



HAL
open science

Recherche d'activités antimicrobiennes chez des mollusques marins. Purification et caractérisation partielle de peptides antimicrobiens isolés à partir de l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* et de bactéries associées.

Diane Defer, Nathalie Bourgougnon, Yannick Fleury Mcf

► **To cite this version:**

Diane Defer, Nathalie Bourgougnon, Yannick Fleury Mcf. Recherche d'activités antimicrobiennes chez des mollusques marins. Purification et caractérisation partielle de peptides antimicrobiens isolés à partir de l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* et de bactéries associées.. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bretagne Sud, 2009. Français. <NNT : >. <tel-00485008>

HAL Id: tel-00485008

<https://theses.hal.science/tel-00485008v1>

Submitted on 19 May 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



THESE / Université de Bretagne-Sud
sous le sceau de L'université Européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de :
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE
BRETAGNE-SUD
Mention : Biologie
École Doctorale SICMA

présentée par

Defer – Diane

Préparée à L'UBS, Vannes (Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884) et à l'UBO, Quimper (Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, EA3882)

Recherche d'activités
antimicrobiennes chez des
mollusques marins.
Purification et caractérisation
partielle de peptides
antimicrobiens isolés à partir
de l'hémolymphe de
Crassostrea gigas et de
bactéries associées.

Thèse soutenue le 24 septembre 2009 devant le jury composé de :

Roch Philippe

Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier 2 / rapporteur

Nicolas Jean-Louis

Directeur de recherche Ifremer, Brest / rapporteur

Renault Tristan

Directeur de recherche Ifremer, La Tremblade / examinateur

Dufour Alain

Professeur, Université de Bretagne-Sud / examinateur

Henry Joël

Maître de Conférences, Université de Caen / examinateur

Baudy-Floc'h Michèle

Directrice de recherche CNRS, Université de Rennes 1 / examinateur

Fleury Yannick

Maître de Conférences, Université de Bretagne-Occidentale / Co-encadrant de thèse

Bourgougnon Nathalie

Professeur, Université de Bretagne-Sud / Directrice de thèse

**Recherche d'activités antimicrobiennes chez des mollusques marins.
Purification et caractérisation partielle de peptides antimicrobiens isolés à partir de
l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* et de bactéries associées.**

Thèse de doctorat, Biologie, Université de Bretagne-Sud, 2009

Résumé

Les systèmes de communication chimique constituent un élément indispensable dans l'établissement des relations intra- ou inter-espèces en milieu marin, tissant un réseau de relations entre individus, au sein d'un écosystème. Les invertébrés dépourvus de système immunitaire à mémoire et au mode de vie sessile produisent des métabolites bioactifs jouant un rôle essentiel dans la réponse aux pressions environnementales telles que la prédation et la défense vis-à-vis d'autres organismes potentiellement pathogènes. L'objectif de ces travaux a été d'identifier la présence de peptides antimicrobiens chez des mollusques bivalves et des gastéropodes d'importance commerciale. Ainsi, la recherche de molécules de défense antimicrobiennes de nature peptidique a été conduite dans des extraits acides des mollusques bivalves, *Cerastoderma edule*, *Ruditapes philippinarum*, *Ostrea edulis* et gastéropodes, *Buccinum undatum*, *Littorina littorea* et *Crepidula fornicata*, ainsi qu'à partir de l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*. Les extraits ont été pré-purifiés par extraction sur phase solide C18 (SPE) et l'élution a été réalisée par 3 paliers successifs de 10%, 40% et 80% d'ACN-0,1% TFA. L'activité antibactérienne a été évaluée *via* la détermination de la CMI sur un ensemble de bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻; et l'activité antivirale a été déterminée *in vitro* sur le modèle virus *Herpes simplex* type 1/cellules Vero *via* la viabilité cellulaire. Les espèces *C. edule*, *L. littorea* et *C. gigas* se sont révélées être les espèces les plus efficaces et non cytotoxiques. Une caractérisation partielle de l'activité détectée chez ces espèces a permis de déterminer la nature peptidique des molécules actives. La purification des peptides antimicrobiens a été conduite sur l'hémolymphe de *C. gigas* et a permis l'identification d'un peptide dont la structure de type lantibiotique laisse présager une origine bactérienne. L'hypothèse d'une association entre *C. gigas* et des bactéries nous a conduit, à partir de cultures d'huîtres non axéniques, à rechercher des bactéries antagonistes dans l'hémolymphe et a permis d'isoler 2 *Vibrio* spp. et 3 *Pseudoalteromonas* spp. A partir de la bactérie *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, un composé actif a été partiellement caractérisé. L'ensemble de ces résultats suggère que les bactéries associées au système immunitaire pourraient jouer un rôle essentiel dans la défense des bivalves.

Mots clés : Mollusques marins, activités antibactériennes et antivirales, peptides antimicrobiens, purification.

**Screening for antimicrobial activities in marine molluscs.
Purification and partial characterisation of antimicrobial peptides from *Crassostrea gigas* hemolymph and associated bacteria**

PhD Thesis, Biology, Université de Bretagne-Sud, 2009

Abstract

The chemical communication systems constitute an essential element in the establishment of intra- or inter-species relationships in marine environment, weaving a dense network of relations between individuals, in ecosystem. The invertebrates lacking of an immune system and usually sessile produce this type of bioactive metabolites playing a crucial role in the answer to the environmental pressures like the predation and the defence against potentially pathogens organisms. The aim of this work was to identify antimicrobial peptides in commercially bivalve and gastropod marine molluscs. Thus, the search for antimicrobial molecules from peptidic nature was undertaken in acid extracts of bivalve molluscs *Cerastoderma edule*, *Ruditapes philippinarum*, *Ostrea edulis*, and gastropods *Crepidula fornicata*, *Buccinum undatum* and *Littorina littorea* and from *Crassostrea gigas* hemolymph. The extracts were pre-purified by Solid Phase Extraction C18 (SPE) and elution was ensured by three successive steps of 10%, 40% and 80% of ACN-0.1% TFA. The antibacterial activities were assayed by determination of the CMI against a panel of target bacteria including Gram⁺ and Gram⁻ bacteria. In parallel, antiviral activities were assayed *in vitro* against *Herpes simplex* virus type 1 and Vero cells by cell viability. The species *C. edule*, *L. littorea* and *C. gigas* proved to be the most effective and non cytotoxic species. A partial characterization of the activity detected in these species allowed determining the protenaceous nature of the active molecules. The purification of antimicrobial peptides realised on the *C. gigas* hemolymph led us to the identification of a peptide which structure lets foresee a bacterial origin. The hypothese of an association between *C. gigas* and bacteria led us from non axenic oysters culture to search for antagonist bacteria in *C. gigas* hemolymph and has conduced to isolate 2 *Vibrio* spp. and 3 *Pseudoalteromonas* spp. The *Pseudoalteromonas* spp. hCg 5 strain, allowed to partially characterized an active compound. Whole of these results suggests that the bacteria associated with the immune system could play an essential function of defence in bivalves.

Keywords : Marine molluscs, antibacterial and antiviral activities, antimicrobial peptides, purification.

Liste des travaux et publications

Publications internationales

Defer, D., Bourgougnon, N., Fleury, Y., 2009. Detection and partial characterisation of an antimicrobial peptide (littorein) from the marine gastropod *Littorina littorea*. International Journal of Antimicrobial Agents 34, 188-190.

Defer, D., Bourgougnon, N., Fleury, Y., 2009. Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. Aquaculture 293, 1-7.

Rashid, Z.M., Lahaye, E., Defer, D., Douzenel, P., Perrin, B., Bourgougnon, N., Sire, O., 2009. Isolation of a sulphated polysaccharide from a recently discovered sponge species (*Celtodoryx girardae*) and determination of its anti-herpetic activity. International Journal of Biological Macromolecules 44, 286-293.

Dans le cadre du Master 2

Rondeau-Mouro, C., Defer, D., Leboeuf, E., Lahaye, M., 2008. Assessment of cell wall porosity in *Arabidopsis thaliana* by NMR spectroscopy. International Journal of Biological Macromolecules 42, 83-92.

Dans le cadre du Master 1

Bazes, A., Silkina, A., Defer, D., Bernède-Bauduin, C., Quéméner, E., Braud, J.-P., Bourgougnon, N., 2006. Active substances from *Ceramium botryocarpum* used as antifouling products in aquaculture. Aquaculture 258, 664-674.

Chapitre d'ouvrage

Fleury, Y., Defer, D., Bourgougnon, N., 2008. Antimicrobial peptides and antiviral activities from marine fished or farmed animals, in "Added Value to Fisheries Waste", J.B. Bergé Ed., Transworld Research Network – Indian publisher. Chapter 8, 163-196.

Communications orales internationales

Defer, D., Bourgougnon, N., Fleury, Y. Putative antimicrobial activity of hemolymph from adult Pacific oyster *Crassostrea gigas*. First International Symposium on Antimicrobial peptides, Nantes 21-23 juin 2006.

Defer, D., Bourgougnon, N., Fleury, Y. Detection of Antibacterial and Antiviral Activity in Marine Molluscs: New Alternative Strategy to Substituted Antibiotics in Aquaculture. WEFTA – Health aspect of seafood consumption, Florence 17-19 septembre 2008.

Defer, D., Bourgougnon, N., Fleury, Y. Partial Characterization of Antimicrobial Peptide from The Marine Gastropoda : *Littorina littorina*. WEFTA – Health aspect of seafood consumption, Florence 17-19 septembre 2008.

Communications par affiche

Defer, D., Bourgougnon, N., Fleury, Y. Détection d'activité antimicrobienne chez plusieurs espèces marines de bivalves et gastéropodes. Forum Ingrédients Santé – UBS Vannes 6 et 7 décembre 2007.

Defer, D., Bourgougnon, N., Fleury, Y. Antimicrobial activity in marine bivalve and gastropod species. 4^{ème} Symposium International Santé Mer, Granville 4 et 5 octobre 2007.

Premier prix Jeune Chercheur attribué par le Pôle de compétitivité breton VALORIAL

Defer, D., Bourgougnon, N., Fleury, Y. Détection d'activité antimicrobienne chez plusieurs espèces marines de bivalves et gastéropodes. Forum Ingrédients Santé – UBS Vannes 6 et 7 décembre 2007.

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier la région Bretagne et le Ministère Délégué à l'Enseignement Supérieur et à la Recherche pour le financement de ce projet (Allocation de Recherche Doctorale).

Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr Nathalie Bourgougnon, Professeur à l'Université de Bretagne-Sud, pour avoir assuré la direction de cette thèse. Un grand merci pour la foi qu'elle témoigne envers les jeunes chercheurs, pour sa stimulation et la motivation apportée au cours de ces années de collaboration. Encore merci de m'avoir soutenue tout au long de cette aventure et de m'avoir encouragée à m'investir dans l'enseignement.

Je remercie vivement le Dr Yannick Fleury, Maître de Conférences à L'Université de Bretagne Occidentale de Quimper pour son encadrement scientifique et le temps qu'il m'a consacré durant ces quatre années. Son expérience et sa persévérance m'ont permis d'accomplir avec rigueur ces travaux.

Je tiens également à remercier les directeurs des laboratoires, le Dr Ivan Le Guérinel (LUBEM) ainsi que les Professeurs Dominique Haras et Karine Rehel (LBCM) de m'avoir accueillie au sein de leur équipe de recherche. Merci Dominique pour ton soutien moral et tes conseils scientifiques et surtout pour le temps que tu m'as consacré.

Je remercie tout particulièrement les Docteurs Joël Henry et Céline Zatylnyj-Gaudin, Maîtres de Conférences de l'Université de Caen/basse Normandie (UFR : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée) pour leur collaboration dans ce projet par la réalisation des analyses de spectrométrie de masse. Mes remerciements vont également au Dr Michèle Baudy-Floc'h de l'équipe « Criblage et Auto-assemblage Fonctionnels », Directrice de Recherche au sein de l'UMR CNRS 6226 à l'Université de Rennes 1 pour son investissement dans la synthèse peptidique. J'adresse en outre toute ma gratitude aux Docteurs Joël Henry et Michèle Baudy-Floc'h d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements aux Directeurs de Recherche Philippe Roch et Jean-Louis Nicolas qui me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie vivement d'avoir accepté de corriger, d'évaluer ce travail, de m'avoir fait part de leurs temps et de remarques pertinentes pour accomplir ce manuscrit.

Je tiens à remercier également les Dr Alain Dufour, Professeur à l'Université de Bretagne-Sud et Tristan Renault, Directeur de Recherche Ifremer pour le soutien scientifique qu'ils ont apporté lors des comités de thèse ainsi que pour leur participation à ce jury de thèse mais surtout pour leur disponibilité et implication lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du LUBEM et de l'IUT de Quimper pour leur accueil chaleureux et pour m'avoir soutenue durant ces années de labeur. Une pensée particulière à Louis Coroller qui a partagé son bureau et m'a apporté beaucoup de soutien, et même le logis (merci à Sophie aussi!). Un grand merci aux filles, Estelle Bellanger et Eugénie Baril pour leur amitié et les soirées bavardage, mais aussi pour m'avoir tant de fois hébergée! Merci à tous ceux de l'équipe qui m'ont apporté conseils et sympathie, Ivan Le Guerinel, Patrick Le Chevalier, Denis de Labroise, Sophie Cliquet, Emile Biliard, Pierre Mafard sans oublier Billy et Marie-Hélène et Anne Levant bien sûr. Egalement un grand merci à tous les doctorants du LUBEM, Sabine Stachowski, Hana Ben Yaghlane, Brice et Kashif pour leur amitié.

Je remercie vivement toute l'équipe du LBCM pour leur aide technique et scientifique. Merci à Chrystel Marty pour les cellules, à Xaviera Pennanec pour le MALDI, à Gael Le Pennec pour les TP et à Johan Garderes pour ses tuyaux. (Merci encore à tous ceux que j'oublie).

Je remercie les membres du LIMATB pour leur sympathie et leur soutien. Merci à Véronique et Olivier Sire pour leur aide scientifique et leur accueil à Meucon. Merci aux filles, Adélaïde Le Grand et Elodie Lahaye pour le soutien entre doctorantes! Merci à Philippe Douzenel pour son amitié et les « problèmes » d'HPLC, ainsi qu'à Alexis. Merci à Gilles Bedoux et Virginie Dupont pour leur sympathie.

Je voudrais également remercier Véronique Vellet pour sa patience et sa capacité à résoudre les problèmes administratifs. Un grand merci à Christine Mehring pour la rapidité et l'efficacité du PEB. Merci à Judith Christie pour l'Anglais.

J'adresse mes remerciements aux fournisseurs de mollusques, Mr Nicolazo et Claude Bourbon & Catherine.

Je remercie J-P Bergé de m'avoir permis de participer au WEFTA.

Je voudrais également remercier tous les stagiaires qui ont apporté leur contribution à ce travail : Estelle, Gaëlle, Lore, Florie, Noémie et Kévin.

Je tiens à remercier Claudie pour les TP et les cafés!

Je remercie également Karen Le Dessert pour l'aide administrative du doctorant, ainsi que Sandra Lambert pour son aide à l'enseignement.

Je remercie tout particulièrement les doctorantes devenues amies. Merci Alex pour m'avoir fait goûter à la vraie vie du doctorant ...et pour ton éternelle réponse à tout! Merci à toi Alla d'avoir été là ainsi que de m'avoir fait rire quand on en avait besoin. Merci à toi aussi Kim, tout particulièrement ces derniers jours, sans toi j'y serais encore! Mais aussi pour toutes ces petites pauses et le soutien quotidien. Benoît, merci à toi également pour tes petites discussions scientifiques et ton énergie.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Hélène pour son accueil plus que généreux et les soirées au coin de la cheminée. Merci également à Caro et Vince pour m'avoir accepté dans leur vie pendant presque 1 an. Merci à Chacha et Sacha pour les week end décompression.

Merci maman, Anne, Fanny, Thomas d'avoir relu avec tant de patience ce manuscrit!

Merci à toi Thomas de m'avoir encouragée jusqu'au bout mais surtout d'avoir toujours su être disponible et attentif. Merci d'avoir été là à chaque moment difficile.

Merci à toute ma famille, vous qui m'avez toujours aidée à réaliser ce qui me tenait à cœur. Merci pour votre soutien, votre patience et encore pour m'avoir aidé à retrouver l'optimisme nécessaire.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Liste des travaux et publications.....	iii
Remerciements	v
Table des matières.....	viii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiv
Introduction générale.....	1
Introduction bibliographique : Les réactions immunitaires des mollusques marins	4
1 La réponse immunitaire cellulaire : Les hémocytes.....	5
1.1 Classification des hémocytes	5
1.2 L'agrégation hémocytaire	7
1.3 La phagocytose	7
2 La réponse immunitaire humorale	14
2.1 Lysozyme et enzymes lysosomales	14
2.2 Cytokines	15
2.3 Lectines.....	16
2.4 Les Peptides AntiMicrobiens (PAMs).....	18
2.4.1 Modes d'action des PAMs.....	37
2.4.2 Les peptides antimicrobiens chez les mollusques marins.....	42
2.4.3 Autres molécules de défense détectées chez les mollusques marins	47
Objectifs de travail.....	50
MATÉRIELS & MÉTHODES	51
3 Matériel biologique	52
3.1 L'huître creuse japonaise <i>Crassostrea gigas</i>	52
3.2 Mollusques bivalves et gastéropodes.....	52
3.3 Lignée cellulaire mammaliennes : les cellules Vero (ATCC: CCL 81).....	53
3.4 Le virus herpès, VHS-1	57
3.4.1 Préparation du stock viral	57
3.4.2 Détermination du titre infectieux de la suspension virale stock	57
3.5 Les microorganismes bactériens.....	61
3.6 Tests d'activité biologique.....	63
3.6.1 Evaluation des activités antivirales et de la cytotoxicité.....	63
3.6.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	65
3.6.3 Détermination de la concentration minimale létale	65
3.6.4 Détection d'activité par diffusion dans un milieu gélosé.....	66
3.6.5 Viabilité par cinétique d'inactivation	67

4	Méthodes d'extraction et de purification	68
4.1	Extraction acide	68
4.2	Pré-purification : Chromatographie en phase inversée manuelle (SPE-C18)	68
4.2.1	Dosage des protéines	69
4.2.2	Digestions par des endoprotéases : détermination de la nature protéique des composés antimicrobiens	70
4.2.3	Gel d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes : SDS- PAGE	71
4.3	Chromatographie liquide	72
4.3.1	Chromatographie en phase inverse RP-HPLC	72
4.3.2	Chromatographie d'exclusion stérique ou Gel Filtration	73
4.3.3	Chromatographie par échange d'ions (IEC) : Chromatographie échangeuse de cations	74
4.4	Etude de l'ADN bactérien	75
4.4.1	Extraction d'ADN bactérien	75
4.4.2	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	75
4.4.3	Analyse du produit de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	76
4.5	Précipitation au sulfate d'ammonium ((NH ₄) ₂ SO ₄)	76
5	Méthodes d'analyse	77
5.1	Caractérisation moléculaire	77
5.1.1	Spectrométrie de masse	77
5.1.2	Le séquençage des peptides par dégradation N-terminale d'Edman	79
5.1.3	Synthèse peptidique sur support solide	81
Chapitre I Recherche d'activités antibactériennes et antivirales chez 4 espèces de bivalves et 3 espèces de gastéropodes marins		83
6	Introduction	85
7	Résultats	88
7.1	Extraction acide et fractionnement sur cartouches SPE-C18	88
7.2	Criblage de l'activité antibactérienne par diffusion en milieu gélosé	88
7.3	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	90
7.4	Activité antivirale et cytotoxicité	94
8	Discussion	98
Chapitre II Caractérisation partielle des composés actifs antimicrobiens détectés chez les mollusques marins <i>Cerastoderma edule</i>, <i>Littorina littorea</i> et <i>Crassostrea gigas</i>		103
9	Introduction	104
10	Résultats	106
10.1	Nature biochimique des composés actifs	106
10.2	Evaluation de la masse moléculaire	108
10.3	Approche du mode d'action	108
10.3.1	Détermination de la cinétique d'inhibition de croissance	108
10.3.2	Détermination de la Concentration Minimale Létale (CML)	110
11	Discussion	111
Chapitre III Purification et caractérisation de composés antimicrobiens chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>		114
12	Introduction	116

13 Résultats	120
13.1 Détermination de la nature biochimique et purification des composés antiviraux détectés dans l'hémolymphe.....	120
13.1.1 Traitement par des endoprotéases.....	120
13.1.2 Purification de la fraction non retenue par chromatographie d'exclusion stérique.....	122
13.2 Purification de l'activité antibactérienne à partir de la fraction-SPE 40%.....	124
13.2.1 Purification de la fraction-SPE 40%.....	124
14 Discussion	133
Chapitre IV Recherche et caractérisation de bactéries antagonistes dans l'hémolymphe de <i>Crassostrea gigas</i>	138
15 Introduction	141
16 Résultats	143
16.1 Isolement et identification de bactéries antagonistes à partir de l'hémolymphe de l'huître creuse <i>C. gigas</i>	143
16.2 Etude et purification de l'inhibiteur produit par la bactérie <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5.....	145
16.2.1 Mesure de l'activité du surnageant de la bactérie <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5 en fonction du temps et de ses caractéristiques de croissance.....	145
16.2.2 Précipitation au sulfate d'ammonium ((NH ₄) ₂ SO ₄).....	147
16.2.3 Thermostabilité du composé inhibiteur du surnageant de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5.....	149
16.2.4 Nature biochimique du composé antibactérien produit par <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5.....	149
16.2.5 Evaluation par SDS-PAGE de la masse moléculaire des protéines inhibitrices du surnageant bactérien de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5.....	151
16.2.6 Cinétique de la perte de viabilité.....	153
16.3 Purification par chromatographie en phase inverse (RP-HPLC C18).....	155
16.4 Analyse par spectrométrie de masse.....	155
17 Discussion	156
Conclusion générale et perspectives	162
Références bibliographiques	170
ANNEXE 1	196
18 Les espèces de mollusques marins étudiées	198
18.1 Les Bivalves.....	198
18.1.1 L'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	198
18.1.2 L'huître plate, <i>Ostrea edulis</i>	203
18.1.3 La coque, <i>Cerastoderma edule</i>	205
18.1.4 La palourde, <i>Ruditapes philippinarum</i>	207
18.2 Les gastéropodes.....	210
18.2.1 La crépidule, <i>Crepidula fornicata</i>	210
18.2.2 Le bulot, <i>Buccinum undatum</i>	214
18.2.3 Le bigorneau, <i>Littorina littorea</i>	217
ANNEXE 2	218

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du processus de phagocytose et des processus de destruction des particules phagocytées (D'après (Paillard <i>et al.</i> , 2004)).	8
Figure 2 : Mécanisme du métabolisme oxydatif des phagocytes (D'après (Gonzalez, 2005)).	10
Figure 3 : Processus de production de l'Oxyde Nitrique (NO).	12
Figure 4 : Structure en 3D de peptides antimicrobiens contenant 1 pont disulfure.	24
Figure 5 : Structure en 3D et séquence du peptide « pediocin-like bacteriocin » sakacine P (MMDB ID : 24689).	24
Figure 6 : Structure en 3D de peptides antimicrobiens contenant 2 ponts disulfure.	26
Figure 7 : Structure en 3D de peptides antimicrobiens contenant 3/4 ponts disulfure.	28
Figure 8 : Structure en 3D de la tritrypticine riche en tryptophane et arginine.	32
Figure 9 : Formules chimiques des aminoacides peu communs composant les lantibiotiques (Chatterjee <i>et al.</i> , 2005) et des résidus modifiés thiazole et oxazole de la microcine B17 (Walsh & Nolan, 2008).	35
Figure 10 : Structures primaires des lantibiotiques mersacidine, nisine A (Wiedemann <i>et al.</i> , 2006) et lacticine 481 (Dufour <i>et al.</i> , 2007). Dha : 2,3-didéhydroalanines ; Dhb : (Z)-2,3-didéhydrobutyrines ; Ala-S-Ala : lanthionine ; Abu-S-Ala : β -méthyllanthionine ; Abu : acide aminobutyrique.	35
Figure 11 : Schéma illustrant le mécanisme de perméabilisation membranaire des peptides antimicrobiens en hélice α : (A) modèle « Barrel stave », (B) modèle « Carpet-like », et (C) modèle de pores toroïdaux « Wormhole model ». Les faces hydrophiles et hydrophobes des peptides (représentés par des cylindres) sont respectivement colorées en bleu et gris. Les vues du dessus des modèles « barrel-stave » et pores toroïdaux sont représentées dans des fenêtres (d'après (Toke, 2005)).	39
Figure 12 : Structure en 3D de la défensine MGD-1 caractérisée chez <i>M. galloprovincialis</i> (MMDB ID: 15038) à gauche et de la mytiline B caractérisée chez <i>M. galloprovincialis</i> et <i>M. edulis</i> à droite (MMDB ID: 58709).	41
Figure 13 : A : Alignements de séquences des isoformes des myticines de <i>R. decussatus</i> avec les myticines A et B de <i>Mytilus</i> sp. B : Alignements des séquences d'acides aminés de la mytiline de <i>R. decussatus</i> , comparées avec les mytilines de <i>Mytilus</i> sp. (*) résidus identiques, (:) substitutions conservées et (.) substitutions semi conservées. Les séquences similaires sont surlignées en gris et les différences de séquence en acides aminés entre les 2 formes sont en gras. Les séquences consensus en cystéines sont indiquées en gras (d'après (Gestal <i>et al.</i> , 2007)).	45
Figure 14 : Structure en 3D de la défensine CgDef identifiée chez <i>C. gigas</i> (MMDB ID: 36150).	45
Figure 15 : Organisation de la microplaque pour la titration du virus.	56
Figure 16 : Organisation de la microplaque pour les évaluations d'activité antivirale et de cytotoxicité.	62
Figure 17 : Schéma du protocole de purification sur colonnes SPE-C18.	69
Figure 18 : Schéma du séquençage peptidique selon la méthode de dégradation N-terminale d'Edman.	78
Figure 19 : Schéma du processus de synthèse peptidique en phase solide.	80
Figure 20 : Structure chimique du groupement protecteur de la fonction α -aminée Fmoc (N-[9-fluorényl]méthoxycarbonyl).	80
Figure 21 : Protocole d'extraction et de pré-purification sur colonne C18 des différents bivalves et gastéropodes étudiés dans le chapitre 1.	84
Figure 22 : Analyse par SDS-PAGE de la fraction-SPE 40% de l'hémolymphe de <i>C. gigas</i> (A) et détection d'activité par la méthode des gels recouverts ensemencés à 1.10^4 UFC/mL avec <i>M. luteus</i> (B). MM : marqueurs moléculaires.	107
Figure 23 : Cinétique d'inhibition de <i>Y. ruckeri</i> par la fraction-SPE 40% de <i>C. edule</i> à une concentration équivalente à 10 CMI ($750 \mu\text{g.mL}^{-1}$).	109

Figure 24 : Cinétique d'inhibition de <i>M. luteus</i> par la fraction-SPE 40% de <i>L. littorea</i> à une concentration équivalente à 2 CMI (890 µg.mL ⁻¹).	109
Figure 25 : Alignements de séquences des défensines isolées chez les moules <i>M. edulis</i> (défensines A et B) (Charlet <i>et al.</i> , 1996) et <i>M. galloprovincialis</i> (MGD-1 et MGD-2) (Charlet <i>et al.</i> , 1996; Mitta <i>et al.</i> , 1999b) et chez les huîtres <i>C. gigas</i> (Cg-Def, Cg-Defh1 et Cg-Defh2) (Gonzalez <i>et al.</i> , 2007) et <i>C. Virginica</i> (AOD) (Seo <i>et al.</i> , 2005).	115
Figure 26 : Protocole de purification de composés à activité antivirale à partir de la fraction-SPE 0% l'hémolymph de <i>C. gigas</i>	117
Figure 27 : Protocole de la purification des composés à activité antibactérienne dans la fraction-SPE 40% de l'hémolymph de <i>C. gigas</i>	119
Figure 28 : Purification par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex [®] G50, h : 100cm, Ø : 2,5cm) de la fraction-SPE 0%. L'élution est assurée par de l'acide acétique 1%, à un débit de 0,2 mL.min ⁻¹ et 8 mL sont collectés par fraction. La densité optique à 280 nm (losange noir) et l'activité antivirale ont été déterminées dans chaque fraction.	121
Figure 29 : Purification par RP-HPLC C18 (C18 UP5HSC-25Q5 250 x 4,6 mm) des fractions 52 à 56 rassemblées après chromatographie d'exclusion stérique. Les pourcentages d'activité antivirale et de cytotoxicité sont représentés respectivement en gris clair et foncé sur le chromatogramme.	121
Figure 30 : Chromatogramme de la fraction-SPE 40% après élution par 45% ACN-0,1% TFA, débit à 0,5 mL.min ⁻¹ sur une colonne de gel filtration (TSK gel G2000 SWXL, 7,8 mm x 30 cm ; TSK gel SWXL Guardcolumn, 7,5 mm x 7,5 cm).	123
Figure 31 : Analyse par RP-HPLC (colonne C18, Interchim, UP5HSC-25QS 250 x 4,6 mm), des fractions 23 à 26 rassemblées, provenant de l'élution sur colonne de gel filtration TSK gel G2000 SWXL, par un gradient d'ACN-0,07% TFA à 0,5%.min ⁻¹ pour un débit de 0,8 mL.min ⁻¹	123
Figure 32 : Analyse par spectrométrie de masse de la fraction 76, issue de la purification de la fraction-SPE 40% par chromatographie d'exclusion stérique et RP-HPLC C18.	125
Figure 33 : Analyse par spectrométrie de masse des fractions actives en (A) et (B), provenant de 2 purifications à partir de 2 campagnes de prélèvements d'hémolymph.	125
Figure 34 : Chromatogramme de la fraction-SPE 40% après élution par un gradient de pH sur colonne échangeuse de cations (CIM Disk monolithic column, 16 i.d. x 6 l. mm. Interchim). La zone grisée correspond aux fractions dans lesquelles l'activité a été retrouvée.	127
Figure 35 : Analyse par RP-HPLC (colonne C18, Interchim, UP5HSC-25QS 4,6 mm x 250 mm) des fractions 14,5-15-15,5 actives rassemblées provenant de la purification par chromatographie échangeuse de cations. La zone grisée correspond aux fractions dans lesquelles l'activité a été retrouvée.	127
Figure 36 : (A) Chromatogramme ionique total de la fraction 38, issue de la séparation sur RP-HPLC des fractions actives après chromatographie échangeuse de cations - (B) Spectre de masse du pic chromatographique majoritaire de temps de rétention 22,10 min.	128
Figure 37 : Structures chimiques proposées pour le peptide putatif identifié à la masse de 636,17 Da.	129
Figure 38 : Intermédiaire de synthèse 1.	130
Figure 39 : Analyse en spectrométrie de masse de l'intermédiaire de synthèse 1.	130
Figure 40 : Séquences peptidiques proposées pour les 3 peptides, avec substitution de la déhydroalanine par un résidu alanine.	131
Figure 41 : Spectres de masse des pics chromatographiques majoritaires C1, C2 et C3.	132
Figure 42 : Protocole de dénombrement et d'isolement de souches bactériennes à partir du compartiment hémolymphatique de <i>C. gigas</i> et recherche de bactéries antagonistes.	139
Figure 43 : Protocole de purification de la souche bactérienne <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5 isolée du compartiment hémolymphatique de <i>C. gigas</i>	140
Figure 44 : Concentration bactérienne déterminée dans le compartiment hémolymphatique de 61 individus de <i>C. gigas</i>	142

Figure 45 : Cinétique de croissance (Log DO _{600nm}) de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5 à 18°C en milieu Marine Broth et activité anti- <i>Listonella anguillarum</i> (UA/mL).....	146
Figure 46 : Activité du surnageant (UA/mL) de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5, précipité à différents pourcentages de saturation en (NH ₄) ₂ SO ₄	146
Figure 47 : Activité inhibitrice (UA/mL) du précipité de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5, après différents temps d'incubation à différentes températures. La souche cible utilisée est <i>Y. ruckeri</i>	148
Figure 48 : Evaluation de l'activité inhibitrice (UA/mL) du surnageant de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5 concentré après digestions enzymatiques.....	150
Figure 49 : Analyse électrophorétique (SDS-PAGE) du surnageant et du précipité de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5. Le gel est recouvert après plusieurs lavages par du milieu Colombia Agarensemencé avec <i>Yersinia ruckeri</i> à 1.10 ⁶ UFC/mL.....	150
Figure 50 : Cinétique de la perte de viabilité de <i>Y. ruckeri</i> (1.10 ⁶ UFC/mL) en présence du précipité de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5, aux concentrations de la CMI (5 µg.mL ⁻¹) et de 2 fois la CMI (10 µg.mL ⁻¹).....	152
Figure 51 : Chromatogramme du précipité de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5, obtenu par injection de 590 µg de protéines totales sur une colonne RP-HPLC C18 (C18 UP 5HSC-25QS, 250 x 10 mm) munie d'une colonne de garde (Upti-screen Modulo Cart, 10 mm i.d 5HS49750). Le gradient d'ACN est représenté en bleu, le débit est de 5 mL.min ⁻¹ d'ACN-0,07% TFA 1%.min ⁻¹ . Les fractions actives sont représentées en gris.....	154
Figure 52 : Spectre de masse de la fraction 36 issue de la purification par RP-HPLC C18 du surnageant précipité.	154
Figure 53 : Photographie de <i>Crassostrea gigas</i> (photographie personnelle).	197
Figure 54 : Anatomie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (d'après (Howard & Smith, 1983)).	197
Figure 55 : Cycle de développement de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> (D'après (Fabioux, 2004)).	200
Figure 56 : Cycle de production de L'huître creuse <i>C. gigas</i> (FAO©, 2007-2009).....	200
Figure 57 : Photographies d' <i>Ostrea edulis</i> (à gauche : www.labelledugolfe.net/photo/gplate.jpg ; à droite : http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis).	202
Figure 58 : Photographies de <i>Cerastoderma edule</i> (photographies personnelles).	204
Figure 59 : Photographies de <i>Ruditapes philippinarum</i> (photographies personnelles).....	206
Figure 60 : Photographies de <i>Crepidula fornicata</i>	209
Figure 61 : Cycle de développement de la Crépidule <i>Crepidula fornicata</i> (d'après (Dupont, 2004)).	211
Figure 62 : Photographies de <i>Buccinum undatum</i> (photographies personnelles).....	213
Figure 63 : Photographies de <i>Littorina littorea</i> (photographies personnelles).....	216

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens en hélice α , de vertébrés et d'invertébrés et structure en 3D de peptides antimicrobiens en hélice α .	21
Tableau 2 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 1 pont disulfure.	24
Tableau 3 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 2 ponts disulfure.	26
Tableau 4 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 3/4 ponts disulfure.	28
Tableau 5 : Caractéristiques générales des pénaeidines de crevette.	30
Tableau 6 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens d'invertébrés et de vertébrés riches en certains acides aminés.	32
Tableau 7 : Peptides antimicrobiens isolés et caractérisés chez <i>Mytilus</i> sp. et <i>Crassostrea</i> sp.	43
Tableau 8 : Glycoprotéines antimicrobiennes et peptides antimicrobiens isolés chez des mollusques opisthobranches.	48
Tableau 9 : Exemple de calcul du facteur (d) utilisé pour la détermination du titre infectieux de VHS-1 selon la méthode de Reed et Muench (1938).	58
Tableau 10 : Bactéries sélectionnées pour la détection d'activité antibactérienne.	60
Tableau 11 : Masse de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (g) à ajouter à 100 mL de milieu Marine Broth, à 4 °C pour une teneur initiale en sels du milieu de 31,35 g.	77
Tableau 12 : Extraits et fractions obtenus à partir des bivalves et gastéropodes sélectionnés.	87
Tableau 13 : Activité antibactérienne dans les fractions provenant d'extraits acides des mollusques marins, contre deux espèces cibles, <i>M. luteus</i> et <i>L. anguillarum</i> .	87
Tableau 14 : Spectres d'activité des fractions-SPE 40% ACN obtenues pour chaque espèce de mollusque. L'activité est exprimée en CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).	89
Tableau 15 : Spectres d'activité des fractions-SPE 80% ACN obtenues pour chaque espèce de mollusque. L'activité est exprimée en CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).	91
Tableau 16 : Pourcentage de protection antivirale et de cytotoxicité vis-à-vis du modèle VHS-1/Vero des fractions-SPE concentrées à 1% (v/v) provenant des extraits des mollusques marins.	93
Tableau 17 : Pourcentage de protection antivirale et de cytotoxicité vis-à-vis du modèle VHS-1/Vero des fractions-SPE concentrées à 1% (v/v) provenant de l'hémolymphe de <i>C. gigas</i> .	93
Tableau 18 : Détermination de l'activité antivirale (CE_{50}), de la cytotoxicité (CC_{50}) et de l'indice de sélectivité (IS) des fractions-SPE 40% et 80% chez les espèces ayant révélées de l'activité.	95
Tableau 19 : CMI obtenues après traitements enzymatiques des fractions-SPE 40% provenant des espèces <i>C. edule</i> , <i>C. gigas</i> et <i>L. littorea</i> . La souche cible utilisée est <i>M. luteus</i> .	105
Tableau 20 : Détection d'activité antivirale après digestions enzymatiques par des endoprotéases.	120
Tableau 21 : Caractéristiques macroscopiques des colonies isolées.	142
Tableau 22 : Spectres d'activité des surnageants de culture des 6 souches inhibitrices.	144
Tableau 23 : Détermination des genres bactériens des bactéries inhibitrices isolées chez <i>C. gigas</i> .	144
Tableau 24 : Détermination du taux et du rendement de purification après précipitation du surnageant de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5 par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 100% de saturation. La souche cible utilisée est <i>L. anguillarum</i> .	148
Tableau 25 : Activité anti- <i>L. anguillarum</i> , <i>Y. ruckeri</i> et <i>V. alginolyticus</i> du précipité de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5.	148
Tableau 26 : Détermination des CMI obtenues à partir du surnageant et du précipité de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. souche hCg 5. La souche cible utilisée est <i>Yersinia ruckeri</i> .	152

Tableau 27 : Bactéries bénéfiques isolées et testées comme agents biologiques chez des bivalves marins.....	166
Tableau 28 : Systématique de <i>Crassostrea gigas</i> (Hayward <i>et al.</i> , 1995).	197
Tableau 29 : Systématique de <i>Ostrea edulis</i> (Hayward <i>et al.</i> , 1995).	202
Tableau 30 : Systématique de <i>Cerastoderma edule</i> (Hayward <i>et al.</i> , 1995).	204
Tableau 31 : Systématique de <i>Ruditapes philippinarum</i> (Hayward <i>et al.</i> , 1995).	206
Tableau 32 : Systématique de <i>Crepidula fornicata</i> (Hayward <i>et al.</i> , 1995).	209
Tableau 33 : Systématique de <i>Buccinum undatum</i> (Hayward <i>et al.</i> , 1995).	213
Tableau 34 : Systématique de <i>Littorina littorea</i> (Hayward <i>et al.</i> , 1995).	216

Introduction générale

La surface de notre planète est recouverte à 71% par des océans. Lesquels sont riches d'une biodiversité estimée entre 3 et $500 \cdot 10^6$ espèces marines (Haug *et al.*, 2002b). A elle seule, la macrofaune marine comprend entre 0,5 et $10 \cdot 10^6$ espèces (De Vries & Hall, 1994). Le milieu marin comporte également une très grande diversité de microorganismes (champignons, bactéries, microalgues et virus) dont la concentration moyenne est estimée *a minima* à 10^3 - 10^6 par millilitre d'eau, pour les bactéries (Benkendorff *et al.*, 2001). Avec plus de 100 000 espèces, le phylum des mollusques est le 2^{ème} en importance après celui des arthropodes. Plus 50 000 espèces de mollusques marins ont été décrites à ce jour (Kornprobst, 2005).

Cette biodiversité océanique dépend principalement des interactions avec l'environnement et intra- et inter-espèces. Le potentiel du milieu marin, comme ressource exploitable en biotechnologies, reste encore insuffisamment exploré. Les organismes marins présentent donc un intérêt scientifique énorme. En effet, ils possèdent des structures, des voies métaboliques, des systèmes reproducteurs et des mécanismes de perception et de défense uniques parce qu'ils ont su s'adapter à leur environnement, parfois hostile. L'identification de nouvelles substances naturelles marines bioactives est une voie prometteuse pour identifier des stratégies thérapeutiques innovantes.

Les invertébrés constituent plus de 90% des espèces animales connues. Ils possèdent un système de défense primitif particulièrement efficace. Une attention toute particulière a été portée aux invertébrés marins fixés et dans de nombreux cas, dépourvus de protections mécaniques. Ces organismes tels que les spongiaires, bryozoaires, tuniciers, cnidaires, échinodermes et les ascidies (parmi les embranchements les plus étudiés) ont développé des stratégies de défense basées sur la production de substances dites allélopathiques. A une biodiversité marine considérable correspond une vaste chimiodiversité. Les composés décrits appartiennent généralement aux classes chimiques des peptides et protéines (Cimino *et al.*, 1999; Aneiros & Garateix, 2004), des terpènes (Gaspar *et al.*, 2008), des polypropionates (Suenaga *et al.*, 2004), des composés azotés (Garson, 2006), des macrolides (Blunt *et al.*, 2006), des dérivés d'acides gras (Ojika *et al.*, 1990), des stérols (Gerwick, 1993) et des composés mixtes (Maktoob & Ronald, 1997). Ces organismes filtreurs et sessiles peuvent également vivre en association avec de nombreux organismes qui peuvent être des symbiontes,

des commensaux, des opportunistes ou encore des parasites. Du fait de ces associations, l'origine exacte des métabolites isolés peut être difficile à déterminer. En effet, certaines molécules d'intérêt d'origine marine isolées chez des invertébrés se sont en fait avérées être produites par leur symbionte bactérien (Kornprobst, 2005).

De nombreuses molécules extraites à partir d'invertébrés marins incluant les bivalves, sont connues pour présenter un large spectre d'activités antimicrobiennes. Ainsi, il a été mis en évidence que certaines molécules affectaient la croissance et le développement de bactéries, de virus, de champignons et de levures (Nakamura *et al.*, 1988; Mitta *et al.*, 2000c; Zasloff, 2002). Chez les mollusques marins, des activités antibactériennes et antivirales ont été décrites plus spécifiquement chez des gastéropodes tels que *Dolabella auricularia* et *Elysia rufescens* au niveau de sécrétions, du ventricule digestive ou de la glande de l'albumen (Hamann *et al.*, 1996; Iijima *et al.*, 2003; Ashour *et al.*, 2006) et chez les bivalves tels que les moules et les huîtres au sein de l'hémolymphe, dans les branchies et le manteau (Charlet *et al.*, 1996; Hubert *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 1999a; Seo *et al.*, 2005; Roch *et al.*, 2008).

Parmi les substances antimicrobiennes décrites, les peptides sont prédominants. Les peptides antimicrobiens sont ubiquitaires dans la nature et produits par tous les organismes pluricellulaires. Ils constituent, par ailleurs, des éléments clés du système immunitaire. Bien que ces peptides marins démontrent une réelle efficacité pour la destruction de microorganismes (Zasloff, 2002; Kruse & Kristensen, 2008) peu d'entre eux sont exploités. Par exemple, l' ω -conopeptide extrait du venin du mollusque bivalve *Conus magus* est à l'origine de l'analgésique Ziconotide (prialtTM) actuellement en phase III des tests cliniques dans les traitements de la douleur (McIntosh *et al.*, 2000; Olivera, 2006). Le depsipeptide cyclique Kahalalide F (Pharma Mar) et le peptide cytotoxique Dolastatine 10, respectivement extraits des mollusques gastéropode *Elisya grandifoli* et *Dolabella auricularia*, sont actuellement en essais cliniques de phase II comme agents anticancéreux potentiel (Ashour *et al.*, 2006; Rawat *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2008; Martín-Algarra *et al.*, 2009).

Au delà de l'exploitation en thérapeutique humaine, des applications en médecine vétérinaire pourraient être envisageables. Ces molécules naturelles bioactives pourraient présenter un intérêt pratique en aquaculture, dans les systèmes de production confinés comme les écloseries. De plus, l'identification de telles molécules permettrait de définir l'arsenal

chimique de défense de ces invertébrés marins et ainsi d'envisager des applications aussi diverses que les stratégies antibactériennes, antivirales et antifongiques.

Dans ce contexte, les mollusques marins représentent d'une part, une source potentiellement importante de nouveaux composés antimicrobiens pouvant servir de support pour la découverte de molécules bioactives antibactériennes et/ou antivirales, et ainsi contribuer au développement de nouvelles stratégies pour des actions préventives chez différentes espèces aquacoles. D'autre part, face à l'augmentation avérée de la résistance bactérienne aux antibiotiques, l'exploration de nouvelles ressources naturelles pourrait servir de support pour l'identification voire la conception de nouvelles molécules thérapeutiques à large spectre d'activité et sans effets secondaires.

Les espèces de mollusques aquacoles régulièrement confrontées à des microorganismes pathogènes marins sont susceptibles de constituer une source de peptides antibactériens. Selon une approche globale, nous avons choisi de rechercher des composés antimicrobiens chez des mollusques bivalves et gastéropodes marins, d'intérêt économique et présents dans l'environnement conchylicole breton. La recherche de molécules de défense antimicrobiennes de nature peptidique a été conduite à partir des extraits acides des mollusques bivalves, *Cerastoderma edule* (Cardiidae), *Ruditapes philippinarum* (Veneridae), *Ostrea edulis* (Ostreidae) et gastéropodes, *Buccinum undatum* (Buccinidae), *Littorina littorea* (Littorinidae) et *Crepidula fornicata* (Calyptraeidae), ainsi qu'à partir de l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* (Ostreidae). A l'exception de la crépidule (*Crepidula fornicata*), considérée comme une espèce invasive et problématique pour les ressources halieutiques, les espèces sélectionnées n'ont été que peu étudiées en chimie marine dans le cadre de la recherche de substances naturelles allélopathiques. Parmi ces organismes, *C. gigas* tient une place économique majeure en Europe, en France et en Bretagne. De par son statut économique, en raison des différents types d'infections microbiennes rencontrés chez cette espèce en aquaculture, elle est devenue un modèle d'étude pour la compréhension des mécanismes de défense des bivalves.

Ce travail s'inscrit dans le cadre des programmes contractualisés par le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) de l'Université de Bretagne-Sud portant, entre autre, sur l'identification de principes actifs à partir de substances marines et le comportement aux interfaces procaryotes-eucaryotes. Il a été effectué en étroite collaboration avec le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) (Dr. Yannick Fleury).

Introduction bibliographique : Les réactions immunitaires des mollusques marins

Les organismes marins sont en permanence exposés aux microorganismes environnants et doivent faire face aux agressions des pathogènes. Leur survie dépend de leur capacité à reconnaître les microorganismes pathogènes et à déclencher une réponse immune protectrice. Le rôle du système immunitaire est de contrôler l'invasion et la prolifération de ces microorganismes étrangers. Pour lutter contre les agents pathogènes, tels que les bactéries, les virus ou encore les champignons, les êtres vivants ont mis en place 2 grands systèmes de réponse immunitaire, dites innée et acquise (Hoebe *et al.*, 2004). L'immunité innée est un mécanisme de défense universel, rapide et efficace, retrouvé chez tous les organismes multicellulaires, y compris chez les mammifères supérieurs (Beutler, 2004). Elle dépend de la présence de récepteurs, principalement présents dans les cellules immunitaires, capables de reconnaître les déterminants antigéniques des microorganismes. L'immunité acquise, ou réponse immunitaire adaptative et à mémoire, ne se manifeste que chez les vertébrés et met en jeu des mécanismes beaucoup plus sophistiqués, telle que la mémoire immunologique (création d'un large répertoire de médiateurs de reconnaissance antigénique).

Bien que les mollusques ne présentent pas d'immunité acquise, de nombreuses études sur leur immunité innée ont montré qu'elle est basée sur un système de défense complexe qui met en jeu des réactions cellulaires et humorales coordonnées. Chez les mollusques marins, l'épiderme à la surface du corps, la muqueuse épithéliale des tractus respiratoire, gastro-intestinal et reproducteur constituent une première barrière contre les invasions de microorganismes potentiellement pathogènes présents dans le milieu aquatique (Medzhitov & Janeway, 2000). D'autres fonctions physiologiques comme l'action des cils, la motilité, la desquamation et la production de mucus peuvent intervenir (Basset *et al.*, 2003). Cependant, la plupart des mécanismes de défense sont induits après infection et leur activation requiert une reconnaissance spécifique du corps étranger.

Le système immunitaire inné des mollusques bivalves repose sur les constituants cellulaires et les effecteurs humoraux solubles de l'hémolymphe, lesquels jouent un rôle majeur dans la protection de l'animal envers les microorganismes envahisseurs (Mydlarz *et al.*, 2006). A l'heure actuelle, aucun composé adaptatif n'a été identifié dans ces systèmes innés (Söderhäll & Cerenius, 1998; Gueguen *et al.*, 2006b).

Chez les mollusques marins, les hémocytes sont les cellules immunitaires circulantes engagées dans plusieurs réactions cellulaires et la synthèse de molécules immunoactives. Les hémocytes sont capables de phagocyter et de migrer dans tous les tissus. Leur action est dirigée envers les microorganismes afin de les phagocyter et les détruire *via* l'action d'enzymes hydrolytiques ainsi que par la production et la libération de radicaux toxiques de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) et de l'oxyde nitrique (ON). Parmi les principaux effecteurs humoraux telles que les lectines, cytokines et le lysozyme se distinguent les peptides antimicrobiens caractérisés par leurs structures extrêmement hétérogènes (Gueguen *et al.*, 2006b).

La réponse immunitaire cellulaire sera abordée dans une première partie. Par la suite, les effecteurs de la réponse immunitaire humorale seront décrits avec une partie consacrée aux peptides antimicrobiens.

1 La réponse immunitaire cellulaire : Les hémocytes

Les mollusques bivalves disposent d'un système circulatoire de type semi-ouvert, comprenant un cœur et des vaisseaux, par lesquels circule l'hémolymphe contenant des hémocytes ou encore cœlomocytes (Cheng, 1981). Les hémocytes, cellules clés du système de défense, sont les composants primaires de la réponse immunitaire des mollusques bivalves (Wootton *et al.*, 2003). Ils sont présents à la fois dans la circulation (vaisseaux et sinus hémolymphatiques) et dans les tissus et organes (glandes digestives, branchies, manteau, gonades) (Xue & Renault, 2001). Le nombre d'hémocytes circulants peut varier et chuter considérablement lors d'une infection. Afin de pallier à ces fortes variations, les bivalves, comme les autres invertébrés, doivent renouveler sans cesse leurs hémocytes (Johansson *et al.*, 2000).

1.1 Classification des hémocytes

Ces hémocytes sont d'une grande diversité et leur origine est encore incertaine. Certains auteurs suggèrent que les hémocytes proviennent de la différenciation de cellules des tissus conjonctifs ou du tractus digestif (Auffret, 1989; Cheng, 1996). Etant donné le manque d'identification des sites hématopoïétiques chez les mollusques, la classification des hémocytes reste difficile à définir (Cheng, 1983b; Raman *et al.*, 2008).

Toutefois, différents types hémocytaires sont observés et font l'objet de plusieurs classifications basées sur des critères d'ordre morphologique, cytochimique, fonctionnel ou encore moléculaire (Cheng & Foley, 1975; Pipe, 1990a). Le critère le plus utilisé reste le caractère morphologique. Bien que de nombreux types de cellules hémocytaires aient été identifiés, on considère de manière générale 2 grands types cellulaires : les hémocytes granulaires (granulocytes) et non granulaires (hyalinocytes) (Hine, 1999).

Les granulocytes sont les cellules hémocytaires présentant un cytoplasme dense dû à la présence de granules de forme et de taille variable et un rapport noyau/cytoplasme faible. Les hyalinocytes par opposition correspondent aux cellules hémocytaires présentant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé contenant peu ou pas de granulations. Il s'agit de cellules peu différenciées (Hine, 1999). On les retrouve également sous le nom de macrophages, « macrophage-like », « monocyte-like cells » et agranulocytes. Ils sont généralement plus petits que les granulocytes (Aladaileh *et al.*, 2007).

Les 2 principaux types hémocytaires, granulocytes et hyalinocytes, ont pu être distingués chez *Crassostrea gigas*. Tous les sous-types hémocytaires observés et pouvant être assignés à une de ces 2 catégories correspondraient à différents stades de développement d'une même lignée (Ford *et al.*, 1994). Il a également été décrit chez l'huître creuse, *C. gigas*, 3 types de granulocytes (basophiles et acidophile) et 2 types de hyalinocytes (hémocytes agranuleux et améobocytes agranuleux) (Auffret, 1989). A noter qu'aucun granulocyte n'a été observé chez les larves de *C. gigas*, laissant supposer un système immunitaire immature à ce stade de développement chez l'huître (Xue *et al.*, 2001).

Ces 2 principaux types d'hémocytes existeraient chez tous les bivalves (Cheng, 1981; Hine, 1999). Ainsi, plusieurs études ont révélé la présence de granulocytes et de hyalinocytes chez la mye *Mya arenaria* (Huffman & Tripp, 1982), chez les moules *Mytilus edulis* (Pipe, 1990a), *M. galloprovincialis* (Cajaraville *et al.*, 1995; Carballal *et al.*, 1997b), chez les palourdes *Ruditapes decussatus* (López *et al.*, 1997), *Ruditapes philippinarum* (Cima *et al.*, 2000) et *Mercenaria mercenaria* (Tripp, 1992), chez les coques *Cerastoderma glaucum* (Matozzo *et al.*, 2007), *Chamelea gallina* (Pampanin *et al.*, 2002), *Cerastoderma edule* et le couteau *Ensis siliqua* (Wootton *et al.*, 2003) ainsi que chez les coquilles *Argopecten irradians* (Zhang *et al.*, 2006a), *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1985), *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991), *Chlamys farreri* (Xing *et al.*, 2002).

Chez l'huître plate *Ostrea edulis*, grâce aux techniques d'immunohistochimie, des granulocytes largement présents dans les tissus conjonctifs des différents organes (glande digestive, le manteau, les branchies et les gonades) ont pu être observés (Xue *et al.*, 2001; Xue & Renault, 2001). Seules des cellules hémostoyaires de type hyalinocyte ont été identifiées chez les mollusques gastéropodes *Littorina littorea*, *Haliotis tuberculata* et *Aplysia californica* (Martin *et al.*, 2007; Gorbushin & Iakovleva, 2008; Travers *et al.*, 2008). Néanmoins, les cellules de mollusques gastéropodes restent moins étudiées que les cellules de bivalves.

1.2 L'agrégation hémostoyaire

Les agents exogènes, dès leur entrée dans l'organisme, peuvent être directement repérés par l'organisme et pris en charge par les cellules hémostoyaires. La plasticité est une caractéristique des hémostoytes qui peuvent s'étaler au contact d'une surface. Ils prennent une forme ammonoïde et des filopodes et pseudopodes se forment, donnant une certaine mobilité aux cellules (Narain, 1973; Hirsch & Hunte, 1990). La mobilité et la capacité de défense des hémostoytes sont variables. En effet, elles dépendent de la saison, de l'état physiologique de l'espèce, du site géographique, de la teneur en nutriment et de la salinité (Zhang *et al.*, 2006a; Matozzo *et al.*, 2007; Malham *et al.*, 2009).

1.3 La phagocytose

La phagocytose est le principal mécanisme cellulaire de défense chez les mollusques marins. Ce processus universel et conservé au cours de l'évolution existe à la fois chez les vertébrés et les invertébrés. Ce mécanisme est mis en place *via* les cellules hémostoyaires (granulocytes et hyalinocytes) (Feng, 1988). Plusieurs travaux révèlent l'activité phagocytaire à la fois des granulocytes et des hyalinocytes, mais l'ampleur de cette activité peut varier entre les 2 types cellulaires. Les granulocytes sont généralement considérés comme étant le type cellulaire le plus actif dans ce processus (Fisher, 1986; Tripp, 1992; Cheng, 1996; Pipe *et al.*, 1997; Cima *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006a; Aladaileh *et al.*, 2007; Travers *et al.*, 2008). Chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, seuls les granulocytes sont capables de phagocyter le zymosan* et les bactéries (*Vibrio tapetis*) tandis que les hyalinocytes ne semblent pas posséder la capacité de phagocytose (Carballal *et al.*, 1997b).

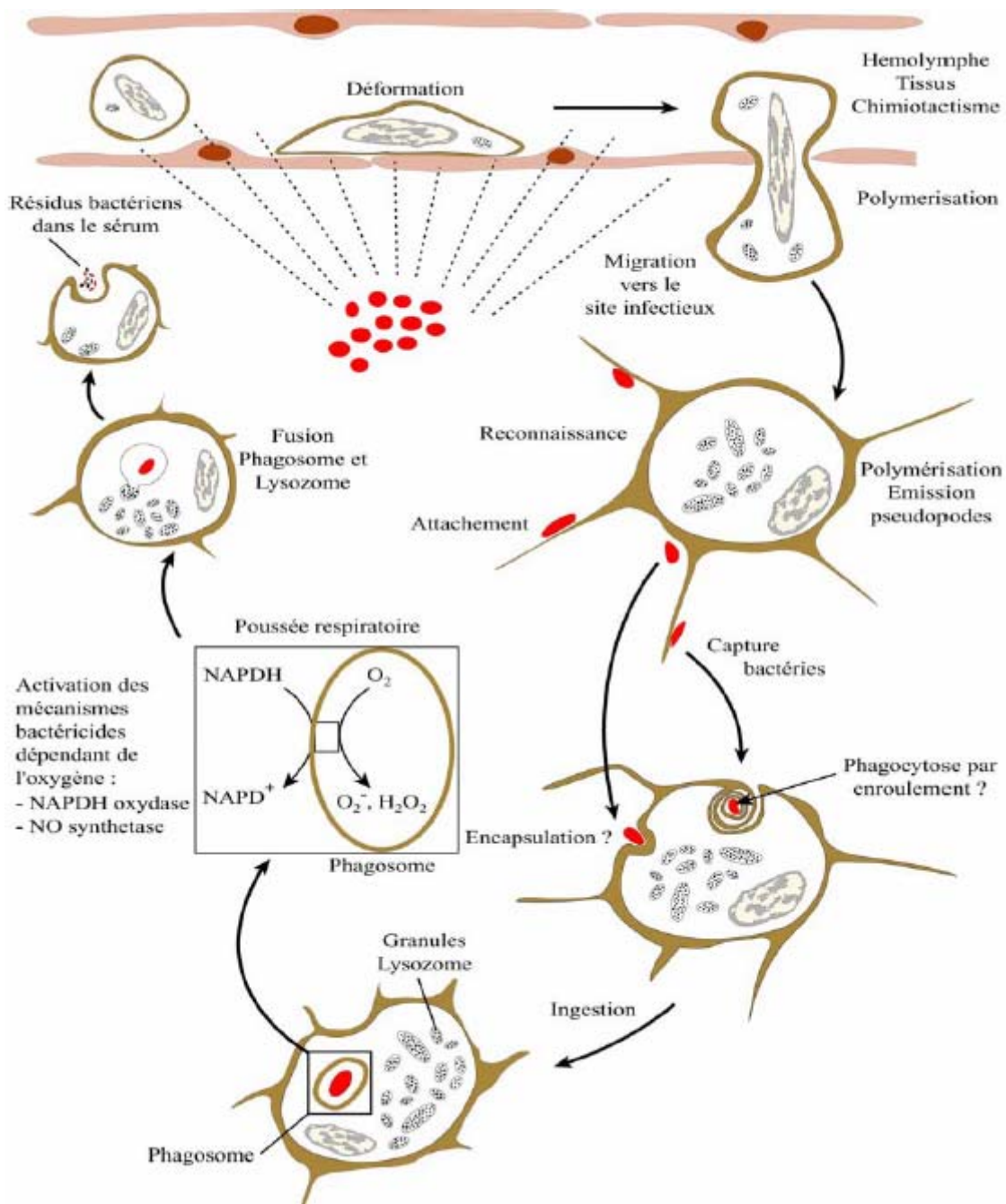


Figure 1 : Représentation schématique du processus de phagocytose et des processus de destruction des particules phagocytées (D'après (Paillard *et al.*, 2004)).

*(*Le zymosan* est un extrait de polysaccharides insolubles de la paroi cellulaire de levure *Saccharomyces cerevisiae*, utilisé comme puissant activateur de la cascade du complément, permettant la phosphorylation des protéines par reconnaissance de motifs microbiens par les récepteurs cellulaires).

De la même manière, les granulocytes sont les cellules les plus actives dans le processus de phagocytose, lors d'injection de particules de zymosan chez la palourde européenne *Ruditapes decussatus*, ou encore chez la coquille St Jacques *Argopecten irradians*, lors de stimulations par des souches bactériennes *Escherichia coli* (López *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2006b).

La phagocytose fait suite à la détection de la présence d'un corps étranger (virus, bactéries, levures, particules inorganiques, organismes pathogènes ou non, globules rouges ou protéines) au sein ou au contact de l'organisme (Auffret, 1986). Les détails de la reconnaissance de l'élément « non soi » chez les bivalves ne sont pas encore bien connus. Cependant, les substances produites par les particules étrangères peuvent agir comme des facteurs chimiotactiques qui favorisent le rapprochement entre les particules à phagocyter et les cellules à activité phagocytaire. La fixation de ces 2 éléments pourrait s'expliquer par la présence de molécules particulières à la surface des hémocytes (récepteurs spécifiques et lectines). Ce processus réversible permet aux cellules de retourner dans la circulation générale. Il se déroule en 2 phases, avec dans un premier temps une association à faible échelle et un changement rapide de la forme des hémocytes (agrégation dite faible). La deuxième phase, consiste en la formation d'amas cellulaires denses et peu dissociables (agrégation cohésive). Ce phénomène correspond à l'attraction des hémocytes (phagocytes) au site réactionnel par des substances produites et libérées par les organismes étrangers ou par les organismes eux-mêmes. Cheng et Rudo (1976) ont montré l'existence de ce phénomène chez *C. virginica*, en présence de bactéries exclusivement vivantes (Cheng & Rudo, 1976).

Les particules phagocytées sont dégradées par les hémocytes dans les phagosomes et les produits de la dégradation sont ensuite accumulés dans des vacuoles et excrétés (Figure 1). Chez les mollusques bivalves le processus de phagocytose se décompose en 4 étapes. Le processus débute par un phénomène d'attraction, suivi d'une étape d'adhérence à la particule reconnue comme étrangère puis d'internalisation ou d'endocytose, pour enfin aboutir à la dégradation intracellulaire de l'élément phagocyté (Cheng, 1983a) (Figure 1). Les 3 premières phases reposent sur des capacités de chimiotactisme, de locomotion, de reconnaissance et de communication. La 4^{ème} phase de destruction, fait intervenir 3 mécanismes biochimiques différents.

Le 1^{er} mécanisme implique les enzymes lysosomales. Les particules étrangères sont internalisées dans une vacuole de phagocytose nommée phagosome primaire.

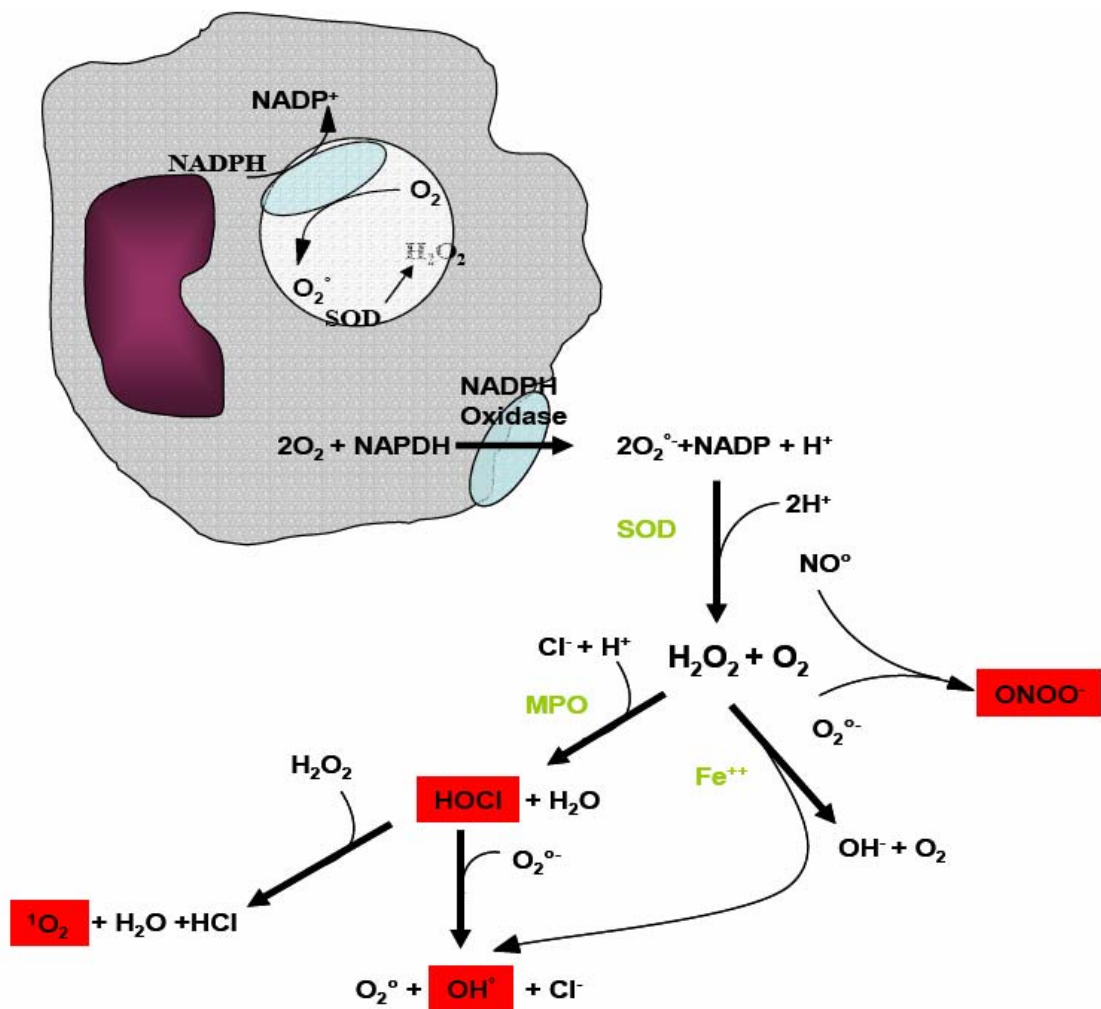


Figure 2 : Mécanisme du métabolisme oxydatif des phagocytes (D'après (Gonzalez, 2005)).

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

Celui-ci fusionne ensuite avec les lysosomes contenant des enzymes hydrolytiques, la fusion de ces 2 éléments forme un phagolysosome et permet l'action d'enzymes sur les particules étrangères internalisées (Auffret, 1986). La présence d'enzymes hydrolytiques telles que le lysozyme, des estérases, des peroxydases et des élastases ont été mises en évidence chez différentes espèces de mollusques bivalves, notamment chez *C. gigas* (Xue & Renault, 2000).

Le 2nd mécanisme repose sur la production et la libération de radicaux toxiques de l'oxygène (ROS ; Reactive Oxygen Species) par un phénomène dit de « flambée oxydative ». Les hémocytes de mollusques sont capables de produire des dérivés réactifs comme des radicaux anions super oxyde ($O_2^{\circ-}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), des radicaux hydroxyles (OH°) et l'anion hypochlorite (OCl^-) (Torreilles *et al.*, 1997). Ces radicaux jouent un rôle important dans l'activité antimicrobienne des cellules phagocytaires. Leur production peut être initiée par diverses substances comme les composants de la paroi bactérienne (Torreilles *et al.*, 1996).

Les ROS sont produites à partir d'une réaction oxydante couplée à la phagocytose, ou lorsque les hémocytes sont stimulés. Cette réaction commence par la réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde par la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphatase oxydase) associée à une consommation en oxygène par les hémocytes (Chu, 2000). L'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) est alors converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase et éventuellement sous forme de radicaux hydroxyles (OH°) et de singlet d'oxygène (1O_2). Ces radicaux oxygénés sont toxiques et peuvent réagir avec d'autres composés pour former des molécules encore plus toxiques. Ils jouent un rôle essentiel dans l'élimination des particules phagocytées (bactéries, virus, levures, et protozoaires). Par ailleurs, lorsque le lysosome fusionne avec le phagosome, l'activité de la myéloperoxydase produit de l'hypochlorite à partir du peroxyde d'hydrogène et des ions chlorure. La myéloperoxydase réagit avec H_2O_2 et Cl^- et génère OCl^- , un puissant oxydant. Le radical hydroxyle (HO°), oxydant peut également être formé à partir de $O_2^{\circ-}$ et de H_2O_2 par des mécanismes myéloperoxydase-dépendant (impliquant un intermédiaire OCl^-) ou myéloperoxydase-indépendant (à travers la catalyse d'un ion métal) (Rosen *et al.*, 1995; Hampton *et al.*, 1998). Ces radicaux oxygénés sont toxiques et peuvent réagir avec d'autres composés pour former des molécules encore plus toxiques (Figure 2).

Ce type de mécanisme existe chez plusieurs espèces de mollusques bivalves. Pipe (1990) et Schlenk *et al.* (1991) ont mis en évidence, chez les moules *Mytilus edulis* et *M.*

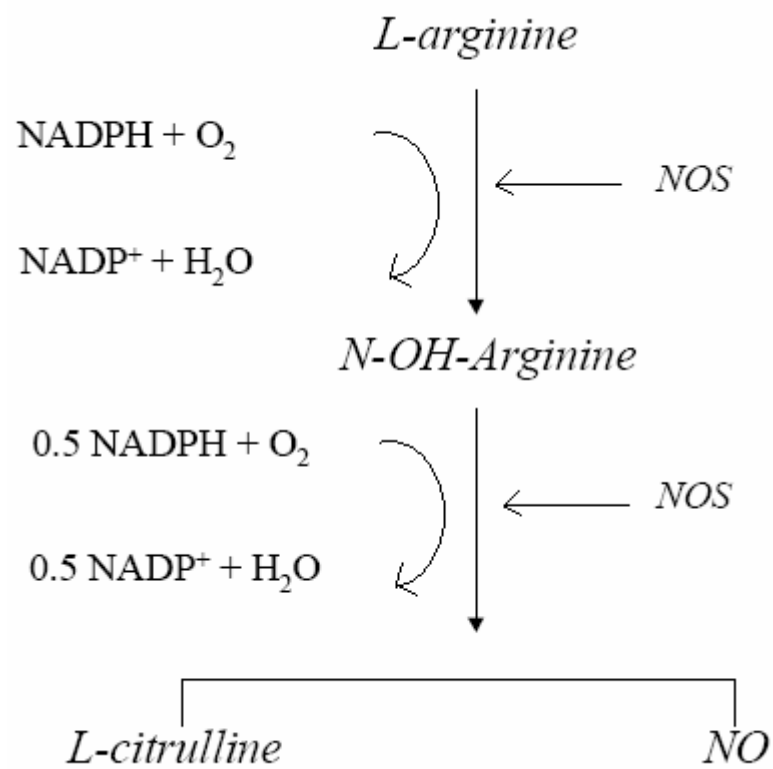


Figure 3 : Processus de production de l'Oxyde Nitrique (NO).

galloprovincialis la synthèse de métabolites réactifs de l'oxygène (ROS) et de la myéloperoxydase (Pipe, 1990a; Schlenk *et al.*, 1991; Pipe, 1992; Carballal *et al.*, 1997a; Torreilles *et al.*, 1997; Canesi *et al.*, 2002b). La production de ROS a également été mise en évidence chez l'huître américaine *C. virginica* (Anderson *et al.*, 1992; Bramble & Anderson, 1997; Bramble & Anderson, 1998), l'huître creuse *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1991; López *et al.*, 1994; Greger *et al.*, 1995; Nakayama & Maruyama, 1998; Lambert *et al.*, 2003), l'huître plate *O. edulis* (Bachère *et al.*, 1991), la coquille *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991; Lambert & Nicolas, 1998) ou encore chez 2 gastéropodes marins *Megathura crenulata* et *Aplysia californica* (Martin *et al.*, 2007). Buggé *et al.* (2007) ont mis en évidence la capacité des hémocytes de *M. mercenaria* à réaliser des flambées oxydatives et donc la présence de ROS (Buggé *et al.*, 2007).

A l'inverse, les hémocytes de la mye commune *Mya arenaria*, de la palourde européenne *Ruditapes decussatus* et des coques européennes *Cerastoderma edule* et japonaises *Corbicula japonica* ne libèrent pas de ROS au cours de la phagocytose des cellules de levure, même si elles ont été opsonisées par un traitement préalable au zymosan* avec du plasma (Cheng & Rudo, 1976; Anderson, 1994; López *et al.*, 1994; Torreilles *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2003; Goedken & DeGuise, 2004).

Une 3^{ème} voie de dégradation des particules phagocytées existe chez certaines espèces. Les oxydes nitriques synthétases (NOS) peuvent catalyser la production d'oxyde nitrique (NO) à partir de L-arginine (Figure 3). L'oxyde nitrique pourrait intervenir dans différents processus physiologiques et pathologiques (Moncada *et al.*, 1991). Depuis quelques années, des études se sont attachées à démontrer l'existence du système NO chez les bivalves et à mesurer la production de NO, précurseur d'une variété d'intermédiaire réactif du nitrogène durant la phagocytose (Franchini *et al.*, 1995; Nakayama & Maruyama, 1998; Torreilles & Guérin, 1999; Arumugam *et al.*, 2000a; Arumugam *et al.*, 2000b; Gourdon *et al.*, 2001; Tafalla *et al.*, 2002). Ainsi, Nakayama et Maruyama (1998) ont démontré une production de NO par les hémocytes d'huître *C. gigas* après stimulation au Phorbol Myristate Acétate (PMA) (Nakayama & Maruyama, 1998). De même, les hémocytes de moules *M. galloprovincialis* sont aussi capables de produire des NO après stimulation au PMA ou à l'aide d'une solution de lipopolysaccharide (LPS) et de zymosan ou encore des billes de latex (Arumugam *et al.*, 2000a; Arumugam *et al.*, 2000b; Gourdon *et al.*, 2001; Tafalla *et al.*, 2002; Novas *et al.*, 2007). D'autre part, il a été montré que la production de NO a été modifiée chez *M. galloprovincialis* après le drame écologique du naufrage du pétrolier « Le Prestige » (Novas

et al., 2007). Villamil *et al.* (2007) ont montré pour la première fois la capacité d'un parasite *Perkinsus marinus* à induire la production de NOS dans les hémocytes de *C. virginica*, résultant en l'augmentation de la production de NO dans le plasma. Ils ont également mis en évidence que les effets obtenus *in vitro* par les immunostimulants PMA et LPS sont comparables à ceux obtenus *in vivo* avec *P. marinus* (Villamil *et al.*, 2007). Tafalla *et al.* (2003) ont démontré que les hémocytes de *R. decussatus* sont également capables de produire du NO en réponse à des stimulants tels que le zymosan, des LPS ou des pathogènes bactériens (*Vibrio tapetis*) (Tafalla *et al.*, 2003).

Stratégie des microorganismes pour éviter la phagocytose

Certains microorganismes pathogènes peuvent cependant persister dans les tissus de bivalves. Les travaux de Canesi *et al.* (2002) ont montré l'importance des molécules d'opsonisation (agglutinines, opsonines) dans la phagocytose, lors d'infections bactériennes chez les moules, les huîtres ou bien encore les palourdes (Canesi *et al.*, 2002a). En l'absence de ces molécules, les bactéries échappent à la mort par phagocytose médiée par les hémocytes des bivalves infectés. En effet, certains parasites arrivent à contrecarrer les processus mis en place par les hémocytes pour leur destruction et peuvent induire de graves maladies. C'est le cas par exemple de *Bonamia ostreae* chez l'huître plate *O. edulis* (Chagot *et al.*, 1992) ainsi que de *P. marinus* et *Haplosporidium nelsoni* chez l'huître américaine *C. virginica* (Ford & Ashton-Alcox, 1993; La Peyre *et al.*, 1995).

2 La réponse immunitaire humorale

Différents travaux rapportent la présence de molécules intervenant dans les mécanismes de défense telles que le lysozyme, des enzymes lysosomales (Pipe, 1990a; Pipe, 1990b), des cytokines et lectines (Leippe & Renwranz, 1988; Hughes *et al.*, 1990; Beck & Habicht, 1991; Hughes *et al.*, 1991) et des peptides antimicrobiens (Mitta *et al.*, 2000a; Mitta *et al.*, 2000c).

2.1 Lysozyme et enzymes lysosomales

Le lysozyme est une petite enzyme bactériolytique ubiquitaire présente dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe et dans les hémocytes de bivalves (Cheng *et al.*, 1975; Bachali *et al.*, 2002). Les lysozymes (présents chez les procaryotes et eucaryotes) constituent un

important composant des défenses immunitaires (Li *et al.*, 2008). Le lysozyme hydrolyse la liaison β -1,4-glycosidique, altérant ainsi les résidus N-acétylglucosamine et N-acétylmuramique engagés dans la couche de peptidoglycanes de la paroi bactérienne des bactéries à Gram⁺. Plusieurs études ont rapporté que les lysozymes sont aussi capables de détruire les bactéries à Gram⁻ chez les bivalves (Nilsen *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2004) et chez les crevettes (Hikima *et al.*, 2003; de-la-Re-Vega *et al.*, 2006). Les lysozymes de bivalves appartiennent à la famille de lysozyme de type i (Nilsen & Myrnes, 2001). Xue *et al.* (2007) ont montré que les mollusques bivalves emploient différents lysozymes pour différentes fonctions. Ils suggèrent néanmoins une adaptation évolutive des lysozymes de type i pour la nutrition, ces derniers jouant un rôle d'enzyme digestive (Xue *et al.*, 2007).

Des enzymes lysosomales (β -glucuronidase, phosphatase, estérase, peroxydase, aminopeptidase) sont également retrouvées dans les hémocytes et l'hémolymphe chez différentes espèces de bivalves comme l'huître creuse, *C. gigas*, et l'huître plate, *O. edulis* (Xue & Renault, 2000). Ces enzymes sont contenues dans les granules, présents dans les cellules phagocytaires, mais elles peuvent aussi être libres dans l'hémolymphe. Les aminopeptidases catalysent la réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique de l'acide amine N-terminal des protéines et en particulier favorisent la dégradation des protéines de surface des parasites (Cheng *et al.*, 1978). La β -glucuronidase, les phosphatases acides, l'amylase et la lipase ont également été recensées dans l'hémolymphe de nombreux mollusques, tels que *C. virginica* (Cheng & Downs, 1988), *Anadara ovalis* (Rodrick & Ulrich, 1984), *Dreissena polymorpha* (Giamberini & Pihan, 1996), *Mercenaria mercenaria* (Cheng *et al.*, 1975; Moore & Gelder, 1983), *Mercenaria campechiensis* (Rodrick & Ulrich, 1984), *Mytilus californianus* (Bayne *et al.*, 1979), *M. edulis* et *M. trossulus* (Noël *et al.*, 1993), *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a) et *Mya arenaria* (Huffman & Tripp, 1982; Beckmann *et al.*, 1992).

2.2 Cytokines

Les cytokines sont des petites protéines solubles constituant des messages échangés entre les différentes catégories de cellules d'un animal, particulièrement dans des situations d'agression par un agent infectieux. Les cytokines forment un groupe de molécules très diversifiées présentant des activités multiples sur différents types cellulaires. Ces médiateurs sont libérés après contact avec des constituants étrangers, par les cellules du système immunitaire telles que les cellules phagocytaires. Les cytokines comportent notamment les

InterLeukines (IL) et les molécules de la famille « Tumour Necrosis Factor » (TNF). Différents travaux rapportent la détection de molécules présentant des activités similaires à celles de l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6 et l'IL-8 ou le TNF- α dans l'hémolymphe et les hémocytes de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Hughes *et al.*, 1991; Ottaviani *et al.*, 2000; Novas *et al.*, 2004). Une molécule de type cytokine a été clonée à partir de la librairie d'ADNc des hémocytes de *C. gigas*. Cette interleukine putative CgIL-17 similaire aux IL-17s de vertébrés présente 27% d'homologie avec l'IL-17D de la truite arc-en-ciel et 21 % d'homologie avec l'IL-17D humaine au niveau des acides aminés (Roberts *et al.*, 2008). Le facteur TGF- β « Transforming Growth Factor- β » est régulé et exprimé dans les hémocytes de *C. gigas* durant une infection par des bactéries à Gram⁻, suggérant que ce Cg-TGF- β peut agir comme une cytokine engagée dans ses mécanismes de défense de l'immunité innée (Lelong *et al.*, 2007).

2.3 Lectines

Les lectines sont des protéines à forte affinité pour les sucres. La capacité de reconnaissance et l'interaction des lectines avec les carbohydrates de molécules étrangères leur confèrent un rôle de récepteur ligand, universel chez tous les organismes vivants (Mydlarz *et al.*, 2006). Fonctionnellement, on les divise en 2 catégories en fonction de leur capacité à reconnaître des ligands endogènes ou exogènes. Elles peuvent intervenir dans les phénomènes d'agglutination et d'opsonisation notamment lors de la phagocytose d'organismes pathogènes (virus, bactéries, champignons et parasites) du fait de leur spécificité pour certains oses (mannose, fucose ou N-acétylglucosamine) constitutifs des glycoprotéines et glycolipides (Pipe, 1990b).

Les lectines ont été identifiées chez les mollusques bivalves tels que les moules (Renwranz & Stahmer, 1983; Renwranz *et al.*, 1985; Tunkijjanukij & Olafsen, 1998), les palourdes (Dam *et al.*, 1992) et les huîtres (Fisher, 1992). Les propriétés des lectines et leurs rôles dans les mécanismes de défense des bivalves sont bien documentés chez les moules et les huîtres (Fisher, 1992). Deux lectines, les gicalines E et H, ont été purifiées dans les hémocytes de *C. gigas* et présentent la capacité d'opsonisation et d'agglutiner les bactéries *Listonella anguillarum* lors de stimulations par ce pathogène (Olafsen *et al.*, 1992). *C. virginica* présente ce même type de réaction envers *V. cholerae* (Fisher & DiNuzzo, 1991). Deux lectines, modiolines E et H, ont été isolées et caractérisées chez *Modiolus modiolus*

(Tunkijjanukij & Olafsen, 1998; Bulgakov *et al.*, 2004). Les modiolines présentent une forte activité antibactérienne envers différentes souches de *Vibrio* (Tunkijjanukij & Olafsen, 1998). Chez la palourde *Ruditapes philippinarum*, 3 lectines (Manila Clam Lectins (MCL)) MCL-1, MCL-3 (Kang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006) et MCL-4 (Takahashi *et al.*, 2008) ont été purifiées et caractérisées dans les hémocytes en réponse à des infections aux parasites *Perkinsus olseni*. Les MCL présentent également une activité d'opsonisation (Kim *et al.*, 2006). Un titre relativement élevé d'agglutination a aussi été révélé chez la palourde *R. decussatus* fortement parasitée par *Perkinsus atlanticus*, suggérant l'existence de substances « lectine-like » engagées dans la défense immunitaire de *R. decussatus* (Ordás *et al.*, 2000).

D'autres lectines ont été détectées chez des bivalves telles qu'une lectine galactose-spécifique chez l'huître perlière, *Pinctada fucata martensii* (Suzuki & Mori, 1989), une lectine calcium-dépendante (lectine de type-C) chez *Ostrea chilensis* (Minamikawa *et al.*, 2004) et *Mytilus edulis* (Renwranz & Stahmer, 1983), une agglutinine galactane-réactive chez *Tridacna maxima* (Baldo *et al.*, 1978), une lectine galactosyl-spécifique chez *Anadara granosa* (Dam *et al.*, 1992). Les lectines issues de l'hémolymphe de *M. edulis* et *Corbicula fluminea* agissent comme des opsonines et stimulent *in vitro* la phagocytose par les hémocytes (Renwranz & Stahmer, 1983; Yang & Yoshino, 1990). Le plasma de *Mercenaria mercenaria* (Arimoto & Tripp, 1977; Tripp, 1992) et de *Calymptogena magnifica* (Fisher & DiNuzzo, 1991) présente des activités d'agglutination des bactéries envahissantes. La plupart des lectines de bivalves exhibent une activité antibactérienne.

Par ailleurs, l'analyse des gènes d'expression des lectines chez les mollusques bivalves a été développée ces dernières années. Chez *Chlamys farreri*, 2 lectines de type-C (*Chlamys farreri* Lectine-1 et 2 (*CfLec-1* et *CfLec-2*)) ont été clonées (Wang *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2008). La protéine recombinante de *CfLec-1* (Ca²⁺ dépendante) est capable d'agglutiner les bactéries *E. coli* et celle de *CfLec-2*, possède une activité agrégative envers la bactérie *Staphylococcus haemolyticus* indépendamment de l'ion Ca²⁺ (Wang *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2008). Chez *C. gigas*, la séquence codante d'une lectine de type-C (*C. gigas* Lectine-1 (*CgCLec-1*)), a été identifiée à l'aide d'ESTs codant pour des lectines dans GenBank. L'ARNm de *CgCLec-1* est uniquement exprimé dans les cellules granulocytes basophiles de la glande digestive, suggérant la sécrétion de cette enzyme dans le diverticule digestif (Yamaura *et al.*, 2008).

Les mollusques gastéropodes présentent une faible activité d'agglutination par rapport aux bivalves. Une absence totale de capacité d'agglutination a été révélée dans le plasma de *Littorina littorea*. Un seul type d'agglutinine a pu être mis en évidence chez *Buccinum undatum*, *Haliotis asinina*, *Trochus niloticus* et trois types d'agglutinine chez *Aplysia californica* (Yakovleva *et al.*, 2001).

2.4 Les Peptides AntiMicrobiens (PAMs)

Présentation générale

Les peptides antimicrobiens synthétisés par la voie ribosomiale sont des éléments majeurs de la réponse immunitaire innée non seulement dans le règne animal (Wang & Wang, 2004) mais également chez les végétaux et les procaryotes (Bulet *et al.*, 2004). La nature ubiquitaire des peptides antimicrobiens suggère leur rôle permanent et primordial dans la nature (Joerger, 2003). Ces effecteurs présentent une grande diversité en terme de caractéristiques structurales, de propriétés biologiques et fonctionnelles, ainsi qu'au travers de leur distribution et expression dans les tissus (Bachère *et al.*, 2004). Selon les organismes, les peptides antimicrobiens sont exprimés de manière constitutive dans des cellules sécrétrices ou inductibles par des infections ou *stimuli* inflammatoires (Hancock, 2001). Une des caractéristiques générales des peptides antimicrobiens est leur capacité à augmenter la perméabilité ionique des membranes phospholipidiques (Toke, 2005).

En plus de leur fonction antimicrobienne directe, ils ont des rôles multiples en tant que médiateurs d'inflammations avec un impact sur les cellules épithéliales et les cellules inflammatoires. Ils influencent divers processus comme la libération de cytokines, la prolifération cellulaire, l'angiogénèse, la cicatrisation, le chimiotactisme, l'induction immune ou encore la balance entre les protéases et les inhibiteurs de protéases (Beisswenger & Bals, 2005). Même si certains peptides ont un spectre d'activité limité aux microorganismes bactériens, d'autres étendent leurs activités antimicrobiennes aux champignons, à certains parasites et virus enveloppés, aux protozoaires, voire aux cellules cancéreuses (Baker *et al.*, 1993; Chinchar *et al.*, 2004; Toke, 2005).

Conventionnellement, les peptides antimicrobiens sont décrits comme :

- Des molécules de petite taille (6-50 résidus acides aminés) avec une masse moléculaire comprise entre 1 et 5 kDa.

- Ils sont le plus souvent cationiques avec une charge nette comprise entre +2 et +9. Cette charge positive est due à une faible proportion de résidus glutamate et aspartate et à la dominance des résidus arginine ou lysine et/ou histidine dans leur séquence.
- Ce sont des molécules à caractère amphiphile, dû à une forte proportion d'acides aminés hydrophobes (30% à 50% de la séquence), variables tant dans leur longueur, séquence et structure. En effet, bien que les structures tridimensionnelles varient, la plupart des peptides ayant adopté leur conformation finale, présente un domaine hydrophobe et une portion hydrophile à leur surface, leur permettant de fortes interactions avec la membrane bactérienne chargée négativement (du fait de la proportion importante en lipides à caractère anionique) (Wang & Wang, 2004; Hancock *et al.*, 2006). Selon différents modes d'action, ils agissent par perturbation des membranes cellulaires des agents pathogènes, provoquant au final leur destruction (Mookherjee & Hancock, 2007)

A l'heure actuelle, l'inventaire des peptides antimicrobiens comprend plus de 1000 peptides d'origines différentes, répertoriés dans les bases de données suivantes :

- Antimicrobial Sequence Database (AMSDb) :
<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/amsdb.html>
- Antimicrobial Peptide Database (APD) :
<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>
- Antimic :
<http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/> (Brahmachary *et al.*, 2004)

Les différentes caractéristiques structurales et la richesse remarquable en certains acides aminés sont la base de la classification actuelle en 4 grands groupes des peptides antimicrobiens (Bulet *et al.*, 2004) :

- (i) Les peptides cationiques linéaires formant une hélice α , amphiphiles ;
- (ii) Les peptides cycliques riches en cystéines, à ponts disulfure ;
- (iii) Les peptides riches en acides aminés spécifiques ;
- (iv) Les peptides contenant des acides aminés rares modifiés.

Bien qu'il existe une grande diversité des espèces marines, peu de peptides antimicrobiens issus d'invertébrés sont connus. C'est pourquoi, afin d'établir une vue d'ensemble de la complexité structurale de ces 4 grands groupes, l'illustration est présentée aux travers d'exemples parmi les centaines de peptides identifiés chez les invertébrés et vertébrés

terrestres et marins. Les peptides antimicrobiens issus de mollusques marins sont répartis au sein de ces 4 groupes. Ils sont présentés à la suite de cette classification selon leur appartenance à ces 4 groupes.

(i) Les peptides cationiques linéaires formant une hélice α

Cette famille est très diversifiée et inclut les peptides trouvés dans un grand nombre d'organismes éloignés d'un point de vue évolutif. Plus de 300 peptides en hélice α ont été isolés chez une grande variété d'espèces allant des invertébrés aux mammifères. Ces peptides font en général moins de 40 acides aminés et ils sont fortement amphiphiles. Ils sont les plus étudiés du fait de leur découverte précoce par rapport aux autres peptides antimicrobiens mais aussi en raison de leur structure simple qui facilite la synthèse et l'étude de leur mode d'action (Wakamatsu *et al.*, 2002). Leur spectre d'activité est très large et s'étend sur les bactéries, les champignons, les protozoaires et certains sont hémolytiques ou cytotoxiques. Ces peptides sont produits par le tissu adipeux et sécrétés dans l'hémolymphe (chez les insectes), mais ils sont également synthétisés par les hémocytes et certains épithéliums (Bulet *et al.*, 2004). Certains adoptent une conformation en hélice α uniquement lorsqu'ils sont en contact avec des membranes. Le Tableau 1 présente quelques peptides en hélice α identifiés chez les arthropodes, urocordés, poissons, amphibiens et mammifères.

Dans les années 60, les propriétés antimicrobienne et hémolytique d'un peptide nommé bombinine, issu des sécrétions de la peau des crapauds européens *Bombina bombina* et *B. variegata*, ont été révélées (Kiss & Michl, 1962; Csordás & Michl, 1969; Csordas & Michl, 1970). La mélittine extraite du venin de l'abeille domestique *Apis mellifera*, est un peptide de 26 acides aminés dont la structuration en hélice α a été mise en évidence quelques années plus tard (Tosteson & Tosteson, 1981). Ces deux substances bien qu'antimicrobiennes sont très cytotoxiques et hémolytiques. La mélittine est aujourd'hui considérée comme la référence des peptides antimicrobiens hémolytiques. Par la suite, à partir des années 80, de nombreuses séquences de peptides représentatifs de cette famille ont été caractérisées. Parmi les peptides en hélice α , 2 peptides ont été particulièrement étudiés. Le premier est une cécropine (cécropine A), isolée chez le papillon hyménoptère *Hyalophora cecropia* (Steiner *et al.*, 1981). Les seconds sont des magainines (Zasloff, 1987) extraites de la peau de l'amphibien *Xenopus laevis*. Les magainines 1 et 2 sont deux peptides de 23 résidus acides aminés différents uniquement par leurs acides aminés en 10^{ème} et 20^{ème} positions. Les magainines sont sécrétés

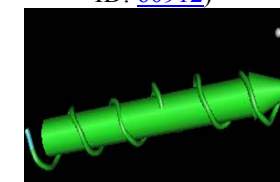
Tableau 1 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens en hélice α , de vertébrés et d'invertébrés et structure en 3D de peptides antimicrobiens en hélice α .

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antiviral ; H : hémolytique ; CC : anti-cellules cancéreuses.

	Origine	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité
Invertébrés	Arthropodes	Papillon <i>Hyalophora cecropia</i> (Holak <i>et al.</i> , 1988)	Cécropine A	KWKLFFKIEKVGQNIIRDGIHAGPAVA VVGQATQIAK	G ⁺ & G ⁻ , V, CC
		Abeille <i>Apis mellifera</i> (Kreil, 1973)	Mélicitine	GIGA VLK VLTTGLPALISWIKRKRQQ	G ⁺ & G ⁻ , V, F, H, CC
		Mouche <i>Sarcophaga peregrina</i> (Iwai <i>et al.</i> , 1993)	Sarcotoxine IA	GWLKKIGKKIERVGOHTRDATIQGLGIAQQAANVAATAR	G ⁺ & G ⁻
	Urocordés	<i>Ascidie Styela clava</i> (Lee <i>et al.</i> , 1997a; Zhao <i>et al.</i> , 1997)	Styéline A	GFGKAFHS VSNFAKKHKT A	G ⁺ & G ⁻
			Styéline B	GFGPAFHS VSNFAKKHKT A	
Styéline C	GWFGKAFRS VSN FYKKHKT YIHAGLSAATLL				
Styéline D	GWLRKAAKS VGKIFYKHKY YIKAA WQIGKHA				
Styéline E	GWLRKAAKS VGKIFYKHKY YIKAA WKIGKHA				
Urocordés	<i>Ascidie Styela clava</i> (Lee <i>et al.</i> , 1997b; Lee <i>et al.</i> , 2001)	Clavanine A	VFQFL GKIIHVGNF VH GFSSH VF	G ⁺ & G ⁻	
		Clavanine B	VFQFL GRIIHHVGNF VH GFSSH VF		
		Clavanine C	VFHLLGKIIHHVGNF VY GFSSH VF		
		Clavanine D	AFKLLGRIIHHVGNF VY GFSSH VF		
		Clavanine E	LFKLLGKIIHHVGNF VYGFSSHVF		
Poissons	<i>Morone saxatilis</i>	Moronécidine	FFHHIFRGIVH VGKTIHRL VTG	G ⁺ & G ⁻	
		Moronécidine	FFHHIFRGIVH VGKTIHKL VTG		
	<i>Brème Chrysophrys major</i> (Iijima <i>et al.</i> , 2003a)	Chrysopsine-1	FFGWLIKGAIHAGKAIHGLIHRRRH	G ⁺ & G ⁻ , H	
	<i>Bar Morone saxatilis</i> (Silphaduang & Noga, 2001)	Piscidine-1	FFHHIFRGIVH VGKTIHRL VTG	G ⁺ & G ⁻ , H	
<i>Limande d'Amérique Pleuronectes americanus</i> (Cole <i>et al.</i> , 1997)	Pleurocidine	GWGSFFKKA AH VGKHVGKAAAL THYL	G ⁺ & G ⁻		
Vertébrés	Amphibiens	Grenouille <i>Phyllomedusa bicolor</i> (Amiche <i>et al.</i> , 2000)	Dermatoxine	SLGSFLKGVGTTLASVGVVSDQFGKLLQAGQ	G ⁺ & G ⁻
		Xenope <i>Xenopus laevis</i> (Zaslouff, 1987)	Magainine 1	GIGKFLHSA GKFGKAFVGEIMKS	G ⁺ & G ⁻
		Magainine 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS		
		Grenouille <i>Phyllomedusa sauvagei</i> (Mor <i>et al.</i> , 1994) et	Dermaseptine-S1	ALWKTMLKGLT MALHAGKAAALGAAADTISQGTQ	G ⁺ & G ⁻ , V, F
		<i>Phyllomedusinae</i> sp. (Pierre <i>et al.</i> , 2000)	Phylloxine	GWMSKIASIGTFLSGMQQ	G ⁺ & G ⁻
		Crapaud <i>Eombina variegata</i> (Csordas & Michl, 1970)	Bombinine	GIGALSAGALKGLAKGLAEHFAN	G ⁺ & G ⁻ , H
		Grenouille <i>Rana temporaria</i> (Simmaco <i>et al.</i> , 1996)	Temporine A Temporine B Temporine C Temporine E	FLPLIGRVL SGIL LLPIVGNLLKSL LLPILGNLLNGLL VLPIIGNLLNSLL	G ⁺
Mammifères	Homme <i>Homo sapiens</i> (Bals, 2000)	Cathélicidine LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPVPTES	G ⁺ & G ⁻ , F	
	Homme <i>Homo sapiens</i> (Raj <i>et al.</i> , 1998)	Histatine 5	DSHAKRHH GYKRKPFKHHSHRGY	G ⁺ & G ⁻ , F	



Piscidine 1 (MMDB ID: [60912](#))



Magainine 2 (MMDB ID: [53840](#))

par les glandes granulaires de la peau lors d'un stress ou d'une blessure (Barra *et al.*, 1998). Ces peptides inhibent la croissance des bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ telle que *Staphylococcus aureus* pour des concentrations inférieures à 100 µg.mL⁻¹. Malgré une identité de séquence très forte, la magainine 2 est 10 fois plus active que son homologue la magainine 1. La magainine 2 s'est aussi révélée antivirale et anticancéreuse pour des concentrations où elle n'est pas cytotoxique. Ce type de structure en hélice α est très représenté chez les différentes espèces d'amphibiens qui excrètent ces peptides par des glandes de leur peau afin de se défendre contre les prédateurs et les microorganismes (Reilly *et al.*, 1994). Les temporines issues de la peau de la grenouille *Rana temporaria* ainsi que les dermaseptines de la peau de *Phyllomedusa hypochondrialis* présentent des activités antiparasitaires mesurées sur un protozoaire du genre *Leishmania*, parasite de l'homme (Mangoni *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2006). Par ailleurs, quelques peptides en hélice α , à l'image de certaines temporines, peuvent s'avérer fortement hémolytiques à des concentrations efficaces sur les bactéries (Conlon *et al.*, 2005). De tels peptides antimicrobiens ont ainsi pu être isolés chez de nombreuses espèces couvrant tous les organismes multicellulaires de la cécropine A produite par un papillon (Holak *et al.*, 1988) aux cathélicidines présentes chez l'homme (Gennaro & Zanetti, 2000).

Parmi les peptides en hélice α , on retrouve également un certain nombre de peptides issus du milieu marin. Les clavanines et styélines isolées à partir des hémocytes du tunicier *Styela clava*, correspondent respectivement à une famille de 5 peptides de 23 acides aminés, riches en histidine (Lee *et al.*, 1997c) et à une famille de 5 peptides de 31-32 acides aminés, riches en phénylalanine (Lee *et al.*, 1997b), ces deux familles de peptides étant amidés en C-terminal.

Les clavanines A à E sont proches des magainines de la peau de *Xenopus laevis*, de par leur séquence primaire, taille et activité antimicrobienne. L'activité de la clavanine A est comparable à celle des magainines et cécropines. Ces clavanines inhibent la croissance d'*Escherichia coli* et de *Listeria monocytogenes* ainsi que la levure *Candida albicans*. Bien que leurs séquences soient proches, les clavanines C et D sont 3 fois plus efficaces que les clavanines A et B pour inhiber la croissance de ces microorganismes à la concentration de 100 µg.mL⁻¹ (Lee *et al.*, 1997c). Par ailleurs, la clavanine A, liée à la présence répétée d'histidines (pKa ~ 6,5) dans sa séquence, a une charge nette positive plus élevée à pH 5,5 qu'à un pH de 7,4. Cette caractéristique lui confère une meilleure activité antimicrobienne à pH de 5-5,5 qu'à pH neutre (Lee *et al.*, 1997a). De plus, la Clavanine A conserve sa capacité antibactérienne lorsqu'elle est diluée dans une solution à 0,1 M NaCl (Lee *et al.*, 1997a).

Les styélines présentent une forte homologie de séquence avec les pleurocidines de la limande d'Amérique *Pleuronectes americanus*. Les styélines D et E diffèrent significativement des styélines A et B mais se ressemblent relativement entre elles. Les styélines A et B sont actives envers les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ jusqu'à des concentrations seuils parfois inférieures à 1,5 µg.mL⁻¹ même en présence de concentrations élevées en NaCl. Elles sont également actives envers les bactéries marines, *Psychrobacter immobilis* et *Planococcus citreus*, dans un milieu à 0,4 M NaCl (Lee *et al.*, 1997b). La styéline D identifiée par clonage de l'ADNc de *Styela clava*, contient 12 résidus d'acides aminés, issus de modifications post-traductionnelles, incluant 1 résidu 6-bromotryptophane, 2 résidus monohydroxylysines, 4 résidus 3,4-dihydroxyphénylalanines (DOPA), 4 résidus dihydroxylysines et 1 résidu dihydroxyarginine. Ces modifications contribuent à l'augmentation de l'activité antibactérienne de la styéline D à un pH acide et dans des conditions élevées de salinité (Lehrer *et al.*, 2003).

(ii) Les peptides cycliques riches en cystéines, à ponts disulfure

Ces peptides cycliques riches en cystéines représentent le 2^{ème} grand groupe de peptides antimicrobiens. Ils possèdent une ou plusieurs paires de cystéines dont l'oxydation entraîne la formation des ponts disulfure intramoléculaires, favorisant la stabilité de leur structure tridimensionnelle. Ces peptides sont généralement plus longs que les peptides en hélice α et peuvent ainsi adopter une grande variété de formes. Selon le nombre de résidus cystéines, ces peptides adoptent une structure en feuillet β (la plupart des défensines de vertébrés), une conformation en « épingle à cheveux » rigide (β -hairpin-like) maintenue par les ponts disulfure, ou encore des structures mixtes contenant à la fois des hélices α et des feuillets β .

Des représentants de cette famille ont été identifiés dans tout le règne animal à la fois chez les vertébrés et invertébrés mais aussi dans le règne végétal (Dimarcq *et al.*, 1998; Bulet *et al.*, 2004). Les défensines sont le groupe le plus représentatif de cette catégorie de peptides. Les premières défensines ont été isolées en 1983 à partir de macrophages présents dans les poumons du lapin (Selsted *et al.*, 1983), avant d'être découvertes chez l'homme (Ganz *et al.*, 1985). Selon le nombre de ponts disulfure contenus par ces peptides et la structuration qu'ils adoptent, ce grand groupe structural est subdivisé en plusieurs sous-groupes.

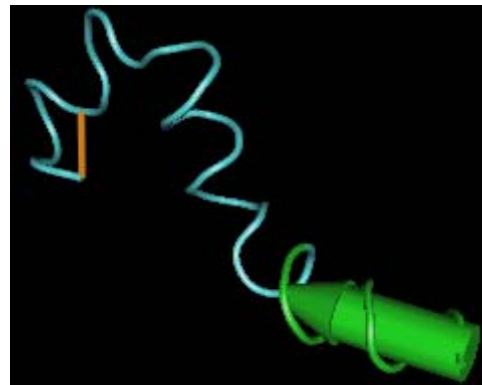
Tableau 2 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 1 pont disulfure.

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antiviral ; H : hémolytique ; CC : anti-cellules cancéreuses.

Origine	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité	
Invertébrés	Arthropodes	Punaise <i>Podisus maculiventris</i> (Mandard <i>et al.</i> , 1998)	Thanatine	GSKKPVIHYYCNRRTGKQORM	G ⁺ & G ⁻ , F
	Amphibiens	Grenouille verte <i>Rana esculenta</i> (Simmaco <i>et al.</i> , 1993)	Esculentine-1	GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNV GKEV GMDVVRTGDIAGC KIKGEC	G ⁺ & G ⁻ , F, H
		Grenouille verte <i>Rana esculenta</i> (Simmaco <i>et al.</i> , 1994)	Esculentine-1A	GIFSKLAGKKIKNLLISGLKNV GKEV GMDVVRTGDIAGC KIKGEC	G ⁺ & G ⁻ , H
		Grenouille japonaise <i>Rana brevipoda porsa</i> (Morikawa <i>et al.</i> , 1992)	Brevinine-1	FLPVLGIAAKV VPALFCKITKKC	G ⁺ & G ⁻ , F
		Grenouille indienne <i>Rana tigrina</i> (Sai <i>et al.</i> , 2001)	Tigérinine-1	FQTMIPIPRCY	G ⁺ & G ⁻
Grenouille européenne <i>Rana temporaria</i> (Goraya <i>et al.</i> , 1999)	Ranatuérine 1T	GLLSGLKKV GKHVAKNV AVSLMDSLKCKISGDC	G ⁺ & G ⁻		
Vertébrés	Mammifères	Bovin (neutrophiles) <i>Bos taurus</i> (Romeo <i>et al.</i> , 1988)	Bacténécine	RLCRIVVIRVCR	G ⁺ & G ⁻

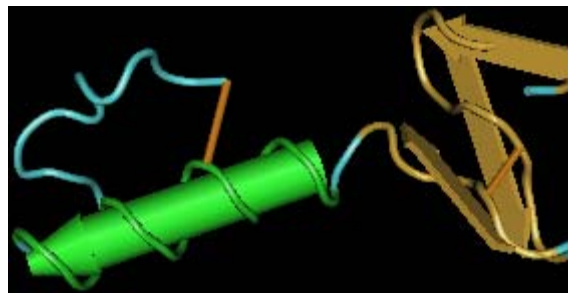


Thanatine (MMDB ID: [12286](#))



Ranatuérine (MMDB ID: [63756](#))

Figure 4 : Structure en 3D de peptides antimicrobiens contenant 1 pont disulfure.



KYYGNQVHCGKHSCTVDWGTAIGNIGNNAAANWATGGNAGWNK

Figure 5 : Structure en 3D et séquence du peptide « pediocin-like bacteriocin » sakacine P (MMDB ID : [24689](#)).

Peptides contenant un seul pont disulfure :

Ce sous-groupe est composé des plus petits peptides, présentant des structures β -*hairpin-like* rigides. Ils sont présents chez de nombreuses espèces. Les résidus cationiques peuvent être principalement situés à l'intérieur de la boucle ou à l'inverse situés aux extrémités N et C terminales, voire les deux à la fois. Le Tableau 2 présente plusieurs exemples de peptides cycliques présentant 1 pont disulfure identifiés chez les arthropodes, amphibiens et mammifères.

On y trouve par exemple la thanatine (Figure 4), seul représentant chez les insectes. Ce peptide de 21 résidus acides aminés est produit par le corps gras infecté de l'insecte hémiptère *Podisus maculiventris* (Fehlbaum *et al.*, 1996). Il est organisé en une structure simple comprenant 2 feuilletts β , stabilisé par un pont disulfure. Ce peptide présente le plus large spectre d'activité des peptides antimicrobiens issus des arthropodes, avec une activité antibactérienne à la fois sur les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻, ainsi qu'une activité antifongique et antilevure pour des concentrations souvent inférieures à 10 μ M (Bulet *et al.*, 2004).

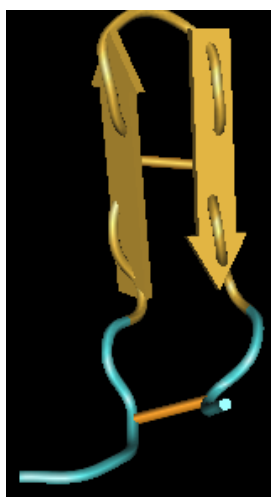
Des peptides contenant un pont disulfure (β -*hairpin-like*) ont également été répertoriés chez les amphibiens, tels que les brevinines (*Rana brevida* et *R. esculenta*), les esculentines (*R. esculenta*), les ranatuérines (Figure 4) (*R. catesbeina*, *R. temporaria* et *R. palustris*) et les tigérinines (*R. tigeria*) (Simmaco *et al.*, 1998). Leur action est dirigée envers les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ ainsi que les levures, pour des concentrations de l'ordre du micromolaire. La brevinine-1 présente en plus un effet hémolytique (Bulet *et al.*, 2004). La bacténécine, est le seul peptide de cette classe identifié chez les mammifères, il est actif à la fois envers les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ (Ganz & Lehrer, 1998; Bulet *et al.*, 2004). Tous ces peptides de structure « β -*hairpin-like* », contiennent une séquence de 7 à 9 résidus acides aminés entre les 2 cystéines engagées dans le pont disulfure. Cette séquence retrouvée chez les amphibiens est appelée « rana box ». Elle correspond à une boucle du C-terminal cationique dont la présence est indispensable pour obtenir l'activité antibactérienne (Dimarcq *et al.*, 1998).

On retrouve également ce type de peptides chez les bactéries à Gram⁺ productrices de bactériocines (peptides antibactériens). Les bactériocines de la classe IIA (« pediocin-like bacteriocin») sont des bactériocines non lantibiotique produites par des bactéries à Gram⁺. Elles présentent toutes 2 cystéines engagées dans 1 pont disulfure, qui leur confèrent

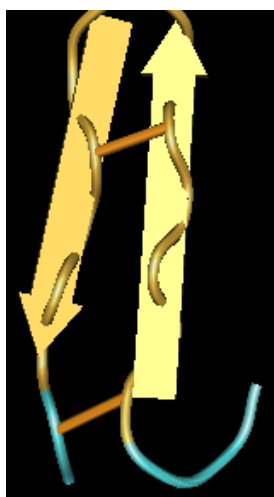
Tableau 3 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 2 ponts disulfure.

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antivirus ; H : hémolytique ; CC : anti-cellules cancéreuses ; P : antiparasites.

Origine	Organisme source	Péptide	Séquence	Activité	
Invertébrés	Arthropodes	Limule <i>Tachypleus tridentatus</i> (Laederach <i>et al.</i> , 2002)	Tachyplésine I	KWCFRVCYRGIYRRCR	G ⁺ & G ⁻ , V, CC
		Limule <i>Tachypleus tridentatus</i> (Miyata <i>et al.</i> , 1989)	Tachyplésine II	RWCFRVCYRGIYRKCR	G ⁺ & G ⁻ ,
		Limules <i>Carcinoscorpius rotundicauda</i> et <i>Tachypleus gigas</i> (Muta <i>et al.</i> , 1990)	Tachyplésine III	KWCFRVCYRGIYRKCR	G ⁺ & G ⁻ ,
		Limule <i>Limulus polyphemus</i> (Miyata <i>et al.</i> , 1989)	Polyphémusine I	RRWCFRVCYRGGCYRKCR	G ⁺ & G ⁻ , V
		Scorpion <i>Androctonus Australis</i> (Mandard <i>et al.</i> , 1999)	Androctonine	RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY	G ⁺ & G ⁻ , F
		Araignée <i>Acanthoscurria gomesiana</i> (Silva <i>et al.</i> , 2000)	Gomésine	ZCRRLCYKQRCVTYCRGR	G ⁺ & G ⁻ , V, F, H, P
Vertébrés	Mammifères	Porc <i>Sus scrofa</i> (Kokryakov <i>et al.</i> , 1993)	Protéagine 2	RGGRLCYCRRRFCIV	G ⁺ & G ⁻ , V, F



Tachyplésine I (MMDB ID: [50227](#))



Polyphémusine I (MMDB ID: [51177](#))



Gomésine (MMDB ID: [49959](#))

Figure 6 : Structure en 3D de peptides antimicrobiens contenant 2 ponts disulfure.

leur activité antibactérienne (anti-Gram⁺) et une structure en hélice α . Certaines possèdent en plus un second pont disulfure dans leur domaine C-terminal, ce qui leur confère une grande spécificité d'action. Ces « pediocin-like bacteriocin », sont composés de 2 domaines séparés par une articulation flexible. Le domaine N-terminal chargé positivement (le plus conservé) comprenant le feuillet β , est capable de s'attacher à la surface cellulaire, alors que le domaine C-terminal plus hydrophobe (moins conservé) contenant une hélice α , interagit avec la membrane cellulaire (Ingolf *et al.*, 2006). Un exemple de ce groupe est la sakacine P produite par *Lactobacillus sake* Lb674 (Figure 5). Elles agissent sur la membrane cytoplasmique des bactéries cibles pour des concentrations de l'ordre du nanomolaire, aux concentrations plus élevées, elles affectent les liposomes intramembranaires (Ingolf *et al.*, 2006).

Peptides contenant deux ponts disulfure :

Parmi le groupe des peptides cycliques riches en cystéines, certains peptides contiennent 4 résidus cystéines engagés dans 2 ponts disulfure internes engendrant une forme β -hairpin-like (Bulet *et al.*, 2004). Le Tableau 3 illustre plusieurs exemples de peptides cycliques présentant 2 ponts disulfure identifiés chez les arthropodes et mammifères.

Dans l'embranchement des arthropodes, les tachyplésines et les polyphémusines (Figure 6) ont été isolés chez les limules (chélicérates) respectivement *Tachypleus tridentatus* et *Limulus polyphemus* (Nakamura *et al.*, 1988; Miyata *et al.*, 1989; Ohta *et al.*, 1992). Ces peptides de 17 à 18 résidus acides aminés présentent une structure particulièrement rigide et amphiphile.

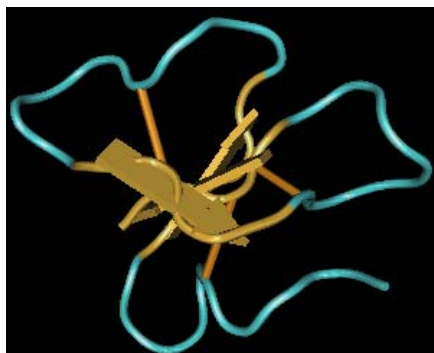
Chez les chélicérates, 2 peptides antimicrobiens contenant 2 ponts disulfure ont également été isolés : l'androctonine chez le scorpion *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996) et la gomésine (Figure 6) chez l'araignée *Acanthoscuria gomesina* (Silva *et al.*, 2000). Le spectre d'activité de ces 4 peptides est très large, et s'étend envers les bactéries à Gram⁻ et à Gram⁺, les levures et dans une moindre mesure envers les champignons filamenteux et même certains virus enveloppés (Yasin *et al.*, 2000).

Les seuls représentants de ce groupe chez les mammifères sont les protégrines, de 16 à 18 résidus acides aminés, isolées dans les leucocytes du porc. Elles présentent des activités antibactériennes (Gram⁻ et Gram⁺) et antilevure (*C. albicans*) (Kokryakov *et al.*, 1993) et sont actives sur certains virus enveloppés (Yasin *et al.*, 2000).

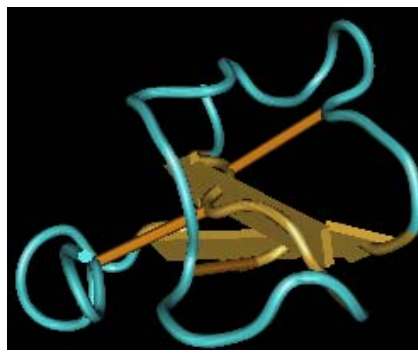
Tableau 4 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 3/4 ponts disulfure.

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antiviral ; H : hémolytique ; CC : anti-cellules cancéreuses.

Origine	Organisme source	Péptide	Séquence	Activité
Invertébrés	Mouche à viande <i>Phormia terranova</i> (Lambert <i>et al.</i> , 1989)	Phormia Défensine A	ATCDLLSGTGINHSACA ¹ AAH ² CLLRGNRGGY ³ CNGKGV ⁴ V ⁵ CRN	G ⁺
	Mouche <i>Sarcophaga peregrina</i> (Yamada & Natori, 1993)	Sapécine B	LT ¹ CEIDRS ² L ³ LLH ⁴ RLKGYLRA ⁵ Y ⁶ CSQK ⁷ V ⁸ CR ⁹ CV ¹⁰ Q	G ⁺ & G ⁻ , H
	Termite <i>Pseudacanthotermes spiniger</i> (Da Silva <i>et al.</i> , 2003)	Termicine	AC ¹ NFQ ² SC ³ WAT ⁴ CQA ⁵ QHSIYFRR ⁶ AF ⁷ CD ⁸ RS ⁹ DR ¹⁰ SQ ¹¹ CK ¹² CV ¹³ FRG	G ⁺ & G ⁻ , F
	Mouche <i>Drosophila melanogaster</i> (Landon <i>et al.</i> , 2000)	Drosomyicine	D ¹ CLSGRYK ² GP ³ CA ⁴ VWDNET ⁵ CRRV ⁶ CKEEGRSSGH ⁷ CS ⁸ PSL ⁹ K ¹⁰ Q ¹¹ WC ¹² EG ¹³ C	G ⁺ & G ⁻ , F
Poissons	Bars <i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i> (Shike <i>et al.</i> , 2002)	Hepcidine	G ¹ C ² R ³ F ⁴ C ⁵ C ⁶ N ⁷ C ⁸ P ⁹ N ¹⁰ M ¹¹ S ¹² G ¹³ C ¹⁴ GV ¹⁵ C ¹⁶ CR ¹⁷ F	G ⁻
Vertébrés	Homme <i>Homo sapiens</i> (Hoover <i>et al.</i> , 2000)	β-Défensine 2 (HBD-2)	GIGDPV ¹ T ² L ³ KSGA ⁴ I ⁵ CH ⁶ PV ⁷ F ⁸ PRRYK ⁹ Q ¹⁰ IG ¹¹ T ¹² CGLPGTK ¹³ CK ¹⁴ KKP	G ⁺ & G ⁻
	Homme <i>Homo sapiens</i> (Selsted <i>et al.</i> , 1985b)	α-Défensine (HNP-1)	AC ¹ Y ² CR ³ PAC ⁴ AG ⁵ ERR ⁶ YGT ⁷ CI ⁸ Y ⁹ Q ¹⁰ GRLWAF ¹¹ CC	G ⁺ & G ⁻ , V, F, CC
	Lapin <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Selsted <i>et al.</i> , 1985a)	α-Défensine (NP-5)	VF ¹ CT ² GR ³ FL ⁴ CG ⁵ SGERASGS ⁶ TINGVRHTL ⁷ CCRR	G ⁺ & G ⁻
	Singe <i>Macaca mulatta</i> (Tang <i>et al.</i> , 1999)	θ-Défensine RTD-1	GF ¹ CR ² LC ³ RRGV ⁴ CR ⁵ CI ⁶ CTR	G ⁺ & G ⁻ , V, F



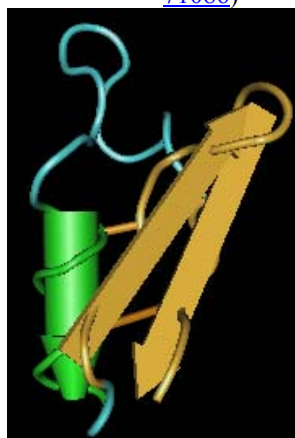
Human Beta Défensine 1 (MMDB ID: [71086](#))



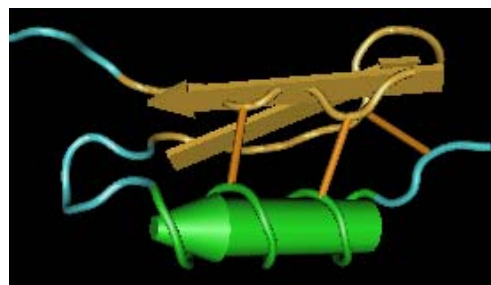
HBD2 (MMDB ID: [18211](#))



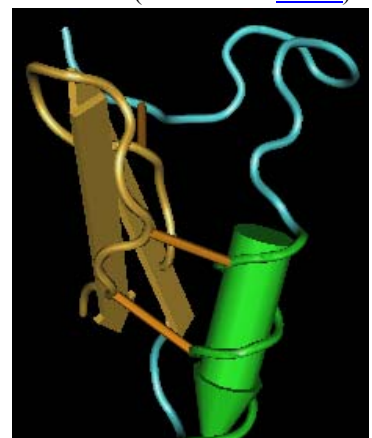
HNP 1 (MMDB ID: [46609](#))



Sapécine B (MMDB ID: [19110](#))



Termicine (MMDB ID: [22993](#))



Phormia Défensine A (MMDB ID: [56408](#))

Figure 7 : Structure en 3D de peptides antimicrobiens contenant 3/4 ponts disulfure.

Peptides contenant trois ou quatre ponts disulfure :

Les peptides possédant 3 ou 4 ponts disulfure constituent la famille des défensines à proprement parler. Leur structure tridimensionnelle consiste habituellement en un domaine en hélice α et deux feuillets β antiparallèles stabilisés par les ponts disulfure ($\alpha\beta\beta$). Dans cette famille, probablement la plus représentée, plus de 70 défensines ont été isolées chez les arthropodes de différents groupes de taxons, comme les insectes, les tiques, la limule, les araignées, les scorpions, chez les mollusques (Dimarcq *et al.*, 1998; Bulet *et al.*, 1999; Iwanaga, 2002; Bulet *et al.*, 2004), et par extension certains crustacés décapodes (Destoumieux *et al.*, 1997). Le Tableau 4 et la Figure 7 illustrent plusieurs exemples de peptides cycliques présentant 3/4 ponts disulfure identifiés chez les arthropodes et mammifères. La classification en sous familles des défensines d'invertébrés est basée sur leurs propriétés biologiques, antibactériennes et/ou antifongiques. Les défensines d'invertébrés sont principalement actives contre les bactéries à Gram⁺, leur activité est nettement plus limitée contre les bactéries à Gram⁻ et les champignons. Seules 4 défensines d'insectes sont strictement antifongiques : la drosomycine chez *Drosophila melanogaster* (Fehlbaum *et al.*, 1994), l'héliomicine chez *Heliothis virescens* (Lamberty *et al.*, 1999), la termicine de *Pseudacanthothermes spiniger* et la gallerimycine chez *Galleria mellonella* (Schuhmann *et al.*, 2003).

Chez les invertébrés, 2 types d'appariement des cystéines impliquées dans les ponts disulfure ont ainsi été décrits : Cys1-Cys4, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 et Cys1-Cys8, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6, Cys4-Cys7 (le pont Cys1-Cys8 est uniquement observé dans la séquence de la drosomycine). Récemment, un troisième type d'appariement des cystéines a été mis en évidence chez la moule *Mytilus galloprovincialis* Cys1-Cys5, Cys2-Cys6, Cys3-Cys7, Cys4-Cys8 (Mitta *et al.*, 2000c; Bulet *et al.*, 2004).

Chez les vertébrés, les défensines sont classées en 2 sous-familles de type α ou de type β reposant sur l'agencement des ponts disulfure entre 3 résidus cystéines : Cys1-Cys6, Cys2-Cys4, Cys3-Cys5 et Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6 respectivement. Ainsi, chez l'homme, il existe des défensines de type α (« Human Neutrophil Peptides », (HPN-1 à 4)) et de type β (« Human Beta Defensins », HBD-1 à 4) (Reddy *et al.*, 2004; De Smet & Contreras, 2005). Les β défensines HBD-1 et HBD-2 montrent une activité inhibitrice principalement contre les bactéries à Gram⁻, tandis que HBD-3 a un large spectre d'activité notamment contre plusieurs bactéries pathogènes ainsi qu'envers la levure *Candida albicans*.

Tableau 5 : Caractéristiques générales des pénaeidines de crevette.

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; F : antifongique.

Origine	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité
Invertébrés Arthropodes	Crevettes <i>Penaeus lannaei</i>	Pénaeidine-1	YRGGYTGPIRPPPIGRPPLRLVQACCYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK	G ⁺ & F
	(Destoumieux <i>et al.</i> , 1997; Destoumieux <i>et al.</i> , 2000)	Pénaeidine-2a	YRGGYTGPIRPPPIGRPPFRPVQACCYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK	G ⁺ & F
		Pénaeidine-3a	QVYKGGYTRPIRPPPFVRLPLGGPIGPYNGCPVSCRGISFSQARSCCSRLGRCCCHVVGKGYG	G ⁺ & F
	<i>Litopenaeus setiferus</i> (Cuthbertson <i>et al.</i> , 2002)	Pénaeidine-4d	HSSGYTRPLRKPSPRPIFIRPIGQDVCYGPSSTARLCCFRYGDCCHL	G ⁺ & F

Certains singes possèdent un type supplémentaire : les défensines de type θ (octadecapeptides de 18 acides aminés), cycliques contenant 3 ponts disulfure résultant de modifications post-traductionnelles de 2 nonadecapeptides dérivés de précurseurs relatifs aux α -défensines. La première θ -défensine (RTD-1) a été isolée à partir des neutrophiles du singe rhésus (Tang *et al.*, 1999). Deux autres θ -défensines ont également été identifiées (RTD-2 et RTD-3) (Tran *et al.*, 2002). Ces défensines affectent la croissance de bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ ainsi que certaines levures.

Les α et β défensines de vertébrés ont une structure similaire composée de 3 feuilletts β , incluant une boucle « β -hairpin-like », s'alignant pour former un feuillet β antiparallèle. Les θ -défensines présentent une structure cyclique (Bulet *et al.*, 2004). Les peptides antimicrobiens, isolés chez les différentes espèces de crevettes pénaeides, présentent six cystéines impliquées dans 3 ponts disulfure (Tableau 5). Les pénaeidines isolées du plasma et des hémocytes des crevettes pénaeides *Penaeus vannamei* forment une famille homogène qui les distinguent des peptides antimicrobiens précédemment décrits dans les autres groupes, par la présence conjointe d'un domaine N-terminal riche en résidus proline et d'un domaine C-terminal comportant 3 ponts disulfure intramoléculaires (Destoumieux *et al.*, 1997). Les cystéines sont engagées selon l'appariement : Cys1-Cys3, Cys2-Cys5, Cys4-Cys6 au niveau du domaine C-terminal. Ce domaine, caractéristique des pénaeidines, consiste en une hélice α liée en amont et en aval par des enroulements créés par les ponts disulfure Cys1-Cys3 et Cys2-Cys5, eux mêmes reliés entre eux par le pont Cys4-Cys6 (Bachère *et al.*, 2000). Les pénaeidines portent par ailleurs des modifications post-traductionnelles à leurs deux extrémités (Destoumieux *et al.*, 1997).

Plusieurs pénaeidines ont été isolées par voie biochimique et par le clonage de leurs ADN complémentaires. Elles présentent de multiples isoformes, constituant des classes distinctes, et une base de données : <http://www.penbase.immunaqua.com/>, leur a été consacrée, afin de comprendre leurs propriétés, diversité et nomenclature (Gueguen *et al.*, 2006a). Les pénaeidines présentent des propriétés antibactériennes essentiellement dirigées contre les bactéries à Gram⁺ (MIC < 5 μ M) et des activités antifongiques pour des concentrations plus élevées sur les champignons filamenteux (MIC de 10 μ M) (Bachère *et al.*, 2000).

Peptides contenant cinq ponts disulfure et plus :

La théromacine, isolée de la sangsue *Theromyzon tessulatum* est un peptide cationique de 75 résidus acides aminés contenant 10 cystéines associées en 5 ponts disulfure : Cys1-Cys2,

Tableau 6 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens d'invertébrés et de vertébrés riches en certains acides aminés.

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antivirus ; H : hémolytique.

	Origine	Composition	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité
Invertébrés	Arthropodes	Riches en proline (P)	Abeille <i>Apis mellifera</i> (Casteels <i>et al.</i> , 1990)	Abaécine	YVPLPNVPQGRRRPFPTFPQGGPFNPKIKWPQGY	G ⁺ & G ⁻
			Fourmie <i>Myrmecia gulosa</i> (Mackintosh <i>et al.</i> , 1998)	Formaécine 1	GRPNPNNKFTPHRL	G ⁻
			Papillon <i>Bombyx mori</i> (Hara & Yamakawa, 1995)	Lébocine 1	DLRFLYPRGKLPVPTPPFFNPKPIYIDMGNRY	G ⁺ & G ⁻
			Mouche <i>Drosophila melanogaster</i> (Bulet <i>et al.</i> , 1999)	Drosocine	GKPRPYSRPTSHRPIRV	G ⁺ & G ⁻
	Riches en glycine (G)	Papillon <i>Hyalophora gloveri</i> (Bulet <i>et al.</i> , 1999)	Glovérine	DVTWDKNIGNGKVFGLGQNDGLFGKAGFKQQFFND DRGKFEQQA YGTRVLGPAAGTTNFGGRLDWSDKNANA ALDISKQIGGRPNLSASGAGVWDFDKNTRLSAGGSLSMG RGKPDVGVHQAQFQHDF	G ⁻	
		Cloporte <i>Armadillidium vulgare</i> (Herbinière <i>et al.</i> , 2005)	Armadillidine	GHLGRPYIGGGGFNRGGGFHRGGGFHRGGGFHSGGGF HRGGGFHSGGSFGYR	G ⁺ & G ⁻	
Urocordés	Riches en phénylalanine (F)	Ascidie <i>Styela clava</i> (Lee <i>et al.</i> , 1997a)	Styéline A	GFGKAFHSVSNFAKKHKTA	G ⁺ & G ⁻	
			Styéline B	GFGPAFHSVSNFAKKHKTA	G ⁺ & G ⁻	
Vertébrés	Poissons	Flétan de l'Atlantique <i>Hippoglossus hippoglossus</i> (Birkemo <i>et al.</i> , 2003)	Hipposine	SGRGKTGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGN YAHRVGAGAPVYL	G ⁺ & G ⁻	
	Mammifères	Riches en Proline (P)	Bovine neutrophils (Storici <i>et al.</i> , 1996)	Bacténécine 5 (bac5)	RFRPPIRRPPIRPPFPYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPLGPPF	G ⁻
		Riches en Proline (P) et arginine (R)	Porc (Boman <i>et al.</i> , 1993)	PR-39	RRRPRPPYLPRRPPPPFPRLPPIRPPGFPPRPPRFP	G ⁻
		Riches en tryptophane (T) et arginine (R)	bovine <i>Bos taurus</i> (Selsted <i>et al.</i> , 1992)	Indolicidine	ILPWKWPWWPWRR	G ⁺ & G ⁻ , V, F, H
			Cochons (Schibli <i>et al.</i> , 1999; Chan <i>et al.</i> , 2006)	Tritrpticine	VRRFPWWPFLRR	G ⁺ & G ⁻ , F
Riches en histidine (H)	Homme <i>Homo sapiens</i> (Raj <i>et al.</i> , 1998)	Histatine 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY	G ⁺ & G ⁻ , F		



Tritrpticine (MMDB ID: [48573](#))

Figure 8 : Structure en 3D de la tritrpticine riche en tryptophane et arginine.

Cys3-Cys4, Cys5-Cys10, Cys6-Cys7, Cys8-Cys9 qui lui confèrent une structure tout à fait originale que l'on n'a retrouvée jusqu'à présent dans aucune autre espèce. La théromacine perd son activité antibactérienne lorsqu'on réduit le nombre de ponts disulfure. Ces derniers jouent donc un rôle important dans l'activité biologique de cette molécule (Tasiemski *et al.*, 2004).

La mytimycine, issue du plasma de la moule *M. edulis* est un peptide partiellement caractérisé, strictement antifongique, qui comporterait 12 cystéines engagées dans des ponts disulfure (Charlet *et al.*, 1996).

(iii) Les peptides riches en acides aminés spécifiques

Un troisième grand groupe rassemble des peptides linéaires dont les séquences primaires sont particulièrement riches en un ou deux aminoacides tels que l'arginine, le tryptophane, la phenylalanine, l'histidine, la glycine ou la proline. Le Tableau 6 présente plusieurs exemples de peptides riches en certains acides aminés identifiés chez les arthropodes et mammifères. Chez les Insectes, les peptides riches en proline sont des molécules linéaires de 14 à 39 résidus, dont la proline peut représenter jusqu'à 25-30% des résidus acides aminés (Bulet & Stöcklin, 2005). Parmi ceux-ci, les abaécines (*Apis mellifera*) (Casteels *et al.*, 1990) et les lébocines (*Bombix mori*) (Hara & Yamakawa, 1995), présentes respectivement chez les abeilles et chez les papillons sont actives contre les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻. Une O-glycosylation post-traductionnelle au niveau de résidus thréonine est observée chez les lébocines. Ces O-glycosylations jouent un rôle sur l'activité antibactérienne de ces peptides, mais aussi sur leur stabilité (Hoffmann *et al.*, 1999). Contrairement aux peptides en hélice α décrits précédemment qui agissent par attaque de la membrane bactérienne, ces peptides agissent par inhibition de la synthèse des protéines (Andreu & Rivas, 1998).

Il existe également chez les mammifères des peptides de la famille des cathélicidines riches en proline et arginine, ces dernières représentant plus de 60% des acides aminés. Certains comme les bacténécines bovines Bac5 et Bac7 présentent plus de 45% de résidus proline et plus de 20% de résidus arginine (Frank *et al.*, 1990). Chez le porc, on trouve aussi des peptides plus longs comme la prophénine-1 (PF-1), composée de plus de 50% de résidus proline et 19% de résidus phénylalanine (Harwig *et al.*, 1995) et le peptide PR-39 dérivé des cathélicidines, qui porte 49% de résidus proline et 26% de résidus arginine (Boman *et al.*,

1993; Harwig *et al.*, 1995). Le PR-39 est actif sur *Escherichia coli*, il semblerait stopper les synthèses d'ADN et de protéines au sein de la bactérie (Boman *et al.*, 1993).

Chez les Mammifères, certains peptides riches en tryptophane appartiennent également à la famille des cathélicidines. L'indolicidine isolée à partir des neutrophiles bovins, est un peptide de 13 acides aminés amidés en C-terminal contenant 38% de tryptophane (Selsted *et al.*, 1992). La tritrpticine chez le cochon est un peptide de 13 acides aminés contenant 23 % de résidus tryptophane et 30% de résidus arginine (Figure 8) (Lawyer *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2006). Tous deux sont actifs contre des bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ ainsi que contre des champignons ; l'indolicidine possède également des activités antiparasitaires. La tritrpticine présente une forte activité hémolytique sur des érythrocytes humains.

Par ailleurs, il existe des polypeptides riches en glycine comme les glovélines isolées à partir de l'hémolymphe de deux lépidoptères, *Hyalophora gloveri* et *Helicoverpa armigera* (Bulet *et al.*, 1999). Les glovélines ont une masse voisine de 14 kDa et possèdent 18% de résidus glycine. Ces peptides inhibent uniquement les bactéries à Gram⁻, en agissant sur la synthèse des protéines de la membrane externe. Un autre peptide riche en glycine, l'armadillidine, composé de 53 acides aminés et possédant 47% de résidus glycine, a été isolé et caractérisé à partir des hémocytes d'*Armadillidium vulgare* (Isopode terrestre) et contrairement aux glovélines, est actif contre des bactéries à Gram⁺, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus megaterium* (Herbinière *et al.*, 2005).

Parmi les peptides de ce groupe structural, les histatines présentes dans la salive humaine sont des peptides cationiques, riches en histidines (29%) (De Smet & Contreras, 2005). L'histatine 5, qui exerce les plus fortes activités antimicrobiennes au sein de ce groupe est notamment active contre les pathogènes *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* en traversant leur membrane cellulaire sans former de pores et agit directement sur les mitochondries.

On peut également ranger dans cette classe les peptides en hélice α , issus du tunicier de *Styela clava*. Les styélines étant riches en phénylalanine (Lee *et al.*, 1997b) et les clavanines riches en histidine (Lee *et al.*, 1997c).

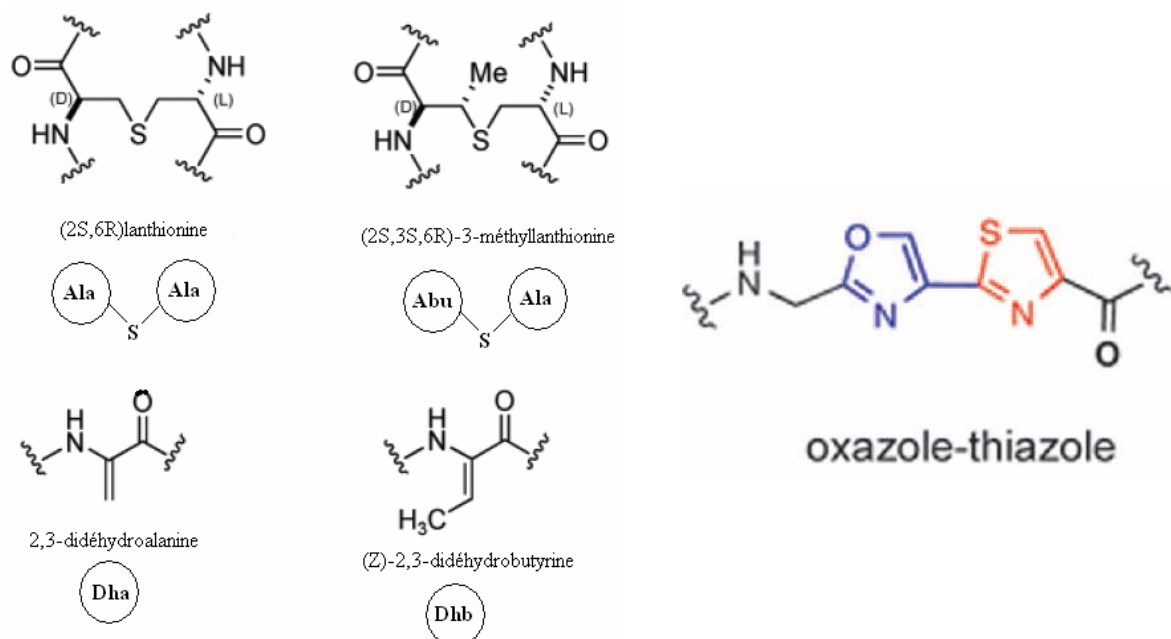


Figure 9 : Formules chimiques des aminoacides peu communs composant les lantibiotiques (Chatterjee *et al.*, 2005) et des résidus modifiés thiazole et oxazole de la microcine B17 (Walsh & Nolan, 2008).

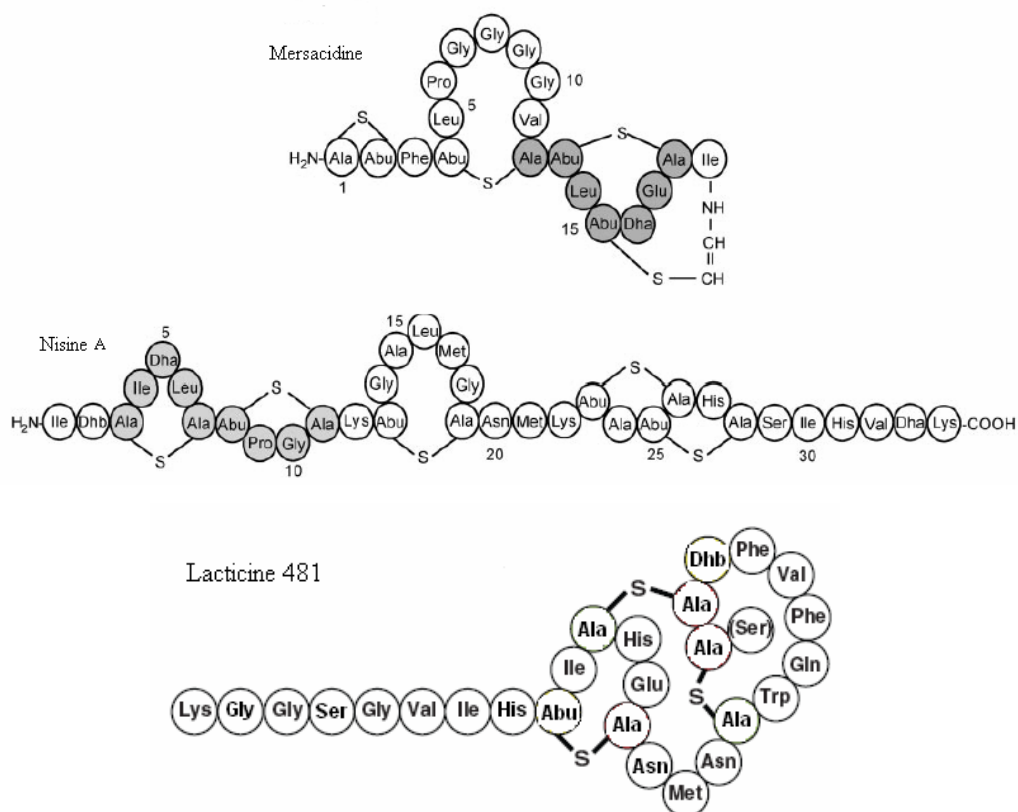


Figure 10 : Structures primaires des lantibiotiques mersacidine, nisine A (Wiedemann *et al.*, 2006) et lacticine 481 (Dufour *et al.*, 2007). Dha : 2,3-didéhydroalanines ; Dhb : (Z)-2,3-didéhydrobutyrines ; Ala-S-Ala : lanthionine ; Abu-S-Ala : β -méthyllanthionine ; Abu : acide aminobutyrique.

(iv) Les peptides contenant des acides aminés rares modifiés

Ces peptides sont considérés comme non communs dans la mesure où ils sont composés d'acides aminés modifiés rares. Au sein de ce groupe, on retrouve les lantibiotiques (classe I des bactériocines) et les microcines (bactériocines de bactéries à Gram⁻) (Jack & Jung, 2000; Gillor *et al.*, 2004).

Les lantibiotiques sont des peptides antimicrobiens produits par des bactéries à Gram⁺. Ces peptides diffèrent des autres bactériocines par la présence de résidus (méthyle)lanthionines. Les lantibiotiques regroupent des peptides qui comportent une quantité importante d'acides aminés peu communs : des résidus de configuration D, des résidus formant des ponts thioéther tels que les lanthionines (Lan) et 3-méthyllanthionines (MeLan) et des déhydroaminoacides tels que la 2,3 déhydroalanine (Dha) et la (Z)-2,3-déhydrobutyrine (Dhb), un pont thioéther peut ainsi se former entre une Dha ou une Dhb et une cystéine non adjacente, formant respectivement un résidu lanthionine (Lan) ou 3-méthyllanthionine (MeLan) (Figure 9) (Jung, 1991; de Vos *et al.*, 1995; Sahl *et al.*, 1995; Sahl & Bierbaum, 1998; Guder *et al.*, 2000; McAuliffe *et al.*, 2001; Twomey *et al.*, 2002; Xie & van der Donk, 2004; Chatterjee *et al.*, 2005; Patton & van der Donk, 2005; Willey & van der Donk, 2007).

Ces résidus originaux résultent de modifications post-traductionnelles de peptides précurseurs codés par des gènes structuraux. La molécule la plus représentative de cette classe est la nisine découverte en 1927. Elle est produite par la bactérie à Gram⁺ *Lactococcus lactis* et utilisée à l'heure actuelle en tant que conservateur alimentaire (E234) (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 2002; Twomey *et al.*, 2002; Chen & Hoover, 2003; Cotter *et al.*, 2005). La nisine est active uniquement sur les bactéries à Gram⁺ et agit à deux niveaux. Elle inhibe la formation de la paroi cellulaire (peptidoglycane) car elle se fixe sur le lipide II précurseur de cette paroi, puis elle induit la formation de pores dans la membrane plasmique conduisant à la lyse cellulaire (Brötz *et al.*, 1998b; Wiedemann *et al.*, 2001).

Il existe de nombreux autres lantibiotiques appartenant au sous groupe des nisines, la subtiline produite par *Bacillus subtilis* (Klein *et al.*, 1993), l'épidermine produite par *Staphylococcus epidermidis* (Schnell *et al.*, 1988) et la gallidermine produite par *Staphylococcus gallinarum* (Freund *et al.*, 1991), le peptide Pep5 produit par *Staphylococcus epidermidis* (Kordel *et al.*, 1988; Kellner *et al.*, 1991) et les lacticines comme la lacticine 481 produites par *Lactococcus lactis* (Dufour *et al.*, 2007) et la mersacidine produite par *Bacillus* sp. (Brötz *et al.*, 1998a; Altena *et al.*, 2000). Ces lantibiotiques présentent des spécificités

structurales (linéaires ou globulaires) (Figure 10) et modes d'action différents (Twomey *et al.*, 2002).

Les microcines sont des peptides antimicrobiens issus de la classe des bactériocines produits par des bactéries à Gram⁻. Ce sont des peptides généralement hydrophobes, présentant une grande stabilité à la chaleur, aux pH extrêmes et aux protéases (Duquesne *et al.*, 2007). Les microcines subissent des modifications post-traductionnelles durant leur biosynthèse. Par exemple, la microcine B17 est un peptide de 43 acides aminés produit par *E. coli*. Des modifications post-traductionnelles ont lieu sur les résidus sérine et cystéine qui réagissent avec le groupement carbonyle d'un résidu glycine adjacent, pour produire des résidus modifiés thiazole (2-aminoéthylthiazole-4-acide carboxylique) ou oxazole (2-aminoéthylloxazole-4-acide carboxylique) formant des hétérocycles (Figure 9) (Heng & Jack, 2006; Parks *et al.*, 2007). La microcine B17 bloque le processus d'élongation de l'ADN des cellules cibles (Herrero *et al.*, 1986).

2.4.1 Modes d'action des PAMs

Bien que les mécanismes d'action des peptides antimicrobiens soient controversés, il existe un certain consensus sur le fait que les peptides perturbent de façon sélective les membranes cellulaires et que leur structure amphiphile jouerait un rôle important dans ce mécanisme. En effet, la charge externe des phospholipides de la membrane cellulaire et la distribution de charge des peptides semblent rentrer en jeu dans les interactions entre les peptides et les membranes biologiques (Bowman *et al.*, 1994; Oren & Shai, 1998; Cudic & Otvos Jr, 2002).

La plupart des peptides antimicrobiens, malgré une grande diversité de spectre d'activité, semblent agir sur la membrane cytoplasmique des micro-organismes. Cette action directe sur la membrane entraîne la mort de la cellule par des phénomènes osmotiques rapides. Certains, cependant, agissent par inhibition de mécanismes intracytoplasmiques tels que la synthèse d'ADN, la synthèse de protéines, des activités enzymatiques, ou encore par des perturbations dans la formation des composants de la paroi (Jenssen *et al.*, 2006). Leur spécificité d'action repose sur la bicouche lipidique des membranes biologiques. Les phospholipides qui la composent présentent un caractère amphiphile, avec des têtes hydrophiles orientées vers l'extérieur et des chaînes alkyles hydrophobes formant l'intérieur de cette bicouche. Les

peptides antimicrobiens habituellement cationiques interagissent avec la charge anionique des lipides exposés à la surface des membranes (Tytler *et al.*, 1995; Toke, 2005).

En effet, les faces externes des membranes des cellules eucaryotes sont riches en phospholipides zwitterioniques rendant leur charge globalement neutre. Les membranes procaryotes présentent des phospholipides hydroxylés qui possèdent une charge nette négative. Cette asymétrie est majoritairement due à la présence de lipopolysaccharides (LPS) chez les bactéries à Gram⁻ et d'acides lipotéichoïques qui ancrent la paroi cellulaire dans la membrane chez les bactéries à Gram⁺. Ces deux composés chargés contribuent également à rendre la charge totale de la cellule procaryote globalement négative. Les peptides antimicrobiens peuvent aussi cibler les membranes fongiques qui présentent des phospholipides chargés négativement tels que le phosphatidylinositol (PI) et/ou la paroi cellulaire composée de (1,3)- β -D-glucanes polyramifiés. Les cellules fongiques sont cependant des cellules eucaryotes (Shai, 2002). Si les phospholipides, les lipopolysaccharides et les acides lipotéichoïques chargés négativement peuvent être considérés comme des sites d'interactions électrostatiques privilégiés, des interactions autres, de type ligand-récepteur, ont aussi été envisagées pour expliquer la spécificité de reconnaissance des peptides antimicrobiens comme la nisine (Epanand & Vogel, 1999).

Cependant, chaque peptide antimicrobien possède un mode d'action qui lui est propre et dépendant de ses caractéristiques intrinsèques (charge, pI, hydrophobicité,...) mais il existe cependant des points communs permettant de mettre en avant certaines généralités. Le mode d'action des peptides antimicrobiens peut ainsi se diviser selon 3 étapes comprenant la fixation initiale (dépendante de la concentration du peptide et de sa capacité à s'autostructurer), l'intégration dans la membrane (dépendante de la conformation et de la capacité d'auto-assemblage des peptides) puis l'aboutissement à la mort cellulaire (par un phénomène de perméabilisation membranaire) (Daffre *et al.*, 2008). Ainsi 4 modes d'actions sont proposés (Jenssen *et al.*, 2006).

Mode d'action en tapis « Carpet-like model »

Ce modèle repose sur une orientation des peptides strictement parallèles vis-à-vis de la membrane. Dans ce cas de figure, les peptides s'organisent et se fixent parallèlement à la membrane présentant leurs résidus hydrophobes face à la membrane, entraînant une réorientation des résidus hydrophiles des phospholipides membranaires vers le corps

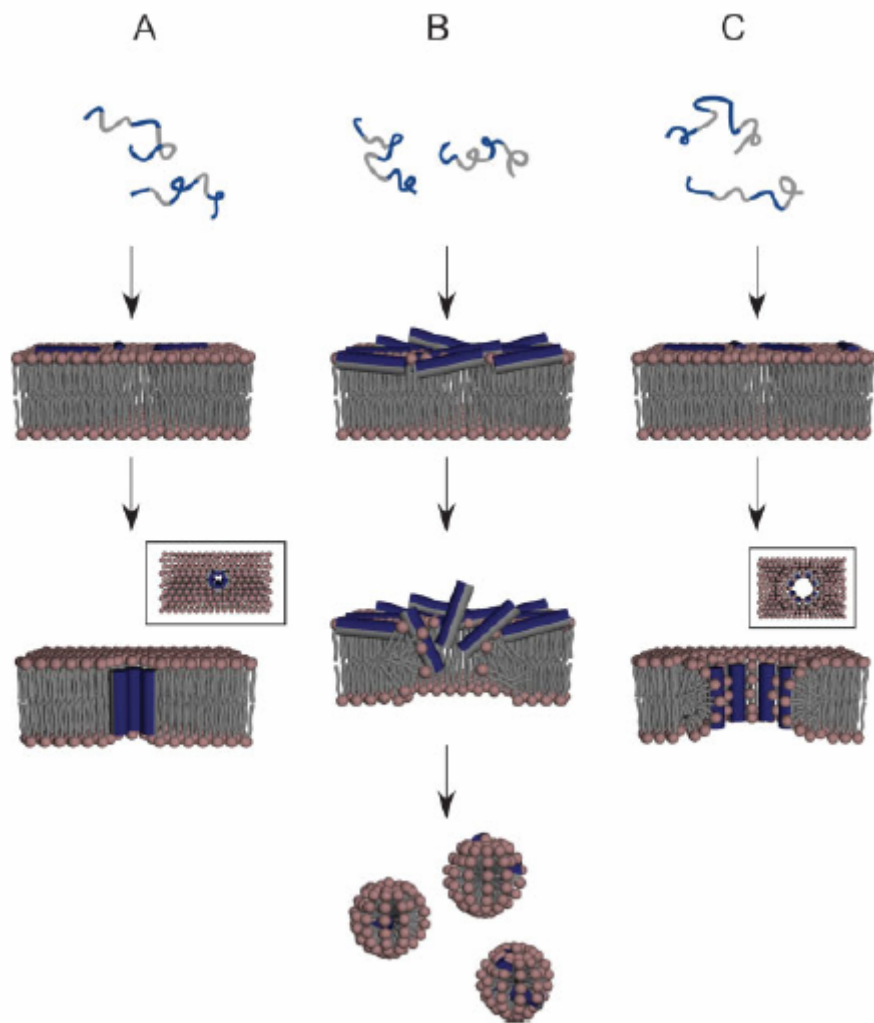


Figure 11 : Schéma illustrant le mécanisme de perméabilisation membranaire des peptides antimicrobiens en hélice α : (A) modèle « *Barrel stave* », (B) modèle « *Carpet-like* », et (C) modèle de pores toroïdaux « *Wormhole model* ». Les faces hydrophiles et hydrophobes des peptides (représentés par des cylindres) sont respectivement colorées en bleu et gris. Les vues du dessus des modèles « barrel-stave » et pores toroïdaux sont représentées dans des fenêtres (d'après (Toke, 2005)).

hydrophobe de la membrane. Après une forte accumulation, les amas de peptides recouvrent la membrane cible à la manière d'un tapis. Ce phénomène entraîne des perturbations locales de l'organisation des phospholipides induisant une dépolarisation membranaire (Matsuzaki *et al.*, 1998). Ces perturbations aboutissent à la rupture de la membrane provoquant la formation de pores et induisant la fuite des métabolites cytoplasmiques, voire une rupture totale de la membrane entraînant la mort cellulaire (Figure 11) (Sitaram & Nagaraj, 1999). Ce modèle fut envisagé pour la première fois dans le cas de la cécropine P1 (Gazit *et al.*, 1996), et a été le premier à être proposé pour décrire le mode d'action des dermaseptines (*Phyllomedusa sauvagei*) (Dagan *et al.*, 2002).

Mode d'action des pores en douve de tonneau « Barrel stave model »

Ce modèle d'action « barrel stave » décrit la formation de pores transmembranaires par des peptides organisés en hélices α amphipathiques. Les surfaces hydrophobes des peptides interagissent avec la partie lipidique de la membrane alors que les surfaces hydrophiles se tournent et pénètrent vers l'intérieur pour former un pore aqueux (Matsuzaki *et al.*, 1998). Le recrutement progressif de monomères additionnels augmente la taille du pore (Reddy *et al.*, 2004). Les canaux transmembranaires ainsi formés vont détruire les équilibres osmotiques et conduire à la lyse de la cellule (Figure 11) (Wu *et al.*, 1999). Un certain nombre d'études révèlent que la paradaxine (Rapaport & Shai, 1991), l'alaméthicine (Sansom, 1993; Chen *et al.*, 2003) et l'endotoxine (Gazit *et al.*, 1994) détruisent les bactéries et les érythrocytes selon ce modèle « barrel stave ».

Mode d'action par formation de pores toroïdaux « Wormhole model »

Ce mécanisme est proche du modèle des pores en douve de tonneaux, mais cette fois les lipides font partie intégrante du pore. En effet, les peptides forment des structures amphiphiles au contact de la membrane puis y enfouissent leur partie hydrophobe. Cette insertion déplace les têtes hydrophiles des phospholipides induisant ainsi une courbure de la membrane. Lorsqu'un certain ratio peptide/lipide est atteint, la tension engendrée provoque le basculement des peptides perpendiculairement à la membrane et ainsi la formation du pore mixte composé à la fois de phospholipides (têtes hydrophiles vers l'intérieur du pore) et de peptides amphiphiles. La présence des têtes hydrophiles des phospholipides, chargées négativement à l'intérieur des pores, contribue à les stabiliser en limitant les phénomènes de répulsions électrostatiques (Figure 11). Ce modèle est proposé pour les magainines (Matsuzaki, 1998) la mélittine (Yang *et al.*, 2001) et la nisine (van Kraaij *et al.*, 1999).

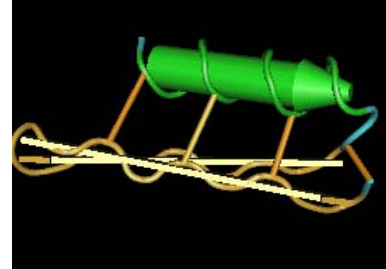
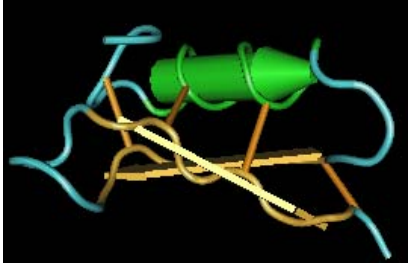


Figure 12 : Structure en 3D de la défensine MGD-1 caractérisée chez *M. galloprovincialis* (MMDB ID: [15038](#)) à gauche et de la mytiline B caractérisée chez *M. galloprovincialis* et *M. edulis* à droite (MMDB ID: [58709](#)).

Mode d'action par formation d'agrégats « aggregate channel model »

Dans ce mécanisme, les peptides se regroupent sans orientation particulière afin de former des agrégats de types micellaires associés aux phospholipides. Ces complexes peptide/lipide éphémères sont cependant capables de traverser la bicouche lipidique et de permettre une translocation du peptide vers l'intérieur de la cellule. Outre le phénomène de perméabilisation membranaire, ce mécanisme peut expliquer l'existence de canaux de taille et de durée de vie variables pour un peptide donné (Wu *et al.*, 1999; Jenssen *et al.*, 2006). Ce mécanisme paraît approprié pour des peptides tels que la polyphémusine I de la limule *Limulus polyphemus* et l'indolicidine bovine qui ne causent pas de dépolarisation membranaire permanente et qui semblent agir sur des cibles cytoplasmiques (Powers *et al.*, 2004).

2.4.2 Les peptides antimicrobiens chez les mollusques marins

Une vue d'ensemble sur les peptides antimicrobiens caractérisés chez les invertébrés marins a été proposée en 2004 (Tincu & Taylor, 2004). Ces peptides sont les composants majeurs du système de défense des invertébrés marins et semblent très répandus chez ces animaux notamment au niveau des systèmes digestifs et respiratoires. Compte tenu de l'étendue et de la diversité des espèces marines, peu de peptides antimicrobiens sont connus et la majorité des peptides antimicrobiens d'origine marine ont été identifiés chez des espèces appartenant aux urocordés, aux arthropodes ou aux mollusques.

Les peptides cycliques riches en cystéines

Les premiers peptides antimicrobiens isolés chez les mollusques marins ont été caractérisés chez les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (Charlet *et al.*, 1996; Hubert *et al.*, 1996). Différentes familles de peptides ont été identifiées. Des défensines (défensines A et B) ont été caractérisées chez la moule *Mytilus edulis* (Charlet *et al.*, 1996; Hubert *et al.*, 1996). Chez *Mytilus galloprovincialis*, des défensines 1 et 2 (MGD1 et MGD2) (Figure 12) (Hubert *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 1999b), des mytilines (A (*M. edulis*), B, C, D et G1) (Figure 12) (Mitta *et al.*, 1999b) et des myticines (myticines A et B et mytimycine (*M. edulis*)) (Mitta *et al.*, 1999a; Mitta *et al.*, 1999b) ont été purifiées à partir des hémocytes (Tableau 7).

Ces peptides sont synthétisés sous forme de précurseurs et stockés sous forme mature dans différents types de granules hémocytaires. Ils interviennent dans la destruction des bactéries à

Tableau 7 : Peptides antimicrobiens isolés et caractérisés chez *Mytilus* sp. et *Crassostrea* sp.

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique.

Origine	Organisme source	Peptide (Masse en Da)	Isolé à partir de	Séquences							Activité				
				1	5	10	15	20	25	30		35	40		
Invertébrés Mollusques bivalves	moules	<i>M. edulis</i> (Plasma) (Charlet <i>et al.</i> , 1996)	Défensine A (4314,3)	Plasma	GFGCPNDYP	CHRHCKS	IPGRXGGY	CGGXHRLR	CTCYR						G ⁺
			Défensine B (4392,4)	Plasma	GFGCPNDYP	CHRHCKS	IPGRYGGY	CGGXHRLR	CTC						G ⁺
		<i>M. galloprovincialis</i> (Charlet <i>et al.</i> , 1996; Mitta <i>et al.</i> , 1999b)	MGD-1 (4415,0)	Plasma / hémocytes	GFGCPNNYQ	CHRHCKS	IPGRG	GGY	CGGWHLR	CTCYRCG					G ⁺ & G ⁻
			MGD-2 (inconnue)	Librairies à ADNc	GFGCPNNYAC	QHCKS	IRGY	GGY	CAGWFLR	CTCYRCG					G ⁺ , F
		<i>M. edulis</i> (Charlet <i>et al.</i> , 1996)	Mytiline A (3773,7)	Plasma	GCASRCKAKC	AGRRC	KGWASAS	FRGR	CYCK	CFRC					G ⁺ , F
	<i>M. edulis</i> & <i>M. galloprovincialis</i> (Charlet <i>et al.</i> , 1996; Mitta <i>et al.</i> , 2000a)	Mytiline B (3974,3)	Plasma / Hémocytes	SCASRCKGHCR	ARRRC	GYVSVL	YRGR	CYCK	CLRC					G ⁺ & G ⁻	
	<i>M. galloprovincialis</i> (Mitta <i>et al.</i> , 2000b)	Mytiline C (4287,05) Mytiline D (3868,65) Mytiline G1 (4118,03)	Hémocytes Hémocytes Hémocytes	SCASRCKSR	CRARRC	RYVSVRY	GGFC	YCRC							G ⁺ & G ⁻
				GCASRCKAKC	AGRRC	KGWASAS	FRRC	CYCK	CFRC						G ⁺ & G ⁻
				VVTCGSLCK	AHCTFR	CKGYFMS	SVLYHGR	CYCR	LLC						G ⁺
		<i>M. galloprovincialis</i> (Mitta <i>et al.</i> , 1999a)	Myticine A (4437,45) Myticine B (4563,45)	Hémocytes / Plasma Hémocytes	HSHACTS	YWGKFC	GTASCTH	YLCRVL	HPGKM	ACVHCSR					G ⁺
				HPHVCTS	YYCSKFC	GTAGCT	RYGCRNL	HRGKLC	FLHCSR					G ⁺	
	<i>M. edulis</i> (Charlet <i>et al.</i> , 1996; Mitta <i>et al.</i> , 1999a; Mitta <i>et al.</i> , 1999b))	Mytimycine (6233,5)	Plasma	DCCRKPF	RRHC	WDCT	AGTPYY	GSTRN	IFGCTC	---				F	
				(caractérisation partielle)											
huîtres	<i>Crassostrea virginica</i> (Seo <i>et al.</i> , 2005)	AOD (4271,0)	Branchies	GFGCPWNRYQ	CHSHCRS	IGRLGGY	CAGSLRL	TCTCTYRS						G ⁺ & G ⁻	
	<i>Crassostrea gigas</i> (Gueguen <i>et al.</i> , 2006)	Cg-Def (4634,0)	Manteau	GFGCPGNQLK	CNMHCKS	ISCRAGY	CDAATL	WLRCTC	TD	CNGKK				G ⁺	
		Cg-Defh-1 (4834,5)	Librairies à ADNc	GFGCPRDQYK	CNSHCQS	IGCRAGY	CAVTL	WLRCTC	TD	CNGKK				G ⁺ & G ⁻	
	(Gonzalez <i>et al.</i> , 2007)	Cg-Defh-2 (4748,4)	Librairies à ADNc	GFGCPGDQYE	CNRHCRS	IGCRAGY	CAVTL	WLRCTC	TG	CSGKK				G ⁺ & G ⁻	
	(Gueguen <i>et al.</i> , 2009)	Cg-PrP (4240,0)	Librairies à ADNc	ILENLLAR	STNED	REGS	IFDTG	P	IRRP	KPRP	PRP	PEG		G ⁺ & G ⁻	

l'intérieur des phagocytes, et sont relargués dans l'hémolymphe pour prendre part aux réponses immunitaires systémiques. Ces peptides antimicrobiens sont caractérisés par la présence de 6 à 8 cystéines dans leur séquence primaire, à l'exception de la mytimycine partiellement caractérisée, renfermant 12 cystéines. Les peptides de moules montrent des caractéristiques communes, c'est-à-dire un peptide signal cationique, suivi du peptide mature et d'une extension C-terminale anionique (Mitta *et al.*, 1999a). La structure tridimensionnelle de la défensine MGD a été établie, révélant la présence d'un motif cystéine stabilisé CS- α - β caractéristique des défensines d'arthropodes bien que chez la moule un pont disulfure supplémentaire soit observé dans la séquence (Yang *et al.*, 2000). Chez la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*, plusieurs isoformes de défensines et de mytilines ont été caractérisées et révèlent des activités antimicrobiennes différentes et parfois complémentaires. Cette diversité des peptides antimicrobiens exprimés chez la moule pourrait contribuer à élargir le spectre d'activité vis-à-vis des microorganismes pathogènes au cours de la réponse immunitaire (Mitta *et al.*, 1999a). La localisation et la régulation de l'expression des peptides antimicrobiens ont été étudiées en détail chez la moule *M. galloprovincialis*. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des similitudes entre la réaction anti-infectieuse modulée par les peptides antimicrobiens chez ce mollusque et les mammifères. Les peptides antimicrobiens de moule participent à la réponse immunitaire à deux niveaux : locale et systémique (Mitta *et al.*, 1999a; Mitta *et al.*, 2000c). En effet, il a été montré qu'en réponse à une stimulation bactérienne, les hémocytes de moule sont capables de migrer au site d'infection où des phénomènes de phagocytose interviennent. Les bactéries internalisées dans les hémocytes se retrouvent alors en contact avec les peptides antimicrobiens au niveau des phagosomes comme décrits chez les neutrophiles de vertébrés. A cette réaction locale peut s'en suivre une réaction systémique caractérisée par la libération, par exocytose dirigée, de peptides antimicrobiens et une augmentation notable de leur concentration plasmatique (Mitta *et al.*, 1999b).

Grâce aux avancées et aux outils développés par la biologie moléculaire, de nouvelles molécules antimicrobiennes ont pu être identifiées chez les moules et autres bivalves. Récemment, une séquence consensus d'un nouveau gène a été rapportée par hybridation suppressive soustractive (SSH), répertoriée dans des bibliothèques à ADNc chez *Mytilus galloprovincialis*. Une myticine C a ainsi été identifiée (Pallavicini *et al.*, 2008). Toujours à l'aide de techniques moléculaires d'hybridation suppressive soustractive (SSH) et par séquençage et analyse d'ESTs (Expressed Sequence Tag), des isoformes 1, 2 et 3 de

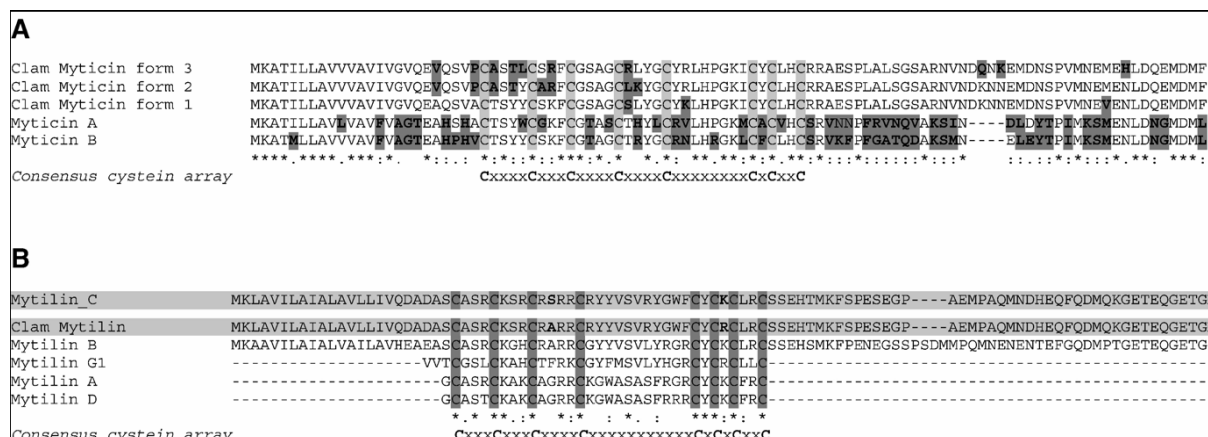


Figure 13 : A : Alignements de séquences des isoformes des myticines de *R. decussatus* avec les myticines A et B de *Mytilus* sp. B : Alignements des séquences d'acides aminés de la mytiline de *R. decussatus*, comparées avec les mytilines de *Mytilus* sp. (*) résidus identiques, (:) substitutions conservées et (.) substitutions semi conservées. Les séquences similaires sont surlignées en gris et les différences de séquence en acides aminés entre les 2 formes sont en gras. Les séquences consensus en cystéines sont indiquées en gras (d'après (Gestal et al., 2007)).

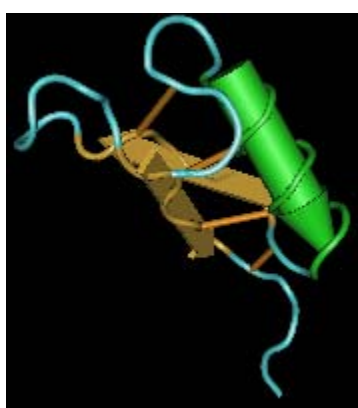


Figure 14 : Structure en 3D de la défensine CgDef identifiée chez *C. gigas* (MMDB ID: [36150](#)).

myticines (Clam myticines 1, 2 et 3) et une mytiline (Clam mytiline), présentant des similitudes avec les myticines et mytilines rapportées chez *Mytilus galloprovincialis*, ont été identifiées et caractérisées chez la palourde *Ruditapes decussatus* (Gestal *et al.*, 2007) (Figure 13). D'autre par, 5 ESTs identifiés chez *R. philippinarum* présentent des similarités avec le peptide de type défensine MGD-1, isolé dans le plasma et les hémocytes de *M. galloprovincialis* (Kang *et al.*, 2006).

Chez l'huître *C. virginica*, un peptide de type défensine, l'« American Oyster Defensin » (AOD) a été isolé et caractérisé à partir d'extraits de branchies (Seo *et al.*, 2005). Cette défensine est exprimée de façon constitutive chez des huîtres saines sans réaliser de challenge bactérien. Des techniques d'approche par biologie moléculaire ont également permis d'identifier des molécules de type défensines, Cg-Def (Figure 14) (Gueguen *et al.*, 2006b) ainsi que Cg-Defh-1 et Cg-Defh-2 (Gonzalez *et al.*, 2007) chez l'huître creuse *C. gigas*. L'AOD est constituée de 3 ponts disulfure et la Cg-Def possède 8 cystéines impliquées dans la formation de 4 ponts disulfure. L'AOD et la Cg-Def présentent respectivement 71 % et 50 % d'homologies de séquence avec la MGD-1 de *Mytilus galloprovincialis*. L'AOD montre une forte activité contre les bactéries à Gram⁺ telles que *Lactococcus lactis* (CMI de 3 µg.mL⁻¹) et *Staphylococcus aureus* (CMI de 2,4 µg.mL⁻¹) mais aussi des activités significatives contre des bactéries à Gram⁻ telles que *E. coli* D31 (CMI de 7,6 µg.mL⁻¹) et *Vibrio parahemolyticus* (CMI de 15 µg.mL⁻¹) (Seo *et al.*, 2005). La Cg-Def est active contre les bactéries à Gram⁺, *Micrococcus lysodeikticus* (CMI de 0,046 µg.mL⁻¹), *S. aureus* (CMI de 11,6 µg.mL⁻¹), *Brevibacterium stationis* 0.2 (CMI de 0,926 µg.mL⁻¹) et *Microbacterium maritypicum* 1 (CMI de 4,63 µg.mL⁻¹) et à Gram⁻, *E. coli* 363 (CMI de 92,6 µg.mL⁻¹) et également contre le champignon filamenteux *Fusarium oxysporum* (CMI de 20,8 µg.mL⁻¹) (Gueguen *et al.*, 2006b).

Les peptides riches en certains acides aminés

Une séquence d'ADNc codant pour un peptide de 37 résidus acides aminés, Cg-Prp composé d'une région acide et d'une région cationique riche en proline a été identifiée chez *C. gigas*. Ce peptide est exprimé dans les hémocytes de *C. gigas* et produit une action antibactérienne synergique avec la défensine Cg-Def, envers les bactéries *E. coli* et *M. lysodeikticus*. Ce peptide est le premier peptide antibactérien, riche en proline, identifié chez un mollusque (Gueguen *et al.*, 2009).

2.4.3 Autres molécules de défense détectées chez les mollusques marins

Activités cytotoxiques

Chez la moule, *M. edulis*, la production de molécules cytolytiques par les hémocytes a été rapportée (Leippe & Renwranz, 1988). Une activité vis-à-vis de cellules de vertébrés (érythrocytes et cellules tumorales de souris) et de parasites protozoaires a également été détectée chez la moule, *M. galloprovincialis* (Hubert *et al.*, 1996). La purification des composés actifs a permis de mettre en évidence un complexe protéique de 320 kDa (Roch *et al.*, 1996). Composé de trois protéines différentes, le complexe agit comme une perforine par polymérisation après fixation à la surface des cellules cibles (Hubert *et al.*, 1997).

Activités antivirales

Des activités antivirales ont également pu être observées chez les bivalves. Des substances antivirales (paolin I and II) ont été mises en évidence dans un extrait aqueux préparé à partir de la mye, *Mya arenaria* présentant une activité vis-à-vis du virus d'amphibien LT-1 (Prescott *et al.*, 1966; Li & Traxler, 1972). Des essais *in vitro* ont permis de détecter une activité de neutralisation du bactériophage T3 dans l'hémolymphe de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Bachère *et al.*, 1990). Un peptide inhibant une protéase du Virus de l'Immunodéficience Humaine type 1 (VIH-1) a également été isolé à partir d'un hydrolysate de *C. gigas* (Lee & Maruyama, 1998). Récemment, chez cette même espèce, un composé présent dans l'hémolymphe a montré la faculté d'inhibition de la réplication du Virus *Herpes simplex* type 1 (VHS-1) et du Virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (VNPI) (Olicard *et al.*, 2005). Une fraction cellulaire de l'hémolymphe de *Crassostrea rhizophorae* a montré une inhibition du virus VHS-1 et une inhibition de la réplication de l'adénovirus respiratoire humain (AdV-5) (Carriel-Gomes *et al.*, 2006). Tout dernièrement, une forme synthétique de la mytiline A a révélé une activité antivirale *in vitro* sur le modèle VHS-1 /cellules Vero (Carriel-Gomes *et al.*, 2007). La mytiline B, un peptide synthétique caractérisé chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, possède également une activité antivirale *in vitro* contre le virus « white spot syndrome virus » (WSSV) (Dupuy *et al.*, 2004; Roch *et al.*, 2004; Roch *et al.*, 2008). Parmi les mollusques marins opisthobranches (sous classe des Gastéropodes), l'espèce *Elysia reufescens* a été étudiée et a

Tableau 8 : Glycoprotéines antimicrobiennes et peptides antimicrobiens isolés chez des mollusques opisthobranches.

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antivirale ; MO : antitumorale ; MA : antimalariale.

Organisme source	Nom	Isolé à partir de	Masses (Da)	Activité
<i>Dolabella auricularia</i>	<u>Dolabellanines</u>			
(Kisugi <i>et al.</i> , 1992; Iijima <i>et al.</i> , 2003b)	Dolabellanine A	Glande de l'albumen	250.10 ³	G ⁺ & G ⁻ , F
(Kisugi <i>et al.</i> , 1992; Iijima <i>et al.</i> , 2003b)	Dolabellanine B2	Peau/mucus	3872,5	G ⁺ & G ⁻ , F
<i>Aplysia kawodai</i>	<u>Aplysianines</u>			
(Kamiya <i>et al.</i> , 1986)	Aplysianine-A	Glande de l'albumen	320.10 ³	G ⁺ & G ⁻
(Kisugi <i>et al.</i> , 1987)	Aplysianine-E	Oeufs	250.10 ³	G ⁺ & G ⁻ , F
(Yamazaki <i>et al.</i> , 1990)	Aplysianine-P	Fluide violet sécrété	60.10 ³	G ⁺ & G ⁻
<i>Aplysia Juliana</i>	<u>Julianines</u>			
(Kamiya, 1989; Yamazaki, 1993)	Julianine-S	Sécrétions fétides	67.10 ³	G ⁺
<i>Aplysia dactylomela</i>				
(Melo <i>et al.</i> , 2000)	Dactylomeline-P	Fluide violet sécrété	60.10 ³	G ⁺ & G ⁻
<i>Elysia rufescens</i>	<u>Kahalalides</u>			
(Hamann <i>et al.</i> , 1996)	Kahalalides E	Ventricule digestive	836,5	V, MO, MA
(Hamann <i>et al.</i> , 1996)	Kahalalides F	Ventricule digestive	596,3	V, MO, MA

révélée à partir d'extraits du ventricule digestive, sa capacité à produire des depsipeptides cycliques appelés Kahalalides E et F, présentant une activité antivirale contre le virus VHS-2 (Hamann *et al.*, 1996).

Activités détectées chez des mollusques opisthobranches

Des études ont mis en évidence la présence d'activités antimicrobiennes liées à des glycoprotéines et peptides chez plusieurs espèces de mollusque opisthobranches. Des dolabellanines, aplysianines et kahalalides ont été isolées respectivement à partir des « lièvres de mer » (« sea hare ») *Dolabella auricularia*, *Aplysia kurodai* et *Elysia rufescens*. Des activités antibactériennes ont été identifiées chez les dolabellanines A et B2 et les aplysianines A, E and P (Iijima *et al.*, 2003). Des glycoprotéines antibactériennes appelées julianines-S, dactylomelyne-P ont été identifiées chez les espèces *Aplysia Juliana* et *Aplysia dactylomela* (Hamann *et al.*, 1996; Melo *et al.*, 2000). Ces molécules et leurs propriétés sont répertoriées dans le Tableau 8.

Objectifs de travail

Au regard de la diversité des molécules d'intérêt vis-à-vis des invertébrés marins, les peptides antimicrobiens de par leur ubiquité et l'étendue de leurs activités (antibactériennes, antifongiques, antivirales ou antihumorales) sont une catégorie remarquable de molécules de défense contre des agents infectieux. Dans ce contexte, notre objectif est la recherche de peptides antimicrobiens chez des mollusques d'intérêt aquacole, encore peu explorés à cette fin, et plus particulièrement chez une espèce modèle pour l'étude des peptides antibactériens, l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Ce travail s'articule autour de 4 points :

- ❖ La recherche d'activités antibactériennes et antivirales chez 4 espèces de bivalves et 3 espèces de gastéropodes marins.
- ❖ La caractérisation partielle des composés actifs antimicrobiens détectés chez les mollusques marins *Cerastoderma edule*, *Littorina littorea* et *Crassostrea gigas*.
- ❖ La purification et la caractérisation de composés antimicrobiens chez *Crassostrea gigas*.
- ❖ La recherche de bactéries antagonistes dans l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*.

MATÉRIELS & MÉTHODES

3 Matériel biologique

3.1 L'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*

Les huîtres creuses *Crassostrea gigas* récoltées sont âgées de 3 ans environ, de calibres 1 ou 2, hors norme pour la vente. Elles mesurent 12 cm de long sur 5 cm de large en moyenne. Elles ont été fournies par Mr Nicolazo, producteur ostréicole du golfe du Morbihan (presqu'île de Rhuys, le tour du parc, Pencadenic, côte Atlantique française).

Prélèvement L'hémolymphe

Les huîtres sont ouvertes après section du muscle adducteur et l'hémolymphe est ponctionnée dans la cavité péricardique en transperçant la membrane péricardique à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille stérile (23G, n°16, Terumo). La collecte d'hémolymphe a été réalisée pendant les mois de septembre, octobre, novembre, mai, juin et juillet (2005-2006). L'hémolymphe de l'ensemble des individus est regroupée et amassée dans un flacon en verre de 450 mL placé dans la glace, de manière à conserver les hémocytes et éviter une agrégation. La quantité d'hémolymphe prélevée par individu est comprise entre 1 et 3 mL. L'hémolymphe est ensuite filtrée sur membranes stériles de 0,22 µm (NALGENE Disposable Filter and Bottle, SFCA serum Filter Unit, 500 mL ; 90 mm Diameter Membrane) sous une hotte à atmosphère stérile (Poste de Sécurité Biologique, (PSM)). Chaque prélèvement d'hémolymphe est suivi d'une observation en microscopie en phase inverse, ((Gx100) immersion de l'échantillon dans de l'huile à immersion) afin d'observer la présence d'hémocytes.

3.2 Mollusques bivalves et gastéropodes

Les bivalves étudiés sont la coque *Cerastoderma edule*, l'huître plate *Ostrea edulis*, la palourde *Ruditapes philippinarum*. Les gastéropodes étudiés sont le bulot *Buccinum undatum*, le bigorneau *Littorina littorea* et la crépidule *Crepidula fornicata*.

Les individus ont été fournis vivants par Mr Claude Bourbon (Bourbon marée S.A.S), Mareyeur à la Trinité-sur-Mer. Tous les organismes proviennent d'élevages ostréicoles originaires de la baie de Quiberon dans le golfe du morbihan. Les crépidules ont été collectées sur des coquilles de bivalves. Ces organismes ont été prélevés durant le mois de mars 2007.

Leurs calibres correspondent à ceux destinés à la consommation. Leurs dimensions moyennes sont les suivantes (longueur (L) x largeur (l) de la coquille) :

Bivalves	Gastéropodes
Coque : <i>Cerastoderma edule</i> : 3,6 x 3,0 cm (L x l)	Bulot : <i>Buccinum undatum</i> : 6,5 x 3,0 cm (L x l)
Huître plate : <i>Ostrea edulis</i> : 8,0 x 4,0 cm (L x l) (calibre 3)	Bigorneau commun : <i>Littorina littorea</i> : 3,0 x 2,0 cm (L x l)
Palourde japonaise : <i>Ruditapes philippinarum</i> : 4,2 x 3,3 cm (L x l)	Crépidule : <i>Crepidula fornicata</i> : 5,0 x 3,0 cm (L x l)

Prélèvement et collecte des corps

Pour les 3 bivalves étudiés, chaque organisme (corps de l'animal) a été intégralement prélevé de sa coquille. Seule l'huître *O. edulis* fait l'objet d'une étude particulière de son manteau associé aux branchies d'une part et de sa glande digestive d'autre part (organes dont les tissus conjonctifs contiennent une importante concentration de granulocytes (Xue *et al.*, 2001; Xue & Renault, 2001)). Afin de faciliter leur ouverture, les coques et les palourdes ont été immergées pendant 15 h dans un mélange (50/50 ; (v/v)) d'une solution à 7,5% de MgCl₂ et d'eau de mer artificielle stérile (NaCl, 30 g.L⁻¹ ; MgCl₂, 10,2 g.L⁻¹ ; KCl, 0,74 g.L⁻¹) (Maes, 1992). Concernant les 3 espèces de gastéropodes, leurs corps ont été extraits de leurs coquilles à l'aide d'un étau. Les opercules ont ensuite été retirés manuellement. A l'exception des huîtres plates pour lesquelles 3 kg ont été nécessaires, environ 500 g d'individus de chaque espèce de bivalves et gastéropodes ont été récoltés afin d'obtenir une masse fraîche totale finale, comprise entre 100 et 200 g.

3.3 Lignée cellulaire mammaliennes : les cellules Vero (ATCC: CCL 81)

Cette lignée cellulaire correspond à des cellules fibroblastiques de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*), en culture continue. C'est une lignée adhérente, garantie stérile, établie en 1962 par Yasumara et Kawakita (Yasumara & Kawakita, 1963). Son taux de croissance est de 1 pour 20 en 7 jours, lorsque les cellules sontensemencées à raison de 3.10⁵ cellules/mL. Les cellules Vero possèdent un nombre de chromosomes et/ou une morphologie anormale. Elles présentent des propriétés spécifiques les différenciant des cellules normales, en particulier un haut potentiel multiplicatif. Cette lignée cellulaire est très sensible à de

nombreux virus, dont le virus *Herpes simplex* de type 1 (VHS-1), elle est donc adaptée pour l'évaluation d'activité anti-VHS-1.

Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la croissance et l'entretien des cellules est le milieu Minimal Essential Medium (MEM) de Eagle, modifié avec des sels de Earle et des acides aminés non essentiels (Eurobio). Ce milieu est tamponné par du bicarbonate de sodium (NaHCO_3) 7,5% (Sigma) et ajusté à un pH de $6,90 \pm 0,1$ sous CO_2 . Stérilisé par filtration sur membrane de $0,22 \mu\text{m}$, le milieu est alors réparti stérilement en flacons de 500 mL, conservé à 37°C pendant 24 h puis à température ambiante pendant 48 h et enfin stocké à 4°C si aucune contamination n'a été décelée. Au moment de l'utilisation, le milieu est enrichi par l'addition de 8% de Sérum de Veau Fœtal (SVF 00-01, Eurobio) (MEM 8% SVF), inactivé 40 min au bain-marie à 56°C et filtré sur membrane $0,22 \mu\text{m}$. A ce milieu est ensuite ajouté 1% de glutamine (200 mM) (CSTGLU 00-OU, Eurobio), nécessaire pour l'obtention d'une culture satisfaisante de cellules de mammifères. Le milieu est également complété à 1% par les antibiotiques et les anti-fongiques suivant : de la pénicilline (10 000 d'unités/mL ; Sigma), de la streptomycine ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Sigma) et de la colimycine (10 000 d'unités /mL ; Sigma), afin de réduire les contaminations par les bactéries et les champignons. Les solutions d'antibiotiques ont été préalablement préparées dans 200 mL de solution phosphatée et réparties en aliquots de 5 mL. La solution phosphatée est préparée pour 5 L, à partir de chlorure de sodium (40 g ; Sigma), de chlorure de potassium (1 g ; Sigma), de phosphate disodique (14,5 g ; Sigma), de phosphate monopotassique (1 g ; Sigma) et d'eau distillée (5 L). Cette solution phosphatée est stérilisée 20 min à 120°C et conservée à 4°C avant utilisation.

Entretien des cellules Vero

Les cellules Vero sont cultivées dans 30 mL de milieu nutritif MEM 8% SVF complété, puis incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 , en monocouche cellulaire, dans des flacons de 75 cm^2 (VWR). Le pH du milieu est maintenu à 7,4 (indicateur de pH : rouge de phénol) grâce au système tampon $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ du milieu et renforcé par l'atmosphère enrichie à 5% de CO_2 (système tampon avec HCO_3^-). Le CO_2 n'intervient pas seulement au niveau du pH mais également sur la prolifération cellulaire au niveau de la biosynthèse des acides puriques et pyrimidiques. Enfin, l'atmosphère nécessite d'être saturée en vapeur d'eau afin de prévenir l'évaporation et donc l'augmentation de l'osmolarité du milieu. Les cellules d'un flacon doivent être multipliées lorsque le tapis cellulaire est confluent, soit 2 fois par

semaine. Le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est lavé avec la solution phosphatée (afin de favoriser l'action de la trypsine ensuite ajoutée). Deux mL de trypsine (Eurobio, Trypsine / EDTA : $0,5\text{g.L}^{-1}$ / $0,2\text{g.L}^{-1}$) sont alors ajoutés et laissés en contact avec le tapis cellulaire pendant une minute à température ambiante. Puis, après avoir enlevé l'excès de la solution de trypsine, le flacon est placé 5 à 10 minutes à 37°C jusqu'à complète dissociation du tapis cellulaire. Les cellules agglomérées sont séparées par aspirations et rejets de 6 mL de milieu MEM 8% SVF. Les cellules décollées sont ensuiteensemencées à raison de 2 mL de suspension cellulaire par nouveaux flacons de 75 cm^2 (1 flacon en 3 flacons) dans 30 mL de milieu MEM 8% SVF. Chaque flacon, après l'entretien des cellules, doit contenir en moyenne 350 000 cellules/mL.

Conservation des cellules Vero

Une culture de cellules Vero en croissance exponentielle (~ 25 à 30 h), à moins de 10 repiquages est dissociée par ajout de trypsine et reprise par 4 mL de SVF pur. Les cellules en suspension homogène sont alors distribuées dans des cryotubes à raison de 1 mL par cryotube. Cette opération s'effectue à froid dans de la glace. En parallèle, une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) 20% (agent cryoprotecteur), est préparée dans du milieu MEM 8% SVF. Un mL de cette solution de DMSO 20% est rajouté goutte à goutte sur les cellules précédemment déposées dans les cryotubes. Une fois les cryotubes remplis de cellules dans le DMSO (6.10^6 cellules dans 2 mL au final), ils sont placés 1 h à -30°C avant d'être conservés à -80°C pendant 24 h puis dans de l'azote liquide (-196°C) jusqu'à utilisation.

Décongélation et mise en culture des cellules

La décongélation des cellules doit s'effectuer rapidement dans un bain-marie à 37°C . La décongélation doit être effectuée de façon partielle uniquement, car une décongélation totale à température ambiante provoquerait un contact trop long du DMSO, toxique envers les membranes cellulaires. Les 2 mL de cellules Vero décongelées sont ajoutés à 30 mL de milieu MEM 8% avant d'être centrifugés à 500g pendant 10 min à 4°C (Jouan MR22i). Une fois le surnageant éliminé, le culot cellulaire obtenu est repris par 6 mL de milieu MEM 8% SVF dans un flacon de 25 cm^2 et placé dans l'étuve à 37°C , sous 5% de CO_2 . Le milieu est renouvelé au bout d'une journée de culture. Quand les cellules ont atteint leur stade de confluence (3 à 4 jours), leur trypsination est nécessaire afin de les transférer dans un flacon de 75 cm^2 ajouté à 30 mL de milieu MEM 8% SVF.

dilution										TC	TC
10-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-5	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-6	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-7	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-8	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Une ligne par dilution : 100 µL de suspension cellulaire
 50 µL de milieu MEM 8% SVF
 50 µL de suspension virale stock

Deux colonnes témoin cellule : 100 µL de suspension cellulaire
 100 µL de milieu MEM 8% SVF

Figure 15 : Organisation de la microplaque pour la titration du virus.
 TC : témoin cellule ; dilution : dilution de la suspension virale stock.

3.4 Le virus herpès, VHS-1

Les souches sauvages 17 utilisées, de VHS-1 ACV^s et PFA^s ont été fournies par le Professeur Billaudel (Hôpital de Nantes, Laboratoire de Virologie de Nantes, France).

3.4.1 Préparation du stock viral

Une fois le milieu d'une suspension de cellules Vero à confluence (10^5 cellules/mL dans un flacon de 75 cm²) éliminé, le tapis cellulaire est repris dans 5 mL de milieu MEM 8% SVF préalablement inoculé par 500 µL de la suspension virale stock. Le flacon est ensuite placé 2 h à 37°C sous 5% de CO₂. Ce temps d'incubation est nécessaire pour que le virus puisse s'adsorber sur la paroi cellulaire avant de pénétrer dans la cellule et de s'y multiplier. Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par 30 mL de milieu MEM 8% SVF, afin d'enlever le surplus de suspension virale. Après 3 à 4 cycles de multiplication virale (3 jours), le flacon subit alors 2 cycles successifs de congélation et décongélation pour compléter l'éclatement des cellules et ainsi libérer les virions intracellulaires. Une fois le surnageant prélevé, la suspension virale subit une clarification par centrifugation (10 000g, 10 min à 4°C ; Jouan MR22i). La suspension virale de stock ainsi obtenue est alors répartie en aliquots de 1 mL dans des cryotubes, puis congelée à -80°C.

3.4.2 Détermination du titre infectieux de la suspension virale stock

Deux méthodes sont employées en parallèle pour déterminer le titre infectieux d'un virus :

- (Reed & Muench, 1938)
- Viabilité cellulaire par coloration au rouge neutre

Le principe du titrage viral est de dénombrer les particules virales capables d'infecter des cellules permissives par unité de volume. Le titrage viral est réalisé sur des plaques de microtitration de 96 puits. Une suspension de 100 µL de cellules Vero à 350 000 cellules/mL est déposée dans chaque puits, ajouté de 50 µL de milieu MEM 8% SVF. Deux colonnes de témoins cellulaires sont préparées à partir de 100 µL de suspension cellulaire et 100 µL de milieu MEM 8% SVF. Une série de dilutions au 10^{ème} est réalisée à partir de la suspension de stock viral et 50 µL sont distribués par puits à raison de 10 réplicats par dilution. Après inoculation du virus, les microplaques sont incubées 72 h à 37°C sous 5% de CO₂, permettant

Tableau 9 : Exemple de calcul du facteur (d) utilisé pour la détermination du titre infectieux de VHS-1 selon la méthode de Reed et Muench (1938).

Dilutions	Nombre de puits contenant des cellules		Somme des puits contenant des cellules		Taux de mortalité	%	position de d pour % >50%
	mortes	vivantes	mortes	vivantes			
10 ⁻¹	10	0	58	0	58/58	100	
10 ⁻²	10	0	48	0	48/48	100	
10 ⁻³	10	0	38	0	38/38	100	
10 ⁻⁴	10	0	28	0	28/28	100	
10 ⁻⁵	10	0	18	0	18/18	100	
10 ⁻⁶	7	3	8	3	8/11	73	d
10 ⁻⁷	1	9	1	12	1/13	8	
10 ⁻⁸	0	10	0	22	0/22	0	

$$\begin{aligned}
 \text{Calcul : } \mathbf{d} &= (A - 50) / (A - B) & \text{Log DI}_{50} &= \text{Log } 10^{(\text{dilution de } \mathbf{d})} + \mathbf{d} \\
 &= (73 - 50) / (73 - 8) & &= \text{Log } 10^6 + 0,35 \\
 &= 0,35 & &= 6 + 0,35 \\
 & & &= 6,35
 \end{aligned}$$

Pour 50 µL le titre est de 10^{6,35}
Pour 1 mL le titre viral est de 2 x 10^{7,35}

3 à 4 cycles de multiplication du virus herpès (Figure 15). L'effet cytopathique du virus herpétique s'exprime par un gonflement et un arrondissement des noyaux des cellules qui prennent un aspect globuleux ainsi qu'une organisation des cellules en chapelet. La dose infectieuse 50% est la dilution produisant un effet cytopathique total dans 50% des essais.

Titration selon la méthode de Reed et Muench (1938)

Cette méthode des dilutions limites, permet de réaliser le calcul de la dose infectieuse à 50%. Comme le nombre d'essais est en pratique limité, Reed et Muench préconisent d'augmenter artificiellement le nombre d'essais par dilution en utilisant le procédé des totaux cumulatifs (Tableau 9) : Si un effet positif est obtenu à une dilution, la réponse sera également positive pour les dilutions inférieures. Inversement, si un effet est négatif à une dilution, il sera semblable aux dilutions supérieures.

Les pourcentages de mortalité sont calculés pour chaque dilution. Si le point 50% ne correspond pas exactement à l'une des dilutions, sa distance proportionnelle (d) à la dilution immédiatement inférieure est calculée selon la formule : $(A-50) / (A-B)$; **A** étant le pourcentage de mortalité à la dilution immédiatement supérieure et **B** le pourcentage de mortalité à la dilution immédiatement inférieure.

Le logarithme du titre infectieux est le logarithme de la dilution qui donne un pourcentage d'effet positif immédiatement supérieur à 50% avec la distance proportionnelle multipliée par le logarithme du facteur de dilution. A partir de la valeur du titre infectieux de la suspension virale, il est possible de déterminer la multiplicité d'infection MOI (Multiplicity Of Infection). Elle correspond à la dose infectieuse divisée par le nombre de cellules par mL et intervient dans l'évaluation de l'activité antivirale : **MOI = DI₅₀/mL / (nombre de cellules Vero/mL)**.

Le titre infectieux utilisé lors de ces travaux est de $2.10^{7,35}$ DI₅₀/mL

Titration par mesure de la viabilité cellulaire : coloration au rouge neutre

Le principe de ce dosage repose sur la coloration des cellules par un colorant vital, le rouge neutre, qui est ensuite extrait par un tampon. Le colorant va diffuser de façon homogène dans le solvant. Les cellules vivantes sont colorées et la lecture de la Densité Optique à 540 nm (DO_{540 nm}), correspondant à la longueur d'onde d'absorption maximale du rouge neutre, est faite au spectrophotomètre UV-visible (SpectraCount™, microplate photometer, Packard). Le nombre de cellules vivantes étant proportionnel à la DO_{540 nm}, celle-ci est utilisée pour exprimer les résultats (McLaren *et al.*, 1983; Langlois *et al.*, 1986).

Tableau 10 : Bactéries sélectionnées pour la détection d'activité antibactérienne.

ND : Non déterminé.

Microorganismes	Milieu de culture	Température d'incubation	Temps de latence	Durée de la phase exponentielle	Rapport UFC/DO ₆₀₀
<i>Aeromonas caviae</i> CIP 7616	TSB	30°C	4 h	>4 h	2.10 ⁹
<i>Aeromonas hydrophyla</i> CIP 7614	TSB	30°C	4 h	>4 h	2.10 ⁹
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	TSB	30°C	4 h	>4 h	2.10 ⁹
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TSB	37°C	2 h	2 h	7,6.10 ⁸
<i>Listonella anguillarum</i> NCBIM 829	TSB+1,5% NaCl	25°C	4 h	27h	8,5.10 ⁸
<i>Yersinia ruckeri</i> ATCC 29473	Colombia	30°C	3,5 h	2,5 h	1,4.10 ⁹
<i>Vibrio alginolyticus</i> CIP 103360	MB	25°C	ND	ND	4,2.10 ⁷
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 10778	LB	30°C	1 h	6 h	3,4.10 ⁷
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	TSB	37°C	9 h	>9 h	9,6.10 ⁷
<i>Vagococcus salmoninarum</i> 18-96	TSB	30°C	4 h	>5 h	4,2.10 ⁷
<i>Lactococcus garviae</i> ATCC 43921	BHI	30°C	3 h	2 h	8. 10 ⁸

Milieux de culture :

TSB : Tryptic Soy Broth (Bouillon caseine-soja) (Biokar Diagnostic, réf : BK046HA)**LB** : Luria-Bertoni Broth, miller (Difco[™], réf : 244620)**Colombia** : Colombia Broth (Difco[™], réf : 294420)**BHI** : Brain Heart Infusion Broth (Difco[™], réf :)**MB** : Marine Broth 2216 (Difco[™], réf : 299110)

Coloration : La solution, conservée au froid et à l'abri de la lumière, est préparée à partir de 0,15 g de rouge neutre (Fluka Chemika) dans 100 mL de sérum physiologique (pH 5,5). Après 72 h d'incubation cellulaire, 50 µL de rouge neutre sont introduits dans chaque puits. Les plaques sont ensuite incubées 45 min à 37°C.

Lavage : Après incubation, les plaques sont vidées et 100 µL de PBS (Phosphate Buffered Saline) sont ajoutés dans chaque puits afin de laver le rouge neutre sur les parois des puits.

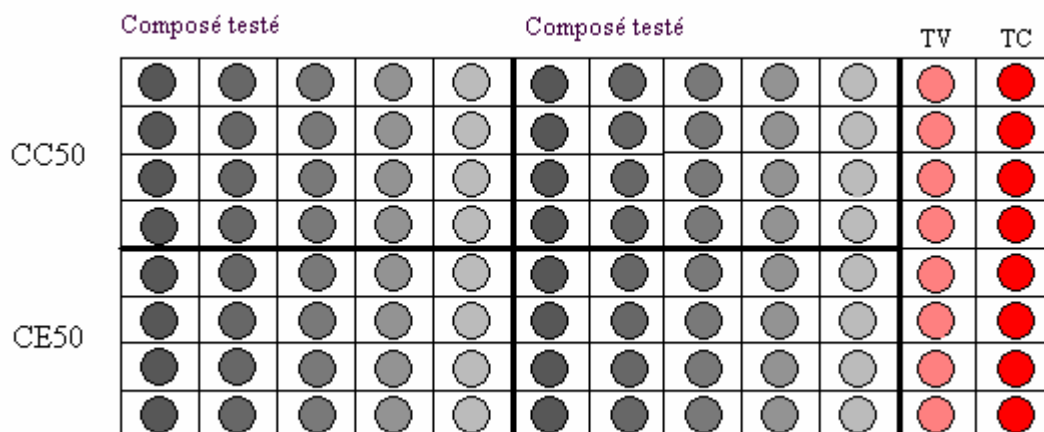
Extraction : le colorant vital est élué par extraction au tampon citrate-éthanol. Ce tampon est préparé à partir d'un volume d'éthanol absolu et d'un volume de tampon Sorensen (V/V ; solution A : 21 g d'acide citrique, 200 mL NaOH 1N qsp 1 L d'eau / solution B : HCl 0,1 N).

Lecture des résultats : Après homogénéisation des cellules dans chaque puits, les plaques sont lues au spectrophotomètre UV-visible (SpectraCount™, microplate photometer, Packard) à la longueur d'onde de 540 nm. Les moyennes des densités optiques obtenues sont déterminées pour chaque série d'évaluation.

3.5 Les microorganismes bactériens

Les souches utilisées concernent 3 bactéries terrestres, dont 2 à Gram⁺, la souche ATCC 10240 de *Micrococcus luteus* et la souche ATCC 10778 de *Bacillus megaterium* et 1 à Gram⁻, la souche ATCC 25922 de *Escherichia coli* (Tableau 10). D'autre part, 8 bactéries marines ont été utilisées, dont 6 à Gram⁻ : la souche ATCC 14174 de *Aeromonas salmonicida* et les souches CIP 7616 et 7614 de *Aeromonas caviae* et *Aeromonas hydrophyla* respectivement, la souche NCBIM 829 de *Listonella anguillarum*, la souche CIP 103360 de *Vibrio alginolyticus* et la souche ATCC 29473 de *Yersinia ruckeri*. Les bactéries marines à Gram⁺ utilisées sont *Lactococcus garviae* ATCC 43921 et *Vagococcus salmoninarum* 18-96 (Tableau 10). Ces souches ont été retenues pour leur sensibilité à des faibles concentrations de peptides antimicrobiens et en particulier aux composés actifs de l'huître *Crassostrea gigas*. Leur intérêt d'utilisation porte également sur le fait qu'elles sont pour la plupart des bactéries pathogènes marines.

Les souches sont conservées plusieurs mois à -80°C dans des cryotubes de glycérol et quelques semaines à 4°C sur gélose inclinée. Leur pureté est vérifiée par isolement sur milieu gélosé, avant la remise en culture pour la réalisation de tests antibactériens. Les souches sont repiquées 8 h environ avant leur utilisation, à raison de 50 µL de culture dans 5 mL de milieu de culture approprié stérile, afin que les souches soient en phase exponentielle de croissance au moment de leur utilisation.



TC : témoin cellule ; TV : témoin virus ; CC_{50} : concentration cytotoxique, engendrant 50% de destruction cellulaire ; CE_{50} : concentration effective, permettant d'obtenir 50% de protection cellulaire vis-à-vis du virus. Chaque composé est testé à 5 concentrations à raison de 4 puits pour déterminer la CC_{50} et 4 puits pour la CE_{50} .

Figure 16 : Organisation de la microplaque pour les évaluations d'activité antivirale et de cytotoxicité.

3.6 Tests d'activité biologique

3.6.1 Evaluation des activités antivirales et de la cytotoxicité

Evaluation de l'activité par viabilité cellulaire (Rouge neutre)

Une suspension cellulaire de 350 000 cellules/mL de cellules Vero est distribuée dans les 96 puits d'une plaque de microtitration à fond plat, à raison de 100 μ L par puits. Pour chaque puits, sont ensuite ajoutés aux cellules, 50 μ L d'extraits à tester à différentes concentrations (4 puits de réplicats par concentration). La drogue de référence (Acyclovir) est associée à chaque essai (50 μ L par puits à différentes concentrations à la place des extraits (5 ; 1 ; 0,5 ; 0,1 et 0,05 μ g.mL⁻¹, 4 puits par concentration). Deux colonnes témoins sont réalisées. Une colonne témoin cellule est composée de 10 puits contenant chacun 100 μ L de suspension cellulaire et de 100 μ L de milieu MEM 8% SVF. Une colonne témoin virus à la MOI de 0,001 DI₅₀/cellules est composée de 100 μ L de suspension cellulaire, 50 μ L de suspension virale et 50 μ L de milieu MEM 8% SVF.

Chaque microplaque est incubée pendant 48 h à 37°C sous atmosphère 5% CO₂. Après 48 h (2-3 cycles de multiplication virale), une observation au microscope inversé (Gx100, Olympus CK2) des tapis cellulaires est réalisée avant d'arrêter le test, selon la méthode de coloration au rouge neutre.

La microplaque est schématiquement divisée en 2 afin d'évaluer d'une part la cytotoxicité par la mesure de la concentration cytotoxique à 50% (CC₅₀) et d'autre part l'activité antivirale par la mesure de la concentration effective à 50% (CE₅₀) (Figure 16).

Evaluation de la cytotoxicité par détermination de la Concentration Cytotoxique à 50% (CC₅₀)

La Concentration Cytotoxique à 50% du produit à tester correspond à la concentration de ce produit capable d'inhiber 50% de la croissance cellulaire. L'évaluation de l'activité cytotoxique est effectuée en triplicatas.

Dans les puits correspondants à l'évaluation de la cytotoxicité sont ajoutés 50 μ L de milieu MEM 8% SVF aux 100 μ L de cellules Vero et 50 μ L d'extrait.

La CC₅₀ est évaluée par la méthode du rouge neutre (McLaren *et al.*, 1983) dans chaque puits de la plaque de microtitration (Nunc). Après coloration, une lecture au

spectrophotomètre UV visible à 540 nm est effectuée de la même manière que pour la « titration virale par mesure de la viabilité cellulaire : coloration au rouge neutre ». Les résultats sont exprimés en pourcentage de destruction cellulaire et calculés selon la formule suivante :

Calcul des résultats

$$CC_{50} = \frac{(\text{DO}_{\text{témoin cellules}} - \text{DO}_{\text{cellules+drogue}})}{\text{DO}_{\text{témoin cellules}}} \times 100$$

Evaluation de l'activité anti-VHS-1 des extraits sur les cellules Vero par détermination de la concentration effective à 50% (CE₅₀)

La concentration effective antivirale 50% (CE₅₀) est exprimée comme la concentration de l'extrait qui diminue de 50% l'effet cytopathique du virus (50% de protection cellulaire). Afin de mettre en évidence l'activité anti-VHS-1 des différents extraits, une suspension virale est préparée avec une multiplicité d'infections (MOI) de 0,001 DI₅₀/cellules et un titre viral de 2x10^{7,35} DI₅₀/mL pour 350 000 cellules/mL.

Dans les puits correspondants à l'évaluation de l'activité antivirale sont ajoutés 50 µL de suspension virale à la MOI de 0,001 DI₅₀/cellules aux 100 µL de cellules Vero et 50µL d'extrait. Les tests d'activité anti-herpétique sont arrêtés et lus selon la méthode de coloration au rouge neutre (Rawls, 1992; Fleury, 1993). Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection cellulaire et calculés selon la formule suivante :

Calcul des résultats

$$CE_{50} = \frac{(\text{DO}_{\text{cellules+virus+drogue}} - \text{DO}_{\text{témoin virus}})}{(\text{DO}_{\text{cellules+drogue}} - \text{DO}_{\text{témoin virus}})} \times 100$$

Acyclovir : substance antiherpétique de référence

L'Acyclovir (Zovirax[®]) est utilisé comme antiviral de référence dans notre étude. Ce produit est un inhibiteur de l'ADN polymérase qui agit uniquement dans les cellules dans lesquelles les herpesvirus sont en cours de répllication. Il s'agit d'un dérivé nucléosidique d'acycloguanosine possédant une base guanine (9-(2 hydroxyéthoxyméthyl)guanine) et où le sucre est remplacé par une chaîne hydrocarbonée acyclique. Cette molécule est active contre le virus sous forme tri-phosphorylée. La phosphorylation est effectuée par la thymidine kinase,

produite en grande quantité par le virus au cours de la phase de réplication. Ainsi modifiée, la molécule peut participer à l'inhibition compétitive de l'enzyme de réplication, l'ADN polymérase de VHS-1. L'acycloguanosine (ACG) est la première substance anti-VHS-1 spécifique dépourvue d'effet toxique sur la cellule (Elion, 1993; Fleury, 1993).

3.6.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration en protéines pour laquelle une inhibition totale de croissance bactérienne est observée après 24 h d'incubation.

Les tests d'activité sont réalisés en milieu liquide dans des plaques de microtitration 96 puits à fond arrondi. Des dilutions de moitié de l'échantillon (100 μ L) sont effectuées dans de l'eau stérile. Cent μ L du milieu de culture doublement concentré,ensemencés à 2.10^5 UFC/mL à partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, sont ajoutés (concentration de 1.10^5 UFC/mL). Des témoins de croissance (100 μ L d'eau stérile additionnés de 100 μ L de milieu de culture de la bactérie cible doublement concentré,ensemencé à 2.10^5 UFC/mL) et de stérilité (100 μ L d'eau stérile ajoutés de 100 μ L de milieu de culture de la bactérie cible doublement concentré) sont réalisés en parallèle. Les microplaques sont incubées à la température optimum de croissance de la bactérie cible utilisée. Les CMI sont estimées visuellement (absence de turbidité dans les puits) puis évaluées par mesure de la DO à 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$). Les CMI sont déterminées à partir de 3 essais indépendants. Des témoins d'inhibition de croissance sont réalisés à l'aide du lysozyme ($50\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Sigma, L6877, from Chicken Egg White) pour les bactéries à Gram⁺ et de la polymyxine B ($50\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Sigma, P-1004) pour les bactéries à Gram⁻.

3.6.3 Détermination de la concentration minimale létale

La Concentration Minimale Létale (CML) correspond à la plus faible concentration en protéines pour laquelle la survie des microorganismes est inférieure à 0,1% de l'inoculum de départ. La détermination de la CML est un test complémentaire de la CMI et permet d'étudier la nature de l'inhibition : bactéricide ou bactériostatique.

Un mélange de 100 μL d'échantillon à différentes concentrations en protéines équivalentes à la CMI, 2 fois la CMI et 4 fois la CMI et d'une suspension de bactéries cibles à 2.10^5 UFC/mL dans un milieu doublement concentré est réalisé. Après 2 h d'incubation à la température optimale de croissance du microorganisme testé, des dilutions de chaque mélange sont effectuées. Les cellules sont ensuite filtrées sur membrane (Gelman Laboratory, \varnothing 47 mm, porosité de $0,45 \mu\text{m}$; Réf : 66278) puis lavées par un tampon phosphate 50 mM, pH 7. Les membranes sont déposées sur milieu gélosé (15 g d'agar/L) dans des boîtes de Pétri. Après 24 h d'incubation à la température optimale de croissance du microorganisme, le nombre de colonies présentes sur les membranes est déterminé. Une concentration est considérée comme létale lorsque le nombre de colonies sur la membrane représente moins de 0,1% du nombre de colonies sur la membrane du témoin.

3.6.4 Détection d'activité par diffusion dans un milieu gélosé

Cette technique permet de détecter la présence d'inhibition de croissance bactérienne par diffusion de composés antimicrobiens dans un milieu gélosé.

40 mL/20 mL de milieu demi gélosé (7,5 g d'agar/L) et tamponné par du tampon phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 100 mM pH 7 sont coulés dans une boîte de Pétri de diamètre 15 cm/9 cm respectivement. Le milieu estensemencé à raison de 1.10^5 UFC/mL. Après solidification du milieu demi gélosé, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés par aspiration à vide à l'aide d'une pipette pasteur en verre stérile. Dans chaque puits est déposé 70 μL d'extrait à tester. Les boîtes sont ensuite mises à incuber pendant 48 h à la température optimum de croissance de la bactérieensemencée (cible). Un témoin stérile et un témoin d'inhibition de croissance sont réalisés en parallèle. Le lysozyme et la polymyxine B à 1 mg.mL^{-1} sont utilisés comme témoins positifs respectivement, pour les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻. L'inhibition de croissance est détectée par la présence d'un halo d'inhibition autour des puits contenant les échantillons à tester. L'importance de l'inhibition est évaluée par mesure de la taille du halo d'inhibition (rayon d'inhibition).

3.6.5 Viabilité par cinétique d'inactivation

Cette technique permet de mettre en évidence la viabilité dans le temps de colonies bactériennes en présence de composés antibactériens à une concentration donnée et ainsi de déterminer le mode d'action du composé actif. Le dénombrement des UFC/mL sur la période d'incubation permet de déterminer si le composé antibactérien agit par destruction bactérienne (bactéricide) ou sur la multiplication des cellules en entraînant un ralentissement de croissance (bactériostatique).

Une préculture bactérienne en phase finale de croissance exponentielle (10^7 UFC/mL) est inoculée à raison de 10^6 UFC/mL dans 10 mL de milieu de mer reconstitué (Sea Salt, 3%), pour les bactéries marines et 10 mL du milieu de culture des bactéries terrestres, puis incubée à sa température optimale de croissance, en présence de composés/extraits antibactériens (v/v) en concentrations équivalentes à 1, 2, 5, 10 ou 20 fois la valeur de la CMI. L'énumération des bactéries survivantes après inoculation et prélèvement à différents intervalles de temps, est réalisée par des étalements en boîtes de Pétri sur un milieu gélosé approprié (15 g d'agar/L) à l'aide d'un disque d'étalement en spirale et d'un stylet de dépôt (WASP1, Don Whitley, Shipley, West Yorkshire, United Kingdom). Des prélèvements de 200 μ L d'échantillons sont ainsi effectués à différents temps d'incubation. Les 200 μ L d'échantillons sont centrifugés (10 000g, 5 min à température ambiante) et le culot est repris par 1 mL d'eau de mer reconstituée (bactéries marines) ou d'eau peptonée 1x (bactéries terrestres). Plusieurs dilutions (10^{-1} et 10^{-2}) sont nécessaires avant l'étalement, afin d'obtenir après 24 h de croissance des colonies dénombrables. Un volume de 500 μ L d'inoculum bactérien dilué est alors prélevé à l'aide du stylet afin de déposer 50 μ L sur la surface de milieu gélosé. Des témoins de croissance (culture bactérienne à 10^6 UFC.mL⁻¹ en présence d'eau stérile (v/v)) et d'inhibition ((culture bactérienne à 10^6 UFC.mL⁻¹ en présence de polymixine B/lysozyme à la CMI (v/v)) sont réalisés en parallèle. Le dénombrement bactérien est réalisé après 24 h d'incubation. La destruction ou l'inhibition de croissance bactérienne est mesurée par évaluation du nombre de Log d'UFC/mL obtenu après le temps d'incubation.

4 Méthodes d'extraction et de purification

4.1 Extraction acide

Une extraction acide a été réalisée pour hydrolyser la paroi des animaux afin d'en extraire les composés de nature protéique. 100 à 200 g de masse fraîche de tissus collecté ont été hydrolysés dans un volume d'1 L d'acide chlorhydrique 1 N porté à 100°C pendant 10 min sous agitation continue (Luders *et al.*, 2005). Le produit de l'extraction a ensuite été broyé (Warring Blender) avant d'être centrifugé à 20 000g, pendant 30 min à 4°C. Le surnageant collecté correspond à l'extrait acide.

4.2 Pré-purification : Chromatographie en phase inversée manuelle (SPE-C18)

La chromatographie d'absorption liquide/solide ou en phase solide est une alternative à l'extraction liquide/liquide. Analogue à la chromatographie d'élution, la technique d'extraction sur phase solide (SPE) est fondée sur l'utilisation de supports d'extraction permettant la concentration ainsi que la purification de traces de molécules dans les matrices aqueuses. La phase stationnaire est à base de silice avec un greffage C₁₈. De nature apolaire, elle retient les molécules par des interactions de type Van Der Waals. La phase mobile est polaire. La séparation s'effectue ainsi par rupture des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire. Ainsi, plus un composé est apolaire, plus il sera retenu au niveau de la phase solide stationnaire et inversement. La phase mobile est constituée d'un mélange eau-acétonitrile en proportions variables. Une augmentation de la concentration en acétonitrile (ACN) entraîne une diminution de la polarité de la phase mobile. La phase mobile est additionnée d'acide trifluoroacétique à 0,1% (TFA), afin d'éviter les interactions ioniques entre la phase stationnaire et les molécules en neutralisant les charges de ces dernières. Ainsi la présence de TFA dans le solvant permet d'augmenter l'hydrophobicité des molécules.

La séparation est réalisée à l'aide de colonnes C-18 (Interchrom, Cols SPE UPTI-clean C18-S-2G/6, Interchim, 03103 Montluçon). Le conditionnement de la colonne est effectué par le passage successif d'ACN 100%-0,1% TFA et d'ACN 10%-0,1% TFA. Après dépôt de l'échantillon, l'élution des composés est assurée par 3 paliers d'ACN (Figure 17). Le premier palier à 10% ACN concentre les molécules hydrophiles non retenues. Les deux paliers

suivants à 40% et 80% ACN concentrent les molécules hydrophobes et très hydrophobes. Les 3 fractions obtenues sont ensuite lyophilisées avant d'être reprises dans de l'eau Milli-Q.

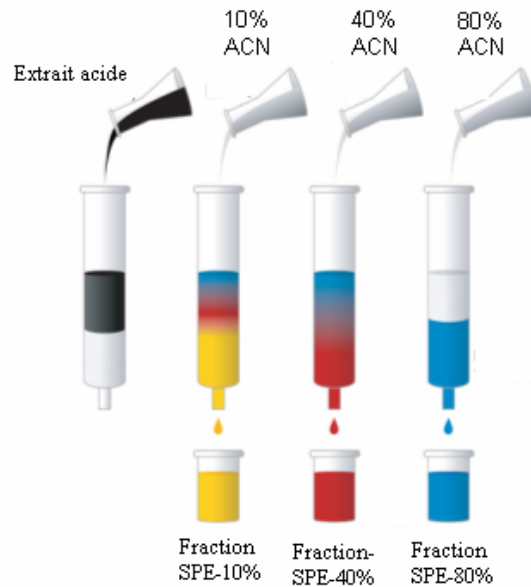


Figure 17 : Schéma du protocole de purification sur colonnes SPE-C18.

SPE : Solide Phase Extraction.

4.2.1 Dosage des protéines

Le dosage colorimétrique des protéines est effectué à l'aide d'un Kit BC Assay (Interchim, FT-UP40840B). Le dosage est basé sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines. L'acide Bicinchonique chélate les ions Cu^+ avec une grande affinité et forme un complexe de couleur violette. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration en protéines. Le dosage est réalisé en triplicats dans une plaque de microtitration 96 puits. Chaque puits contient 25 μL d'échantillon dilué (eau milliQ) ou non, auxquels sont ajoutés 200 μL de réactif BC Assay (solution de réactif A (UP95424B) et de réactif B (UP95425B), 50:1). Une gamme étalon est effectuée en parallèle avec de l'albumine de sérum bovin de 50 à 0,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (UP36859, Serum Bovine Albumine Standard, 2 mg.mL^{-1}). Trente minutes d'incubation à 37°C sont au minimum nécessaires avant de lire l'absorbance à 540 nm (SpectraCountTM, microplate photometer, Packard).

4.2.2 Digestions par des endoprotéases : détermination de la nature protéique des composés antimicrobiens

Des digestions par des endoprotéases des fractions antimicrobiennes ont été réalisées à l'aide de la trypsine (coupure après les acides aminés basiques - Sigma, T-1426), de l' α -chymotrypsine (coupure après les acides aminés aromatiques - Sigma, C-4129), de la protéinase K (coupe toutes les liaisons peptidiques - Sigma, P-6556) et de la protéase de type XIV (non spécifique - Sigma P-5147), afin de déterminer si les composés antimicrobiens sont de nature protéique.

Activité antibactérienne

Des dégradations par les endoprotéases, la trypsine, l' α -chymotrypsine et la protéase de type IV, conditionnées dans du tampon phosphate 50 mM à pH 8, ont été réalisées dans un rapport enzyme/substrat de 1/50 (v/v). Après 1 h d'incubation à 37°C en présence de ces enzymes (1/50), l'activité antibactérienne des échantillons incubés en présence des protéases a été testée par détermination de la CMI sur la bactérie cible *M. luteus*. Des témoins positifs (échantillons incubés 1 h à 37°C) et négatifs (enzymes incubées 1 h à 37°C dans du tampon phosphate 50 mM à pH 8) ont été réalisés en parallèle.

Activité antivirale

Des digestions par des protéases ont été réalisées à l'aide de la trypsine, de l' α -chymotrypsine et de la protéinase K. Chaque protéase a été solubilisée dans du tampon phosphate 100 mM à son pH optimum, respectivement de 7,6 ; 7,8 et 7,5. L'évaluation de la cytotoxicité des enzymes sur les cellules Vero a été évaluée en parallèle. A une concentration finale de trypsine et d' α -chymotrypsine de 63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de protéinase K de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, aucune cytotoxicité n'est détectée. Des solutions mères à 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de trypsine et d' α -chymotrypsine ((v/v) ; rapport Enzyme/Substrat < 1/10) et de protéinase K (1:50 ; rapport Enzyme/Substrat < 1/40)) ont ainsi été employées pour être incubées pendant 1 h à 37°C avec l'échantillon. La réaction est arrêtée par un choc thermique de 1 min à 100°C. Un témoin négatif a été réalisé en parallèle, dans les mêmes conditions. Après dégradation enzymatique, l'activité des fractions est vérifiée sur le modèle VHS-1/cellules Vero.

4.2.3 Gel d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes : SDS-PAGE

L'électrophorèse en condition dénaturante permet de séparer et de faire migrer des molécules chargées électriquement à travers un gel de polymère sous la contrainte d'un champ électrique. Une dénaturation des protéines est assurée par l'action d'un tensioactif anionique fort, le dodécylsulfate de sodium (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques de charges négatives (Laemmli, 1970). La dénaturation des protéines est complétée avant migration par une réduction des ponts disulfure à l'aide d'un traitement au β -mercaptoéthanol (5 min à 100°C). La séparation des protéines se fera alors selon leur taille, évaluée à l'aide de marqueurs de taille migrant en parallèle. Ainsi les protéines de petite taille migreront plus loin que celles de plus grande taille.

Le gel de migration est composé de 2 gels, un de concentration (de 1 cm de hauteur) et un de séparation (de 6 cm de hauteur) pour une épaisseur de 0,75 mm ou 1,5 mm selon le choix de la capacité des puits. Le premier comprend un pourcentage d'acrylamide/bis-acrylamide et de SDS de 16% et 1% respectivement, le second gel est composé à 3,8% d'acrylamide/bis-acrylamide et à 0,7% de SDS. Les solutions tampon anode (0,2M tris HCl, pH 8,9) et cathode (0,1M tris, 0,1M tricine, 1% SDS) utilisées sont réalisées à base de tris et de tricine, ce qui favorise une meilleure séparation des peptides (Schägger & von Jagow, 1987). L'électrophorèse est réalisée sur un appareil BIO-RAD (Molecular Mini-PROTEAN II Electrophoresis system) à ampérage constant de 400 mA, pour un voltage de 60 V pendant 1 h, suivie de 100 V jusqu'à la fin de la migration (3 h). Après électrophorèse, les protéines sont fixées dans une solution alcoolique eau/éthanol/acide acétique (50/10/40 (v/v)) puis colorées au bleu de Coomassie (25 mg de brillant blue G (Biorad), 10% acide acétique) et décolorées dans de l'acide acétique 10% afin d'obtenir une meilleure lisibilité des bandes obtenues.

Après coloration et décoloration des gels, l'activité antibactérienne des peptides séparés sur le gel peut être révélée. Plusieurs bains du gel dans de l'eau MilliQ stérile sont nécessaires afin d'éliminer le SDS (5 bains de 5 min). Le gel est ensuite transféré dans une boîte de Pétri et recouvert par un milieu géloséensemencé à 1.10^4 UFC/mL. L'activité antibactérienne envers la souche cible va se traduire par la présence de halos d'inhibition au niveau des bandes peptidiques. Cette technique ne permet pas de quantifier l'activité, mais donne une indication sur la taille du composé actif (Bhunja & Johnson, 1992).

4.3 Chromatographie liquide

La chaîne chromatographique utilisée, est composée d'une pompe WatersTm 600 équipée d'un injecteur manuel à valve d'injection, d'un contrôleur Waters 600, d'un détecteur spectrophotométrique UV-visible Waters 996 et d'un collecteur BIO-RAD (model 2128).

La chromatographie liquide permet une séparation des protéines selon un mécanisme d'échange entre un soluté, une phase mobile et une phase stationnaire. La séparation des protéines sera assurée selon leurs coefficients de partage ou encore en fonction de leur charge selon la nature des phases employées.

4.3.1 Chromatographie en phase inverse RP-HPLC

La Chromatographie Liquide Haute Pression en Phase Inverse (RP-HPLC) est une chromatographie solide- liquide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire. La phase stationnaire est composée de silice greffée par des chaînes de 18 atomes de carbones (C18). Cette phase apolaire nécessite un solvant polaire, ici l'acétonitrile (ACN). Les composés polaires sont donc élués prioritairement. La phase mobile polaire correspond à un mélange d'acétonitrile avec de l'eau selon un gradient linéaire. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention des composés. Les gradients d'élution diminuent la polarité de l'éluant au cours de la séparation (mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va croissant).

Deux colonnes Interchrom- Interchim ont été utilisées : Une colonne analytique de dimensions 250 x 4,6 mm (C18 5HSC 25QS) et une colonne semi préparative de dimensions 250 x 10 mm (C18 5HSC 25QS), surmontées chacune d'une colonne de garde (Upti-screen, Modulo-CART QS UPTISPHERE, 10 mm i.d., 5h549750). Leur porosité est de 120 Å, pour une phase stationnaire de granulométrie de 5 µm. Des boucles d'injection de 200 µL et de 2 mL ont respectivement été employées pour la colonne analytique et la colonne semi préparative. La phase mobile est composée de 2 solvants : un solvant A polaire (Eau-0,1% TFA) et un solvant B apolaire (ACN-0,07% TFA). Ces solvants sont préalablement filtrés (0,22 µm) et dégazés à l'hélium. Le débit appliqué est de 0,8 mL.min⁻¹ pour la première colonne et de 5 mL.min⁻¹ pour la seconde.

Avant injection dans la colonne RP-HPLC C18, les échantillons sont centrifugés (10 000g, 10 min à 4°C). L'élution des molécules est assurée à un débit constant par un gradient linéaire de 20 à 80% d'ACN. La $DO_{220\text{ nm}}$ et la $DO_{280\text{ nm}}$ sont mesurées, correspondant aux longueurs d'ondes des liaisons peptidiques et des acides aminés aromatiques. Les fractions éluées sont collectées toutes les minutes, puis lyophilisées et solubilisées dans de l'eau Milli-Q.

4.3.2 Chromatographie d'exclusion stérique ou Gel Filtration

Cette chromatographie est fondée sur la rétention sélective des protéines en fonction de leur taille. La phase stationnaire de la colonne est constituée d'un gel de particules sphériques hydratées et poreuses permettant une séparation des protéines en solution en fonction de leur volume hydrodynamique. Les protéines avec un volume ne permettant pas de pénétrer dans les pores de la phase stationnaire sont exclues directement dans le volume externe appelé volume mort (V_0).

La colonne de gel filtration employée pour réaliser la purification de peptides à activité antibactérienne est une colonne de 30,0 cm de longueur et de 7,8 mm de diamètre avec une porosité de 250 Å pour une granulométrie de 5 µm (08540 TSK gel, G2000 SWXL ; Col. No. : 2SWX06FH3934). Cette colonne est montée en série avec une précolonne de 7,5 cm de longueur et de 7,5 mm de diamètre (05371TSK gel SWXL Guardcolumn ; Col. No. : SWPH0388, TOSOH BIOSCIENCE (Interchim)) afin d'éviter la saturation de la colonne. Une courbe de calibration est préalablement réalisée à partir de peptides de référence de masses moléculaires comprises entre 1 347,6 Da et 2 000 000 Da (Blue Dextran, 2 000 000 Da ; BSA, 66 000 Da ; Myoglobine, 16 700 Da ; Cytochrome C, 12 400 Da ; Albumine, 70 000 ; Insuline chaîne B, 3 495,9 Da ; substance P, 1 347,6 Da). Cette colonne permet une séparation des peptides dont la masse moléculaire est comprise entre 500 Da et 25 000 Da. Les $DO_{220\text{ nm}}$ et $DO_{280\text{ nm}}$ ont été mesurées. Le solvant d'élution est d'un mélange eau/ACN 55/45 (v/v) additionné de 0,1% de TFA. Le temps d'élution appliqué est de 40 min avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹. Le volume injecté est de 100 µL. Le signal chromatographique est traité à l'aide du logiciel Empower 2.

Une colonne en verre semi préparative basses pressions, de 100 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre interne a également été utilisée. La phase stationnaire utilisée est de nature polysidique de type Dextran (Sephadex[®] G50 (Sigma)). La phase stationnaire à raison de 0,1 g de Sephadex[®] G50 pour 1 mL d'acide acétique 1% est coulée dans la colonne et le diamètre

des particules après stabilisation est compris entre 20 et 80 μm (le volume total de la colonne est de 500 mL). Cette colonne permet un fractionnement des macromolécules et la détermination approximative de la masse molaire des protéines en comparaison à une gamme étalon (séparation de protéines globulaires de masse comprise entre 1 500 Da et 30 000 Da). Une courbe de calibration a été préalablement réalisée à partir de peptides et molécules de référence de masse moléculaires comprises entre 1 355 Da et 2 000 000 Da (Blue Dextran, 2 000 000 Da ; α -Chymotrypsine, 25 000 Da ; Cytochrome C, 12 400 Da ; Aprotinine, 6 500 Da ; Vitamine B12, 1 355 Da). L'éluant utilisé est de l'acide acétique à 1% pour un débit constant de 0,2 mL.min⁻¹. La DO est mesurée aux longueurs d'onde de 550 nm (vitamine B12), 600 nm (Blue Dextran) et 280 nm (acides aminés aromatiques).

4.3.3 Chromatographie par échange d'ions (IEC) : Chromatographie échangeuse de cations

Cette technique permet de séparer des molécules selon leur charge. La colonne échangeuse de cations utilisée contient comme fonction ionisable un acide faible, le carboxyméthyl (Carboxymethyl (CIM[®], CM), CIM Disk monolithic column, 16 i.d. x 6 l. mm. Interchim).

La phase stationnaire est constituée d'un support insoluble dans l'eau, sur lequel sont greffés des groupements fonctionnels ionisés, chargés négativement. Le pKa du composé de base de la phase stationnaire, le carboxyméthyl (-O-CH₂-CO₂⁻) est de 5, il permet la séparation d'acides forts. Les molécules chargées positivement présentes dans la phase mobile sont alors retenues par interactions électrostatiques. La charge des protéines dépend directement du pH de la phase mobile. La résine doit être conditionnée sous la forme ionique adéquate avant son utilisation, et régénérée après usage. L'éluant est assurée par des solutions aqueuses contenant des ions échangeables avec les solutés fixés sur l'échangeur. Les éluants employés à des pH donnés variables, permettent de modifier la charge des ions fixés et de provoquer leur libération dans l'éluât de façon successive.

La colonne est conditionnée avec de l'eau Milli-Q filtrée sur membrane de 0,22 μm et dégazée à l'hélium. Après injection de l'échantillon sur la colonne, le pH augmente de 7,66 à 12,56 sur 15 min lors de l'éluant. Le rapport Tris HCl 5 mM / Trizma base 5 mM est fixé à 80% / 20% en début d'éluant et évolue jusqu'à 25% / 75% après 5 min. De la 6^{ème} à la 10^{ème}

minute, l'élution est réalisée par 100% de Trizma base 5 mM, suivie de 4 min à 100% de NaOH pour finalement revenir à un rapport Tris HCl 5 mM / Trizma base 5 mM de 80% / 20%). Le débit de 3 mL.min⁻¹ appliqué est constant pendant toute la durée de l'élution. Les fractions sont collectées toutes les 30 sec. La DO est mesurée à 280 nm.

4.4 Etude de l'ADN bactérien

Les cultures de bactéries isolées du compartiment hémolympatique de l'hémolymphe de *C. gigas* sont réalisées par ensemencement à 2% (v/v) dans du milieu Marine Broth incubé pendant 48 h à 18°C.

4.4.1 Extraction d'ADN bactérien

A partir de culture bactérienne de 96 h en milieu liquide, l'ADNr 16S bactérien est extrait selon la méthode de Saulnier *et al.* (2000). L'ADN bactérien est extrait par une résine de styrène-divinylbenzène (ChelexTM 100, Sigma) contenant des groupements d'acide aminodiacétique (Saulnier *et al.*, 2000).

Deux cent µL de culture bactérienne sont centrifugés 10 min à 10 000g. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris par 400 µL de solution de Chelex (5% de Chelex dans une solution de Tris 10 mM, pH 8) et 50 µL de protéinase K (250 µg.mL⁻¹, Sigma). Les échantillons sont incubés pendant 4 h à 56°C sous agitation, puis portés à ébullition 10 min à 100°C, avant d'être placés immédiatement dans la glace. Après sédimentation des billes de Chelex, le surnageant est collecté et utilisé comme matrice pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

4.4.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné, afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Chaque réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un volume réactionnel final de 50 µL comprenant : 25 µL de PCR Master Mix 2x (Promega. 50 units.mL⁻¹ *Taq* DNA Polymérase dans un tampon réactionnel Tris HCl 50 mM à pH 8,5 ; 400 µM de chaque dNTPs ; MgCl₂ 3 mM), 5 µL de chacune des deux amorces ADN 16S à 10⁻⁵ M (W18 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' et W20 5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3' ; Universal

Primers, (Weisburg *et al.*, 1991)), 10 μL d'ADN bactérien et 5 μL d'eau Milli-Q stérile. La réaction de PCR est ensuite réalisée à l'aide d'un thermocycleur automatique (Applied Biosystems, GeneAmp PCR system 9700), avec une première étape de dénaturation de l'ADN de 3 min à 95°C, 35 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 1 min à 94°C, une étape d'appariement des amorces de 1 min à 52°C et une étape d'élongation de 1 min à 72°C et enfin un cycle d'élongation de 10 min à 72°C pour limiter les élongations incomplètes.

4.4.3 Analyse du produit de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%, en tampon TAE (Tris HCl 40 mM, Acétate de sodium 20 mM, EDTA 10 mM pH 8) pendant 2 h à 90 V. Quinze μL d'échantillon sont ajoutés à 3 μL d'un mélange de colorants de charges 6x, pH 8, avant leur dépôt sur le gel (Orange G, 50 pb ; Bleu de Bromophénol, 300 pb ; Xylène de cyanol, 3000 pb). La révélation des bandes est réalisée par fixation du Bromure d'éthidium ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (BET, Promega) sur l'ADN et l'observation se fait sous UV (Transilluminateur UV, Fisher Bioblock Scientific). Le marqueur de taille moléculaire utilisé est Lambda ADN/EcoRI + Hind III (G1731, Promega), il permet de déterminer la taille de fragments de 125 pb à 21 226 pb.

Le séquençage des produits de PCR a été réalisé par la société BIOFIDAL (69 120 Vaulx en Velin). L'analyse des séquences est effectuée par comparaison avec celles présentes dans les bases de données, par l'intermédiaire du logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.5 Précipitation au sulfate d'ammonium ((NH₄)₂ SO₄)

La solubilité des protéines dans un milieu aqueux dépend de plusieurs facteurs, dont la concentration en sels. A de faibles concentrations, la présence de sels va favoriser la stabilité des groupements chargés des protéines, en augmentant leur solubilité par attraction des protéines au sein de la solution (les protéines sont entourées d'ions de charge opposée à leur charge nette). Ce phénomène est connu sous le nom de « Salting in ». Cependant, à partir d'un seuil de concentration en sels, les protéines vont avoir tendance à précipiter. Ce phénomène de « Salting out » est atteint lorsque les protéines parviennent à un maximum de solubilité pour de fortes concentrations en sels. La forte solubilité du sulfate d'ammonium fait de lui le sel le plus efficace pour réaliser la séparation et la purification de protéines par précipitation.

La précipitation des protéines est réalisée à différents pourcentages de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, par augmentation du gradient de 40% à 100%. La quantité de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à ajouter est calculée à l'aide d'un programme (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) (Tableau 11) en fonction de la teneur initiale en sels du milieu. La précipitation a lieu à 4°C pendant 18 h. Les protéines précipitées sont récupérées dans le culot après centrifugation à 10 000g pendant 30 min, à 4°C. Le culot protéique est collecté après resolubilisation dans un volume d'eau Milli-Q 10 fois inférieur au volume de la solution de départ.

Tableau 11 : Masse de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g) à ajouter à 100 mL de milieu Marine Broth, à 4 °C pour une teneur initiale en sels du milieu de 31,35 g.

Teneur (g) initiale en sels du milieu Marine Broth	% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ finaux	g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à ajouter dans 100 mL de milieu Marine Broth, à 4 °C
31,35	40%	5,05
	60%	17,81
	80%	32,40
	100%	49,2

5 Méthodes d'analyse

5.1 Caractérisation moléculaire

Les étapes d'analyse en spectrométrie de masse ont été réalisées au laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines UMR 100 IFREMER, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, sous la direction de Dr. Joël Henry et Dr. Céline Zatylnyj-Gaudin (Université de Caen / Basse Normandie ; Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée).

5.1.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique qui permet d'une part de déterminer la masse des protéines et d'autre part de renseigner sur leurs séquences. Le spectromètre de masse utilisé comporte une source d'ionisation de type électrospray (ESI) et un analyseur de type trappe d'ions (IT) (LC-ESI-MS/MS) (LCQ, DecaXP, MS-n-ThermoFinnigan, USA). Cette LC-MS/MS est pilotée par le logiciel Xcalibur. L'acquisition est réalisée sous la forme d'un full-scan MS permettant d'accéder à la valeur des m/z des composés ionisables présents dans

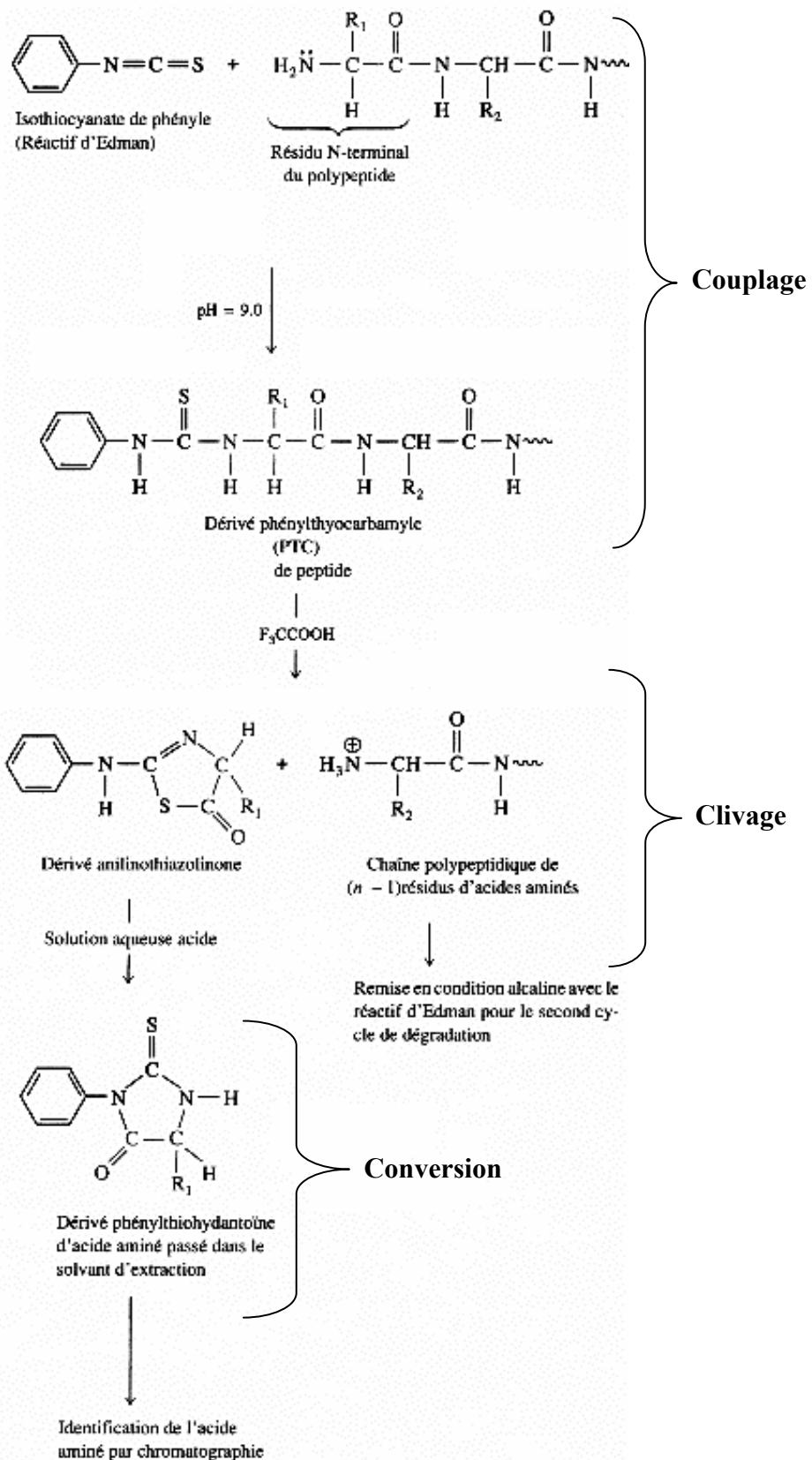


Figure 18 : Schéma du séquençage peptidique selon la méthode de dégradation N-terminale d'Edman.

l'échantillon. La fragmentation est réalisée en mode data dependent-scan ou en mode MS/MS pour l'ion choisi. L'électrospray couplé à la trappe d'ions, utilise la stabilité des ions dans un champ électrique pour définir le rapport (m/z) et ainsi remonter à la structure chimique des échantillons liquides préionisés en solution. Le détecteur quantifie les charges électriques et le traitement du signal de sortie permet d'obtenir le spectre de masse. La structure primaire des peptides isolés est donnée par l'utilisation complémentaire de la spectrométrie de masse et le séquençage automatique d'Edman. La spectrométrie de masse permet également d'identifier les modifications post-traductionnelles de la séquence primaire, difficiles voire impossibles à détecter par la dégradation automatique d'Edman (Biemann & Martin, 1987).

5.1.2 Le séquençage des peptides par dégradation N-terminale d'Edman

Afin de confirmer les séquences des peptides purifiés, les échantillons sont soumis à un séquençage d'Edman. Cette technique est également utilisée pour préciser certains acides aminés isobares, non différenciables en spectrométrie de masse. Ces analyses ont été réalisées par Mr Andrieu au laboratoire d'enzymologie moléculaire de Grenoble. L'analyse de la séquence N-terminale des peptides est réalisée par un séquenceur protéique automatique (Applied Biosystems Model 477 A) selon le principe de la dégradation N-terminale d'Edman. La technique de séquençage des peptides repose sur la méthode de dégradation automatique d'Edman (Edman, 1950). Cette technique permet de déterminer la structure primaire de peptides ou de protéines. La détermination de la structure primaire s'opère par élimination séquentielle des acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale du peptide. La réaction se déroule sur un cycle de 3 étapes, répété jusqu'au dernier acide aminé de la chaîne polypeptidique (Figure 18). La première étape de couplage s'appuie sur la réaction de l'isothiocyanate de phényle (PITC) (aussi appelé réactif d'Edman) sur la fonction α -aminée de l'acide aminé en position N-terminale à un pH alcalin (assuré par du *n*-methylpiperidine/methanol/eau) pour former un dérivé phénylthiocarbamyl (PTC-protéine). Le dérivé phénylthiocarbamyl est ensuite traité par un acide anhydre, l'acide trifluoroacétique. La liaison peptidique reliant cet acide aminé en position N-terminale est ainsi spécifiquement rompue. Il en résulte le dérivé anilinothiozolinone de l'acide aminé (ATZ-acide aminé), qui est ensuite extrait de la chaîne à l'aide d'un solvant, le chlorure de butyle. L'acide aminé suivant se retrouve en position N-terminale pour le prochain cycle de dégradation. Le dérivé anilinothiozolinone est enfin converti sous une forme plus stable en phénylthiohydantoïne (PTH-acide aminé) avec un solvant eau / TFA 75% / 25% (v/v). Chaque résidu PTH-acide

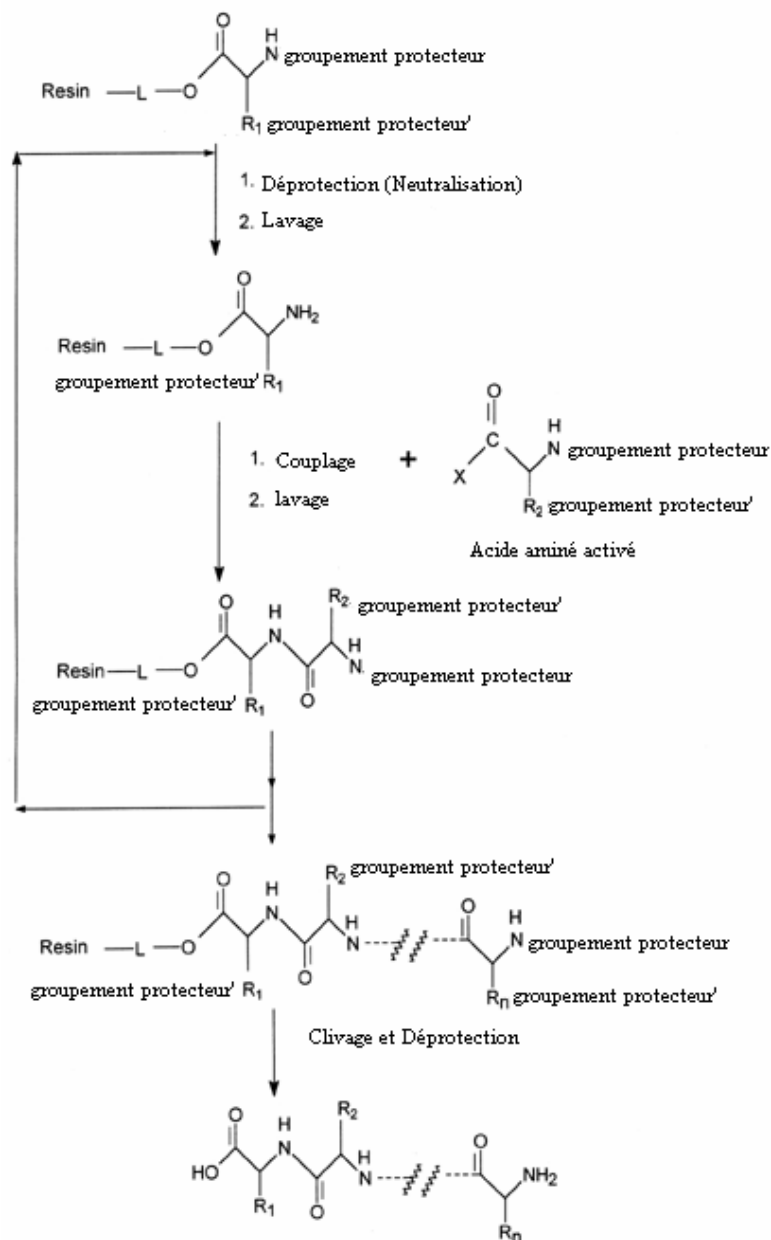


Figure 19 : Schéma du processus de synthèse peptidique en phase solide.

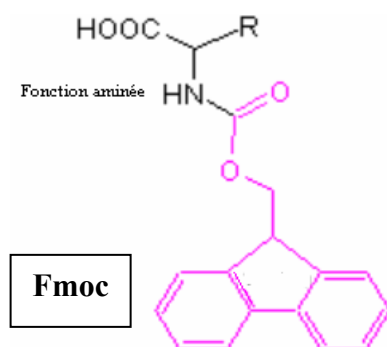


Figure 20 : Structure chimique du groupement protecteur de la fonction α -aminée Fmoc (*N*-[9-fluorènyl]méthoxycarbone).

aminé est séparé et identifié par son temps de rétention en HPLC (sur un système 120A HPLC) et identifié par rapport à des PTH-aa de référence.

5.1.3 Synthèse peptidique sur support solide

Les étapes de synthèse ont été réalisées au laboratoire Ciblage et Auto-assemblages Fonctionnels, UMR CNRS 6226 de l'Université de Rennes 1 sous la direction de Dr. Michèle baudy-Floc'h et en collaboration avec Dr. Mathieu Laurencin.

La synthèse peptidique sur support solide (SPSS) est basée sur des couplages successifs d'aminoacides sur un support polymérique insoluble. Cette synthèse a lieu dans le sens contraire de la synthèse biologique. L'élongation de la chaîne peptidique s'effectue de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale (Merrifield, 1963). Tout d'abord, l'extrémité C-terminale est fixée par sa fonction acide carboxylique sur une résine support de synthèse par une liaison covalente stable. Le cycle d'addition commence par la déprotection de la fonction α -aminée du peptide en élongation, en éliminant son groupement protecteur. Il s'ensuit l'addition de l'acide aminé suivant par sa fonction carboxylique activée.

L'acide aminé nouvellement incorporé est protégé au niveau de sa fonction α -aminée ainsi que sur ses fonctions latérales. Une étape d'acylation permet la formation de la liaison peptidique entre l'acide aminé activé et la fonction α -aminée de l'acide aminé additionné (Figure 19). Lorsque le peptide est synthétisé, le dernier acide aminé est déprotégé, les fonctions latérales sont enlevées et le peptide est clivé du support par lyse acide. Le peptide libre est ensuite purifié et caractérisé. Il est nécessaire pendant la synthèse de bloquer les fonctions réactives des acides aminés. La déprotection de la fonction α -aminée de l'acide aminé incorporé s'opère avant l'introduction de l'acide aminé suivant, les fonctions réactives des chaînes latérales restent protégées jusqu'à la fin de l'élongation.

La synthèse chimique classique sur phase solide Fmoc (*N*-[9-fluorènyl]méthoxycarbonyl) (Figure 20) a été réalisée à l'aide d'un synthétiseur automatique commercial Advanced Chem Tech 440 Mos synthesizer, par couplage de Fmoc- α -aminés acides sur une résine Wang N^α -Fmoc-Phe (0,72 mmole/g).

Les acides aminés protégés ont été couplés et activés *in situ* en présence de *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) et *N,N,N',N'*-Tetraméthyl-O-(Benzotriazol-1-yl) Uronium Tetrafluoroborate (TBTU) et de diisopropyléthylamine (DIEA). Chaque réaction de couplage est réalisée en utilisant un excès (4 fois) de chaque acide aminé, TBTU, et HOBt en présence

d'un excès de 8 fois la quantité nécessaire de DIEA pendant 1 h. La déprotection N^α -Fmoc a été réalisée à l'aide de 20% de pipéridine dans du diméthylformamide (DMF). La déprotection des chaînes latérales et le clivage du peptide du support solide ont été réalisés par un traitement à 95% d'acide trifluoroacétique (TFA)/ 2% triisopropylsilane (TIS)/ 2% eau et 1% d'éthane dithiolo (pour éviter l'oxydation pendant la déprotection), pendant 3 h à température ambiante. La résine est ensuite éliminée de la solution par filtration, et le peptide brut de synthèse obtenu est récupéré par précipitations au diéther glacial et filtrations. Le peptide brut synthétisé est purifié par RP-HPLC sur une colonne semi-préparative HPLC (système X Terra 10 μm column (300 \times 19 mm)). L'élution est réalisée par un gradient linéaire d'eau-0,08% TFA (A) et ACN-0,1% TFA aqueux (B), pour un débit de 8 mL.min⁻¹ avec détection par une photodiode aux longueurs d'onde de 215 et 254 nm. Les fractions correspondant au pic majoritaire ont été collectées, regroupées et lyophilisées. Le peptide produit est alors collecté sous forme d'une poudre blanche. La pureté du peptide est contrôlée par RP-HPLC analytique sur une colonne X Terra 5 μm (250 \times 4.6 mm) à l'aide d'un gradient linéaire eau-0,08% TFA et ACN-0,1% TFA à un débit de 1mL.min⁻¹ (pour vérifier que la pureté soit supérieure à 99%). Au final, le peptide est analysé par LC-ESI-MS/MS.

Chapitre I

**Recherche d'activités antibactériennes et
antivirales chez 4 espèces de bivalves et 3 espèces
de gastéropodes marins**

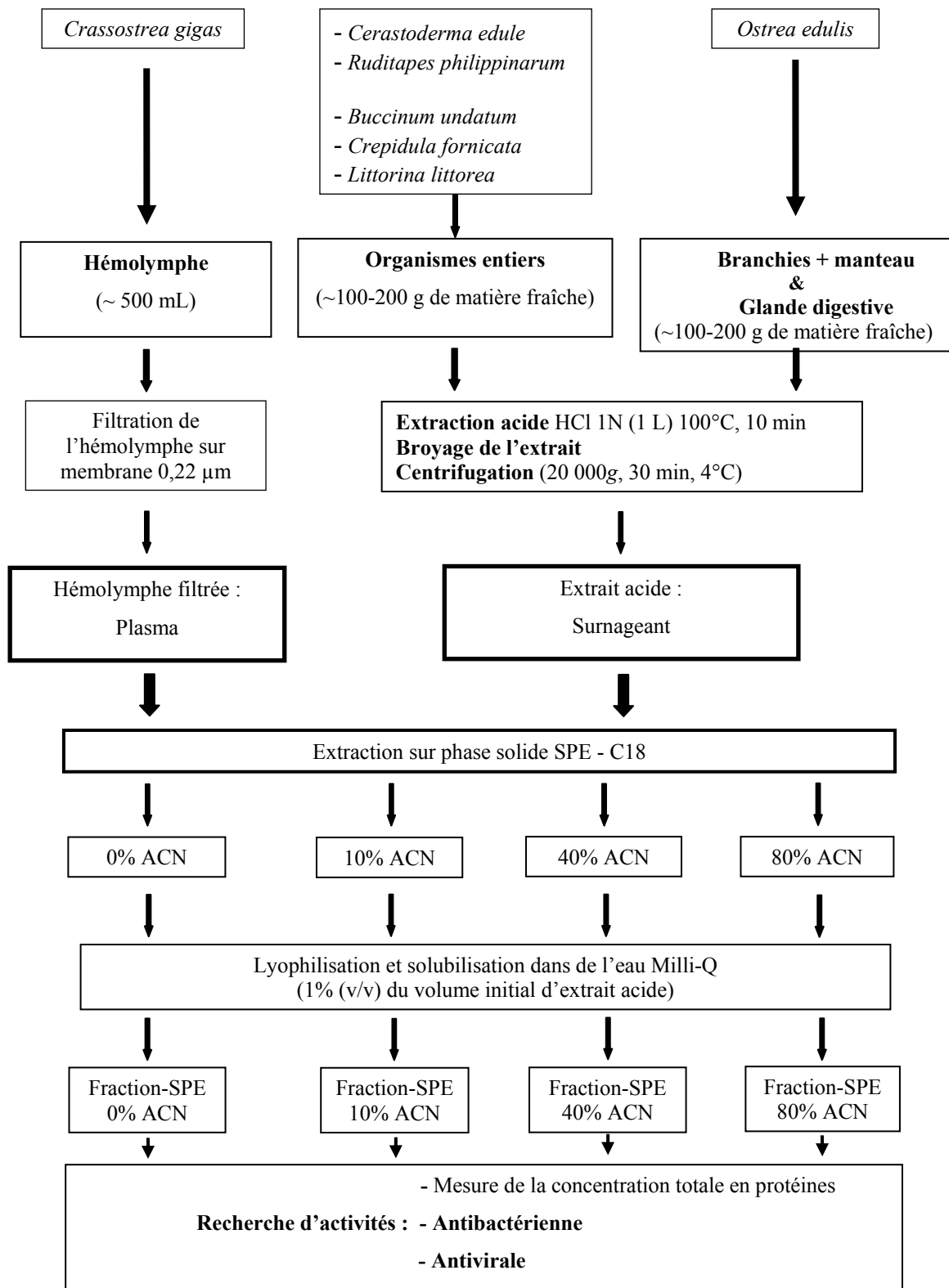


Figure 21 : Protocole d'extraction et de pré-purification sur colonne C18 des différents bivalves et gastéropodes étudiés dans le chapitre 1.

6 Introduction

L'environnement marin est connu comme étant une importante source de produits naturels (Rinehart, 1983). Le criblage d'extraits d'espèces marines les plus diverses suscite depuis ces 30 dernières années un attrait particulier dans la mise en évidence de bioactivité chez des mollusques marins. Dans ce contexte, ce premier chapitre vise à rechercher des molécules à activités antimicrobiennes à partir de 4 espèces de bivalves conchylicoles fortement représentées en Bretagne : l'huître plate *Ostrea edulis* et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (*Ostreidae*), la coque *Cerastoderma edule* (*Cardiidae*) et la palourde *Ruditapes philippinarum* (*Veneridae*). *O. edulis* et *C. gigas* sont les 2 principales espèces d'huîtres produites en France (FAO©, 2008-2009). La palourde japonaise *R. philippinarum* est actuellement la principale espèce produite en aquaculture en raison de sa meilleure compétitivité vis-à-vis de l'espèce européenne *Ruditapes decussatus*. La coque *C. edule* naturellement présente sur les côtes françaises de la Manche et de la Méditerranée fait principalement l'objet de pêche à pied, mais son élevage et sa production annuelle en font une espèce économiquement attractive. Ces espèces restent néanmoins fréquemment touchées par des épizooties bactériennes, parasitaires et virales (Paillard *et al.*, 2004; Renault, 2006). Trois espèces de gastéropodes ont été également choisies pour cette étude : le bulot *Buccinum undatum* (*Buccinidae*), le bigorneau *Littorina littorea* (*Littorinidae*) et la crépidule *Crepidula fornicata* (*Calyptraeidae*). En effet, les gastéropodes marins représentent un intérêt significatif dans l'environnement conchylicole. Le bulot et le bigorneau sont des coquillages d'intérêt économique retrouvés sur les côtes de la Manche et de l'Atlantique. Au contraire, la crépidule ne présente aucun intérêt que ce soit économique ou pour la consommation alimentaire. Elle est considérée comme une espèce invasive et problématique pour les ressources halieutiques. Certaines activités humaines tels que les transports maritimes sont des facteurs favorisant la diffusion de ces espèces exogènes. Outre l'ostréiculture qui les a involontairement introduites le long du littoral français, l'eutrophisation générale des eaux et les méthodes de pêche les diffusent sur des kilomètres et contribuent à leur prolifération.

Ainsi, les espèces retenues pour cette étude sont à la fois des espèces importantes en terme d'économie régionale (*Buccinum undatum*, *Littorina littorea*, *Cerastoderma edule*), nationale et mondiale (*Ostrea edulis*, *Ruditapes philippinarum*) et *Crepidula fornicata* est une espèce générant d'importants problèmes écologiques et de valorisation.

La recherche d'activité antibactérienne a été mise en oeuvre envers des bactéries pathogènes de poissons fréquemment répertoriés et occasionnant des pertes économiques

importantes en aquaculture (Toranzo *et al.*, 2005; Abdel-Raouf & Ibraheem, 2008), ainsi qu'envers des bactéries pathogènes responsables de maladies chez les bivalves (Jorquera *et al.*, 2001; Paillard *et al.*, 2004).

Ainsi, *Listonella anguillarum* et *Aeromonas* sp. sont à l'origine de vibriose et furunculose rencontrées chez les espèces d'élevage (turbot, dorade, anguille et morue) (Dubber & Harder, 2008). Le pathogène *Vagococcus salmoninarum* est fréquemment associé à des infections chez les Salmonidés à travers le monde (Michel *et al.*, 1997). *Yersinia ruckeri* est un agent étiologique de la yersiniose, maladie infectieuse sévère, régulièrement rencontrée chez les Salmonidés (Fernandez *et al.*, 2003). *Vibrio alginolyticus* est fréquemment impliqué dans les épizooties de la dorade méditerranéenne d'aquaculture. Cette bactérie est à l'origine d'importantes mortalités chez ces poissons d'élevage (Balebona *et al.*, 1998). Les bactéries du genre *Vibrio* (*V. alginolyticus* et *V. anguillarum*) provoquent des mortalités sévères dans les cultures larvaires de *C. gigas* (Paillard *et al.*, 2004).

Le criblage des activités antibactériennes a également été réalisé sur des bactéries fréquemment employées dans les spectres de recherche de peptides antimicrobiens, telles que *Escherichia coli* (Gram⁻) ou *Micrococcus luteus* et *Bacillus megaterium* (Gram⁺).

Des virus apparentés aux *Herpesviridae* tels que le virus Koi-Herpes ou Carp intestinal Nephritis and Gill necrosis Virus (CNGV) provoquent des mortalités massives chez les carpes et d'énormes déficits financiers pour les éleveurs (Perelberg *et al.*, 2005). Les Ictalurid Herpes virus (IcHV-1), Ranid Herpes virus (RaHV-1), Salmonid Herpes virus (SalHV-1) et Anguillid Herpes virus (AngHV-1) entraînent également d'importantes pertes chez des espèces de poissons d'élevage (Ittoop *et al.*, 2006). Chez les bivalves, le virus OsHV-1 provoque des épizooties estivales récurrentes chez l'huître *C. gigas* (Renault, 2006). Ces virus aquatiques membres de la famille des *Herpesviridae* présentent une structure protéique et morphologique similaire à celle du virus *Herpes simplex* Type 1 (VHS-1) (Ilouze *et al.*, 2006). L'évaluation de l'activité antivirale a été effectuée sur le modèle VHS-1 en culture sur des cellules mammaliennes Vero. Ce modèle est fréquemment employé dans la recherche de molécules antivirales chez les organismes marins (Yasin *et al.*, 2000; Maier *et al.*, 2001; Olicard *et al.*, 2005; Carriel-Gomes *et al.*, 2007) principalement du fait de l'impossibilité actuelle de pouvoir cultiver *in vitro* le virus OsHV-1 et de l'absence de lignées cellulaires d'huîtres.

Tableau 12 : Extraits et fractions obtenus à partir des bivalves et gastéropodes sélectionnés.

SPE : Extraction en Phase Solide ; ACN : Acétonitrile.

Mollusques	Nombre d'individus	Masse de tissus prélevés (g)	Extraits acides		Fractions-SPE Protéines ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
			Volume (mL)	Protéines ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	10% ACN	40% ACN	80% ACN
<i>Cerastoderma edule</i>	58	123	1 030	1 581	918	6 000	340
<i>Ruditapes philippinarum</i>	48	191	910	1 948	1 100	10 000	500
<i>Buccinum undatum</i>	19	168	1 100	5 364	1 275	18 000	520
<i>Littorina littorea</i>	100	103	1 060	3 559	9 640	15 000	4 000
<i>Crepidula fornicata</i>	75	125	975	3 637	684	9 600	440
<i>Ostrea edulis</i>	50						
Glande digestive		107	990	2 231	976	16 000	400
Branchies + manteau		105	1 020	1 309	682	4 800	5 120
<i>Crassostrea gigas</i> (hémolymphe)	126	450 mL		1 900	1 000	630	150

Tableau 13 : Activité antibactérienne dans les fractions provenant d'extraits acides des mollusques marins, contre deux espèces cibles, *M. luteus* et *L. anguillarum*.

La recherche d'activité a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé :

– : signifie qu'aucune inhibition n'a été détectée ; + : correspond à un diamètre d'inhibition de 7 mm ; ++ : correspond à un diamètre d'inhibition de 7 à 10 mm ; +++ : correspond à un diamètre d'inhibition de plus de 10 mm.

Extraits	Fractions-SPE					
	10% ACN		40% ACN		80% ACN	
	<i>M. luteus</i>	<i>L. anguillarum</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. anguillarum</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. anguillarum</i>
<i>Cerastoderma edule</i>	–	–	++	+	+	+
<i>Ruditapes philippinarum</i>	–	–	++	+	+	–
<i>Buccinum undatum</i>	–	–	+	+++	–	–
<i>Littorina littorea</i>	–	–	+	+	–	–
<i>Crepidula fornicata</i>	–	–	+	+	–	–
<i>Ostrea edulis</i>						
Glande digestive	–	–	+	+++	–	–
Branchies + manteau	–	–	–	–	++	–
<i>Crassostrea gigas</i> (hémolymphe)	–	–	+++	–	+++	–

7 Résultats

7.1 Extraction acide et fractionnement sur cartouches SPE-C18

Dans le but d'extraire des composés antimicrobiens sur leur caractère amphiphile, thermorésistants et stables chimiquement, une extraction acide et un fractionnement sur colonnes SPE-C18 ont été réalisés en présence de différentes concentrations en ACN. 100 à 200 g de chair fraîche de chaque espèce ont été prélevés et regroupés avant de subir une extraction acide (Tableau 12). Les extraits acides obtenus ont ensuite été pré-purifiés par fractionnement sur des cartouches SPE-C18. Une élution par paliers successifs de 10%, 40% et 80% d'ACN-0,1% TFA a permis de collecter 3 fractions de polarité décroissante (Figure 21). L'hémolymphe d'huître creuse *C. gigas* (~ 500 mL à partir de 120 individus) n'a pas subi la même extraction. Après filtration, le plasma a été déposé directement sur colonnes SPE-C18. L'élution assurée par 3 paliers successifs de 10%, 40% et 80% d'ACN-0,1% TFA a permis d'obtenir 3 fractions de polarité décroissante (Figure 21).

Après lyophilisation, ces fractions éluées ont été reconstituées dans de l'eau Milli-Q (à 1% ($V_{\text{initial}}/V_{\text{final}}$) du volume de l'extrait acide). La concentration en protéines a été quantifiée dans chacune des fractions-SPE 10, 40 et 80% (Tableau 12). Les activités antibactériennes et antivirales ont été recherchées dans ces fractions-SPE et exprimées par rapport à la concentration totale en protéines.

7.2 Criblage de l'activité antibactérienne par diffusion en milieu gélosé

L'activité antibactérienne a été évaluée par la technique de diffusion en milieu gélosé sur deux espèces bactériennes *Micrococcus luteus* (Gram⁺) et *Listonella anguillarum* (Gram⁻) (Tableau 13).

Aucune activité n'a été retrouvée dans les fractions-SPE non retenues et les fractions-SPE 10%. En revanche, les fractions-SPE 40% et 80% présentent une activité antibactérienne significative. Ce résultat met en évidence le caractère amphiphile des composés à l'origine des activités puisqu'ils sont extraits en milieux aqueux, retenus sur C18 et solubles dans l'eau.

Tableau 14 : Spectres d'activité des fractions-SPE 40% ACN obtenues pour chaque espèce de mollusque. L'activité est exprimée en CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

– : Pas d'inhibition ; *ND* : Non déterminé ; La CMI définit la plus faible concentration en protéine ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) engendrant 100 % d'inhibition après 48 h d'incubation en conditions optimales de croissance de la bactérie cible. Le Lysozyme et la Polymyxine B sont utilisés comme témoins positifs respectivement contre les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻. B + M et GD signifient respectivement Branchies + Manteau et Glande Digestive.

	Fractions-SPE 40%								Témoins
	<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Ostrea edulis</i> B + M	GD	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Buccinum undatum</i>	<i>Littorina littorea</i>	<i>Crepidula fornicata</i>	
Bactéries cibles	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)								
<i>Aeromonas salmonicida</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	<i>ND</i>
<i>Aeromonas caviae</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	<i>ND</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	<i>ND</i>
<i>Escherichia coli</i>	300	500	–	–	–	4250	3750	300	4
<i>Listonella anguillarum</i>	1500	1000	–	–	–	2125	1875	2400	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	300	500	–	–	–	–	–	600	16
<i>Yersinia ruckeri</i>	75	125	60	60	160	1060	3750	1200	1
<i>Bacillus megaterium</i>	150	250	240	240	20	530	469	600	1
<i>Micrococcus luteus</i>	150	250	2400	2400	20	530	469	2400	4
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	300	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	–	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	63

Les activités antibactériennes ont été détectées dans les fractions-SPE 40% à la fois contre *M. luteus* et *L. anguillarum* (Tableau 13). Excepté pour l'extrait de l'espèce *O. edulis* (branchies + manteau), toutes les fractions-SPE 40% montrent un antagonisme envers ces deux bactéries cibles sélectionnées.

Seule la fraction-SPE 80% de l'extrait d'*O. edulis* (branchies + manteau) présente une activité antibactérienne ciblée uniquement sur *M. luteus*.

En observant les différentes activités détectées dans les fractions-SPE 40% et 80% de chaque espèce, *Micrococcus luteus* est globalement plus sensible, à l'exception des fractions-SPE 40% de *B. undatum* et d'*O. edulis* (glande digestive), plus actives contre *Listonella anguillarum*.

7.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La technique de diffusion en milieu gélosé employée pour la recherche d'activité antibactérienne est une méthode sensible, facile à mettre en oeuvre et nécessite un faible volume d'échantillon. Cependant cette technique, bien que fréquemment utilisée, présente des limites dues au fait que l'agarose présent peut entraver la diffusion de molécules potentiellement actives et donc la détection de certaines classes de composés antimicrobiens (du Toit & Rautenbach, 2000). En conséquence de quoi, la recherche d'activité antibactérienne a été complétée par la détermination de CMI en milieu liquide et sur un plus grand nombre de bactéries. Le choix des bactéries s'est porté sur des pathogènes marins ou des bactéries employées comme espèces modèles dans le criblage de peptides antibactériens. Les résultats sont présentés dans les Tableaux 14 et 15.

L'absence d'activité dans les fractions-SPE 10%, quelle que soit la bactérie cible testée (résultats non rapportés dans les Tableaux 14 et 15) a été confirmée.

Aucune activité n'a été mise en évidence envers les espèces du genre *Aeromonas* quelles que soient les fractions-SPE 40% et 80% et les espèces de mollusque testées.

Les activités antibactériennes ont été détectées dans les fractions-SPE 40% et 80%. Pour le cas de *Listonella anguillarum*, les activités restent faibles. La seule fraction-SPE 80% active contre *L. anguillarum* selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé est issue de l'extrait de *C. edule*. Sa CMI a été estimée à 85 µg.mL⁻¹ (Tableau 15).

Tableau 15 : Spectres d'activité des fractions-SPE 80% ACN obtenues pour chaque espèce de mollusque. L'activité est exprimée en CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

– : Pas d'inhibition ; *ND* : Non déterminé ; La CMI définit la plus faible concentration en protéine ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) engendrant 100 % d'inhibition après 48 h d'incubation en conditions optimales de croissance de la bactérie cible. Le Lysozyme et la Polymyxine B sont utilisés comme témoins positifs respectivement contre les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻. B + M et GD signifient respectivement Branchies + Manteau et Glande Digestive.

	Fractions-SPE 80%								Témoins
	<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Ostrea edulis</i> B + M	GD	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Buccinum undatum</i>	<i>Littorina littorea</i>	<i>Crepidula fornicata</i>	
Bactéries cibles	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)								
<i>Aeromonas salmonicida</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	<i>ND</i>
<i>Aeromonas caviae</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	<i>ND</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	<i>ND</i>
<i>Escherichia coli</i>	170	250	–	–	–	–	–	–	4
<i>Listonella anguillarum</i>	85	250	2560	200	–	260	125	–	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	170	250	–	–	–	–	–	250	16
<i>Yersinia ruckeri</i>	85	250	–	–	–	–	–	–	1
<i>Bacillus megaterium</i>	43	–	40	100	37	130	500	–	1
<i>Micrococcus luteus</i>	43	63	2560	100	9	–	125	–	4
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	170	250	<i>ND</i>	<i>ND</i>	–	260	<i>ND</i>	–	63

De façon générale, pour chaque espèce de mollusque, l'activité des fraction-SPE 40% présente le plus large spectre d'activité (Tableau 14). En revanche, les fractions-SPE 80% ne sont actives que sur quelques souches cibles telles que *L. anguillarum*, *B. megaterium*, *M. luteus* et *V. salmoninarum* mais à des CMI plus faibles (Tableau 15).

Les activités antibactériennes détectées ont été classées en différentes catégories en fonction des valeurs de CMI rapportées à la concentration en protéines totales. Ainsi, les activités antibactériennes correspondant à des valeurs de CMI respectivement inférieures à $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, comprises entre 200 et $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et supérieures à $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été qualifiées respectivement d'activités dites élevées, moyennes et faibles. Suivant cette classification, les fractions-SPE 40% et 80% obtenues à partir de l'extrait de *C. edule* et de l'hémolymphe de *C. gigas* apparaissent comme les plus actives. Trois souches bactériennes, *Yersinia ruckeri*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus megaterium* sont particulièrement sensibles à la fraction-SPE 40% de l'extrait de *C. edule* avec des CMI respectives de 75 et $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Toutes les CMI obtenues à partir de la fraction-SPE 80% de l'extrait de *C. edule* sont inférieures à la concentration de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ envers les souches bactériennes sensibles, à la fois contre les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻.

Concernant *C. gigas*, seule *Yersinia ruckeri* est sensible à la fraction-SPE 40% pour une CMI de $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Deux souches à Gram⁺, *Micrococcus luteus* et *Bacillus megaterium* sont sensibles à la fraction-SPE 40% pour des valeurs de CMI de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ainsi qu'à la fraction-SPE 80%, pour des valeurs de CMI respectivement de $9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $37 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

En regard des autres fractions-SPE issues des extraits de bivalves, les fractions-SPE 40% et 80% de l'extrait d'*Ostrea edulis* (branchies + manteau), présentent des valeurs de CMI du même ordre de grandeur que celles de *C. edule* mais uniquement sur 2 souches cibles, respectivement *Y. ruckeri* ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et *B. megaterium* ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Ces mêmes résultats ont été constatés concernant la fraction-SPE 40% de l'extrait d'*Ostrea edulis* (Glande digestive). La fraction-SPE 80% bien que présentant des CMI inférieures ou égales à $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ reste moins active que les fractions-SPE 80% des extraits de *C. edule* et *C. gigas*.

Les fractions-SPE 40% et 80% obtenues pour l'extrait de *R. philippinarum* présentent un large spectre d'activité, mais les valeurs de CMI sont plus élevées que celles obtenues pour les extraits de *C. edule* et *C. gigas*.

D'une manière générale, les fractions-SPE 80% possèdent une activité élevée sur un spectre étroit de bactéries composé de *L. anguillarum*, *B. megaterium* et de *M. luteus*.

Tableau 16 : Pourcentage de protection antivirale et de cytotoxicité vis-à-vis du modèle VHS-1/Vero des fractions-SPE concentrées à 1% (v/v) provenant des extraits des mollusques marins.

Fractions-SPE	Protéines totales ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	protection antivirale (%) vis-à-vis de VHS-1	cytotoxicité (%) envers les cellules Vero
40% ACN			
<i>Cerastoderma edule</i>	1500	71,7 \pm 11,4	26,0 \pm 23,5
<i>Ruditapes philippinarum</i>	2550	0	100,0 \pm 1,0
<i>Buccinum undatum</i>	4500	0	70,0 \pm 1,0
<i>Littorina littorea</i>	531	99,0 \pm 1,0	34,0 \pm 1,0
<i>Crepidula fornicata</i>	2400	39,0 \pm 32,0	50,0 \pm 26,2
<i>Ostrea edulis</i>			
Glande digestive	4000	81,3 \pm 30,6	23,0 \pm 4,2
Branchies + manteau	1200	73,3 \pm 12,7	14,0 \pm 13,1
Fractions-SPE			
80% ACN			
<i>Cerastoderma edule</i>	85	59,3 \pm 9,3	24,3 \pm 8,8
<i>Ruditapes philippinarum</i>	125	48,7 \pm 1,5	22,8 \pm 7,5
<i>Buccinum undatum</i>	130	60,7 \pm 13,1	27,7 \pm 3,8
<i>Littorina littorea</i>	60	0	18,0 \pm 1,0
<i>Crepidula fornicata</i>	110	46,8 \pm 26,6	27,8 \pm 7,3
<i>Ostrea edulis</i>			
Glande digestive	100	40,0 \pm 33,9	34,0 \pm 11,3
Branchies + manteau	1280	28,0 \pm 12,0	20,0 \pm 9,9
Acyclovir contrôle	1	100,0	14,0

Tableau 17 : Pourcentage de protection antivirale et de cytotoxicité vis-à-vis du modèle VHS-1/Vero des fractions-SPE concentrées à 1% (v/v) provenant de l'hémolymphe de *C. gigas*.

Fractions-SPE	Protéines totales ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	protection antivirale (%) vis-à-vis de VHS-1	cytotoxicité (%) envers les cellules Vero
Hémolymphe	1900	97,6 \pm 1,2	25,6 \pm 0,9
0% ACN	1000	96,0 \pm 4,0	26,0 \pm 1,5
10% ACN	790	0	100,0 \pm 1,0
40% ACN	475	50,0 \pm 1,0	12,0 \pm 1,0
80% ACN	37	17,0 \pm 1,0	29,0 \pm 1,0

Les fractions-SPE 40% provenant d'extraits de gastéropodes, bien que présentant une activité contre les bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ présentent des CMI supérieures à celles évaluées chez les bivalves. Avec des valeurs de CMI de 469 µg.mL⁻¹ envers *M. luteus* et *B. megaterium* pour sa fraction-SPE 40% et de 125 µg.mL⁻¹ envers *Y. ruckeri* pour sa fraction-SPE 80%, l'extrait de *Littorina littorea* apparaît comme le plus actif chez les gastéropodes.

En conclusion, ces premiers résultats laissent apparaître une activité antibactérienne significative dans les fractions-SPE obtenues à partir des extraits des espèces de bivalves *C. edule* et *C. gigas* et du gastéropode *L. littorea*.

7.4 Activité antivirale et cytotoxicité

L'évaluation de l'activité antivirale des fractions-SPE a été réalisée sur le modèle VHS-1/cellules Vero par viabilité cellulaire, à une MOI de 0,001 DI₅₀/cellules pendant 48 h à 37°C, sous 5% de CO₂. La cytotoxicité des fractions-SPE sur les cellules Vero est réalisée en parallèle de l'activité antivirale. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection des cellules Vero vis-à-vis des particules virales de VHS-1 et en pourcentage de cytotoxicité correspondants.

L'évaluation de l'activité antivirale et de la cytotoxicité a tout d'abord été effectuée sur les fractions-SPE concentrées (Tableau 16). Puis, un effet dose-réponse des fractions actives a été mesuré en inoculant les cellules Vero avec le virus VHS-1 en présence de concentrations décroissantes en extrait (série de dilutions de chaque fraction-SPE 40% et 80% concentrées à 1% jusqu'à 0,1% (v/v)) dans le but de définir leur CE₅₀ (Concentration Effectrice à 50%) et CC₅₀ (Concentration Cytotoxique à 50%).

Bien que l'activité antivirale et la cytotoxicité puissent résulter de l'effet de composés distincts, l'activité antivirale a été pondérée par la cytotoxicité en utilisant l'Indice de Sélectivité. L'indice de sélectivité (IS) (CC₅₀/CE₅₀) est calculé par le rapport de la cytotoxicité (CC₅₀) sur l'activité antivirale (CE₅₀). Le calcul de cet indice permet la comparaison et la classification des activités antivirales obtenues pour chaque fraction-SPE (Tableau 18).

Aucune activité antivirale n'a été retrouvée dans les fractions 10% provenant d'extrait acide. Seule la fraction non retenue obtenue à partir de l'hémolymphe filtrée de *C. gigas* (Tableau 17) met en évidence une activité antiherpétique.

Tableau 18 : Détermination de l'activité antivirale (CE_{50}), de la cytotoxicité (CC_{50}) et de l'indice de sélectivité (IS) des fractions-SPE 40% et 80% chez les espèces ayant révélées de l'activité.

CE_{50} : Concentration antivirale Effectrice à 50%. Correspond à la concentration en échantillon nécessaire pour inhiber 50% de l'infection virale induite. CC_{50} : La Concentration Cytotoxique est la concentration qui provoque 50% de destruction du tapis cellulaire. IS (CC_{50}/CE_{50}) : Indice de Sélectivité. Chaque CE_{50} et CC_{50} sont exprimées par rapport à la concentration protéique totale. Les données correspondent aux moyennes obtenues par régressions linéaires réalisées à partir de 3 expériences indépendantes.

Fractions-SPE	CC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CE_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IS (CC_{50}/CE_{50})
40% ACN			
<i>Cerastoderma edule</i>	3913,0	919,5	4,3
<i>Littorina littorea</i>	1115,8	11,8	94,5
<i>Ostrea edulis</i>			
Glande digestive	8566,0	2416,2	3,5
Branchies + manteau	3668,9	886,0	4,2
80% ACN			
<i>Cerastoderma edule</i>	163,8	67,4	2,4
<i>Ruditapes philippinarum</i>	329,1	91,6	3,6
<i>Buccinum undatum</i>	233,2	68,7	3,4
Acyclovir contrôle	46,8	0,2	234,0

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Olicard *et al.* (2005). Les résultats d'évaluation de la cytotoxicité et de l'activité antivirale obtenus à partir de l'hémolymphe filtrée de *C. gigas* et de ses différentes fractions-SPE ainsi que dans la fraction non retenue, sont présentés dans le Tableau 17.

L'activité est retrouvée dans l'hémolymphe de *C. gigas*, avec un pourcentage de protection de $97,6 \pm 1,2\%$, pour une concentration en protéines totales de $1900 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tableau 17). Après pré-purification sur cartouche SPE-C18, l'activité la plus importante est obtenue dans la fraction-SPE 0%, non retenue, avec un pourcentage de protection de $96,0 \pm 4,0\%$, pour une concentration en protéines totales de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Une protection partielle a été détectée dans la fraction SPE-40% non cytotoxique, avec un pourcentage de protection de $50,0 \pm 1,0\%$, pour une concentration en protéines totales de $475 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Enfin, une très faible protection a été révélée dans la fraction-SPE 80%, avec un pourcentage de protection de $17,0 \pm 1,0\%$, pour une concentration en protéines totales de $37 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Seule la fraction-SPE 10% est cytotoxique sur la lignée cellulaire Vero. L'hémolymphe et les 3 fractions-SPE 0%, 40% et 80% ne présentent pas de cytotoxicité significative avec des pourcentages de cytotoxicité compris entre $12,0 \pm 1,0\%$ et $29,0 \pm 1,0\%$.

Les pourcentages de protection anti-VHS-1 des fractions-SPE 40% et 80% issues de la pré-purification de l'hémolymphe de *C. gigas*, ne dépassant pas le seuil des 50%, les valeurs de CE_{50} et CC_{50} n'ont pas pu être déterminées.

L'activité antiherpétique a été détectée dans les autres extraits de mollusques pour les fractions-SPE 40% ou 80%, avec une efficacité variable selon les espèces. Globalement, les fractions-SPE 40% s'avèrent les plus actives (Tableau 18). La protection cellulaire la plus efficace vis-à-vis du virus VHS-1, a été détectée dans la fraction-SPE 40% de l'extrait de *L. littorea* ($99,0 \pm 1\%$ de protection).

Les fractions-SPE 40% obtenues à partir des extraits de *C. edule* ($71,7 \pm 11,4\%$ de protection), *O. edulis* (branchies + manteau) ($73,3 \pm 12,7\%$ de protection) et *O. edulis* (glande digestive) ($81,3 \pm 30,6\%$ de protection) présentent un niveau de protection cellulaire élevé.

Une faible cytotoxicité a été révélée dans ces fractions. En effet, les pourcentages de destruction cellulaire sont compris entre $14,0 \pm 13,1\%$ pour la fraction-SPE 40% obtenue à partir de l'extrait d'*O. edulis* (branchies + manteau) et $26,0 \pm 23,5\%$ pour la fraction-SPE 40% de l'extrait de *C. edule*. Seul le pourcentage de destruction cellulaire de $34,0 \pm 1,0\%$ de l'extrait de *L. littorea* est légèrement élevé ($> 30\%$).

Concernant les fractions-SPE 80%, une plus faible protection est détectée pour les espèces *B. undatum* ($60,7 \pm 13,1$ % de protection), *C. edule* ($59,3 \pm 9,3$ % de protection) et *R. philippinarum* ($48,7 \pm 1,5$ % de protection).

Ces résultats montrent que les fractions-SPE les plus efficaces et non cytotoxiques sont les fraction-SPE 40% des extraits de *L. littorea* pour des valeurs respectives de CC_{50} de $1115,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et de CE_{50} de $11,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (IS = 94,5) puis de *C. edule* (IS = 4,3) et *O. edulis* branchies + manteau (IS= 4,2) pour des valeurs respectives de CC_{50} de $3913,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $3668,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et de CE_{50} de $919,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $886,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tableau 18).

La fraction-SPE 40% de l'extrait d'*O. edulis* (glande digestive) s'avère moins active avec un IS de 3,5 pour une CC_{50} de $8566,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et une CE_{50} de $2416,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La valeur de protection antivirale se rapproche davantage des valeurs obtenues pour les fractions-SPE 80%. En effet, les fractions-SPE 80% de *R. philippinarum* et *B. undatum* présentent des IS proches, respectivement des IS de 3,6 et 3,4 pour des CC_{50} de $329,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $233,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et des CE_{50} de $91,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $68,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Enfin, la fraction-SPE 80% de *C. edule* avec une valeur de CC_{50} de $163,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour une CE_{50} de $67,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et un IS de 2,4 apparaît moins efficace et présente une cytotoxicité non négligeable. Néanmoins, *C. edule* est la seule espèce pour laquelle une activité antivirale est détectée à la fois dans sa fraction-SPE 40% et 80% (Tableau 18).

Il est important de signaler que, comme les composés antibactériens, les composés responsables de l'activité antivirale sont amphiphiles puisqu'ils sont extraits et solubilisés en solution aqueuse et retenus sur colonne C18. Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, nous avons choisi de poursuivre une caractérisation partielle des composés actifs issus des extraits de *C. edule* et *L. littorea* et de l'hémolymphe de *C. gigas* dans le chapitre 2.

8 Discussion

Liée à la compétition interspécifique, l'exposition à des concentrations relativement élevées de bactéries, virus et autres parasites conduit les invertébrés marins à produire des molécules de défense. Les composés bioactifs découverts chez des mollusques sont essentiellement identifiés à des peptides, depsipeptides, stéroïdes, sesquiterpène, terpènes, polypropionates, composés azotés, macrolides, dérivés d'acides gras tels que les prostaglandines, stéroïdes, des composés hétéroclites et des alcaloïdes, ces composés présentant tous un type spécifique d'activité (Maktoob & Ronald, 1997; Becerro *et al.*, 2001; Blunt *et al.*, 2006; Blunt *et al.*, 2008).

Au cours des dernières décennies, la découverte chez les animaux de peptides endogènes présentant des propriétés antibactériennes a suscité l'attrait pour ces molécules de défense. Chez les bivalves, la recherche de peptides antimicrobiens a généralement été réalisée à partir d'hémolymphe. De nombreuses études ont rapporté la présence de tels peptides chez les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (Mitta *et al.*, 1999a; Mitta *et al.*, 1999b; Mitta *et al.*, 2000b; Haug *et al.*, 2004) ou encore chez les huîtres *C. virginica* et *C. gigas* (Anderson & Beaven, 2001; Seo *et al.*, 2005; Gueguen *et al.*, 2006b; Gueguen *et al.*, 2009) ainsi que chez certains mollusques gastéropodes (Benkendorff *et al.*, 2001; Iijima *et al.*, 2003).

Ces substances protègent en permanence les mollusques marins dépourvus de système immunitaire à mémoire, des multiples agressions bactériennes dont ils sont la cible et participent au maintien permanent de leur intégrité.

Au cours de cette étude, après une première extraction acide, la pré-purification des composés antimicrobiens a été effectuée à l'aide de colonnes SPE-C18. La nature amphiphile des composés actifs a été mise en évidence par le fait qu'ils ont été extraits à l'aide d'un solvant polaire, l'eau, et retenus sur une phase stationnaire apolaire (Bulet *et al.*, 2004). Etant donné la découverte de plusieurs peptides antimicrobiens chez des mollusques marins ainsi que le caractère ubiquitaire de ces molécules, et devant leur nature amphiphile (caractère commun aux peptides antimicrobiens), nous pouvons émettre l'hypothèse que les composés actifs détectés soient des peptides antimicrobiens.

Bien que les fractions-SPE obtenues à partir des mollusques marins ne contiennent pas de produits purs, les valeurs de CMI obtenues dans cette étude sont comparables à celles précédemment obtenues pour les peptides « American Oyster Defensin » (AOD) et CgDef

pures, caractérisés chez *C. gigas* envers *E. coli* et *V. alginolyticus* (CMI respectivement de $330 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $161\text{-}92 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Seo *et al.*, 2005; Gueguen *et al.*, 2006b)).

Les valeurs d'activité antivirale (CE_{50} de $919,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et de cytotoxicité (CC_{50} de $3913,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de la fraction-SPE 40% de *C. edule* et de la fraction-SPE 40% de *L. littorea* (valeurs respectives de CE_{50} et de CC_{50} de $11,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $1115,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sont proches de celles obtenues par Olicard *et al.* (2005) à partir de l'hémolymphe de *C. gigas* en utilisant exactement le même modèle VHS-1/cellules Vero (valeurs respectives de CE_{50} et CC_{50} de $425 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Olicard *et al.*, 2005). En revanche, les valeurs d'IS obtenues dans cette étude sont largement supérieures surtout pour la fraction 40% provenant de *Littorina littorea* (IS = 94). Nos résultats ont été obtenus par une technique de détection d'activité antivirale identique à celle utilisée par Olicard *et al.* (2005). Compte tenu du fait que les tests aient été appliqués dans les mêmes conditions et sur le même modèle VHS-1/ cellules Vero, nous considérerons que l'activité obtenue par la fraction-SPE 40% de *L. littorea* est plus efficace contre VHS-1, que celle détectée dans l'hémolymphe de *C. gigas* dans les travaux de Olicard *et al.* (2005). La fraction-SPE 40% de *C. edule* est moins cytotoxique et présente une efficacité similaire mais avec un IS de 4,3.

Dans la mesure où les activités antibactériennes ont été retrouvées à la fois dans les fractions-SPE 40% et 80%, il est raisonnable de supposer que plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de l'activité (Haug *et al.*, 2002a). Cependant, aucune activité n'a été retrouvée dans les fractions-SPE 10% quelle que soit l'espèce étudiée. Cette distinction a préalablement été remarquée dans les travaux de Ehret-Sabatier *et al.* (1996) lors de travaux sur l'hémolymphe du scorpion *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996).

Une étude récente réalisée par Tadesse *et al.* (2008) a décrit un protocole similaire d'extraction et de concentration à partir de 7 espèces d'ascidies, 6 espèces d'éponges et 1 espèce de corail de la côte norvégienne. Des activités antibactériennes et antifongiques ont été recherchées (Tadesse *et al.*, 2008). Bien qu'une activité ait été détectée dans les fractions-SPE 10% des espèces étudiées, les fractions-SPE 40% et 80% se sont révélées être les plus actives. Toutefois, les différences obtenues entre ces travaux et les nôtres peuvent correspondre à la différence des espèces explorées. Par ailleurs, l'environnement, la zone géographique, la saisonnalité sont connus pour influencer également l'activité biologique (Matozzo *et al.*, 2007).

Les travaux réalisés dans cette étude ont permis de détecter des activités antibactériennes et antivirales dans des extraits de mollusques bivalves et gastéropodes d'importance économique. En considérant à la fois les activités antibactériennes et antivirales obtenues à partir des fractions-SPE 40% et 80%, *C. edule* et *C. gigas* apparaissent les espèces présentant un réel potentiel antimicrobien à explorer. En effet, les fractions-SPE 40% et 80% de l'extrait de *C. edule* présentent l'activité antibactérienne la plus large pour de faibles valeurs de CMI par rapport aux autres bivalves. *C. edule* est la seule espèce pour laquelle une activité antivirale a été mesurée à la fois dans la fraction-SPE 40% et 80%. Les fractions-SPE 40% et 80% issues de l'hémolymphe de *C. gigas*, bien qu'actives sur un spectre plus étroit de bactéries, sont quant à elles actives aux plus faibles valeurs de CMI décelées. Bien que l'activité antivirale optimale fut détectée à la fois dans l'hémolymphe et la fraction non retenue (fraction-SPE 0%), le potentiel antiviral de l'hémolymphe de *C. gigas* et de sa fraction-SPE 0%, demeurent les plus élevés obtenus avec celui de la fraction-SPE 40% de *L. littorea*.

Les études portant sur *C. edule* concernent davantage la reproduction, la dynamique et la régulation de populations (Guillou *et al.*, 1990; Guillou & Tartu, 1992) ou encore l'influence du parasitisme sur la mortalité de cette espèce (Thieltges *et al.*, 2009). L'infestation parasitaire est considérée comme une conséquence d'un affaiblissement des animaux dû aux dysfonctionnements de l'écosystème (pollutions, bouleversements des équilibres). Des coques fragilisées par des infections bactériennes seront plus sensibles aux attaques par les parasites (Babarro & de Zwaan, 2001; Babarro & De Zwaan, 2008). A l'exception des travaux de Wootton *et al.* (2003), aucune étude n'a porté sur les mécanismes de défense de cette espèce et l'existence de peptides actifs. Des similarités morphologiques entre les hémocytes de *C. edule* et *M. edulis* ont été mises en évidence par ces auteurs. La dominance des hémocytes granulaires chez *C. edule* suggère leur capacité à réagir activement dans les mécanismes de réponse immunitaire (Wootton *et al.*, 2003). Nos travaux permettent toutefois de suggérer la présence de molécules de défense chez cette espèce.

Crassostrea gigas est une espèce modèle dans l'étude des mécanismes de défense des mollusques bivalves. De nombreux travaux ont montré l'existence des principaux mécanismes de défense de l'immunité innée chez cette espèce. En effet, *C. gigas* est l'une des espèces modèle dans l'étude et la compréhension des mécanismes de défense chez les bivalves. Ainsi, les mécanismes cellulaires de la phagocytose (Xue & Renault, 2000), l'apoptose (Renault *et*

al., 2000; Lacoste *et al.*, 2002a; Terahara *et al.*, 2003), l'agrégation ou d'adhésion hémocytaire et de chimiotactisme (Olafsen *et al.*, 1992), mis en place par les hémocytes (granulocytes et hyalinocytes) dans l'élimination de corps étrangers, font l'objet d'un grand nombre d'études chez *C. gigas*. Différents travaux rapportent la présence de molécules intervenant dans les mécanismes de défense tels que le lysozyme et des enzymes lysosomales (Xue & Renault, 2000), des radicaux toxiques de l'oxygène (ROS ; Reactive Oxygen Species) (Bachère *et al.*, 1991; López *et al.*, 1994; Greger *et al.*, 1995; Nakayama & Maruyama, 1998; Lambert *et al.*, 2003), des oxydes nitriques synthétases (NOS) (Nakayama & Maruyama, 1998), des lectines (Olafsen *et al.*, 1992), des protéines de stress ou Hsp (Gourdon *et al.*, 2000; Hamdoun *et al.*, 2003; Boutet *et al.*, 2003), des protéases et inhibiteurs de protéases (Faisal *et al.*, 1998) ainsi qu'une activité phénoloxydase dominante dans la partie acellulaire de l'hémolymphe (Luna-González *et al.*, 2003; Hellio *et al.*, 2007; Thomas-Guyon *et al.*, 2009).

Plusieurs travaux portent également sur la détection et la caractérisation de peptides antimicrobiens produits et employés comme moyens de défense chez *C. gigas*. Les travaux ayant abouti à la caractérisation de peptides antibactériens chez *C. gigas* ont été réalisés par des techniques moléculaires d'hybridation suppressive soustractive (SSH), par séquençage et analyse d'« Expressed Sequence Tags » (ESTs). Ces analyses ont été réalisées par recherche d'homologies, par comparaison avec les bases de données établies à partir des bibliothèques d'ESTs, réalisées sur les hémocytes de *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2003). Depuis 2006, grâce à cette banque d'ESTs (<http://www.ifremer.fr/GigaBase>), plusieurs défensines, Cg-Def et deux isoformes Cg-Defh-1 et Cg-Defh-2 ainsi qu'un peptide riche en proline Cg-Prp ont pu être identifiés chez *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2006b; Gonzalez *et al.*, 2007; Gueguen *et al.*, 2009). Par ailleurs, des études structuro-fonctionnelles à l'aide de variants synthétiques ont montré que les peptides Cg-Prp₂₂₋₃₆ et Cg-Prp₂₆₋₃₆ identifiés chez *C. gigas*, agissent en synergie avec ses défensines (Gueguen *et al.*, 2009).

Aucun peptide antimicrobien actif n'a pu être isolé chez l'huître *C. gigas* par une approche biochimique contrairement aux moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis* ou à l'huître *C. virginica*. La raison pour laquelle aucun peptide antimicrobien n'a été identifié chez *C. gigas* pourrait reposer sur le fait que *C. gigas* produit des molécules différentes de celles caractérisées chez les moules (Bachère *et al.*, 2004). Ces premiers résultats incitent à poursuivre la purification des molécules responsables de l'activité décelée dans l'hémolymphe de *C. gigas*.

Les études concernant *L. littorea* sont principalement ciblées sur l'écologie de l'espèce (Van den Broeck *et al.*, 2009) et les facteurs environnementaux influençant sa morphologie et son comportement (Van den Broeck *et al.*, 2007). Des études ont toutefois rapporté l'activité de protéines kinases à activité mitogène (MAPK) dans les hémocytes de *L. littorea* en réponse à des stimulations par des lipopolysaccharides d'*E. coli*, des mannanes de *Saccharomyces cerevisiae*, ou après un traitement par l'ester phorbol (Iakovleva *et al.*, 2006). Les différences de réaction cellulaire suscitées par ces *stimuli* suggèrent la capacité de discrimination des hémocytes à provoquer une réponse spécifique. Bien que ce type de réponse immunitaire ait pu être mis en évidence chez *L. littorea*, aucun peptide antimicrobien n'a été identifié chez cette espèce à ce jour. Là encore, nos travaux peuvent donc suggérer la présence de molécules de défense chez cette espèce.

Généralement, les travaux portant sur la recherche d'activité antibactérienne chez les mollusques marins révèlent une plus forte sensibilité des bactéries à Gram⁺ que des bactéries à Gram⁻ (Tadesse *et al.*, 2008). Néanmoins, dans cette étude, les fractions-SPE testées sont également efficaces envers des bactéries à Gram⁻. Dans la mesure où des activités ont été démontrées, considérant la nature amphiphile des composés antimicrobiens décelés dans les fractions-SPE et confrontés au caractère ubiquitaire des peptides antimicrobiens, nous émettons l'hypothèse de la nature peptidique des composés actifs. Cette hypothèse sera étudiée dans le chapitre 2.

En conclusion de ce premier chapitre, des activités antimicrobiennes ont pu être révélées pour chaque espèce étudiée. En observant les activités antibactériennes et antivirales, les résultats obtenus pour les bivalve *C. edule* et *C. gigas* et pour le gastéropode *L. littorea* démontrent l'intérêt de poursuivre la caractérisation et la purification des composés actifs extraits chez ces 3 espèces de mollusques marins. La poursuite de caractérisation partielle des substances actives provenant des fractions-SPE 40% de ces 3 espèces et de l'hémolymphe de *C. gigas* fera l'objet du chapitre 2.

Chapitre II

**Caractérisation partielle des composés
actifs antimicrobiens détectés chez les
mollusques marins *Cerastoderma edule*,
Littorina littorea et *Crassostrea gigas***

9 Introduction

Le criblage d'activité antimicrobienne mené sur des extraits de mollusques marins d'intérêt économique dans le chapitre précédent, a permis de déceler dans chaque espèce étudiée une activité antibactérienne et/ou antivirale. Trois fractions-SPE 40% provenant des extraits des bivalves *C. gigas* et *C. edule* et du gastéropode *L. littorea* se sont distinguées. En effet, l'activité antibactérienne détectée dans la fraction-SPE 40% de l'hémolymphe de *C. gigas* présente les plus faibles CMI, tandis que celle détectée dans la fraction-SPE 40% de *C. edule* démontre le plus large spectre d'activité avec des CMI dont la majorité est inférieure à $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La fraction-SPE 40% de l'extrait de *L. littorea* est notablement moins active que les 2 précédentes. Néanmoins, cette fraction est la plus efficace des fractions-SPE provenant de gastéropodes. Par ailleurs, elle demeure la fraction-SPE 40% possédant la plus forte activité antivirale (CE_{50} et de $11,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et CC_{50} de $1115,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), outre l'activité antivirale mesurée dans l'hémolymphe de *C. gigas* et sa fraction non retenue.

Ces travaux ont été conduits dans une approche globale reposant sur la distinction d'espèces de mollusques marins présentant un intérêt potentiel dans l'identification de peptides antimicrobiens. La démarche était de réaliser un criblage d'activité préliminaire sur des mollusques marins d'intérêt aquacole et d'identifier des espèces prometteuses.

Ainsi ce chapitre s'emploie à définir la nature biochimique des composés amphiphiles responsables des activités antibactériennes détectées dans les fractions-SPE 40% provenant de *C. gigas*, *C. edule* et *L. littorea*, ainsi qu'évaluer la masse moléculaire de ces composés et approcher leurs modes d'action. Enfin, l'intérêt de ce chapitre est de définir la ou les espèces les plus intéressantes pour poursuivre la purification et la caractérisation des substances actives.

Tableau 19 : CMI obtenues après traitements enzymatiques des fractions-SPE 40% provenant des espèces *C. edule*, *C. gigas* et *L. littorea*. La souche cible utilisée est *M. luteus*.

	fraction-SPE 40% <i>C. edule</i>	fraction-SPE 40% <i>L. littorea</i>	fraction-SPE 40% <i>C. gigas</i>
Dans les mêmes conditions			
de traitement	150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	445 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Après dégradation par la :			
trypsine	> 3000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	> 3500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	> 630 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
α-chymotrypsine	> 3000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	> 3500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	630 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

10 Résultats :

Caractérisation partielle des fractions-SPE 40% des extraits de *C. edule*, *C. gigas* et *L. littorea*

10.1 Nature biochimique des composés actifs

Traitement par des endoprotéases

Pour appréhender la nature biochimique des composés antibactériens détectés dans le chapitre précédent, les fractions-SPE 40% des espèces *C. edule*, *C. gigas* et *L. littorea*, ont été soumises à des digestions enzymatiques par des endoprotéases : la trypsine (coupure après les acides aminés basiques) et l' α -chymotrypsine (coupure après les acides aminés aromatiques) conditionnées dans du tampon phosphate 50 mM à pH 8.

Après 1 h d'incubation à 37°C en présence de ces enzymes (rapport enzyme/substrat ; 1/50 (v/v)), l'activité des fractions-SPE 40% de *C. edule*, *C. gigas* et *L. littorea* a été testée par détermination de la CMI sur la bactérie cible *M. luteus*. Des témoins positifs (fractions-SPE 40% incubées 1 h à 37°C) et négatifs (enzymes incubées 1 h à 37°C dans du tampon phosphate 50 mM à pH 8) ont été réalisés en parallèle. Le Tableau 19 présente les résultats des CMI obtenues après ces digestions enzymatiques.

Les résultats montrent que le traitement par la trypsine se traduit par une perte totale de l'activité antibactérienne pour ces 3 fractions-SPE 40%. Un résultat similaire a été obtenu par le traitement à l' α -chymotrypsine pour les fractions-SPE 40% provenant des extraits de *C. edule* et *L. littorea*. On note une activité antibactérienne résiduelle, détectée dans la fraction-SPE 40% provenant de l'hémolymphe de *C. gigas*. En effet, l'incubation en présence de chymotrypsine pendant 1 h se traduit par une augmentation de la CMI d'un facteur de 31,5.

Ces pertes importantes d'activité suite à un traitement par des endoprotéases indiquent que les composés responsables de l'activité antibactérienne des fractions-SPE 40% de *C. edule*, *C. gigas* et *L. littorea* sont au moins en partie de nature protéique.

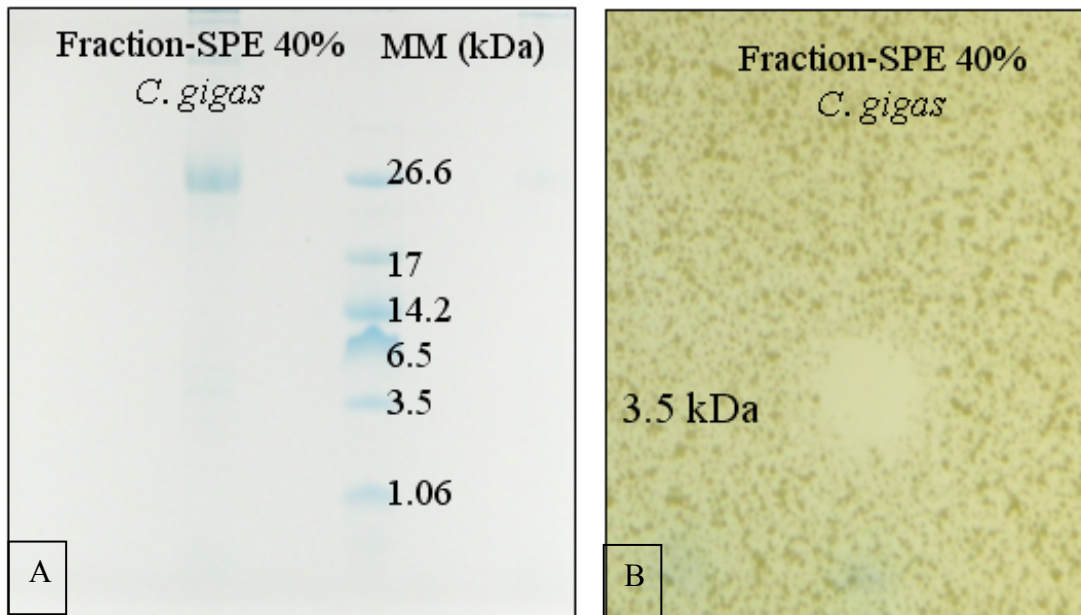


Figure 22 : Analyse par SDS-PAGE de la fraction-SPE 40% de l'hémolymph de *C. gigas* (A) et détection d'activité par la méthode des gels recouvertsensemencés à 1.10^4 UFC/mL avec *M. luteus* (B). MM : marqueurs moléculaires.

10.2 Evaluation de la masse moléculaire

L'évaluation de la masse moléculaire des composés antibactériens présents dans les fractions-SPE 40% des extraits de *C. edule*, *C. gigas* et *L. littorea* a été réalisée par SDS-PAGE combinée à une méthode de détection d'activité dite de « gels recouverts ». Après migration électrophorétique et rinçages à l'eau stérile (pour éliminer le SDS), les gels SDS-PAGE ont été recouverts par un milieu demi-gélosé (7,5 g d'agar/L)ensemencé par la souche cible *M. luteus*.

Concernant les fractions-SPE 40% de *C. gigas* (Figure 22 A et B), *C. edule* et *L. littorea* une zone d'inhibition de croissance de la bactérie cible *M. luteus* est observée pour une distance de migration correspondante à environ 3,5 kDa, bien qu'aucune bande n'ait pu être visualisée par coloration au bleu de Coomassie dans la zone de migration pour *C. edule* et *L. littorea* (résultats non présentés).

Ces résultats permettent d'évaluer à environ 3,5 kDa les masses moléculaires des composés actifs présents dans les fractions-SPE 40% de l'hémolymphe de *C. gigas* et des extraits de *C. edule* et *L. littorea*.

10.3 Approche du mode d'action

10.3.1 Détermination de la cinétique d'inhibition de croissance

Afin de mettre en évidence une approche du mode d'action des composés antibactériens détectés dans les fractions-SPE 40% des extraits des espèces *C. edule* et *L. littorea*, des cinétiques d'inhibition de croissance ont été réalisées sur les bactéries les plus sensibles, respectivement *Y. ruckeri* et *M. luteus*. Les Figures 23 et 24 présentent les résultats de la perte de viabilité.

Pour la fraction-SPE 40% provenant de *C. edule*, à une concentration équivalente de 10 CMI (750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), une réduction de la viabilité de *Y. ruckeri* est observée à partir de 3 h de culture. Entre la 3^{ème} et 8^{ème} heure, la viabilité des cellules bactériennes diminue progressivement jusqu'à une perte finale de 2 Log (UFC/mL) (Figure 23).

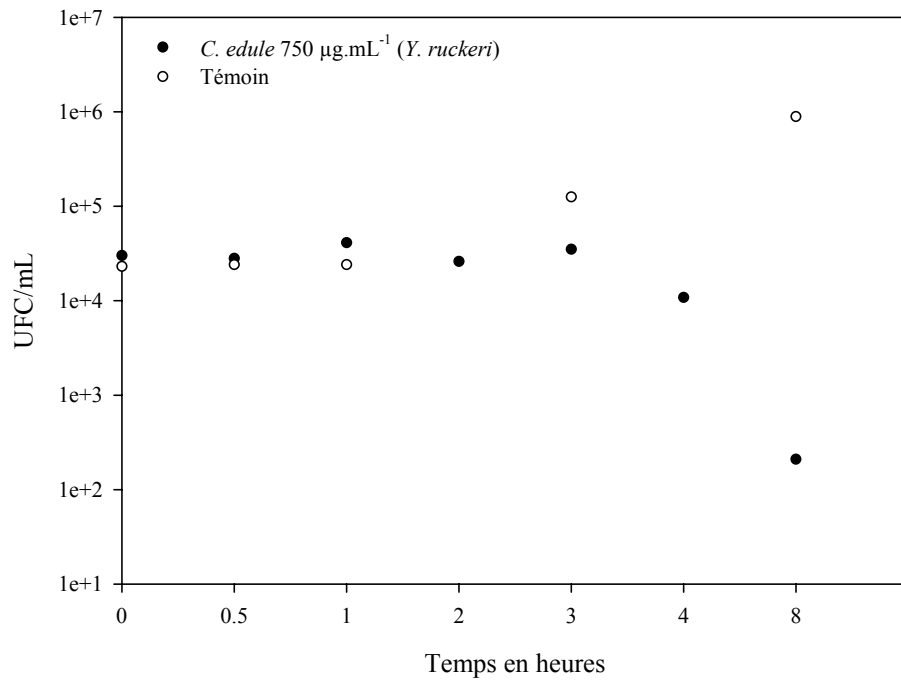


Figure 23 : Cinétique d'inhibition de *Y. ruckeri* par la fraction-SPE 40% de *C. edule* à une concentration équivalente à 10 CMI (750 µg.mL⁻¹).

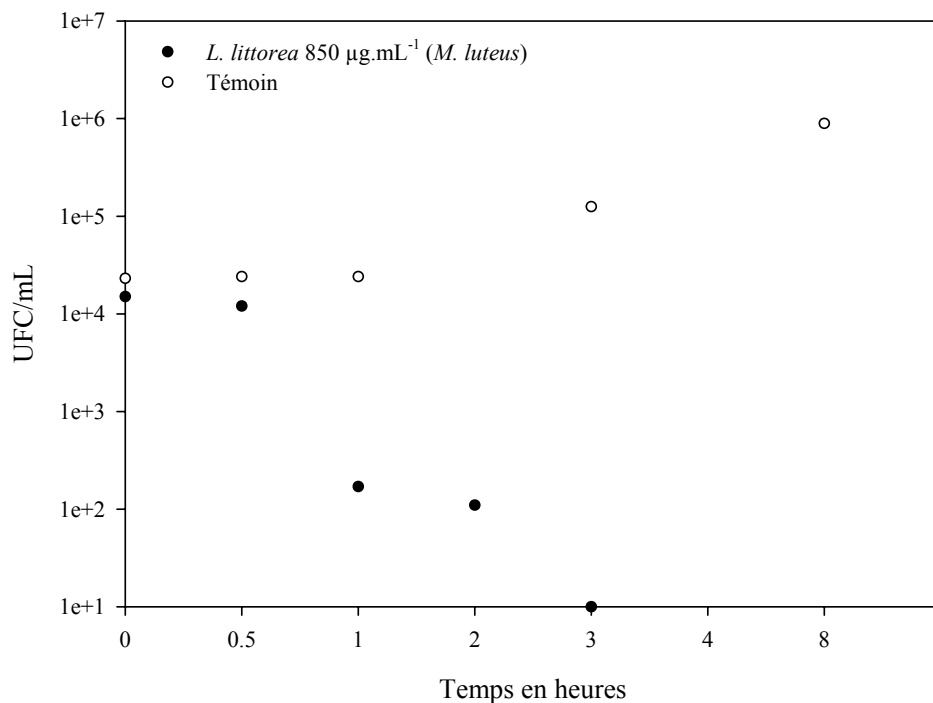


Figure 24 : Cinétique d'inhibition de *M. luteus* par la fraction-SPE 40% de *L. littorea* à une concentration équivalente à 2 CMI (890 µg.mL⁻¹).

Concernant la fraction-SPE 40% de l'extrait de *L. littorea*, une perte de viabilité de *M. luteus* est observée après 30 minutes d'incubation en présence d'une concentration équivalente de 2 CMI ($890 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Au-delà de cette période, la viabilité bactérienne décroît régulièrement jusqu'à la 3^{ème} heure. Aucune survie n'est observée après 3 h d'incubation (Figure 24). Ces résultats indiquent que les fractions-SPE 40% antibactériennes des extraits de *C. edule* et *L. littorea* agissent par un effet bactéricide. Cet effet est plus rapidement mis en place par la fraction-SPE 40% de *L. littorea*, il est plus efficace, dans la mesure où la concentration inhibitrice appliquée est équivalente à 2 CMI.

10.3.2 Détermination de la Concentration Minimale Létale (CML)

La détermination de la CML, en complément de la CMI, a été réalisée pour étudier l'action inhibitrice (bactéricide ou bactériostatique) de la fraction-SPE 40% de l'hémolymphe de *C. gigas* envers *M. luteus*. Après 2 h d'incubation de *M. luteus* en présence d'une dilution de la fraction-SPE 40% correspondant à 8 fois la CMI ($160 \mu\text{g.mL}^{-1}$), aucune croissance bactérienne n'a été observée. Ces résultats indiquent un effet bactéricide des substances antibactériennes présentes dans la fraction-SPE 40% de *C. gigas*.

11 Discussion

La méthode de séparation par extraction sur phase solide (SPE) permet de séparer des composés en fonction de leur caractère hydrophobe. Dans la mesure où des activités antibactériennes ont été révélées dans les fractions-SPE 40% et 80% des extraits de *C. edule*, et *L. littorea* ainsi que dans celle de l'hémolymphe de *C. gigas*, cela suggère que plusieurs facteurs puissent en être responsables.

Au cours du chapitre 1 nous avons souligné le caractère amphiphile des composés responsables des activités antimicrobiennes et la mesure de ces activités a été établie sur leurs concentrations en protéines totales. De plus, les fractions-SPE 40% des extraits de *C. edule*, et *L. littorea* et de l'hémolymphe de *C. gigas* se sont distinguées par leur activité. Nous nous sommes donc attachés au cours de ce chapitre à déterminer la nature biochimique des composés responsables des activités antibactériennes de ces fractions et à définir leur type d'activité sur les bactéries cibles.

L'action d'endoprotéases a mis en évidence une perte d'activité antibactérienne significative des fractions-SPE 40% de *C. edule*, *C. gigas* et *L. littorea* envers *M. luteus*. Cette perte d'activité antibactérienne provoquée par des enzymes protéolytiques indique que les composés actifs sont en grande partie de nature protéique (Haug *et al.*, 2002a).

Par ailleurs, la perte d'activité totale observée avec la trypsine, indique la présence de résidus basiques tels que l'arginine et la lysine. Ces résidus sont fréquemment rencontrés dans la séquence des peptides antimicrobiens dont la charge globale moyenne aux pH physiologiques est de +3,82 (AMP database ; <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

L'évaluation de la masse moléculaire de composés de nature protéique par migration électrophorétique et coloration des gels SDS PAGE au bleu de Coomassie, est une méthode fréquemment employée dans l'évaluation de la masse moléculaire de composés antibactériens (Schnapp *et al.*, 1996). Complétée par un recouvrement des gels SDS-PAGE avec un milieu demi-gélosé (7,5 g d'agar/L)ensemencé par une bactérie cible, cette méthode est largement utilisée pour la mise en évidence d'activité antibactérienne des bandes protéiques révélées (Pinto *et al.*, 2009). Bien qu'il existe des techniques plus précises pour déterminer la masse moléculaire de composés, la technique de SDS-PAGE apporte des informations sur la présence de peptides. La technique des gels recouverts en complément reste la plus adaptée pour vérifier l'activité biologique (Moreno *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2009).

De la sorte, cette méthode nous a permis de révéler dans les fractions-SPE 40% provenant de *C. edule*, *C. gigas* et *L. littorea* une activité antibactérienne dans une zone de migration voisine de 3,5 kDa. Les peptides antimicrobiens présentent conventionnellement une masse comprise entre 1 et 5 kDa (Wang & Wang, 2004). La base de donnée Antimicrobial Peptide Database, regroupe 1459 peptides « matures et actifs » dont la longueur moyenne est de 29,88 résidus acides aminés (<http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic.php>), équivalant à une masse moléculaire de 3,5 kDa. Par ailleurs, chez les mollusques marins, la masse moléculaire des défensines caractérisées chez les moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis* est comprise entre 3,7 kDa et 4,5 kDa (Charlet *et al.*, 1996; Hubert *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 1999b; Mitta *et al.*, 2000b) et celles caractérisées chez les huîtres *C. virginica* et *C. gigas* ont une masse moléculaire comprise entre 4,2 kDa et 4,8 kDa (Seo *et al.*, 2005; Gueguen *et al.*, 2006b; Gonzalez *et al.*, 2007).

Pour résumer, les travaux présentés dans ce chapitre ont montré que les composés responsables des activités antibactériennes sont amphiphiles, de nature protéique au moins pour partie, ils contiennent 1 ou plusieurs résidus arginine ou lysine et leur masse moléculaire est proche de 3,5 kDa. Ils présentent donc les caractéristiques structurales générales communes des peptides antimicrobiens. Etant donné le caractère ubiquitaire des peptides antimicrobiens et le fait qu'ils sont considérés comme l'un des principaux effecteurs du système immunitaire inné des mollusques marins, tous les éléments convergent pour désigner des peptides antimicrobiens comme responsables des activités détectées dans les 3 fractions-SPE 40% provenant de *C. edule*, *L. littorea* et *C. gigas*.

Les cinétiques d'inhibition de croissance ont montré une perte de viabilité des cellules cibles après respectivement 3 h et 30 min d'incubation en présence des fractions-SPE 40% de *C. edule* et *L. littorea* à des concentrations équivalentes à 10 et 2 fois les CMI. Ces résultats indiquent un effet bactéricide. De la même manière, un effet bactéricide pour une concentration correspondant à 8 fois sa CMI a été observé pour la fraction-SPE 40% provenant de *C. gigas*.

Les peptides antibactériens d'origine marine sont connus pour présenter un mécanisme bactéricide. En effet, les travaux de Mitta *et al.* (1999 et 2000) ont mis évidence un effet bactéricide sur *M. luteus* au-delà de 6 h pour la mytiline G1 (Mitta *et al.*, 2000b) et à plus de 2 h pour la myticine A et mytiline B (Mitta *et al.*, 1999a; Mitta *et al.*, 2000b) pour des concentrations équivalentes à 10 fois la CMI de ces composés.

Bien que les fractions-SPE obtenues ne contiennent pas de produits purs, les activités apparaissent liées à des peptides antimicrobiens. Bien que seuls les composés hydrosolubles aient été testés pour leur activité biologique, nous ne pouvons écarter l'hypothèse que les extraits (obtenus avec de l'ACN) puissent contenir des pigments ou autres composés lipophiles non solubles dans l'eau, pouvant présenter une activité antibactérienne.

Par ailleurs, pour l'espèce *C. gigas*, la détection d'activité antimicrobienne a été réalisée à partir de l'hémolymphe et non d'un extrait acide d'organisme. Nous avons donc choisi de poursuivre la purification de la fraction-SPE 40% antibactérienne et de la fraction-SPE non retenue antivirale de *C. gigas*. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre III

**Purification et caractérisation de composés
antimicrobiens chez l'huître creuse
*Crassostrea gigas***

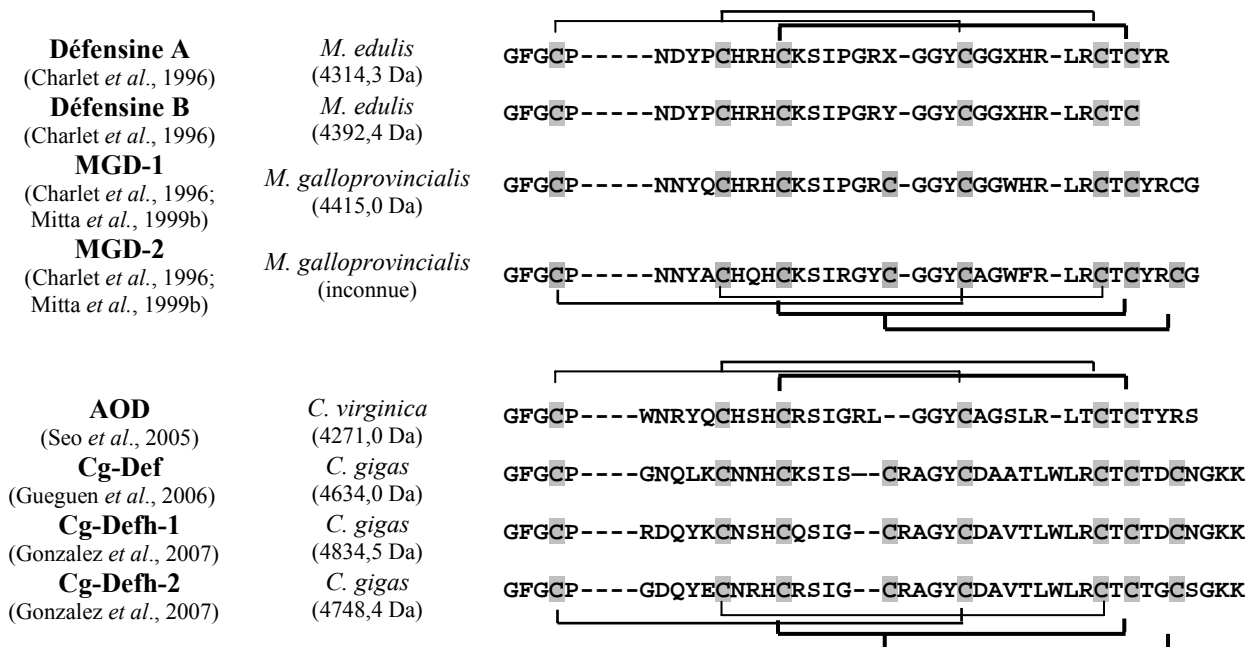


Figure 25 : Alignements de séquences des défensines isolées chez les moules *M. edulis* (défensines A et B) (Charlet *et al.*, 1996) et *M. galloprovincialis* (MGD-1 et MGD-2) (Charlet *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 1999b) et chez les huîtres *C. gigas* (Cg-Def, Cg-Defh1 et Cg-Defh2) (Gonzalez *et al.*, 2007) et *C. Virginica* (AOD) (Seo *et al.*, 2005).

□ : Pont disulfure entre 2 résidus cystéine.

12 Introduction

L'huître creuse *C. gigas* est l'espèce de bivalve aquacole la plus répandue à travers le monde. De par son importance économique et en raison des différents types d'infections pathogènes rencontrées chez cette espèce en aquaculture, elle est devenue un modèle d'étude pour la compréhension des mécanismes de défense des bivalves. En effet, de nombreuses études ont été réalisées sur la mise en évidence des mécanismes de défense chez *C. gigas*, tant au niveau cellulaire qu'humorale (Olafsen *et al.*, 1992; Faisal *et al.*, 1998; Nakayama & Maruyama, 1998; Xue & Renault, 2000; Lacoste *et al.*, 2002b; Lambert *et al.*, 2003; Terahara *et al.*, 2003; Boutet *et al.*, 2003; Thomas-Guyon *et al.*, 2009)

Plusieurs travaux portent également sur la détection et la caractérisation de peptides antimicrobiens chez *C. gigas*. Les seuls travaux de recherche ayant aboutis à la purification d'un peptide antibactérien, « l'American Oyster Defensin » (AOD) par des méthodes biochimiques classiques sont ceux de Seo *et al.* (2005) chez l'huître Américaine *C. virginica*. En effet, l'AOD a été purifiée par chromatographie RP-HPLC (C4), à partir d'un extrait de branchies. La structure de ce peptide a été déterminée par spectrométrie de masse (Seo *et al.*, 2005). Il est présenté dans la Figure 25. Parallèlement, les techniques de biologie moléculaire ont ouvert la voie de l'identification de peptides antimicrobiens chez *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2003; Gueguen *et al.*, 2006b; Gonzalez *et al.*, 2007; Gueguen *et al.*, 2009).

Bien que les infections virales soient à l'origine de mortalités massives de naissains d'huître en aquaculture, la recherche est essentiellement ciblée sur les peptides antibactériens. Toutefois, certains travaux suggèrent la présence de molécules antivirales de nature peptidique chez *C. gigas*.

Les travaux de Bachère *et al.* (1990) portant sur un extrait d'hémolymphe de *C. gigas* montrent des activités virucides sur des coliphages de type T3. Les travaux de Achour *et al.* (1997) mettent en évidence que des extraits de *C. gigas* provoquent une stimulation des activités enzymatiques intervenant dans les mécanismes de défense sur des individus sains et sur des individus infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

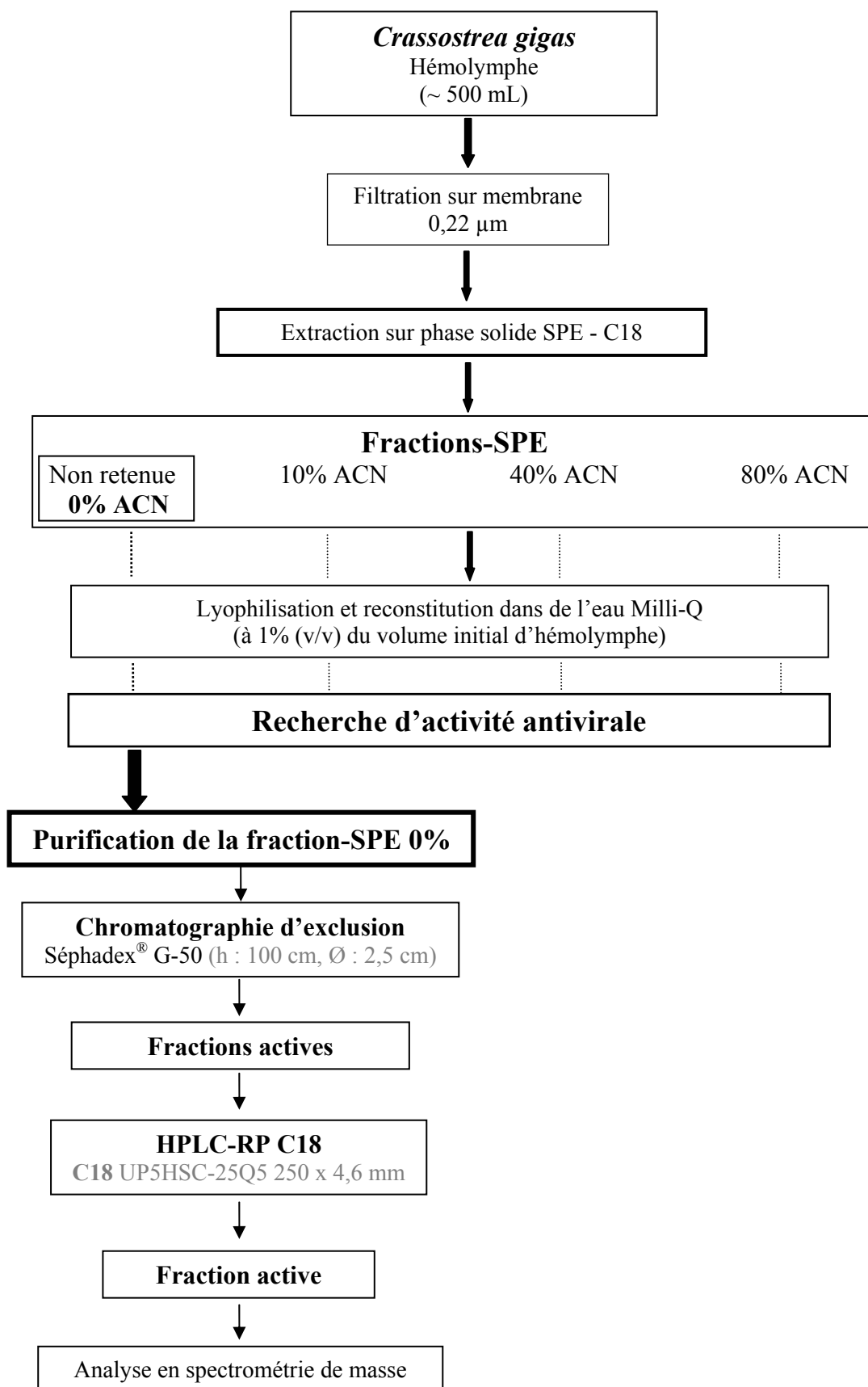


Figure 26 : Protocole de purification de composés à activité antivirale à partir de la fraction-SPE 0% l'hémolymphe de *C. gigas*.

Les travaux d'Olicard *et al.* (2004) ont fait également état d'une activité antivirale d'origine peptidique dans l'hémolymphe de *C. gigas*. A l'exception de ces travaux, la littérature scientifique ne mentionne pas l'existence de molécules spécifiques à *C. gigas* présentant des activités antivirales.

En s'inspirant de cette étude et compte tenu des résultats des chapitres précédents, nous avons tenté de réaliser par voie biochimique la purification chez *C. gigas*, des composés antibactériens de nature protéique responsables de l'activité antivirale (Figure 26) et de l'activité antibactérienne (Figure 27).

Le choix de purification de telles molécules s'est porté sur l'hémolymphe de *C. gigas* pour plusieurs raisons :

- C'est l'une des espèces les plus importantes produite en aquaculture et elle fait fréquemment l'objet de mortalités massives ;
- en 2005, au départ de ces travaux, aucune molécule antimicrobienne n'avait été caractérisée dans l'hémolymphe de *C. gigas* ;
- à l'issue du criblage d'activité, l'activité antibactérienne détectée par mg de protéines totales dans les fractions-SPE de *C. gigas* est celle détectée aux plus faibles CMI ;
- les peptides antibactériens sont produits par les cellules hémocytaires et exprimés de façon constitutive chez les huîtres (Hancock *et al.*, 2006).

Ces purifications ont été tentées à partir de la fraction-SPE non retenue (0%) et de la fraction-SPE 40%, ces dernières présentant respectivement les activités antivirales non cytotoxiques et antibactériennes les plus importantes.

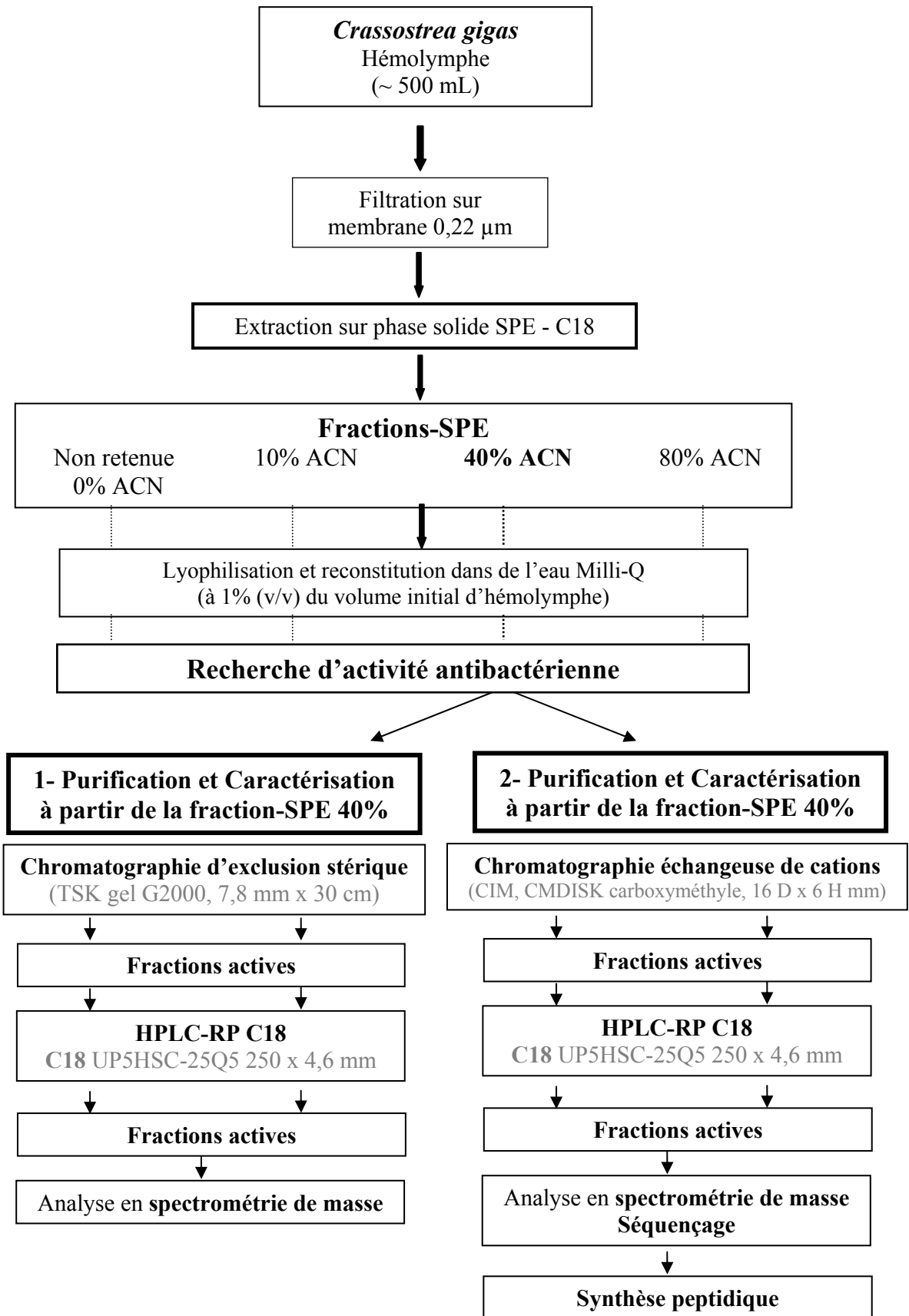


Figure 27 : Protocole de la purification des composés à activité antibactérienne dans la fraction-SPE 40% de l'hémolymphe de *C. gigas*.

13 Résultats

Avant d'entreprendre la purification de(s) composé(s) responsable(s) de l'activité antivirale, nous avons cherché à définir leur nature biochimique.

13.1 Détermination de la nature biochimique et purification des composés antiviraux détectés dans l'hémolymphe

13.1.1 Traitement par des endoprotéases

Afin de déterminer la nature biochimique de(s) composé(s) antiviral(aux) présent(s) dans l'hémolymphe, des digestions par des endoprotéases, telles que la trypsine (coupure après les acides aminés basiques), l' α -chymotrypsine (coupure après les acides aminés aromatiques) et la protéinase K (coupure des liaisons peptidiques du côté C-terminal des acides aminés aromatiques et hydrophobes) ont été réalisées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Détection d'activité antivirale après digestions enzymatiques par des endoprotéases.

	protection antivirale (%) vis-à-vis de VHS-1	cytotoxicité (%) vis-à-vis des cellules Vero
Hémolymphe	97,6 \pm 1,2	25,6 \pm 0,9
Traitements		
Hémolymphe	74,0 \pm 8,9	24,7 \pm 2,9
Hémolymphe + Trypsine	38,6 \pm 9,4	24,0 \pm 9,4
Hémolymphe + α -Chymotrypsine	15,6 \pm 3,5	25,6 \pm 2,3
Hémolymphe + Protéinase K	36,6 \pm 5,8	27,0 \pm 3,5

Les résultats révèlent tout d'abord une diminution pour le témoin réalisé avec l'hémolymphe traitée dans les mêmes conditions expérimentales en l'absence de protéases. Néanmoins, 74,0% de l'activité antivirale subsiste. En revanche, une perte significative de la protection vis-à-vis de VHS-1 pour les différents traitements enzymatiques est observée. En effet, une diminution importante de l'activité a été obtenue par le traitement avec l' α -chymotrypsine, puisque 15% de protection seulement subsistent.

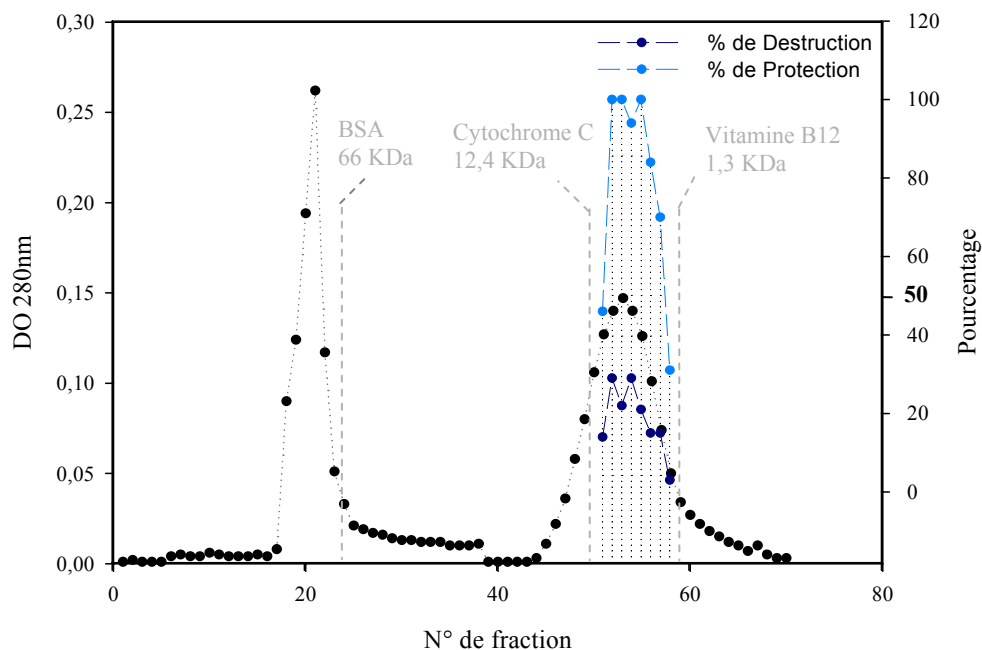


Figure 28 : Purification par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex® G50, h : 100cm, Ø : 2,5cm) de la fraction-SPE 0%. L'éluion est assurée par de l'acide acétique 1%, à un débit de 0,2 mL.min⁻¹ et 8 mL sont collectés par fraction. La densité optique à 280 nm (losange noir) et l'activité antivirale ont été déterminées dans chaque fraction.

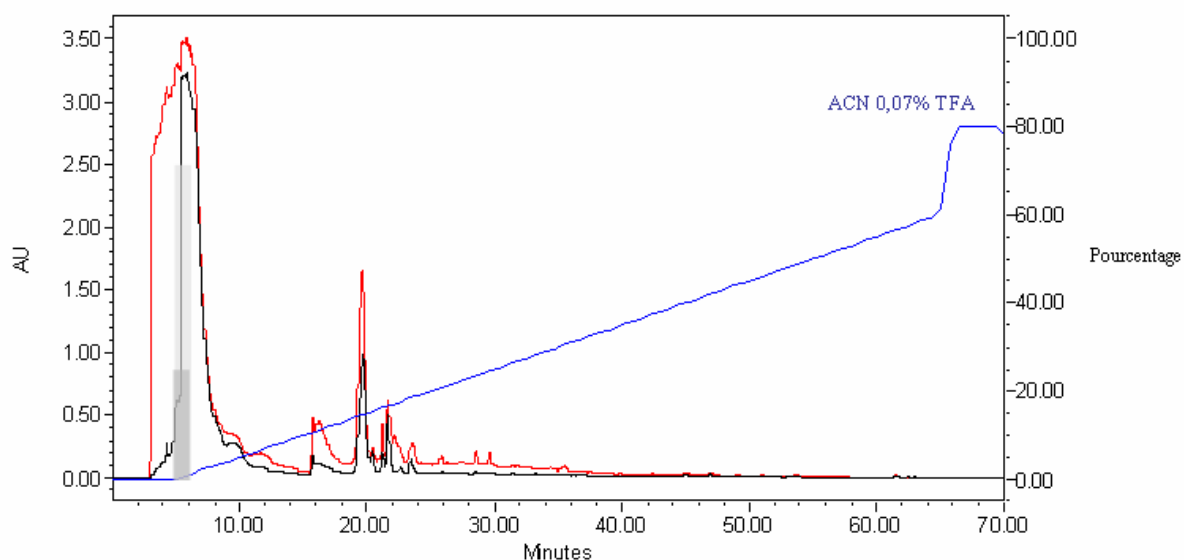


Figure 29 : Purification par RP-HPLC C18 (C18 UP5HSC-25Q5 250 x 4,6 mm) des fractions 52 à 56 rassemblées après chromatographie d'exclusion stérique. Les pourcentages d'activité antivirale et de cytotoxicité sont représentés respectivement en gris clair et foncé sur le chromatogramme.

Ces résultats indiquent que les composés présentant une activité antivirale dans l'hémolymphe sont au moins pour partie de nature protéique. En revanche les différents traitements enzymatiques se révèlent sans effet sur la cytotoxicité envers les cellules Vero.

13.1.2 Purification de la fraction non retenue par chromatographie d'exclusion stérique

Quatre mg de protéines de la fraction-SPE 0% ont été déposés sur une colonne de gel filtration semi préparative Sephadex[®] G50. Les fractions collectées, lyophilisées puis solubilisées dans 1 mL d'eau Milli-Q, ont été testées pour leur activité antivirale à l'aide du modèle VHS-1/cellules Vero. Le chromatogramme obtenu et l'activité antivirale détectée sont représentés dans la Figure 28. L'activité antivirale est retrouvée dans les fractions 52 à 57 pour des pourcentages de cytotoxicité variant de 15% à 29% et de protection cellulaire compris entre 70% et 100%. La masse moléculaire des composés actifs est donc comprise entre 12,4 kDa et 1,3 kDa (Figure 28).

13.1.2.1 Purification par chromatographie RP-HPLC C18

L'activité antivirale décelée dans les fractions numérotées de 52 à 56 est comprise entre 84 et 100% de protection cellulaire vis-à-vis du virus sans cytotoxicité significative. Ces fractions ont été injectées sur une colonne de chromatographie RP-HPLC C18 (UP5HSC-25Q5 250 x 4,6 mm). L'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient d'ACN-0,07% TFA à 2%.min⁻¹ et les fractions ont été collectées toutes les minutes. L'activité antivirale a été recherchée dans chaque fraction. Le chromatogramme obtenu et les fractions actives sont représentés dans la Figure 29. La seule fraction présentant une activité significative avec un pourcentage de protection cellulaire vis-à-vis du virus de 72%, (représenté en gris clair sur le chromatogramme) a été éluée à la 6^{ème} minute. La cytotoxicité est évaluée à 23% de destruction cellulaire (représenté en gris foncé). De la même façon qu'à l'étape de pré-purification, les composés responsables de l'activité antivirale ne sont pas retenus sur la colonne RP-HPLC C18.

L'analyse des composés présents dans la fraction éluée à la 6^{ème} minute a été effectuée en spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Bien que plusieurs essais aient été réalisés, aucun composé pur n'a pu être détecté en raison de la faible quantité de produit purifié, la présence d'importants bruits de fond et d'impuretés perturbant le signal (résultats non présentés).

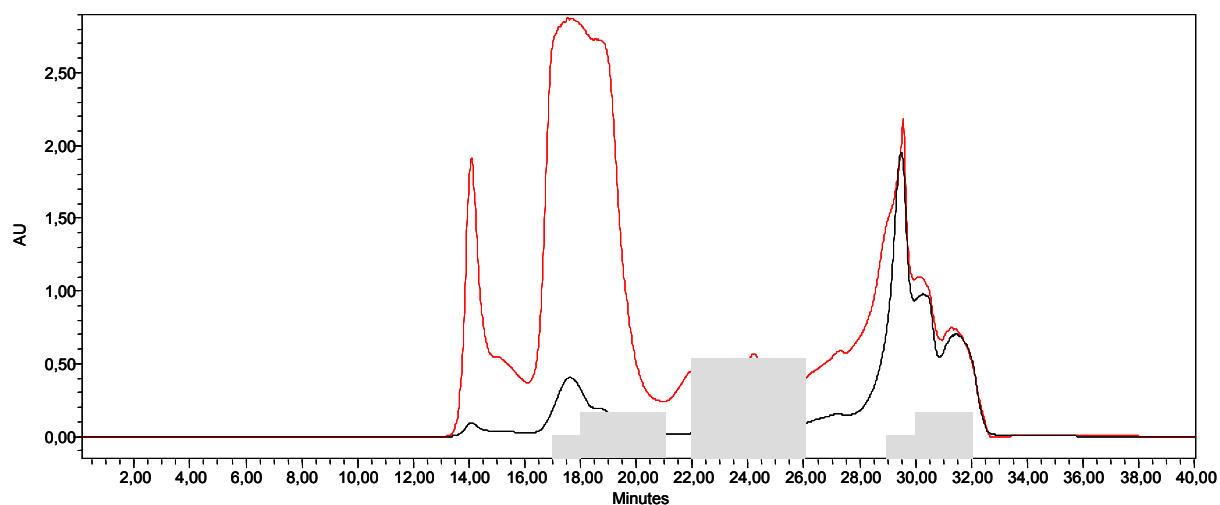


Figure 30 : Chromatogramme de la fraction-SPE 40% après élution par 45% ACN-0,1% TFA, débit à $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sur une colonne de gel filtration (TSK gel G2000 SWXL, 7,8 mm x 30 cm ; TSK gel SWXL Guardcolumn, 7,5 mm x 7,5 cm).

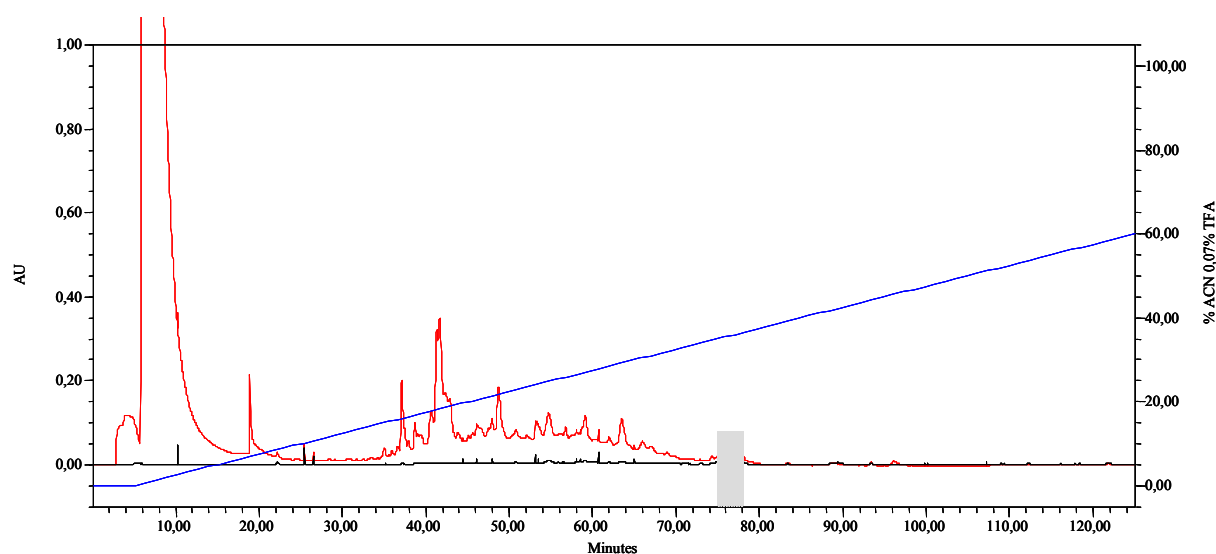


Figure 31 : Analyse par RP-HPLC (colonne C18, Interchim, UP5HSC-25QS 250 x 4,6 mm), des fractions 23 à 26 rassemblées, provenant de l'élution sur colonne de gel filtration TSK gel G2000 SWXL, par un gradient d'ACN-0,07% TFA à $0,5\%.\text{min}^{-1}$ pour un débit de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

13.2 Purification de l'activité antibactérienne à partir de la fraction-SPE 40%

La fraction-SPE 40% a été sélectionnée pour réaliser la purification de composés antibactériens. La souche cible sélectionnée, *M. luteus*, présente la CMI la plus faible. Deux stratégies de purification ont été conduites successivement.

13.2.1 Purification de la fraction-SPE 40%

13.2.1.1 1^{ère} stratégie de purification

Chromatographie d'exclusion stérique

La fraction-SPE 40% a été injectée sur une colonne d'exclusion stérique (SWXL G2000). Les fractions collectées toutes les minutes ont été lyophilisées puis solubilisées par 1 mL d'eau Milli-Q et enfin testées contre *M. luteus*. Les zones grisées sur le chromatogramme (Figure 30) représentent les fractions actives (l'intensité de l'activité est proportionnelle à la hauteur des histogrammes). Les fractions éluées entre 23 et 26 min correspondent aux fractions pour lesquelles un maximum d'activité antibactérienne a été observé.

Chromatographie RP-HPLC C18

Les fractions 23 à 26 ont été rassemblées en une seule fraction dans le but de poursuivre la purification par chromatographie RP-HPLC C18. L'activité anti-*Micrococcus luteus* est retrouvée dans les fractions 75, 76 et 77, éluées par environ 35% d'ACN (Figure 31). Ces 3 fractions ont été analysées en spectrométrie de masse.

Analyses en spectrométrie de masse

Les étapes d'analyse en spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS) ont été réalisées au Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines UMR 100 IFREMER, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, sous la direction des Drs. Joël Henry et Céline Zatylnyj-Gaudin (Université de Caen / Basse Normandie ; Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée).

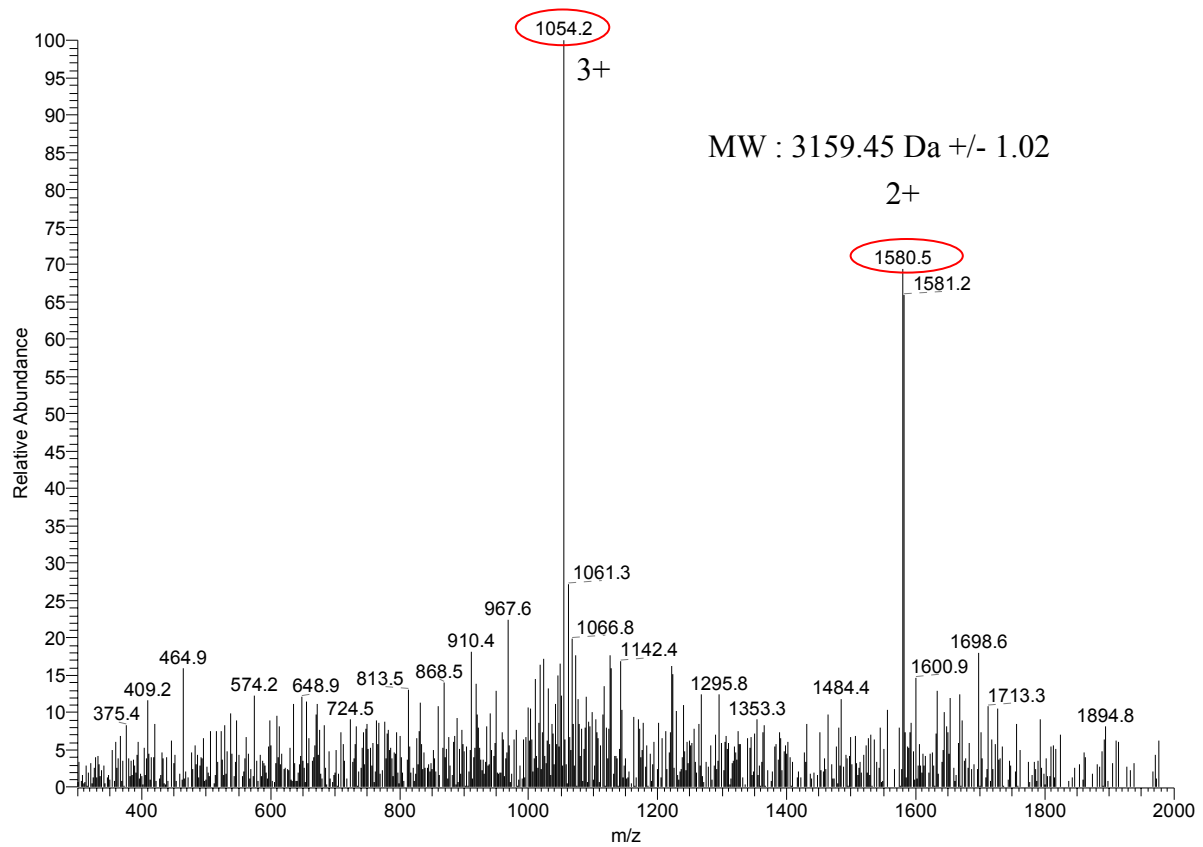


Figure 32 : Analyse par spectrométrie de masse de la fraction 76, issue de la purification de la fraction-SPE 40% par chromatographie d'exclusion stérique et RP-HPLC C18.

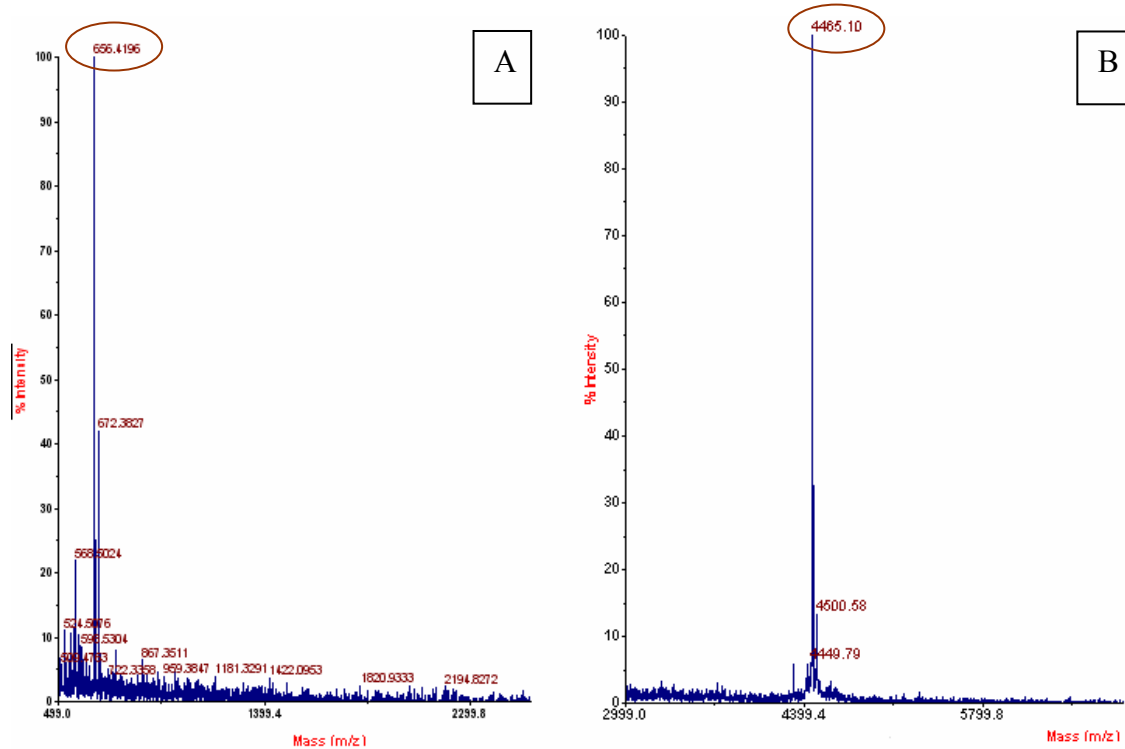


Figure 33 : Analyse par spectrométrie de masse des fractions actives en (A) et (B), provenant de 2 purifications à partir de 2 campagnes de prélèvements d'hémolymphe.

La Figure 32 représente le spectre de masse de la fraction 76. Seul le spectre de masse de cette fraction antibactérienne a permis de distinguer la présence d'un pic distinct. Le pic de m/z 1580,5 dont l'ion moléculaire apparaît de façon intense, a été analysé en zoomscan afin de préciser son état de charge. Les résultats ont montré qu'il s'agissait d'un ion dichargé ayant une masse moléculaire d'environ 3158 Da (Figure 32).

La reproductibilité de la purification a été testée selon le même protocole à partir de la fraction-SPE 40%. Deux peptides de masse m/z 656,42 et 4465,10 (Figure 33 A et B) ont été obtenus. Si l'activité antibactérienne détectée dans les 3 fractions concentrées d'hémolymphe de *C. gigas* est reproductible, en revanche les 3 tentatives de purification à partir des 3 campagnes de prélèvement d'hémolymphe ont abouti à 3 composés de masses moléculaires différentes. Ces résultats suggèrent la présence de différents composés antibactériens dans les 3 lots d'hémolymphe. Nous avons donc modifié le protocole de purification et débuté une 4^{ème} purification des composés antibactériens contenus dans la fraction-SPE 40% de l'hémolymphe de *C. gigas* à partir d'une nouvelle campagne de collecte d'hémolymphe.

13.2.1.2 2^{ème} stratégie de purification

Chromatographie échangeuse de cations

La fraction-SPE 40% a été injectée sur colonne échangeuse de cations selon le protocole établi dans la partie Matériels & Méthodes (e.g. paragraphe 4.3.3). L'élution est assurée par un gradient de pH. Après collecte, lyophilisation et reprise dans 1 mL d'eau Milli-Q, les fractions ont été testées contre *M. luteus*. L'activité a été retrouvée dans les fractions éluées entre 14,5 et 15,5 min (zone grisée sur le chromatogramme) (Figure 34).

Chromatographie RP-HPLC C18

Ces fractions rassemblées ont été injectées sur une colonne RP-HPLC C18. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient d'ACN-0,07% TFA. Après cette étape de purification, une activité vis-à-vis de *M. luteus* a été décelée dans les fractions éluées entre la 38^{ème} et 41^{ème} minute. L'activité maximale a été retrouvée dans la fraction élue à la 39^{ème} minute, correspondant à un pourcentage d'ACN-0,07% TFA de 36% (Figure 35). Afin de déterminer la structure des composés antibactériens, les fractions 38 à 41 ont été analysées en spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS).

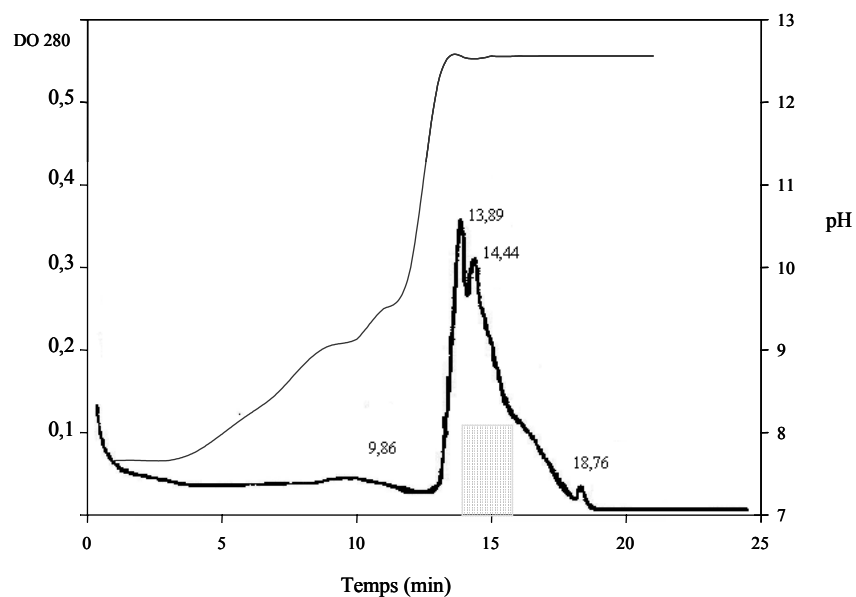


Figure 34 : Chromatogramme de la fraction-SPE 40% après élution par un gradient de pH sur colonne échangeuse de cations (CIM Disk monolithic column, 16 i.d. x 6 l. mm. Interchim). La zone grisée correspond aux fractions dans lesquelles l'activité a été retrouvée.

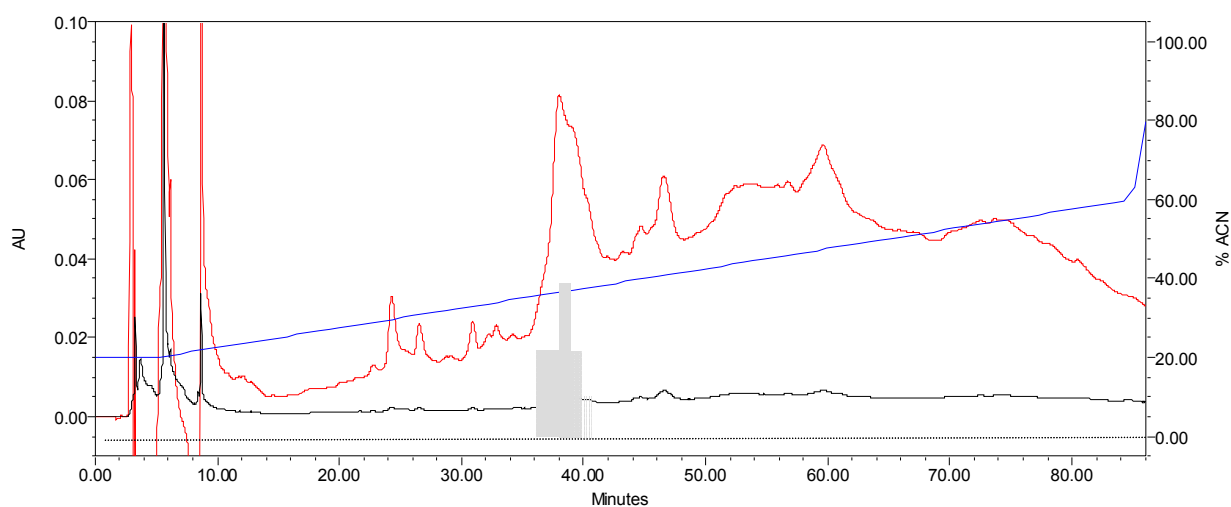


Figure 35 : Analyse par RP-HPLC (colonne C18, Interchim, UP5HSC-25QS 4,6 mm x 250 mm) des fractions 14,5-15-15,5 actives rassemblées provenant de la purification par chromatographie échangeuse de cations. La zone grisée correspond aux fractions dans lesquelles l'activité a été retrouvée.

Analyse en spectrométrie de masse

Les étapes d'analyse en spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS) ont été réalisées par la même équipe de l'Université de Caen.

Un composé pur a pu être détecté dans la fraction 38. La Figure 36 (A) représente le chromatogramme ionique total de cette fraction. L'analyse par spectrométrie de masse (MS/MS) a permis de définir la masse du composé à m/z 637,17 (Figure 36 (B)).

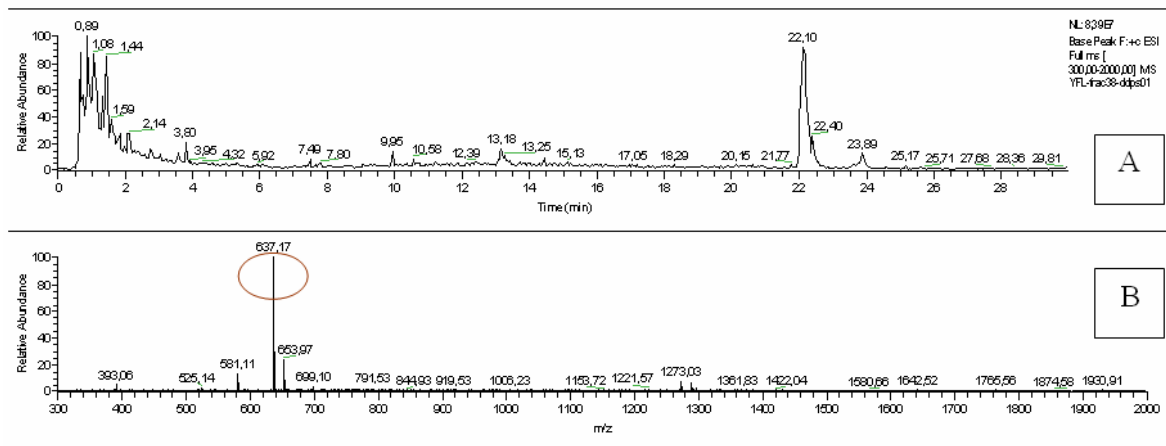


Figure 36 : (A) Chromatogramme ionique total de la fraction 38, issue de la séparation sur RP-HPLC des fractions actives après chromatographie échangeuse de cations - (B) Spectre de masse du pic chromatographique majoritaire de temps de rétention 22,10 min.

Séquençage

L'analyse par microséquencage du peptide de m/z 637,17 suivant la méthode de dégradation N-terminale d'Edman a été réalisée. Les résultats obtenus ont permis de définir l'heptapeptide suivant : $\text{NH}_2\text{-X-P-P-X-X-I-V-COOH}$

Une recherche des acides aminés exotiques non définis (X) par la méthode d'Edman et compatibles avec la masse obtenue a été élaborée à l'aide des logiciels Turboquest (ThermoFinnigan), AArand1, Aaseq 5.2 (Zanuttini et Henry <http://users.info.unicaen.fr/~zanutti/aaseq/> Université de Caen, France), et MS-product (Protein prospector 3.4.1, Université de Californie, <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhym/4.0/msprod.htm>).

Les résidus d'acides aminés identifiés représentent une masse de 424,53 Da. La masse des 3 résidus non identifiés correspond donc à 211,64 Da. Sur la base du caractère exotique de ces

résidus non identifiés par microséquençage, de leur masse moléculaire totale et de la séquence, nous avons cherché une combinaison permettant d'expliquer ces résultats.

Nous proposons d'attribuer les acides aminés exotiques à une déhydroalanine ($MM_{Dha} = 69,06$ Da) et une lanthionine ($MM_{2Ala} = 172,2$ Da). Cette hypothèse n'est recevable qu'en considérant que le pont thioéther entre les 2 Dha composant la lanthionine est rompu et le soufre éliminé au cours de l'ionisation. Une telle élimination en cours d'analyse en spectrométrie de masse a déjà été observée pour certains lantibiotiques (Smith *et al.*, 2000). Nous proposons donc dans la Figure 37 les structures suivantes pour le peptide purifié.

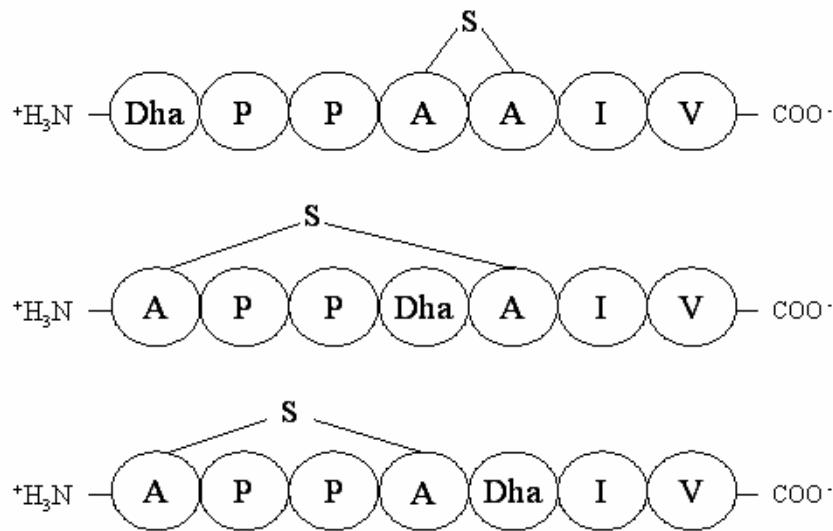


Figure 37 : Structures chimiques proposées pour le peptide putatif identifié à la masse de 636,17 Da.

Les ions fragmentés générés semblent correspondre à la structure proposée, bien que cette proposition reste hypothétique. Pour confirmer l'hypothèse émise concernant la structure du peptide purifié, nous avons entrepris la synthèse chimique de ce peptide.

Synthèse peptidique

Les synthèses peptidiques en phase solide du lantibiotique proposé ont été réalisées au Laboratoire Ciblage et Auto-assemblages Fonctionnels (UMR CNRS 6226 de l'Université de Rennes 1) par le Dr. Mathieu Laurencin sous la direction du Dr. Michèle Baudy-Floc'h.

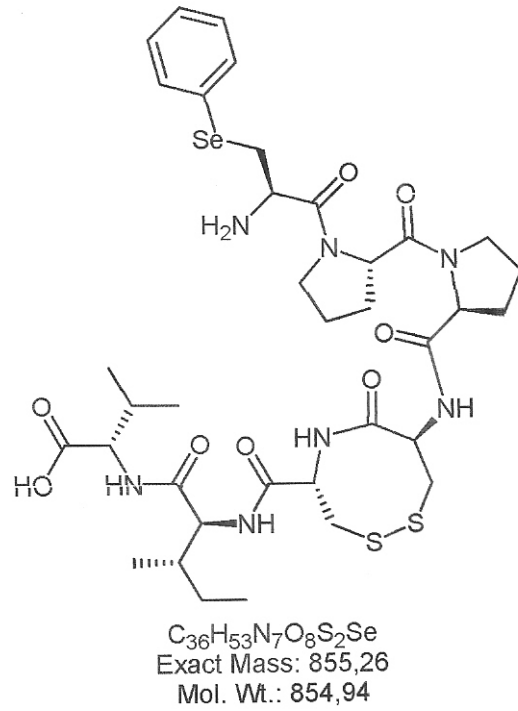


Figure 38 : Intermédiaire de synthèse 1.

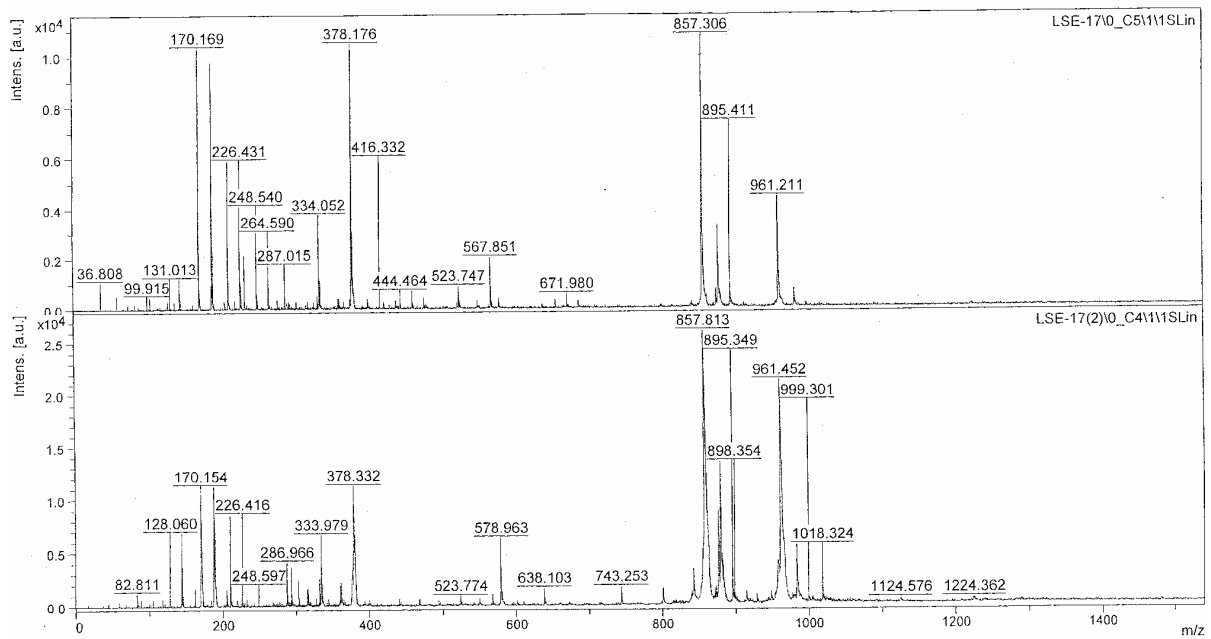


Figure 39 : Analyse en spectrométrie de masse de l'intermédiaire de synthèse 1.

La synthèse peptidique d'un antibiotique est complexe. La première stratégie adoptée a consisté à réaliser un peptide intermédiaire de synthèse comportant en N-terminale une phénylsélocystéine et 2 résidus cystéines en lieu et place de la lanthionine (Figure 38). Ces derniers seraient par la suite oxydés en lanthionine. Après synthèse et clivage, le peptide brut de synthèse, c'est-à-dire non purifié, a été analysé par spectrométrie de masse (Figure 39). Un ion moléculaire de masse m/z 857 a été détecté et pourrait correspondre au peptide attendu. L'activité antibactérienne du peptide brut de synthèse a été testée sur *Micrococcus luteus*. Une faible activité antibactérienne a été décelée (CMI de 1 mM).

Les 2 oxydations successives n'ont pas permis d'aboutir à des peptides majoritaires (Figure 39). La difficulté de synthèse du peptide réside en partie dans le fait que la déhydroalanine est un acide aminé chimiquement très réactif. Pour tenter de palier à cette difficulté, nous avons décidé de substituer la déhydroalanine par un résidu alanine. Ce résidu bien que moins réactif, présente une forte analogie structurale avec la déhydroalanine.

De cette manière, 3 peptides selon les séquences suivantes ont été envisagés et synthétisés :

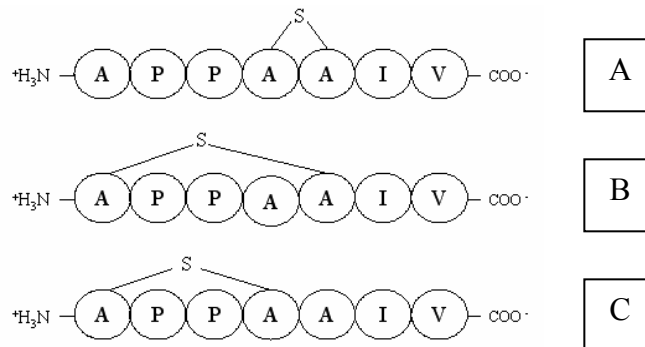


Figure 40 : Séquences peptidiques proposées pour les 3 peptides, avec substitution de la déhydroalanine par un résidu alanine.

Les 3 peptides bruts de synthèse (Figure 40) ont été testés sur *M. luteus*. Les peptides bruts A et B ont révélé une CMI supérieure à 5 mM et le 3^{ème}, le peptide C, une CMI de 1,25 mM envers *M. luteus*. Le peptide C a été purifié.

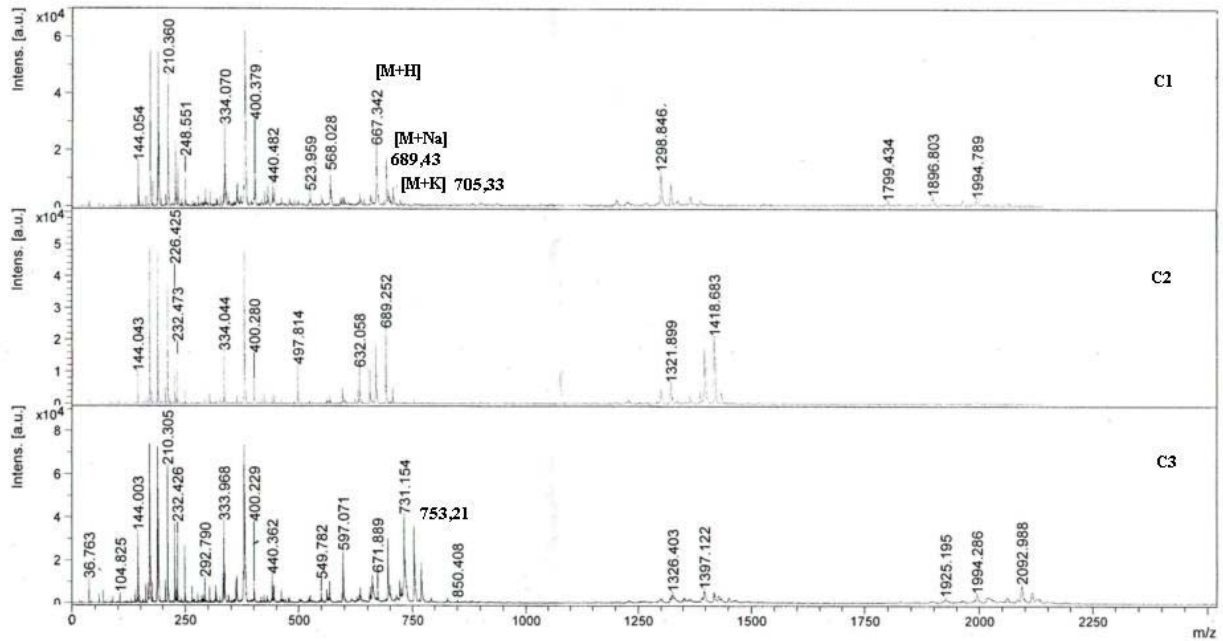


Figure 41 : Spectres de masse des pics chromatographiques majoritaires C1, C2 et C3.

Les pics élués à 18,47 ; 18, 87 et 19,92 min, respectivement nommés C1, C2 et C3 (Figure 41) ont été collectés et analysés par spectrométrie de masse. La masse moléculaire attendue pour le peptide C était de 667 Da. Cette valeur de masse a été détectée au cours de l'analyse du peptide C1. L'activité antibactérienne a été testée contre *M. luteus* et *Bacillus megaterium*. Les peptides de synthèse C1, C2 et C3 présentent une activité anti-*M. luteus* à 2,5 mM. Les peptides C2 et C3 présentent en plus une activité anti-*B. megaterium* à 2,5 mM.

14 Discussion

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à la purification à partir de l'hémolymphe de *C. gigas* de composés antiviraux et antibactériens. L'activité antivirale est directement évaluée dans l'hémolymphe filtrée de *C. gigas* alors que la détection d'activité antibactérienne nécessite une concentration sur colonne SPE-C18. Seul un faible retard de croissance est observé après 24 h d'incubation, suggérant que la concentration en composé(s) antibactérien(s) est trop faible pour inhiber la bactérie cible à 10^5 UFC/mL.

Activité antivirale

La présence d'activité antivirale dans les fractions-SPE 0% et 40% amène à penser que les composés actifs, pour partie de nature protéique, sont différents.

Le protocole employé pour tenter de purifier le(s) composé(s) antiviral(aux) de la fraction-SPE 0% est une combinaison de méthodes chromatographiques (exclusion stérique et RP-HPLC C18) classiques utilisées pour la purification de peptides antimicrobiens (Roch *et al.*, 1996). Les résultats obtenus par chromatographie d'exclusion stérique ont permis de mettre en évidence des fractions actives non cytotoxiques dont la masse molaire est comprise entre 1,3 et 12,4 kDa. Le profil d'élution à 280 nm et la zone de fractions pour lesquelles de l'activité a été retrouvée peuvent être comparés aux résultats obtenus dans les travaux de thèse d'Olicard à partir d'hémolymphe filtrée (0,22 μ m) et dialysée (Olicard, 2004). En effet, dans ces travaux, un profil chromatographique similaire a été obtenu à 280 nm après injection de l'hémolymphe filtrée et dialysée sur une colonne de gel filtration Superdex HR 10/30 (fractionnement des molécules de masse molaire comprise entre 100 et 7000 Da). De même, un pic élué dans une zone d'élution de composés de masse moléculaire comprise entre 3500 et 7000 Da s'était révélé actif sur le modèle VHS-1 dans les mêmes conditions expérimentales (MOI_{0,001} DI₅₀/mL)VHS-1/Cellules Vero sur 48 h.

Dans le cadre de nos travaux, la purification par chromatographie RP-HPLC C18 du groupe de fractions actives obtenues par chromatographie d'exclusion stérique a permis d'isoler une fraction faiblement retenue non cytotoxique présentant un pourcentage de 72% de protection cellulaire. Il apparaît alors que le(s) composé(s) antiviral(aux) est(sont) polaire(s). D'autre part, au cours de leurs travaux, Olicard *et al.* (2004) n'avaient pas retrouvé d'activité antivirale après injection de la fraction active obtenue par gel filtration sur colonne C18 ou C8.

La détermination de la masse moléculaire du composé antiviral n'a malheureusement pas abouti en spectrométrie de masse, que l'ionisation ait lieu en MALDI ou ESI. Aucun signal distinct n'a pu être isolé du bruit de fond, bien que la fraction analysée fut re-concentrée et solubilisée dans de l'eau ultra pure. L'échec de cette étape d'analyse réside dans la difficulté à purifier une quantité suffisante de peptide. Cette contrainte de quantité apparaît comme une des causes majeures de la complexité à caractériser des peptides antimicrobiens par des méthodes de purification biochimique chez les mollusques marins (Gueguen *et al.*, 2006b).

A ce jour, aucun peptide antiviral n'a été obtenu chez l'huître *C. gigas* par une approche moléculaire. En revanche, un analogue et un fragment synthétique (C10C) de la mytiline B, défensine isolée chez *M. galloprovincialis*, ont prouvé leur capacité à inhiber le virus « white spot syndrome virus » (WSSV) *in vitro* (pré-incubation du virus en présence des peptides, avant injection aux crevettes *Palaemon serratus*) à des valeurs de IC₅₀ respectivement de 5 µM et 45 µM. L'activité antivirale semble être principalement liée aux ponts formés par les cystéines, engendrant des contraintes structurales (β -hairpin-like) (Roch *et al.*, 2008). L'activité antivirale de la forme synthétique de la mytiline A a également été démontrée sur le modèle VHS-1 (MOI_{0,05})/cellules Vero (Carriel-Gomes *et al.*, 2007). Ces auteurs ont mis en évidence la capacité de la mytiline A, de part sa séquence riche en résidus cystéine, à rentrer en compétition avec les particules virales au niveau des sites d'attache sur la surface cellulaire.

Activité antibactérienne

En parallèle, 2 protocoles de purification de peptides antibactériens ont permis d'aboutir à l'identification de 4 composés antibactériens présents dans l'hémolymphe de *C. gigas*. Des éléments de séquence ont pu être collectés pour le 4^{ème} peptide purifié.

Un premier protocole proche de celui utilisé pour la purification de peptides antiviraux a permis de purifier 3 peptides antibactériens à partir de la fraction-SPE 40%. L'analyse par spectrométrie de masse de ces peptides purifiés par RP-HPLC C18 (élution à environ 35% d'ACN), a permis de leur attribuer des masses moléculaires de 4465,10 Da, 3158 Da et 656,42 Da. Selon les travaux de Seo *et al.* (2005), l'« American Oyster Defensin » (AOD) a été éluée en RP-HPLC C18 à un pourcentage d'ACN de 41%. Par ailleurs, les masses moléculaires des peptides identifiés dans notre étude rentrent dans la gamme des masses moléculaires (1 à 5 kDa) conventionnellement décrites pour les peptides antimicrobiens. En effet, toutes les défensines caractérisées chez les huîtres *C. gigas* et *C. virginica* présentent une masse moléculaire comprise entre 4 et 5 kDa.

Une ultime tentative de purification a été engagée selon un protocole, combinant chromatographie d'échange de cations et RP-HPLC C18. A l'issue de cette première étape, l'activité a été retrouvée dans des fractions éluées pour des valeurs de pH très basiques. De la même manière, les myticines A et B isolées chez *M. edulis* (pI de 8,74 et 9,1) (Mitta *et al.*, 1999a) et les MGD-1 et MGD-2 isolées chez *M. galloprovincialis* (pI de 9,12 et 8,92) (Mitta *et al.*, 1999b) ainsi que l'AOD de *C. virginica* (pI de 9,18) (Seo *et al.*, 2005) présentent des points isoélectriques basiques. Le caractère cationique est un élément de structure commun à la grande majorité des peptides antibactériens (AMP database ; <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Après purification par RP-HPLC C18, un composé d'une masse de 636,17 Da a été identifié dans la fraction 38. Le séquençage par la combinaison d'une dégradation N-Terminale d'Edman et d'analyses de spectres MS/MS a permis d'identifier un heptapeptide (m/z 637,17), de séquence X-P-P-X-X-I-V.

Ce peptide de seulement 7 résidus d'acides aminés apparaît original du fait de sa faible masse moléculaire. La majorité des peptides antimicrobiens identifiés chez les huîtres sont de type défensine et leur masse moléculaire est comprise entre 4 et 5 kDa. L'AOD chez *C. virginica* et les défensines Cg-Def, Cg-Defh-1 et -2 identifiées chez *C. gigas*, comportent une séquence comprise entre 38 et 43 résidus acides aminés et contiennent toutes 6 (AOD) à 8 (Cg-Def, Cg-Defh-1 et -2) résidus cystéines engagés respectivement dans 3 et 4 ponts disulfures. Le peptide Cg-Prp identifié chez *C. gigas* par analyse des banques d'ADNc est le seul dont la séquence de 37 acides aminés est riche en résidus proline (6) et ne contenant pas de cystéine. De la même manière, les peptides antimicrobiens identifiés chez les moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis* contiennent 6 à 12 résidus cystéine et des séquences de 31 à 40 acides aminés. Ainsi, aucune homologie de séquence n'a été observée entre le peptide caractérisé dans cette étude et les peptides antimicrobiens caractérisés chez ces bivalves. En outre, aucune homologie de séquence n'a été observée dans les banques de séquences (<http://www.ncbi.gov/Blast>).

Sur la base des éléments de séquence et de masse, nous avons formulé l'hypothèse que ce peptide pourrait être un lantibiotique. La présence d'un résidu non commun, la déhydroalanine, mais surtout la présence d'une lanthionine dans une séquence peptidique, définit la classe des lantibiotiques. Les lantibiotiques sont synthétisés par des bactéries à Gram⁺ par la voie ribosomale (Jack & Jung, 2000). Les résidus exotiques résultent de

modifications post-traductionnelles drastiques (Sahl *et al.*, 1995). Le plus célèbre d'entre eux est la nisine (Kuipers *et al.*, 1992; Klaenhammer, 1993; Kuipers *et al.*, 1993; Wiedemann *et al.*, 2001). Les lantibiotiques sont des peptides antibactériens de petite taille, dont la masse moléculaire est inférieure à 4 kDa. Leur spectre d'action est connu pour être étroit, uniquement dirigé contre les bactéries à Gram⁺ (Jack & Jung, 2000). Il semblerait que les résidus d'acides aminés déshydratés composant les lantibiotiques peuvent contribuer à exercer une activité antimicrobienne par leur capacité à réagir avec les groupements sulfhydryles des protéines de la paroi bactérienne (Wiedemann *et al.*, 2001). D'autre part, la conformation imposée par la présence de ponts thioéther semblerait avoir un rôle majeur dans la structure du peptide et ainsi apparaît jouer un rôle essentiel dans l'activité du peptide (Nagao *et al.*, 2006).

Si cette structure hypothétique semble être confirmée par l'analyse par fragmentation en spectrométrie MS/MS, il reste néanmoins quelques points non élucidés sur l'ensemble des résultats obtenus au cours des 4 tentatives de purification. Le 1^{er} point concerne la sensibilité à la trypsine et l' α -chymotrypsine, étant donné que la séquence proposée ne présente aucun site de coupure pour ces 2 protéases. L'explication pourrait résider dans le fait que ces traitements enzymatiques ont été appliqués uniquement sur la fraction-SPE 40% ayant conduit au peptide de 4464 Da et n'ont pas été renouvelés à chaque purification issue d'une nouvelle campagne de prélèvement. D'autre part, le point isoélectrique est évalué pour la structure proposée à 5,57 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>), alors que l'élution par la colonne échangeuse de cations a lieu à un pH largement supérieur.

Enfin, l'hypothèse formulée pour la structure du peptide a également une importante conséquence. En effet, dans la mesure où les lantibiotiques n'ont jusqu'à ce jour jamais été isolés à partir d'organismes eucaryotes, la présence d'un tel peptide dans l'hémolymphe d'huître suggère une origine bactérienne. La présence de bactéries dans le compartiment hémolympatique est un fait reconnu (Bachère *et al.*, 2004). On peut alors s'interroger sur le rôle de ces bactéries dans la défense de l'organisme hôte *C. gigas*. De plus, cette origine bactérienne permettrait d'expliquer les difficultés rencontrées pour reproduire la purification à partir de différentes campagnes de prélèvements.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons tenté de synthétiser par voie chimique le lantibiotique. Les synthèses du peptide ou d'analogues ont permis de révéler une faible activité antibactérienne de l'ordre du millimolaire dans les peptides synthétiques bruts ou

prépurifiés. Certains peptides de type lantibiotique comme la nisine et la mersacidine permettent d'obtenir des CMI inférieures à 0,05 μM envers *Micrococcus flavus* et inférieures à 1,5 μM envers *Lactococcus lactis* subsp. (Wiedemann *et al.*, 2006).

Si les résultats n'ont donc pas permis de confirmer l'hypothèse émise, il n'en reste pas moins que nous avons purifié et partiellement caractérisé un peptide antibactérien inédit et original du fait de sa courte séquence et jamais identifié chez un mollusque bivalve. Par ailleurs l'isolement de 4 composés différents au cours des 4 purifications, pose une interrogation sur l'origine de ces composés. En effet, L'association bivalves/bactéries commensales est souvent décrite dans la littérature (Bachère *et al.*, 2004). La production de substances de type « Bacteriocin-Like Inhibitory Substance » (BLIS) dans ce type d'association est également reconnue. L'hypothèse d'une origine bactérienne de ce peptide reste à être vérifiée. L'objet de cette étude sera traité dans le chapitre suivant.

Chapitre IV

Recherche et caractérisation de bactéries antagonistes dans l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*

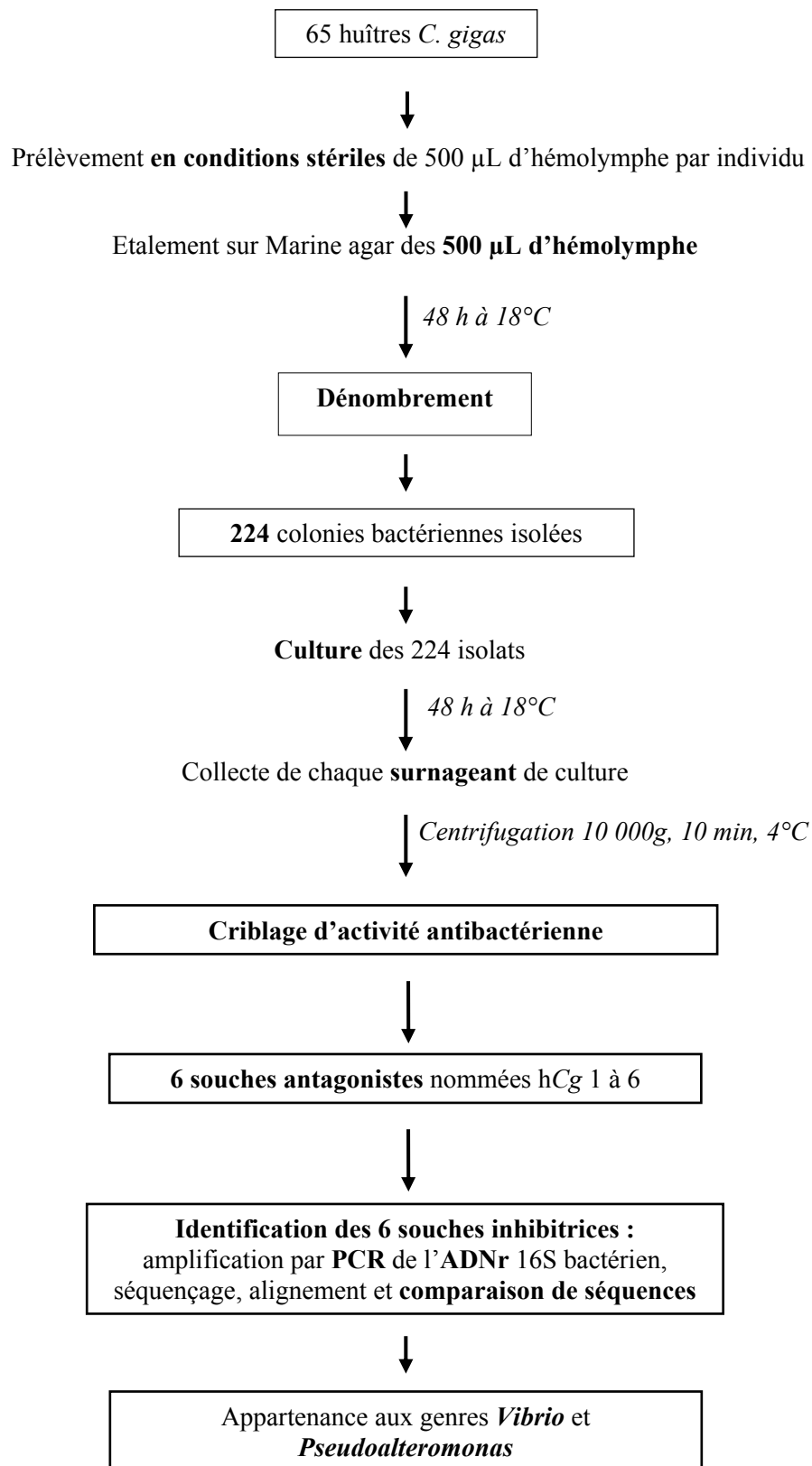


Figure 42 : Protocole de dénombrement et d'isolement de souches bactériennes à partir du compartiment hémolympatique de *C. gigas* et recherche de bactéries antagonistes.

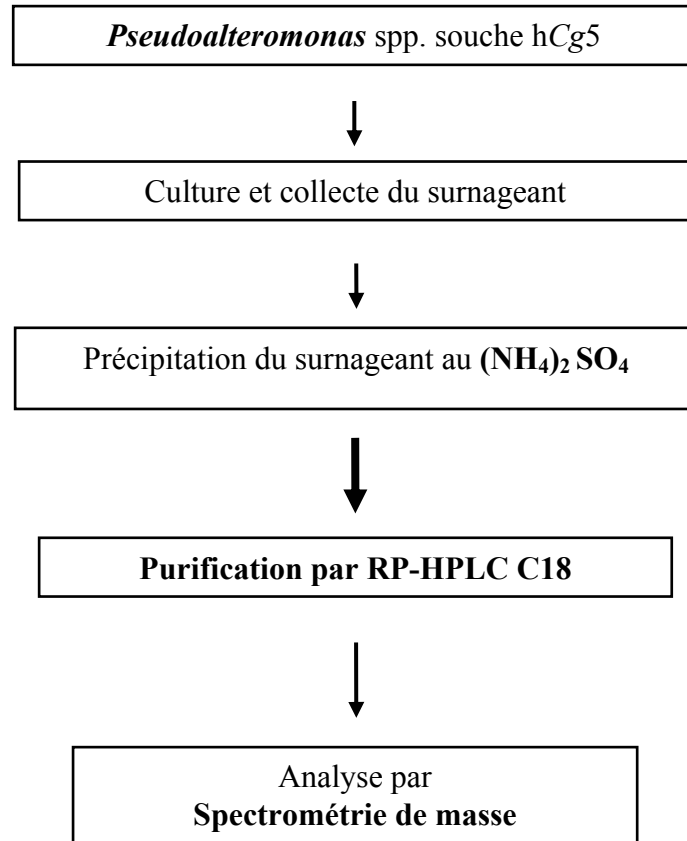


Figure 43 : Protocole de purification de la souche bactérienne *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 isolée du compartiment hémolympatique de *C. gigas*.

15 Introduction

Un certain nombre de bactéries marines issues des genres *Vibrio* et *Pseudoalteromonas* est suspecté de constituer la flore commensale de certains animaux marins et notamment des mollusques bivalves, continuellement en interaction avec leur milieu environnant (Ringø, 2008). Ces bactéries, vraisemblablement non pathogènes pour leur hôte, vivent en commensalisme et peuvent jouer le rôle d'antagoniste vis-à-vis de pathogènes potentiels. Cette flore assure une action protectrice de l'hôte par une compétition pour la niche écologique (Ringø, 2008). La capacité d'une bactérie à inhiber le développement d'une autre bactérie est un phénomène commun dans la nature. Les interactions microbiennes jouent un rôle majeur dans l'équilibre entre les microorganismes bénéfiques et les potentiels pathogènes (Balcázar *et al.*, 2006).

La production d'origine bactérienne de composés extracellulaires inhibiteurs jouerait un rôle dans le maintien de l'équilibre de l'hôte lui-même (Jorquera *et al.*, 2001). Cette flore bactérienne est souvent décrite comme une source d'aliments ou de vitamines pour son hôte. Elle peut avoir un rôle synergique avec les mécanismes de défense, afin de prévenir la colonisation de bactéries pathogènes. Elle peut également jouer un rôle dans l'élimination des déchets ou encore servir de réservoir de facteurs de croissance pendant la phase larvaire (Jorquera *et al.*, 2001).

Compte tenu des résultats du chapitre précédent et de l'hypothèse émise concernant l'origine bactérienne du peptide purifié et partiellement identifié, nous avons recherché des bactéries productrices de composés antagonistes dans le compartiment hémolympatique de l'huître adulte *C. gigas*. La stratégie expérimentale a consisté à isoler des souches bactériennes présentes de façon prépondérante dans l'hémolymphe de *C. gigas* et à rechercher une activité antibactérienne dans le surnageant des bactéries isolées (voir Figures 42 et 43).

Tableau 21 : Caractéristiques macroscopiques des colonies isolées.

Types de colonies bactériennes	Caractéristiques macroscopiques spécifiques
1	Colonies orangées, ~ 4 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et convexes
2	Colonies orange vif, ~ 1 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et convexes
3	Colonies orangées présentant un pourtour de coloris beige, ~ 2 à 4 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et convexes
4	Colonies beige clair, ~ 1 à 6 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et bombées
5	Colonies jaune, ~ 1 à 3 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et convexes
6	Colonies jaune foncé, ~ 1 à 2 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et convexes
7	Colonies jaune, ~ 1 à 3 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et convexes
8	Colonies jaune pâle, ~ 1 à 2 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et convexes
9	Colonies « saumon », ~ 2 à 4 mm de diamètre, brillantes, opaques, à bords réguliers et convexes
10	Colonies orange pâle translucide, dégradé croissant vers l'extérieur, à bords non réguliers, plates
11	Colonies rose foncé, ~ 1 mm de diamètre, opaque, à bords réguliers et convexe

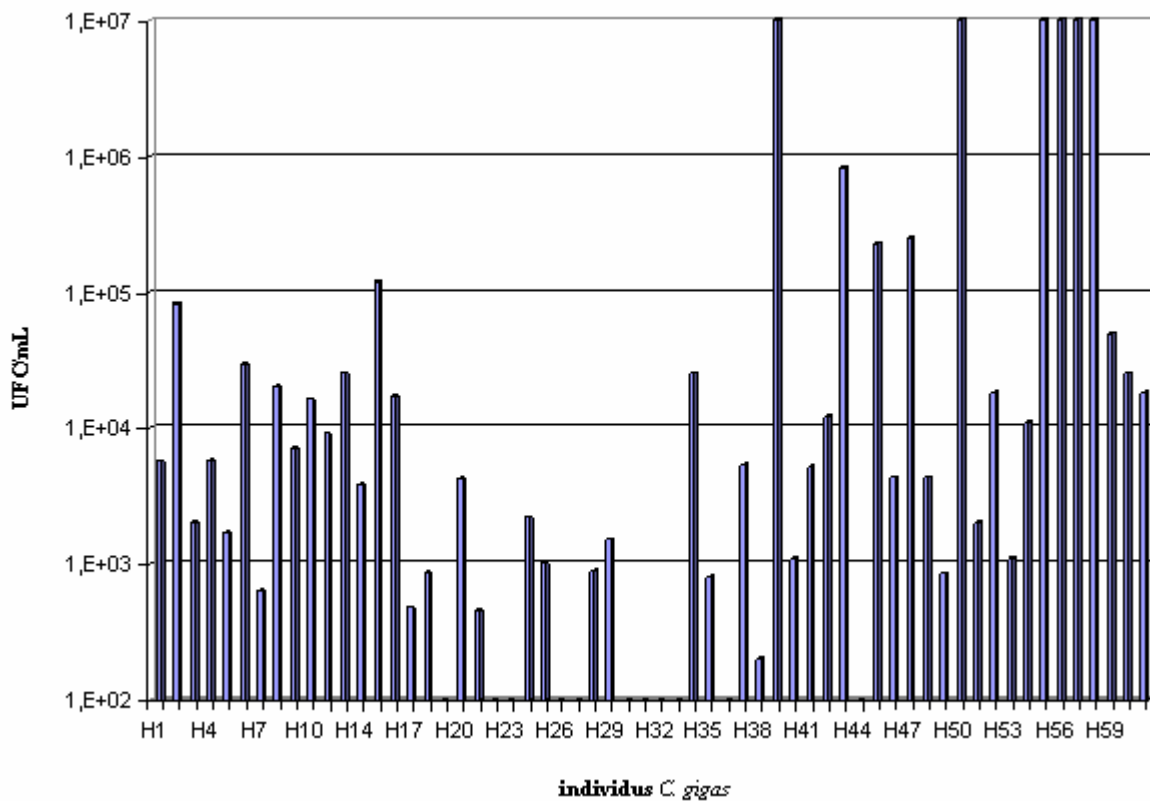


Figure 44 : Concentration bactérienne déterminée dans le compartiment hémolympatique de 61 individus de *C. gigas*.

16 Résultats

16.1 Isolement et identification de bactéries antagonistes à partir de l'hémolymphe de l'huître creuse *C. gigas*

Le dénombrement de la flore bactérienne présente dans le compartiment hémolympatique a été conduit individuellement sur 65 huîtres de calibre 1 à 2, provenant du même producteur que dans les chapitres 1, 2 et 3. L'isolement et le dénombrement des bactéries présentes dans le compartiment hémolympatique ont été réalisés immédiatement après un prélèvement de 500 μL en conditions stériles et étalement à l'aide d'un enseigneur spirale (WASP, AES Laboratoire) sur milieu marine agar, après avoir incubé les boîtes de Pétri 48 h à 18°C.

Un niveau de concentration bactérienne extrêmement hétérogène a été révélé dans le compartiment hémolympatique en fonction des individus. En effet, certains animaux présentaient une contamination bactérienne de leur hémolymphe inférieure à 10^2 UFC/mL tandis que d'autres démontraient une concentration supérieure à 10^7 UFC/mL. En éliminant ces extrêmes, une concentration bactérienne moyenne de $1,2 \cdot 10^4$ UFC/mL a été observée (Figure 44).

Onze types de colonies d'aspects macroscopiques différents ont été observés et isolés à partir des 65 huîtres (Tableau 21). A l'exception du type 11 détecté uniquement dans un prélèvement, les 10 autres types de colonies bactériennes ont été observés dans chaque prélèvement d'hémolymphe.

Nous avons retenu 224 souches bactériennes, isolées à partir de 61 (sur 65) prélèvements d'hémolymphe, présentes de façon majoritaire et correspondant aux 11 morphotypes définis dans le Tableau 21. Chacune des 224 colonies bactériennes a ensuite été mise en culture dans 5 mL de Marine Broth pendant 48 h à 18°C. Leur pureté a été vérifiée par isolement sur Marine Agar. Les 224 surnageants de culture ont été collectés après centrifugation (10 000g, 10 min) et filtration (0,22 μm), puis testés par la technique de diffusion en milieu gélosé contre un panel de bactéries. Ce dernier est constitué de *Micrococcus luteus*, souche cible utilisée pour la purification du peptide identifié dans le chapitre précédent ; et d'espèces pathogènes en aquaculture : *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garviae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vagococcus salmoninarum*, *Listonella anguillarum*.

Tableau 22 : Spectres d'activité des surnageants de culture des 6 souches inhibitrices.

Souches cibles	Sensibles aux surnageants des bactéries actives
Gram⁺	
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	hCg 2 et 4
<i>Lactococcus garviae</i>	hCg 1
<i>Micrococcus luteus</i>	hCg 1, 2, 3 et 4
Gram⁻	
<i>Listonella anguillarum</i>	hCg 5
<i>Vibrio alginolyticus</i>	hCg 3
<i>Aeromonas salmonicida</i>	hCg 4
<i>Yersinia ruckeri</i>	hCg 6

Tableau 23 : Détermination des genres bactériens des bactéries inhibitrices isolées chez *C. gigas*.

Isolats	Souches de référence dans Genbank	N° d'accèsion	% d'identité	Longueur (Pb)	Références
hCg 1	<i>Vibrio</i> sp. (<i>V. splendidus</i> ?)	FJ748512	98%	1516	Zeng, 2009
hCg 2	<i>Vibrio</i> sp. (<i>V. gazogenes</i> ?)	X74705	97%	1448	(Ruimy <i>et al.</i> , 1994)
hCg 3	<i>Vibrio</i> sp.	FJ457609	99%	1415	Gram <i>et al.</i> , 2008
hCg 4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	EU864261	100%	1637	Shi <i>et al.</i> , 2008
hCg 5	<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	EU365608	100%	1506	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)
hCg 6	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	DQ492744	95%	1456	Yu <i>et al.</i> , 2006

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool. **Les références surlignées correspondent à des soumissions directes sur le site BLAST (Blast Nucleotide Sequence), mais non publiées** : Zeng, Y. Bacterial diversity in Ny-Alesund. *Unpublished*. Zeng, Y. Direct Submission Submitted (10-FEB-2009) Bioscience, Polar Research Institute of China, 451 Jinqiao Road, Shanghai 200136, China. Gram, L., Melchiorson, J. and Bruhn, J.B. Marine culturable bacteria - a global survey of antibacterial activity. *Unpublished*. Gram, L. Direct Submission Submitted (13-NOV-2008) National Institute of Aquatic Resources, Technical University of Denmark, Soltofts Plads bldg 221, Kgs.Lyngby 2800, Denmark. Shi, S., Xiao, X. and Wang, F. Direct Submission. Submitted (19-JUN-2008) Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Daxue Road 184#, Xiamen, Fujian 361005, China. Yu, Y., Li, H.R., Chen, B. and Zeng, Y.X. Phylogenetic Diversity of Cultivated Bacteria Associated with Arctic Sea Ice. *Unpublished*. Yu, Y., Li, H.R., Chen, B. and Zeng, Y.X. Direct Submission. Submitted (14-APR-2006) Polar Biological Science, Polar Research Institute of China, 451 Jinqiao Road, Pudong, Shanghai 200136, P.R. China.

Six surnageants de culture ont montré un antagonisme vis-à-vis des bactéries cibles sélectionnées, soit environ 2,6% des souches cultivées. Ces 6 souches produisant une inhibition ont été dénommées temporairement hCg 1 à 6. Leur spectre d'activité est présenté dans le Tableau 22. Les surnageants bactériens issus des bactéries hCg 1 à 4 inhibent tous *M. luteus* et 1 ou 2 autres bactéries différentes ; ceux des souches hCg 3 et 4 inhibent à la fois des bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ ; ceux des souches hCg 5 et 6 n'inhibent qu'une souche-test de bactéries à Gram⁻ (Tableau 22).

Ces bactéries antagonistes ont été identifiées par séquençage de l'ADN 16S amplifié par PCR et par alignement de ces séquences. Les ADNr 16S bactériens ont été amplifiés à l'aide d'amorces universelles (W18 et W20) permettant d'obtenir des amplicons de ~1500pb. Après vérification de la taille des fragments amplifiés par électrophorèse des ADNr 16S amplifiés, les produits de PCR ont été séquencés par la société Biofidal (Vaulx en Velin, France). Par interrogation de banques de données disponibles sur le site National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), des alignements des séquences des ADNr 16S amplifiés ont été réalisés. Nous n'avons retenu que les séquences présentant le plus fort pourcentage d'identité. Des genres bactériens ont pu être assignés aux souches antagonistes hCg 1 à 6 (Tableau 23). Ces 6 souches appartiennent soit au genre *Vibrio*, soit au genre *Pseudoalteromonas*. Les espèces ont parfois pu être précisées.

16.2 Etude et purification de l'inhibiteur produit par la bactérie *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5

La poursuite des travaux d'étude de l'inhibition bactérienne et de purification a été focalisée sur la bactérie la plus active, *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. Il faut noter que c'est l'unique souche pour laquelle le surnageant est inhibiteur après plus de 2 dilutions au demi et cela jusqu'à une dilution de 1/256 (résultats non présentés).

16.2.1 Mesure de l'activité du surnageant de la bactérie *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 en fonction du temps et de ses caractéristiques de croissance

La production du composé inhibiteur a été suivie sur 96 h au cours de la croissance de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 (Figure 45). L'activité antibactérienne déterminée par la technique de diffusion en milieu gélosé par dilutions successives au demi (après centrifugation 5 min à 10 000g) augmente selon la courbe de croissance de la bactérie.

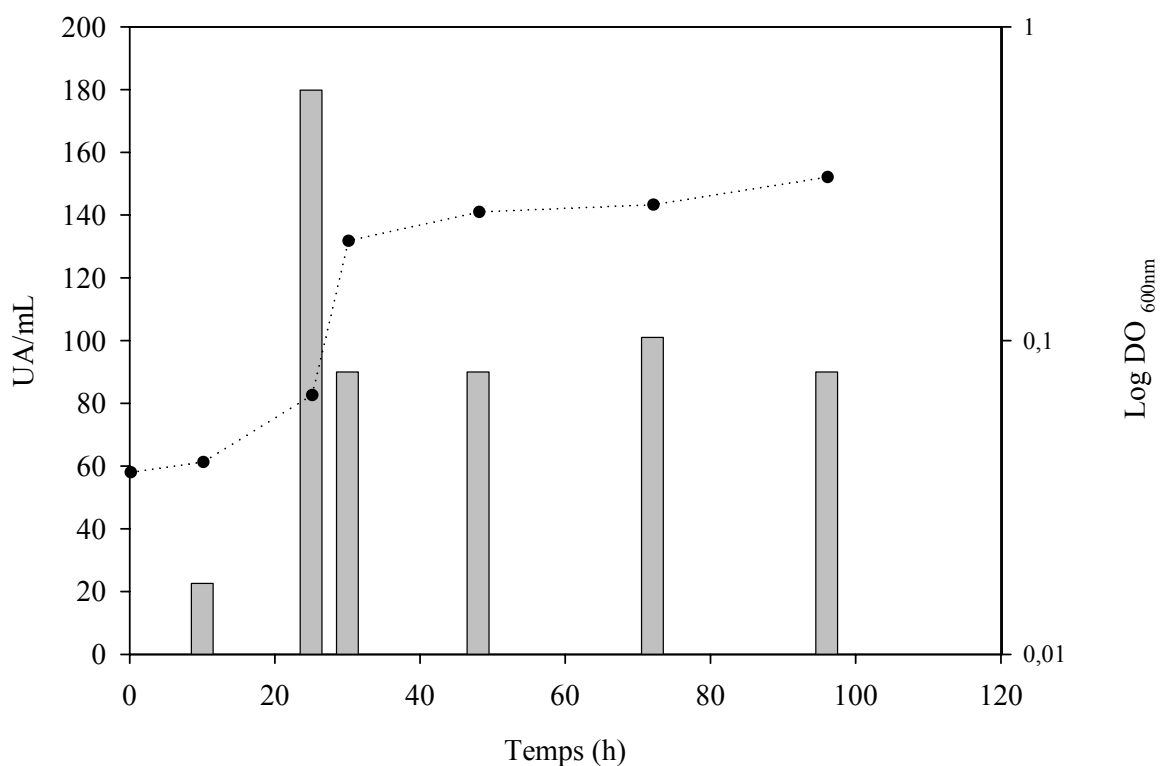


Figure 45 : Cinétique de croissance (Log DO_{600nm}) de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 à 18°C en milieu Marine Broth et activité anti-*Listonella anguillarum* (UA/mL).

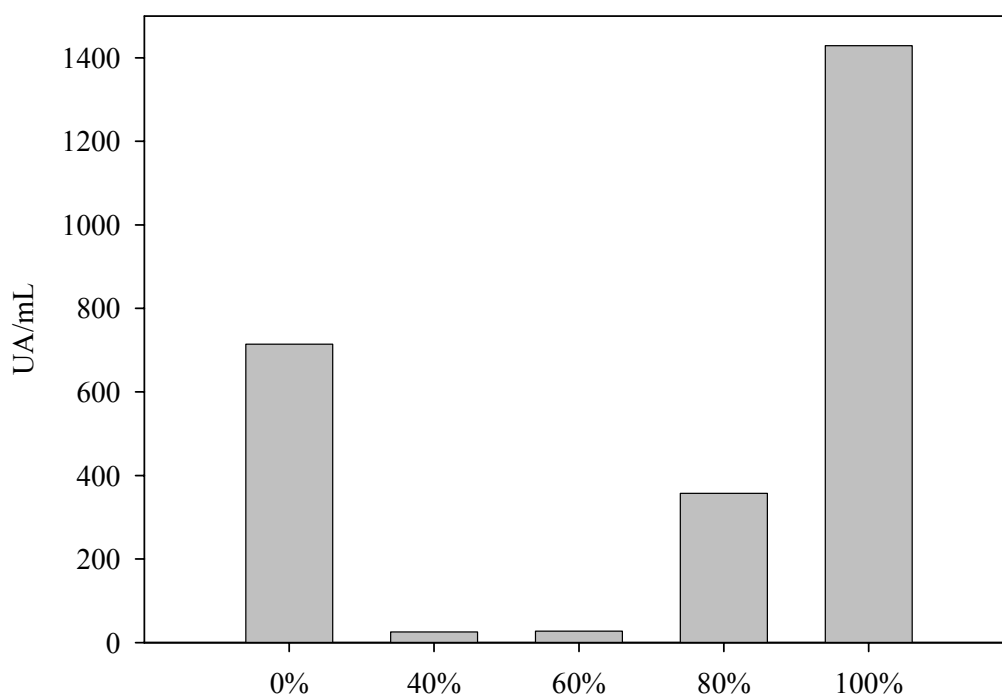


Figure 46 : Activité du surnageant (UA/mL) de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, précipité à différents pourcentages de saturation en (NH₄)₂SO₄.

Pseudoalteromonas spp. souche hCg 5, jusqu'à T=25 h (phase exponentielle de croissance), où un maximum d'activité a été détecté. L'activité durant la phase stationnaire est inférieure à celle déterminée à T=25 h mais reste néanmoins constante (entre 80 et 100 UA/mL).

16.2.2 Précipitation au sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄)

Afin de concentrer les composés de nature protéique du surnageant bactérien, des précipitations par différents pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium ont été réalisées (Figure 46). Les meilleurs rendements et taux de purification ont été obtenus avec la précipitation par 100% de saturation en (NH₄)₂SO₄ (Tableau 24). En effet, à ce pourcentage de saturation, un rendement de purification de 49,2% a été obtenu (Tableau 24). Un contrôle négatif a été réalisé par précipitation de milieu Marine Broth par 100% de (NH₄)₂SO₄ dans les mêmes conditions que pour le surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. Aucune activité n'a été révélée pour le contrôle négatif. De la sorte, le surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 précipité à 100% par du (NH₄)₂SO₄ a été utilisé pour la purification. Il sera par la suite dénommé « précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 ».

Nous avons réévalué le spectre d'activité antibactérien avec le précipité du surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. Les bactéries à Gram⁻ *Yersinia ruckeri* et *Vibrio alginolyticus* se sont révélées sensibles. Ainsi, le spectre d'activité du surnageant a été étendu à 2 bactéries à Gram⁻ supplémentaires grâce à la précipitation. L'activité reste néanmoins prépondérante envers *L. anguillarum* avec une concentration de 6950 UA/mg contre des concentrations de 1559 UA/mg pour *Y. ruckeri* et de 682 UA/mg pour *V. alginolyticus* (Tableau 25).

Tableau 24 : Détermination du taux et du rendement de purification après précipitation du surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 100% de saturation. La souche cible utilisée est *L. anguillarum*.

	Volume	Concentration en protéines (mg.mL^{-1})	Activité (UA/mL)	Activité (UA/mg)	Taux de purification	Activité totale (UA)	Rendement (%)
Surnageant de culture	860 mL	0,426	414	971	1	356 040	100
Surnageant précipité	43 mL	0,586	4 073	6950	7,1	175 139	49,2

Tableau 25 : Activité anti-*L. anguillarum*, *Y. ruckeri* et *V. alginolyticus* du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5.

Activité du surnageant précipité	Concentration en protéines (mg.mL^{-1})	Activité (UA/mL)	Activité (UA/mg)
<i>Listonella anguillarum</i>	0,586	4 073	6950
<i>Yersinia ruckeri</i>	0,586	914	1559
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0,586	400	682

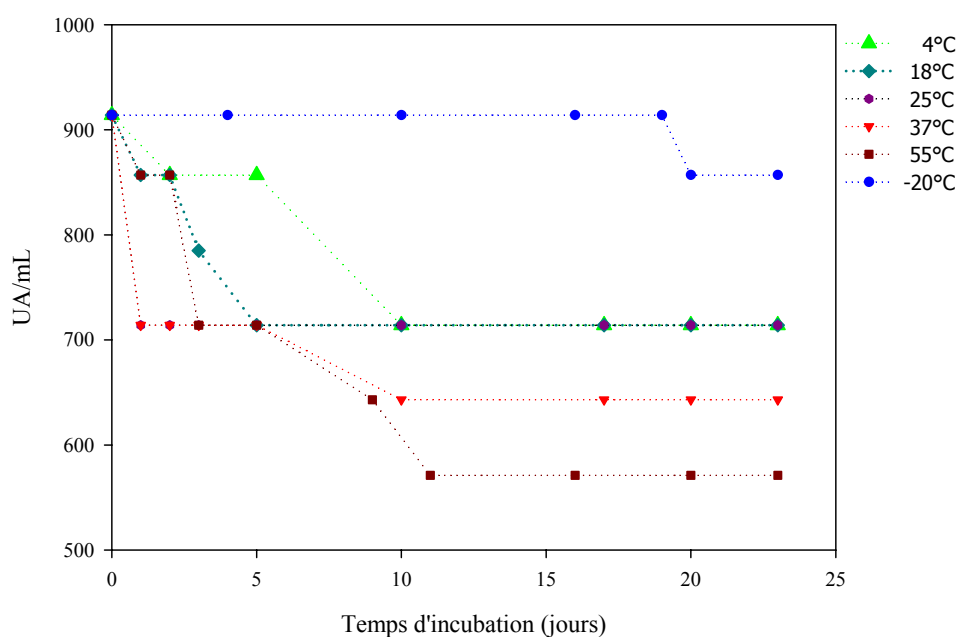


Figure 47 : Activité inhibitrice (UA/mL) du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, après différents temps d'incubation à différentes températures. La souche cible utilisée est *Y. ruckeri*.

16.2.3 Thermostabilité du composé inhibiteur du surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5

La thermostabilité du composé inhibiteur produit par la bactérie *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 a été suivie au cours du temps à différentes températures d'incubation : 55, 37, 25, 18, 4 et -20°C. L'effet d'une forte contrainte de température correspondant à un cycle d'autoclave de 121°C pendant 21 min a également été déterminé. Les résultats d'activité traduits en UA/mL sont présentés dans la Figure 47. A T0, l'activité anti- *Y. ruckeri* était de 914 UA/mL. Seulement 6,3% de perte d'activité ont été observés après 20 jours à -20°C. Ceci est probablement lié aux multiples cycles de congélation-décongélation effectués pour réaliser les tests. En revanche, 21,9% de perte d'activité ont été notés au terme des 23 jours d'incubation à 4°C. Les incubations à 18, 25, 37 et 55°C se sont traduites après 5 jours d'incubation par des pertes d'activité de 200 UA/mL (21,9%), détectées dès le 1^{er} jour d'incubation à 25°C et 37°C. Au-delà de 5 jours, l'activité s'est maintenue pour les températures d'incubation de 18°C et 25°C. En revanche, à 37°C et 55°C, de nouvelles pertes d'activité se sont dévoilées au-delà des 5^{ème} et 10^{ème} jours d'incubation. L'activité est demeurée stable à 37°C et 55°C jusqu'au 23^{ème} jour d'incubation, mais reste toutefois inférieure à l'activité mesurée pour les températures de 18, 25 et 4°C. Après un cycle d'autoclavage, 72% de l'activité antibactérienne a été retrouvée (658 UA/mL).

En conclusion, ces résultats révèlent une grande thermostabilité du composé antibactérien détecté dans le précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, avec une température préférentielle de conservation de -20°C (en évitant les cycles de congélation-décongélation).

16.2.4 Nature biochimique du composé antibactérien produit par *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5

Afin de définir la nature biochimique du composé antibactérien, le précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 a été soumis à des digestions enzymatiques, réalisées à l'aide de 3 protéases : la trypsine, la chymotrypsine et une protéase de type XIV non spécifique. En parallèle, chacune des 3 protéases incubées dans du tampon phosphate 50 mM à pH 8 ainsi que le précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 incubé dans les mêmes conditions en l'absence d'enzyme ont été utilisés comme contrôles.

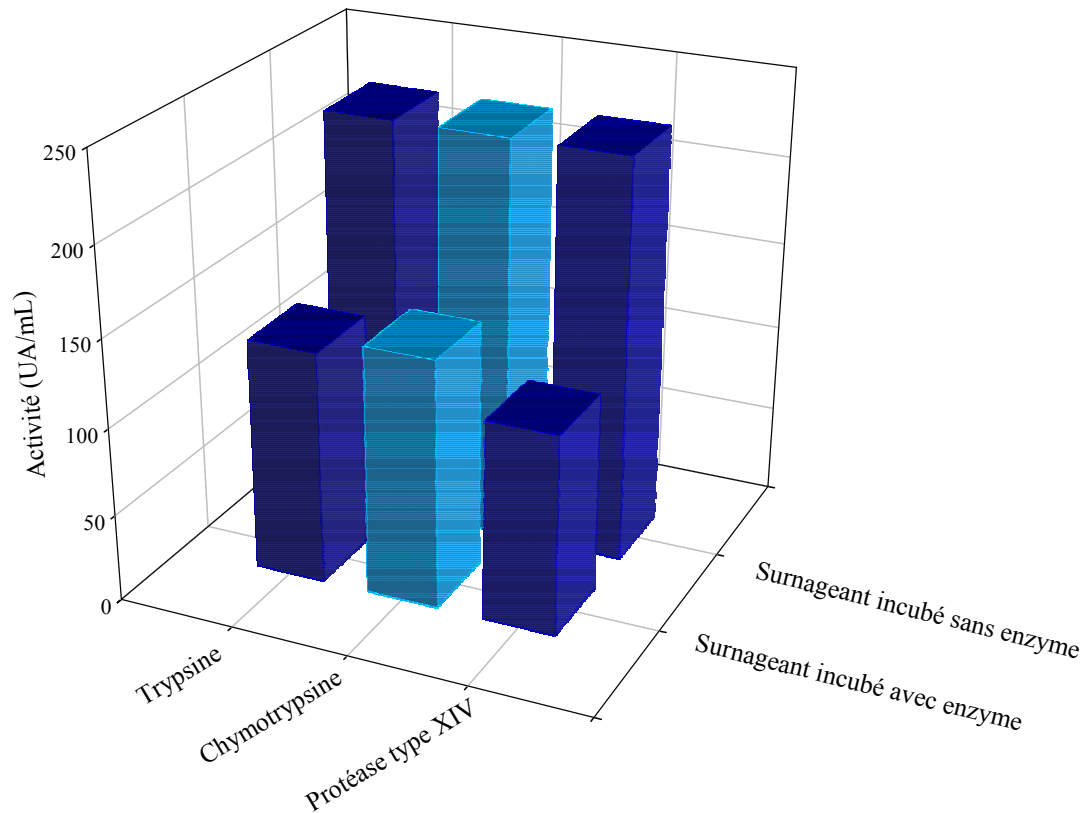


Figure 48 : Evaluation de l'activité inhibitrice (UA/mL) du surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 concentré après digestions enzymatiques.

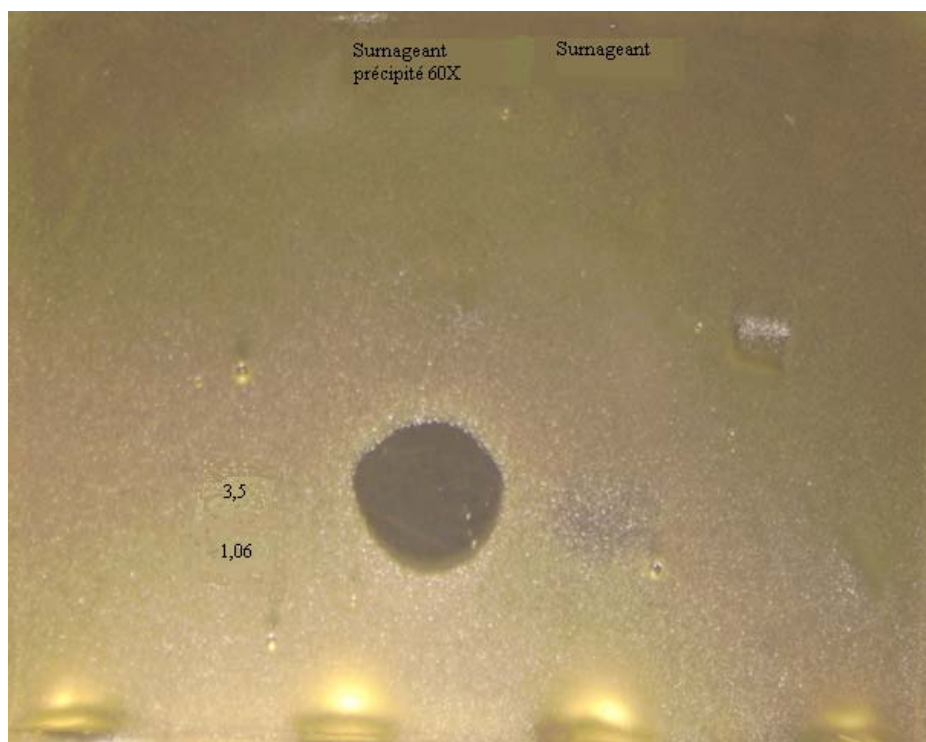


Figure 49 : Analyse électrophorétique (SDS-PAGE) du surnageant et du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. Le gel est recouvert après plusieurs lavages par du milieu Columbia Agarensemencé avec *Yersinia ruckeri* à 1.10^6 UFC/mL.

Après 4 h d'incubation à 37°C pour un rapport Enzyme/Substrat de 1/10 et dénaturation des enzymes par un traitement thermique (1 min à 100°C), l'activité du surnageant concentré a été testée à l'aide de la technique de diffusion en milieu gélosé contre la bactérie *Y. ruckeri*. La Figure 49 présente les résultats obtenus après incubation du surnageant concentré en présence ou non d'une des 3 enzymes sélectionnées. Une perte d'activité du surnageant concentré a été observée en présence de chacune des 3 enzymes. La diminution d'activité la plus importante a été obtenue pour la protéase de type XIV avec plus de 51% de perte d'activité. Les activités révélées après dégradation par la trypsine et la chymotrypsine ont diminué respectivement de 42% et 38%. Bien que partielles, ces pertes d'activités après digestions enzymatiques indiquent que le composé inhibiteur est au moins en partie de nature protéique.

16.2.5 Evaluation par SDS-PAGE de la masse moléculaire des protéines inhibitrices du surnageant bactérien de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5

L'électrophorèse en condition dénaturante a été réalisée avec le surnageant et le précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. Après plusieurs lavages du gel, celui-ci a été recouvert par du milieu Colombia Agarensemencé avec *Yersinia ruckeri* à 1.10^6 UFC/mL (Figure 49). L'activité antibactérienne envers *Y. ruckeri* se traduit par la présence de halots d'inhibition dans une zone de migration correspondant à la masse moléculaire des composés inhibiteurs. La bactérie *Y. ruckeri* a été sélectionnée comme souche cible car elle supporte mieux la gélose en surfusion que *L. anguillarum*, bien que cette dernière soit plus sensible. Après 24 h d'incubation à 30°C, un halot d'inhibition de croissance de la bactérie cible a été détecté pour le précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, dans la zone de migration des protéines correspondant à des masses moléculaires de 3,5 kDa (Figure 49). Bien que cette technique ne permette pas de quantifier l'activité, il apparaît clairement que le composé inhibiteur a été concentré par la précipitation du surnageant.

A ce stade, pour résumer, il apparaît que le composé inhibiteur présent dans le surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 est : en partie de nature protéique ; thermostable et d'une masse moléculaire d'environ 3,5 kDa. Par conséquent, ce(s) composé(s) possède(nt) les caractéristiques des peptides antibactériens appelés bactériocines, et plus précisément des microcines (bactériocine thermostable de bactérie à Gram⁻) (Heng & Jack, 2006).

Tableau 26 : Détermination des CMI obtenues à partir du surnageant et du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. La souche cible utilisée est *Yersinia ruckeri*.

	Surnageant de culture	précipité	Témoin Polymyxine B
CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	13,3	5,0	1,0

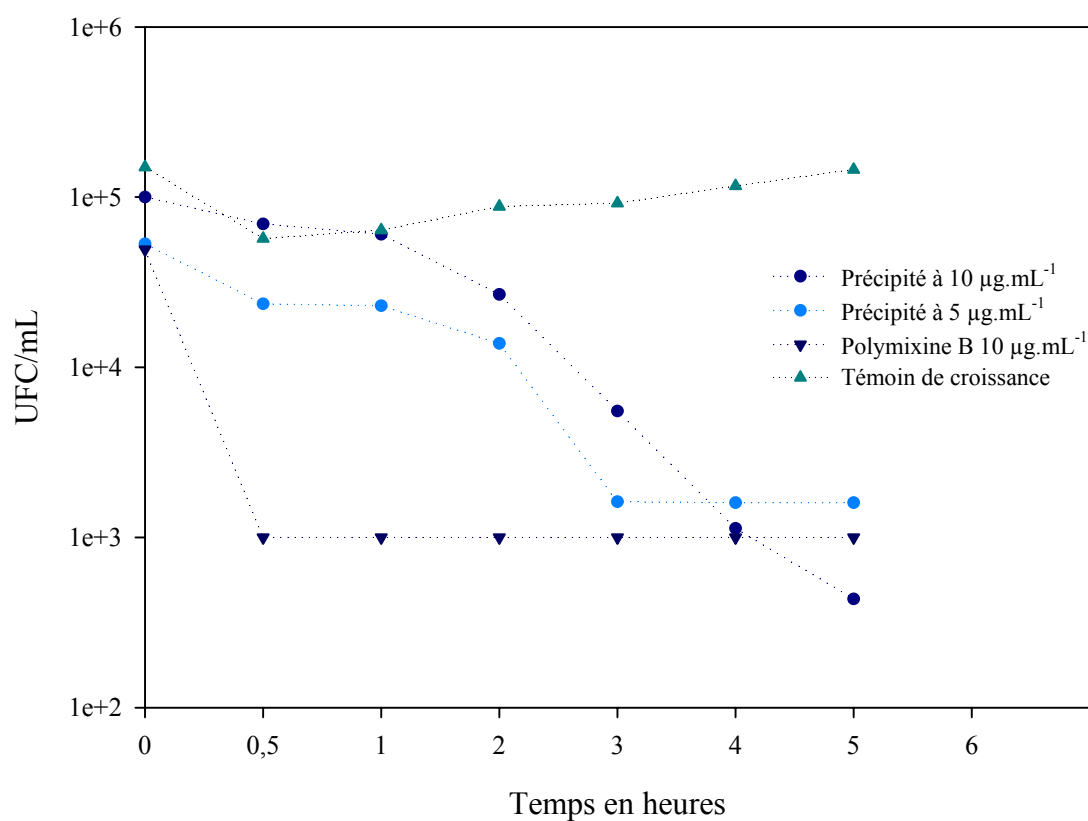


Figure 50 : Cinétique de la perte de viabilité de *Y. ruckeri* (1.10^6 UFC/mL) en présence du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, aux concentrations de la CMI ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et de 2 fois la CMI ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

16.2.6 Cinétique de la perte de viabilité

Cette méthode permet de déterminer si le composé inhibiteur identifié dans le surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 est bactéricide ou bactériostatique. La CMI a préalablement été déterminée sur *Y. ruckeri* par un test d'inhibition en microplaques. Elle est exprimée en μg de protéines totales par mL du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. La polymyxine B a été utilisée comme témoin positif. La CMI a été évaluée à la fois sur le surnageant et sur le précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. Les CMI obtenues sont respectivement de 13,3 et 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tableau 26).

L'évolution de la viabilité de la bactérie *Y. ruckeri* à 1.10^6 UFC/mL a ensuite été mesurée en présence du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 aux concentrations de 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CMI) et 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (2 fois la CMI) pendant 6 h. La polymyxine B à la concentration de 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (10 CMI) a été utilisée comme témoin positif. Un témoin de croissance a été réalisé en parallèle avec la bactérie cible *Y. ruckeri*ensemencée à 1.10^6 UFC/mL (Figure 50). Sur la période donnée d'incubation, ce témoin montre que la viabilité de *Y. ruckeri* reste constante.

En revanche, en présence de surnageant précipité aux concentrations de 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, le nombre d'UFC/mL diminue avec une perte finale d'environ 2,5 Log d'UFC/mL à 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ après 5 h, et de plus d'1 Log d'UFC/mL à 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ après 3 h d'incubation. Ainsi, après 5h d'incubation, la population bactérienne est réduite en moyenne d'un facteur 100, indiquant un effet bactéricide. Bien que ces pertes de viabilité de *Y. ruckeri* par cinétique aient révélé un effet bactéricide moins rapide que celui de la polymyxine B à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, le précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 est tout aussi efficace.

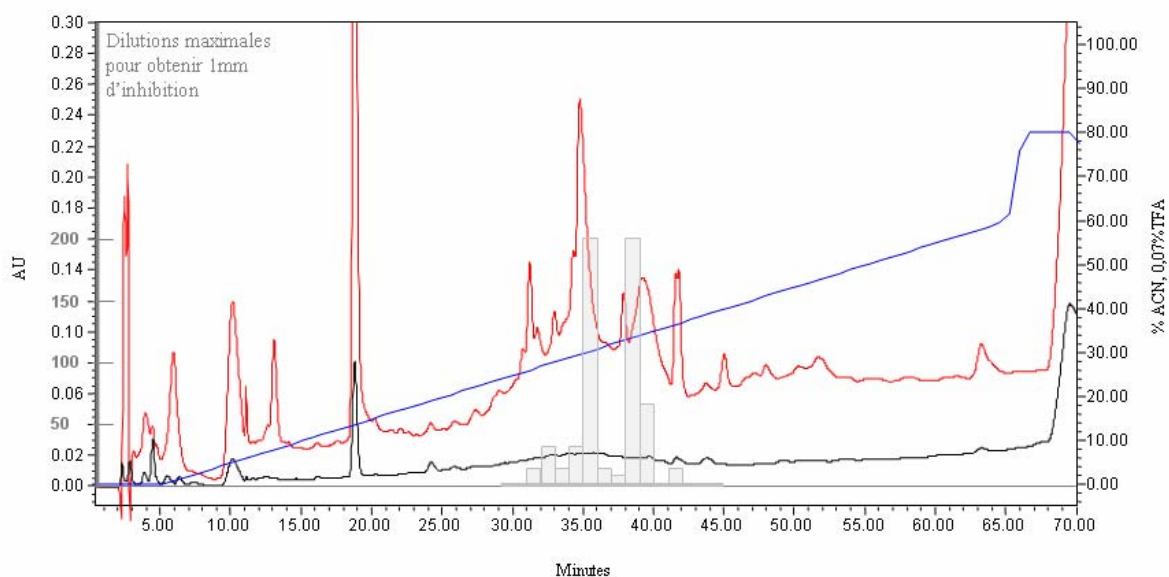


Figure 51 : Chromatogramme du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, obtenu par injection de 590 μg de protéines totales sur une colonne RP-HPLC C18 (C18 UP 5HSC-25QS, 250 x 10 mm) munie d'une colonne de garde (Upti-screen Modulo Cart, 10 mm i.d 5HS49750). Le gradient d'ACN est représenté en bleu, le débit est de 5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ d'ACN-0,07% TFA 1% $\cdot\text{min}^{-1}$. Les fractions actives sont représentées en gris.

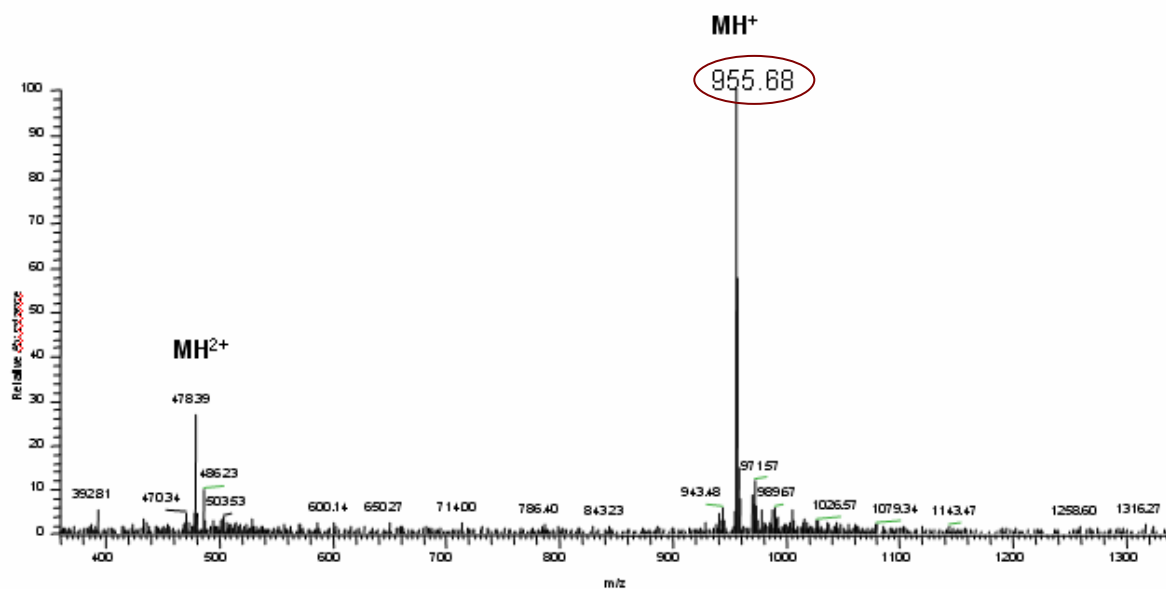


Figure 52 : Spectre de masse de la fraction 36 issue de la purification par RP-HPLC C18 du surnageant précipité.

16.3 Purification par chromatographie en phase inverse (RP-HPLC C18)

Afin de purifier le peptide présent dans le précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, une séparation des composés a été réalisée par chromatographie en phase inverse (RP-HPLC C18). 586 µg de protéines totales du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 ont été injectés. L'activité des fractions collectées, lyophilisées et resolubilisées dans 500 µL d'eau Milli-Q a été évaluée envers *Listonella anguillarum* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'activité a été retrouvée dans les fractions éluées entre la 30^{ème} et la 45^{ème} minute, correspondant à un pourcentage d'ACN compris entre 30% et 45%. La Figure 51 présente le chromatogramme obtenu par l'analyse en RP-HPLC C18 du précipité de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, ainsi que l'activité antibactérienne de chaque fraction inhibitrice. Une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée sur les 2 fractions inhibitrices les plus actives éluées aux 36^{ème} et 39^{ème} minutes.

16.4 Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée au Laboratoire de Biologie et Biotechnologie Marines, de l'Université de Caen, par le Dr Joël Henry et le Dr Céline Zatylnyj-Gaudin (plateau spectrométrie de masse). Cette technique a pour objectif de définir la masse moléculaire de peptides, mais aussi de vérifier la pureté de l'échantillon. L'analyse de la fraction 36 a révélé la présence d'un peptide majoritaire de m/z 955 (Figure 52), également présent dans la fraction 39.

17 Discussion

Les travaux réalisés dans cette étude ont permis de mettre en évidence la présence de souches bactériennes antagonistes dans l'hémolymphe d'adultes d'huîtres creuses *C. gigas*. Deux cent vingt-quatre colonies ont pu être sélectionnées à partir des étalements sur Marine Agar d'hémolymphe prélevées stérilement. Onze types de colonies bactériennes dominants ont été observés.

Les dénombrements bactériens réalisés sur les différents lots d'hémolymphe dans cette étude ont permis d'observer une concentration de bactéries cultivables moyenne de $1,2 \cdot 10^4$ UFC/mL à 18°C, en s'affranchissant des concentrations extrêmes. Cette concentration bactérienne moyenne n'est cependant que peu représentative dans la mesure où une grande disparité de concentrations a été observée dans l'hémolymphe des animaux prélevés. Une étude menée par Olfasen *et al.* (1993) avait permis de dénombrer entre 10^1 et 10^3 UFC/mL pour une moyenne de $1,4 \cdot 10^2$ UFC/mL dans l'hémolymphe et les tissus de *C. gigas* lorsque les individus étaient maintenus entre 0 et 8°C, pour une température d'incubation bactérienne de 12°C. Colwell et Liston (1960) ont déterminé la composition naturelle de la flore bactérienne de *C. gigas* après culture des huîtres à différentes températures (25°C et 37°C) et dans différentes zones géographiques. Les dénombrements bactériens ont été réalisés dans les mêmes conditions de température que dans le milieu de prélèvement des huîtres (25°C et 37°C). Ils ont montré qu'aucune différence réelle dans la composition de la flore bactérienne n'apparaissait entre les températures et les différentes zones de distribution et que le nombre moyen de colonies isolées était proche de 10^3 UFC/mL. La concentration bactérienne moyenne estimée au cours de cette étude à partir de l'hémolymphe de *C. gigas* est plus élevée que dans les études précédemment citées.

Parmi les 224 souches isolées, 6 souches ont présenté une activité antibactérienne. L'identification par des méthodes d'analyses moléculaires a révélée que ces 6 souches appartiennent vraisemblablement au groupe phylogénétique des Gamma-protéobactéries et plus particulièrement aux genres *Vibrio* (O. Vibrionales, F. *Vibrionaceae*) et *Pseudoalteromonas* (O. Alteromonadales, F. *Pseudoalteromonadaceae*) (Tableau 23). L'appartenance de ces bactéries à ces 2 genres bactériens concorde avec les études effectuées sur la diversité microbienne des écosystèmes marins (Romanenko *et al.*, 2008). En effet, des *Pseudoalteromonas* et des *Vibrio* ainsi que des *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Archromobacter* et *Flavobacterium* sont régulièrement rapportés comme communément associés à la flore des

invertébrés marins (Colwell & Liston, 1960; Colwell & Sparks, 1967; Sugita *et al.*, 1981; Kueh & Chan, 1985; Holmström & Kjelleberg, 1999; Jorquera *et al.*, 2001; König *et al.*, 2006; Skovhus *et al.*, 2007). Ces genres bactériens, et particulièrement *Vibrio*, sont dominant parmi la microflore de la surface externe, du tractus digestif, des organes internes et des hémocytes de mollusques marins. Une spécificité dans l'ingestion de *Pseudoalteromonas* et *Vibrio* paraît exister chez les bivalves (Olafsen *et al.*, 1993). La présence de bactéries de ces genres chez des huîtres adultes saines met en évidence une association spécifique entre ces bactéries et leur hôte (Olafsen *et al.*, 1993). Ces bactéries sont des habitants naturels des systèmes aquatiques et peuvent persister sur des périodes relativement longues dans leur hôte. Elle pourraient occuper cette niche écologique particulière et ainsi participer à la lutte contre l'introduction de microorganismes pathogènes aquacoles à la fois dans leur environnement et dans l'hôte (Das *et al.*, 2006).

Les espèces du genre *Pseudoalteromonas* peuvent être adoptées par la faune et la flore marine comme agents de défense et possèdent un large éventail de bio-activités associées à la production de composés extracellulaires (Holmström & Kjelleberg, 1999; Kalinovskaya *et al.*, 2004; Bowman, 2007). En effet, des bactéries du genre *Pseudoalteromonas* vivant en association avec des eucaryotes marins ont révélé leur aptitude à produire des substances biologiques montrant des activités antibactériennes (Bowman, 2007; Romanenko *et al.*, 2008), antifouling (Holmström *et al.*, 2002), bactériolytique (Sawabe *et al.*, 1998), antifongique (Bowman, 2007), agarolytique (Holmström & Kjelleberg, 1999), hémolytique (Kalinovskaya *et al.*, 2004), algicide (Holmström & Kjelleberg, 1999) et parfois même antivirale (Kamei *et al.*, 1988).

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence que seulement 2,6% des souches isolées présentent une inhibition des souches cibles sélectionnées. Castro *et al.* (2002) ont révélé que seulement 4% des 123 *Vibrio* isolés et testés chez *Ruditapes philippinarum* inhibaient la croissance de souches de *V. tapetis* et uniquement en culture sur du milieu Muller-Hinton 2% NaCl (Castro *et al.*, 2002).

Etant donnée la structure putative du peptide purifié (chapitre 3) à partir de l'hémolymphe de *C. gigas* et les résultats de 4 tentatives de purification, il nous a semblé judicieux de rechercher la présence de bactéries productrices de bactériocines dans l'hémolymphe de *C. gigas* adultes saines. L'activité du surnageant des bactéries isolées inhibitrices a été testée sur la bactérie *M. luteus*, souche envers laquelle un peptide antibactérien ayant une structure présumptive proche des lantibiotiques a pu être purifié dans le chapitre précédent. Cependant, l'inhibition de *M. luteus* par les surnageants de culture des souches isolées s'est révélée faible.

Etant donné ces difficultés, nous avons choisi d'orienter nos travaux sur les souches actives cultivables présentant l'activité *in vitro* la plus forte contre les bactéries pathogènes en aquaculture, c'est à dire sur la souche identifiée à *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5.

Dans un premier temps, l'étude de la production du composé antibactérien au cours de la croissance de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5, a permis de révéler que l'activité maximale est détectée en fin de la phase de croissance et durant la phase stationnaire. Un tel résultat a été décrit chez des espèces de *Pseudoalteromonas* identifiées chez des bivalves (Holmström & Kjelleberg, 1999; Longeon *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2005; Bowman, 2007; Ringø, 2008). En effet, il a été mis en évidence que *P. tunicata* produit des composés extracellulaires durant sa phase stationnaire (Holmström & Kjelleberg, 1999; Rao *et al.*, 2005).

D'autre part, la thermostabilité de l'activité du surnageant précipité a été étudiée. Le composé antibactérien s'est révélé particulièrement thermostable et résistant à des températures très élevées. Cette propriété a été régulièrement décrite pour les bactériocines produites par les bactéries lactiques telles que les plantaricines (Ogunbanwo *et al.*, 2003; Yanagida *et al.*, 2005; Tiwari & Srivastava, 2008). Par ailleurs, une réduction significative de l'activité du surnageant a été observée suite aux digestions par 3 enzymes protéolytiques (pertes entre 51% et 38%). Ces résultats révèlent la nature protéique au moins partielle du composé antibactérien détecté dans le surnageant.

L'analyse par SDS-PAGE du surnageant avant et après précipitation a démontré que la masse moléculaire du composé actif présent dans le surnageant est proche de 3 kDa.

L'étude de l'action du surnageant précipité aux concentrations de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CMI) et 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (2 CMI) sur *Y. ruckeri* a permis de mettre en évidence une réduction significative du nombre d'UFC/mL formées dès 3 h d'incubation et plus particulièrement au bout de 5 h à la concentration de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Tiwari et Srivastava (2008) ont démontré une action de type bactéricide vraisemblablement liée à la capacité des bactériocines à former des pores à travers la membrane cellulaire et engendrant la lyse de la cellule chez les bactériocines plantaricines LR14 α et β . En effet, l'action bactéricide des plantaricines LR14 α et β a été révélée à la concentration de 100 UA/mL, et plus particulièrement à la concentration de 200 UA/mL lorsque les 2 peptides de la plantaricine LR14 étaient employés de façon synergique. Ces mêmes auteurs révèlent une perte de 1 Log en 6 h pour chaque peptide employé à 100 UA/mL et une inhibition totale pour une application synergique de ces 2 peptides à 200 UA/mL. Dans nos travaux, aux concentrations de 5 et 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ correspondant à 40 et 80 UA/mL, une diminution du nombre de colonies formées de plus de 2 Log à 80 UA/mL en 5 h et constante

à 6 h a été révélée. Cette réduction significative de la viabilité de la bactérie cible *Y. ruckeri* met en évidence un effet bactéricide du composé de nature protéique présent dans le surnageant de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5.

La purification partielle à partir d'1 L de surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 par précipitation au sulfate d'ammonium saturé à 100% a permis de concentrer plus de 7 fois son action inhibitrice sur *L. anguillarum* (6950 UA/mg) ainsi que de détecter son action vis-à-vis des souches *Y. ruckeri* (1559 UA/mg) et *V. alginolyticus* (682 UA/mg). La concentration de l'activité indique la capacité de précipitation du facteur inhibiteur par une saturation en sulfate d'ammonium à 100% (Prasad *et al.*, 2005).

L'analyse par PR-HPLC C18 du surnageant précipité a permis de mettre en évidence les composés inhibiteurs. Ils ont été élués par 25 à 40% d'ACN et pour les plus inhibiteurs par 31 et 34% d'ACN. L'analyse par spectrométrie de masse des fractions les plus actives 36 et 39 a révélé la présence d'un peptide d'un rapport m/z de 955 dans la fraction 36 et de 6 peptides dans la fraction 39, dont un majoritaire correspondant au peptide de m/z 955 identifié dans la fraction 36.

Nous avons donc mis en évidence la présence de bactéries de type *Vibrio* et *Pseudoalteromonas* chez des adultes de l'huître creuse *C. gigas*. Une souche de *Pseudoalteromonas* isolée, cultivable et identifiée, a fait l'objet d'une étude plus approfondie concernant sa capacité à produire des substances antibactériennes de type « Bacteriocin-like Inhibitory Substance » (BLIS). L'étude et la purification ont été menées selon des techniques reconnues comme efficaces pour isoler et purifier les peptides antimicrobiens et bactériocines, par la combinaison de précipitation au sulfate d'ammonium et RP-HPLC C18 (Yanagida *et al.*, 2005; Lategan *et al.*, 2006; Sriannual *et al.*, 2007).

Il s'avère que le composé de nature protéique présent dans le surnageant présente les caractéristiques des microcines, de part sa masse moléculaire, sa thermostabilité, son spectre d'action envers les bactéries à Gram⁻ (genre bactérien producteur), son effet bactéricide ainsi que sa production en fin de phase de croissance et durant la phase stationnaire.

Plusieurs travaux de recherche ont rapporté la présence de composés antimicrobiens d'origine protéique synthétisés et sécrétés par des *Pseudoalteromonas* associées à des mollusques bivalves marins. Romanenko *et al.* (2008) ont identifiés une *Pseudoalteromonas* isolé chez le mollusque bivalve *Anadara Broughtoni* dans la mer du japon, nommé AN10 et

attribué à 100% de similarité de séquence à l'espèce *P. fluva*, capable de synthétiser des substances inhibitrices de faible masse moléculaire (Romanenko *et al.*, 2008). Une autre espèce *P. tunicata* intervenant dans la formation des biofilms et fréquemment associée avec les organismes eucaryotes marins, s'est avérée produire 5 composés inhibiteurs (Rao *et al.*, 2005). Dans cette étude, un des composés produits est une protéine antibactérienne d'une masse moléculaire de 190 kDa. Cette protéine désignée Alph, active à la fois sur des bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ est composée de 2 sous-unités de 60 et 80 kDa. Un autre composé inhibiteur identifié dans ces travaux est produit par *P. tunicata* uniquement en présence d'autres bactéries (Rao *et al.*, 2005). D'autre part, Longeon *et al.* (2004) ont mis en évidence la production d'une protéine antibactérienne P-153 sous forme d'un trimère en solution et d'une masse de 280 kDa, produite par une souche nommée X153 du genre *Pseudoalteromonas*. Ils ont révélés la production d'une protéine de forte masse moléculaire présentant un large spectre d'activité antibactérienne et particulièrement envers des *Vibrio* ichthyopathogènes (Longeon *et al.*, 2004). Les auteurs ont suggérés l'utilisation potentielle de cette souche comme probiotique en paeneiculture et pisciculture.

Holmström *et al.* (2002) ont démontré que 2 autres souches de ce genre, *Pseudoalteromonas citrea* et *Pseudoalteromonas rubra*, produisent des substances auto inhibitrices. D'une manière générale, il est suggéré que des *Pseudoalteromonas* producteurs d'agents antifouling pourraient aider l'hôte à lutter contre la colonisation de sa surface par leur capacité à produire des composés inhibiteurs dans la mesure où la relation symbiotique est effective (Holmström *et al.*, 2002).

Le genre *Pseudoalteromonas* abrite plusieurs espèces produisant des substances de faible masse molaire ayant une activité biologique (Bowman, 2007). De la sorte, plusieurs substances antibactériennes produites par *P. luteoviolacea* et *P. phenolica* correspondent à différents pyrroles brominés. Des tambjamines de type alcaloïdes, et particulièrement la tambjamine YP1 identifiée chez *P. tunicata* à pigments jaune, présentant une activité antifongique. Les bactéries *P. denitrificans* et *P. rubra* pigmentées rouge vif, sécrètent un pigment appelé cycloprodigiosine HCl démontrant une action similaire aux ionophores en bloquant le symport des ions chlorite/proton. Cette capacité de synthèse de telles molécules leur confère ainsi une action anti-malaria et supprime l'immunoprolifération. Elles sont aussi capables d'engendrer l'apoptose de certaines lignées cellulaires cancéreuses. Des Korormycines, dont une hydroxyquinonolone heptylée, produite par une *Pseudoalteromonas* sp. non identifiée, arbore une activité antibiotique envers diverses bactéries marines et particulièrement envers *Vibrio* spp. (Bowman, 2007).

La plupart des bactériocines caractérisées chez des bactéries à Gram⁻ l'ont été à partir d'*E. coli* et sont des colicines et microcines (Gillor *et al.*, 2004). Un nombre réduit de bactériocines a été identifié chez d'autres bactéries à Gram⁻, comme les pyocines de *Pseudomonas* sp. (Jacob, 1954), la vibriocine de *Vibrio cholerae* (Himsley & Seyfried, 1962; Jayawardene & Himsley, 1969), les alveïcines de *Hafnia alvei* (Hamon & Peron, 1963), les klebïcines ou pneumocines de *Klebsiella pneumoniae* (Reeves, 1972; Chhibber & Vadehra, 1986), une enterocoliticine de *Yersinia enterocolitica* (Strauch *et al.*, 2001), BC1 et BC2 de *Vibrio vulnificus*, IW1 de *V. cholerae* (Shehane & Sizemore, 2002), une BLIS chez *Aeromonas hydrophila* (Messi *et al.*, 2003) et une BLIS chez *Vibrio harveyi* VIB 571 (Prasad *et al.*, 2005).

A partir des travaux répertoriés sur les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, isolées et testées comme agents biologiques chez des bivalves marins, aucun de ces composés ne révèle une masse moléculaire identique à celle déterminée dans notre étude. Le peptide identifié dans ce chapitre ne présente toutefois pas la même masse que celui qui a été purifié et identifié à partir de l'hémolymphe de *C. gigas*. Néanmoins, il s'avère extrêmement difficile de démontrer l'origine microbienne de composés antibactériens d'origine marine, car la plupart des bactéries symbiotiques ne sont pas cultivables. De ce fait, obtenir une production de composés recherchés à partir d'une culture bactérienne pure isolée à partir de l'hôte implique d'avoir la certitude que la bactérie productrice soit la bonne et qu'elle soit cultivable.

En conclusion, nous avons pu confirmer que l'hémolymphe de *C. gigas* abrite une flore bactérienne. Cette dernière contient des bactéries antagonistes, productrices de bactériocines. Nous avons purifié une bactériocine de type microcine, d'une masse moléculaire de 954 Da à partir du surnageant de l'espèce identifiée, *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5. Le séquençage par microséquençage automatique ou MS/MS, n'a pas permis d'obtenir des résultats exploitables pour définir avec certitude sa séquence. Cette observation laisse supposer que ce peptide subit des modifications post-traductionnelles importantes, ce qui est fréquemment rencontrés chez les microcines. Il apparaît donc que nos travaux sont les premiers à ce jour à avoir décrit des bactériocines de type microcines chez une bactérie du genre *Pseudoalteromonas*.

Conclusion générale et perspectives

La diversité des organismes vivants du monde marin offre un potentiel conséquent pour l'exploitation et la découverte de substances naturelles bioactives. Au sein de cette considérable chimiodiversité, les invertébrés marins continuellement exposés aux microorganismes pathogènes environnants et uniquement pourvus d'un système immunitaire primitif, sans mémoire, représentent un réservoir unique de molécules bioactives de défenses. Les peptides antimicrobiens sont des éléments clés du système de défense des invertébrés marins. Leur purification et leur caractérisation sont d'un intérêt considérable dans l'identification de nouvelles molécules naturelles, originales d'un point de vue biochimique et performantes par leur large spectre d'action antimicrobien.

Face au caractère ubiquitaire des peptides antimicrobiens, nous nous sommes attachés à la mise en évidence de telles molécules chez des mollusques bivalves et gastéropodes d'intérêt aquacole. Pour ce faire, nous avons sélectionné des espèces de mollusques d'intérêt économique pour la conchyliculture française. Quatre espèces de bivalves : *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Cerastoderma edule*, *Ruditapes philippinarum* et 3 espèces de gastéropodes *Buccinum undatum*, *Littorina littorea*, *Crepidula fornicata* ont ainsi été étudiés.

La pré-purification sur colonne SPE-C18 et l'élution par 3 concentrations en ACN (10%, 40% et 80%) des extraits acides de ces mollusques et de l'hémolymphe de *C. gigas* nous a conduit à détecter des molécules à caractère amphiphile présentant des activités antivirale et antibactérienne chez ces espèces.

Parmi les fractions purifiées obtenues, les fractions-SPE 40% des extraits de *C. edule*, et *L. littorea* et de l'hémolymphe de *C. gigas* se sont avérées être les plus actives par leur plus large spectre d'action et l'efficacité des activités antimicrobiennes (mesure des CMI les plus faibles et des pourcentages de protection antivirale les plus élevés) sur des pathogènes bactériens et viraux sélectionnés. Dans cette étude, nous avons montré que ces substances antimicrobiennes amphiphiles étaient de nature peptidique, d'une masse moléculaire proche de 3,5 kDa, et agissant *via* un effet bactéricide sur des bactéries cibles. Les composés actifs présentent donc les caractéristiques de peptides antimicrobiens.

Dans la mesure où les peptides antibactériens sont produits par les cellules hémocytaires et semblent être exprimés de façon constitutive chez les huîtres (Bachère *et al.*, 2004; Hancock *et al.*, 2006), nous nous sommes attaché à la purification de peptides chez *C. gigas*. Sa fraction-SPE 40% pré-purifiée présente l'activité antibactérienne la plus forte (mesure d'une CMI de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contre *M. luteus* et *B. megaterium*) et l'hémolymphe, elle-même,

présente une forte protection antivirale ($97,6 \pm 1,2\%$ de protection antivirale vis-à-vis de VHS-1).

Bien que l'identification de la structure précise de tels composés de nature peptidique responsables de l'activité antivirale n'a pas abouti par la purification selon des méthodes biochimiques et chimiques, nous avons tout du moins pu montrer que des peptides présentant une activité antivirale sont présents au sein de l'hémolymphe de *C. gigas*.

En revanche, la purification de la fraction-SPE 40% pré-purifiée à partir de l'hémolymphe de *C. gigas* a permis d'aboutir à l'identification de peptides antibactériens de différentes masses moléculaires : 4464,10 Da, 3158 Da, 655,42 Da et finalement 636,17 Da. Hormis leur masse moléculaire et leur activité biologique, aucune information structurale supplémentaire n'a pu être obtenue pour les 3 premiers peptides purifiés. Le microséquençage du 4^{ème} peptide purifié (636,17 Da) à partir de l'hémolymphe de *C. gigas* a montré qu'il s'agissait d'un heptapeptide de séquence : X-P-P-X-X-I-V (X : résidus non définis). Ce peptide inédit et original n'a jamais été identifié chez un mollusque bivalve auparavant. Ce peptide ne présente pas d'homologie avec les défensines des bivalves connues à ce jour. De même, la séquence de ce peptide ne se rapproche pas de la séquence du peptide Cg-Prp présentant une région cationique riche en proline exprimée dans les hémocytes de *C. gigas*, récemment décrite par Gueguen *et al.* (2009). Les éléments de structures définis au cours de ces travaux montrent la présence de 3 résidus d'acides aminés « exotiques » non identifiés par séquençage selon la méthode d'Edman. Sur la base des informations recueillies (microséquençage et spectrométrie de masse) nous avons émis l'hypothèse que ces acides aminés non identifiés pourraient correspondre à une déhydroalanine (Dha) et une lanthionine. Ces acides aminés résultant de modifications post-traductionnelles sont généralement décrits chez certaines bactériocines synthétisées par des bactéries à Gram⁺, les lantibiotiques. La synthèse en phase solide de peptides bruts et purifiés à partir d'une telle séquence a permis d'obtenir plusieurs analogues de synthèse dont l'activité anti-*M. luteus* s'est révélée pour des concentrations faibles comprises entre 1 mM et 5 mM.

Bien que la synthèse d'un tel peptide se soit avérée complexe du fait des modifications post-traductionnelles essentielles à l'activité, nous avons tout de même vérifié l'importance de ponts thioéther dans sa séquence. Les acides aminés exotiques tels que la Dha et la lanthionine semblent jouer un rôle prédominant dans les relations structure-activité des lantibiotiques.

Si certains lantibiotiques de type A comme la nisine sont capables de déstabiliser les membranes bactériennes pour des concentrations de l'ordre du micromolaire, un remplacement de la Dha par une Dhb (déhydrobutyryne) en position 5 de la nisine Z réduit son

activité de 5 à 10 fois (Guder *et al.*, 2000). Bien que l'effet d'un changement de résidus acides aminés soit difficile à prédire, il a été démontré pour plusieurs lantibiotiques que des mutations affectant les résidus engagés dans la formation de ponts thioéther provoquent généralement une diminution de l'activité, voire une perte totale. C'est le cas par exemple de l'épidermine S19A et de la nisine S23A (Guder *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les modifications des lantibiotiques (ponts thioéther et résidus acides déhydroaminés) présentent un réel défi pour déterminer leur structure primaire (Martin *et al.*, 2004). De ce fait, l'obtention de peptides synthétiques ayant une structure du type de celles des lantibiotiques est bien souvent difficile à obtenir par la technique de dégradation d'Edman. Il est de fait, que par substitution de la Dha par une alanine nous avons obtenu des analogues de synthèse dont un peptide brut (C), présentant des activités anti-*M. luteus*, à la concentration de 1,25 mM.

La production de ce type de peptide est néanmoins originale chez les eucaryotes. Compte tenu de cette observation et de l'isolement de 4 composés différents au cours des 4 purifications, nous nous sommes interrogé sur l'origine de ces composés, à savoir si le peptide partiellement séquencé ne proviendrait pas d'une production bactérienne constituant la flore de *C. gigas*. En effet, l'association commensale bivalve/bactérie est souvent décrite dans la littérature (Bachère *et al.*, 2004). La production de substance de type « Bacteriocin-Like Inhibitory Substance » (BLIS) dans ce type d'association est également avérée (Romanenko *et al.*, 2008).

La présence d'une molécule de défense de nature bactérienne est en accord avec l'hypothèse émise depuis plusieurs années par de nombreux auteurs sur l'influence de la *microflore* dans la protection des organismes. L'influence de cette microflore s'avère également prépondérante dans les relations intra- et inter-spécifiques (Ridley *et al.*, 2005; Uria & Piel, 2009). La plupart des métabolites bioactifs utilisés comme défenses chimiques (par leurs effets dissuasif, destructeur ou répulsif par exemple vis-à-vis d'organismes prédateurs), sont en fait produits par des symbiotes ou par l'association entre l'hôte et le symbiote, mais pas par l'hôte isolé (Haefner, 2003; Dunlap *et al.*, 2007; Wijffels, 2007). Cependant, les relations entre les différents membres de ces associations restent complexes et peu connues (Wijffels, 2007). Ainsi, certains produits naturels isolés à partir d'invertébrés marins ont été suspectés de provenir d'une origine microbienne. Il semblerait que ce soit le cas pour une majorité des molécules d'origine marine (Haefner, 2003). Par exemple la bryostatine 1, macrocyclique lactone actuellement en phase II d'essais cliniques pour le traitement de certains cancers et isolée à partir du bryozoaire *Bugula neritina*, est finalement

synthétisée par son symbionte bactérien *Candidatus Endobugula sertula* (Davidson *et al.*, 2001). Bien qu'il ne soit pas cultivable, la présence de ce symbionte *Candidatus Endobugula sertula* chez le bryozoaire *Bugula neritina* a été confirmé (Sharp *et al.*, 2007). Le gène à l'origine de la biosynthèse de bryostatine a été cloné chez *Endobugula sertula* (Sudek *et al.*, 2007). De même, l'agent anticancéreux, la dolastatine 10, initialement isolé à partir de *Dolabella auricularia* possède un analogue très proche, la symplostatine produite par la cyanobactérie *Symploca hydroides*, connue pour être présente dans l'alimentation de *D. auricularia* (Mooberry S.L. *et al.*, 2003).

Face à ce constat, il nous est apparu judicieux d'étudier la microflore cultivable au sein de l'hémolymphe de *C. gigas* et de rechercher des souches bactériocinogènes. Il s'avère difficile de démontrer l'origine microbienne de composés actifs d'origine marine car seulement 0,1 à 1% des bactéries marines sont cultivables. Cependant, l'identification de plusieurs souches des genres *Vibrio* et *Pseudoalteromonas* dans l'hémolymphe de *C. gigas* a confirmé la présence de bactéries antagonistes chez ce bivalve. Selon Ringo (2008), un certain nombre de bactéries marines issues des genres *Vibrio* et *Pseudoalteromonas* est suspecté de constituer la flore commensale de certains animaux marins et notamment des mollusques bivalves (Ringø, 2008). Ces bactéries, vraisemblablement non pathogènes pour leur hôte, vivent en commensalisme et pourraient jouer le rôle d'antagoniste vis-à-vis de pathogènes potentiels. Cette flore assurerait une action protectrice de l'hôte par une compétition vis-à-vis de la niche écologique (Ringø, 2008).

L'étude et la purification à partir du surnageant d'une des souches de *Pseudoalteromonas* spp., la souche hCg 5 isolée, a contribué à l'identification d'un peptide d'un rapport *m/z* de 955 et présentant un certain nombre de caractéristiques des BLIS. La purification de bactériocines issues du surnageant bactérien de *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 isolée de l'hémolymphe de *C. gigas* a toutefois permis de renforcer l'hypothèse du rôle joué par les bactéries commensales chez ce bivalve et de mettre en évidence la production de BLIS présentant les caractéristiques des microcines. Les microcines sont des peptides antibactériens de masse moléculaire inférieure à 10 kDa, thermostables, synthétisés par la voie ribosomale par des bactéries à Gram⁻ (Severinov *et al.*, 2007).

Parmi les travaux révélant la production de BLIS chez des espèces du genre *Pseudoalteromonas*, aucun ne fait référence à une microcine ou une molécule apparentée. Ces résultats suggèrent l'originalité de la production de ce type de bactériocine par des *Alteromonadacea*.

Tableau 27 : Bactéries bénéfiques isolées et testées comme agents biologiques chez des bivalves marins.

Bactéries bénéfiques	Bivalves hôtes	Références
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	<i>Argopecten purpuratus</i>	(Riquelme <i>et al.</i> , 1996)
<i>Vibrio</i> sp. C33	<i>Argopecten purpuratus</i>	(Riquelme <i>et al.</i> , 1997; Riquelme <i>et al.</i> , 2000; Riquelme <i>et al.</i> , 2001)
<i>Pseudomonas</i> sp. 11	<i>Argopecten purpuratus</i>	(Avendaño & Riquelme, 1999)
<i>Bacillus</i> sp. B2	<i>Argopecten purpuratus</i>	(Riquelme <i>et al.</i> , 2001)
<i>Arthrobacter</i> sp. 77	<i>Argopecten purpuratus</i>	(Riquelme <i>et al.</i> , 2000)
<i>Alteromonas</i> sp. CA2	<i>Crassostrea gigas</i>	(Douillet & Langdon, 1993; Douillet & Langdon, 1994)
<i>Alteromonas media</i> A199	<i>Crassostrea gigas</i>	(Gibson <i>et al.</i> , 1998; Lategan <i>et al.</i> , 2006)
<i>Vibrio</i> spp.	Oyster larvae (<i>Crassostrea virginica</i>)	(Elston <i>et al.</i> , 1981)
<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Pecten maximus</i>	(Ruiz <i>et al.</i> , 1995; Ruiz <i>et al.</i> , 1996)
<i>Roseobacter</i> sp. BS107	<i>Pecten maximus</i>	(Ruiz-Ponte <i>et al.</i> , 1999)

Nous avons donc révélé au cours de cette étude la présence de composés antimicrobiens assimilés à des peptides retrouvés chez des espèces de mollusques bivalves et gastéropodes. La purification de l'hémolymphe de *C. gigas* et du surnageant de la bactérie *Pseudoalteromonas* spp. souche hCg 5 a révélé la présence de peptides de faibles masses moléculaires originaux.

Bien qu'il soit difficile de valoriser de telles molécules, l'identification de la présence de peptides antimicrobiens chez les mollusques marins permet d'élargir les connaissances sur leurs molécules de défense. Compte tenu des nombreuses épizooties répertoriées chez les mollusques et autres invertébrés marins d'élevage, il est important d'acquérir une connaissance plus approfondie de leur système de défense. A cette fin, l'identification et l'étude de la structure et du mode d'action de peptides antimicrobiens chez des espèces aquacoles peuvent contribuer à mieux appréhender leur rôle et leur fonctionnement. La structure des peptides antimicrobiens a une implication directe sur leur mode d'action. Il est donc d'intérêt de mieux comprendre comment ces peptides produits par des mollusques marins peuvent lutter contre les pathogènes environnants. La maîtrise génétique de la production de telles molécules de défense pourrait contribuer au maintien de leur survie en situation d'agression par des pathogènes et ainsi assurer la pérennité de leur production. De la même manière, une meilleure compréhension et connaissance des bactéries productrices de BLIS et du type de molécules qu'elles produisent rejoint le concept relatif à l'intérêt porté à ces molécules naturelles antibiotiques.

L'utilisation de bactéries bénéfiques est devenue un moyen de biocontrôle d'intérêt chez les poissons, les crustacés et les mollusques bivalves en aquaculture (Jorquera *et al.*, 2001). Même si plusieurs travaux ont déjà permis de rapporter la présence et l'utilisation potentielle de bactéries probiotiques à partir d'animaux marins et de l'environnement marin, l'utilisation de bactéries probiotiques en aquaculture reste limitée à une application piscicole et en crevetticulture (Nicolas *et al.*, 2007). Des essais dans des bassins de culture larvaire de mollusques bivalves tels que l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la coquille Saint Jacques *Pecten maximus*, la coquille Chilienne *Argopecten purpuratus* et la palourde *Ruditapes philippinarum* ont néanmoins révélé l'effet bénéfique de l'application de ces souches (Tableau 27) sur la survie larvaire (Elston *et al.*, 1981; Douillet & Langdon, 1993; Douillet & Langdon, 1994; Ruiz *et al.*, 1995; Riquelme *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 1996; Riquelme *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1998; Avendaño & Riquelme, 1999; Gatesoupe, 1999; Riquelme *et al.*, 2000; Riquelme *et al.*, 2001; Lategan *et al.*, 2006; Ringø, 2008). Il n'en reste pas moins que le

devenir de ces souches bactériennes dans l'environnement reste incertain. Elles peuvent engendrer des conséquences non maîtrisables, comme provoquer l'émergence de souches pathogènes, se diffuser dans l'environnement marin et présenter des effets néfastes sur d'autres organismes.

En conséquence de quoi, le bilan de ces travaux met en évidence la production de peptides à activités antibactériennes, bien que la structure supposée n'ait pas été confirmée. Il pourrait être envisagé d'approfondir la détermination des séquences des peptides purifiés par d'autres méthodes telle que la résonance magnétique nucléaire.

Dans la mesure où la composition des microbiontes endogènes est variable, il serait intéressant d'étudier plus précisément la relation et le rôle que peuvent jouer ces bactéries sur la stimulation des défenses immunitaires de son hôte. Certains travaux suggèrent que ces bactéries jouent un rôle bénéfique par stimulation des défenses immunitaires cellulaires de l'hôte ou en déclenchant une cascade de signalisation intervenant sur la désactivation de la production de facteurs de virulence des pathogènes potentiels (Balcázar *et al.*, 2007). Une meilleure connaissance des mécanismes mis en jeu dans ce type de relation, commensale bivalve/bactérie, ainsi que l'identification des substances produites par le symbionte et leur mode d'action pourrait donc apporter des informations conséquentes sur les moyens de protection des bivalves. Certaines bactéries perçues comme candidates pour être employées en tant que probiotiques présentent une activité antivirale (Balcázar *et al.*, 2006). Comprendre de quelle manière ces bactéries peuvent jouer un rôle dans l'inhibition ou la régulation de la réplication virale au sein de leur hôte pourrait être une voie à explorer.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdel-Raouf, N. and Ibraheem, B.M.I., 2008. Antibiotic activity of two *Anabaena* species against four fish pathogenic *Aeromonas* species. *African Journal of Biotechnology* 7, 2644-2648.
- Aladaileh, S., Nair, S.V., Birch, D., Raftos, D.A., 2007. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 48-63.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C., Bierbaum, G., 2000. Biosynthesis of the Lantibiotic Mersacidin: Organization of a Type B Lantibiotic Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2565-2571.
- Amiche, M., Seon, A.A., Wroblewski, H., Nicolas, P., 2000. Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *European Journal of Biochemistry* 267, 4583-4592.
- Anderson, R.S., 1994. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 89-96.
- Anderson, R.S. and Beaven, A.E., 2001. Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. *Aquatic Living Resources* 14, 343-349.
- Anderson, R.S., Kraus, B.S., McGladdery, S.E., Reece, R.S., Stokes, N.A., 2003. A thraustochytrid protist isolated from *Mercenaria mercenaria*: molecular characterization and host defense responses. *Fish and Shellfish Immunology* 15, 183-194.
- Anderson, R.S., Oliver, L.M., Bruchacher, L.L., 1992. Superoxide anion generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 303-307.
- Andreu, D. and Rivas, L., 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers (Peptide Science)* 47, 415-433.
- Aneiros, A. and Garateix, A., 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B* 803, 41-53.
- Arimoto, R. and Tripp, M.R., 1977. Characterization of a bacterial agglutinin in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 30, 406-413.
- Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., 2000a. Nitrite release in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquatic Living Resources* 13, 173-177.
- Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., Roch, P., 2000b. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *European Journal of Cell Biology* 79, 513-519.
- Ashour, M., Edrada, R., Ebel, R., Wray, V., Watjen, W., Padmakumar, K., Muller, W.E.G., Lin, W.H., Proksch, P., 2006. Kahalalide Derivatives from the Indian Sacoglossan Mollusk *Elysia grandifolia*. *Journal of Natural Products* 69, 1547-1553.
- Auffret, M., 1986. Internal defense in bivalve molluscs: ultrastructural observations on the fate of experimentally injected bacteria in *Ostrea edulis* granular hemocytes. *Pathology in marine aquaculture- European aquaculture society, special publication* 9, 351-356.
- Auffret, M., 1989. Comparative study of the hemocytes of two oyster species: the European flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Shellfish Research* 8, 367-373.
- Avendaño, R.E. and Riquelme, C.E., 1999. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research* 30, 893-900.
- Babarro, J.M.F. and de Zwaan, A., 2001. Factors involved in the (near) anoxic survival time of *Cerastoderma edule*: associated bacteria vs. endogenous fuel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128, 325-337.
- Babarro, J.M.F. and De Zwaan, A., 2008. Anaerobic survival potential of four bivalves from different habitats. A comparative survey. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 108-113.

- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P., Fiala-Medioni, A., Deutsch, J.S., 2002. Phylogenetic Analysis of Invertebrate Lysozymes and the Evolution of Lysozyme Function. *Journal of Molecular Evolution* 54, 652-664.
- Bachelet, G., Guillou, J., Labourg, P.-J., 1992. Adult-larval and juvenile interactions in the suspension-feeding bivalve, *Cerastoderma edule*: field observations and experiments., *Marine Eutrophication and Population Dynamics*. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 175-182.
- Bachère, E., Destoumieux, D., Bulet, P., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191, 71.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews* 198, 149-168.
- Bachère, E., Hervio, D., Mialhe, E., 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Disease of Aquatic Organisms* 11, 173-180.
- Bachère, E., Hervio, D., Mialhe, E., Grizel, H., 1990. Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Developmental and Comparative Immunology* 14, 261-268.
- Bailey, D.F. and Laverack, M.S., 1966. Aspects of the Neurophysiology of *Buccinum Undatum* L. (Gastropoda): I. Central Responses to Stimulation of the Osphradium. *Journal of Experimental Biology* 44, 131-148.
- Baker, M.A., Maloy, W.L., Zasloff, M., Jacob, L.S., 1993. Anticancer Efficacy of Magainin2 and Analogue Peptides. *Cancer Research* 53, 3052-3057.
- Balcázar, J.L., Blas, I.d., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173-186.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L., 2007. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary Microbiology* 122, 373-380.
- Baldo, B.A., Sawyer, W.H., Stick, R.V., Uhlenbruck, G., 1978. Purification and characterization of a galactan-reactive agglutinin from the clam *Tridacna maxima* and a study of its combining site. *Biochemical Journal* 175, 467-477.
- Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Morinigo, M.A., Borrego, J.J., 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4269-4275.
- Bals, R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infections. *Respiratory Research* 1, 141-150.
- Barra, D., Simmaco, M., Boman, H.G., 1998. Gene-encoded peptide antibiotics and innate immunity.: Do 'animalcules' have defence budgets? *FEBS Letters* 430, 130-134.
- Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R., Roitt, I., 2003. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 21, S2/12-S12/23.
- Bayne, C.J., Moore, M.N., Carefoot, T.H., Thompson, R.J., 1979. Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: The cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology* 34, 1-20.
- Beaumont, A. and Cassier, P., 1990. *Biologie animale*. Tome 1. Dunod, Paris, 459 pp.
- Becerro, M.A., Goetz, G., Paul, V.J., Scheuer, P.J., 2001. Chemical Defenses of the Sacoglossan Mollusk *Elysia rufescens* and Its Host Alga *Bryopsis* sp. *Journal of Chemical Ecology* 27, 2287-2299.
- Beck, G. and Habicht, G.S., 1991. Purification and biochemical characterization of an invertebrate interleukin 1. *Molecular Immunology* 28, 577-584.
- Beckmann, N., Morse, M.P., Moore, C.M., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 124-132.
- Beisswenger, C. and Bals, R., 2005. Functions of Antimicrobial Peptides in Host Defense and Immunity. *Current Protein and Peptide Science* 6, 255-264.
- Benkendorff, K., Davis, A.R., Bremner, J.B., 2001. Chemical Defense in the Egg Masses of Benthic Invertebrates: An Assessment of Antibacterial Activity in 39 Mollusks and 4 Polychaetes. *Journal of Invertebrate Pathology* 78, 109-118.
- Beutler, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40, 845-859.

- Bhunja, A.K. and Johnson, M.G., 1992. A modified method to directly detect in SDS-PAGE the bacteriocin of *Pediococcus acidilactici*. Letters in Applied Microbiology 15, 5-7.
- Biemann, K. and Martin, S.A., 1987. Mass spectrometric determination of the amino acid sequence of peptides and proteins. Mass Spectrometry Reviews 6, 1-76.
- Birkemo, G.A., Luders, T., Andersen, O., Nes, I.F., Nissen-Meyer, J., 2003. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics 1646, 207-215.
- Blanchard, M., 1995. Origine et état de la population de *Crepidula fornicata* (Gastropoda Prosobranchia) sur le littoral français. Haliotis 24, 75-86.
- Blanchard, M., 1997. Spread of the slipper limpet *Crepidula fornicata* (L. 1758) in Europe. Current state and consequences. Scientia Marina (Barcelona) 61, 109-118.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.-P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2008. Marine natural products. Natural Product Reports 25, 35-94.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2006. Marine natural products. Natural Product Reports 23, 26-78.
- Boman, H.G., Agerberth, B., Boman, A., 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. Infection and Immunity 61, 2978-2984.
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., Moraga, D., 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell Stress & Chaperones 8, 76-85.
- Bowman, H.G., Marsh, J., Goode, J.A., 1994. Symposium on Antimicrobial peptides. In: Wiley (Ed.), Ciba Foundation Symposium. John Wiley & Sons, London, U.K.
- Bowman, J., 2007. Bioactive Compound Synthetic Capacity and Ecological Significance of Marine Bacterial Genus *Pseudoalteromonas*. Marine Drugs 5, 220-241.
- Brahmachary, M., Krishnan, S.P.T., Koh, J.L.Y., Khan, A.M., Seah, S.H., Tan, T.W., Brusic, V., Bajic, V.B., 2004. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. Nucleic Acids Research 32, D586-D589.
- Bramble, L.H. and Anderson, R.S., 1997. Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. Developmental and Comparative Immunology 21, 337-348.
- Bramble, L.H. and Anderson, R.S., 1998. A comparison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and morone saxatilis phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum*. Developmental and Comparative Immunology 22, 55-61.
- Brand, G.D., Leite, J.R.S.A., de Sa Mandel, S.M., Mesquita, D.A., Silva, L.P., Prates, M.V., Barbosa, E.A., Vinecky, F., Martins, G.R., Galasso, J.H., Kuckelhaus, S.A.S., Sampaio, R.N.R., Furtado, J.J.R., Andrade, A.C., Bloch, J.C., 2006. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). Biochemical and Biophysical Research Communications 347, 739-746.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E., Sahl, H.-G., 1998a. The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42, 154-160.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., Sahl, H.-G., 1998b. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. Molecular Microbiology 30, 317-327.
- Buckman, K., Hynes, A., Orchard, E., 2005. Movement of the common periwinkle (*Littorina littorea*) at Woodneck Beach, Falmouth, Massachusetts, for Marine Invertebrates of Cape Cod, Topics Course, Fall Semester 2005.
- Buggé, D.M., Hégaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. Fish & Shellfish Immunology 23, 188-196.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L., Hoffmann, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Developmental and Comparative Immunology 23, 329-344.
- Bulet, P. and Stöcklin, R., 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. Protein and Peptides Letters 12, 3-11.
- Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological Reviews 198, 169-184.

- Bulgakov, A.A., Park, K.-I., Choi, K.-S., Lim, H.-K., Cho, M., 2004. Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish & Shellfish Immunology* 16, 487-499.
- Cajaraville, M.P., Abascal, I., Etxeberria, M., Marigómez, I., 1995. Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: Time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. *Environmental Toxicology & Water Quality* 10, 1-8.
- Calvez, I., 2003. Approche de la variabilité spatiale d'une population de palourdes *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), aux stades larvaires et post-larvaires. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002a. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 57, 469-476.
- Canesi, L., Scarpato, A., Betti, M., Ciacci, C., Pruzzo, C., Gallo, G., 2002b. Bacterial killing by mytilus hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Marine Environmental Research* 54, 547-551.
- Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C., Villalba, A., 1997a. Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 70, 96-105.
- Carballal, M.J., Lopez, M.C., Azevedo, C., Villalba, A., 1997b. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 127-135.
- Carriel-Gomes, M.C., Kratz, J.M., Barracco, M.A., Bachère, E., Monte Barardi, C.R., Oliveira Simões, C.M., 2007. In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 469-472.
- Carriel-Gomes, M.C., Kratz, J.M., Müller, V.D.M., Barardi, C.R.M., Simões, C.M.O., 2006. Evaluation of antiviral activity in hemolymph from oysters *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 19, 189-193.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P., 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* 187, 381-386.
- Castro, D., Pujalte, M.J., Lopez-Cortes, L., Garay, E., Borrego, J.J., 2002. Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities. *Journal of Applied Microbiology* 93, 438-447.
- Cesari, P. and Pellizzato, M., 1990. *Biologia di Tapes philippinarum*. In: Veneto, E.d.S.A. (Ed.), *Biologia e Sperimentazione*, pp. 21-46.
- Chagot, D., Boulo, V., Hervio, D., Mialhe, E., Bachère, E., Mourton, C., Grizel, H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 241-249.
- Chan, D.I., Prenner, E.J., Vogel, H.J., 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 1184-1202.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P., 1996. Innate Immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 21808-21813.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., van der Donk, W.A., 2005. Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. *Chemical Reviews* 105, 633-684.
- Chen, F.-Y., Lee, M.-T., Huang, H.W., 2003. Evidence for Membrane Thinning Effect as the Mechanism for Peptide-Induced Pore Formation. *Biophysical Journal* 84, 3751-3758.
- Chen, H. and Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 82-100.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate blood cells*. Academic Press Inc., London, pp. 223-299.
- Cheng, T.C., 1983a. The Role of Lysosomes in Molluscan Inflammation1. *American Zoologist* 23, 129-144.
- Cheng, T.C., 1983b. Triggering of immunological defense mechanisms in molluscan shellfish by biotic and abiotic challenge and its application. *Marine Technology Society Journal* 17, 18-25.

- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions, in: The eastern oyster *Crassostrea virginica*. In: Newell, R.I.E., Kennedy, V.S., Eble, A.F. (Eds.). Maryland Sea Grant College, pp. 299-329.
- Cheng, T.C. and Downs, J.C.U., 1988. Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 52, 163-167.
- Cheng, T.C. and Foley, D.A., 1975. Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*: An electron microscopical study. *Journal of Invertebrate Pathology* 26, 341-351.
- Cheng, T.C., Lie, K.J., Heyneman, D., Richards, C.S., 1978. Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda). *Journal of Invertebrate Pathology* 31, 57-62.
- Cheng, T.C., Rodrick, G.E., Foley, D.A., Koehler, S.A., 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology* 25, 261-265.
- Cheng, T.C. and Rudo, B.M., 1976. Distribution of glycogen resulting from degradation of ¹⁴C-labelled bacteria in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 27, 259-262.
- Chhibber, S. and Vadehra, D.V., 1986. Purification and characterization of bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae* 158. *Journal of General Microbiology* 132, 1051-1054.
- Chinchar, V.G., Bryan, L., Silphadaung, U., Noga, E., Wade, D., Rollins-Smith, L., 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* 323, 268.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology. Immunobiology and Pathology*. Enfield, NH, Plymouth, UK, pp. 1-42.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 677-693.
- Cimino, G., Fontana, A., Gavagnin, M., 1999. Marine opisthobranch molluscs: chemistry and ecology in sacoglossans and dorids. *Current Organic Chemistry* 3, 327-372.
- Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G., 1997. Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. *Journal of Biological Chemistry* 272, 12008-12013.
- Cole, H.A., 1956. A preliminary study of growth-rate in cockles (*Cardium edule* L.) in relation to commercial exploitation. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 22, 77-90.
- Colwell, R.R. and Liston, J., 1960. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology* 8, 104-109.
- Colwell, R.R. and Sparks, A.K., 1967. Properties of *Pseudomonas enalia*, a Marine Bacterium Pathogenic for the Invertebrate *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Applied Microbiology* 15, 980-986.
- Comps, M. and Duthoit, J.L., 1979. Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (Lmk) et *C. gigas* (Th.). *Haliotis* 8, 301-308.
- Conlon, J.M., Abraham, B., Sonnevend, A., Jouenne, T., Cosette, P., Leprince, J., Vaudry, H., Bevier, C.R., 2005. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the carpenter frog *Rana virgatipes* (Ranidae, Aquarana). *Regulatory Peptides* 131, 38-45.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3, 777-788.
- Creek, G.A., 1960. The development of the Lamellibranch *Cardium edule* L. *Proceedings of the Zoological Society of London* 135, 243-260.
- Csordas, A. and Michl, H., 1970. Isolation and structural resolution of a haemolytically active polypeptide from the immune secretion of a European toad. *Monatshefte für Chemie* 101, 182-189.
- Csordás, A. and Michl, H., 1969. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. *Toxicon* 7, 103-108.
- Cudic, M. and Otvos Jr, L., 2002. Intracellular Targets of Antibacterial Peptides. *Current Drug Targets* 3, 101-106.

- Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S., 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics* 54, 442-445.
- Da Silva, P., Jouvencal, L., Lamberty, M., Bulet, P., Caille, A., Vovelle, F., 2003. Solution structure of termicin, an antimicrobial peptide from the termite *Pseudacanthotermes spiniger*. *Protein Science* 12, 438-446.
- Daffre, S., Bulet, P., Spisni, A., Ehret-Sabatier, L., Rodrigues, E.G., Travassos, L.R., 2008. Bioactive natural peptides. *Studies in Natural Products Chemistry* 35, 597-691.
- Dagan, A., Efron, L., Gaidukov, L., Mor, A., Ginsburg, H., 2002. In Vitro Antiplasmodium Effects of Dermaseptin S4 Derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1059-1066.
- Dam, T.K., Sarkar, M., Ghosal, J., Choudhury, A., 1992. A novel galactosyl-binding lectin from the plasma of the blood clam, *Anadara granosa* (L.) and study of its combining site. *Molecular and Cellular Biochemistry* 117, 1-9.
- Das, B.K., Samal, S.K., Samantaray, B.R., Sethi, S., Pattnaik, P., Mishra, B.K., 2006. Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 253, 17-24.
- Davidson, S.K., Allen, S.W., Lim, G.E., Anderson, C.M., Haygood, M.G., 2001. Evidence for the Biosynthesis of Bryostatins by the Bacterial Symbiont "*Candidatus* Endobugula sertula" of the Bryozoan *Bugula neritina*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4531-4537.
- de-la-Re-Vega, E., Garcia-Galaz, A., Diaz-Cinco, M.E., Sotelo-Mundo, R.R., 2006. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 405-408.
- De Smet, K. and Contreras, R., 2005. Human Antimicrobial Peptides: Defensins, Cathelicidins and Histatins. *Biotechnology Letters* 27, 1337-1347.
- de Vos, W.M., Kuipers, O.P., van der Meer, J.R., Siezen, R.J., 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: posttranslationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 17, 427-437.
- De Vries, D.J. and Hall, M.R., 1994. Marine biodiversity as a source of chemical diversity. *Drug Development Research* 33, 161-173.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 193-202.
- Department of Fisheries and Oceans (DFO), 1998. Periwinkles (*Littorina littorea*), DFO Science Stock Status Report C3-46., Government of Canada.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., Bachere, E., 1997. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry* 272, 28398-28406.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachère, E., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science* 113, 461-469.
- Dimarçq, J.-L., Bulet, P., Hetru, C., Hoffmann, J., 1998. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Peptide Science* 47, 465-477.
- Douillet, P. and Langdon, C.J., 1993. Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. *The Biological Bulletin* 184, 36-51.
- Douillet, P.A. and Langdon, C.J., 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119, 25-40.
- du Toit, E.A. and Rautenbach, M., 2000. A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods* 42, 159-165.
- Dubber, D. and Harder, T., 2008. Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture* 274, 196-200.
- Dufour, A., Hindré, T., Haras, D., Le Pennec, J.-P., 2007. The biology of lantibiotics from the lacticin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 134-167.
- Dunlap, W.C., Battershill, C.N., Liptrot, C.H., Cobb, R.E., Bourne, D.G., Jaspars, M., Long, P.F., Newman, D.J., 2007. Biomedicinals from the phytosymbionts of marine invertebrates: A molecular approach. *Methods* 42, 358-376.

- Dupont, L., 2004. Invasion des côtes françaises par le mollusque exotique *Crepidula fornicata*: contribution de la dispersion larvaire et du système de reproduction au succès de la colonisation. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI.
- Dupuy, J.W., Bonami, J.R., Roch, P., 2004. A synthetic antibacterial peptide from *Mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome virus in palaemonid shrimp. *Journal of Fish Diseases* 27, 57-64.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S., 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports* 24, 708-734.
- Eble, A.F. and Scro, R., 1996. General anatomy. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), *The Eastern oyster C. virginica*. Maryland Sea Grant College, pp. 19-30.
- Edman, P., 1950. Edman automatique degradation, 283 pp.
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J.A., van Dorsselaer, A., Bulet, P., 1996. Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood. *Journal of Biological Chemistry* 271, 29537-29544.
- Elion, G.B., 1993. Acyclovir: discovery, mechanism of action and selectivity. *Journal of Medical Virology* 1, 2-6.
- Elston, R., Leibovitz, L., Relyea, D., Zatlá, J., 1981. Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: Diagnostic tools and management features. *Aquaculture* 24, 53-62.
- Eno, N.C., Clark, R.A., Sanderson, W.G., 1997. A review and directory of non-native marine species in British waters. Peterborough, UK, 152 pp.
- Epanand, R.M. and Vogel, H.J., 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica and Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology* 1462, 11-28.
- Fabioux, C., 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale.
- Faisal, M., MacIntyre, E.A., Adham, K.G., Tall, B.D., Kothary, M.H., La Peyre, J.F., 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 121, 161-168.
- FAO, c2006-2008. Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées - *Ostrea edulis*. Text by Gouilletquer, P. In *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Updated 1 jan 2004, Rome.
- FAO©, 2007-2009. Fisheries Gateway. Fiches d'information sur les pêches et l'aquaculture, FAO Fisheries and Aquaculture Department [en ligne]. Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/fr.
- FAO©, 2008-2009. Fisheries Topics: Research. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture (SOFIA). Texte par Jean- Francois Pulvenis in: FAO Fisheries and Aquaculture Department [en ligne]. Rome.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briand, J.P., Roussel, J.P., Letellier, L., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1221-1225.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W.F., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 1994. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *Journal of Biological Chemistry* 269, 33159-33163.
- Feng, S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oyster and mussels. *American Fisheries Society Special Publication* 18, 153-168.
- Fernandez, L., Lopez, J.R., Secades, P., Menendez, A., Marquez, I., Guijarro, J.A., 2003. In Vitro and In Vivo Studies of the Yrp1 Protease from *Yersinia ruckeri* and Its Role in Protective Immunity against Enteric Red Mouth Disease of Salmonids. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7328-7335.
- Fisher, W.S., 1986. Structure and function of oyster hemocytes. In: Brehelin, M. (Ed.), *Immunity in invertebrates*. Springer, Berlin, pp. 25-35.
- Fisher, W.S., 1992. Occurrence of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 162, 1-13.

- Fisher, W.S. and DiNuzzo, A.R., 1991. Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology* 57, 380-394.
- Flassch, J.P. and Leborgne, Y., 1992a. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and effects on aquaculture production and natural settlement. ICES Marine Symposium, pp. 92-96.
- Flassch, J.P. and Leborgne, Y., 1992b. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and effects on aquaculture production and natural settlement. ICES Marine Symposium 194, 92-96.
- Fleury, H.J.A., 1993. *Virologie humaine*, 209 pp.
- Ford, S.E. and Ashton-Alcox, K.A., 1993. A comparison of methods for identifying molluscan hemocytes. *Journal of Shellfish Research* 12, 360-361.
- Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A., Kanaley, S.A., 1994. Comparative Cytometric and Microscopic Analyses of Oyster Hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 64, 114-122.
- Franchini, A., Fontanili, P., Ottaviani, E., 1995. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 110, 403-407.
- Frank, R.W., Gennaro, R., Schneider, K., Przybylski, M., Romeo, D., 1990. Amino acid sequences of two proline-rich bactericins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 265, 18871-18874.
- Freund, S., Jung, G., Gibbons, W.A., Sahl, H.-G., 1991. NMR and circular dichroism studies on Pep5. In: Sahl, H.-G., Jung, J. (Eds.), *Nisin and Novel Lantibiotics*. ESCOM Scientific Publishers BV, Leiden., pp. 103-112.
- Galstoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service* 64, 1-480.
- Ganz, T. and Lehrer, R.I., 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Current Opinion in Immunology* 10, 41-44.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., Lehrer, R.I., 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation* 76, 1427-1435.
- Garson, M., 2006. Marine Mollusks from Australia and New Zealand: Chemical and Ecological Studies. In: Cimino, G., Gavagnin, M. (Eds.), *Molluscs*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2006, pp. 159-174.
- Gaspar, H., Cutignano, A., Ferreira, T., Calado, G., Cimino, G., Fontana, A., 2008. Biosynthetic Evidence Supporting the Generation of Terpene Chemodiversity in Marine Mollusks of the Genus *Doriopsilla*. *Journal of Natural Products* 71, 2053-2056.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Gaudette, M.F., Lowther, J.L., Pechenik, J.A., 2001. Heat shock induces metamorphosis in the larvae of the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 266, 151-164.
- Gazit, E., Bach, D., Kerr, I.D., Sansom, M.S., Chejanovsky, N., Shai, Y., 1994. The α -5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: in vitro activity, ion channel formation and molecular modeling. *Biochemical Journal* 304, 895-902.
- Gazit, E., Miller, I.R., Biggin, P.C., Sansom, M.S.P., Shaif, Y., 1996. Structure and Orientation of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 within Phospholipid Membranes. *Journal of Molecular Biology* 258, 860-870.
- Gendron, L., 1992. Determination of the size and sexual maturity of the waved whelk, *Buccinum undatum* Linnaeus, 1758, in the gulf of St. Lawrence, as a basis for the establishment of a minimum catchable size. *Journal of Shellfish Research* 11, 1-7.
- Gennaro, R. and Zanett, M., 2000. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55, 31-49.
- Gerwick, W.H., 1993. Carbocyclic oxylipins of marine origin. *Chemical Reviews* 93, 1807-1823.
- Gestal, C., Costa, M., Figueras, A., Novoa, B., 2007. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides. *Gene* 406, 134-143.
- Giamberini, L. and Pihan, J.-C., 1996. The pericardial glands of the zebra mussel: Ultrastructure and implication in lead detoxication process. *Biology of the Cell* 86, 59-65.

- Gibson, L.F., Woodworth, J., George, A.M., 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169, 111-120.
- Gillor, O., Kirkup, B.C., Riley, M.A., Allen I. Laskin, J.W.B.a.G.M.G., 2004. Colicins and Microcins: The Next Generation Antimicrobials, *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 129-146.
- Goedken, M. and DeGuise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defense mechanisms. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 539-552.
- Gonzalez, M., 2005. Etude de la réponse immunitaire chez l'huître *Crassostrea gigas*: caractérisation et fonctions de protéines de reconnaissance aux LPS et d'effecteurs antimicrobiens. Thèse de l'Université Montpellier II, Sciences et techniques du Languedoc.
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., de Lorgeril, J., Romestand, B., Bachere, E., 2007. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 31, 332-339.
- Goraya, J., Knoop, F.C., Conlon, J.M., 1999. Ranatuerin 1T: an antimicrobial peptide isolated from the skin of the frog, *Rana temporaria*. *Peptides* 1999; 20:159-160 20, 159-160.
- Gorbushin, A.M. and Iakovleva, N.V., 2008. The enigma of the haemogram "left-shift" in periwinkles infected with trematodes. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 745-754.
- Gouilletquer, P., 1989. Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Gouilletquer, P., FAO. c2006-2008, 2004. Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées - *Ostrea edulis*. In FAO Fisheries and Aquaculture Department.
- Gouilletquer, P., Héral, M., Bechemin, C., Richard, P., 1989. Abnormal calcification in the shell of the manila clams *Ruditapes philippinarum*: characterization and comparison of amino-acid content in different shell parts. *Aquaculture* 81, 169-183.
- Gourdon, I., Gricourt, L., Kellner, K., Roch, P., Escoubas, J.-M., 2000. Characterization of a cDNA Encoding a 72 kDa Heat Shock Cognate Protein (Hsc72) from the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Mitochondrial DNA* 11, 265-270.
- Gourdon, I., Guérin, M.C., Torreilles, J., Roch, P., 2001. Nitric Oxide Generation by Hemocytes of the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide* 5, 1-6.
- Gowanloch, J.N., 1927. Contribution to the study of marine gastropods: the intertidal life of *Buccinum undatum*, a study in non adaptation. *Contributions to Canada biology and fisheries* 3, 167-178.
- Greger, E.A., Drum, A.S., Elston, R.A., 1995. Measurement of Oxidative Activity in Hemocytes of the Pacific Razor Clam, *Siliqua patula*, and the Oyster, *Crassostrea gigas*, Using Lucigenin- and Luminol-Dependent Chemiluminescence. *Journal of Invertebrate Pathology* 65, 48-60.
- Grizel, H., 2003. Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins. IFREMER, Plouzané, 201 pp.
- Grizel, H., Comps, M., Bonami, J.R., Cousserans, F., Duthoit, J.L., Le Pennec, M.A., 1974. Research on the agent of digestive gland disease of *Ostrea edulis* Linné. *Sciences et Pêche Bulletin d'Information et de Documentation de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes* 240, 7-30.
- Guder, A., Wiedemann, I., Sahl, H.-G., 2000. Posttranslationally modified bacteriocins - the lantibiotics. *Peptide Science* 55, 62-73.
- Gueguen, Y., Romestand, B., Fievet, J., Schmitt, P., Destoumieux-Garzón, D., Vandenbulcke, F., Bulet, P., Bachère, E., 2009. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular Immunology* 46, 516-522.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.-P., Flament, D., Barreau-Roumiguière, C., Girardot, A.-L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E., Escoubas, J.-M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139-145.
- Gueguen, Y., Garnier, J., Robert, L., Lefranc, M.-P., Mougenot, I., de Lorgeril, J., Janech, M., Gross, P.S., Warr, G.W., Cuthbertson, B.J., Barracco, M.A., Bulet, P., Aumelas, A., Yang, Y., Bo, D., Xiang, J., Tassanakajon, A., Piquemal, D., Bachère, E., 2006a. PenBase, the shrimp

- antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 283-288.
- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J.-M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P., Bachere, E., 2006b. Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*: Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 281, 313-323.
- Guevara, J.M. and Niell, F.X., 1989. Growth rates in a continuously immersed population of *Cerastoderma edule* L. *Scie Mar* 53, 483-489.
- Guillou, J., Bachelet, G., Desprez, M., Ducrottoy, J.-P., Madani, I., Rybarczyk, H., Sauriau, P.-G., Sylvand, B., Elkaim, B., Glémarec, M., 1990. Les modalités de la reproduction de la coque (*Cerastoderma edule*) sur le littoral français de la Manche et de l'Atlantique. *Aquatic Living Resources* 3, 29-41.
- Guillou, J. and Tartu, C., 1992. Reproduction et recrutement de la coque *Cerastoderma edule* L. A Saint-Pol-De-Leon (Bretagne-Nord). *IFREMER Actes de Colloques* 13, 29-38.
- Haefner, B., 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* 8, 536-544.
- Hamann, M.T., Otto, C.S., Scheuer, P.J., Dunbar, D.C., 1996. Kahalalides: Bioactive Peptides from a Marine Mollusk *Elysia rufescens* and Its Algal Diet *Bryopsis* sp. *Journal of Organic Chemistry* 61, 6594-6600.
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance. *Biological Bulletin* 205, 160-169.
- Hamon, Y. and Peron, Y., 1963. Individualisation de quelques nouvelles familles d'entérobacteriocines. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 257, 309-311.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood* 92, 3007-3017.
- Hancock, R.E.W., 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* 1, 156-164.
- Hancock, R.E.W., Brown, K.L., Mookherjee, N., 2006. Host defence peptides from invertebrates - emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 211, 315-322.
- Hara, S. and Yamakawa, M., 1995. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical Journal* 310, 651-656.
- Harwig, S., S. L., Kokryakov, V., N., Swiderek, K., M., Aleshina, G., M., Zhao, C., Lehrer, R., I., 1995. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Letters* 362, 65-69.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Stensvag, K., Sandsdalen, E., Styrvold, O.B., 2002a. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 371-385.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, O.M., Stensvag, K., 2002b. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology* 81, 94-102.
- Haug, T., Stensvag, K., Olsen, O.M., Sandsdalen, E., Styrvold, O.B., 2004. Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85, 112-119.
- Hayward, P.J. and Ryland, J.S., 1990. *The Marine Fauna of the British Isles and North-West Europe*. Clarendon Press, Oxford.
- Hayward, P.J., Wigham, G.D., Yonow, N., 1995. Molluscs (Phylum Mollusca). In: Hayward, P.J., Ryland, J.S. (Eds.), *Handbook of the marine fauna of north-west Europe*. Oxford University Press, USA, pp. 484-628.
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 433-440.
- Helm, M.M. and Pelizzato, M., 1990. *Tapes philippinarum*: biologia e sperimentazione, Ente di Sviluppo Agricolo Veneto.
- Heng, N.C.K. and Jack, R.W., 2006. Microcins. In: Abba, J.K. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides*. Academic Press, Burlington, pp. 75-81.

- Herbinière, J., Braquart-Varnier, C., Grève, P., Strub, J.-M., Frère, J., Van Dorsselaer, A., Martin, G., 2005. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Developmental and Comparative Immunology* 29, 489-499.
- Herrero, M., Kolter, R., Moreno, F., 1986. Effects of Microcin B17 on Microcin B17-immune Cells. *Journal of General Microbiology* 132, 403-410.
- Hikima, S., Hikima, J., Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Aoki, T., 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene* 316, 187-195.
- Himsley, F.H. and Seyfried, P.L., 1962. Lethal Biosynthesis of a New Antibacterial Principle: Vibriocin. *Nature* 193, 1193-1194.
- Hine, P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 367-385.
- Hinsch, G.W. and Hunte, M., 1990. Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the american oyster. In: Perkins, F.O., Cheng, T.C. (Eds.), *Pathology in Marine Sciences*. Academic Press, San Diego, pp. 479-488.
- Hoagland, K.E., 1985. Genetic relationships between one british and several north american populations of *Crepidula fornicata* based on allozymes studies (Gastropoda: calyptraeidae). *Journal of Molluscan Studies* 51, 177-182.
- Hoebe, K., Jansen, E., Beutler, B., 2004. The interface between innate and adaptative immunity. *Nature Immunology* 5, 971-974.
- Hoffmann, R., Bulet, P., Urge, L., Otvös, L.J., 1999. Range of activity and metabolic stability of synthetic antibacterial glycopeptides from insects. *Biochimica et biophysica acta (G). General subjects* 1426, 459-467.
- Holak, T.A., Engström, A., Kraulis, P.J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T.A., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., 1988. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 27, 7620-7629.
- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., Kjelleberg, S., 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* 41, 47-58.
- Holmström, C. and Kjelleberg, S., 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* 30, 285-293.
- Hoover, D.M., Rajashankar, K.R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J.J., Chertov, O., Lubkowski, J., 2000. The Structure of Human beta -Defensin-2 Shows Evidence of Higher Order Oligomerization. *J. Biol. Chem.* 275, 32911-32918.
- Howard, D.W. and Smith, C.S., 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks, NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, Woods Hole, Massachusetts, USA, pp. 102.
- Hubert, F., Cooper, E.L., Roch, P., 1997. Structure and differential target sensitivity of the stimuable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1361, 29-41.
- Hubert, F., Noel, T., Roch, P., 1996. A member of the arthropod defensin family from the edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry* 240, 302-306.
- Huffman, J.E. and Tripp, M.R., 1982. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 40, 68-74.
- Hughes, T.K., Smith Jr, E.M., Chin, R., Cadet, P., Sinisterra, J., Leung, M.K., Shipp, M.A., Scharrer, B., Stefano, G.B., 1990. Interaction of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proceeding of Natural Academy of Sciences USA* 87, 4426-4429.
- Hughes, T.K.J., Smith Jr, E.M., Barnett, J.A., Charles, R., Stefano, G.B., 1991. LPS stimulated invertebrate hemocytes: A role for immunoreactive TNF and IL-1. *Developmental and Comparative Immunology* 15, 117-122.
- Humphreys, J., Caldow, R.W.G., McGroarty, S., West, A.D., Jensen, A.C., 2007. Population dynamics of naturalised Manila clams *Ruditapes philippinarum* in British coastal waters. *Mar Biol* 151, 2255-2270.

- Iakovleva, N.V., Gorbushin, A.M., Storey, K.B., 2006. Modulation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) activity in response to different immune stimuli in haemocytes of the common periwinkle *Littorina littorea*. *Fish & Shellfish Immunology* 21, 315-324.
- Iijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Murakami, T., Nakai, T., 2003a. Purification and characterization of three isoforms of chrysophsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *FEBS Journal* 270, 675-686.
- Iijima, R., Kisugi, J., Yamazaki, M., 2003b. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. *Developmental and Comparative Immunology* 27, 305-311.
- Ilouze, M., Dishon, A., Kahan, T., Kotler, M., 2006. Cyprinid herpes virus-3 (CyHV-3) bears genes of genetically distant large DNA viruses. *FEBS Letters* 580, 4473-4478.
- Ingolf, F., Nes, D.A.B., Helge, H., 2006. The Nonantibiotic Heat-Stable Bacteriocins in Gram-positive Bacteria. In: Abba, J.K. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides*. Academic Press, Burlington, pp. 107-113.
- Ittoop, G., George, K.C., Sanil, N.K., George, R.M., Sobhana, K.S., Nisha, P.C., 2006. Characterization of haemocytes of the Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). *Aquaculture Research* 37, 1636-1643.
- Iwai, H., Nakajima, Y., Natori, S., Arata, Y., Shimada, I., 1993. Solution conformation of an antibacterial peptide, sarcotoxin IA, as determined by ¹H-NMR. *European Journal of Biochemistry* 217, 639-644.
- Iwanaga, S., 2002. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Current Opinion in Immunology* 14, 87-95.
- Jack, R.W. and Jung, G., 2000. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 310-317.
- Jackson, A., 2008. *Littorina littorea*. Common periwinkle. *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme*. In: Kingdom, M.B.A.o.t.U. (Ed.), Plymouth.
- Jacob, F., 1954. Induced biosynthesis and mode of action of a pyocine, antibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales de l'Institut Pasteur* 86, 149-160.
- Jayawardene, A. and Himsley, H.F., 1969. Vibriocin: a bacteriocin from *Vibrio comma* I production, purification, morphology and immunological studies. *Microbios* 1B, 87-88.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W., 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 491-511.
- Joerger, R.D., 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 82, 640-647.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Stritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.
- Jones, G.G., Sanford, C.L., Jones, B.L., 1993. Manila Clams: Hatchery and Nursery Methods, Skerry Bay, Lasqueti island B.C, Canada, 73 pp.
- Jorquera, M.A., Silva, F.R., Riquelme, C.E., 2001. Bacteria in the culture of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture International* 9, 285-303.
- Jung, G., 1991. Lantibiotics: a survey. In: Jung, G., Sahl, H.G. (Eds.), *Nisin and novel lantibiotics*. ESCOM Science Publishers, Leiden, The Netherlands., pp. 1-34.
- Kalinovskaya, N.I., Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.V., Gorshkova, N.M., Kuznetsova, T.A., Dmitrenok, A.S., Nicolau, D.V., 2004. Low-Molecular-Weight, Biologically Active Compounds from Marine *Pseudoalteromonas* Species. *Current Microbiology* 48, 441-446.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Kimura, T., 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiology and Immunology* 32, 67-73.
- Kamiya, H., Muramoto, K., Yamazaki, M., 1986. Aplysianin-A, an antibacterial and antineoplastic glycoprotein in the albumen gland of a sea hare, *Aplysia kurodai*. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 42, 1065-1067.
- Kamiya, H., Muramoto, K., Goto R., Sakai M., Endo Y. and Yamazaki, M., 1989. Purification and characterization of an antibacterial and antineoplastic protein secretion of a sea hare *Aplysia juliana*. *Toxicon* 27, 1269-1277.
- Kang, Y.-S., Kim, Y.-M., Park, K.-I., Kim Cho, S., Choi, K.-S., Cho, M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 1119-1131.

- Kellner, R., Jung, G., Sahl, H.-G., 1991. Structure elucidation of the tricyclic lantibiotic Pep5 containing eight positively charged amino acids. In: Sahl, H.-G., Jung, J. (Eds.), Nisin and Novel. ESCOM Scientific Publishers BV, Leiden, pp. 141-158.
- Kim, Y.M., Park, K.-I., Choi, K.-S., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Cho, M., 2006. Lectin from the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Is Induced upon Infection with the Protozoan Parasite *Perkinsus olseni*. *J. Biol. Chem.* 281, 26854-26864.
- Kingston, P.F., 1974. Studies on the reproductive cycles of *Cardium edule* and *C. glaucum*. *Mar Biol* 28, 317-323.
- Kiss, G. and Michl, H., 1962. Über das Giftsekret der Gelbbauchunke, *Bombina variegata* L. *Toxicon* 1, 33-34.
- Kisugi, J., Kamiya, H., Yamazaki, M., 1987. Purification and Characterization of Aplysianin E, an Antitumor Factor from Sea Hare Eggs. *Cancer Research* 47, 5649-5653.
- Kisugi, J., Ohye, H., Kamiya, H., Yamazaki, M., 1992. Characterisation of an antibacterial protein, dolabellin A, from the albumen gland of the sea hare, *Dolabella auricularia*. *Chem Pharm Bull* 40, 1537-1539.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39-85.
- Klein, C., Kaletta, C., Entian, K.D., 1993. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 296-303.
- Kokryakov, V.N., Harwig, S.S.L., Panyutich, E.A., Shevchenko, A.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V., Korneva, H.A., Lehrer, R.I., 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Letters* 327, 231-236.
- König, G.M., Kehraus, S., Seibert, S.F., Abdel-Lateff, A., Müller, D., 2006. Natural Products from Marine Organisms and Their Associated Microbes. *ChemBioChem* 7, 229-238.
- Kordel, M., Benz, R., Sahl, H.G., 1988. Mode of action of the staphylococcinlike peptide Pep 5: voltage-dependent depolarization of bacterial and artificial membranes. *Journal of Bacteriology* 170, 84-88.
- Kornprobst, J.-M., 2005. Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. Tec & Doc Lavoisier, paris, 1834 pp.
- Kreil, G., 1973. Structure of melittin isolated from two species of honeybees. *FEBS Letters* 33, 241-244.
- Kruse, T. and Kristensen, H.-H., 2008. Using antimicrobial host defense peptides as anti-infective and immunomodulatory agents. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 6, 887-895.
- Kueh, C.S.W. and Chan, K.-y., 1985. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Microbiology* 59, 41-47.
- Kuipers, O.P., Rollema, H.S., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 1993. Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis*, directed by the leader peptide of the homologous lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters* 330, 23-27.
- Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Yap, W.M., Boot, H.J., Siezen, R.J., de Vos, W.M., 1992. Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin. *Journal of Biological Chemistry* 267, 24340-24346.
- La Peyre, J.F., Chu, F.-L.E., Meyers, J.M., 1995. Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 179-190.
- Lacoste, A., Cueff, A., Poulet, S.A., 2002a. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate β -adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *Journal of Cell Science* 115, 761-768.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Gélébart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2002b. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 26, 1-9.
- Laederach, A., Andreotti, A.H., Fulton, D.B., 2002. Solution and Micelle-Bound Structures of Tachyplesin I and Its Active Aromatic Linear Derivatives. *Biochemistry* 41, 12359-12368.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lambert, C. and Nicolas, J.L., 1998. Specific Inhibition of Chemiluminescent Activity by Pathogenic *Vibrios* in Hemocytes of Two Marine Bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 53-63.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology* 15, 225-240.
- Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J.L., Wicker, C., Reichhart, J.M., Dunbar, B., Lepage, P., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J., Fothergill, J., 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 262-266.
- Lamberty, M., Ades, S., Uttenweiler-Joseph, S., Brookhart, G., Bushey, D., Hoffmann, J.A., Bulet, P., 1999. Insect Immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *Journal of Biological Chemistry* 274, 9320-9326.
- Landon, C., Vovelle, F., Sodano, P., Pajon, A., 2000. The active site of drosomycin, a small insect antifungal protein, delineated by comparison with the modeled structure of Rs-AFP2, a plant antifungal protein. *Journal of Peptide Research* 56, 231-238.
- Langlois, M., Allard, J.P., Nugier, F., Aymard, M., 1986. A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs. *Journal of Biological Standardization* 14, 201-211.
- Laruelle, F., 1999. Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) en Bretagne. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Laruelle, F., Guillou, J., Paulet, Y., 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*, on intertidal flats in Brittany. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 72, 69-96.
- Lategan, M.J., Booth, W., Shimmon, R., Gibson, L.F., 2006. An inhibitory substance produced by *Aeromonas media* A199, an aquatic probiotic. *Aquaculture* 254, 115-124.
- Lauth, X., Shike, H., Burns, J.C., Westerman, M.E., Ostland, V.E., Carlberg, J.M., Van Olst, J.C., Nizet, V., Taylor, S.W., Shimizu, C., Bulet, P., 2002. Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass. *Journal of Biological Chemistry* 277, 5030-5039.
- Lawyer, C., Pai, S., Watabe, M., Borgia, P., Mashimo, T., Eagleton, L., Watabe, K., 1996. Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Letters* 390, 95-98.
- Le Gall, G., Bachère, E., Miahle, E., 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. *Diseases of Aquatic Organisms* 11, 181-186.
- Lee, I.H., Cho, Y., Lehrer, R.I., 1997a. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity* 65, 2898-2903.
- Lee, I.H., Cho, Y., Lehrer, R.I., 1997b. Styelins, Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides from the Solitary Tunicate, *Styela clava*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118, 515-521.
- Lee, I.H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S.S.L., Cooper, E.L., Lehrer, R.I., 1997c. Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Letters* 400, 158-162.
- Lee, I.H., Zhao, C., Nguyen, T., Menzel, L., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Sherman, M.A., 2001. Clavaspilin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *Journal of Peptide Research* 58, 445-456.
- Lee, T.-G. and Maruyama, S., 1998. Isolation of HIV-1 Protease-Inhibiting Peptides from Thermolysin Hydrolysate of Oyster Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253, 604-608.
- Lehrer, R.I., Tincu, J.A., Taylor, S.W., Menzel, L.P., Waring, A.J., 2003. Natural Peptide Antibiotics from Tunicates: Structures, Functions and Potential Uses¹. *Integrative and Comparative Biology* 43, 313-322.
- Leippe, M. and Renwantz, L., 1988. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 12, 297-308.

- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quéré, H., Rodet, F., Dubos, M.P., Favrel, P., 2007. Cg-TGF- β , a TGF- β /activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Developmental and Comparative Immunology* 31, 30-38.
- Li, H., Parisia, M.-G., Toubiana, M., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 143-152.
- Li, M.F. and Traxler, G.S., 1972. Antiviral activity of aquaous clam (*Mya arenaria*) extract on amphibian virus (LT-1). *Canadian Journal of Microbiology* 18, 397-402.
- Longeon, A., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Corre, S., Nicolas, J.-L., Guyot, M., 2004. Purification and Partial Identification of Novel Antimicrobial Protein from Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* Species Strain X153. *Marine Biotechnology* 6, 633-641.
- López, C., Carballeda, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Morphological Characterization of the Hemocytes of the Clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Invertebrate Pathology* 69, 51-57.
- López, C., Villalba, A., Bachère, E., 1994. Absence of generation of active oxygen radicals coupled with phagocytosis by the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Invertebrate Pathology* 64, 188-192.
- Luders, T., Birkemo, G.A., Nissen-Meyer, J., Andersen, O., Nes, I.F., 2005. Proline Conformation-Dependent Antimicrobial Activity of a Proline-Rich Histone H1 N-Terminal Peptide Fragment Isolated from the Skin Mucus of Atlantic Salmon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2399-2406.
- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F., Robles-Mungaray, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 15, 275-282.
- Mackintosh, J.A., Veal, D.A., Beattie, A.J., Gooley, A.A., 1998. Isolation from an Ant *Myrmecia gulosa* of Two Inducible O-Glycosylated Proline-rich Antibacterial Peptides. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6139-6143.
- Maes, P., 1992. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*, Thèse de Doctorat. Université de Brest.
- Maier, M.S., Roccatagliata, A.J., Kuriss, A., Chludil, H., Seldes, A.M., Pujol, C.A., Damonte, E.B., 2001. Two New Cytotoxic and Virucidal Trisulfated Triterpene Glycosides from the Antarctic Sea Cucumber *Staurocucumis liouvillei*. *Journal of Natural Products* 64, 732-736.
- Maktoob, A. and Ronald, H.T. 1997. Handbook of Natural Products from Marine Invertebrates. Phylum mollusca Part. 1. Harwood academic publishers, 1-288 pp.
- Malham, S.K., Cotter, E., O'Keefe, S., Lynch, S., Culloty, S.C., King, J.W., Latchford, J.W., Beaumont, A.R., 2009. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture* 287, 128-138.
- Mandard, N., Sodano, P., Labbe, H., Bonmatin, J.M., Bulet, P., Hetru, C., Ptak, M., Vovelle, F., 1998. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *European Journal of Biochemistry* 256, 404-410.
- Mandard, N., Sy, D., Maufrais, C., Bonmatin, J.M., Bulet, P., Hetru, C., Vovelle, F., 1999. Androctonin, a Novel Antimicrobial Peptide from Scorpion *Androctonus Australis*: Solution Structure and Molecular Dynamics Simulations in the Presence of a Lipid Monolayer. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 17, 367-380.
- Mangoni, M.L., Saugar, J.M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M., Rivas, L., 2005. Temporins, Small Antimicrobial Peptides with Leishmanicidal Activity. *Journal of Biological Chemistry* 280, 984-990.
- Mann, R., 1979. The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 38, 121-133.
- Martel, A., Larrivée, D.H., Klein, K.R., Himmelman, J.H., 1986. Reproductive cycle and seasonal feeding activity of the neogastropod *Buccinum undatum*. *Marine Biology* 92, 211-221.
- Martín-Algarra, S., Espinosa, E., Rubió, J., López, J.J.L., Manzano, J.L., Carrión, L.A., Plazaola, A., Tanovic, A., Paz-Ares, L., 2009. Phase II study of weekly Kahalalide F in patients with advanced malignant melanoma. *European Journal of Cancer* 45, 732-735.

- Martin, G.G., Oakes, C.T., Tousignant, H.R., Crabtree, H., Yamakawa, R., 2007. Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica*. *Journal of Molluscan Studies* 73, 355-365.
- Martin, N.I., Sprules, T., Carpenter, M.R., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., Vederas, J.C., 2004. Structural Characterization of Lacticin 3147, a Two-Peptide Lantibiotic with Synergistic Activity. *Biochemistry* 43, 3049-3056.
- Matozzo, V., Rova, G., Marin, M.G., 2007. Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 732-746.
- Matsuzaki, K., 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology* 1376, 391-400.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K.-i., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K., Epanand, R.M., 1998. Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2. *Biochemistry* 37, 11856-11863.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 285.
- McIntosh, J.M., Corpuz, G.O., Layer, R.T., Garrett, J.E., Wagstaff, J.D., Bulaj, G., Vyazovkina, A., Yoshikami, D., Cruz, L.J., Olivera, B.M., 2000. Isolation and Characterization of a Novel Conus Peptide with Apparent Antinociceptive Activity. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32391-32397.
- McLaren, C., Ellis, M.N., Hunter, G.A., 1983. A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. *Antiviral Research* 3, 223-234.
- Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr., 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews* 173, 89-97.
- Melo, V.M.M., Duarte, A.B.G., Carvalho, A.F.F.U., Siebra, E.A., Vasconcelos, I.M., 2000. Purification of a novel antibacterial and haemagglutinating protein from the purple gland of the sea hare, *Aplysia dactylomela* Rang, 1828. *Toxicon* 38, 1415-1427.
- Merrifield, R.B., 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* 85, 2149-2154.
- Messi, P., Guerrieri, E., Bondi, M., 2003. Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. *FEMS Microbiology Letters* 220, 121-125.
- Michel, C., Nougayrède, P., Eldar, A., Sochon, E., de Kinkelin, P., 1997. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Diseases of Aquatic Organisms* 30, 199-208.
- Minamikawa, M., Hine, M., Russell, S., Huber, P., Duignan, P., Lumsden, J.S., 2004. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chilectin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. *Fish and Shellfish Immunology* 17, 463-476.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrzynda, E.A., Boudry, P., Roch, P., 2000a. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental and Comparative Immunology* 24, 381-393.
- Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., Roch, P., 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry* 265, 71-78.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science* 112, 4233-4242.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., Roch, P., 2000b. Involvement of Mytilins in mussel antimicrobial defense. *Journal of Biological Chemistry* 275, 12954-12962.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000c. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters* 486, 185-190.
- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y., 1989. Antimicrobial Peptides, Isolated from Horseshoe Crab Hemocytes, Tachyplesin II, and Polyphemusins I and II: Chemical Structures and Biological Activity. *Journal of Biochemistry* 106, 663-668.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43, 109-142.

- Mooberry S.L., Leal R.M., Tinley T.L., Luesch H., Moore R.E., T.H., C., 2003. The molecular pharmacology of symplostatin 1: a new antimitotic dolastatin 10 analog. *International Journal of Cancer* 104, 512-521.
- Mookherjee, N. and Hancock, R., 2007. Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 64, 922-933.
- Moore, C.A. and Gelder, S.R., 1983. The role of the "blunt" granules in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* following phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology* 41, 369-377.
- Mor, A., Amiche, M., Nicolas, P., 1994. Structure, synthesis, and activity of Dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry* 33, 6642-6650.
- Moreno, M.R.F., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., RUSUL, G., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 147-157.
- Morikawa, N., Hagiwara, K., Nakajima, T., 1992. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipedata porsa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189, 184-190.
- Mortensen, S. and Strand, O., 2000. Release and recapture of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) introduced to Norway. *Sarsia* 85, 87-91.
- Muta, T., Fujimoto, T., Nakajima, H., Iwanaga, S., 1990. Tachyplesins Isolated from Hemocytes of Southeast Asian Horseshoe Crabs (*Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus gigas*): Identification of a New Tachyplesin, Tachyplesin III, and a Processing Intermediate of Its Precursor. *Journal of Biochemistry* 108, 261-266.
- Mydlarz, L.D., Jones, L.E., Harvell, C.D., 2006. Innate Immunity, Environmental Drivers, and Disease Ecology of Marine and Freshwater Invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 251-288.
- Nagao, J.-i., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K.-i., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2006. Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102, 139-149.
- Nakamura, M., Mori, K., Inooka, S., Nomura, T., 1985. In vitro production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Developmental and Comparative Immunology* 9, 407-417.
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y., 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *Journal of Biological Chemistry* 263, 16709-13713.
- Nakayama, K. and Maruyama, T., 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Developmental and Comparative Immunology* 22, 151-159.
- Narrain, A.S., 1973. The ameobocytes of lamellibranch molluscs, with special reference to the circulating ameobocytes. *Malacology* 6, 1-12.
- Ngo, T.T.T. and Choi, K.-S., 2004. Seasonal changes of *Perkinsus* and *Cercaria* infections in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Jeju, Korea. *Aquaculture* 239, 57-68.
- Nicolas, J.L., Gatescoupe, F.-J., Frouel, S., Bachère, E., Gueguen, Y., 2007. Quelles stratégies alternatives aux antibiotiques en aquaculture? *INRA Productions Animales* 20, 253-258.
- Nielsen, C., 1975. Observations on *Buccinum undatum* (L.) attacking bivalves and on prey responses, with a short review on attack methods of other prosobranchs. *Ophelia* 13, 87-108.
- Nilsen, I.W. and Myrnes, B., 2001. The gene of chlamysin, a marine invertebrate-type lysozyme, is organized similar to vertebrate but different from invertebrate chicken-type lysozyme genes. *Gene* 269, 27-32.
- Nilsen, I.W., Overbo, K., Sandsdalen, E., Sandaker, E., Sletten, K., Myrnes, B., 1999. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS Letters* 464, 153-158.
- Noël, D., Bachère, E., Mialhe, E., 1993. Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Developmental and Comparative Immunology* 17, 483-493.

- Novas, A., Barcia, R., Ramos-Martínez, J.I., 2007. After the Prestige oil spill modifications in NO production and other parameters related to the immune response were detected in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 85, 285-290.
- Novas, A., Cao, A., Barcia, R., Ramos-Martínez, J.I., 2004. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36, 390-394.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., Onilude, A.A., 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology* 2, 219-227.
- Ohta, M., Ito, H., Masuda, K., Tanaka, S., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Kato, N., 1992. Mechanisms of antibacterial action of tachyplesins and polyphemusins, a group of antimicrobial peptides isolated from horseshoe crab hemocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, 1460-1465.
- Ojika, M., Yoshida, Y., Nakayama, Y., Yamada, K., 1990. Aplydilactone, a novel fatty acid metabolite from the marine mollusc *Aplysia kurodai*. *Tetrahedron Letters* 31, 4907-4910.
- Olafsen, J.A., Fletcher, T.C., Grant, P.T., 1992. Agglutinin activity in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Developmental and Comparative Immunology* 16, 123-138.
- Olafsen, J.A., Mikkelsen, H.V., Gjaever, H.M., Hovik Hansen, G., 1993. Indigenous Bacteria in Hemolymph and Tissues of Marine Bivalves at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1848-1854.
- Olicard, C., 2004. Recherche de substances anti-virales chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat de l'Université de La Rochelle.
- Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A., Bourgougnon, N., 2005. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Research* 66, 147-152.
- Olivera, B.M., 2006. Conus Peptides: Biodiversity-based Discovery and Exogenomics. *Journal of Biological Chemistry* 281, 31173-31177.
- Ordás, M.C., Ordás, A., Beloso, C., Figueras, A., 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 597-609.
- Oren, Z. and Shai, Y., 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science* 47, 451-463.
- Ottaviani, E., Franchini, A., Malagoli, D., Genedani, S., 2000. Immunomodulation by recombinant human interleukin-8 and its signal transduction pathways in invertebrate hemocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 506-513.
- Paillard, C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquating Living Resources* 17, 467-475.
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquating Living Resources* 17, 477-498.
- Paillard, C. and Maes, P., 1989. Origine pathogène de l'"anneau brun" chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *Comptes Rendus de l'Académie des sciences Paris, Serie III.* 309, 235-241.
- Pallavicini, A., del Mar Costa, M., Gestal, C., Dreos, R., Figueras, A., Venier, P., Novoa, B., 2008. High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 213-226.
- Pampanin, D.M., Marin, M.G., Ballarin, L., 2002. Morphological and cytoenzymatic characterization of haemocytes of the venus clam *Chamelea gallina*. *Diseases of Aquatic Organisms* 49, 227-234.
- Pardo, B., Paz-Ares, L., Taberner, J., Ciruelos, E., Garcia, M., Salazar, R., Lopez, A., Blanco, M., Nieto, A., Jimeno, J., Izquierdo, M.A., Trigo, J.M., 2008. Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Kahalalide F Administered Weekly as a 1-Hour Infusion to Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* 14, 1116-1123.
- Park, K.-I. and Choi, K.-S., 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): I. Quantifying eggs. *Aquaculture* 241, 667-687.

- Parks, W.M., Bottrill, A.R., Pierrat, O.A., Durrant, M.C., Maxwell, A., 2007. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie* 89, 500-507.
- Patton, G.C. and van der Donk, W.A., 2005. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current Opinion in Microbiology* 8, 543-551.
- Pechenik, J.A., 1984. The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 74, 241-257.
- Pechenik, J.A., Blanchard, M., Rotjan, R., 2004. Susceptibility of larval *Crepidula fornicata* to predation by suspension-feeding adults. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 306, 75-94.
- Pechenik, J.A., Jarrett, J.N., Rooney, J., 2002. Relationships between larval nutritional experience, larval growth rates, juvenile growth rates, and juvenile feeding rates in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 280, 63-78.
- Perelberg, A., Ronen, A., Hutoran, M., Smith, Y., Kotler, M., 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. *Vaccine* 23, 3396-3403.
- Pichot, Y., Comps, M., Tige, G., Grizel, H., Rabouin, M.A., 1980. Recherches sur *Bonamia ostrea* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 43, 131-140.
- Pierre, T.N., Seon, A.A., Amiche, M., Nicolas, P., 2000. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobialopeptide precursors. *European Journal of Biochemistry* 267, 370-378.
- Pinto, A.L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., Gibbs, P.A., 2009. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *International Journal of Food Microbiology* 129, 50-58.
- Pipe, R., 1990a. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *The Histochemical Journal* 22, 595-603.
- Pipe, R.K., 1990b. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research* 261, 261-268.
- Pipe, R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology* 16, 111-122.
- Pipe, R.K., Farley, S.R., Coles, J.A., 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research* 289, 537-545.
- Pitel, M., Savina, M., Fifas, S., Berthou, P., 2004. Evaluations locales des populations de bivalves dans le golfe normand-breton - Résultats de la campagne BIVALVES2002, IFREMER, DRV/RH - DEL/EC/BB., 44p.
- Ponurovsky, S.K. and Yakovlev, Y.M., 1992. The reproductive biology of the Japanese littleneck, *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Selfish Research* 2, 265-277.
- Poutiers, J.M., 1998. Bivalves. Acephala, Lamellibranchia, Pelecypoda. In: Carpentier, K.E., Niem, Volker. H. (Ed.), *FAO species identification guide for fishery purposes. The Living Marine Resources of Western Central Pacific*. FAO, Rome, pp. 1-686.
- Powers, J.-P.S., Rozek, A., Hancock, R.E.W., 2004. Structure-activity relationships for the β -hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1698, 239-250.
- Prasad, S., Morris, P.C., Hansen, R., Meaden, P.G., Austin, B., 2005. A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. *Microbiology* 151, 3051-3058.
- Prescott, B., Li, C.P., Caldes, G., Martino, E., 1966. Chemical studies of paolin. II. An antiviral substance from oysters. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 123, 460-464.
- Pronnier, F., 1996. Le développement larvaire et l'alimentation de larves de bivalves d'écolserie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire de l'Ecole Nationales Vétérinaire de Nantes, Nantes.
- Raj, P.A., Marcus, E., Sukumaran, D., K., 1998. Structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biopolymers* 45, 51-67.

- Raman, T., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 2008. Agglutinin-mediated phagocytosis-associated generation of superoxide anion and nitric oxide by the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 337-345.
- Rao, D., Webb, J.S., Kjelleberg, S., 2005. Competitive Interactions in Mixed-Species Biofilms Containing the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1729-1736.
- Rapaport, D. and Shai, Y., 1991. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry* 266, 23769-23775.
- Rawat, D.S., Joshi, C.P., Joshi, P., Atheaya, H., 2006. Marine peptides and related compounds in clinical trial. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents)* 6, 33-40.
- Rawls, W.E., 1992. *Herpes simplex* viruses: types 1 and 2. In: Lennette, E.H. (Ed.), *Laboratory diagnosis of viral infections*, pp. 443-461.
- Reddy, K.V.R., Yedery, R.D., Aranha, C., 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24, 536-547.
- Reed, L.J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27, 493-497.
- Reeves, P., 1972. The bacteriocins. In: Kleinzeller, A., Springer, G.F., Wittman, H.G. (Eds.), *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*. Springer, Heidelberg.
- Reid, D.G., 1996. Systematics and evolution of *Littorina littorea*. Ray society, London, 463 pp.
- Reilly, D.S., Tomassini, N., Bevins, C.L., Zasloff, M., 1994. A Paneth cell analogue in *Xenopus* small intestine expresses antimicrobial peptide genes: conservation of an intestinal host-defense system. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42, 697-704.
- Renault, T., 2006. Les virus infectants les bivalves marins. *Virologie* 10, 35-41.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Chollet, B., Cochenec, N., Gérard, A., 2000. Concomitant Herpes-like virus infection in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42, 173-183.
- Renwranz, L., Daniels, J., Hansen, P.D., 1985. Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology* 9, 203-210.
- Renwranz, L. and Stahmer, A., 1983. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *Journal of Comparative Physiology* 149, 535-546.
- Ridley, C., Bergquist, P., Harper, M., Faulkner, D., Hooper, J., Haygood, M., 2005. Speciation and Biosynthetic Variation in Four Dictyoceratid Sponges and Their Cyanobacterial Symbiont, *Oscillatoria spongelliae*. *Chemistry & Biology* 12, 397-406.
- Rinehart, K.L., 1983. Biologically active compounds from marine sources. *Marine Chemistry* 12, 229.
- Ringø, E., 2008. The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquaculture Research* 39, 171-180.
- Riquelme, C., Araya, R., Escribano, R., 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181, 25-36.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., Candia, M., 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154, 17-26.
- Riquelme, C., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Vergara, N., Araya, R., 1996. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with Larval Mortalities of Scallop (*Argopecten purpuratus*). *Journal of Invertebrate Pathology* 67, 213-218.
- Riquelme, C.E., Jorquera, M.A., Rojas, A.I., Avendaño, R.E., Reyes, N., 2001. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192, 111-119.
- Robert, R. and Deltreil, J.-P., 1990. Elevage de la plaourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* dans le bassin d'Arcachon. Bilan des dix dernières années et perspectives de développement. Rapport internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. IFREMER.
- Robert, R., Trut, G., Laborde, J.L., 1993. Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Bay of Arcachon, France. *Marine Biology* 116, 291-299.

- Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J., Goetz, F., 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 1099-1104.
- Roch, P., Hubert, F., van der Knaap, W., Noël, T., 1996. Present knowledge on the molecular basis of cytotoxicity, antibacterial activity and stress response in marine bivalves. *Italian Journal of Zoology* 63, 311-316.
- Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M., Aumelas, A., 2008. NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 227-238.
- Rodrick, G.E. and Ulrich, S.A., 1984. Microscopical studies on the hemocytes of bivalves and their phagocytic interaction with selected bacteria. *Helgoland Marine Research* 37, 167-176.
- Romanenko, L.A., Uchino, M., Kalinovskaya, N.I., Mikhailov, V.V., 2008. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities. *Microbiological Research* 163, 633-644.
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M., Gennaro, R., 1988. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 263, 9573-9575.
- Rosen, G.M., Pou, S., Ramos, C.L., Cohen, M.S., Britigan, B.E., 1995. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB Journal* 9, 200-209.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3-16.
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M., Christen, R., 1994. Phylogenetic Analysis and Assessment of the Genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* Deduced from Small-Subunit rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 416-426.
- Ruiz-Ponte, C., Samain, J.F., Sanchez, J.L., Nicolas, J.L., 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology* 1, 52-59.
- Ruiz, C.M., Román, G., Sanchez, J.L., 1995. Effects of three different marine bacteria strain on larvae culture of *Pecten maximus*. Burnell G., 10th International Pectinid Workshop, IPW, Ireland, 113-115 pp.
- Ruiz, C.M., Román, G., Sánchez, J.L., 1996. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. *Aquaculture International* 4, 289-291.
- Russell-Hunter, W. and Russell-Hunter, M., 1963. *Buccinum undatum* L. in the Clyde Estuary. *Glasgow Naturalist* 18, 249-250.
- Rygg, B., 1970. Studies on *Cerastoderma edule* (L.) and *Cerastoderma glaucum* (Poiret). *Sarsia* 43, 65-80.
- Sahl, H.-G. and Bierbaum, G., 1998. Lantibiotics: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 52, 41-79.
- Sahl, H.-G., Jack, R., Bierbaum, G., 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry* 230, 827-853.
- Sahl, H.G., Jack, R.W., Bierbaum, G., 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry* 230, 827-853.
- Sai, K.P., Jagannadham, M.V., Vairamani, M., Raju, N.P., Devi, A.S., Nagaraj, R., Sitaram, N., 2001. Tigerinins: Novel Antimicrobial Peptides from the Indian Frog *Rana tigrina*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2701-2707.
- Sansom, M.S.P., 1993. Alamethicin and related peptaibols — model ion channels. *European Biophysics Journal* 22, 105-124.
- Santarelli, L., 1986. Exploitation du Buccin dans le golfe Normano-Breton. *La Pêche Maritime* Jan, 48-52.
- Saulnier, D., Avarre, J.C., Le Moullac, G., Ansquer, D., Levy, P., Vonau, V., 2000. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 109-115.
- Sauriau, P.-G., Pichocki-Seyfried, C., Walker, P., De Montaudouin, X., Palud, C., Héral, M., 1998. *Crepidula fornicata* L. (mollusque, gastéropode) en baie de Marennes-Oléron: cartographie des fonds par sonar à balayage latéral et estimation du stock de *Crepidula fornicata* L. (Mollusca, Gastropoda) in the Marennes-Oléron Bay: side-scan sonar mapping of subtidal beds and stock assessment. *Oceanologica Acta* 21, 353-362.

- Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, K., Iqbal, M.M., Yumoto, I., Ezura, Y., Christen, R., 1998. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 769-774.
- Schägger, H. and von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- Schibli, D.J., Hwang, P.M., Vogel, H.J., 1999. Structure of the Antimicrobial Peptide Tritrpticin Bound to Micelles: A Distinct Membrane-Bound Peptide Fold. *Biochemistry* 38, 16749-16755.
- Schlenk, D., Martinez, P.G., Livingstone, D.R., 1991. Studies on myeloperoxidase activity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 99, 63-68.
- Schnapp, D., Kemp, G.D., Smith, V.J., 1996. Purification and Characterization of a Proline-Rich Antibacterial Peptide, with Sequence Similarity to Bactenecin-7, from the Haemocytes of the Shore Crab, *Carcinus Maenas*. *European Journal of Biochemistry* 240, 532-539.
- Schnell, N., Entian, K.-D., Schneider, U., Gotz, F., Zahner, H., Kellner, R., Jung, G., 1988. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature* 333, 276-278.
- Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskas, A., Podsiadlowski, L., 2003. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 53, 125-133.
- Selsted, M.E., Brown, D.M., DeLange, R.J., Harwig, S.S., Lehrer, R.I., 1985a. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J. Biol. Chem.* 260, 4579-4584.
- Selsted, M.E., Brown, D.M., DeLange, R.J., Lehrer, R.I., 1983. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 258, 14485-14489.
- Selsted, M.E., Harwig, S.S., Ganz, T., Schilling, J.W., Lehrer, R.I., 1985b. Primary Structures of Three Human Neutrophil Defensins. *Journal of Clinical Investigation* 76, 1436-1439.
- Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W., Cullor, J.S., 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 267, 4292-4295.
- Seo, J.-K., Crawford, J.M., Stone, K.L., Noga, E.J., 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 1998-2004.
- Severinov, K., Semenova, E., Kazakov, A., Kazakov, T., Gelfand, M.S., 2007. Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Molecular Microbiology* 65, 1380-1394.
- Shai, Y., 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66, 236-248.
- Sharp, K.H., Davidson, S.K., Haygood, M.G., 2007. Localization of *Candidatus Endobugula sertula* and the bryostatins throughout the life cycle of the bryozoan *Bugula neritina*. *ISME J* 1, 693-702.
- Shehane, S.D. and Sizemore, R.K., 2002. Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 322-328.
- Shike, H., Lauth, X., Westerman, M.E., Ostland, V.E., Carlberg, J.M., Van Olst, J.C., Shimizu, C., Bulet, P., Burns, J.C., 2002. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *FEBS Journal* 269, 2232-2237.
- Silphaduang, U. and Noga, E.J., 2001. Antimicrobials: Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 414, 268-269.
- Silva, P.I., Jr., Daffre, S., Bulet, P., 2000. Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33464-33470.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D., 1998. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47, 435-450.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D., Bossa, F., 1993. Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS Letters* 324, 159-161.

- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D., Bossa, F., 1994. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *Journal of Biological Chemistry* 269, 11956-11961.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M.L., Barra, D., 1996. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European Journal of Biochemistry* 242, 788-792.
- Sitaram, N. and Nagaraj, R., 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462, 29-54.
- Skovhus, T., Holmström, C., Kjelleberg, S., Dahllöf, I., 2007. Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. *FEMS Microbiology Ecology* 61, 348-361.
- Smith, L., Novák, J., Rocca, J., McClung, S., Hillman, J.D., Edison, A.S., 2000. Covalent structure of mutacin 1140 and a novel method for the rapid identification of lantibiotics. *European Journal of Biochemistry* 267, 6810-6816.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 23-28.
- Solidoro, C., Pastres, R., Melaku Canu, D., Pellizzato, M., Rossi, R., 2000. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in northern adriatic lagoons. *Marine Ecology Progress Series* 199, 137-148.
- Sriornual, S., Yanagida, F., Lin, L.-H., Hsiao, K.-N., Chen, Y.-s., 2007. Weissellicin 110, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaa-Som, a Fermented Fish Product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2247-2250.
- Staaland, H., 1972. Respiratory rate and salinity preference in relation to the ecology of three marine prosobranchs *Buccinum undatum* (L.), *Neptunea antiqua* (L.), and *Neptunea despecta* (L). *Norway Journal of Zoology* 20, 35-51.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., Boman, H.G., 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 16, 246-248.
- Storici, P., Tossi, A., Lenarčič, B., Romeo, D., 1996. Purification and Structural Characterization of Bovine Cathelicidins, Precursors of Antimicrobial Peptides. *European Journal of Biochemistry* 238, 769-776.
- Strauch, E., Kaspar, H., Schaudinn, C., Dersch, P., Madela, K., Gewinner, C., Hertwig, S., Wecke, J., Appel, B., 2001. Characterization of Enterocoliticin, a Phage Tail-Like Bacteriocin, and Its Effect on Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5634-5642.
- Sudek, S., Hildebrand, M., Anderson, C.M., Liu, H., Patel, A., Sherman, D.H., Haygood, M.G., 2007. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "*Candidatus* Endobugula sertula", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *Journal of Natural Products* 70, 67-74.
- Suenaga, K., Kigoshi, H., Yamada, K., 2004. Auriopyrones A and B, cytotoxic polypropionates from the sea hare *Dolabella auricularia*: Isolation and structures. *Tetrahedron Letters* 37, 5151-5154.
- Sugita, H., Tanaami, H., Kobashi, T., Deguchi, Y., 1981. Bacterial flora of coastal bivalves. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47, 655-661.
- Suzuki, T. and Mori, K., 1989. A galactose-specific lectin from the hemolymph of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 92, 455-462.
- Tadesse, M., Gulliksen, B., Strøm, M.B., Styrvold, O.B., Haug, T., 2008. Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 286-293.
- Tafalla, C., Gómez-León, J., Novoa, B., Figueras, A., 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 27, 197-205.
- Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A., 2002. Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132, 423-431.

- Takahashi, K.G., Kuroda, T., Muroga, K., 2008. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 150, 45-52.
- Tang, Y.-Q., Yuan, J., Ösapay, G., Ösapay, K., Tran, D., Miller, C.J., Ouellette, A.J., Selsted, M.E., 1999a. A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated α -Defensins. *Science* 286, 498-502.
- Tang, Y.-Q., Yuan, J., Ouml, sapay, G., Ouml, sapay, K., Tran, D., Miller, C.J., Ouellette, A.J., Selsted, M.E., 1999b. A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated α -Defensins. *Science* 286, 498-502.
- Tasiemski, A., Vandenbulcke, F., Mitta, G., Lemoine, J., Lefebvre, C., Sautiere, P.-E., Salzet, M., 2004. Molecular Characterization of Two Novel Antibacterial Peptides Inducible upon Bacterial Challenge in an Annelid, the Leech *Theromyzon tessulatum*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 30973-30982.
- Tebble, N., 1966. *British bivalve seashells*. Alden Press Osney Mead, London, 218 pp.
- Terahara, K., Takahashi, K.G., Mori, K., 2003. Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 27, 521-528.
- Thieltges, D.W., Ferguson, M., Jones, C., Krakau, M., de Montaudouin, X., Noble, L., Reise, K., Poulin, R., 2009. Distance decay of similarity among parasite communities of three marine invertebrate hosts. *Oecologia*, 1-11.
- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Developmental and Comparative Immunology* 33, 653-659.
- Tincu, J.A. and Taylor, S.W., 2004. Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 3645-3654.
- Tiwari, S. and Srivastava, S., 2008. Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 759-767.
- Toke, O., 2005. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Peptide Science* 80, 717-735.
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37-61.
- Torreilles, J. and Guérin, M.-C., 1999. Production of peroxyntirite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 509-518.
- Torreilles, J., Guérin, M.-C., Roch, P., 1996. Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la Vie* 319, 209-218.
- Torreilles, J., Guérin, M.-C., Roch, P., 1997. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 21, 267-275.
- Tosteson, M.T. and Tosteson, D.C., 1981. The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers. 36, 109-116.
- Tran, D., Tran, P.A., Tang, Y.-Q., Yuan, J., Cole, T., Selsted, M.E., 2002. Homodimeric θ -Defensins from Rhesus macaque Leukocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 3079-3084.
- Travers, M.-A., Mirella da Silva, P., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 400-411.
- Tripp, M.R., 1992. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 222-227.
- Tunkijjanukij, S. and Olafsen, J.A., 1998. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization. *Developmental and Comparative Immunology* 22, 139-150.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C., 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 165-185.

- Tytler, E.M., Anantharamaiah, G.M., Walker, D.E., Mishra, V.K., Palgunachari, M.N., Segrest, J.P., 1995. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin induced lysis. *Biochemistry* 34, 4393-4401.
- Uria, A. and Piel, J., 2009. Cultivation-independent approaches to investigate the chemistry of marine symbiotic bacteria. *Phytochemistry Reviews* In Press.
- Van den Broeck, H., De Wolf, H., Backeljau, T., Blust, R., 2007. Effects of environmental stress on the condition of *Littorina littorea* along the Scheldt estuary (The Netherlands). *Science of The Total Environment* 376, 346-358.
- Van den Broeck, H., De Wolf, H., Backeljau, T., Blust, R., 2009. Comparative assessment of reproductive impairment in the gastropod mollusc *Littorina littorea* along the Belgian North Sea coast. *Science of The Total Environment* 407, 3063-3069.
- van Kraaij, C., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P., 1999. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Natural Product Reports* 16, 575-587.
- Villamil, L., Gómez-León, J., Gómez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology* 31, 968-977.
- Wakamatsu, K., Takeda, A., Tachi, T., Matsuzaki, K., 2002. Dimer structure of magainin 2 bound to phospholipid vesicles. *Biopolymers* 64, 314-327.
- Walsh, C.T. and Nolan, E.M., 2008. Morphing peptide backbones into heterocycles. *Proceeding of Natural Academy of Sciences USA* 105, 5655-5656.
- Wang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D., Xu, W., 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology* 44, 722-731.
- Wang, Z. and Wang, G., 2004. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research* 32, D590-D592.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697-703.
- Wiedemann, I., Bottiger, T., Bonelli, R.R., Schneider, T., Sahl, H.-G., Martinez, B., 2006. Lipid II-Based Antimicrobial Activity of the Lantibiotic Plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2809-2814.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.-G., 2001. Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *Journal of Biological Chemistry* 276, 1772-1779.
- Wijffels, R.H., 2007. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology* 26, 26-31.
- Willey, J.M. and van der Donk, W.A., 2007. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annual Review of Microbiology* 61, 477-501.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Ratcliffe, N.A., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology* 15, 195-210.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R.E.W., 1999. Mechanism of Interaction of Different Classes of Cationic Antimicrobial Peptides with Planar Bilayers and with the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 7235-7242.
- Xie, L. and van der Donk, W.A., 2004. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 498-507.
- Xing, J., Zhan, W.B., Zhou, L., 2002. Endoenzymes associated with haemocyte types in the scallop *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology* 13, 271-278.
- Xue, Q.-G., Renault, T., Chilmonczyk, S., 2001. Flow cytometric assessment of haemocyte subpopulations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish & Shellfish Immunology* 11, 557-567.
- Xue, Q.-G., Schey, K.L., Volety, A.K., Chu, F.-L.E., La Peyre, J.F., 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139, 11-25.

- Xue, Q., Itoh, N., Schey, K., Li, Y., Cooper, R., La Peyre, J., 2007. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 64, 82-95.
- Xue, Q. and Renault, T., 2000. Enzymatic Activities in European Flat Oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 155-163.
- Xue, Q. and Renault, T., 2001. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 187-194.
- Yakovleva, N.V., Samoilovich, M.P., Gorbushin, A.M., 2001. The Diversity of Strategies of Defense from Pathogens in Molluscs. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 37, 358-367.
- Yamada, K. and Natori, S., 1993. Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from *Sarcophaga* embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin. *Biochemical Journal* 291, 275-279.
- Yamaura, K., Takahashi, K.G., Suzuki, T., 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149, 168-175.
- Yamazaki, M., 1993. Antitumor and antimicrobial glycoproteins from sea hares. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 105, 141-146.
- Yamazaki, M., Ohye, H., Kisugi, J.a.K., H., 1990. Bacteriostatic and cytolytic activity of purple fluid from the sea hare. *Developmental and Comparative Immunology* 14, 379-383.
- Yanagida, F., Chen, Y., Onda, T., T., S., 2005. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* 40, 430-435.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W., 2001. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophysical Journal* 81, 1475-1485.
- Yang, R. and Yoshino, T.P., 1990. Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea* II. Isolation and characterization of a plasma opsonin with hemagglutinating activity. *Developmental and Comparative Immunology* 14, 397-404.
- Yang, Y.S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J.F., Roch, P., Aumelas, A., 2000. Solution Structure and Activity of the Synthetic Four-Disulfide Bond Mediterranean Mussel Defensin (MGD-1). *Biochemistry* 39, 14436-14447.
- Yap, W.G., 1977. Population biology of the Japanese little-neck clam, *Tapes philippinarum* in Keneohe Bay, Hawaiian Islands. *Pacific Science* 31, 223-244.
- Yasin, B., Pang, M., Turner, J.S., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Wagar, E.A., 2000. Evaluation of the Inactivation of Infectious Herpes Simplex Virus by Host-Defense Peptides. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19, 187-194.
- Yasumara, Y. and Kawakita, M., 1963. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine* 21, 1201-1219.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5449-5453.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zhang, W., Wu, X., Wang, M., 2006a. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. *Aquaculture* 251, 19-32.
- Zhang, X., Yao, T., Tian, L., Xu, S., An, L., 2008. Phylogenetic and Physiological Diversity of Bacteria Isolated from Puruogangri Ice Core. *Microbial Ecology* 55, 476-488.
- Zhang, Z., Li, X., Vandepuer, M., Zhao, W., 2006b. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 502-509.
- Zhao, C., Liaw, L., Lee, I.H., Lehrer, R.I., 1997. cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava*. *FEBS Letters* 412, 144-148.
- Zheng, P., Wang, H., Zhao, J., Song, L., Qiu, L., Dong, C., Wang, B., Gai, Y., Mu, C., Li, C., Ni, D., Xing, K., 2008. A lectin (CfLec-2) aggregating *Staphylococcus haemolyticus* from scallop *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 286-293.

ANNEXE 1

Tableau 28 : Systématique de *Crassostrea gigas* (Hayward *et al.*, 1995).

Règne	Animal, Invertébrés
Phylum	Mollusques
Classe	Lamellibranches (<i>Bivalvia</i>)
Sous-Classe	<i>Pteriomorphia</i>
Ordre	<i>Filibranchia</i>
Sous-Ordre	<i>Ostreina</i>
Super-Famille	<i>Ostreacea</i>
Famille	<i>Ostreidae</i>
Genre	<i>Crassostrea</i> (Sacco, 1897)
Espèce	<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)



Figure 53 : Photographie de *Crassostrea gigas* (photographie personnelle).

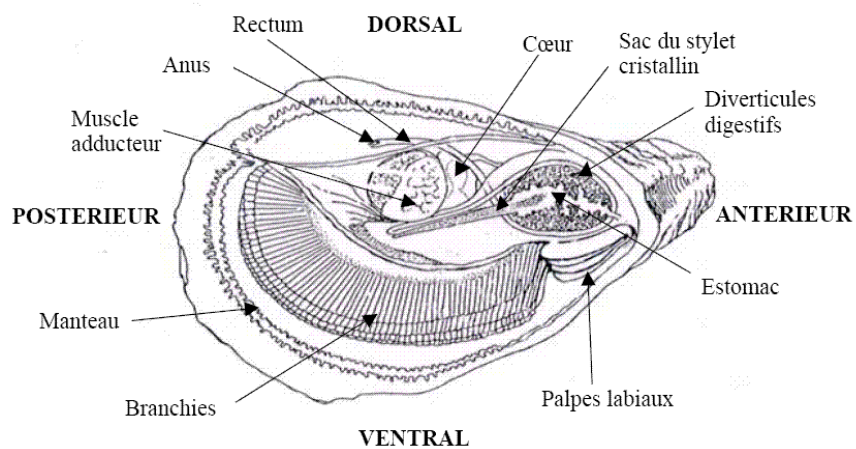


Figure 54 : Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (d'après (Howard & Smith, 1983)).

18 Les espèces de mollusques marins étudiées

18.1 Les Bivalves

Les Bivalves sont des mollusques marins ou dulçaquicoles. Il s'agit d'organismes filtreurs au corps comprimé latéralement, représentant une symétrie bilatérale par leur coquille composée de 2 valves articulées et disposées de part et d'autre du plan de symétrie. Les bivalves ne présentent pas de tête, de pharynx, de radula et de glande salivaire (Poutiers, 1998).

18.1.1 L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), appartient à l'embranchement des Mollusques, classe des Lamellibranches (*Bivalvia*), sous-classe des *Pteriomorphia*, ordre des *Filibranchia*, sous-ordre des *Ostreina*, super-famille des *Ostreacea*, famille des *Ostreidae*, genre *Crassostrea* et espèce *C. gigas* (Tableau 28 ; Figure 53). Ce sont des animaux métazoaires, triploblastiques (possédant entre l'ectoderme et l'endoderme un troisième feuillet individualisé, le mésoderme), coelomates (possédant un coelome), protostomiens (dont la bouche embryonnaire donne la bouche adulte), hyponeuriens (système nerveux ventral) à symétrie bilatérale. Leur corps est mou, non segmenté (Galstoff, 1964).

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est originaire d'Asie. Elle a été introduite sur les côtes des continents américain, océanien et européen au cours du XX^{ème} siècle. A ce jour, elle est cultivée dans 27 pays et sa production est évaluée à plus de 4,5 millions de tonnes en 2006. L'huître creuse japonaise, *Crassostrea gigas*, a été importée en France en 1966 et de façon massive de 1970 à 1974 pour pallier à la disparition de l'huître creuse portugaise, *Crassostrea angulata*, présente sur les côtes françaises depuis le milieu du XIX^{ème} siècle. La disparition de *Crassostrea angulata* des côtes françaises au début des années 70, est liée à une épizootie associée à la présence de virus apparentés aux iridovirus (Comps & Duthoit, 1979).

Les huîtres sont des animaux filtreurs, sédentaires, fixés, peuplant des substrats meubles ou durs dans des zones intertidales et infralittorales ou dans les zones estuariennes. Elles se sont adaptées dans de nombreuses régions grâce à leur tolérance aux variations de température (eurythermes), de salinité (euryhalines) et de disponibilité en ressource alimentaire. *C. gigas*

colonise la zone intertidale découvrant à de faibles coefficients de marée (40). L'huître creuse peut être cultivée dans des eaux plus profondes pouvant aller jusqu'à des fonds de 10-20 m. La densité dépasse 250 individus/m² sur des gisements naturels. *C. gigas* ainsi que l'huître plate, *Ostrea edulis*, font partie des principales espèces d'huîtres produites en France ((FAO©, 2007-2009)).

Les caractères généraux de l'anatomie de l'huître creuse sont présentés dans la Figure 54. Adulte, l'huître ne possède qu'un muscle adducteur. Elle adhère au support par la valve gauche (ou valve concave). Le tissu conjonctif recouvrant le corps de l'huître est appelé le manteau. Celui-ci est constitué de 2 lobes (droit et gauche), eux-mêmes bordés de 3 bourrelets. Les bourrelets internes délimitent une cavité palléale que les branchies séparent en une chambre inhalante et une chambre exhalante. Le volume d'eau qui traverse l'animal permet d'assurer l'apport de nourriture, les échanges gazeux respiratoires et l'expulsion des déchets. La bouche est encadrée par 4 palpes labiaux foliacés et ciliés, situés sous la charnière antérieure (Beaumont & Cassier, 1990). L'appareil circulatoire est de type lacunaire ou semi-ouvert, il est donc constamment en contact avec le milieu extérieur. Le coeur est situé contre le muscle adducteur dans la cavité péricardique. Il est composé d'un ventricule et de 2 oreillettes. Cet organe permet la circulation de l'hémolymph. Ce liquide est composé de cellules circulantes, hémocytes et d'une partie acellulaire, le sérum (Beaumont & Cassier, 1990). L'hémolymph circule ensuite dans les artères et les artérioles, puis dans des sinus de taille variable qui mettent les organes au contact direct de l'hémolymph. Celle-ci est ensuite épurée dans le rein, puis circule vers les branchies par les vaisseaux afférents et en repart, après hématoèse, par les vaisseaux efférents jusqu'aux oreillettes (Figure 54) (Eble & Scro, 1996).

Les bivalves sont des mollusques aquatiques microphages. L'huître creuse pompe l'eau de mer pour capter les particules nécessaires à son alimentation et l'oxygène nécessaire à sa respiration. Elle filtre en moyenne 10 à 15 litres d'eau par heure. En filtrant, les huîtres absorbent les micro-organismes et les particules alimentaires (bactéries, phytoplancton, etc.), capturés et agglutinés au niveau des branchies grâce à un film muqueux. Ces particules sont triées par les filaments branchiaux et retenues ou rejetées en fonction de leur taille (Beaumont & Cassier, 1990).

Le mode de reproduction est primitif avec une fécondation externe et un hermaphrodisme successif protandrique.

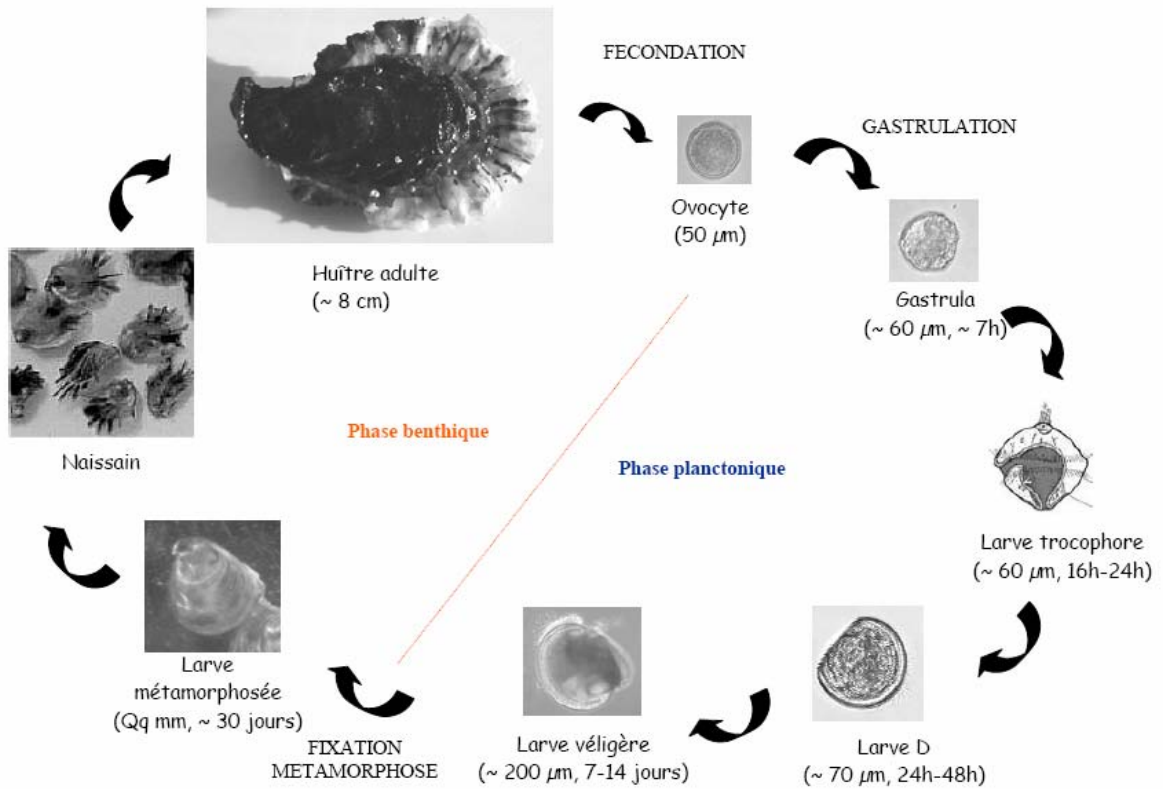


Figure 55 : Cycle de développement de l’huître *Crassostrea gigas* (D’après (Fabioux, 2004)).

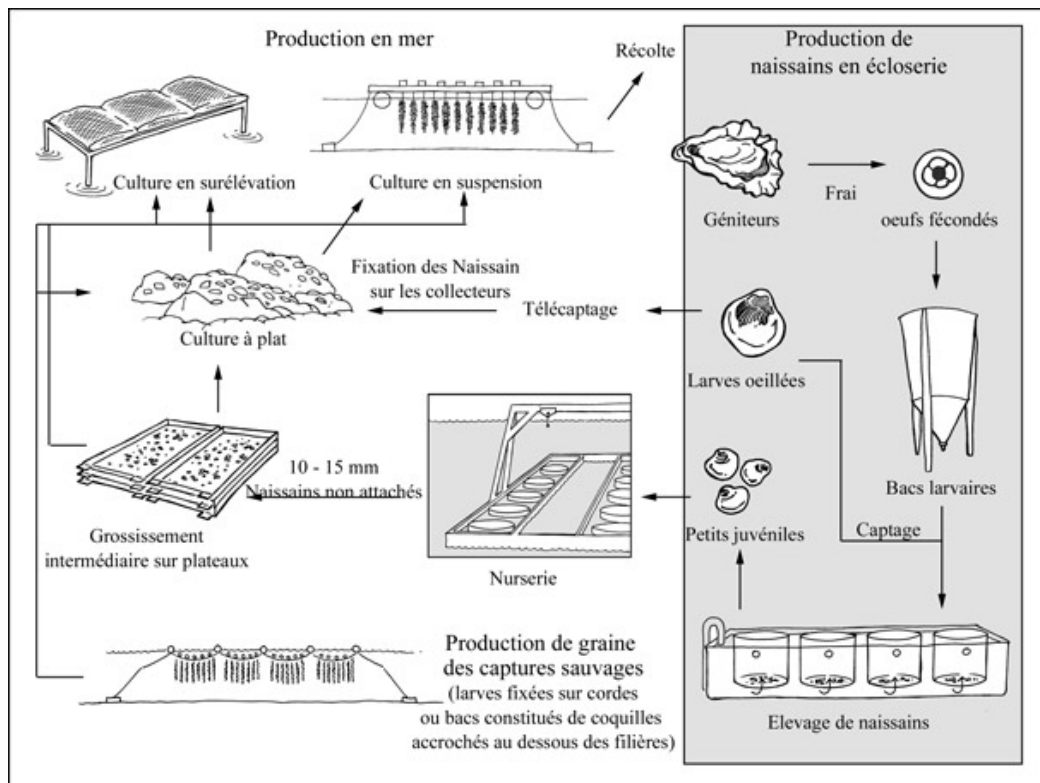


Figure 56 : Cycle de production de L’huître creuse *C. gigas* (FAO©, 2007-2009).

La phase de repos sexuel se situe pendant l'hiver, période de changement de sexe. Au printemps, à la faveur de conditions environnementales favorables, la gamétogenèse reprend à partir des cellules germinales, la maturité sexuelle ayant lieu au cours de l'été. Dès les mois de mai et juin, les huîtres matures perdent leurs réserves lipidiques hivernales qui vont être remplacées par des gamètes. La maturation sexuelle est due à l'élévation de la température de l'eau. Les huîtres se mettent alors à pondre en émettant une phéromone, incitant leurs congénères à faire de même. *Crassostrea gigas* est un organisme ovipare, c'est à dire que la fécondation des ovules par les spermatozoïdes se produit dans le milieu extérieur ; il y a fécondation externe. Un individu peut émettre plusieurs dizaines de millions de gamètes, compensant la forte mortalité larvaire. La gonade, enveloppée d'un tissu conjonctif, se développe autour de la glande digestive. Les gamètes sont émis dans l'eau et donnent des larves mobiles d'environ 50 µm appelées larves trocophores. 24 à 48 heures après l'éclosion, une coquille à 2 valves apparaît. La larve est alors appelée veligère (ou larves D), elle possède une coquille et un vélum, organe servant à sa nutrition et locomotion, d'environ 70 µm. Les larves de bivalves sont en suspension dans la colonne d'eau ce qui permet leur dissémination géographique. Planctoniques, elles ont une durée de vie larvaire étroitement liée à la température de l'eau, pouvant aller de 21 à 28 jours. Au stade pédiveligère (après une vingtaine de jours de vie pélagique), la larve développe un pied participant à la recherche d'un substrat pour sa fixation. Une fois fixée, la larve débute sa métamorphose (huître de 300 µm) qui entraîne de nombreux remaniements : disparition du pied et du vélum, apparition du manteau et des branchies. L'huître atteint alors le stade naissain (ou juvénile). Elle passera le reste de sa vie fixée au substrat sans autre modification qu'une augmentation de taille. Le stade adulte est considéré comme atteint après la première saison de reproduction (Figure 55) (Grizel, 2003).

L'approvisionnement en juvéniles peut se faire de trois manières : par captage naturel, en récoltant les juvéniles sur des gisements d'huîtres ou par l'intermédiaire des écloséries. Le bassin d'Arcachon et le bassin de Marennes Oléron sont les 2 principaux sites de captage naturel de l'huître creuse en France. Après 9 à 18 mois, les naissains sont séparés et détachés de leurs collecteurs ; cette étape est le détroquage. Les huîtres sont ensuite mises en poche et sont élevées en poche disposées sur des tables où elles séjourneront encore deux ans avant d'être commercialisées. Un affinage en claire peut être ajouté et s'effectue dans des bassins peu profonds (anciens marais salants) ou bien dans des zones riches en phytoplancton comme un estuaire (Figure 56) (FAO©, 2007-2009).

Tableau 29 : Systématique de *Ostrea edulis* (Hayward *et al.*, 1995).

Règne	Animal, Invertébrés
Phylum	Mollusques
Classe	Lamellibranches (<i>Bivalvia</i>)
Ordre	<i>Ostreoida</i>
Sous-Ordre	<i>Ostreina</i>
Super-Famille	<i>Ostreacea</i>
Famille	<i>Ostreidae</i>
Genre	<i>Ostrea</i>
Espèce	<i>Ostrea edulis</i> (Linné, 1758)



Figure 57 : Photographies d'*Ostrea edulis* (à gauche : www.labelledugolfe.net/photo/gplate.jpg ; à droite : http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis).

18.1.2 L'huître plate, *Ostrea edulis*

L'huître plate européenne *Ostrea edulis* (Linné, 1758), est un mollusque bivalve peuplant la Côte Atlantique. Elle appartient à l'ordre des *Ostreoida* et à la famille des *Ostreidae* (Tableau 29 ; Figure 57).

L'huître plate, *Ostrea edulis*, est une native européenne. Elle se retrouve sur la côte ouest européenne de la Norvège jusqu'aux eaux proches du Maroc, le long de la Méditerranée ainsi que dans la Mer Noire. Elle se rencontre dans le Nord Est de l'Atlantique et dans tout le bassin méditerranéen. Des populations naturelles vivent aussi à l'est de l'Amérique du nord, suite aux introductions internationales de l'espèce en 1940 et 1950. Durant les 18^{ème} et 19^{ème} siècles, la pêche intensive et des hivers extrêmement froids ont conduit à une surexploitation, une baisse de recrutement et une destruction des gisements naturels européens. Pour faire face à la baisse de naissain et à l'émergence de maladies chez les populations d'huîtres, des changements dans les méthodes de culture se sont mis en place durant le 20^{ème} siècle. En effet, une mortalité massive a dévasté les populations d'huître plate européenne en 1920 (Pichot *et al.*, 1980). La population s'est rétablie mais elle a souvent été remplacée par des populations d'huître creuse dans plusieurs zones traditionnelles d'élevage. Deux maladies, la Martéiliose et la Bonamiose à l'origine de deux protozoaires *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974) et *Bonamia ostreae* respectivement (Pichot *et al.*, 1980), se sont répandues entre 1970 et 1980, réduisant la production de *O. edulis* dans presque toutes les zones traditionnelles de culture en Europe. Malgré les nouvelles pratiques de gestion et les programmes de repeuplement intensifs, la production d'*O. edulis* est restée affaiblie.

Ostrea edulis est un hermaphrodite protandrique (i.e. les individus sont d'abord mâles puis changent de sexe et se transforment en femelle), changeant généralement de sexe 2 fois par saison. Pendant la saison de reproduction, les huîtres se comportent tout d'abord en tant que mâles après sa fixation en printemps et s'inversent par la suite en femelle et *vice versa* au fil des saisons. Dans les eaux françaises, la gamétogenèse a lieu à 10°C et la ponte entre 14 et 16°C. Les gamètes femelles sont libérés dans la cavité palléale où ils sont fécondés par le sperme émis à l'extérieur. *O. edulis* produit entre 500 000 à 1 million d'œufs par ponte. L'émission finale des larves dans l'environnement se produit après une période d'incubation dépendante de la température qui dure 8 à 10 jours. Les larves (160 µm) vont ensuite encore passer 8 à 10 jours en phase pélagique avant la fixation.

Tableau 30 : Systématique de *Cerastoderma edule* (Hayward *et al.*, 1995).

Règne	Animal, Invertébrés
Phylum	Mollusques
Classe	Lamellibranches (<i>Bivalvia</i>)
Ordre	<i>Veneiroida</i>
Super-Famille	<i>Cardiacea</i>
Famille	<i>Cardiidae</i>
Sous-Famille	<i>Cardiinae</i>
Genre	<i>Cerastoderma</i>
Espèce	<i>Cerastoderma edule</i> (Linné, 1758) (synonyme avant 1950, <i>Cardium edule</i>)



Figure 58 : Photographies de *Cerastoderma edule* (photographies personnelles).

L'huître plate peut atteindre une taille de plus de 20 cm et vivre au-delà de 20 années (Gouletquer, 2004; FAO, c2006-2008).

O. edulis est présente sur les côtes, de la zone des marées jusqu'à 30 m de profondeur. Elle vit fixée sur un substrat dur mais on peut aussi la rencontrer détachée, sur le fond. Elle préfère les eaux salées, même si on peut la trouver dans les estuaires. Elle s'installe dans les eaux côtières, de préférence en milieux abrités, dans des habitats rocheux, parfois vaseux ou graveleux. Elle tolère une turbidité de l'eau faible mais l'eau doit être propre, oxygénée et riche en nutriments. Sa croissance est ralentie pour une température de l'eau inférieure à 10°C.

18.1.3 La coque, *Cerastoderma edule*

La coque commune *Cerastoderma edule* (Linné 1758), anciennement nommée *Cardium edule*, appartient à l'embranchement des Mollusques, à la classe des Bivalves, à l'ordre des *Veneroida* et à la famille des *Cardiidae* (Tableau 30 ; Figure 58).

La coque est l'un des mollusques bivalves les plus abondants sur les estrans semi abrités des baies sableuses et des estuaires (Bachelet *et al.*, 1992). Sa répartition s'étend de la mer de Barents au Maroc (Tebble, 1966). Ce suspensivore endogé, pouvant atteindre une taille de 50 mm, vit enfoui dans des sédiments sablo-vaseux ou sableux, voire même dans des fins graviers (Hayward & Ryland, 1990). Il se trouve essentiellement dans la zone intertidale, plus rarement en position subtidale (Guevara & Niell, 1989). Il vit enfoui à proximité de la surface. La coque filtre la matière organique (dont le phytoplancton), en suspension dans l'eau pour se nourrir grâce à son siphon inhalant. Il s'agit d'une espèce assez tolérante vis-à-vis des facteurs édaphiques et de la salinité (Guillou *et al.*, 1990), survivant à des salinités extrêmes de 10 ‰ et 45 ‰ (Rygg, 1970; Hayward & Ryland, 1990).

La température agit sur le déclenchement des pontes de la coque. La ponte ne peut être induite en dessous de 11-13°C (Kingston, 1974). Cette espèce gonochorique (sexes séparés), ovipare, à fécondité élevée, effectue sa fécondation en pleine eau. L'oeuf se développe en une larve pélagique dont la durée de vie est de 3 à 5 semaines. La sédentarisation se produit à une taille d'environ 280 µm (Creek, 1960). Le cycle sexuel de la coque comprend une période principale de ponte au printemps et une seconde période plus modeste en automne (Guillou *et al.*, 1990). La longévité maximale de l'espèce est d'environ 6 ans (Cole, 1956).

Tableau 31 : Systématique de *Ruditapes philippinarum* (Hayward *et al.*, 1995).

Règne	Animal, Invertébrés
Phylum	Mollusques
Classe	Lamellibranches (<i>Bivalvia</i>)
Ordre	<i>Veneroida</i>
Super-Famille	<i>Veneraceae</i>
Famille	<i>Veneridae</i>
Sous-Famille	<i>Cardiinae</i>
Genre	<i>Ruditapes</i>
Espèce	<i>Ruditapes philippinarum</i> (Adams & Reeve, 1850)



Figure 59 : Photographies de *Ruditapes philippinarum* (photographies personnelles).

Naturellement présente sur les côtes françaises de la Manche et de la Méditerranée, la coque est principalement exploitée par la pêche à pied. Depuis les années 1980, l'élevage s'est développé dans le traict du Croisic, seul site français aquacole pour la coque. La taille réglementaire de la coque pour la pêche est de 3 cm. La production annuelle varie de 1 200 à 2 000 tonnes, plaçant le traict du Croisic en deuxième position française après la baie de Somme (2 000 à 7 000 tonnes de pêche) (Guillou & Tartu, 1992).

18.1.4 La palourde, *Ruditapes philippinarum*

La palourde *Ruditapes philippinarum* communément appelée palourde japonaise, appartient à l'embranchement des Mollusques, à la classe des Bivalves, à l'ordre des *Veneroida* et à la famille des *Veneridae* (Tableau 31 ; Figure 59).

Cette espèce indigène de l'océan Pacifique à Indien a été introduite dans plusieurs parties du monde où elle est maintenant partiellement établie. Introduite accidentellement au début des années 1930 sur les côtes pacifique de l'Amérique du nord (Yap, 1977), cette population est maintenant présente de l'Oregon à la Colombie-Britannique. La production de naissains en aquaculture a ensuite facilité l'introduction de *Ruditapes philippinarum* le long de la côte pacifique. La surexploitation et les rendements irréguliers de l'espèce Européenne *Ruditapes decussatus* ont favorisé l'import de l'espèce japonaise sur les côtes européennes en raison de son meilleur taux de croissance. Ainsi, *R. philippinarum* a été introduite entre 1972 et 1975 dans les éclosiers français et à la fin des années 1970 en Grande-Bretagne (Flassch & Leborgne, 1992a). S'en sont suivi de nombreux échanges dans les eaux européennes en faveur de l'aquaculture, vers le Portugal, l'Irlande, l'Espagne et l'Italie. Aujourd'hui, on retrouve cette espèce sur la côte sud de la Grande-Bretagne (Humphreys *et al.*, 2007), tout le long du littoral français et espagnol atlantique et méditerranéen (Cesari & Pellizzato, 1990; Laruelle, 1999). Cette espèce a également été rapportée dans de nombreux autres pays, comme la Norvège (Mortensen & Strand, 2000), la Californie, le Maroc, la Tunisie (Cesari & Pellizzato, 1990), l'Israël et Tahiti (Ponurovsky & Yakovlev, 1992). *R. philippinarum* est maintenant la principale espèce produite en aquaculture en raison de sa meilleure compétitivité.

Comme la plupart des *Veneridae*, cette espèce est gonochorique. La gamétogenèse est initiée lorsque l'eau atteint les 12°C et dure 2 à 5 mois avant le démarrage de la période de fraie (Mann, 1979; Laruelle *et al.*, 1994; Hayward *et al.*, 1995; Laruelle, 1999; Ngo & Choi,

2004; Park & Choi, 2004). La durée des périodes de fraie varie géographiquement. Le long des côtes Atlantiques françaises, cette période prend place de fin août à début septembre de façon synchrone pour toute la population (Gouletquer, 1989; Robert *et al.*, 1993; Laruelle, 1999). Dépendant des conditions environnementales, les périodes de fraie peuvent avoir lieu de façon asynchrone entre mai et fin août (Laruelle, 1999; Calvez, 2003) et plus tardivement à la fin de l'automne (Gouletquer, 1989). *R. philippinarum* est méroplanctonique, ses gamètes sont libérés dans la colonne d'eau où la fertilisation et le développement des larves ont lieu. Les œufs fertilisés d'un diamètre d'environ 70 µm (Pronnier, 1996), atteignent le stade larvaire après 24 à 48 h et commencent à s'alimenter de phytoplancton. Cette vie planctonique durant laquelle les larves sont dispersées dans l'eau prend fin au bout de 10-15 jours, lorsqu'elles ont atteint le stade de larves pédivéligères (200 µm), ce qui les conduit passivement à sédimenter et à se fixer au substrat (Helm & Pelizzato, 1990; Jones *et al.*, 1993; Calvez, 2003). La première gamétogenèse se produit lorsque les individus ont atteint une taille de 20 mm (Laruelle, 1999). Elles peuvent atteindre à l'âge adulte une taille maximum de 70 à 80 mm.

La palourde *Ruditapes philippinarum* est un bivalve filtreur qui vit principalement dans des baies et estuaires peu profonds. Elle est capable de tolérer une eau douce à marée basse et sa répartition bathymétrique s'étend des premiers mètres de recouvrement à marée haute jusqu'à quelques mètres de profondeur de la zone subtidale. On la retrouve enfouie à quelques centimètres dans des sédiments comme le sable et les graviers boueux. Elle se nourrit grâce à son siphon qui lui permet de filtrer l'eau et les sédiments. Etant donné sa large répartition géographique, sa gamme de tolérance thermique l'est également avec toutefois un optimal de croissance entre 20 et 24°C (Solidoro *et al.*, 2000).

Sa haute valeur commerciale ajoutée à son importante performance de croissance, à sa tolérance élevée, à une faible qualité des sédiments et à des variations de salinité et de température font de la palourde *Ruditapes philippinarum* une espèce d'intérêt en aquaculture. Après son introduction en France durant les années 1970 (Flassch & Leborgne, 1992b), la culture de la palourde n'a cessé de se développer le long de la côte Atlantique : des baies d'Arcachon (Robert & Deltreil, 1990) et de Marennes–Oléron (Gouletquer *et al.*, 1989) jusqu'au bassin de l'Aber Wrac'h en Bretagne (Finistère) (Flassch & Leborgne, 1992b). Entre le printemps et l'été 1987, de fortes mortalités ont eu lieu dans le bassin de l'Aber Wrac'h dans les cultures en poches. A l'heure actuelle, ce site reste néanmoins le plus

Tableau 32 : Systématique de *Crepidula fornicata* (Hayward *et al.*, 1995).

Règne	Animal, Invertébrés
Phylum	Mollusques
Classe	<i>Gastropoda</i>
Sous-Classe	<i>Prosobranchia</i>
Ordre	<i>Mesogastropoda (Sorbeoconcha)</i>
Sous-Ordre	<i>Myomorpha</i>
Super-Famille	<i>Calyptraeacea</i>
Famille	<i>Calyptraeidae</i>
Genre	<i>Crepidula</i>
Espèce	<i>Crepidula fornicata</i> (Linné, 1758)



Figure 60 : Photographies de *Crepidula fornicata*

(à gauche : www.opalesurcasting.net/la_faune_aquatique/la_crepidule) ; à droite :
Photographie P. Briand/Ifremer)

important site de production en France (Paillard & Maes, 1989; Flassch & Leborgne, 1992b). Ces mortalités ont été associées à la maladie de l'anneau Brun, provoquant un dépôt sur la périphérie de la coquille interne (Paillard & Maes, 1989). La fréquence de la détection de ces symptômes associés à des mortalités massives rapportées de façon séquentielle le long de la côte Atlantique française dans la baie de Marennes–Oléron en 1988 (Gouletquer *et al.*, 1989) et dans la baie d'Arcachon en 1989 (Robert & Deltreil, 1990) ont contribué au déclin de la culture en France, uniquement restreinte aujourd'hui au bassin de l'Aber Wrac'h en Bretagne (Paillard, 2004).

18.2 Les gastéropodes

Les Gastéropodes sont des mollusques marins, dulçaquicoles ou présents dans des lieux humides. Ce sont des organismes rampant sur un large pied ventral souvent pourvu d'une coquille dorsale spiralée. Leur corps possède 2 ensembles : le céphalopodium, ensemble de la tête et du pied, et le complexe palléo-viscéral, constitué par la masse viscéreuse et le manteau la recouvrant formant la cavité palléale. Les gastéropodes présentent une symétrie bilatérale (Poutiers, 1998).

18.2.1 La crépidule, *Crepidula fornicata*

La Crépidule *Crepidula fornicata* (Linnée 1758), est un Mollusque marin appartenant à la classe des Gastéropodes, à l'ordre des *Mesogastropoda* et à la famille des *Calyptraeidae* (Tableau 32 ; Figure 60).

Crepidula fornicata originaire de la côte Est de l'Amérique du Nord a été introduite à la fin du 19^{ème} siècle en Angleterre par le biais d'importations d'huîtres d'Amérique du Nord (Hoagland, 1985). Cette espèce invasive, introduite sur les côtes anglaises il y a plus de 100 ans, prolifère actuellement sur les côtes Européennes, particulièrement le long des côtes de l'Atlantique et de la Manche. Son introduction accidentelle par le biais d'espèces exploitées, l'associe aujourd'hui bien souvent aux bassins conchylicoles. L'introduction en France daterait des années 1930 avec une deuxième vague d'introduction pendant la seconde guerre mondiale par les ports de Normandie et de Brest (Blanchard, 1995). Une accélération de son extension est liée à l'introduction de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* dans les années 1970. Son extension a été, par ailleurs, facilitée par les activités humaines d'échanges entre

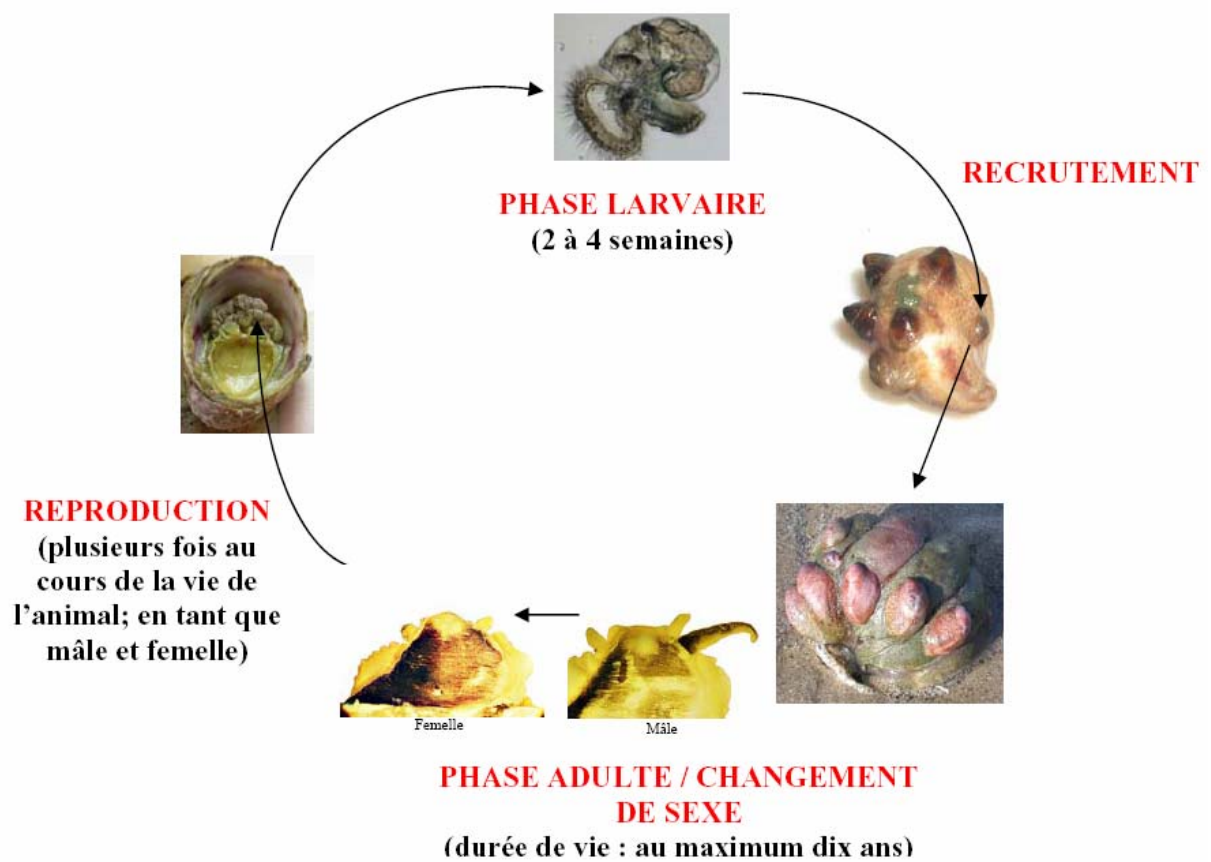


Figure 61 : Cycle de développement de la Crépidule *Crepidula fornicata* (d'après (Dupont, 2004).

les sites de conchyliculture (Blanchard, 1997; Sauriau *et al.*, 1998). Cette espèce est ainsi devenue dominante dans certaines baies comme à St Brieuc ou dans la rade de Brest (Eno *et al.*, 1997).

La crépidule vit dans les eaux superficielles entre le niveau des basses mers et la profondeur de 10 m. Elle vit sur des substrats durs mais s'adapte à des substrats meubles en profondeurs. *C. fornicata* est une espèce suspensivore se nourrissant de plancton. La longévité de l'espèce est d'environ 10 ans. Elle présente une forte tolérance aux variations de température et de salinité. Sa maturité sexuelle est atteinte dès l'âge de 3 mois. La particularité de cette espèce concerne son mode de reproduction par hermaphrodisme protandre caractérisé par sa vie en association. En effet, les individus empilés les uns sur les autres, forment des chaînes. La reproduction de l'espèce est ainsi facilitée par le recrutement des mâles sur les chaînes de femelles plus grosses se situant à la base de l'enchaînement. La fécondation est directe. Chaque femelle fécondée déposera sur le substrat (ou la coquille de l'individu inférieur) 40 à 70 capsules contenant chacune de 120 à 250 œufs. Après une période d'incubation de 3 à 4 semaines, les larves vont éclore, mener une vie planctonique de l'ordre de 2 à 3 semaines, puis se métamorphoser et se fixer sur n'importe quel substrat dur (Figure 61) (Pechenik, 1984; Gaudette *et al.*, 2001; Pechenik *et al.*, 2002; Pechenik *et al.*, 2004).

Les raisons de sa prolifération sont diverses. *Crepidula fornicata* est une espèce opportuniste grâce à une stratégie de reproduction efficace, de faibles exigences écologiques et l'absence de prédateurs. De plus, cette espèce s'installe sur des fonds de natures diverses et les chaînes de crépidules adultes servent de support pour les recrues. Enfin, si les activités conchylicoles ont été un vecteur majeur dans la propagation de la crépidule sur le littoral français, la pêche côtière aux engins traînants a, depuis, favorisé localement sa dissémination. La prolifération de *Crepidula fornicata* modifie la texture des fonds qu'elle colonise, en produisant des éléments grossiers (coquilles) et fins (biodépôts). Il en résulte une hétérogénéité sédimentaire qui entraîne une diversification des "niches", avec pour principale conséquence la fixation d'une épifaune riche et variée. Mais cet accroissement local de la diversité s'accompagne d'une banalisation des fonds à une plus grande échelle spatiale. S'ajoute un risque de compétition pour l'espace et la nourriture vis-à-vis d'autres filtreurs. La compétition spatiale s'observe dans les secteurs fortement colonisés où les gisements de certains pectinidés (coquilles St Jacques et pétoncle) disparaissent par manque de place

Tableau 33 : Systématique de *Buccinum undatum* (Hayward *et al.*, 1995).

Règne	Animal, Invertébrés
Phylum	Mollusques
Classe	<i>Gastropoda</i>
Sous-Classe	<i>Prosobranchia</i>
Ordre	<i>Neogastropoda</i>
Famille	<i>Buccinidae</i>
Sous-Famille	<i>Buccininae</i>
Genre	<i>Buccinum</i>
Espèce	<i>Buccinum undatum</i> (Linné, 1758)



Figure 62 : Photographies de *Buccinum undatum* (photographies personnelles).

disponible ainsi que par l'envasement provoqué par la crépidule, défavorable à leur recrutement. Par ailleurs, la crépidule entre en compétition trophique avec les mollusques exploités ou non, tels que huîtres, moules, coques ou palourdes. Certains secteurs conchylicoles traditionnels deviennent ainsi inexploitable du fait de l'augmentation du volume de crépidules récoltées et de l'allongement du temps de tri. Un déplacement de certaines de ces activités est alors constaté localement. Jusqu'à ces dernières années, la lutte contre la crépidule était limitée à des nettoyages ponctuels opérés par dragage des parcs ostréicoles (Marennes-Oléron et Cancale). Aujourd'hui, un projet de son exploitation industrielle est envisagé en Bretagne. Il vise à récolter massivement la crépidule dans les secteurs les plus fortement colonisés puis à la transformer à des fins agro-alimentaires.

Une étude sur les bivalves réalisées en 2002 dans le golfe normand-breton a montré la présence de crépidules au large de la côte ouest du département de la Manche, s'étendant autour des îles Chausey (biomasse faible à moyenne (entre 0 et 750 g/0,25 m²)) et entre l'île de Jersey et la côte (biomasse moyenne à forte (entre 750 et 4250 g/0,25 m²)) (Pitel *et al.*, 2004). Au niveau côtier, l'Est Cotentin est très touché par la prolifération de crépidules particulièrement entre l'île Tatihou et Ravenoville. Enfin, plusieurs populations de crépidules ont été observées sur le littoral, dans le port de Cherbourg (grande rade) (population présente depuis 1945); sur l'estran d'Utah Beach, dans l'est des parcs à huîtres de la Baie des Veys et au niveau des platiers de Luc-sur-Mer (Pitel *et al.*, 2004).

Des travaux de valorisation de cette espèce invasive tentent à se développer, notamment en baie du Mont Saint-Michel dans la finalité de diminuer le stock, en transformant les coquilles en aliment calcique agricole.

18.2.2 Le bulot, *Buccinum undatum*

Le buccin *Buccinum undatum* (Linnée 1758), est un Mollusque marin appartenant à la classe des Gastéropodes, à l'ordre des *Neogastropoda* et à la famille des *Buccinidae* (Tableau 33 ; Figure 62). Cette espèce est très répandue dans les eaux tempérées et froides des mers du Nord. Son aire de répartition s'étend du Canada aux mers sibériennes au Nord et aux aires bordant l'océan Atlantique, des côtes bretonnes françaises à la côte portugaise, celle-ci représentant sa limite sud (Taylor et Taylor, 1977).

Il s'agit d'un des carnivores les plus abondants de la zone côtière sublittorale, peu adapté aux conditions intertidales bien qu'on en trouve encore à 100 m de profondeur à marée basse. Il a une vie benthique, avec des déplacements limités. Il demeure le plus souvent immobile et enfoui. Il est présent sur des substrats meubles comme le sable, la boue sableuse ou les zones rocailleuses souvent riches en débris coquilliers (Nielsen, 1975). Son corps proprement dit se décompose en quatre régions : la tête, le pied, le sac viscéral et le manteau. Il s'agit d'une espèce extrêmement variable dans la taille de sa coquille, aussi bien que dans son poids, sa forme et sa couleur.

Cette espèce gonochorique atteint sa maturité sexuelle à l'âge de 5-7 ans, selon les sexes et conditions environnementales locales. Au Québec, la taille à maturité est de 7-8 cm (Gendron, 1992) tandis qu'en France, elle est atteinte à 4 ans pour une taille de 5.5 cm et un poids d'une vingtaine de grammes. La reproduction a lieu à l'automne, mais elle est variable en fonction des régions (Martel *et al.*, 1986). La fécondation est interne, elle est suivie peu de temps après par la ponte. Les femelles se déplacent sur les zones de substrats durs pour y pondre et accrocher leur oeufs enfermés dans des capsules chitineuses soudées les unes aux autres. Elles forment alors des amas plus ou moins réguliers pouvant regrouper jusqu'à 15 000 capsules contenant chacune de 50 à 2 000 œufs. Il n'y a pas de vie larvaire planctonique. A l'éclosion, vers février, chaque capsule libère 10 à 20 jeunes individus qui présentent déjà les caractéristiques morphologiques des adultes. Leur taille adulte varie de 60 mm à 12 mm. Sa durée de vie est d'une dizaine d'années (Santarelli, 1986).

Ce prédateur carnivore identifie sa source de nourriture par chimiotactisme (Bailey & Laverack, 1966). Il vit dans des zones de températures modérées à froide où la température de l'eau ne dépasse pas 29°C, sa limite létale (Gowanloch, 1927). Sa tolérance pour la salinité est limitée à 2‰ (Russell-Hunter & Russell-Hunter, 1963; Staaland, 1972).

Le bulot fait l'objet de pêche aux casiers essentiellement au large de Saint Malo et de Granville. En effet, Granville en Normandie reste le premier port de pêche de ce gastéropode en France, même si de nouvelles zones de pêches ouvrent en baie de Seine et Bretagne Nord.

Tableau 34 : Systématique de *Littorina littorea* (Hayward *et al.*, 1995).

Règne	Animal, Invertébrés
Phylum	Mollusques
Classe	Gastropoda
Sous-Classe	<i>Prosobranchia</i>
Ordre	<i>Mesogastropoda</i>
Super-Famille	<i>Littorinacea</i>
Famille	<i>Littorinidae</i>
Sous-Famille	<i>Littorininae</i>
Genre	<i>Littorina</i>
Espèce	<i>Littorina littorea</i> (Linné, 1758)



Figure 63 : Photographies de *Littorina littorea* (photographies personnelles).

18.2.3 Le bigorneau, *Littorina littorea*

Le bigorneau commun *Littorina littorea* (Linnée 1758), est un mollusque marin appartenant à la classe des Gastéropodes, à l'ordre des *Mesogastropoda* et à la famille des *Littorinidae* (Tableau 34 ; Figure 63).

L'espèce *Littorina littorea* est très répandue dans les eaux tempérées et froides des mers du Nord. Son aire de répartition s'étend des îles Britanniques et du nord-ouest de l'Europe aux côtes américaines Atlantique du Labrador au New Jersey. Il est également devenu abondant en Nouvelle Angleterre (Buckman *et al.*, 2005).

Les bigorneaux sont distribués dans la zone rocheuse de l'estran. Ils vivent en agrégats dans le sous étage aquatique de balancement des algues telles que *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum* mais peuvent aussi être retrouvés dans les crevasses des rochers, sur le sable ou encore dans les eaux saumâtres et les estuaires (Department of Fisheries and Oceans (DFO), 1998). Cette espèce est considérée comme un bon indicateur de pollution. La durée de vie moyenne de *Littorina littorea* est de 10 ans pour une taille de coquille de 20 mm, quelques rares individus pouvant atteindre 52 mm. Ils représentent un des principaux brouteurs du rivage. Ils se nourrissent de microalgues telles que les diatomées benthiques et les dinoflagellés aussi bien que de macroalgues comme *Ulva lactuca* ou encore de jeunes algues rouges ou brunes (Jackson, 2008). Il s'agit d'une espèce relativement tolérante aux variations de température (entre 0°C en hiver et 25°C en été). Sa tolérance en salinité se limite à 9,5 ‰, mais sa principale faiblesse reste son manque de mobilité qui en fait une proie facile pour ses prédateurs (Reid, 1996).

Cette espèce gonochorique atteint sa maturité sexuelle à l'âge de 2-3 ans, variable selon les sexes et conditions environnementales locales. La période de reproduction peut avoir lieu toute l'année mais sa durée varie fortement en fonction des conditions climatiques et de la richesse en nourriture du milieu. *Littorina littorea* est un organisme ovipare avec une fertilisation interne. La femelle rejette dans la mer des capsules de 1 mm contenant les œufs. Chaque capsule peut contenir jusqu'à 9 œufs, mais la quantité ne dépasse pas 2 à 3 œufs par capsule en moyenne. La période d'évacuation des œufs est généralement synchronisée avec les marées de ressort du printemps. La phase larvaire pélagique dure environ 6 semaines (Jackson, 2008).

ANNEXE 2



Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs

Diane Defer^{a,b}, Nathalie Bourgougnon^{a,b}, Yannick Fleury^{a,c,*}

^a Université Européenne de Bretagne, France

^b Université de Bretagne Sud, Centre d'Enseignement et de Recherche Yves Coppens, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines EA3884, Campus de Tohannic BP573, 56017 Vannes Cedex, France

^c Université de Brest, Institut Universitaire de Technologie, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne EA3882 IFR148 SclnBioS, 6 rue de l'université, 29334 Quimper Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2008

Received in revised form 17 March 2009

Accepted 28 March 2009

Keywords:

Antimicrobial compounds
Antibacterial and antiviral activities
Marine molluscs
Antibiotic alternative

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the presence of antimicrobial activities in the hemolymph of commercially important mollusc species. Acidic extracts were prepared from whole *Cerastoderma edule* (Cardiidae), *Ruditapes philippinarum* (Veneridae), *Ostrea edulis* (Ostreidae), *Crepidula fornicata* (Calyptaeidae) and *Buccinum undatum* (Buccinidae) and fractionated by Solid Phase Extraction. Fractions were first assayed for antibacterial activity against two indicator strains by an antagonism well diffusion method. Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were then determined against a panel of target bacteria including three Gram-positive and seven Gram-negative bacteria, some of which are aquaculture-pathogenic marine strains. In parallel, antiviral activities were assayed *in vitro* against *Herpes simplex virus type 1* and Vero cells by cell viability. The broadest antibacterial activity was found in fractions from *C. edule*, but the highest activity was found in *O. edulis* (gills + mantle). At the antiviral level, the most active fraction was also attributed to *C. edule* acidic extract. Furthermore, SPE-fractions from other molluscs (40% SPE-fraction from *O. edulis* (gills + mantle), and 80% SPE-fractions from *B. undatum*, *C. edule* and *R. philippinarum* extracts) displayed lower EC₅₀ values than the 40% SPE from *C. edule* but at *in vitro* concentrations causing more cytotoxicity. These promising results have led us to consider purification of the active compound(s) which may be related to mollusc defense mechanisms.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aquaculture is the world's fastest-growing sector of agriculture, chiefly dominated by fish farming for production both in fresh and salt-water environments for food-production (Ravi et al., 2007). Unfortunately, pisciculture encounters serious difficulties with microbial and parasitic infections, in spite of the use of antibiotics as prophylactic agents mainly for therapeutic purposes. The occurrence of antibiotic-resistant fish or shellfish pathogens associated with the increasing fight against bacterial antibiotic resistance have made it necessary to find new efficient alternatives to treat maricultured

species (Bansemir et al., 2006; Braithwaite and McEvoy, 2005; Projan and Bradford, 2007). New strategies including vaccination, probiotics and novel antimicrobial compounds must also be developed to prevent bacterial infection in intensive aquaculture (Balcázar et al., 2006; Panigrahi and Azad, 2007).

Most marine animal life is fixed to a substratum. It produces bioactive metabolites in response to ecological pressures such as competition for space, deterrence of predation and the ability to reproduce successfully. In a marine environment, where all surfaces are constantly exposed to the threat of surface colonisation, sessile organisms remain relatively free of biofouling. These sedentary organisms control fouling epibionts by effective antimicrobial mechanisms (Tincu and Taylor, 2004). Marine invertebrates offer a source of potential antimicrobial drugs (Bansemir et al., 2006; Bazes et al., in press; Jayaraj et al., 2008; Mayer et al., 2007). Discovered bioactive compounds in molluscs were identified essentially as peptide, depsipeptide, sterols, sesquiterpene, terpenes, polypropionate, nitrogenous compounds, macrolides, prostaglandins and fatty acid derivatives, sterols, miscellaneous compounds and alkaloids; they all presented specific types of activities (Balcázar et al., 2006; Blunt et al., 2006; Maktoob and Ronald, 1997). Studies of antimicrobial mechanisms and compounds of marine invertebrates may provide

Abbreviations: AMPs, antimicrobial peptides; CFU/ml, colony forming unit per milliliter; CC₅₀, the 50% cytotoxic concentration; CPE, cytopathic effect; EC₅₀, the 50% effective antiviral concentration; FCS, fetal calf serum; HCl, hydrochloric acid; HSV-1, *Herpes simplex virus type 1*; ID₅₀/cell, 50% infectious dose per cell; IU/ml, international unit per milliliter; MEM, minimum essential medium; MICs, minimum inhibitory concentrations; OD, optical density; PCS, penicillin, colimycin, streptomycin antibiotics; SPE, Solid Phase Extraction; TFA, trifluoro-acetic acid.

* Corresponding author. Université Européenne de Bretagne, France. Tel.: +33 2 98 64 19 30; fax: +33 2 98 64 19 69.

E-mail address: fleury@univ-brest.fr (Y. Fleury).

Table 1
Acidic extracts from selected gastropods and bivalves.

Species	Number of animals	Wet weight of flesh (g)	Acidic extracts		SPE-fractions [protein] (µg/ml)		
			Volume (ml)	[Protein] (µg/ml)	10%	40%	80%
<i>Cerastoderma edule</i>	58	123	1030	1581	918	6000	340
<i>Ruditapes philippinarum</i>	48	191	910	1948	1100	10,000	500
<i>Crepidula fornicata</i>	75	125	975	3637	684	9600	440
<i>Buccinum undatum</i>	19	168	1100	5364	1275	18,000	520
<i>Ostrea edulis</i>							
Digestive gland	50	107	990	2231	976	16,000	400
Gills + mantle	50	105	1020	1309	682	4500	5120

valuable information for new antibiotic discoveries and give new insights into bioactive compounds in aquacultured molluscs.

The aim of this work was to investigate the antimicrobial activity of extracts of marine molluscs of economic importance in Brittany: three farmed bivalve molluscs *Cerastoderma edule* (Cardiidae), *Ruditapes philippinarum* (Veneridae) and *Ostrea edulis* (Ostreidae) and two gastropods *Buccinum undatum* (Buccinidae) and *Crepidula fornicata* (Calypttraeidae). So a three-step solid phase extraction protocol was designed, using C18 column to concentrate antimicrobial compounds. Antimicrobial activity was screened against fish pathogens widely distributed in a variety of economically important warm and cold water fish species, and every year results in considerable economic losses in aquaculture (Abdel-Raouf and Ibraheem, 2008; Toranzo et al., 2005). *Listonella anguillarum* and *Aeromonas* species frequently lead to vibriosis and furunculosis (Dubber and Harder, 2008). *Vibrio alginolyticus* is frequently involved in epizootic outbreaks in farmed gilt-head bream in Mediterranean aquaculture, causing fish mortality and important economic losses (Balebona et al., 1998). *Vagococcus salmoninarum* infects the salmonids from distinct geographical origins (Michel et al., 1997) and *Yersinia ruckeri*, an etiological agent of yersiniosis causes serious infectious diseases in salmonids (Fernandez et al., 2003). Standard test organisms such as *Escherichia coli* for Gram-negative bacteria or *Micrococcus luteus* and *Bacillus megaterium* were also assayed. Antiviral activity was investigated against an enveloped DNA virus, *Herpes simplex virus type 1* (HSV-1), using Vero cells. This model is currently used for the screening of antiviral molecules from marine organisms (Maier et al., 2001; Olicard et al., 2005; Yasin et al., 2000). Furthermore, aquatic viruses, members of the *Herpesviridae* family are well known to have a morphology and protein structure similar to HSV-1 (Ilouze et al., 2006). For example, the *Koi Herpes virus* induces massive mortality of carp causing huge financial losses for fish farmers (Perelberg et al., 2005). The choice of a heterologous model was imposed by the lack of bivalve cell lines (Renault and Novoa, 2004).

2. Materials and methods

2.1. Organisms

Living specimens *C. edule* (Cardiidae), *R. philippinarum* (Veneridae), *O. edulis* (Ostreidae) and *B. undatum* (Buccinidae) were obtained from oyster farmers from the bay of Quiberon, Morbihan, France. *C. fornicata* (Calypttraeidae) gastropods from the Golfe du Morbihan were obtained from a fishmonger and were collected as epigrowth of common scallop shells. All the specimens were collected in March 2007. Furthermore, to facilitate their opening, the cockles and clams were exposed over night to a 7.5% MgCl₂ / half sea water solution.

2.2. Extraction and purification

2.2.1. Acidic extraction

Organisms were first carefully removed from their shells. Extraction was performed by incubation in hydrochloric acid (HCl) 1 N (1 L) for 10 min at 100 °C on about 100 g to 200 g of wet weight of tissue from

about fifty animals (Zatylny et al., 2000). After homogenisation (Warring Blender, 1 min, high speed) they were clarified by centrifugation at 20000 ×g for 30 min at 4 °C. The supernatant was collected and called the acidic extract (Table 1). Concerning *O. edulis* specimens, the gills with mantle from the digestive gland we studied separately.

2.2.2. Solid phase separation

Acidic extracts were loaded and fractionated onto C-18 cartridges (Col SPE/C18 UPTI-clean, Interchim, 4 g) equilibrated with 10% Acetonitrile (ACN), 0.1% Trifluoro-acetic acid (TFA). Three successive elutions were performed by 10%, 40% and then 80% ACN in Milli-Q water (v/v) (containing 0.1% TFA) (Ehret-Sabatier et al., 1996). Unretained and eluted compounds with 10% ACN were pooled. Obtained fractions were named 10%, 40% and 80% Solid Phase Extraction fractions (SPE-fractions). The three 10%, 40% and 80% SPE-fractions from the acidic extracts were lyophilized and reconstituted in Milli-Q water (in 1% (v/v) of initial acidic extracts supernatant volume) before being sterilized, using 0.2 µm filters. Protein concentration was determined for reconstituted Milli-Q water SPE-fractions and for initial acidic extracts by the MicroBC Assay Kit (Interchim) (Table 1). The 10%, 40% and 80% SPE-fractions were kept frozen at –20 °C until antimicrobial assays were performed. Antibacterial and antiviral activities were assessed.

2.3. Antimicrobial assays

Fractions were assayed for antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria (see below) using a well-diffusion assay. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of active fractions were then determined. Antiviral activity was estimated against *Herpes simplex virus type 1*, using Vero cells.

2.3.1. Bacterial strains and growth conditions

Three Gram-positive and seven Gram-negative bacteria were used as target bacteria. These were chosen because they are fish pathogenic marine bacteria (Balebona et al., 1998; Fernandez et al., 2003; Michel et al., 1997; Mizuki et al., 2006; Montfort and Baleux, 1990; Ringo, 2008; Zanetti et al., 1999) or are commonly used for antimicrobial tests. *M. luteus* (ATCC 10240) and *E. coli* (ATCC 25922) were grown at 37 °C in liquid Tryptic Soy Broth; *B. megaterium* (ATCC 10778) was grown at 30 °C in liquid Luria-Bertani Broth; *Aeromonas salmonicida* (ATCC 14174), *Aeromonas hydrophila* (CIP 7614) and *V. salmoninarum* (18–96) were grown at 30 °C in liquid Tryptic Soy Broth; *Aeromonas caviae* (CIP 7616) and *Y. ruckeri* (ATCC 29473) were grown at 30 °C in liquid Colombia Broth; *L. anguillarum* (NCBIM 829) was grown at 25 °C in liquid Tryptic Soy Broth with 1.5% of NaCl and *V. alginolyticus* (CIP 103360) was grown in liquid Luria-Bertani Broth with 2.5% of sea salt.

2.3.2. Well-diffusion assay

SPE-fractions were first assayed for antibacterial activity using the antagonism well-diffusion method. Buffered medium agar with phosphate 100 mM pH7 (in order to avoid organic acid inhibition) was inoculated with target bacteria at 1 × 10⁶ CFU/ml and plated in a sterile Petri dish (15 cm diameter). Two indicator strains were

selected. The first was *M. luteus*, a Gram-positive bacteria known as one of the most sensitive (Hubert et al., 1996) while the second was *L. anguillarum*, a Gram-negative bacterium identified as a fish bacterium pathogen (Mizuki et al., 2006). Wells (diameter, 5 mm) were punched in the agar plate and 60 µl of SPE-fractions to be assayed were added. The plate cultures were incubated at optimal growth temperature for 18 h. Negative control (sterile water) and positive control were used (lysozyme (1 mg/ml) for Gram-positive bacteria and polymyxine B (1 mg/ml) for Gram-negative bacteria) (adapted from (Bulet et al., 1991)). Growth inhibition of the indicator bacterium was evaluated by the inhibition zone size surrounding the wells after 18 h of incubation (Relf et al., 1999). Assays were carried out in duplicate.

2.3.3. Minimal Inhibitory Concentrations (MICs)

Minimal inhibitory concentrations were determined in standard 96-well microtiter plates against the bacterial panel. 50 µl of a twice concentrated medium, inoculated at 2×10^5 CFU/ml with target bacterium of an exponential growing phase culture, were added to 50 µl of a 2-fold serial dilution of SPE-fractions. The plates were incubated for 48 h at the optimal growth temperature as above. Bacterial growth was measured at 600 nm for optical density after a 48 h incubation. Evaluation was carried out in triplicate. MIC was defined as the lowest protein concentration displaying 100% growth inhibition after 48 h of incubation.

2.3.4. Antiviral activity

2.3.4.1. Cells and virus. The cell line used was the African green monkey kidney cells (Vero, ATCC CCL-81) grown in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, Eurobio) supplemented with 8% fetal calf serum (FCS, Eurobio) and 1% of antibiotics PCS (10000 IU/ml penicillin, 25000 IU/ml colimycin, 10 mg/ml streptomycin; Sigma). The Vero cell lines were grown and maintained in a humidified incubator at 37 °C, in a 95% air, 5% CO₂ (v,v) atmosphere. Virus stock of *Herpes simplex virus type 1* (HSV-1) (wild 17 strain ACVs and PFAs, sensitive to acyclovir) was obtained from Pr. Ingrand (Hôpital A. Béclère, Reims, France). The virus stock was prepared by incubating Vero monolayers (75 cm² culture flasks seeded with 3.5×10^5 cells/ml) at low multiplicity and incubating at 37 °C, in a 95% air, 5% CO₂ (v, v) atmosphere. Two or three days after infection, the cultures were frozen and thawed twice, before clearing the preparation by centrifugation at 10000 ×g for 10 min, and the resulting supernatant aliquot was stored at –80 °C until used. Virus titrations were performed by the limiting dilution method (Reed and Muench, 1938) using 10 wells on 96-well microtiter plates per dilution. The virus titer was estimated from cytopathogenicity and expressed as 50% infectious doses per milliliter (ID₅₀/ml). The HSV-1 stock used had a titer of $2 \times 10^{8.02}$ ID₅₀/ml. This model is currently used for the screening of antiviral molecules from marine organisms (Yasin et al., 2000).

2.3.4.2. Cytotoxicity assay by cell viability. Dilutions of SPE-fractions (50 µl) were prepared in Eagle's MEM supplemented with 8% FCS and distributed into the wells of a 96-well microtest III tissue culture plate (Nunclon, Intermed). A series included eight assays ranging from extreme concentrations to various linear dilutions of SPE-fractions from acidic extracts (4 wells per concentration, 48 h, 37 °C, 5% CO₂). 100 µl of cellular suspension (3.5×10^5 Vero cells/ml) in Eagle's MEM containing 8% FCS were distributed into the wells using a multi-channel Titertek® pipette with 50 µl of culture medium. Daily cell examinations were performed under a phase-contrast microscope to determine the minimum concentration which induced cell morphology alterations such as swelling, shrinkage, granularity and floating. After a 48 h incubation microscopic examination was performed to check the potential cytotoxicity. Then 50 µl of neutral red dye (0.15% in saline, pH 5.5) were added to each well and cultures were incubated for 45 min at 37 °C, in a 95% air, 5% CO₂ (v,v) atmosphere (McLaren

et al., 1983). Excess dye was removed by rinsing with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2; Biomérieux) and the neutral red incorporated by the viable cells was eluted into 100 µl/well of citrate ethanol buffer. After shaking the tray for 20 min., whereby cells monolayers were completely destroyed, the absorbance (OD) of the wells was read in a multichannel spectrophotometer (Packard Spectra Count™) at 540 nm. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of the test compound was defined as the concentration that reduced the absorbance of mock-infected cells to 50% of that of controls. CC₅₀ values were expressed as the percentage of cytotoxicity and calculated as $[(\text{ODc})\text{C} - (\text{ODc})\text{MOCK} / (\text{ODc})\text{C}] \times 100$. Where (ODc)C and (ODc)MOCK were the OD values of the untreated cells and treated cells respectively (Langlois et al., 1986; Sudo et al., 1994; Takeuchi et al., 1991). The CC₅₀ concentrations were calculated from concentration–effect curves after linear regression analysis. Evaluation was carried out in triplicate.

2.3.4.3. Antiviral assay by cell viability. 50 µl of SPE-fractions diluted with MEM 8% FCS, was distributed into the 96 wells containing 100 µl of a cellular suspension of Vero cells in the same medium (3.5×10^5 cells/ml). The cells were then infected with 50 µl of mock- and virus cell suspensions at multiplicity of infection (MOI) of 0.001 ID₅₀/cells. Each concentration of SPE-fractions was tested 4 times. After 48 h of incubation at 37 °C, in a 95% air, 5% CO₂ (v,v) atmosphere, the antiviral activity was evaluated by the neutral red dye method (McLaren et al., 1983). Cell and virus controls were run simultaneously. The antiherpetic compound acyclovir [9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanosine] (Merck) was used as a reference for HSV-1 inhibition. The optical density (OD) was directly related to the percentages of viable cells that were inversely proportional to CPE ratio. The 50% effective antiviral concentration (EC₅₀) was expressed as the concentration that achieved 50% protection of virus-infected cells from virus-induced cytotoxicity. The straight line of the regression was determined for each assay and each plate on the basis of cell controls (0% CPE) and virus controls (100% CPE) (Langlois et al., 1986). The percent inhibition of viral activity was calculated by the following formula:

$$[(\text{ODt})\text{virus} - (\text{ODc})\text{virus}] / [(\text{ODc})\text{MOCK} - (\text{ODc})\text{virus}] \times 100$$

where (ODt)virus was the OD of the test sample, (ODc)virus was the OD of the virus-infected control (no samples), and (ODc)MOCK was the OD of the mock-infected control. The ratio of (ODc)virus to (ODc)MOCK is expressed as “% of control” (Sudo et al., 1994; Takeuchi et al., 1991). The EC₅₀ concentrations were calculated from concentration–effect curves after linear regression analysis. The results were expressed using the selectivity index (SI = CC₅₀/EC₅₀). Evaluation was carried out in triplicate.

3. Results

3.1. Antibacterial screening

Antibacterial activities are mainly detected in the 40% SPE-fractions of acidic extracts against both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Table 2). All 40% SPE-fractions exhibit antagonism against the two target bacteria except for those from *O. edulis* (gills + mantle) (Table 2). For the last-mentioned, the antibacterial activity is only detected in the 80% SPE-fractions, which shows the biggest inhibition zone. When compared, 40 and 80% SPE-fractions globally exhibit equivalent antibacterial activity against both *M. luteus* and *L. anguillarum*. To be noted, no antibacterial inhibition was detected from the 10% SPE-fractions of acidic extracts. Firstly, results have helped to reveal the presence of antibacterial compounds in 40 and 80% SPE-fractions of acidic extracts from these marine molluscs. Secondly, the fact that only 40 and 80% SPE-fractions exhibit

Table 2

Antibacterial activities of the fractionated acidic extracts of marine molluscs against two target bacteria *Micrococcus luteus* and *Listonella anguillarum*.

Acidic extracts from	SPE-fractions					
	10%		40%		80%	
	<i>M. luteus</i>	<i>L. anguil.</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. anguil.</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. anguil.</i>
<i>Cerastoderma edule</i>	–	–	++	+	+	+
<i>Ruditapes philippinarum</i>	–	–	++	+	+	–
<i>Crepidula fornicata</i>	–	–	+	+	–	–
<i>Buccinum undatum</i>	–	–	+	+++	–	–
<i>Ostrea edulis</i>	–	–	–	–	–	–
Digestive gland	–	–	+	+++	–	–
Gills + mantle	–	–	–	–	++	–

Diameters of growth inhibition were used to defined inhibition categories; +: corresponding to growth inhibition diameter below 7 mm; ++: corresponding to inhibition diameter comprise between 7 and 10 mm; +++: corresponding to inhibition diameter upper than 10 mm; and (–) means that no inhibition was detected. Assays were carried out in duplicate.

antibacterial activity demonstrates the amphiphilic character of the active compound(s).

3.1.1. Minimal Inhibitory Concentrations determination

The well diffusion method previously used is sensitive and easy to bring into play but it has been shown to be unsuited for the detection of certain classes of antimicrobial compounds (du Toit and Rautenbach, 2000). So we have determined Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) against a broader spectrum of target cells in a liquid medium. Gram-positive and Gram-negative bacteria from marine origin or not were selected. Results are shown in Table 3. No antibacterial activity was either detected in 10% SPE-fractions, whichever the target bacteria (results not shown). *Aeromonas* species were insensitive to any SPE-fractions of acidic extracts assayed. Antibacterial activities were otherwise detected as expected in the 40% and 80% SPE-fractions even though only weak activity was detected

Table 3

Antibacterial spectrum of activity of the 40% and 80% SPE-fractions from acidic extracts, expressed as MICs ($\mu\text{g/ml}$).

Bacteria	40% SPE-fractions from acid extract of						Control
	<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Crepidula fornicata</i>	<i>Buccinum</i>	<i>Ostrea undatum edulis</i>		
					G + M	DG	
<i>Aeromonas salmonicida</i>	–	–	–	–	–	–	ND
<i>Aeromonas caviae</i>	–	–	–	–	–	–	ND
<i>Aeromonas hydrophila</i>	–	–	–	–	–	–	ND
<i>Escherichia coli</i>	300	500	300	–	–	–	4
<i>Listonella anguillarum</i>	1500	1000	2400	2250	–	1000	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	300	500	600	–	–	–	16
<i>Yersinia ruckeri</i>	75	125	1200	1125	60	500	1
<i>Bacillus megaterium</i>	150	250	600	560	240	–	1
<i>Micrococcus luteus</i>	150	250	2400	560	2400	2000	4
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	300	ND	ND	ND	ND	ND	63
	80% SPE-fractions from acid extract of						
	<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Crepidula fornicata</i>	<i>Buccinum undatum</i>	<i>Ostrea edulis</i>		Control
<i>Aeromonas salmonicida</i>	–	–	–	–	–	–	ND
<i>Aeromonas caviae</i>	–	–	–	–	–	–	ND
<i>Aeromonas hydrophila</i>	–	–	–	–	–	–	ND
<i>Escherichia coli</i>	170	250	–	–	–	–	4
<i>Listonella anguillarum</i>	85	250	–	260	2560	200	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	170	250	250	–	–	–	16
<i>Yersinia ruckeri</i>	85	250	–	–	–	–	1
<i>Bacillus megaterium</i>	43	–	–	130	40	100	1
<i>Micrococcus luteus</i>	43	63	–	–	2560	100	4
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	170	250	–	260	ND	ND	63

–: No inhibitory effect; ND: Not Determined. MICs were defined as the lowest protein ($\mu\text{g/ml}$) concentration displaying 100% of inhibition after 48 h incubation in optimal growth conditions. Lysozyme and Polymyxine B were used as positive controls against Gram-positive and Gram-negative bacteria respectively. G + M and DG respectively mean Gills + Mantle and Digestive Gland.

against *L. anguillarum*, with the exception of the *C. edule* 80% SPE-fraction which presented potent activity with a MIC of 85 $\mu\text{g/ml}$ (Table 3). Within a mollusc species, the antibacterial activity is broader in the 40% SPE-fraction, but higher in the 80% SPE-fraction on the rare sensitive strain such as *L. anguillarum*, *B. megaterium*, *M. luteus* and *V. Salmoninarum*.

Based on protein concentration (although the chemical nature of antimicrobial compounds is not known), low, medium or high antibacterial activities were respectively defined for MICs upper to 1000 $\mu\text{g/ml}$, MICs between 1000 $\mu\text{g/ml}$ to 200 $\mu\text{g/ml}$, and finally MICs lower than 200 $\mu\text{g/ml}$. Using this classification, SPE-fractions from *C. edule* are distinctly the most active ones. Indeed they have demonstrated the largest spectrum of activity, being active against all bacteria assayed except *Aeromonas* species, with the lowest MICs (Table 3). 40 and 80% SPE-fractions from *O. edulis* gills + mantle exhibit respectively MICs of the same nature only against two indicator strains *Y. ruckeri* (60 $\mu\text{g/ml}$) and *B. megaterium* (40 $\mu\text{g/ml}$). 40% SPE-fractions resulting from the acidic extracts of *R. philippinarum* and *C. fornicata* exhibit a sizeable activity spectrum, but MICs are higher than those obtained with the 40% SPE-fraction from *C. edule*. The SPE-fractions coming from *C. edule* have shown a significant antibacterial activity against marine aquaculture-pathogens, especially the 80% SPE-fraction. The 80% SPE-fraction from *R. philippinarum* also presented potent antibacterial activity, but with MICs values higher than those obtained with *C. edule*. Considering the 80% SPE-fractions, except those from *C. edule* and *R. philippinarum*, only a little activity was detected. As a result, merely potential activity was found against *M. luteus* and/or *B. megaterium*, with the exception of *C. fornicata* 80% SPE-fraction, which only showed activity against one target bacteria (*V. alginolyticus*).

3.1.2. Antiviral activity and cytotoxicity

SPE-fractions were assayed for their antiviral activity against *Herpes simplex virus* type 1, a common virus used for screening marine antiviral compounds (Carriel-Gomes et al., 2007) on the model Vero cell lines.

Table 4
Inhibition of viral activity and cytotoxicity detected in SPE-fractions from acidic extracts of molluscs using HSV-1/Vero cells model.

SPE-fractions	[Protein] ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition of viral activity (%)	Cytotoxicity to Vero cells (%)
40% from			
<i>Buccinum undatum</i>	4500	0	70.0 \pm 1.0
<i>Cerastoderma edule</i>	1500	71.7 \pm 11.4	26.0 \pm 23.5
<i>Crepidula fornicata</i>	2400	39.0 \pm 32.0	50.0 \pm 26.2
<i>Ostrea edulis</i>			
Digestive gland	4000	81.3 \pm 30.6	23.0 \pm 4.2
Gills + mantle	1200	73.3 \pm 12.7	14.0 \pm 13.1
<i>Ruditapes philippinarum</i>	2550	0	100.0 \pm 1.0
80% from			
<i>Buccinum undatum</i>	130	60.7 \pm 13.1	27.7 \pm 3.8
<i>Cerastoderma edule</i>	85	59.3 \pm 9.3	24.3 \pm 8.8
<i>Crepidula fornicata</i>	110	46.8 \pm 26.6	27.8 \pm 7.3
<i>Ostrea edulis</i>			
Digestive gland	100	40.0 \pm 33.9	34.0 \pm 11.3
Gills + mantle	1280	28.0 \pm 12.0	20.0 \pm 9.9
<i>Ruditapes philippinarum</i>	125	48.7 \pm 1.5	22.8 \pm 7.5
Acyclovir control	1	100.0	14.0

Cytotoxicity of SPE-fractions to Vero cells was evaluated. No antiviral activity was determined for the 10% SPE-fractions since they were shown to be cytotoxic on Vero cell lines (results not shown). We focused on fractions causing more than 50% of protection of Vero cell lines from viral particles with the weakest cytotoxicity percentage (inferior to 50% anyway) and all by leaning on the Selectivity Index (SI). Such activities were detected in 40 and/or 80% SPE-fractions (Table 4). Maximal percent inhibition of viral activity was detected in the 40% SPE-fractions of acidic extract from *O. edulis* digestive gland. At this concentration, 81.3 \pm 30.6% of the cells were protected from viral particles while a minor cytotoxicity was observed (23.0 \pm 4.2% of cytotoxicity) (Table 4). The 40% SPE-fractions of acidic extracts from *C. edule* and *O. edulis* (gills + mantle) also presented attractive percent inhibition of viral activity with respectively 71.7 \pm 11.4% (26.0 \pm 23.5% of cytotoxicity) and 73.3 \pm 12.7% (14.0 \pm 13.1% of cytotoxicity). The *B. undatum* 80% SPE-fraction was the most efficient of the 80% SPE-fractions, with 60.7 \pm 13.1% of inhibition of viral activity (27.7 \pm 3.8% of cytotoxicity). Nevertheless, sizeable antiviral activity was further detected in the 80% SPE-fractions of acidic extracts from *C. edule* and *R. philippinarum* with 59.3 \pm 9.3% (24.3 \pm 8.8% of cytotoxicity) and 48.7 \pm 1.5% (22.5 \pm 7.5% of cytotoxicity) of inhibition of viral activity respectively.

Dose response effects were studied in order to define the EC₅₀ and CC₅₀ as well as the corresponding Selectivity Index (SI) of the potentially antiviral SPE-fractions (Table 5). Whereas antiviral activity and cytotoxicity may result from distinct compounds, we counter-balanced antiviral activity in relation to cytotoxicity using SI calculation to compare the antiviral potency of the extracts. The antiviral potency detected in the SPE-fractions of marine molluscs acidic extracts was classified using the selectivity index (SI = CC₅₀/EC₅₀). The 40% SPE-fractions of acidic extracts resulting from *C. edule* and *O. edulis* gills + mantle (with EC₅₀ of 919.5 $\mu\text{g/ml}$ and of 886.0 $\mu\text{g/ml}$ for CC₅₀ of 3913.0 $\mu\text{g/ml}$ and of 3668.9 $\mu\text{g/ml}$ respectively) appeared to be the most efficient fractions. These two fractions presented highest SI values about 4.3. The following group was composed of SI values ranging from 3.4 for the 80% SPE-fraction from *B. undatum* to 3.5 and 3.6 for the 40% SPE-fraction from *O. edulis* digestive gland and the 80% SPE-fraction from *R. philippinarum*. As they presented about the same SI, the 80% SPE-fraction from *B. undatum* was presented as the most efficient one in this category with its lowest EC₅₀ (68.7 $\mu\text{g/ml}$) with low cytotoxicity (CC₅₀ of 233.2 $\mu\text{g/ml}$). The 80% SPE-fraction from *C. edule* 80% with the lowest SI (2.4) displayed antiviral activity but also showed cytotoxicity (CC₅₀ inferior to 200.0 $\mu\text{g/ml}$) (Table 5).

The 40% and 80% SPE-fractions of acidic extract from *C. edule* and *B. undatum* respectively were demonstrated to display the most antiviral potentiality, thanks to lower EC₅₀ values for only little cytotoxicity and so better SI values. Dose response curves illustrate higher antiviral activity of the 80% SPE-fraction from *B. undatum* but also highlight its prohibitive cytotoxicity. So in assessment, in view of both antiviral and cytotoxic effect, the *C. edule* fractionated extract exhibits the most efficient antiviral activity.

4. Discussion

Several molecules extracted from marine invertebrates, including bivalves, possess broad spectrum antimicrobial activities, affecting the growth of bacteria, fungi and yeasts (Mitta et al., 2000a; Nakamura et al., 1988; Zasloff, 2002). Antibacterial and antiviral activities have been previously described in the hemolymph of several molluscan species including several sea hares, sea slug, oysters, and mussels species (Gueguen et al., 2006; Maktoob and Ronald, 1997; Olicard et al., 2005; Roch et al., 2008). Some of the molecules responsible for these activities have been identified and characterized. Chemical classes of these compounds are peptides, terpenes, polypropionates, nitrogenous compounds, polypeptides, macrolides, prostaglandins and fatty acid derivatives, sterols and miscellaneous compounds (Maktoob and Ronald, 1997).

The aim of the present study was to investigate the antimicrobial activity of extracts of aquaculture marine mollusc species (*C. edule* (*Cardiidae*), *R. philippinarum* (*Veneridae*), *O. edulis* (*Ostreidae*) and gastropods *B. undatum* (*Buccinidae*) and *C. fornicata* (*Calyptreidae*)) which are strongly represented on the coasts of Brittany (France). Both antibacterial and antiviral activities were detected from whole organism extracts. The most important antimicrobial activities were detected with the SPE-fractions from *C. edule* acidic extract. These SPE-fractions from *C. edule* also presented the largest bacterial spectrum of activity and further exhibited sizeable antiviral activity without cytotoxicity. In fact it was the only studied species for which both SPE-fractions presented antiviral activity.

At this stage of the study, the only structural feature that can be deduced is the amphipathic character of the active compounds. Indeed, they were firstly extracted in an aqueous solvent and finally systematically recovered in the 40 and/or 80% ACN fractions whatever the acidic extract. The chemical nature of the active compounds detected herein still has to be determined. We have compared the antibacterial and antiviral activities detected with the antimicrobial peptides from marine molluscs. Indeed, antimicrobial activities have previously been described in a wide range of commercial bivalve

Table 5

Antiviral activity (EC₅₀), cytotoxicity (CC₅₀) and selective index (CC₅₀/EC₅₀) of the efficient 40% and 80% SPE-fractions of acidic extracts from marine molluscs studied using HSV-1/Vero cells model.

SPE-fractions	CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)
40% from			
<i>Cerastoderma edule</i>	3913.0	919.5	4.3
<i>Ostrea edulis</i>			
Digestive gland	8566.0	2416.2	3.5
Gills + mantle	3668.9	886.0	4.2
80% from			
<i>Buccinum undatum</i>	233.2	68.7	3.4
<i>Cerastoderma edule</i>	163.8	67.4	2.4
<i>Ruditapes philippinarum</i>	329.1	91.6	3.6
Acyclovir control	46.8	0.2	234.0

EC₅₀: 50% Effective antiviral Concentration is the concentration of sample required to inhibit virus-induced CPE 50%.

CC₅₀: Cytotoxic Concentration is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

SI (CC₅₀/EC₅₀): Selective Index.

Every EC₅₀ and CC₅₀ was expressed as the total protein concentration. Data are mean \pm standard deviations (S.D.) from three separate experiments.

species, among which the mussels *Mytilus edulis* and *galloprovincialis* or even the oysters *Crassostrea virginica* and *gigas* (Anderson and Beaven, 2001; Haug et al., 2004; Mitta et al., 1999a,b, 2000b) and in some gastropods (Benkendorff et al., 2001; Iijima et al., 2003). Mytilin B, a synthetic antibacterial peptide from the mussel *Mytilus galloprovincialis* exhibited both antibacterial and antiviral activities (Roch et al., 2008). In most cases, these peptides are 20–50 residue long and exhibit cationic and amphiphilic characters (the reader is referred to two antimicrobial peptides database websites [<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, <http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm>]).

Although fractions in this study were not pure, the obtained MICs values are sometimes equivalent to or lower than those described from various purified AMPs from marine organisms. Our results are in accordance with antibacterial MICs data obtained with AOD and CgDef peptides from oysters against *E. coli* and *V. alginolyticus* (MICs of 330 µg/ml and 161–92 µg/ml respectively (Gueguen et al., 2006; Seo et al., 2005)) and with Mytilin B against *L. anguillarum* (MICs values of 9000 µg/ml (Roch et al., 2008). Nonetheless, antibacterial spectrum and activity comparison are risky, given the lack of standardized assay and due to the potential complex nature of the activity of the fraction extracts with unknown quantities of the active compound.

Relatively little information was available on the antiviral defense mechanisms of bivalves. Antiviral substances (paolins I and II) have been reported in clams, *Mya arenaria* (Li and Traxler, 1972; Prescott et al., 1966), and *in vitro* assays were used to detect a neutralizing activity against T3 coliphage in hemolymph from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Bachère et al., 1990). A peptide that inhibits HIV-1 protease was also isolated from *C. gigas* hydrolysate (Lee and Maruyama, 1998). In a recent study, a synthetic form of Mytilin A revealed antiviral activity on the model HSV-1 virus/Vero cells (Carriel-Gomes et al., 2007). Mytilin B, another synthetic antibacterial peptide from the mussel *M. galloprovincialis*, possesses *in vitro* antiviral activity against white spot syndrome virus (WSSV) (Roch et al., 2008).

The oyster hemolymph was found to have broad antiviral activity against HSV-1 and INPV (Infectious Pancreatic Necrosis Virus) (Olicard et al., 2005). The antiviral activity values (EC₅₀ value of 919.5 µg/ml) and cytotoxicity (CC₅₀ value of 3913.0 µg/ml) of the 40% SPE-fraction from the *C. edule* acidic extract (SI=4.3) compared with those obtained by Olicard et al. (2005) from *C. gigas* hemolymph rigorously using the same test model (EC₅₀ and CC₅₀ values were 425 µg/ml and 750 µg/ml respectively) (SI = 1.8). These results indicated that *C. edule* species presented an important activity, which was further supported by the highest SI of *C. edule*. Ideal anti-viral agents should inhibit viral reproduction at concentrations that are non-toxic to the host cells or organisms. Therefore, drugs are frequently tested for their ability to protect cells from viral-mediated killing at minimally- or non-toxic concentrations (Marshall and Barrows, 2004).

Although different species and experimental procedures were used in the different studies, they indicated the high frequency of detectable antimicrobial activity in marine molluscs. These results enforce the idea that marine molluscs are a source to be considered in the discovering of new substances for drug development.

As antibacterial activity was detected in both 40 and 80% SPE-fractions, it is reasonable to assume that multiple factors are responsible for the antimicrobial activities (Haug et al., 2002). No activity was revealed by the 10% SPE-fractions, whatever the extract assayed. These fractions contain polar non-bound compounds on C-18 cartridge and eluted with 10% ACN. Such results have already been described (Ehret-Sabatier et al., 1996). In a previous study, a similar fractionation procedure was used to study antibacterial and fungal activities of seven ascidians, six sponges and one soft alcyonid coral (Tadesse et al., 2008). The highest antifungal and antibacterial activities were detected in the 40% and 80% SPE-fractions. The 10% SPE-fractions assayed were generally active but less potent than the other fractions against bacteria and fungi (Tadesse et al., 2008). The screened species and the extraction procedure may explain these results. The active compounds detected

from cnidaria and tunicate and those detected in this study from molluscs may differ at the structural level.

In our study, the amphipathic nature of the bioactive compounds was demonstrated as they were extracted and dissolved in polar solvent after being retained on C-18 cartridge (Bulet et al., 2004). Assuming the amphipathic character of the antimicrobial compounds detected in the present study and confronted with the well-known ubiquity of AMPs, whether antimicrobial activity is caused by AMPs or other compounds remains to be clarified. Many antimicrobial screening studies have shown that Gram-negative bacteria are more sensitive than Gram-positive bacteria (Tadesse et al., 2008). Nevertheless, in our screening study, SPE-fractions were highly effective against both groups of bacteria, including several human and marine pathogens. As an interesting activity has been discovered in these molluscs, the bioactive compound nature needs to be specified through more purification steps and should lead to further studies relating to their antibacterial and antiviral modes of action. Otherwise, a microbial origin of these active compounds cannot be ruled out.

5. Conclusions

The results showed that potent antibacterial and antiviral activity could be detected in all investigated mollusc species. Taking together antibacterial and antiviral results highlights the potency of the acidic extracts obtained from *C. edule*. Further investigations intending to purify these active compound(s) should be considered to clarify their chemical nature.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Brittany region (ARED). We acknowledge Claude Bourbon for the generous gift of the marine bivalves and gastropods. We would also like to thank Jean-Pascal Bergé for providing the aquaculture bacterial strains, Chrystel Marty for her support in the cell culture, Alain Dufour and Renault Tristan for their precious advice, Judith Christie and Roger Labia for critical reading of this manuscript.

References

- Abdel-Raouf, N., Ibraheem, B.M.I., 2008. Antibiotic activity of two *Anabaena* species against four fish pathogenic *Aeromonas* species. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 2644–2648.
- Anderson, R.S., Beaven, A.E., 2001. Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. *Aquat. Living Resour.* 14, 343–349.
- Bachère, E., Hervio, D., Mialhe, E., Grizel, H., 1990. Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Dev. Comp. Immunol.* 14, 261–268.
- Balcázar, J.L., Blas, I.d., Ruiz-Zaruela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173–186.
- Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Morinigo, M.A., Borrego, J.J., 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4269–4275.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., Lindequist, U., 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 252, 79–84.
- Bazes, A., Silkina, A., Douzenel, P., Fay, F., Kervarec, N., Morin, D., Bergé, J.-P., Bourgougnon, N., in press. Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *J. Appl. Phycol.* doi:10.1007/s10811-008-9382-9.
- Benkendorff, K., Davis, A.R., Bremner, J.B., 2001. Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: an assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 109–118.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23, 26–78.
- Braithwaite, R., McEvoy, L., 2005. Marine biofouling on fish farms and its remediation. *Adv. Mar. Biol.* 47, 215–252.
- Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J.L., Lambert, J., Reichhart, J.M., Hoffmann, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 1991. Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J. Biol. Chem.* 266, 24520–24525.
- Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169–184.
- Carriel-Gomes, M.C., Kratz, J.M., Barracco, M.A., Bachère, E., Monte Barardi, C.R., Oliveira Simões, C.M., 2007. *In vitro* antiviral activity of antimicrobial peptides against *Herpes simplex* 1, adenovirus, and rotavirus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 469–472.

- du Toit, E.A., Rautenbach, M., 2000. A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *J. Microbiol. Methods* 42, 159–165.
- Dubber, D., Harder, T., 2008. Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture* 274, 196–200.
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J.A., van Dorsselaer, A., Bulet, P., 1996. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.* 271, 29537–29544.
- Fernandez, L., Lopez, J.R., Secades, P., Menendez, A., Marquez, I., Guijarro, J.A., 2003. *In vitro* and *in vivo* studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7328–7335.
- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J.-M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P., Bachere, E., 2006. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*: recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 313–323.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Stensvag, K., Sandsdalen, E., Styrvoid, O.B., 2002. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 371–385.
- Haug, T., Stensvag, K., Olsen, O.M., Sandsdalen, E., Styrvoid, O.B., 2004. Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *J. Invertebr. Pathol.* 85, 112–119.
- Hubert, F., Noel, T., Roch, P., 1996. A member of the arthropod defensin family from the edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* 240, 302–306.
- Iijima, R., Kisugi, J., Yamazaki, M., 2003. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 305–311.
- Ilouze, M., Dishon, A., Kahan, T., Kotler, M., 2006. Cyprinid herpes virus-3 (CyHV-3) bears genes of genetically distant large DNA viruses. *FEBS Lett.* 580, 4473–4478.
- Jayaraj, S.S., Thiagarajan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 2008. Isolation, purification and characterization of [beta]-1,3-glucan binding protein from the plasma of marine mussel *Perna viridis*. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 715–725.
- Langlois, M., Allard, J.P., Nugier, F., Aymard, M., 1986. A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of *Herpes simplex* strains to antiviral drugs. *J. Biol. Stand.* 14, 201–211.
- Lee, T.-G., Maruyama, S., 1998. Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 604–608.
- Li, M.F., Traxler, G.S., 1972. Antiviral activity of aqueous clam (*Mya arenaria*) extract on amphibian virus (LT-1). *Can. J. Biol. Chem.* 18, 397–402.
- Maier, M.S., Roccatagliata, A.J., Kuriss, A., Chludil, H., Seldes, A.M., Pujol, C.A., Damonte, E.B., 2001. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*. *J. Nat. Prod.* 64, 732–736.
- Maktoob, A., Ronald, H.T., 1997. Handbook of natural products from marine invertebrates. Phylum mollusca Part. 1. Harwood academic publishers. 1–288 pp.
- Marshall, K.M., Barrows, L.R., 2004. Biological activities of pyridocridines. *Nat. Prod. Rep.* 21, 731–751.
- Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Berlink, R.G.S., Hamann, M.T., 2007. Marine pharmacology in 2003–4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotazoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.* 145, 553–581.
- McLaren, C., Ellis, M.N., Hunter, G.A., 1983. A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of *Herpes simplex* viruses to antiviral agents. *Antiviral Res.* 3, 223–234.
- Michel, C., Nougayrède, P., Eldar, A., Sochon, E., de Kinkelin, P., 1997. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Dis. Aquat. Organ.* 30, 199–208.
- Mitta, G., Hubert, F., Noel, T., Roch, P., 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* 265, 71–78.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112, 4233–4242.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000a. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486, 185–190.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., Roch, P., 2000b. Involvement of Mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275, 12954–12962.
- Mizuki, H., Washio, S., Morita, T., Itoi, S., Sugita, H., 2006. Distribution of a fish pathogen *Listonella anguillarum* in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery. *Aquaculture* 261, 26–32.
- Montfort, P., Baleux, B., 1990. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1999–2006.
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y., 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J. Biol. Chem.* 263, 16709–13713.
- Olicard, C., Renault, T., Torch, C., Benmansour, A., Bourgougnon, N., 2005. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res.* 66, 147–152.
- Panigrahi, A., Azad, I.S., 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiol. Biochem.* 33, 429–440.
- Pereberg, A., Ronen, A., Hutoran, M., Smith, Y., Kotler, M., 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. *Vaccine* 23, 3396–3403.
- Prescott, B., Li, C.P., Caldes, G., Martino, E., 1966. Chemical studies of paolin. II. An antiviral substance from oysters. *Proc Soc Exp Biol Med* 123, 460–464.
- Projan, S.J., Bradford, P.A., 2007. Late stage antibacterial drugs in the clinical pipeline. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 441–446.
- Ravi, A.V., Musthafa, K.S., Jegathambal, G., Kathiresan, K., Pandian, S.K., 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 219–223.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493–497.
- Relf, J.M., Chisholm, J.R.S., Kemp, G.D., Smith, V.J., 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* 264, 350–357.
- Renault, T., Novoa, B., 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* 17, 397–409.
- Ringo, E., 2008. The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquacult. Res.* 39, 171–180.
- Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M., Aumelas, A., 2008. NMR structure of mussel mytilin, and antiviral–antibacterial activities of derived synthetic peptides. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 227–238.
- Seo, J.-K., Crawford, J.M., Stone, K.L., Noga, E.J., 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1998–2004.
- Sudo, K., Konno, K., Yokota, T., Shigeta, S., 1994. A sensitive assay system screening antiviral compounds against *Herpes simplex* virus type 1 and type 2. *J. Virol. Methods* 49, 169–178.
- Tadesse, M., Gulliksen, B., Strøm, M.B., Styrvoid, O.B., Haug, T., 2008. Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 286–293.
- Takeuchi, H., Baba, M., Shigeta, S., 1991. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-*Herpes simplex* virus compounds. *J. Virol. Methods* 33, 61–71.
- Tincu, J.A., Taylor, S.W., 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3645–3654.
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37–61.
- Yasin, B., Pang, M., Turner, J.S., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Wagar, E.A., 2000. Evaluation of the inactivation of infectious *Herpes simplex* virus by host-defense peptides. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 187–194.
- Zanetti, S., Deriu, A., Dupre, I., Sanguinetti, M., Fadda, G., Sechi, L.A., 1999. Differentiation of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from sardinian waters by ribotyping and a new rapid PCR fingerprinting method. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1871–1875.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.
- Zatylny, C., Gagnon, J., Boucaud-Camou, E., Henry, J., 2000. The SepOvotropin: a new ovarian peptide regulating oocyte transport in *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1013–1018.



Diane Defer Date of birth: 31.05.1981 **EDUCATION 2005–2009: PhD student.** Research, Purification and Characterization of antimicrobial compounds from marine molluscs. Universities of South and Occidental Brittany, France. **2004–2005: Master.** Plant Biology and Vegetal Products. University of Nantes, France. **EXECUTIVE SUMMARY** Background in Biochemistry, Microbiology, Virology, and Biotechnology. Experience in CPG, HPAEC, HPLC, Mass Spectrometry, RMN ¹³C CP/MAS and SP/MAS methods. Experience in antiviral and antimicrobial analyse techniques.

Nathalie Bourgougnon was born in 1967. She obtained his doctoral thesis (PhD) in “Marine Biology” from University of Nantes in 1994. She has worked as Associate Professor at University of La Rochelle (1994–2001). Since 2001, she works as a Professor at University of Bretagne-Sud (UBS) about research of marine active compounds with biological activities. Since 1993, she has supervised 8 PhD students and is co-author of 30 international publications, 2 books chapters. She has deposited 1 patent. She was director of Doctoral School at the UBS and she is vice president of International Doctoral College at the Université Européenne de Bretagne.



Dr Y. FLEURY was born in 1969. He has been involved in research on antibacterial peptides for many years. His thesis was dedicated to the structure activity relationships of mesentericin Y105³⁷, a bacteriocin from lactic acid bacteria (Université Paris VII, 1996). He obtained a PhD fellowship at the Université de Rennes 1, to study dermaseptins, an amphibian antimicrobial peptide family. Since 2000, he has been working on antimicrobial peptides from various marine origins (by-product hydrolysates, bivalves). He belongs to the IFREMER Sea^{Pro} network and various scientific consortia. His teaching activities are devoted to biochemistry at the Quimper Institute of Technology.

E. coli strain C209/08, which exhibited reduced susceptibility to imipenem [minimum inhibitory concentration (MIC) = 4 µg/mL]. Bacterial identification and initial susceptibility testing of the isolates were carried out by the automated VITEK® 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). MICs of imipenem, meropenem and ertapenem were determined by the broth microdilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [3]. Susceptibility to other antimicrobial agents was assessed by the disk diffusion method and interpreted according to CLSI criteria [3]. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as the quality control strain. Isolates were screened for MBL production by the double-disk synergy test (DDST) using ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)-impregnated disks and imipenem, and for extended-spectrum β-lactamase (ESBL) by DDST between amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxime, ceftazidime, cefepime and aztreonam. Polymerase chain reaction (PCR) assays using primers designated to amplify the entire *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} genes were performed as described previously [4], followed by DNA sequencing. Multiple alignments of protein sequences were performed with ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Conjugation experiments were carried out by plate mating using *E. coli* 26R793 (Lac⁻, Rif^r) as the recipient. Transconjugants were selected on MacConkey agar plates containing rifampicin (100 µg/mL) and ceftazidime (2 µg/mL).

Escherichia coli C209/08 was susceptible to imipenem, meropenem and ertapenem (MICs of 4, 0.5 and 0.5 µg/mL, respectively), aminoglycosides (gentamicin, amikacin and netilmicin), aztreonam and colistin, but was resistant to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefepime, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime and piperacillin/tazobactam. Screening for ESBLs was negative, however the imipenem/EDTA test was synergetic suggesting possible MBL production. PCR analysis yielded an amplicon with 100% identity to *bla*_{VIM-1}. Repeated conjugation assays failed to demonstrate transfer of imipenem resistance to the recipient strain.

In the last years, many studies have documented the involvement of ESBL-producing isolates in community-acquired infections throughout the world [5,6]. In contrast, there is only one report of community-acquired infection caused by MBL-producing *P. mirabilis* [2]. Their dissemination in the extrahospital setting has been linked with previous hospitalisation and antibiotic treatment. These isolates were clonally related, indicating that the patients were probably colonised at discharge. In this report, we describe the isolation of a VIM-producing *E. coli* isolate from the ear canal of an outpatient who developed otitis externa. No predisposing factors such as hospitalisation or therapy with antimicrobial agents in the preceding year have been found in this young male patient, therefore this infection could be considered as community-acquired [5,6]. These findings suggest that MBL-producing bacteria have begun to disseminate in the community. MBL genes reside on mobile elements and are transferable. Propagation of MBL-producers in the extrahospital setting represents a threat to public health because these strains might serve as a reservoir of resistance determinants for other pathogens. Early and accurate detection of isolates carrying MBL genes will allow the prompt implementation of infection control measures in order to prevent their spread in the community setting.

Funding: No funding sources.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58.

- [2] Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-β-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:136–9.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. Document M100-S17. Wayne, PA: CLSI; 2007.
- [4] Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, et al. Metallo-β-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2224–8.
- [5] Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea E, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1089–94.
- [6] Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, et al. Risk factors for the development of extended-spectrum β-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:163–7.

Danai Vitti*

Efthimia Protonotariou

Danae Sofianou

Department of Clinical Microbiology, Hippokraton G. Hospital, Thessaloniki, Greece

* Corresponding author at: Department of Clinical Microbiology, Hippokraton G. Hospital, Konstantinoupoleos 49, 54642, Thessaloniki, Greece. Tel.: +30 2310 89 2050; fax: +30 2310 89 2050.

E-mail address: danaivitti@yahoo.gr (D. Vitti)

8 February 2009

doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.02.011

Detection and partial characterisation of an antimicrobial peptide (littorein) from the marine gastropod *Littorina littorea*

Keywords:

Antibacterial activity
Antiviral activity
Antimicrobial peptide
Marine gastropod
Littorina littorea

Sir,

Only a few marine species have been studied for their potential antimicrobial activity. Marine antimicrobial peptides (AMPs) have been mainly investigated in economically important species, i.e. aquaculture species [1]. In the present study, we investigated antibacterial and antiviral activities in a common resistant marine gastropod (*Littorina littorea*) living in the tidal zone both against marine and terrestrial prokaryotes. The target organisms selected were four main aquaculture pathogenic bacteria, four standard bacteria in antibacterial activity screening and herpes simplex virus type 1 (HSV-1), frequently used for screening marine antiviral compounds [2].

Specimens of common periwinkle (*L. littorea*) were collected in January 2007 at Bénodet Bay (Finistère, France). The whole organism (without shell) was homogenised in 1 N HCl for 10 min at 100 °C and separated by centrifugation. The supernatant was loaded onto a C18 cartridge equilibrated with 10% acetonitrile (ACN) and 0.1% trifluoroacetic acid. Elution was performed sequentially with 10%, 40% and 80% ACN. Lyophilised fractions were reconstituted in sterile ultrapure water and named L₁₀, L₄₀ and L₈₀, respectively. The protein concentration was determined using the microBCA method.

The fractions were assayed for antibacterial activity against target bacteria in exponential growth phase at 1 × 10⁵ colony-forming units/mL. Antibacterial activity was detected only in the L₈₀ and L₄₀ fractions (Table 1). The former exhibited potent antibacterial

Table 1
Antibacterial and antiviral activities and structural insights into the active compound in the L₄₀ fraction from *Littorina littorea*.

	L ₄₀	Control
MIC (μg/mL) ^a		
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 10778	469	1
<i>Carnobacterium piscicola</i> NRRL B-14829	–	N.D.
<i>Lactococcus garvieae</i> ATCC 43921	–	N.D.
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	469	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3750	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	–	N.D.
<i>Listonella anguillarum</i> NCBIM 829	1875	15
<i>Yersinia ruckeri</i> ATCC 29473	3750	125
Antiviral activity (μg/mL) ^b		
EC ₅₀	12	0.2
CC ₅₀	1120	46.8
Structural insights		
Sensitivity to protease treatment		
Trypsin	+	
α-Chymotrypsin	+	
Isoelectric point (pI)	9.2 ^c	
% ACN for active compound elution	30% ^d	
Molecular weight (kDa)	3.5 ^e	

MIC, minimum inhibitory concentration; N.D., not determined; HSV-1, herpes simplex virus type 1; EC₅₀, 50% effective viral concentration; CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; +, no anti-*Micrococcus luteus* activity was visible on overlaid gel electrophoresis after protease treatment; ACN, acetonitrile.

^a MICs were defined as the lowest protein concentration displaying at least 99% inhibition after 48 h incubation in optimal growth conditions. Lysozyme and polymyxin B were used as positive controls against Firmicutes and Gracilicutes, respectively. Acyclovir (1 μg/mL) was used as a positive control against HSV-1 virus.

^b Against HSV-1.

^c Determined using cation exchange chromatography.

^d % ACN for elution of the active compound(s) was determined on a C18 reverse column (ODS2, 5 μm, 10 × 250 mm; Interchim SA, Montluçon, France).

^e Evaluated by overlaid gel electrophoresis assay.

activity against some of the Firmicutes assayed, whilst the latter displayed a larger antibacterial spectrum since anti-Gracilicute activity was also detected. Nevertheless, minimum inhibitory concentrations (MICs) determined for Firmicutes were lower than those of Gracilicutes and were similar to those detected for the L₈₀ fraction. Such a spectrum of activity has already been described for several AMPs of marine origin, i.e. AMPs from mussels [3,4], oyster [5,6] and crustacean AMPs such as penaeidins [1].

To differentiate between bactericidal and bacteriostatic activity, survival kinetics of *Micrococcus luteus* were studied in peptone water in the presence of the L₄₀ fraction at 2 × MIC. No bacterial viability was detected after 2 h of incubation, suggesting a bactericidal mode of action. Survival kinetic curves fitted with the Weibull model [7] were used to evaluate the decimal reduction time (D) for the L₄₀ fraction (48 min; $r^2 = 0.90$). Using published results [3,4], we have determined the D value for myticin A (16 min; $r^2 = 0.97$) and mytilins D (5 min; $r^2 = 0.95$) and G1 (87 min; $r^2 = 0.99$) against the same target bacteria. Although mussel AMPs were pure and used at 10 × MIC, the pre-purified L₄₀ fraction displayed a D value lower than mytilin G1.

Antiviral activity was investigated against HSV-1 using an assay adapted from Olicard et al. [2]. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was defined as the concentration that reduced cell viability to 50% of that of untreated cells and the 50% effective antiviral concentration (EC₅₀) was defined as the concentration that achieved 50% protection of virus-infected cells from virus-induced destruction. Antiviral activity was only detected in the L₄₀ fraction (Table 1). Maximal antiviral protection was observed at 530 μg/mL. At this concentration, 99 ± 1% of viable cells were protected from viral particles, whilst a cytotoxic effect was observed (34.0 ± 1% cell destruction). The EC₅₀ (12 μg/mL) and CC₅₀ (1120 μg/mL)

were deduced from dose–response effects. The selectivity index (SI = CC₅₀/EC₅₀) of the antiviral L₄₀ fraction (SI = 93) was high compared with the antiviral activity detected in oyster haemolymph (SI = 1.8) using the same test model [2].

To gain insight into the molecular characteristics of the antibacterial compound(s), the L₄₀ fraction (15 mg of protein) was subjected to liquid chromatography. Using C18 reverse-phase chromatography, the antibacterial compound was eluted with ca. 30% ACN, confirming its amphipathic nature (Table 1). When loaded onto a cation exchange column, antibacterial activity was detected in fractions eluted between pH 9.1 and 9.2, revealing the cationic character of the active compound and defining its isoelectric point (pI) at ca. 9.2. Analysis of the L₄₀ fraction (10 μg) by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) overlaid with appropriated broth agar inoculated with the sensitive bacteria *M. luteus* revealed a single active band in the 3.5 kDa zone, whilst the L₄₀ fractions treated with trypsin or α-chymotrypsin for 30 min were devoid of antibacterial activity (Table 1).

We have shown the cationic, amphipathic and at least partially proteinic nature of the active compound(s) in L₄₀ fraction. Its molecular weight was evaluated at ca. 3.5 kDa.

All these results are in agreement with common structural characteristics of AMPs, that is to say an average AMP length of 29.96 residues and an average net charge of +3.89 (Antimicrobial Peptide Database; <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). We therefore hypothesised that an AMP is responsible for the antibacterial activity in the L₄₀ fraction from *L. littorea* and propose to name it littorein.

Funding: No funding sources.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- Tincu JA, Taylor SW. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3645–54.
- Olicard C, Renault T, Torhy C, Benmansour A, Bourgougnon N. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res* 2005;66:147–52.
- Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, Salzet M, Roch P. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J Biol Chem* 2000;275:12954–62.
- Mitta G, Hubert F, Noël T, Roch P. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem* 1999;265:71–8.
- Seo JK, Crawford JM, Stone KL, Noga EJ. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1998–2004.
- Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, Garnier J, Fievet J, Escoubas JM, et al. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J Biol Chem* 2006;281:313–23.
- Mafart P, Couvert O, Gaillard S, Leguérinel I. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int J Food Microbiol* 2002;72:107–13.

Diane Defér ^{a,b}

Nathalie Bourgougnon ^{a,b}

Yannick Fleury ^{a,c,*}

^a Université Européenne de Bretagne, France

^b Université de Bretagne Sud, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM EA 3884), Centre de recherche et d'enseignement Yves Coppens, Campus de Tohannic - BP 573, 56017 Vannes, France

^c Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM EA 3882), IFR148 SclnBioS, IUT de Quimper, Bâtiment G, 6 rue de l'Université, 29 000 Quimper, France

* Corresponding author at: Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM EA 3882), IFR148 SclnBioS, IUT de Quimper, Bâtiment G, 6 rue de l'Université, 29 000 Quimper, France. Tel.: +33 2 98 64 19 30;

fax: +33 2 98 64 19 69.
E-mail address: fleury@univ-brest.fr (Y. Fleury)

5 January 2009

doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.02.016

In vitro activity of thioridazine against mycobacteria

Sir,

Thioridazine is an antipsychotic drug that is active against mycobacteria by targeting the type II NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase and the binding of calcium to proteins as well as disruption of aerobic respiration under microaerobic conditions [1].

The activity of thioridazine against mycobacteria has gained renewed attention due to the ongoing spread of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) [2]. The recent emergence of extensively drug-resistant (XDR)-TB has only strengthened the search for new antimycobacterial drugs. Even aggressive treatment regimens including high numbers of drugs at maximum tolerable doses and adjunctive surgery result in cure rates of only 60% in XDR-TB [3].

Although TB is a major threat to public health, cure rates for nontuberculous mycobacterial (NTM) disease are comparable with those in XDR-TB. In a recently published trial by the British Thoracic Society (BTS), cure rates after 5 years' follow-up were only in the range 20–40% [4]. These sobering rates are in part due to the pre-existing conditions that increased these patients' susceptibility to NTM disease, e.g. chronic obstructive pulmonary disease. In MDR- and XDR-TB, as well as in NTM disease, new drugs are needed to improve cure rates [3–5]. However, most of the drugs currently in the pipeline are tested exclusively for their activity against *Mycobacterium tuberculosis*.

Thioridazine has a well-known safety profile owing to its extensive use in psychiatry and may represent a good candidate for drug trials for MDR-TB, XDR-TB and NTM disease. To establish its possible efficacy, minimum inhibitory concentrations (MICs) of thioridazine were determined for clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* ($n=3$), *Mycobacterium avium* ($n=4$), *Mycobacterium kansasii* ($n=1$), *Mycobacterium malmoense* ($n=1$), *Mycobacterium simiae* ($n=1$), *Mycobacterium xenopi* ($n=1$), *Mycobacterium gordonae* ($n=2$), *Mycobacterium fortuitum* ($n=1$), *Mycobacterium szulgai* ($n=2$) and *M. tuberculosis* ($n=8$), applying a previously described 25-well agar dilution method [6]. The *M. tuberculosis* isolates were four pan-susceptible isolates, three MDR isolates and one XDR isolate.

Susceptibility to thioridazine was tested at concentrations of 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 mg/L. The MIC was defined as the concentration able to reduce bacterial growth by >99%. Growth on thioridazine-enriched Middlebrook 7H10 medium was compared with an undiluted and a 1/100 diluted standardised bacterial suspension on drug-free medium.

The MICs and the time of reading the plates are given in Table 1 for all isolates tested. For the rapid growers (*M. abscessus* and *M. fortuitum*) sufficient growth was noted after 4 days of incubation; most slow growers required 8 days or 11 days.

Thioridazine is most active against *M. tuberculosis*. All *M. tuberculosis* isolates had MICs of 4 mg/L, regardless of their susceptibility to first- or second-line drugs. In humans, 0.5 mg/L is the acceptable maximum plasma concentration of thioridazine [2]. However, *M. tuberculosis* bacteria residing in macrophages are susceptible to thioridazine even at 0.1 mg/L, since macrophages concentrate thioridazine in the vacuoles where *M. tuberculosis* resides [2].

Thioridazine is less active against NTM, especially against rapid growers. Results were consistent amongst isolates of the same

Table 1

Minimum inhibitory concentrations (MICs) and duration of incubation to obtain sufficient growth for various *Mycobacterium* spp.

Strain no.	<i>Mycobacterium</i> spp.	MIC (mg/L)	Incubation (days)
NLA000600658	<i>M. avium</i>	32	4
NLA000800431	<i>M. avium</i>	32	11
NLA000800441	<i>M. avium</i>	16	4
C687	<i>M. avium</i>	32	11
NLA000600659	<i>M. avium</i> complex	16	8
NLA000800050	<i>M. malmoense</i>	32	11
NLA000800280	<i>M. kansasii</i> type I	2	11
NLA000701790	<i>M. szulgai</i>	16	8
NLA000800062	<i>M. szulgai</i>	16	8
NLA000800549	<i>M. xenopi</i>	8	11
NLA000800295	<i>M. simiae</i>	16	8
NLA000600643	<i>M. gordonae</i>	16	11
C809	<i>M. gordonae</i>	16	8
NLA000600203	<i>M. abscessus</i>	64	4
NLA000800454	<i>M. abscessus</i>	64	4
NLA000800448	<i>M. abscessus</i> sv	16	4
NLA000800494	<i>M. fortuitum</i>	32	4
NLA000600443	XDR <i>M. tuberculosis</i>	4	11
NLA000500538	MDR <i>M. tuberculosis</i>	4	11
NLA000501371	MDR <i>M. tuberculosis</i>	4	11
NLA000601463	MDR <i>M. tuberculosis</i>	4	11
NLA000600523	<i>M. tuberculosis</i>	4	8
C100	<i>M. tuberculosis</i>	4	11
C2147	<i>M. tuberculosis</i>	4	11
C937	<i>M. tuberculosis</i>	4	11

sv, smooth colony variant; XDR, extensively drug-resistant; MDR, multidrug-resistant.

species, or differed by a single two-fold step, as for *M. avium*. MICs in the range 16–32 mg/L, the most common MICs for NTM, appear to preclude a role for thioridazine in the therapy of NTM disease. The low level of activity against *M. abscessus* is especially unfortunate. Bacteria of this species can cause severe disease and their level and extent of drug resistance demands new, active compounds [5]. Whether the concentrating effect within macrophages will lead to local drug concentrations capable of killing NTM remains to be established. Based on our in vitro results this seems less likely.

Although its cardiotoxicity is a significant drawback [7], thioridazine may add to the activity of regimens for MDR- or even XDR-TB, for which very few active drugs are currently available. A potential role for thioridazine in the treatment of latent TB, owing to its disruption of aerobic respiration under microaerobic conditions, may warrant separate investigation.

Thioridazine appears less likely to add activity to the regimens for pulmonary NTM disease proposed by the American Thoracic Society and the BTS [4,5].

In summary, thioridazine is active in vitro against susceptible and MDR or XDR *M. tuberculosis*. Due to a concentrating effect within macrophages, there may be a role for thioridazine in the treatment of MDR- or even XDR-TB. With MICs at least four- to eight-fold higher than those observed for *M. tuberculosis*, its activity against NTM is significantly lower, thus a role in the treatment of NTM disease is less likely.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mirjam Dessens and Bert van Klingeren for setting up the drug susceptibility testing method.

Funding: No funding sources.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

