

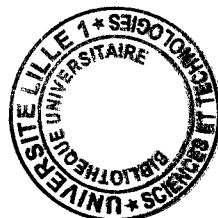
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE BIOLOGIE

Année 2001

N°ordre

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE



**CARACTERISATION ET ROLE DES PEPTIDES
ANTIMICROBIENS DANS L'IMMUNITÉ INNÉE DE
LA SANGSUE *THEROMYZON TESSULATUM***

Par Aurélie TASIEMSKI

Présentée le 14 décembre 2001 devant la commission d'examen:

Président : Mr le Docteur Charles Bevins

Directeurs de thèse Mr le Professeur Michel Salzet
Mr le Professeur Franck Vandenbulcke

Rapporteurs Mme le Docteur Evelyne Bachère
Mr le Docteur Jonathan Ewbank

Examinateur Mr le Docteur Guillaume Mitta

AVANT PROPOS

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à Michel pour la confiance qu'il m'a toujours accordée et pour m'avoir permise de mener à terme ce travail de thèse.

Merci à Franck pour son soutien et ses conseils tant dans le domaine de la recherche qu'en enseignement.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame Evelyne Bachère et à Monsieur Jonathan Ewbank pour avoir accepté de consacrer une partie de leur temps précieux à la lecture et à la critique de ce manuscrit.

Mister Charles Bevins, it is a great honor for me that you accept to be part of the jury. Thanks a lot.

Je remercie Guillaume pour les nombreux (et précieux !) conseils qu'il a su me prodiguer lors de son passage au laboratoire et pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens également à remercier Annie, Arnaud, David, Isa, Lolotte, Marie-Christine, PE, et les autres...(ils se reconnaîtront) pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur sympathie.

Merci à Monsieur Vinckier et à Patrick pour m'avoir donné l'opportunité de faire des vacations.

Enfin et surtout, merci à ma famille qui m'a toujours soutenue : sans vous tout cela n'aurait pas été possible et merci à Alexandre pour toutes les bonnes choses qu'il a su m'apporter et qu'il m'apporte encore.

J'allais oublier : merci aux arbres qui m'ont très généreusement fourni leur pâte à papier tout au long de la rédaction de ce manuscrit...

SOMMAIRE

Sommaire

INTRODUCTION	page 7
GENERALITES	page 12
<u>La sangsue <i>Theromyzon tessulatum</i></u>	page 13
<u>L'immunité antimicrobienne</u>	page 16
<u>I/ Immunité innée et immunité adaptative</u>	page 17
<u>II/ Immunité antimicrobienne des invertébrés et des vertébrés</u>	page 20
<u>A/ Reconnaissance des microorganismes</u>	page 21
1/ Reconnaissance des motifs LPS des bactéries à Gram négatif	page 21
2/ Reconnaissance d'autres motifs	page 24
<u>B/ Immunité antimicrobienne intracellulaire</u>	page 27
1/ Mécanismes de lyse intracellulaire dépendants de l'oxygène	page 28
2/ Mécanismes de lyse intracellulaire indépendants de l'oxygène	page 29
3/ Cas particulier des organismes à développement intracellulaire	page 33
<u>C/ Immunité antimicrobienne extracellulaire</u>	page 34
1/ Les cascades protéolytiques dans la défense antimicrobienne	page 34
a- <i>La coagulation et la mélénisation des invertébrés</i>	page 35
b- <i>La réaction du complément des Mammifères</i>	page 36
2/ Les peptides antimicrobiens	page 38
a- <i>Les peptides antimicrobiens produits et libérés par les cellules circulantes</i>	page 39

<i>b- Les peptides antimicrobiens produits et libérés par un tissu spécialisé</i>	page 43
D/ Immunité antimicrobienne des épithélia et des muqueuses	page 51
1/ Immunité antimicrobienne des épithélia chez les invertébrés	page 51
2/ Immunité antimicrobienne des épithélia chez les vertébrés	page 53
CHAPITRE I: PUBLICATION N°1	page 58
CHAPITRE II: PUBLICATION N°2	page 101
CHAPITRE II: PUBLICATION N°3	page 128
CHAPITRE III: PUBLICATION N°4	page 155
DISCUSSION-PERSPECTIVES	page 193
A/ <u>Les peptides antimicrobiens de <i>Theromyzon tessulatum</i></u>	page 194
B/ <u>Sites de production des peptides antimicrobiens identifiés</u>	page 198
1/ Sites d'expression	page 198
2/ Sites de stockage	page 198
C/ <u>Roles des peptides antimicrobiens identifiés dans le processus anti-infectieux</u>	page 200
1/ Peptide B	page 200
2/ Theromacine	page 204
CONCLUSION	page 209
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	page 212
PUBLICATIONS-COMMUNICATIONS	page 230

INTRODUCTION

Introduction

Les effets antibactériens de la pénicilline furent découverts par A. Fleming en 1928. Largement utilisée pendant la seconde guerre mondiale grâce aux travaux de Florey et Chain, la pénicilline permit de sauver des millions de vies. L'homme pensait enfin maîtriser les maladies infectieuses qui jusqu'alors demeuraient des fléaux. Cependant l'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques a très vite terni ce tableau (Wenzel, Osterman et al. 1976). Sous la pression de sélection exercée par les antibiotiques, les bactéries ne cessent d'évoluer afin d'échapper à leur action. Des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à tous les antibiotiques connus à ce jour ont été découvertes au Japon et aux USA et le dernier verrou que formait la vancomycine vient de sauter (Lessing and Raftery 1998). L'hôpital est le lieu le plus propice au développement de ce phénomène de résistance du fait d'une prescription élevée d'antibiotiques et de la forte densité de population qui facilite la dissémination. Les infections acquises en ce lieu (dites nosocomiales) sont actuellement un problème de santé publique par leur fréquence, leur coût et leurs conséquences en terme de morbidité et de mortalité (Raad, Abbas et al. 1997; Guillemot and Courvalin 2001). La situation est inquiétante car désormais la résistance sort des murs de l'hôpital et touche la médecine de ville. Ainsi, sous nos latitudes, on assiste à une recrudescence de la tuberculose que l'on croyait vaincue. Certaines souches résistantes pourraient également avoir vu le jour à cause de l'utilisation des antibiotiques dans les élevages intensifs d'animaux (Poppe, Ayroud et al. 2001). Les dernières années ont vu une augmentation spectaculaire, en incidence et en gravité, des cas de salmonelloses humaines. La situation s'est encore aggravée depuis le début des années 1990 : des souches de

Salmonella typhimurium, résistantes à de nombreux antibiotiques, sont apparues et menacent de devenir un grave problème de santé publique (Chu, Chiu et al. 2001). Cela s'inscrit dans une tendance générale : l'incidence des résistances bactériennes a augmenté à un rythme alarmant au cours des dernières années et l'on s'attend à ce qu'elle continue de croître aussi vite sinon plus rapidement à l'avenir (Guillemot and Courvalin 2001). A cela s'ajoute le fait que depuis plus de 25 ans, aucune nouvelle famille d'antibiotiques n'a été découverte.

Dans cette optique, l'étude des mécanismes immunitaires innés des animaux et des plantes est devenue une source d'inspiration pour concevoir les antibiotiques de demain et/ou de nouvelles stratégies pour lutter contre ces nouveaux agents pathogènes (Hancock 1997). Depuis la découverte par le Professeur H. Boman, en 1980, du premier peptide antimicrobien, cinq cents autres molécules ont été caractérisées et certaines d'entre elles sont actuellement en phase d'essais cliniques (Cole and Ganz 2000). Ces peptides pour la plupart cationiques, ont été mis en évidence dans tous les phyla. Ils présentent un large spectre d'activité contre les bactéries, les champignons filamenteux et les levures. De manière intéressante, leur action générale au niveau de la membrane des bactéries ne favoriserait pas l'apparition de souches résistantes. Dans la première partie de ce manuscrit intitulée "Généralités", nous montrerons le rôle clé que jouent ces peptides antibiotiques dans les mécanismes immunitaires innés. Ils participent efficacement et cela chez tous les métazoaires, à la lutte contre les microorganismes que ce soit au niveau cellulaire (destruction des particules phagocytées), au niveau humoral ou encore au niveau des épithélia et des muqueuses. La conservation de leur mode d'action mais aussi de leur régulation justifie l'intérêt porté à l'étude des modèles

invertébrés. Ainsi, il est apparu que les mécanismes immunitaires innés des vertébrés étaient une mosaïque de mécanismes ancestraux partagés avec des animaux évolutivement plus primitifs.

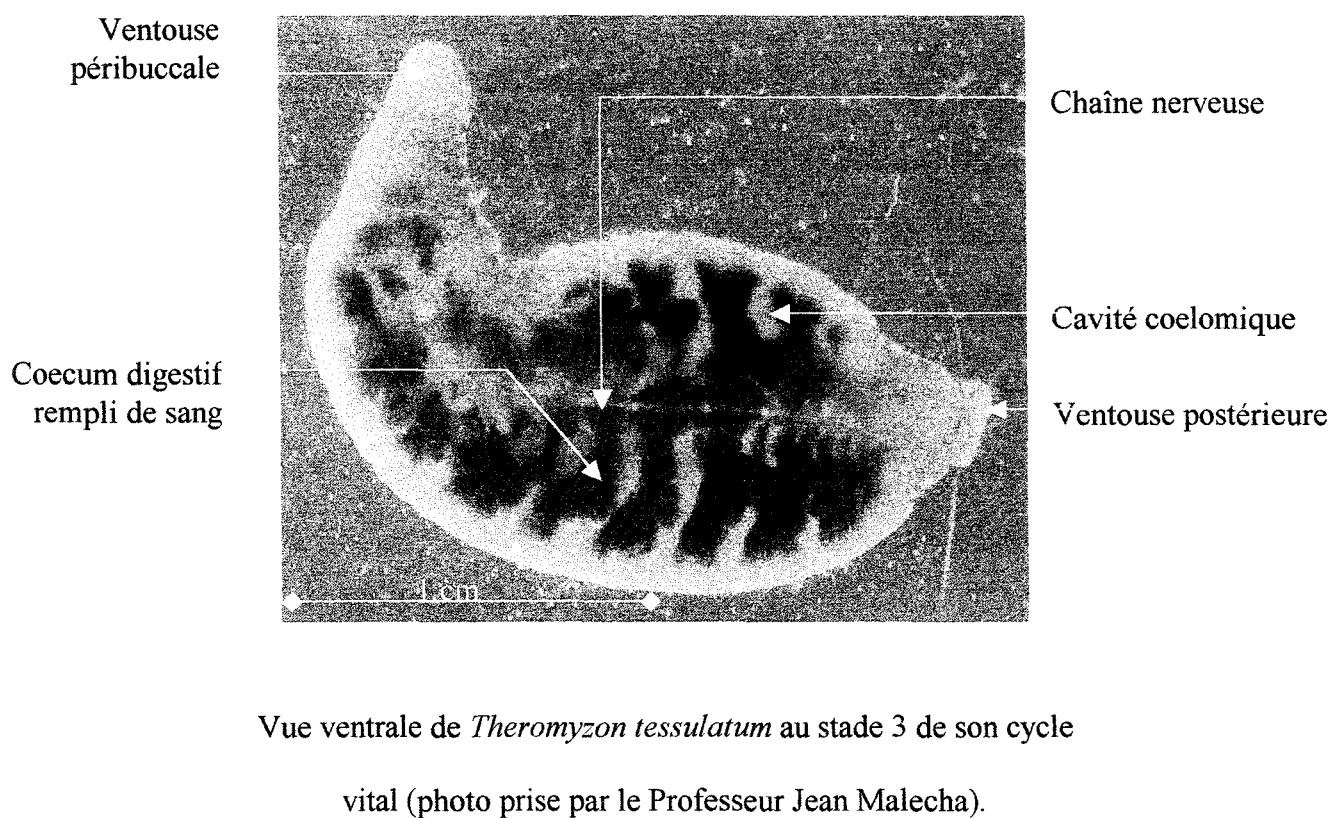
Dans ce contexte, une thématique de recherche visant à comprendre les mécanismes et les effecteurs de l'immunité innée de la sangsue *Theromyzon tessulatum* a été développée au Laboratoire de Neuroimmunité des Annélides. Au démarrage de cette thèse, peu de données nous renseignaient sur l'immunité des sangsues. Chez *T. tessulatum*, seul un rôle phagocytaire des amoebocytes coelomique était rapporté. Ces cellules, caractérisées par de longs pseudopodes, sont en effet capables d'ingérer des bactéries injectées dans le liquide cœlomique de l'animal (Sawyer 1986). La sangsue semble par conséquent avoir développé une immunité cellulaire classique mais qu'en est-il des effecteurs anti-infectieux humoraux et plus particulièrement des peptides antibiotiques ?

Sur ces bases, le principal objectif de cette thèse fut dans un premier temps, de mettre en évidence l'existence de peptides antimicrobiens chez *Theromyzon t.* et dans un deuxième temps d'étudier le rôle de ces peptides dans la réponse immunitaire des sangsues. Dans ce manuscrit, nous présenterons les publications (parues ou soumises) qui regroupent les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse concernant deux types de peptides antimicrobiens. La première publication, exposée dans le premier chapitre, est consacrée à la caractérisation d'un peptide antibactérien porté par un précurseur de neuropeptides : la proenképhaline A (PEA) et à l'étude du rôle des peptides dérivés de la PEA dans les mécanismes immunitaires innés de la sangsue. Le deuxième chapitre décrit la conservation de ce système chez l'homme. Cette publication traite plus particulièrement de l'implication des dérivés de la PEA dans la réponse

inflammatoire des patients opérés à cœur ouvert. Un deuxième article révélant la présence d'autres peptides antimicrobiens issus de précurseurs de neuropeptides, dans le sang de patients opérés à cœur ouvert a été joint à ce chapitre. Dans le troisième chapitre, sont présentées à la fois, la caractérisation d'un nouveau peptide antibactérien chez la sangsue et l'étude du niveau d'expression du gène codant ce peptide en réponse à une infection bactérienne. Les résultats obtenus sont ensuite discutés et les champs d'investigations ouverts par ces travaux sont donnés dans une partie intitulée « discussion et perspectives ». Enfin, une conclusion générale viendra éclairer les principaux aboutissements de cette thèse.

GENERALITES

La sangsue *Theromyzon tessulatum*



Theromyzon tessulatum appartient à l'Embranchement des Annélides, la Classe des Achétes ou Hirudinés, l'Ordre des Rhynchobdelliformes ou sangsues à trompe et à la Famille des Glossiphoniidés. D'un point de vue phyllogénique, cet Embranchement occupe une position clé dans l'arbre évolutif puisqu'il a donné naissance aux Coelomates supérieurs. Les Annélides sont en effet les premiers êtres triploblastiques pourvus d'un coelome. (voir figure 1).

Espèce dulcicole, *T. tessulatum* est un animal hématophage, ectoparasite strict des oiseaux aquatiques, plus particulièrement des Ansériformes. Au moment du repas, la sangsue s'introduit dans les fosses nasales de l'oiseau où elle prélève au moyen de sa trompe, la quantité nécessaire de sang à travers la muqueuse. Trois repas de sang vont ponctuer sa vie et ainsi permettre de définir quatre stades (Malecha 1979).

- stade 0 : de l'éclosion au premier repas
- stade 1 : après le premier repas
- stade 2 : après le deuxième repas
- stade 3 : après le troisième et dernier repas.

Ce troisième repas déclenche, pour des raisons encore indéterminées, de profondes modifications physiologiques et anatomiques. La principale correspond à l'entrée en phase de gamétogenèse de l'animal. Les sangsues étant des animaux hermaphrodites protandres, la gamétogenèse se déroule en deux temps : tout d'abord une phase de spermatogenèse puis une phase d'ovogenèse. La fécondation croisée va être suivie par la ponte et l'incubation de « cocons ». Les cocons disposés à l'abris sous le ventre du parent, vont se développer et donner naissance aux sangsues de stade 0. *Theromyzon t.* étant une espèce sémelpare, l'adulte meurt quelques jours après le départ des sangsues néonatales.

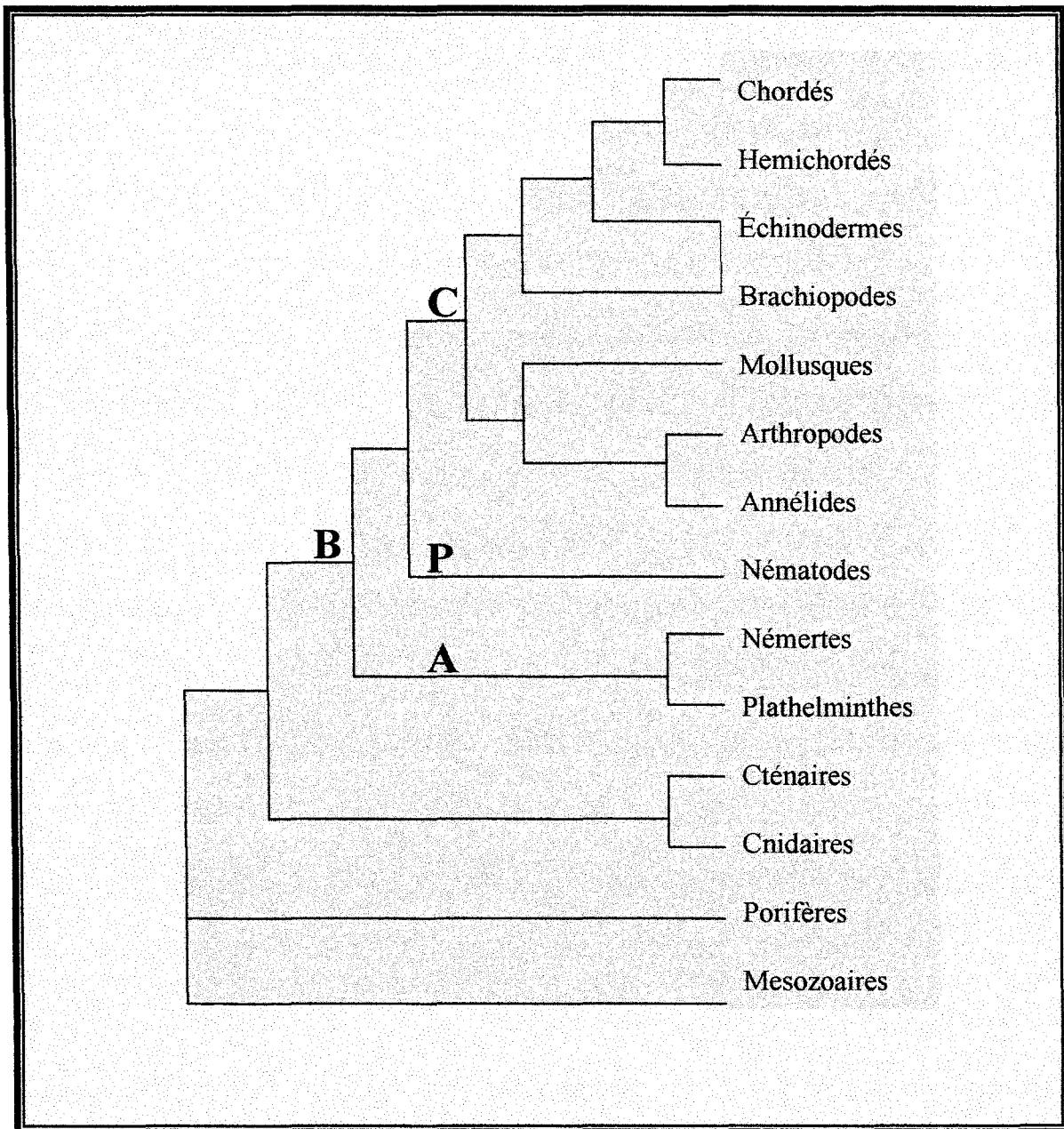


Figure 1 : Arbre phylogénétique simplifié du Règne Animal : Les animaux à symétrie bilatérale (**B**) sont divisés en trois groupes en se servant de la présence d'une cavité interne, le coelome (koilos signifie cavité en grec) comme critère : 1/ des animaux sans cœlome (**Accélomates**) comme le tænia de l'Embranchement des Plathelminthes 2/ des animaux avec une cavité interne qui n'est pas un vrai cœlome (**Pseudo cœlomates**) comme l'ascaris de l'Embranchement des Nématodes, et 3/ des animaux avec un véritable cœlome (**Cœlomates**) comme les sangsues de l'Embranchement des Annélides, et tous les animaux placés plus haut dans l'arbre phylogénétique.

L'acquisition de cette maturité sexuelle est dépendante d'un facteur critique : le poids de l'animal. Ainsi, si la masse corporelle est insuffisante, la sangsue n'entre pas en phase de gamétopénie et un stade supplémentaire (appelé stade 2 surnuméraire) est observé. Son cycle de vie s'étend alors sur deux ans au lieu d'une année. L'augmentation de poids est favorisée par deux phénomènes : d'une part l'ingestion de sang au cours du troisième repas et d'autre part la mise en place de mécanismes anti-diurétiques puissants. L'anti-diurèse se manifeste par une accumulation d'eau au niveau des cavités qui renferment le liquide coelomique. Cette augmentation en volume du liquide coelomique rend ainsi possible son extraction.

Pour cette raison, les purifications de peptides antimicrobiens décrites dans ce manuscrit ont été effectuées à partir du liquide coelomique prélevé sur des sangsues au stade 3 de leur cycle vital.

L'immunité antimicrobienne

La première ligne de défense contre les microorganismes pathogènes est constituée par les barrières anatomiques capables de prévenir la pénétration de ces agents et donc le développement d'une infection. Ainsi chez les invertébrés, le corps de nombreux Cœlentérés, Annélides, Mollusques et de certains Tuniciers sont recouverts de mucus, barrière physico-chimique très efficace comme première ligne de défense. Des exosquelettes très résistants comme les coquilles de certains Mollusques et les carapaces de certains Arthropodes s'opposent également à la pénétration des bactéries. Chez les vertébrés, ces mécanismes dits d'exclusion sont multiples et leurs altérations sont à l'origine de nombreuses infections. Citons à titre d'exemple, le rôle de la barrière du revêtement kératinique de l'épiderme et le pH acide de la sueur. Dans le tractus génital, le pH vaginal et la flore de Döderlin participent à l'exclusion des pathogènes. Au niveau des muqueuses respiratoires, le flux d'air dans les cornets et l'escalator mucociliaire des bronches sont autant de mécanismes d'exclusion dont l'altération pathologique (polluants atmosphériques, tabagisme, mucoviscidose...) conduit à la bronchite chronique. Au niveau du tube digestif, les éléments les plus importants sont l'acidité gastrique, le péristaltisme intestinal, et la libération de sidérophores (chélateurs ferriques) par les bactéries commensales. Les sécrétions muqueuses, riches en lysozyme, en lactoferrine et en peptides antimicrobiens participent également à ces mécanismes d'exclusion. Tous ces événements maintiennent la muqueuse intestinale stérile alors que le colon contient approximativement 10^{10} bactéries par gramme de matières fécales.

Par conséquent et fort heureusement, seule une infime portion de microorganismes pathogènes de notre environnement peut atteindre nos tissus. La pénétration dans l'organisme d'un microbe entraîne la mise en route des effecteurs de l'immunité. L'immunité

antimicrobienne repose sur un ensemble de mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont devenus de plus en plus complexes au fur et à mesure de l'évolution des espèces et de l'adaptation réciproque des écosystèmes bactériens et de l'hôte. Parmi ces mécanismes, deux types d'immunité l'une dite non-spécifique (innée) et l'autre dite spécifique (adaptative) participent à la lutte contre les microorganismes.

I/ Immunité innée et immunité adaptative

Chez les invertébrés et les vertébrés, la réponse immunitaire innée est une réponse immédiate qui vise à la capture et à la destruction rapide de l'élément pathogène. Elle met en jeu des protéines sériques ou membranaires, préexistantes ou rapidement induites après une infection (dans l'heure qui suit). Ces molécules sont capables de reconnaître des motifs invariants à la surface des bactéries. La reconnaissance de ces molécules du non-soi enclenche des réactions cellulaires et humorales. Les premières impliquent les cellules circulantes qui participent à l'encapsulation et/ou à la phagocytose des particules étrangères. Le volet humoral quant à lui, consiste d'une part en l'activation de cascades protéolytiques et d'autre part en la synthèse de peptides antimicrobiens.

L'immunité adaptative, propre aux vertébrés, est spécifique de l'agent qui l'a induite et se caractérise par une augmentation de la réponse à chaque rencontre avec cet agent. Cette faculté, basée sur la spécificité et la mémoire, est le fait de recombinaisons génétiques qui s'opèrent au sein des gènes codant les molécules de l'immunité adaptative. Ces molécules comprennent d'une part les immunoglobulines (Ig) ou anticorps qui sont sous forme soluble dans les liquides biologiques ou sous forme de récepteurs membranaires à la surface des

lymphocytes B (LB) et d'autre part les récepteurs des lymphocytes T (LT). Ces molécules sont très diversifiées. On estime par exemple qu'un organisme adulte contient à un instant donné de l'ordre de 10^{20} molécules d'Ig dont plus de 10^9 espèces moléculaires différentes, et plus de 10^4 clones différents de LT.

Chez les vertébrés, qui possèdent les deux types d'immunité, l'immunité innée va communiquer son « évaluation biologique » de l'antigène à l'immunité adaptative. Cette communication se fait par le biais de différents effecteurs (voir figure 2). La fixation de l'antigène sur les monocytes/macrophages va entraîner l'induction et la libération de cytokines proinflammatoires dont l'interleukine 1 β (Il-1 β), l'interleukine 6 (Il-6), l'interleukine 12 (Il-12) et le Facteur de Nécrose Tumoral- α (TNF- α). Leurs actions conjointes ou non vont entre autres (i) augmenter les fonctions microbicides des phagocytes (Il-1, TNF- α) et cytotoxiques des cellules NK (Il-12), (ii) induire la libération par le foie des protéines de la phase aiguë (Il-6, Il-1, TNF- α), (iii) favoriser la différenciation des LB (Il-6) et (iv) engendrer fatigue et fièvre en agissant sur l'hypothalamus (Il-1, TNF- α). Le TNF- α induit également la libération d'interféron- γ (IFN- γ) par les cellules NK. L'IFN- γ libéré augmente l'expression des molécules de classe I et II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) à la surface des lymphocytes B et des monocytes/macrophages qui voient de ce fait leur capacité de présentation de l'antigène accrue. La présentation de l'antigène par le CMH aux récepteurs des LT délivre le premier signal nécessaire à l'activation des cellules T. Le deuxième signal est fourni par l'association des protéines membranaires B7-1 et B7-2 présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes au même récepteur du LT. B7-1 et B7-2 sont induites par les LPS. Récemment Medzhitov et ses collègues ont montré que l'induction de la protéine B7-1 à la surface des macrophages, était médiée par un récepteur homologue à Toll chez l'homme, plaçant ainsi la molécule B7-1 à l'une des interfaces entre

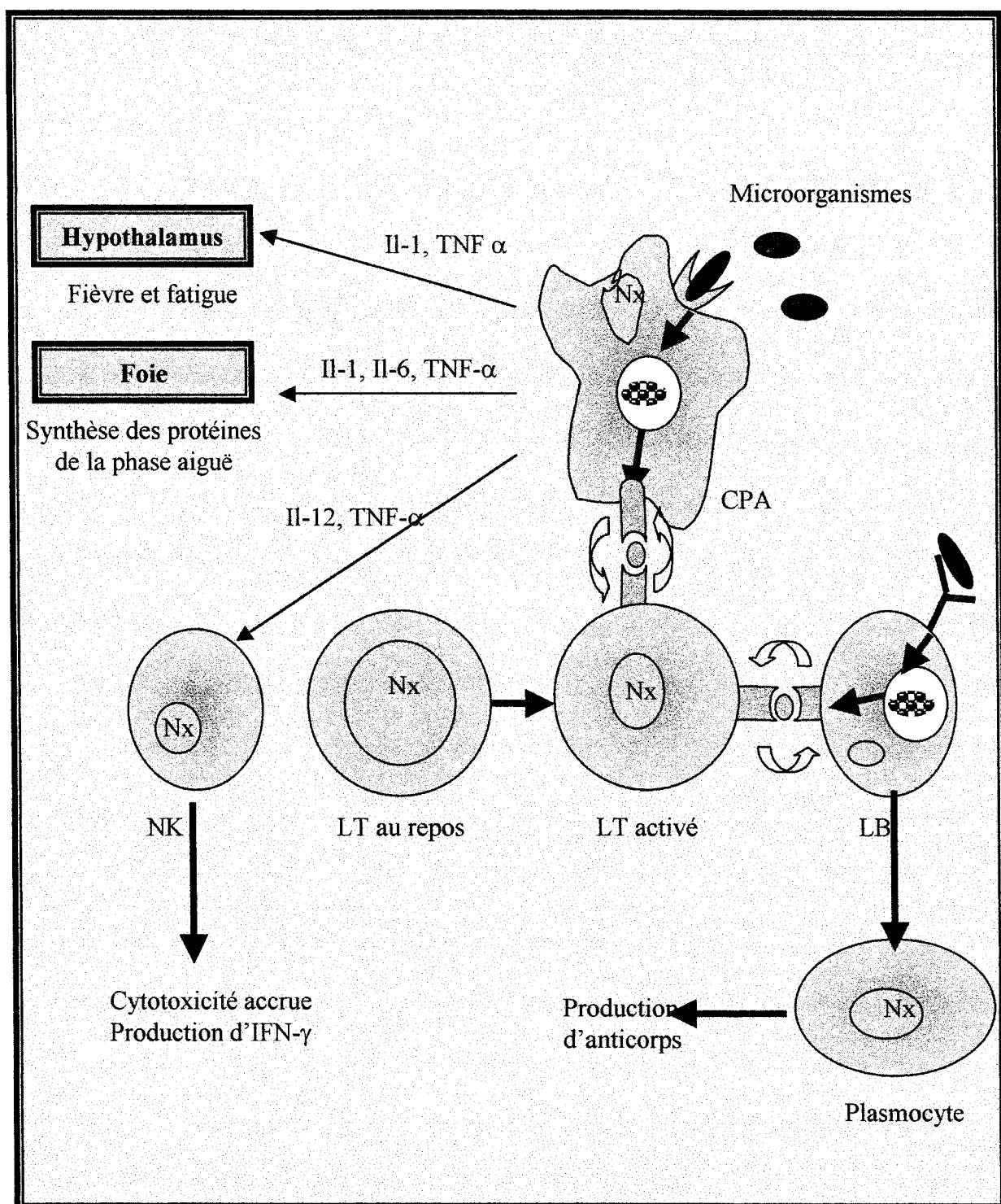


Figure 2: Après avoir détecté la présence de microorganismes, l'immunité innée communique son évaluation biologique de l'antigène à l'immunité acquise (voir le texte pour explications). CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène ; LB : Lymphocyte B ; LT : Lymphocytes T ; NK : Natural Killer ; Nx : noyau

l'immunité innée et l'immunité acquise (Medzhitov and Janeway 2000). L'activation réciproque des LB et des LT est nécessaire à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes en plasmocytes c'est à dire en cellules productrices d'anticorps. Ces anticorps spécifiques de l'antigène, conféreront à l'organisme une capacité de résistance vis-à-vis d'une nouvelle infection. C'est cette mémoire immunologique qui est utilisée dans la vaccination. La synthèse d'un anticorps spécifique nécessite un certain nombre d'événements de recombinaison des gènes codant les Ig. Les premiers événements, qui donnent lieu à la première vague d'anticorps (IgM et IgA), sont le réarrangement des chaînes lourdes et légères pour former les segments codant pour les domaines variables. Plus tard dans le développement, les cellules B pourront opérer d'autres réarrangements de leur ADN, en particulier lors de la commutation de classe et lors des hypermutations somatiques (deuxième vague d'anticorps, IgG et IgE). Ces derniers événements entraînent sous le contrôle des gènes RAG (Recombination Activating Gene) des mutations ponctuelles dans les polypeptides d'Ig (Blackwell and Alt 1989). De la même façon, les récepteurs des cellules T possèdent des régions variables qui sont également le lieu de recombinaison génétique (Ferrier, Kripli et al. 1989). Tous ces événements ont pour objectifs d'augmenter la spécificité de reconnaissance vis à vis de l'antigène ce qui assure une réponse plus rapide lors d'une ré-infection.

La mise en place d'un tel système est long et coûteux en énergie. Pour citer un chiffre, 99 % des cellules T seront éliminées par sélection négative dans le thymus ou suite à un réarrangement non productif (Hunkapiller et Hood, 1990). Par ailleurs, lors d'une première infection bactérienne, la réponse anticorps se met en place trop lentement comparée à la croissance exponentielle des bactéries (voir figure 3). Par conséquent, même si l'immunité innée présente le désavantage d'être moins flexible d'un point de vue génétique (ce qui favorise les mécanismes d'échappement des microbes), elle est indispensable à l'enrayement

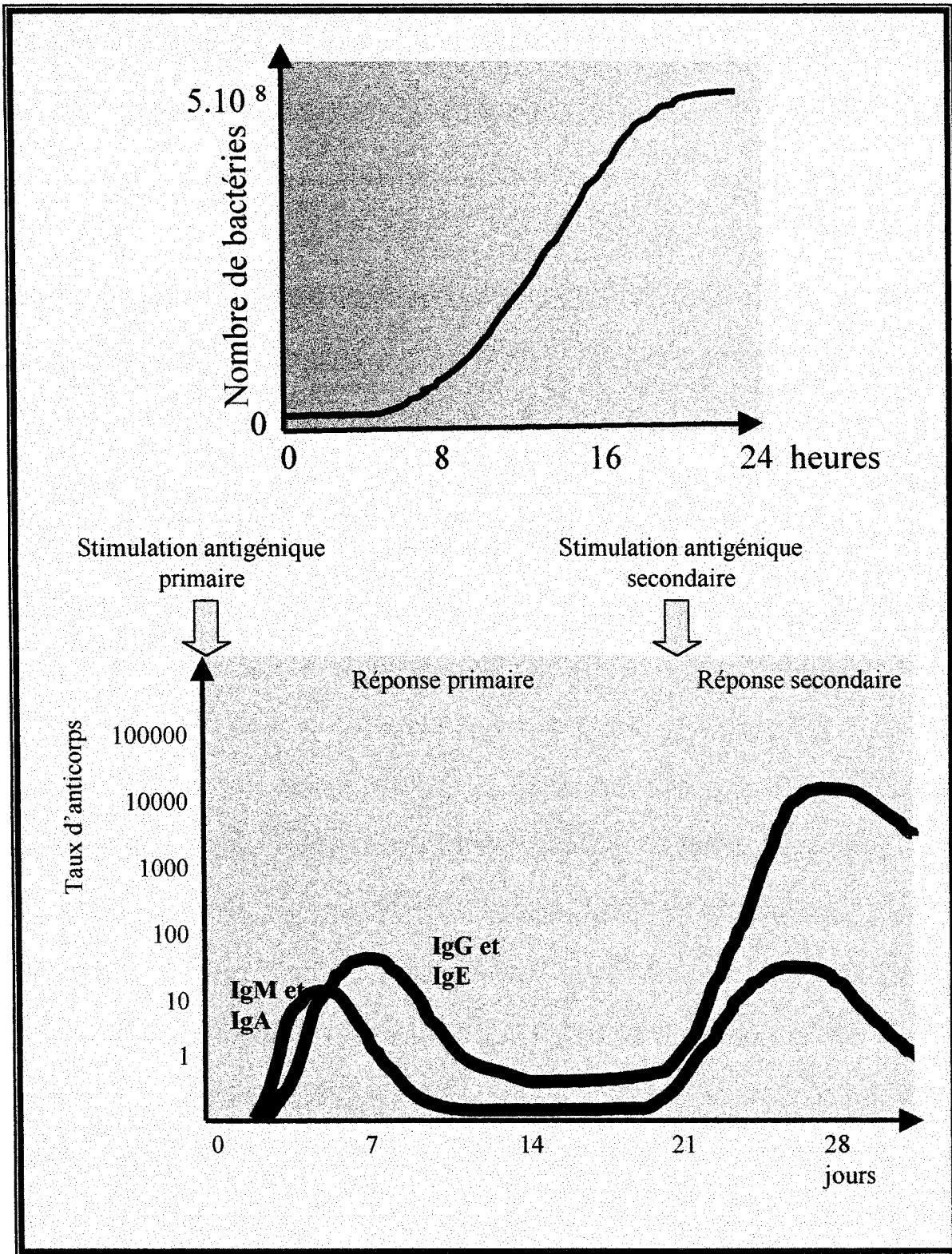


Figure 3 : Les bactéries sont capables de se multiplier très rapidement: un seul microorganisme peut produire 5×10^8 bactéries en 24 heures (si l'on considère un temps de doublement de 50 min.). Au contraire, une réponse anticorps effective nécessite sept jours lors d'une réponse primaire (et trois lors d'une réponse secondaire) pour se mettre en place.

rapide de la prolifération microbienne dans l'organisme. Pour preuve, les déficits congénitaux de certaines composantes du complément entraînent chez l'homme des infections bactériennes récidivantes. Une autre preuve est le franc succès évolutif que connaissent les invertébrés. Ce phylum n'a pas développé d'immunité spécifique et pourtant, les invertébrés englobent plus de 90% des animaux qui peuplent notre planète. Ils sont parvenus à coloniser presque toutes les niches écologiques et sont de ce fait confrontés à une plus grande variété de microorganismes. Cette réussite évolutive repose entre autre sur des mécanismes de défense très efficaces Jusqu'au début des années 1990, il était largement admis que les réactions immunitaires des invertébrés relevaient de mécanismes totalement différents de ceux des vertébrés. Diverses études révèlent aujourd'hui l'existence de similitudes frappantes entre la réponse innée des mammifères et la défense antimicrobienne des invertébrés. Nous évoquerons ces similitudes tout au long des paragraphes suivants. Dès à présent, il ne sera question que d'immunité innée.

II/ Immunité antimicrobienne des invertébrés et des vertébrés

Bien qu'ayant développé un système immunitaire structuralement et fonctionnellement plus complexe, les vertébrés ont conservé des mécanismes de défense innés proches de ceux présents chez les invertébrés. Le plan d'organisation de la lutte contre les microorganismes est identique : reconnaissance, mise en place des mécanismes cellulaires et humoraux auxquels s'ajoute une défense locale au niveau des épithélia et des muqueuses. Même si dans un intérêt médical, les recherches ont principalement été menées chez les vertébrés, les invertébrés ont également fait l'objet de nombreuses études. Le système immunitaire des invertébrés a particulièrement été étudié chez les Arthropodes et les Mollusques ceci (i) dans un intérêt

médical, puisque certains insectes et certains gastéropodes sont vecteurs de parasitoses qui affectent l'homme, (ii) dans un intérêt économique afin de limiter les pertes dans les élevages (cas des Crustacés et des Mollusques bivalves) et (iii) dans un intérêt fondamental comme c'est le cas pour les modèles *Cænorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* dont les génomes ont été entièrement décryptés.

A/ Reconnaissance des microorganismes

La reconnaissance et la discrimination entre les molécules du soi et du non-soi constituent la base d'une réponse immunitaire efficace. Les microbes exposent au système immunitaire des motifs dits invariants qui vont être la cible de molécules sériques ou membranaires. Les motifs sont dits invariants car ils sont caractéristiques d'une « famille » de microbes : les LPS caractérisent les bactéries à Gram négatif, les acides lipotéichoïques se rencontrent à la surface des bactéries à Gram positif et les mannanes sont une structure commune des champignons.

1/ Reconnaissance des motifs LPS des bactéries à Gram négatif

En ce qui concerne les invertébrés, les protéines liant les LPS ont été bien étudiées chez les Arthropodes (Chiou, Chen et al. 2000). Chez ces animaux, des fonctions supplémentaires viennent compléter les capacités de reconnaissance de ces molécules. Par exemple, chez la limule *Tachypleus tridentatus*, la tachyplésine, la polyphémusine, la tachycitine et la tachylectine-1 possèdent en plus d'une capacité de liaison aux LPS, des activités microbicides (Kawabata, Beisel et al. 2001) (Kawabata, Nagayama et al. 1996). La reconnaissance entraîne la destruction immédiate de la bactérie reconnue. Deux autres protéines sériques, la tachylectin-2 et la tachylectin-5 possèdent des propriétés agglutinantes (Iwanaga, Kawabata et

al. 1998) (Gokudan, Muta et al. 1999). Le facteur C quant à lui, par son activité protéase à sérine participe à la cascade protéolytique de la coagulation (Iwanaga and Kawabata 1998). Ce processus très sensible est d'ailleurs à la base d'un test de détection d'endotoxines couramment utilisé en laboratoire : le « Limulus test ».

Chez les Insectes, l'hémoline après liaison aux LPS, prévient l'agrégation hémocytaire et favorise la phagocytose en agissant comme facteur opsonisant (Bettencourt, Assefaw-Redda et al. 2000). L'hémoline appartient à la superfamille des Ig ce qui évoque l'existence d'un mécanisme de reconnaissance des antigènes basé sur des molécules ancestrales communes.

Toujours chez les Insectes, une protéine se liant aux composants de la paroi des bactéries à Gram négatif, la Gram-Négative Binding Protein (GNBP) a été isolée chez le vers à soie et la drosophile (Lee, Lee et al. 1996). La GNBP joue un rôle important dans la réponse antibactérienne de ce Diptère. En effet, il est apparu qu'une surexpression de la GNBP de drosophile potentialisait la réponse aux LPS alors que son inactivation l'inhibait (Kim, Ryu et al. 2000). Cette molécule inducible par les bactéries, possède un site β -1,3 glycanase qui suggère également une capacité de liaison aux motifs β -1,3 glycane des champignons. La GNBP présente des homologies de séquence avec le CD14 des vertébrés.

Chez les Mammifères, les molécules intervenant dans la reconnaissance des endotoxines ont fait l'objet de nombreux travaux. Cet intérêt s'explique par le fait que les LPS sont responsables du syndrome de choc infectieux ou choc septique, typiquement observé lors des bactériémies à Gram négatif. Plusieurs molécules liant les LPS ont ainsi été caractérisées chez les vertébrés mammaliens. Certaines, comme cela est observé pour la tachyplésine ou la tachycitine de limule, possèdent en plus de leur capacité de liaison aux endotoxines, une activité antibactérienne. C'est le cas notamment de la lysine produite par les cellules NK (Andersson, Gunne et al. 1996), des cathélicidines CAP 18/LL-37 (Lerrick, Hirata et al. 1995)

et de la protéine Bactericidal/ Permeability-Increasing (BPI) synthétisés par les neutrophiles (Little, Kelner et al. 1994). La BPI est un membre de la famille des protéines capables de fixer les lipides. Cette famille comprend les protéines de transport du cholestérol, les protéines de transport des phospholipides ainsi que la LPS Binding Protein (LBP) (Bruce, Beamer et al. 1998). Toutes ces molécules présentent des homologies de séquence et une organisation génique très conservées (Hubacek, Buchler et al. 1997). Malgré les similitudes structurales que partagent la LBP et la BPI, leur liaison aux LPS n'engendre pas les mêmes effets (Tobias, Soldau et al. 1997). La BPI produite par les neutrophiles, agit de façon conjointe avec des peptides antimicrobiens tels que les défensines et le complexe d'attaque membranaire du complément pour détruire spécifiquement les bactéries à Gram négatif (Weiss, Elsbach et al. 1992). Elle favorise également l'opsonisation des bactéries par les neutrophiles et neutralise l'action que les LPS ont sur les monocytes (Irvine, Elsbach et al. 1997). La LBP, quant à elle, est une protéine sérique de phase aiguë produite par le foie, qui informe les monocytes de la présence des LPS. L'importance de la LBP dans la réponse inflammatoire a été démontrée chez la souris. Ainsi des souris déficientes en LBP, ne meurent pas suite à une injection d'une dose normalement létale de LPS (Wurfel, Monks et al. 1997). Le même phénotype de résistance est observé lors d'une déficience en CD14 (Haziot, Ferrero et al. 1995). Cela s'explique par le fait que le complexe LBP-LPS délivre un signal activateur aux monocytes *via* le CD14 qui est ancré à leur surface. Le CD14 interagit alors avec un récepteur qui présente des homologies avec le récepteur Toll de la drosophile : le hTLR-4 (human Toll Like Receptor-4) (Medzhhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Récemment des études ont montré que les LPS pouvaient également activer directement le hTLR-4 présent à la surface des monocytes (Poltorak, Ricciardi-Castagnoli et al. 2000). L'activation de hTLR-4 par des

endotoxines déclenche une voie de signalisation (détailée dans le volet « immunité antimicrobienne extracellulaire ») qui mène à la synthèse de cytokines proinflammatoires.

2/ Reconnaissance d'autres motifs

Des protéines reconnaissant les mannanes exprimés à la surface des champignons, doivent être présentes au moins chez les Deutérostomes, car deux de ces molécules ont récemment été clonées chez l'ascidie *Halocynthia roretzi* (Ji, Azumi et al. 1997). Ces molécules présentent de par leur domaine protéase à sérine, des homologies avec les Mannan binding protein Associated Protease (MASP) humaines qui interviennent dans la voie des lectines du complément des vertébrés (Matsushita, Endo et al. 1998). Toujours chez *Halocynthia roretzi*, une molécule de la famille des lectines a été isolée : la ficoline (Kenjo, Takahashi et al. 2001). Les lectines (du latin *legere* qui signifie choisir) sont des protéines ou des glycoprotéines dépourvues d'activité enzymatique. Leur capacité à se fixer aux motifs carbohydrates des microorganismes leur confère un large spectre d'action. La ficoline d'ascidie présente des homologies avec la ficoline humaine. Cette molécule en association avec les MASP possède chez les mammifères, la capacité d'activer la voie des lectines du complément. Ces protéines d'ascidie pourraient par conséquent constituer un des maillons d'un système ancestral de type complément.

Chez les Chélicérates, une molécule proche de la GNBP d'Insecte, a été isolée et clonée. La β -1,3-Glucan-Binding Protein (BGBP) ou facteur G de la limule, est constituée de deux sous-unités reliées de façon non covalente. La plus large porte le domaine glycanase alors que la plus petite porte un domaine protéase à sérine. Après la liaison aux motifs β -1,3 glycane des champignons, le facteur G déclenche une cascade protéolytique menant à la formation d'un gel dont la vocation est de limiter l'infection. Une BGBP a également été clonée chez

l'écrevisse (Cerenius, Liang et al. 1994). Il s'agit d'un monomère qui présente une structure primaire différente de la BGBP de limule. La BGBP d'écrevisse est très proche de la protéine LP-1 de crevette. LP-1 étant impliquée dans le transport des lipides vers les ovaires, il apparaît qu'immunité et reproduction peuvent être liées chez les crustacés. Après s'être fixée à son ligand, la BGBP se fixe aux hémocytes de l'écrevisse, vraisemblablement par des récepteurs de type intégrines (Holmlund, Thornqvist et al. 1997). La BGBP agit donc comme une opsonine.

Enfin d'autres mécanismes de reconnaissance des agents infectieux ne faisant pas intervenir de « récepteurs patrons » existent probablement chez les invertébrés. Chez la drosophile par exemple, il n'est pas exclu que certains champignons entomopathogènes tels que *Beauveria bassiana* puissent être reconnus non pas par un constituant particulier de l'enveloppe, mais par les protéases que ces agents pathogènes sécrètent afin de percer la cuticule de l'insecte. De telles protéases pourraient en clivant Spätzle ou une protéase de l'hôte activer la voie Toll et induire une réponse antifongique (Lemaître, Reichhart et al. 1997).

Chez les mammifères, les hTLRs seuls ou associés semblent jouer un rôle clé dans le processus de reconnaissance des motifs exposés à la surface des microorganismes. Contrairement à la drosophile, ces motifs servent de ligands aux TLRs. Dix TLRs ont été recensés chez l'homme. La spécificité de reconnaissance de certains d'entre eux a été appréhendée par le biais de diverses études (pour revue voir (Means, Golenbock et al. 2000)). De ces travaux, il ressort que : le hTLR-2 est activé par les peptidoglycans et les lipoprotéines des bactéries à Gram positif (Takeuchi, Hoshino et al. 1999), le hTLR-4 est activé, comme nous l'avons dit précédemment, par les LPS mais aussi par les acides lipoteichoïques des bactéries à Gram positif, le hTLR-5 est activé par les flagellines bactériennes, le hTLR-6 en association avec le hTLR-2 reconnaît les peptidoglycans présents

à la surface des bactéries à Gram positif et les particules de Zymosan (levures) (Takeuchi, Kawai et al. 1999) et enfin le hTLR-9 est activé par l'ADN bactérien contenant un motif CpG non-méthylé. Sur les bases de ces observations, une hypothèse attrayante serait de penser que le ratio et l'association des divers hTLRs exprimés à la surface d'une cellule, orienteraient la réponse de cette cellule vis à vis d'un type particulier de microorganismes.

Toujours chez les vertébrés, différentes lectines libres ou membranaires sont capables de reconnaître des motifs autres que les LPS. Parmi les lectines libres, la Mannose Binding Protein (MBP) et la ficoline interviennent dans l'activation de la cascade du complément (Kawasaki, Kawasaki et al. 1983) (Turner 1996). Une autre lectine libre, la Surfactant Protein (SP-A), a été mise en évidence dans le liquide pulmonaire où elle participerait activement aux mécanismes de défense des alvéoles face aux virus et aux bactéries inhalés (Harrod, Trapnell et al. 1999). Des lectines membranaires interviennent également dans le processus de reconnaissance (pour revue voir (Stahl and Ezekowitz 1998)). Les Mannose Receptor (MR) sont des récepteurs multilectiniques présents au niveau des macrophages tissulaires et des cellules dendritiques. Leur rôle dans les mécanismes immunitaires innés sont multiples. Non seulement ils participent au processus de phagocytose (Marodi, Schreiber et al. 1993) mais ils favorisent également la sécrétion d'enzymes lysosomiales et la production de cytokines proinflammatoires (Yamamoto, Klein et al. 1997).

Hormis quelques exceptions telles que la ficoline et d'autres molécules qui semblent être à l'origine de la réaction du complément, il existe peu de similitudes dans la structure primaire des molécules de reconnaissance de vertébrés et d'invertébrés. Les similitudes apparaissent principalement au niveau des signaux immunitaires mis en route après la reconnaissance. Nous verrons notamment que la plus flagrante de ces homologies concerne la

voie Toll. Les ligands des récepteurs Toll sont différents chez la drosophile et les Mammifères et pourtant dans les deux cas la détection d'un microorganisme déclenche une voie de transduction quasi-identique qui aboutit à la production de molécules effectrices de l'immunité innée.

B/ Immunité antimicrobienne intracellulaire

Les cellules phagocytaires constituent avec les facteurs humoraux, la première ligne de défense mise en jeu après l'invasion microbienne. Les étapes (voir figure 4) qui marquent le processus de phagocytose sont très conservées car identiques chez les invertébrés et chez les vertébrés (Bayne and Fryer 1994): (1) reconnaissance et fixation (2) ingestion par enroulement des pseudopodes autour de la particule à phagocyter, formation d'un phagosome (3) destruction par activation des mécanismes bactéricides dépendant de l'oxygène (4) fusion phagosome-lysosome, activation des mécanismes bactéricides indépendants de l'oxygène et (5) exocytose des débris bactériens. Même si la phagocytose peut avoir lieu en absence de facteurs opsonisants, elle est favorisée par les lectines plasmatiques et/ou les composants du complément ou de la cascade de la coagulation. La phagocytose n'est possible que si l'élément à ingérer n'est pas trop volumineux. Dans le cas contraire, la particule étrangère est encapsulée ou enfermée dans un agrégat multicellulaire puis elle est détruite par déversement des enzymes lysosomales ou par accumulation de mélanine. Parfois, et c'est notamment le cas des bactéries à développement intracellulaire, des virus, ou des parasites, les pathogènes échappent aux processus de lyse intracellulaire. Pour contrer ce phénomène, les vertébrés possèdent des cellules spécialisées dans la destruction des cellules infectées.

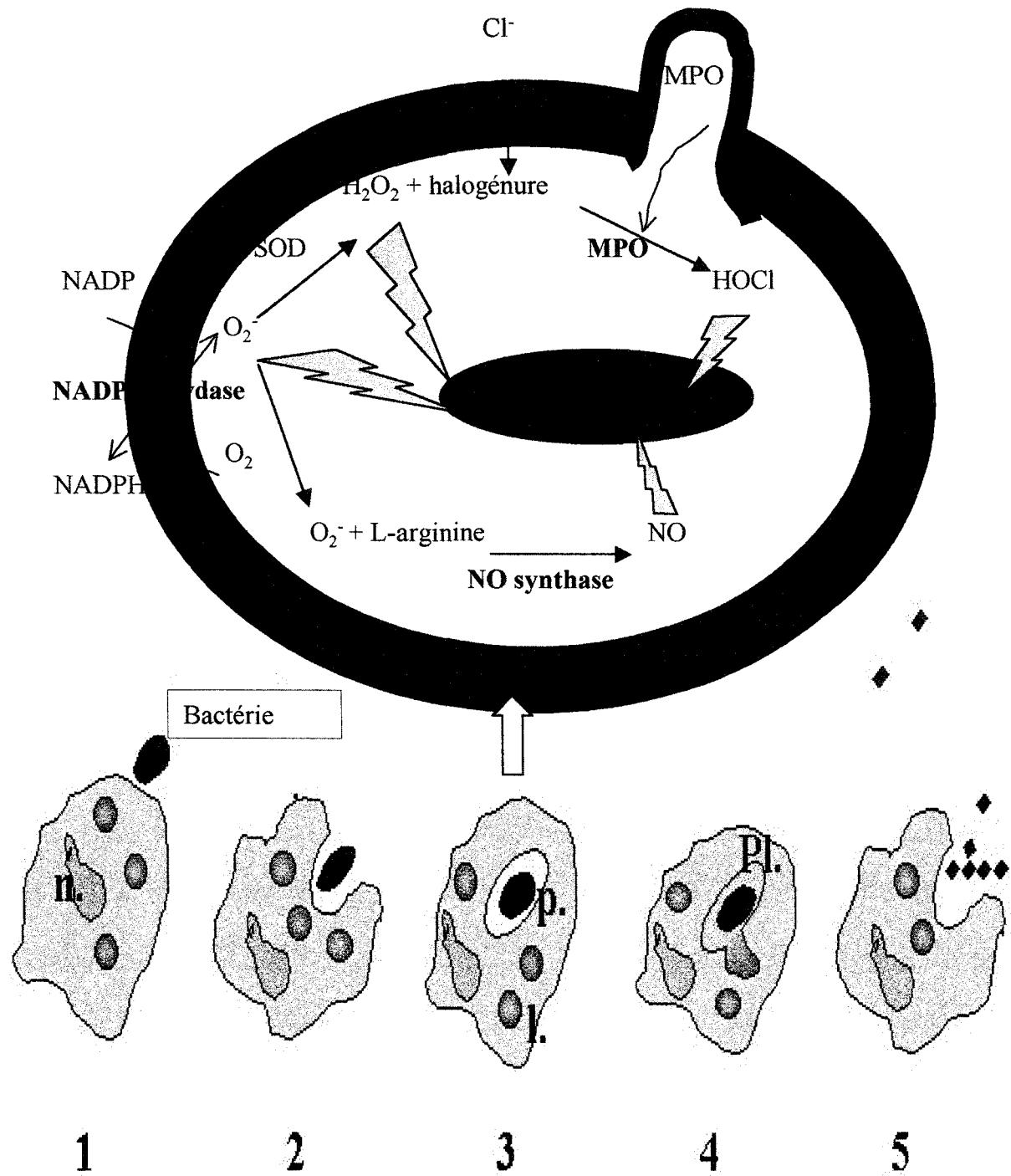


Figure 4: Principales étapes de la phagocytose.

(1) reconnaissance (2) internalisation (3) formation du phagosome, bactéricidie dépendante de l'oxygène (4) formation du phagolysosome par fusion du phagosome et du lysosome, bactéricidie indépendante de l'oxygène (5) exocytose des débris.
 l. lysosome ; M.P.O. myéloperoxydase ; n. noyau ; p. phagosome; Pl. phagolysosome ; S.O.D. superoxyde dismutase.

1/ Destruction des bactéries phagocytées par les mécanismes de lyse intracellulaire dépendant de l'oxygène

Chez les invertébrés et chez les vertébrés, trois enzymes sont à la base du mécanisme de lyse intracellulaire dépendant de l'oxygène : la NADPH oxydase membranaire, la myéloperoxydase (MPO) et la NO synthase. Les systèmes enzymatiques mettant en jeu ces molécules semblent très conservés (Anderson, Kang et al. 1979) (Jacklet 1997). Ainsi chez les Mollusques bivalves pour lesquels le processus a été bien étudié, l'implication de la MPO et de la NADPH oxydase dans la lyse intracellulaire est identique à ce qui est décrit chez les Mammifères (Torreilles, Guerin et al. 1996). La NO synthase a quant à elle été mise en évidence chez les Cnidaires, les Echinodermes, les Nématodes, les Annélides, les Mollusques, les Crustacés et les Insectes (Jacklet 1997).

Le mécanisme enzymatique est le suivant (voir figure 4): l'internalisation d'un élément étranger déclenche au sein du phagosome la réduction univale de l'oxygène moléculaire en superoxyde via la NADPH oxydase membranaire. Cet anion superoxyde par action de la superoxyde dismutase (SOD) va générer de l'eau oxygénée qui en présence de sels de fer assure la production d'oxygène singulet et de radicaux hydroxyles (réaction de Fenton, non représentée sur le schéma). Chez les vertébrés, la NADPH oxydase est activée lorsque la cellule phagocytaire est en présence d'endotoxines, d'IFN- γ , d'IL-8 ou lors de la fixation d'IgG aux récepteurs FC. Lorsqu'il y a fusion des phagosomes avec les lysosomes, la MPO des lysosomes en présence d'eau oxygénée et d'halogénure, assure la production d'acide hypochloreux (HOCl) (Klebanoff, Durack et al. 1977). Une troisième voie dépendante de l'oxygène joue également un rôle important dans la lyse des bactéries par les cellules phagocytaires : il s'agit de la formation de dérivés oxydés de l'azote aboutissant à la production de monoxyde d'azote (NO). Le NO est formé à partir de la L-arginine en présence

de NO-synthase. L'expression du gène de la NO synthase est fortement induite dans les macrophages en présence d'IFN γ et d'endotoxines chez les vertébrés uniquement. La réaction s'effectue en présence de NADPH, d'anions superoxydes et d'un cofacteur indispensable la tétrahydrobioptérine. Le NO formé peut ensuite être transformé en dérivés encore plus toxiques tels que le nitrosium ou le dioxyde d'azote. Tous ces composés réactifs dérivés de l'oxygène : le NO, l'HOCl, les anions superoxydes, l'eau oxygénée, les radicaux hydroxyles... sont toxiques vis à vis des bactéries mais aussi vis à vis des phospholipides de la membrane des cellules de l'hôte qui de ce fait ont développé des moyens de défense antiradicalaire tels que la taurine (neutralise l'HOCl), le glutathion, la catalase qui dégrade l'eau oxygénée...(Vattanaviboon, Sriprang et al. 2001) (Henkle-Duhrsen and Kampkotter 2001) (Loprasert, Vattanaviboon et al. 1996).

2/ Destruction des bactéries phagocytées par les mécanismes de lyse indépendants de l'oxygène

Lors de la formation d'un phagolysosome, le contenu lysosomal est déversé dans le phagosome. Parmi les substances déversées, le lysozyme qui dégrade la paroi de certaines bactéries, la lactoferrine qui chélate le fer, les hydrolases acides telles que la phosphatase ainsi que l'acidité du phagosome agissent de façon conjointe dans la destruction des bactéries. Des peptides antimicrobiens peuvent également participer à la destruction des microbes phagocytés.

En ce qui concerne les invertébrés, l'implication des peptides antimicrobiens dans la lyse des particules internalisées a été particulièrement bien étudiée chez un Mollusque bivalve : la moule *Mytilus galloprovincialis* (Mitta, Vandebulcke et al. 2000). Chez cet animal, les cellules circulantes semblent jouer un rôle prépondérant de la réponse anti-

infectieuse. L'injection expérimentale de bactéries conduit au recrutement de cellules phagocytaires à gros granules vers le foyer infectieux. Les gros granules assimilables à des lysosomes, contiennent en plus des hydrolases, la mytiline B (Pipe 1990). La mytiline B est un peptide antimicrobien cationique qui possède huit cystéines impliquées dans quatre ponts disulfures (Mitta, Hubert et al. 2000). Cette molécule est active contre les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et les champignons. Suite à une infection microbienne, la mytiline B participe dans un premier temps au mécanisme de lyse intracellulaire. En effet, lors de la formation du phagolysosome, la molécule contenue dans les gros granules est déversée dans le phagosome où en conjonction avec les mécanismes oxydatifs, elle assure la destruction du pathogène séquestré. Dans une phase plus tardive (24 à 48 heures après l'injection bactérienne), la molécule est libérée dans le plasma où elle jouerait un rôle systémique visant à contrecarrer d'éventuelles infections généralisées. Chez ce modèle invertébré, l'implication conjointe de peptide antimicrobien et du lysozyme dans le processus de lyse intracellulaire est identique à ce qui a été décrit pour les neutrophiles humains (voir figure 5).

Chez les vertébrés, les neutrophiles représentent les cellules immunitaires sanguines les plus abondantes et de ce fait constituent une barrière de défense importante face aux microorganismes. Ils tuent les éléments pathogènes en produisant en plus des composés réactifs de l'oxygène, des peptides antimicrobiens et toute une série d'hydrolases dont le lysozyme, la phosphatase acide, la β -glucuronidase, la leucine aminopeptidase... Ces protéines majoritairement stockées dans les granules azurophiles des neutrophiles, agissent lors de la fusion de ces granules avec le phagosome (phagolysosome). Ces dernières années, différentes classes de peptides antimicrobiens ont été purifiées à partir de cellules phagocytaires mammaliennes (Ganz, Selsted et al. 1985) (Ganz and Weiss 1997). Deux grandes familles de peptides à large spectre d'activité ont particulièrement été étudiées : les

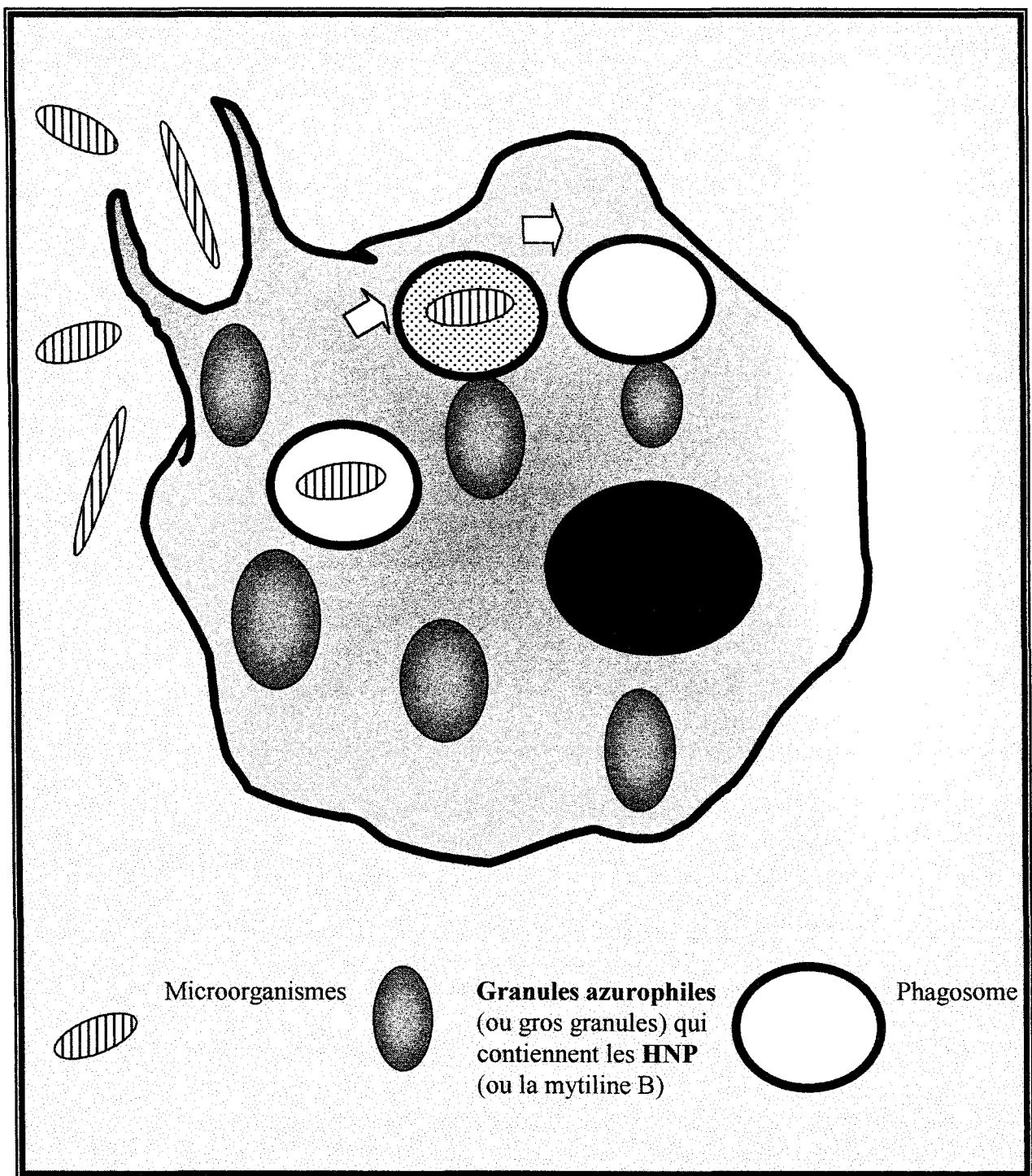


Figure 5: Mécanismes d'intervention des défensines α humaines (HNP) et de la mytiline B dans la lyse intracellulaire des bactéries. Chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, après phagocytose, la mytiline B contenue dans les gros granules des hémocytes est déversée dans le phagosome. De la même façon, les défensines α des granules azurophiles des neutrophiles humains libèrent leur contenu dans les phagosomes.

défensines et les cathélicidines (Yang, Chertov et al. 2001). Les cathélicidines pour lesquelles aucune action intracellulaire n'a été montrée, seront décrites plus loin dans le manuscrit.

Il existe trois types de défensines chez les vertébrés : les défensines α , les défensines β et les défensines θ (Ganz and Weiss 1997). Nous ne détaillerons pas les défensines θ dont le rôle n'est pas encore bien défini. Les défensines α , les défensines β sont des peptides cationiques en feuillet β qui possèdent six résidus de cystéines impliqués dans trois ponts disulfures. Les défensines présentent des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales. Les défensines α et les défensines β diffèrent par l'emplacement de leurs ponts di-sulfures et par la structure de leur précurseur. En effet, seul le précurseur des défensines α possède une prorégion anionique qui protège la cellule hôte des effets cytotoxiques du peptide (Valore, Martin et al. 1996). Bien que l'organisation génique ainsi que les structures primaire et secondaire des deux défensines diffèrent, une base ancestrale commune a été suggérée. En effet, une cartographie du génome montre que les gènes sont placés dans une même région du chromosome 8 (Liu, Zhao et al. 1997). Un autre argument est basé sur la détermination de la structure de la « big défensine » de limule (Saito, Kawabata et al. 1995). Ce peptide antimicrobien d'invertébré possède un emplacement des ponts di-sulfures identique à celui de la défensine β alors qu'il présente des homologies de séquence avec une défensine α de rat. La « big défensine » pourrait par conséquent être le peptide ancestral à partir duquel les deux familles de défensines ont évolué.

L'homme produit au total six défensines α différentes et deux défensines β (Ganz, Selsted et al. 1985). Quatre défensines α sont présentes dans les granules azurophiles des neutrophiles : HNP 1,2,3,4 (Human Neutrophil Peptide) et deux sont localisées dans les cellules de Paneth de l'intestin : HD 5,6 (Human Defensin). Enfin, les défensines β HBD-1 et 2 (Human Beta Defensin) interviennent principalement au niveau des tissus. Cette « classification » n'est

toutefois pas une règle chez tous les modèles animaux. Ainsi les neutrophiles de souris ayant essentiellement basé leur défense sur les mécanismes oxydatifs, sont dépourvus de défensine α et les neutrophiles bovins possèdent des défensines β . De façon générale, l'expression des gènes codant les défensines β est constitutive et/ou induite au niveau des épithélia, alors que l'expression des gènes codant les défensines α est uniquement réduite aux précurseurs de la lignée myéloïde (Ganz and Weiss 1997). La production de défensines α par les cellules myéloïdes humaines est considérable : 5-10 mg/kg de masse corporelle/jour (Schroder 1999). Les phénomènes de maturation post-traductionnelle et d'adressage des défensines α dans les granules de stockage ont été élucidés. Il apparaît que la prorégion du peptide est indispensable pour que le peptide soit adressé à son compartiment de stockage (Valore, Martin et al. 1996). Lorsqu'un neutrophile phagocyte une bactérie telle que *Salmonella typhimurium*, les granules azurophiles qui ont stocké les HNP fusionnent avec le phagosome et libèrent leur contenu (voir figure 4). Après fusion, on estime que les HNP représentent le composant majeur des phagolysosomes. Les défensines α présentent un spectre antimicrobien qui leur est propre. Elles ont des activités (i) antibactériennes contre les bactéries intracellulaires et extracellulaires, à Gram négatif et à Gram positif, (ii) contre les champignons tels que *Candida albicans* (Lehrer, Lichtenstein et al. 1993), (iii) antivirale avec notamment des effets sur la propagation des virus enveloppés dont font parti les virus de la famille des *Herpes* (Daher, Selsted et al. 1986) et (iv) antiparasitaire incluant des effets anti-*Giardia* et anti-*Treponema* (Aley, Zimmerman et al. 1994) (Borenstein, Selsted et al. 1991). Le mode d'action des défensines α implique séquentiellement, une interaction électrostatique avec la partie polaire des phospholipides membranaires puis une insertion dans la membrane de la cellule cible pour former des canaux voltage-dépendants sélectifs aux anions (Kagan, Ganz et al. 1994). Les défensines peuvent également être libérées dans le milieu extracellulaire lors de

la formation du phagolysosome ou par dégranulation des neutrophiles activés. Du fait de leur sensibilité à la salinité du milieu, les défensines perdent alors leur activité antimicrobienne. Divers travaux montrent cependant qu'elles ont su développer d'autres propriétés immunologiques telles que la chémotaxie, qui seront développées ultérieurement (voir page).

3/ Cas particulier des microorganismes à développement intracellulaire

Ce mécanisme n'a pour l'instant été mis en évidence que chez les vertébrés. Chez les Mammifères, la destruction des microrganismes qui ont su échapper aux processus de lyse intracellulaire met en jeu deux types de cellules cytotoxiques : les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques (LTC). La destruction de l'élément pathogène passe par la destruction de la cellule infectée (souvent un macrophage). Deux stratégies ont été mises en place : soit l'interaction cellule « malade »-cellule cytotoxique entraîne la mort programmée de la cellule infectée, soit les cellules cytotoxiques libèrent dans la cellule infectée des molécules microbicides telles que des peptides antimicrobiens. Les LTC humains produisent en effet un peptide antibactérien actif contre les bactéries à Gram positif et négatif, contre les champignons et les parasites : la granulysine (Stenger, Rosat et al. 1999). Ce peptide antibiotique en conjonction avec la perforine (voir figure 6), est capable de détruire les bactéries intracellulaires telles que *Mycobacterium tuberculosis*. Comme la lysine des cellules NK et l'amoebapore synthétisée par *Entamoeba histolytica*, la granulysine appartient à la famille des saposines qui sont de petites protéines associées aux lipides produites au niveau du système nerveux central (Krensky 2000). La présence de granulysine dans les cellules NK et d'un peptide apparenté dans les granules cytoplasmiques d'une amibe suggère que les protéines de la famille des saposines constituent une forme ancienne et très conservée de défense antimicrobienne.

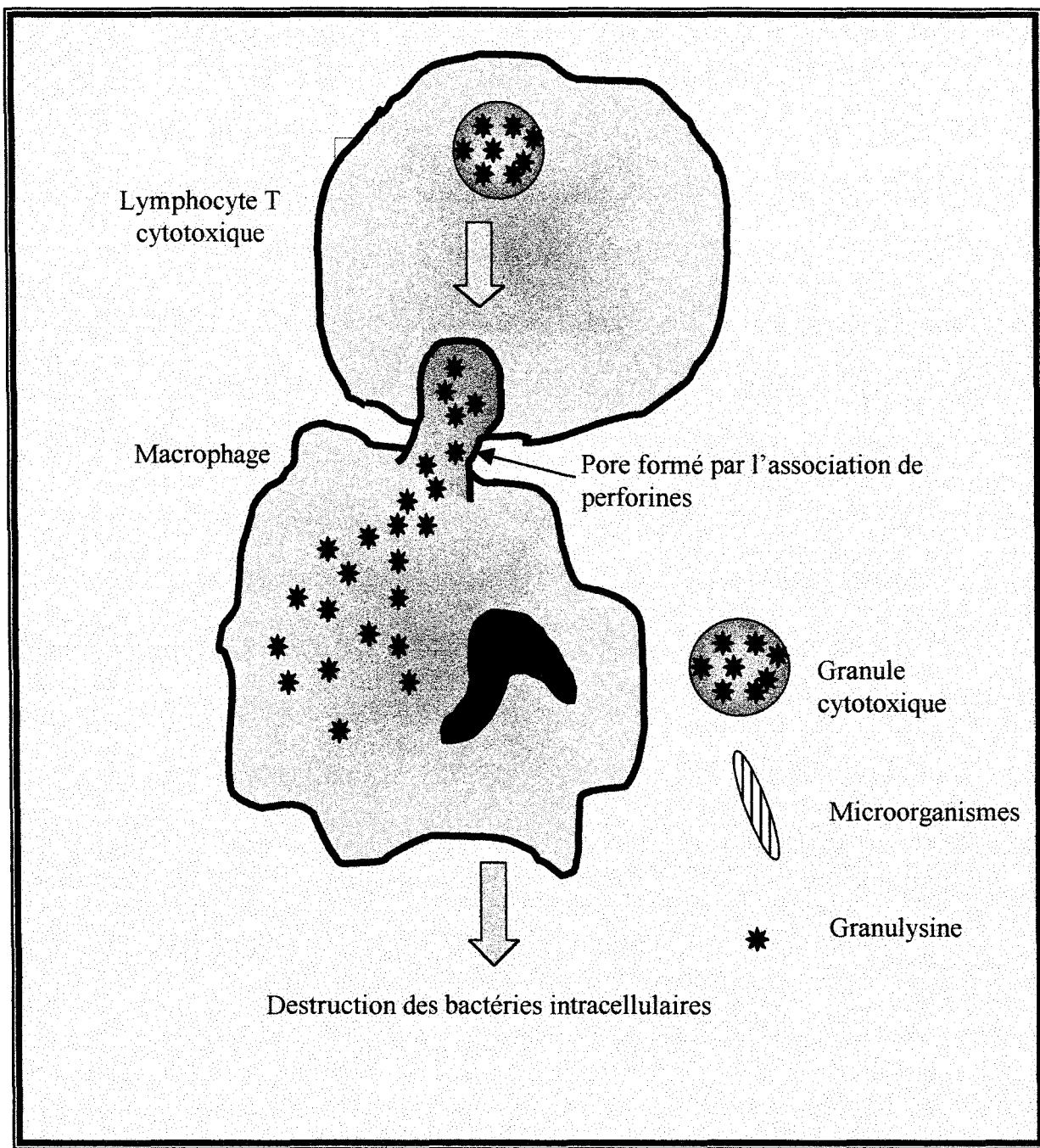


Figure 6: Après avoir reconnu un antigène bactérien présent à la surface des macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, les lymphocytes T cytoxiques accèdent au compartiment intracellulaire du macrophage en formant un pore constitué par l'association de perforines. Le contenu des granules cytotoxiques est alors déversé et les substances microbicides telles que la granulysine peuvent détruire les microorganismes intracellulaires (d'après S. Stenger et collaborateurs, « Granulysin : a lethal weapon of cytolytic T cells » Trends Immunology Today 1999)

C/ Immunité antimicrobienne extracellulaire

Nous avons vu précédemment que les cellules immunitaires peuvent migrer vers le site infectieux où elles participent à la destruction des éléments pathogènes en lysant les microorganismes internalisés. Cette migration s'opère vraisemblablement sous l'influence de facteurs chémoattractants. Les cellules recrutées peuvent également agir en déversant dans le milieu extracellulaire (tissulaire ou humoral) diverses substances microbicides. Ces substances comprennent entre autres des acteurs de cascades protéolytiques complexes et des peptides antimicrobiens inductibles ou non. Le rôle des anticorps ne sera pas évoqué ici dans la mesure où l'objectif est de montrer les similitudes entre la défense antimicrobienne des invertébrés et des vertébrés.

1/ Les cascades protéolytiques dans la défense antimicrobienne

Afin d'éviter la perte fatale de liquide biologique, les invertébrés Cœlomates et Accœlomates obturent très rapidement les blessures provoquées par un traumatisme. La blessure est refermée suite à la mise en place de différents mécanismes tels que la « gélification » du plasma (coagulation) et la mélanisation. Les processus de formation d'un gel de coagulation et de mélanisation mettent en oeuvre des cascades protéolytiques complexes activées au niveau du site qui peut être une lésion traumatique ou un foyer infectieux. Ces mécanismes mis en évidence chez de nombreux invertébrés (Annélides, Arthropodes, Echinodermes...), présentent des similitudes avec la réaction du complément des vertébrés.

a/ la coagulation et la mélanisation chez des invertébrés

La coagulation met en jeu l'agrégation au site de la blessure des cellules hémostatiques qui en libérant leur contenu participent à la formation d'un gel de coaguline. Ce gel d'une part obture la lésion et d'autre part limite, par piégeage, l'expansion des microorganismes dans les tissus. Ce processus a été particulièrement bien étudié chez la limule *Tachypleus tridentatus* (Iwanaga, Kawabata et al. 1998). Chez ce Chélicérate, la présence de microorganismes dans l'hémolymphé déclenche une exocytose massive du contenu des hémocytes qui sont accumulés au site d'infection. Cette dégranulation assure la libération des facteurs C et G qui reconnaissent respectivement les LPS et les glycanes (Iwanaga and Kawabata 1998). La fixation des éléments microbiens active les deux facteurs qui par leur domaine protéase à sérine vont enclencher la cascade protéolytique qui est schématisée dans la figure 7. Cette cascade conduit à la formation d'un gel de coaguline insoluble dont le but est de limiter l'infection. Le système est régulée par trois inhibiteurs de protéase de la famille des serpines présents à l'intérieur des gros granules hémocytaires : les LICI-1, 2, 3 (Limulus Intracellular Coagulation Inhibitor). LICI-1 inhibe spécifiquement le facteur C alors que LICI-2 et LICI-3 inhibent les facteurs C et G (Miura, Kawabata et al. 1995) (Agarwala, Kawabata et al. 1996).

La mélanisation repose sur l'activité protéase à sérine de la phénoloxydase (PO) (Soderhall and Cerenius 1998). La réaction, commune à de nombreux invertébrés, intervient non seulement dans la sclerotinisation de la cuticule mais également dans les mécanismes de défense face aux éléments pathogènes (Brey, Stoltz et al. 1991). Le processus de mélanisation a particulièrement été bien décortiqué chez les Crustacés et les Insectes (voir figure 7). Lors d'une blessure, l'enzyme inactive (stockée sous forme pro-PO) est sécrétée dans l'hémolymphé. Le clivage par une protéase à sérine active la PO dont l'action génère, par

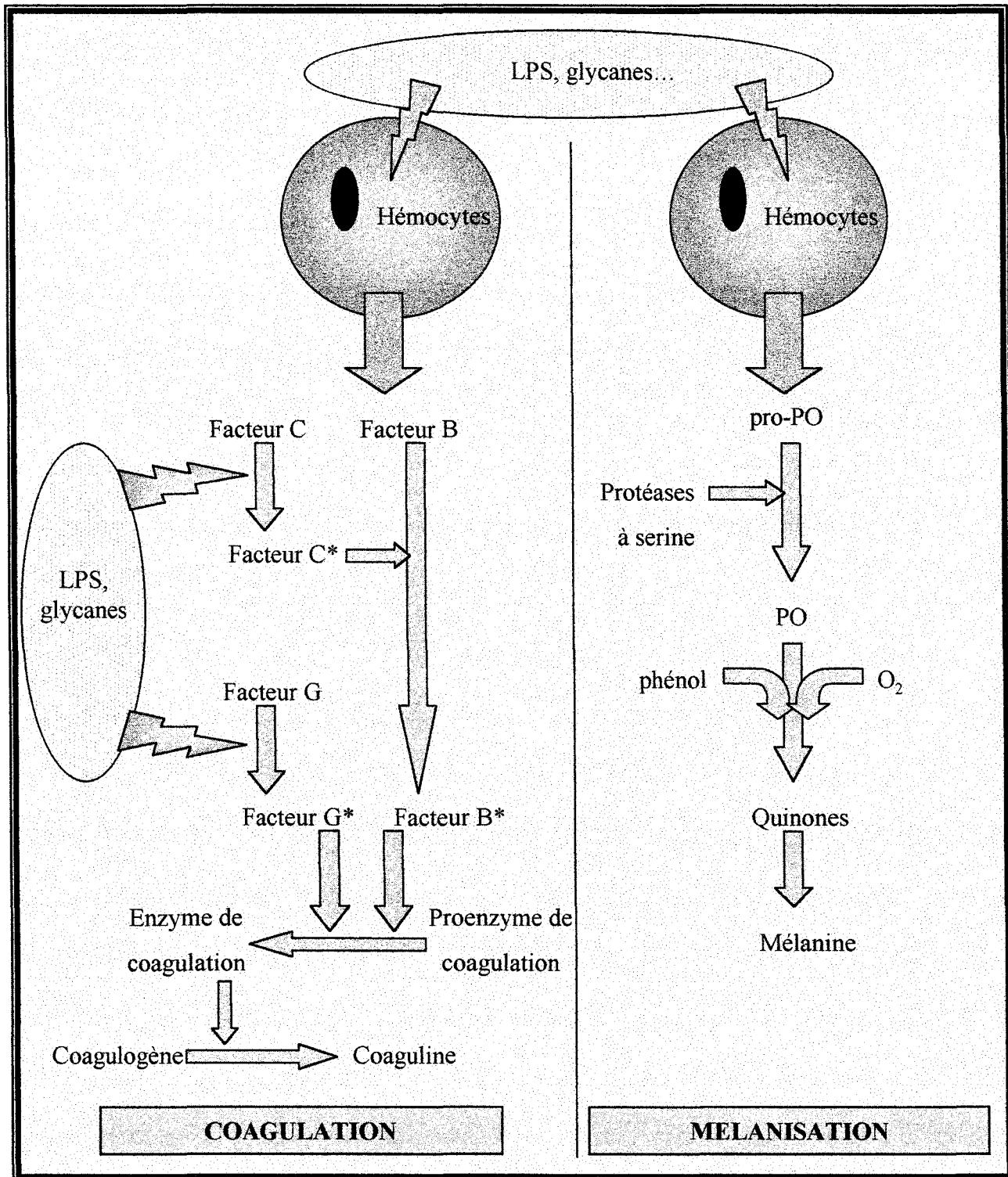


Figure 7 : Représentation des cascades protéolytiques de la coagulation chez la limule et de la mélanisation chez les Insectes et les Crustacés.

Après détection de motifs microbiens, les gros granules des hémocytes de Limule libèrent les facteurs B, C, G, l'enzyme de coagulation, le coagulogène... La réaction aboutit à la formation d'un gel de coaguline qui piège les microbes.

Les LPS et les glycanes entraînent l'exocytose de la prophénoloxydase contenue dans les hémocytes d'Insectes ou de Crustacés. Son activation mène à la formation de mélanine qui s'accumule autour des particules étrangères.

oxydations des radicaux phénols, la formation de quinones. Les quinones d'une part interviennent dans la sclerotinisation et le tannage de la cuticule et d'autre part servent à la synthèse de mélanine. La mélanine formée s'accumule autour de l'élément étranger encapsulé ou enfermé dans un nodule cellulaire (Gillespie, Kanost et al. 1997). La cascade engendre également des anions superoxydes qui comme la mélanine, sont des molécules toxiques pour les bactéries (Nappi, Vass et al. 1995). Afin d'éviter les effets délétères liés à une sur-production des composants actifs, le système est sous le contrôle d'inhibiteurs de protéases appartenant à la famille des serpines. Chez le criquet *Locusta migratoria*, deux inhibiteurs capables de bloquer l'activation de la prophénoloxydase ont été clonés : LICM I et LICM II (Kromer, Nakakura et al. 1994). Un inhibiteur qui présente des homologies avec les LICM a également été mis en évidence chez l'écrevisse : la pacifastine (Liang, Sottrup-Jensen et al. 1997).

b/ la réaction du complément des Mammifères.

L'activation du système du complément est un mécanisme puissant d'initiation et d'amplification de l'inflammation. Les produits issus de la cascade du complément participent entre autres au chimiotactisme des neutrophiles, à l'opsonisation des microorganismes, à l'activation des leucocytes, à la destruction des éléments pathogènes (en formant le complexe d'attaque membranaire), à la dégranulation des mastocytes... Ils interagissent également avec chacune des trois autres cascades enzymatiques que sont la coagulation, la fibrinolyse et la réaction de contact. La fonction de défense anti-infectieuse du complément est démontrée par la répétition des infections microbiennes qu'engendrent certains déficits : infections par les *Neisseria* dans les déficits en C5, C6, C7, C8 ou encore infections par les bactéries pyrogènes lors de déficit en C3, facteur H ou I.

Trois voies d'activation du complément ont été mises en évidence : une voie classique dépendante des anticorps et deux voies indépendantes des IgG et des IgM. Ces sont ces deux dernières voies qui sont directement activées lors d'une infection bactérienne (pour revue voir (Song, Sarrias et al. 2000)). Une de ses deux voies, dite « alterne », fait intervenir les facteurs B, D et la properdine. Elle est activée en présence d'endotoxines et d'IgA. L'autre voie, appelée « voie des lectines », met principalement en jeu une lectine sérique produite par le foie : la MBP. Les lectines ayant la faculté de se lier aux motifs carbohydrates, cette voie est activée par bon nombre de microorganismes (Kawasaki, Kawasaki et al. 1983) (Turner 1996). Après fixation aux sucres exposés à la surface des microbes, les Mannoses Binding Protein (MBP) s'associent aux MASP et les activent (Matsushita 1996) (Reid, Colomb et al. 1998). Les MASP activés clivent le C4 et le C2 ce qui déclenche l'activation de la voie classique du complément. Parallèlement, la MASP-1 active la voie alterne en clivant le C3. Dans tous les cas, l'activation des voies « classique », « alterne » et « des lectines » conduit à la formation d'une C3-convertase puis d'une C5-convertase. L'action de la C5-convertase sur la molécule C5 constitue la première étape de la formation du Complexe d'Attaque Membranaire (CAM). L'assemblage du CAM à la surface des bactéries ou des particules virales entraîne la lyse de ces microorganismes (Guthridge, Rakstang et al. 2001).

Les deux cascades protéolytiques que sont la coagulation et la mélanisation des invertébrés pourraient être à l'origine de cette réaction du complément des vertébrés. En effet, des molécules caractérisées chez des invertébrés présentent des homologies avec certains acteurs de la réaction du complément des Mammifères. Ainsi, chez la limule, la chaîne A du facteur C contient cinq domaines de type Epidermal Growth Factor (EGF), lesquels sont également présents dans les facteurs du complément des vertébrés mammaliens (Iwanaga and

Kawabata 1998). Par ailleurs, la prophénoloxydase d'insecte possède des homologies avec la région thiol-ester des protéines C3 et C4 du complément (Hall, Scott et al. 1995).

D'autres éléments tendent à montrer que la réaction du complément est évolutivement ancienne. En effet, un homologue du C3 et des MASP ont été caractérisés chez un Tunicier (Nonaka and Azumi 1999). Une molécule proche du C3 et une autre apparentée au facteur B ont également été mises en évidence chez un Echinoderme (Al-Sharif, Sunyer et al. 1998) (Smith, Shih et al. 1998). Plus récemment, une glycoprotéine présentant des homologies structurales et fonctionnelles avec les molécules de la famille du complément a été caractérisée chez un Insecte. Cette protéine appelée aTEP-1, possède des capacités opsonisantes et favoriserait l'internalisation des bactéries à Gram négatif par les hémocytes d'anophèle (Levashina, Moita et al. 2001).

2 / les peptides antimicrobiens dans l'immunité antimicrobienne extracellulaire

Depuis la découverte en 1980 du premier peptide antimicrobien isolé chez *Hyalophora cecropia*, environ cinq cents autres molécules antibiotiques ont été mises en évidence (<http://bbcm1.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>). Leur diversité a permis d'établir différentes classes de peptides: les molécules linéaires en hélice α , les molécules riches en résidus cystéines toujours impliqués dans des ponts di-sulfures, les molécules linéaires dépourvues de cystéines où un ou deux acides aminés sont sur-représentés et enfin les peptides anioniques. Précédemment, nous avons vu que les peptides antimicrobiens participaient activement en conjonction avec les mécanismes oxydatifs, à la lyse intracellulaire de microorganismes dans les phagocytes que ce soit chez les invertébrés ou chez les vertébrés. Ces peptides interviennent également dans la réponse anti-infectieuse extracellulaire qu'elle soit tissulaire ou humorale.

a/ les peptides antimicrobiens produits et libérés par les cellules circulantes

Pour beaucoup d'invertébrés, les cellules circulantes sont au cœur de la réponse anti-infectieuse. C'est notamment le cas de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Mitta, Vandenbulcke et al. 2000), de la crevette *Penaeus vannamei* (Destoumieux, Munoz et al. 2000) ou de la limule *Tachypleus tridentatus* (Iwanaga, Muta et al. 1994). Nous avons choisi de détailler le modèle Chélicérate pour lequel la participation des hémocytes dans la réponse anti-infectieuse a particulièrement bien été décrite.

Chez les vertébrés, l'immunité à médiation cellulaire est indispensable compte tenu de la complexité et de la taille des organismes. Nous verrons que les neutrophiles par leur grand nombre, leur capacité à migrer vers les sites infectés ainsi que leur capacité à stocker et à libérer dans leur environnement des molécules biologiquement actives, jouent un rôle important dans le processus de défense antimicrobienne.

- **exemple des hémocytes de limules**

Chez la limule la réponse anti-infectieuse s'appuie sur la capacité des hémocytes granuleux à libérer un certain nombre de substances stockées dans deux types de granules, des gros et des petits. Précédemment, nous avons vu que les LPS entraînaient l'exocytose du matériel contenu dans les gros granules. Ce matériel comprend entre autres les enzymes nécessaires à la formation du gel de coaguline qui a pour but de piéger les bactéries, mais aussi des peptides aux fonctions bactéricides tels que la « big defensin » et une protéase à activité antimicrobienne, le facteur D. Shigenaga et coll. ont montré que les LPS pouvaient également déclencher l'exocytose des petits granules (Shigenaga, Takayenoki et al. 1993). Ces petits granules sont majoritairement composés de deux peptides possédant des activités antibactériennes et antifongiques : la tachyplésine et la « big defensin ». La tachyplésine est originale de par son précurseur qui comprend une extension C-terminale anionique non

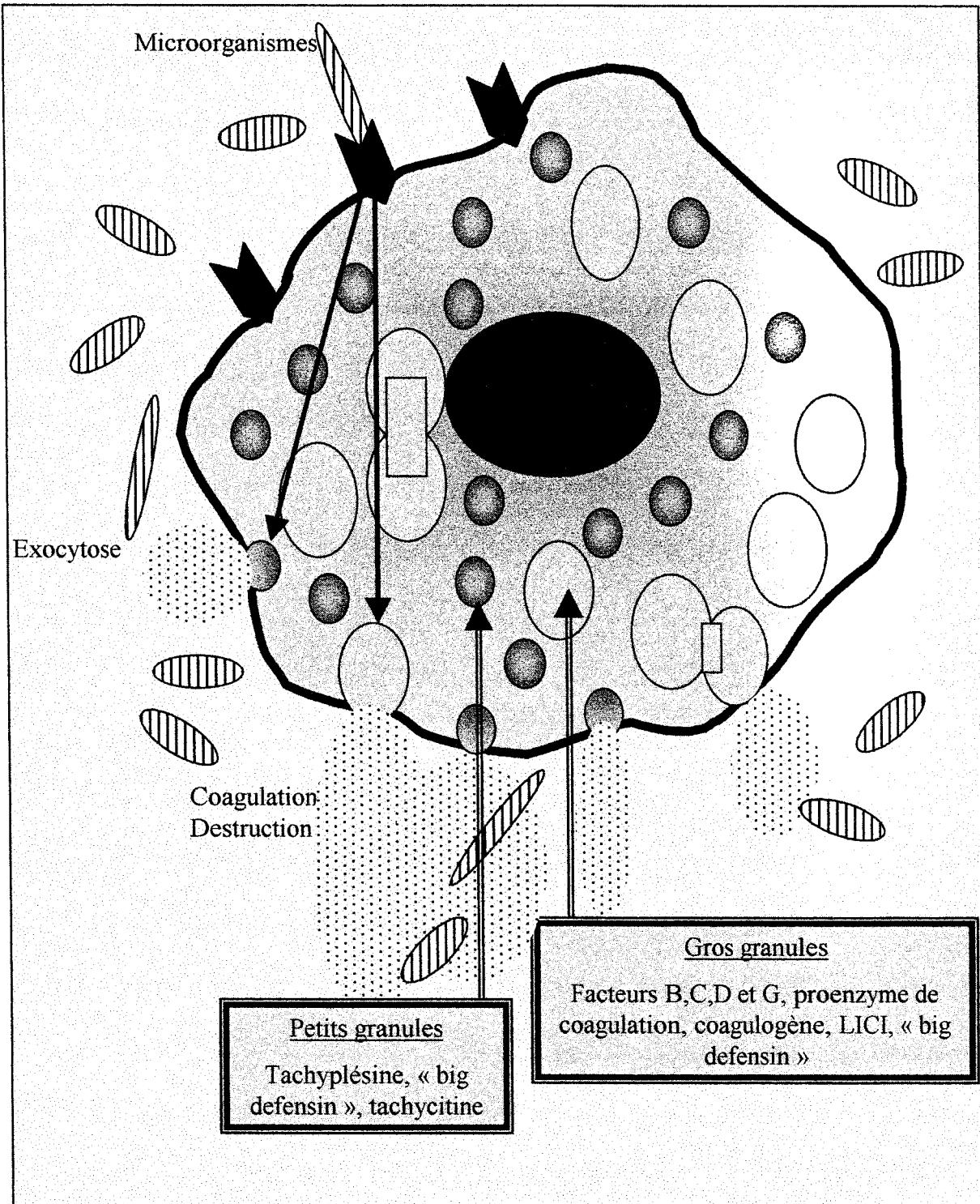


Figure 8 : La réponse anti-infectieuse chez la limule (d'après Muta et al., 1996). Après détection des LPS des bactéries à Gram négatif, les hémocytes recrutés sur le site d'infection, libèrent le contenu de leurs petits et gros granules. Les facteurs de coagulation sécrétés vont assurer la formation d'un gel de coaguline qui va piéger les microorganismes. Simultanément la libération des facteurs antimicrobiens va permettre la « stérilisation » du milieu.

conventionnelle. La fonction de cette portion n'a pas encore été élucidée, elle pourrait permettre l'adressage du peptide vers son lieu de stockage et/ou assurer un repliement du précurseur idéal à l'action des enzymes de maturation (Shigenaga, Muta et al. 1990). Un troisième peptide antibiotique a été mis en évidence dans les petits granules : la tachycitine (Kawabata, Nagayama et al. 1996). Cette molécule qui contient des domaines de liaison aux chitines, agirait de façon synergique avec la « big defensin » dans la lutte contre les microorganismes. L'ensemble des données obtenues chez la limule a permis d'avancer un modèle d'intervention des hémocytes dans la réponse anti-infectieuse (voir figure 8). Lors d'une infection, les hémocytes s'accumulent au foyer infectieux et libèrent le contenu de leurs granules. L'exocytose des gros granules conduit à la libération des constituants de la cascade de la coagulation et de peptides antimicrobiens assurant ainsi respectivement le piégeage et la destruction des microbes. Simultanément, les petits granules en déversant leur contenu riche en peptides antibiotiques renforcent cette action microbicide.

L'utilisation par les peptides antimicrobiens des cellules circulantes comme véhicules vers les sites d'infection a également été mise en évidence chez les vertébrés.

• exemple des neutrophiles mammaliens

Nous avons vu précédemment que les défensines participaient en conjonction avec les dérivés de l'oxygène, aux mécanismes de bactéricidie des neutrophiles. Lorsque ces cellules sont activées, les défensines peuvent également être libérées dans le milieu extracellulaire où la teneur en NaCl et en cations bivalents leur fait perdre leur activité antimicrobienne. Cette inhibition serait en fait un moyen pour l'organisme de protéger ses cellules des effets cytotoxiques de ces peptides. Récemment les travaux de Nagaoka ont cependant montré que les défensines seules n'exerçaient plus d'action antibiotique mais qu'en synergie avec les

cathélicidines, elles conservaient la faculté de perméabiliser les membranes bactériennes (Nagaoka, Hirota et al. 2000). D'autres rôles leur sont également attribués (pour revue voir (Hancock and Diamond 2000)). En effet, les défensines libérées dans le milieu extracellulaire (i) possèdent des propriétés chémo-attractantes vis à vis des lymphocytes T et des monocytes, (ii) favorisent la phagocytose en absence de facteurs opsonisant facilitant ainsi la clearance bactérienne, (iii) activent la réponse adaptative en augmentant la production d'IFN γ et d'IL-5 par les cellules T et (iv) limitent la diffusion de l'inflammation en inhibant la fibrinolyse.

Par conséquent, les neutrophiles qui participent essentiellement au processus de lyse intracellulaire des microorganismes peuvent également libérer des composants actifs dans le milieu extracellulaire. En général, les neutrophiles dégranulent lorsqu'ils sont à l'extérieur de la circulation sanguine. Cependant, des défensines α ont été mises en évidence dans le plasma de personnes souffrant de septicémie ou de méningite bactérienne (Panyutich, Panyutich et al. 1993). Les défensines libérées seraient le reflet du niveau d'activation des neutrophiles et donc du niveau d'inflammation. Les défensines plasmatiques ne sont pas libres, elles peuvent en effet être complexées à des serpines (Panyutich, Hiemstra et al. 1995), à l' α 2-macroglobuline (Panyutich and Ganz 1991) et au C1q du complément (Panyutich, Szold et al. 1994). Malgré leur stabilisation grâce à la formation de ces complexes, la concentration en défensines du plasma est relativement faible comparée à la quantité stockée dans les granules azurophiles et au nombre important de neutrophiles circulant. Ceci s'expliquerait par le fait que les défensines plasmatiques peuvent être liées aux lipoprotéines (Higazi, Lavi et al. 1997). Cette liaison faciliterait d'ailleurs la fixation des lipoprotéines aux cellules endothéliales. Le dépôt de défensines via les lipoprotéines au niveau des vaisseaux contribuerait au développement du processus d'athérosclérose (Higazi, Lavi et al. 1997).

D'autres peptides antimicrobiens également issus des neutrophiles sont libérés dans le milieu extracellulaire. C'est le cas notamment des molécules de la famille des cathélicidines (Yang, Chertov et al. 2001). Les cathélicidines présentent comme les défensines un large spectre d'activité : elles sont antibactériennes, antifongiques et antivirales (Zanetti, Gennaro et al. 2000). Les cathélicidines correspondent à la partie C-terminale active d'un précurseur qui comprend une région N-terminale d'environ cent acides aminés, nommée cathéline. Le domaine cathéline tire son nom d'un inhibiteur de cathepsine porcin avec lequel il partage de nombreuses homologies (Ritonja, Kopitar et al. 1989). Son rôle n'est pas encore bien défini : adressage, protection... Dans tous les cas, il constitue le seul point commun entre toutes les cathélicidines isolées que ce soit chez le lapin, le mouton, le bœuf ou l'homme. En effet, la partie possédant l'activité antimicrobienne diffère totalement en fonction des espèces. Par exemple, la LL-37 humaine présente une structure en hélice α (Frohm, Agerberth et al. 1997), les bacténécines bovines et le PR-39 porcin sont des peptides riches en arginine et en proline (Shi, Ross et al. 1996), l'indolicidine bovine est riche en tryptophane (Ladokhin, Selsted et al. 1997) et les protégrines porcines ont une structure en feuillet β (Aumelas, Mangoni et al. 1996). Comme pour les HNP, le gène codant la pro-cathélicidine humaine (LL-37) s'exprime précocement au cours du processus de maturation des cellules myéloïdes et ne s'exprime plus dans les neutrophiles matures (Sorensen, Arnljots et al. 1997). En revanche, le lieu de stockage est différent : les précurseurs de cathélicidines sont stockés dans des granules « spécifiques » des neutrophiles et non pas dans les granules azurophiles. Chez le bovin, les bacténécines sont colocalisées avec les défensines β dans ces granules spécifiques. La libération de la partie C-terminale active du précurseur des cathélicidines s'effectue via l'action d'une élastase présente dans les granules azurophiles (Zanetti, Gennaro et al. 2000) (Panyutich, Shi et al. 1997). Chez le bœuf et le porc, il a été montré qu'une stimulation des

neutrophiles par des bactéries entraînait une libération concomitante des granules spécifiques et azurophiles assurant la mise en présence de l'enzyme et du précurseur. Après maturation le peptide peut alors agir dans le milieu environnant la cellule (Zanetti, Gennaro et al. 2000). Comme les défensines, les cathélicidines possèdent des activités autres que les activités antimicrobiennes. Elles sont chémoattractantes pour les LT et elles neutralisent la réponse des macrophages aux LPS par leur capacité de liaison aux endotoxines (Yang, Chertov et al. 2001). Les cathélicidines font partie, avec le lysozyme, des rares molécules issues des neutrophiles présentes en quantités relativement élevées dans la circulation (Sorensen, Arnljots et al. 1997). Pour le lysozyme, cela s'explique par une faible rétention de la molécule tout au long de sa biosynthèse dans les cellules myéloïdes (Arnljots, Sorensen et al. 1998). Le cas de la cathélicidine humaine est différent car la molécule n'est pas libérée au cours de sa synthèse. En fait, la LL-37 plasmatique se complexe aux lipoprotéines AI ce qui empêche la clearance rénale du peptide antibiotique (Arnljots, Sorensen et al. 1998). Contrairement aux défensines, le complexe ne s'accumule pas au niveau des cellules endothéliales et demeure circulant. Les lipoprotéines serviraient en quelques sortes de réservoirs de cathélicidines.

a/ *Les peptides antimicrobiens produits et libérés par un tissu spécialisé*

Précédemment nous avons vu que les cellules circulantes constituaient une source « mobile » en peptides antimicrobiens chez les invertébrés et les vertébrés. Chez les Insectes, la production de molécules antibiotiques par les hémocytes reste cependant un phénomène mineur. En effet, chez les hexapodes, l'organe principal de production des peptides antimicrobiens est le corps gras, un analogue fonctionnel du foie des Mammifères.

Nous nous focaliserons, dans une première partie, sur les études réalisées chez la drosophile pour laquelle la connaissance du génome a permis d'avancer très loin dans la compréhension des mécanismes qui régulent l'expression des peptides antimicrobiens.

Dans une seconde partie, nous évoquerons le cas particulier des peptides antimicrobiens produits et libérés par des tissus endocrinien et neuroendocrinien chez les Mammifères.

- **exemple des peptides antimicrobiens synthétisés par le corps gras de la drosophile**

Chez les Insectes les plus « évolués » *i.e.* à métamorphose complète (Holométaboles), une infection expérimentale induit la synthèse d'une batterie de peptides antimicrobiens. Ces molécules antibiotiques produites par le corps gras, sont immédiatement sécrétées dans l'hémolymphé où elles participent en complément des phénomènes de coagulation et de mélénisation à la destruction des pathogènes (Meister, Lemaitre et al. 1997). Le modèle drosophile, de part la connaissance de son génome, est le modèle invertébré pour lequel les mécanismes et les voies de transduction sont les mieux décrits. Chez cette mouche, plus de sept peptides antimicrobiens ont été isolés et clonés (Bulet, Hetru et al. 1999). Cinq d'entre eux (diptéricine, cécropine, attacine, drosocine, défensine) possèdent des activités dirigées contre les bactéries. La drosomycine est active contre les champignons. Enfin, la metchnikowine possède une activité à la fois antibactérienne et antifongique. Leur mode d'action est mal connu mais on pense que ces petits peptides cationiques se fixent à la membrane des microorganismes et les tuent en les perméabilisant. La structure de ces molécules et de leur précurseur est très conservée. En effet, tous à l'exception de la drosocine et de la diptéricine sont issus de la maturation d'un précurseur composé d'un peptide signal suivi d'une prorégion anionique puis du peptide actif en C-terminal. Le précurseur de la

drosocine est dépourvu de prorégion anionique et comprend une extension C-terminale (Bulet, Dimarcq et al. 1993), celui de la diptéricine se distingue par l'absence de prorégion (Reichhart, Essrich et al. 1989). Deux hypothèses concernant le rôle de cette prorégion anionique ont été avancées : elle participerait aux mécanismes d'adressage cellulaire et/ou protégerait la cellule productrice des effets cytotoxiques de certains peptides. Cette dernière hypothèse a été vérifiée pour la mellitine, un peptide antimicrobien du venin d'abeille, dont l'activité lytique est inhibée par la prorégion du précurseur (Kreil, Mollay et al. 1980).

L'originalité de la réponse antimicrobienne de la drosophile repose sur la régulation transcriptionnelle des gènes qui codent pour ces peptides. L'injection de bactéries induit rapidement une très forte expression de ces gènes. L'expression débute moins de soixante minutes après l'infection, atteint son maximum après six à douze heures, puis décline lentement. La caractérisation des gènes a permis de mettre en évidence l'existence de motifs homologues aux séquences cis-régulatrices présentes dans les promoteurs des gènes induits au cours de la réponse immunitaire des mammifères. Il s'agit essentiellement d'éléments de réponse à l'IL-6 (IL-6 RE), à l'IFN et des motifs GATA et κB. Il s'est avéré que ces motifs κB étaient nécessaires à l'induction des gènes antibactériens après une blessure septique (Kadalayil, Petersen et al. 1997) (Engstrom, Kadalayil et al. 1993). Sur ces bases, l'utilisation de drosophiles mutantes a permis de « décortiquer » les mécanismes de transduction du signal à l'origine de l'induction des gènes (voir figure 9). Deux voies principales ont été mises en évidence: (i) la voie Toll qui contrôle l'expression des gènes codant la drosomycine, la cécropine et l'attacine et (ii) la voie Imd (Immune deficiency) qui est impliquée dans l'expression de la diptéricine, de la drosocine, de la cécropine et de l'attacine (Hoffmann, Kafatos et al. 1999). Une étude génétique a montré que les gènes codant pour ces peptides étaient différemment induits en fonction du microorganisme injecté. Ainsi, l'infestation des

drosophiles avec un champignon pathogène d'insectes (*Beauveria bassiana*) induit une augmentation de l'expression des gènes codant les deux peptides antifongiques, drosomycine et metchnikowine, alors que les gènes codant les peptides exclusivement antibactériens restent silencieux (Lemaitre, Reichhart et al. 1997). Inversement, l'infestation de drosophiles par une bactérie entomopathogène (*Erwinia carotovora*) induit préférentiellement une expression des gènes codant pour les peptides à activité antibactérienne (Basset, Khush et al. 2000). Cette spécificité donne un sens biologique à l'existence de ces diverses voies.

La voie Toll qualifiée de « voie antifongique », demeure à l'heure actuelle la mieux décryptée. A l'origine, cette voie était connue pour sa participation dans la mise en place de l'axe dorso-ventral au cours des phases précoces de l'embryogenèse de la drosophile (Belvin and Anderson 1996). La voie de signalisation menant à l'induction des gènes codant pour les peptides antibiotiques, débute dans le compartiment extracellulaire par l'activation de protéases à sérine qui provoque la maturation de Spätzle, le ligand présumé de Toll (pour revue voir (Imler and Hoffmann 2001)). En effet, aucune donnée biochimique ne prouve que Spätzle s'associe réellement au récepteur Toll. Deux mutations sont en faveur d'une activation de Toll par des protéases sécrétées et présentes dans l'hémolymph : les mutations *perséphone* et *semmelweiss*. Ces mutations qui affectent l'expression de gènes codant pour des protéases, ont pour effet d'inhiber respectivement l'activation de Toll par les champignons ou par les bactéries à Gram positif (Hoffmann 2001). Il existe par conséquent une spécificité dans la reconnaissance des pathogènes par les protéases produites par la drosophile. D'autres protéases pourraient participer à l'activation de la voie Toll : (i) les protéases impliquées dans les cascades protéolytiques (ii) des protéases d'origine exogène sécrétées par les microorganismes entomopathogènes afin par exemple de percer la cuticule de l'insecte comme c'est le cas pour *Beauveria bassiana* (Lemaitre, Reichhart et al. 1997).

Dans tous les cas, la fixation du ligand au récepteur Toll active une molécule adaptatrice, Tube et une kinase, Pelle. Pelle activée se dissocie de Toll puis active une autre kinase (encore indéterminée) qui va phosphoryler Cactus. Cette phosphorylation entraîne la dégradation de Cactus permettant ainsi la libération du facteur de transcription DIF. Après nucléarisation, DIF se fixe sur le promoteur et active les gènes codant la drosomycine, l'attacine et la cécropine. Cette voie de signalisation intracellulaire associé à Toll, présente de fortes similitudes avec la voie d'activation de NF-kB par l'IL-1 au cours de la réponse inflammatoire de phase aiguë des mammifères (voir figure 9). Le parallèle est particulièrement significatif si l'on considère que les domaines intracytoplasmiques de Toll et du récepteur à l'IL-1 ont des structures proches, que les kinases Pelle et IRAK présentent des homologies de séquence, que Cactus et I kB, d'une part et NFkB et DIF de l'autre, appartiennent à deux mêmes familles de protéines. Dans les deux cas, drosophile ou Mammifères, l'activation de la cascade conduit à la synthèse de molécules effectrices de l'immunité. Très récemment, plusieurs gènes codant pour des protéines homologues à Toll ont été caractérisés chez l'homme. Les hTLRs semblent tous jouer un rôle dans la réponse immunitaire (voir page). La voie Toll/ IL-1 R est donc une cascade évolutivement ancienne impliquée dans les mécanismes de défense des Insectes et des Mammifères. Cette voie est d'autant plus ancienne, qu'elle vient d'être mise en évidence chez un Nématode : *Caenorhabditis elegans* (Pujol, Link et al. 2001).

Le génome de *C.elegans* contient non seulement un gène codant pour un récepteur homologue au récepteur Toll-8 de la drosophile : *tol-1* mais aussi un gène codant pour un analogue de PELLE/IRAK (*pik-1*), un homologue de TRAF (*trf-1*) et un homologue de Cactus/I kB (*ikb-1*). En revanche, aucun homologue de Rel n'a été mis en évidence (Pujol, Link et al. 2001). Des mutations au niveau de ces différents gènes ont été réalisées et la

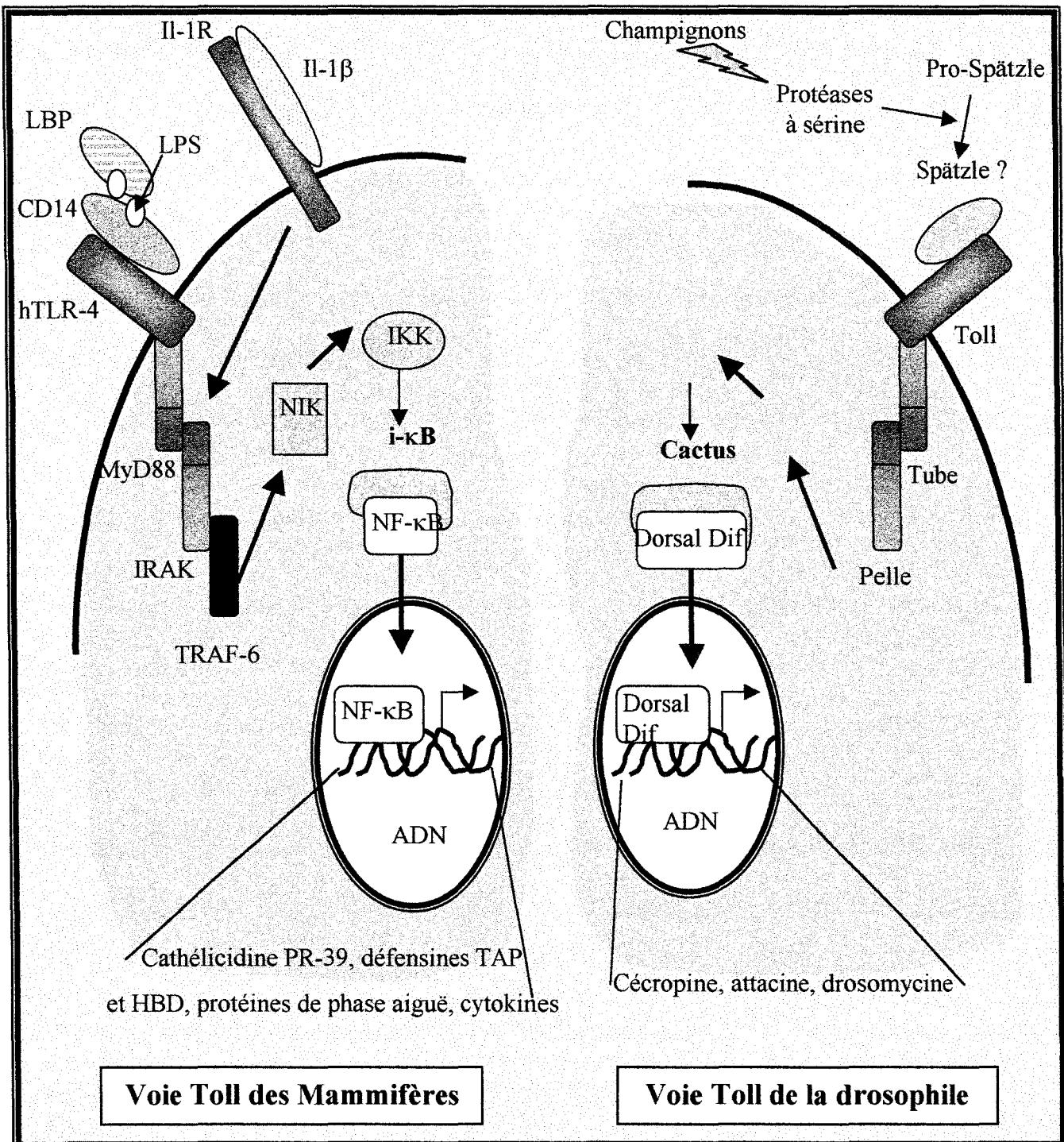


Figure 9: Conservation des voies de contrôle transcriptionnel des gènes de l'immunité innée chez les mammifères et chez la drosophile (d'après Boman et al 1998, Hoffmann et al 1999).

résistance de ces mutants à l'infection a été testée. Il est apparu qu'aucun de ces génés n'était nécessaire au mécanisme de résistance de ces Nématodes vis à vis de divers pathogènes. En fait, le produit du gène *tol-1* participerait au mécanisme de reconnaissance des microorganismes d'une manière inattendue. *C. elegans* serait en effet capable, *via* le produit du gène *tol-1*, de distinguer différents types de bactéries lors de la prise de nourriture. Cette reconnaissance lui permettrait d'éviter l'ingestion fatale de microorganismes tels que *Serratia marcescens*. Le produit du gène *tol-1* jouerait donc un rôle important dans un mécanisme de défense « comportementale » du Nématode. L'expression de ce gène au niveau du système nerveux de l'animal va d'ailleurs de pair avec ces observations.

La réponse antibactérienne de la drosophile est totalement indépendante de la voie Toll. Cependant, l'analyse du génome de ce diptère ayant révélé la présence de huit autres récepteurs de type Toll : Toll-2 (18-wheeler) et Toll-3-9 (Tauszig, Jouanguy et al. 2000), on ne peut pas exclure le fait que l'un ou même plusieurs d'entre eux puissent participer à la reconnaissance des LPS comme le fait le hTLR-4. Le récepteur 18-wheeler pourrait être un candidat puisque sa mutation entraîne une forte diminution de la synthèse de l'attacine lors d'une infection par *E. coli*. Ce récepteur n'est cependant pas l'unique intervenant puisque la mutation de son gène ne freine pas la synthèse d'un autre peptide antibactérien : la diptéricine (Williams, Rodriguez et al. 1997). En fait, la seule mutation connue pour affecter la production de peptides antimicrobiens est la mutation du gène *imd*. Récemment le produit de ce gène a été caractérisé chez la drosophile. La protéine *imd* présente des homologies avec RIP, une molécule intervenant dans la voie de signalisation associée au récepteur du Tumoral Necrosis Factor- α (TNF- α). D'autres similitudes laissent à penser que la voie de transduction menant à l'activation de la diptéricine chez la drosophile est comparable à la voie de signalisation du récepteur au TNF- α (voir figure 10) : les éléments du complexe IKK de la

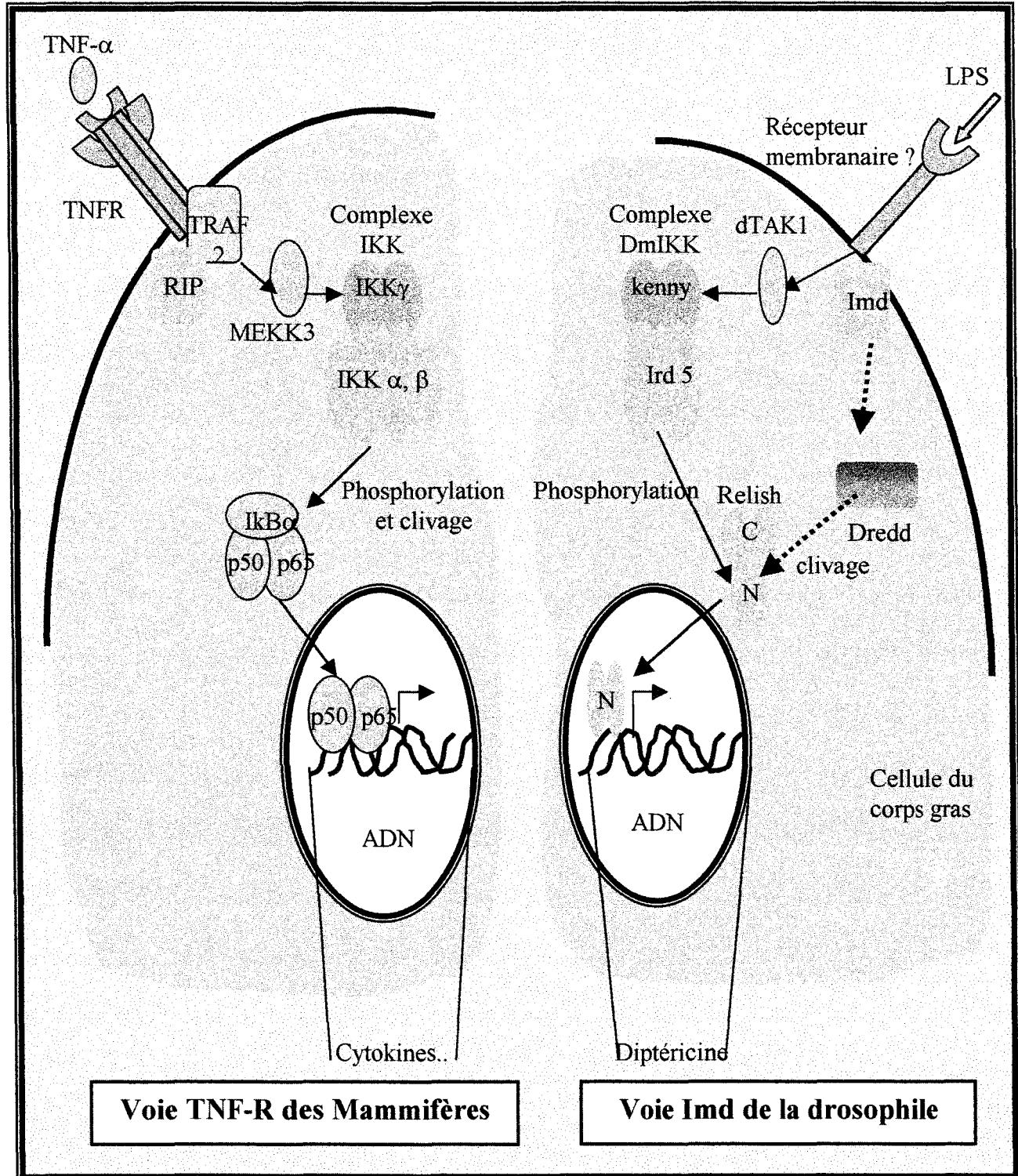


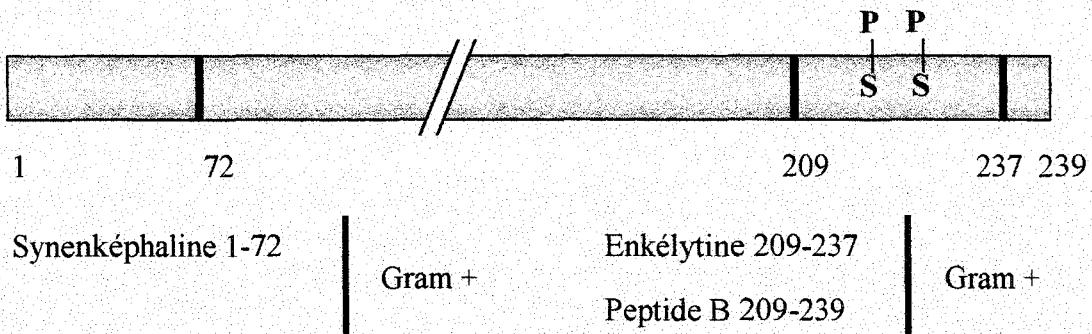
Figure 10: Conservation des éléments de la voie de signalisation associée au récepteur au TNF- α mammalien avec ceux de la voie Imd de la drosophile (d'après Silverman and Maniatis 2001, Imler and Hoffmann 2001).

drosophile sont homologues à ceux du complexe IKK mammaliens, les molécules Relish et p50 appartiennent à la même famille et la kinase TAK1 de drosophile est proche de la kinase MEKK de vertébrés (Silverman and Maniatis 2001). Le récepteur de même que son ligand, associés à cette voie de transduction chez la drosophile, sont pour l'instant inconnus. Certes, le génome de la drosophile encode une molécule analogue au TNF- α et une autre analogue à son récepteur, cependant aucun domaine intracytoplasmique homologue à ceux du TNF-R, n'apparaissent dans la séquence du récepteur de la drosophile (Aravind, Dixit et al. 2001). Le récepteur mis en jeu dans la voie Imd reste donc à déterminer tout comme le rôle dans l'immunité de la drosophile du récepteur homologue au TNF-R. Dans tous les cas, l'activation de la voie Imd par les LPS entraîne l'activation du complexe dIKK qui phosphoryle Relish. Parallèlement, la caspase Dredd qui pourrait être activée par la protéine Imd, assurerait le clivage de Relish phosphorylé. La partie N-terminale de Relish ainsi libérée après translocation nucléaire, activerait le prometteur codant le peptide antibactérien (Imler and Hoffmann 2001).

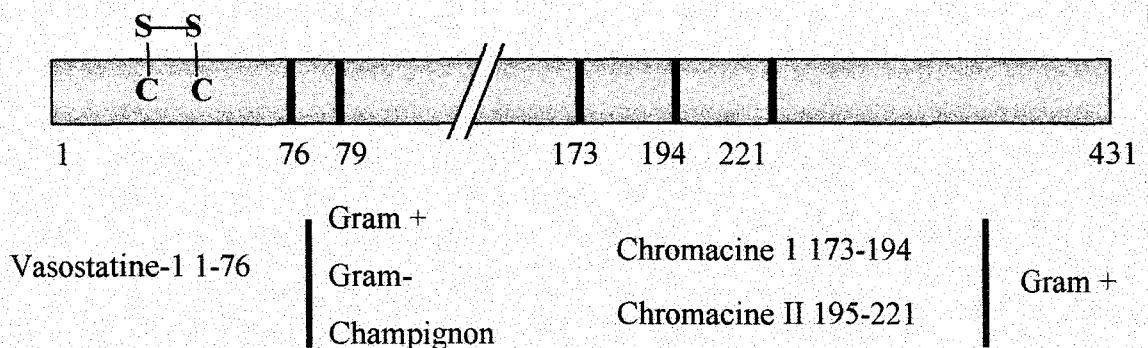
• Exemple des peptides antimicrobiens synthétisés par un tissu endocrinien chez les Mammifères

Chez les vertébrés, certains peptides antibiotiques peuvent également être produits et libérés par des tissus autres que les épithélia ou les muqueuses. Les peptides antibactériens dont il est question, sont originaux par le fait qu'ils proviennent de précurseurs de neuropeptides : la proenképhaline A (PEA), les chromogranines A (CGA) et B (CGB) (voir figure 11). A l'origine, ces précurseurs ont été mis en évidence dans des cellules endocrines, neuronales et neuroendocrines. Leur maturation a été particulièrement bien décrite dans les cellules chromaffines de la médullo-surrénale bovine (Metz-Boutigue, Goumon et al. 1998).

Proenképhaline A



Chromogranine A



Chromogranine B

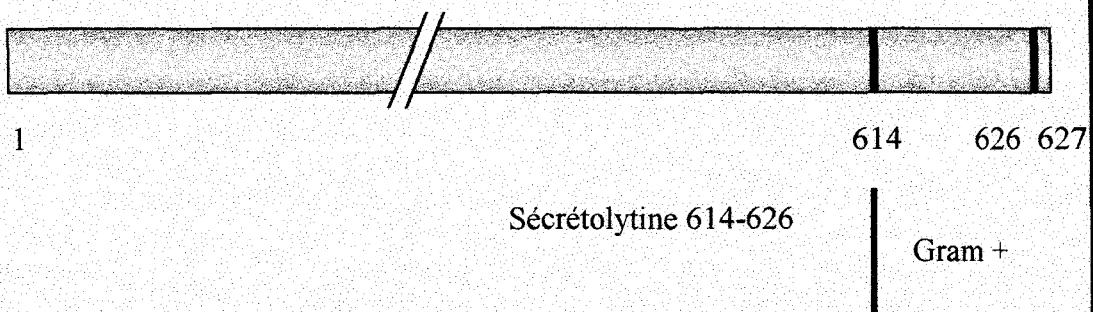


Figure 11: Peptides antimicrobiens dérivés de la proenképhaline A, et des chromogranines A et B isolés à partir des cellules chromaffines bovines (d'après D. Aunis et al 1998).

Le clivage des sites basiques assure la libération de molécules biologiquement actives ayant entre autres des fonctions chémoattractantes, vasodilatatrices et antimicrobiennes. Trois peptides antibiotiques ont été bien étudiés chez le bœuf : l'enkélytine (PEA 209-237) la vasostatine-1 (CGA 1-76) et la sécrétolytine portée par la chromogranine B (CGB) (pour revue voir (Metz-Boutigue, Lugardon et al. 2000)). En plus de cette origine endocrinienne, certaines de ces molécules seraient également produites par des cellules immunitaires. C'est le cas de l'enkélytine, de la vasostatin-1 et de la sécrétolytine qui ont été mises en évidence dans le surnageant de culture de neutrophiles stimulés (Lugardon, Raffner et al. 2000). *In vivo*, l'enkélytine a également été isolée à partir de fluides infectieux d'abcès bovins, montrant que cette molécule participe aux mécanismes de défense des vertébrés (Goumon, Lugardon et al. 1998). L'enkélytine possède une activité exclusivement dirigée contre les bactéries à Gram positif incluant *Staphylococcus aureus*. La vasostatine-1, quant à elle possède un spectre d'activité plus large puisqu'elle est antifongique et antibactérienne (Gram négatif et positif) (Lugardon, Raffner et al. 2000). L'étude des modifications post-traductionnelles de l'enkélytine a révélé que la bi-phosphorylation était indispensable à l'activité. Contrairement aux peptides antibiotiques évoqués jusqu'à présent, l'enkélytine présente une charge globale négative (Kieffer, Dillmann et al. 1998). Son mode de destruction des bactéries est par conséquent différent de celui des peptides antimicrobiens cationiques. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer son mode d'action (i) capture des ions divalent ou trivalent nécessaires à la croissance bactérienne, (ii) formation de pores ou mécanisme « carpet-like » via l'interaction des résidus basiques (iii) interaction des résidus hydrophobes avec les glycolipides de la membrane bactérienne. La présence de molécules effectrices de l'immunité au sein de précurseur de neuropeptides va de paire avec le concept de Neuroimmunité c'est-à-

dire l'existence d'un échange bidirectionnel d'informations entre les systèmes nerveux et immunitaire.

D/ Immunité antimicrobienne des épithélia et des muqueuses

Les microorganismes pathogènes interagissent avec les surfaces épithéliales où ils peuvent adhérer, et s'ils survivent peuvent se multiplier et infecter les tissus plus profonds. Pour contrer efficacement ce problème, les invertébrés et les vertébrés ont développé différents mécanismes d'exclusion physique et chimique tels que la production de peptides antimicrobiens.

1/ Immunité antimicrobienne des épithélia chez les invertébrés

Chez *Mytilus galloprovincialis*, trois familles de peptides antimicrobiens produits principalement par les hémocytes, ont été caractérisés : les défensines, les mytilines et les myticines (Mitta, Vandenbulcke et al. 2000). Chaque famille comporte différents isoformes. Les spectres d'activité propres à chacune de ces molécules et à leurs différents isoformes, donnent un sens à cette grande diversité de peptides antibiotiques. De cette manière, l'animal peut en effet faire face à une plus grande variété de microorganismes. Par ailleurs, l'étude de la répartition spatiale de ces peptides antimicrobiens a révélé une distribution différentielle dans les tissus de l'animal. Par exemple, alors que les hémocytes infiltrés au niveau des branchies expriment la myticine B et la mytiline B, aucune cellule n'exprime la défensine MGD-1. A l'inverse, au niveau de l'épithélium intestinal, les cellules infiltrées expriment la défensine MGD-1 mais peu la myticine B et pas la mytiline B (Mitta, Vandenbulcke et al. 2000). Les études menées chez ce modèle, ont également révélé la présence de mytiline B dans des cellules autres que les hémocytes infiltrés puisque le messager et le peptide ont été

détectés dans les entérocytes de l'intestin de moule. Cette expression qui semble tissu-spécifique pourrait assurer une optimisation de la défense anti-infectieuse chez ces animaux

Chez les Insectes, même si le corps gras apparaît comme le site principal d'expression des peptides antimicrobiens, l'utilisation de constructions génétiques a permis la mise en évidence d'une expression au niveau des épithelia en relation avec le milieu extérieur (Ferrandon, Jung et al. 1998). Ainsi la drosomycine s'exprime dans la trachée, les glandes salivaires de l'adulte, dans les appareils reproducteurs mâle et femelle. Dans la majeure partie des cas, le gène est inductible, excepté dans la glande de stockage des gamètes femelles où l'expression semble constitutive. La voie de signalisation conduisant à l'expression de ce peptide dans les cellules épithéliales est différente de celle qui règle l'expression du même peptide dans le corps gras. Chez la drosophile, aucune expression de la drosomycine n'a été détectée dans l'intestin. Chez d'autres insectes tels que *Stomoxys calcitrans* (Lehane, Wu et al. 1997) ou *Anopheles gambiae* l'expression de défensine a été mise en évidence dans des cellules intestinales (Dimopoulos, Richman et al. 1997). Chez l'anophèle, le peptide est induit dans les cellules intestinales suite à une ingestion de *Plasmodium berghei* (Richman, Dimopoulos et al. 1997).

Les réponses locales jouent probablement un rôle dans la lutte contre les infections dans ces tissus. En éliminant l'agent pathogène sur le site d'infection, elle permet d'éviter la mise en route de mécanismes systémiques plus coûteux en énergie. Cette réponse locale est à mettre en relation avec la réponse antimicrobienne développée au sein des épithelia mammaliens.

2/ Immunité antimicrobienne des épithélia et des muqueuses chez les vertébrés

La production de peptides antibiotiques au niveau de la peau a particulièrement bien été étudiée chez les Amphibiens (Bevins and Zasloff 1990). Chez ces animaux, les glandes dermiques produisent une extraordinaire variété de molécules apparentées aux hormones et aux neuropeptides mammaliens : angiotensine, dermorphines, deltorphines, peptides opioïdes, bombisine, bradykinine... Ces glandes synthétisent également des peptides antibiotiques impliqués dans la défense de la peau nue des Amphibiens contre les invasions microbiennes. Chez les Amphibiens Anoures, trois groupes de peptides antimicrobiens ont été définis.

- (i) des molécules contenant à leur extrémité C-terminale, deux résidus de cystéines impliquées dans un pont disulfure. Les représentants sont les brévinines et les esculentines (Goraya, Wang et al. 2000).
- (ii) des peptides de très petite taille (dix à treize acides-aminés), les temporines isolés chez *Rana temporaria* (Mangoni, Rinaldi et al. 2000).
- (iii) des peptides linéaires avec une structure en hélice α amphipatique, tels que les magainines (*Xenopus laevis*), les dermaseptines (*Phyllomedusa sauvagei* et *bicolor*) et les bombinines (*Bombina variegata*) (Amiche, Seon et al. 1999) (Mangoni, Grovale et al. 2000). Ces peptides sont actifs contre des bactéries, des champignons, des levures et des protozoaires mais ne sont pas cytotoxiques vis à vis des cellules humaines. La magainine découverte il y a dix ans par Zasloff, exerce son action antimicrobienne en formant des pores dans la membrane des microorganismes (Zasloff 2000). Récemment, une molécule dérivée de ce peptide antimicrobien a été testée sur les lésions ulcérvatives des pieds de patients diabétiques. Les résultats concluant de ces essais cliniques, prouvent que les peptides antibiotiques naturellement produits par les animaux pourraient constituer les nouveaux antibiotiques de demain (<http://wwwpslgroup.com/dg/2168e.htm>).

Tous ces peptides proviennent de la maturation d'un précurseur appartenant à la famille des préprodermaseptines. Ces précurseurs se caractérisent par une extrémité N-terminale très conservée suivie d'une partie C-terminale variable qui contient les peptides antimicrobiens (Charpentier, Amiche et al. 1998). L'extrémité N-terminale (peptide signal et région pro) présente des homologies de séquence avec des précurseurs d'opioïdes de grenouilles : les préprodermorphines et les préprodeltorphines suggérant une origine commune des gènes codant ces précurseurs avec les gènes codant les préprodermaseptines.

Chez les Mammifères, les peptides antimicrobiens présents au niveau des épithélia et des muqueuses proviennent soit de la dégranulation des cellules immunitaires circulantes (neutrophiles, plaquettes...) soit de la synthèse *in situ* par des cellules résidantes. Ainsi les neutrophiles libèrent des défensines α au niveau des poumons humains et les granulocytes porcins des cathélicidines (PR-39) au niveau de la peau. La synthèse *in situ* inclut une expression constitutive comme c'est le cas pour les défensines α des cellules de Paneth de l'intestin moyen ou une expression induite comme c'est le cas pour les défensines β de la peau humaine et du tractus respiratoire bovin. Chez l'homme, la cathélicidine LL-37 et les membres de la famille des défensines ont été mis en évidence dans presque tous les tissus en contact avec le milieu extérieur. Le rôle des défensines dans l'immunité des muqueuses et des épithélia a particulièrement bien été décrite.

Deux types de défensines sont produites par les cellules épithéliales : les défensines α (HD-5 et HD-6) synthétisées principalement par les cellules de Paneth et les défensines β (HBD-1 et HBD-2) présentes au niveau des tractus génital et respiratoire et au niveau de la peau et des reins.

Les cellules de Paneth sont des granulocytes situés à la base des cryptes de Lieberkühn de l'intestin (Darmoul and Ouellette 1996). Que ce soit chez l'homme ou la souris, les granules

de ces cellules sont riches en défensines α (appelées cryptdines dans le cas des souris). L'acquisition de l'activité antimicrobienne des défensines α requiert la maturation du précurseur. Chez l'homme, les HDs seraient stockées sous forme propeptides dans les cellules de Paneth et le clivage assurant la libération du peptide actif s'effectuerait pendant ou après la sécrétion par exocytose (Bevins, Martin-Porter et al. 1999). Chez la souris, le processus est différent car la maturation s'effectue dans les cellules de Paneth grâce à l'action d'une métalloprotéase, la matrilysine (MMP-7) (Wilson, Heppner et al. 1995). L'activité de cette enzyme paraît essentielle car les souris dont le gène codant la MMP-7 est inactivé, sont dix fois plus sensibles que les souris normales à une infection par une souche virulente de *Salmonella typhimurium* (Wilson, Ouellette et al. 1999). Les cryptdines jouent par conséquent un rôle important dans la défense antimicrobienne mise en jeu au niveau de l'intestin. Un autre rôle leur a récemment été attribué puisqu'elles participeraient aux mécanismes d'échanges ioniques en perméabilisant sélectivement la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin (Lencer, Cheung et al. 1997).

Chez l'homme, les défensines β ne participent pas à la défense de la muqueuse intestinale par contre elles interviennent au niveau de nombreux autres épithelia. Ainsi HBD-1 paraît être une composante importante au maintien d'un tractus respiratoire stérile. Un défaut dans sa production et/ou dans son mode d'action entraînerait des infections pulmonaires chroniques telles que celles rencontrées chez les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces malades, les canaux sélectifs aux ions chlorures sont défaillants ce qui se traduit par une teneur anormalement élevée en chlorure de sodium au niveau de l'épithélium pulmonaire (Smith, Travis et al. 1996). Cette concentration ionique élevée inhibe les défensines qui sont sensibles aux sels et de ce fait lève la barrière de protection anti-infectieuse formée par ces peptides. La présence de transcrits d'HBD-2 au niveau des poumons et de la trachée ajoutée à la capacité

poumons et de la trachée ajoutée à la capacité de cette molécule à tuer *Pseudomonas aeruginosa* suggèrent qu' HBD-2 joue également un rôle important dans la protection de l'épithélium des voies respiratoires. Comme pour HBD-1, un disfonctionnement dans la production ou l'activité de ce peptide pourrait contribuer au développement d'infections pulmonaires chroniques (Pier, Grout et al. 1996). A l'origine, HBD-2 a été isolée à partir de lésions occasionnées par le psoriasis (Harder, Bartels et al. 1997). Bien que le psoriasis ne soit pas une maladie d'origine bactérienne, la concentration en HBD-2 est très importante au niveau des lésions. En fait, l'expression du gène codant HBD-2 dans les kératinocytes est induite par des facteurs inflammatoires tels que le TNF α . Les bactéries à Gram positif et les champignons tués induisent également l'expression du gène HBD-2. Par conséquent, la voie de transduction doit être différente de la voie LPS/CD14/TLR impliquée dans l'activation des gènes des peptides antimicrobiens de la drosophile et de la β défensine bovine trachéale.

En conclusion, les récents progrès dans le domaine de l'immunité innée montrent que les animaux, en dépit de l'énorme diversité des espèces, utilisent très souvent les mêmes principes de base dans les mécanismes de défense antimicrobienne. Les vertébrés et les invertébrés ont des plans d'organisation différents car adaptés aux besoins essentiels de chacun et pourtant des similitudes existent dans la stratégie de lutte contre les microorganismes que ce soit dans la destruction intracellulaire des pathogènes ou encore dans la mise en place des cascades protéolytiques. Les similitudes les plus frappantes concernent l'implication des peptides antimicrobiens dans les mécanismes de défense des vertébrés et des invertébrés. Par exemple, chez la moule *Mytilus galloprovincialis* l'implication de la mytiline

B dans le processus de lyse intracellulaire des particules phagocytées est identique à ce qui est décrit pour les défensines des neutrophiles humains. De la même façon, les peptides antimicrobiens de vertébrés et d'invertébrés peuvent être stockés puis libérés par les cellules circulantes directement sur le site infectieux comme, c'est le cas notamment des cathélicidines véhiculées par les neutrophiles ou des peptides antimicrobiens des hémocytes de limule. Enfin, l'expression de certains gènes codant des molécules antibiotiques est induite selon une voie de transduction identique chez les vertébrés et les invertébrés. Ainsi, l'expression des gènes codant la cécropine de drosophile et ceux codant la défensine trachéale bovine répondent à une voie de signalisation quasi-identique sous le contrôle d'un récepteur de la famille Toll. Toutes ces similitudes fonctionnelles montrent clairement que l'étude d'organismes qualifiés de « primitifs » constitue une source d'informations à ne pas négliger car favorables à une meilleure compréhension de certains mécanismes immunitaires innés mammaliens.

CHAPITRE I

Implication des peptides dérivés de la proenképhaline A dans l'immunité anti-infectieuse chez la sangsue

Cet article publié dans « Molecular Brain Research » (Mol. Brain. Res. 76 (2000) 237-252) met en évidence le rôle des peptides dérivés de la PEA dans les mécanismes de défense anti-infectieux chez deux invertébrés : la sangsue *Theromyzon tessulatum* et la moule *Mytilus edulis*. L'étude menée chez le Mollusque bivalve est le fruit d'une collaboration avec l'équipe du Professeur G.B. Stefano.

Alors que les PEA de sangsue et de moule présentent de faibles homologies avec les PEA de vertébrés, les séquences correspondant aux peptides biologiquement actifs sont très conservées (Salzet and Stefano 1997). En effet, les enképhalines : méthionine-enképhaline (met-enk) et leucine-enképhaline (leu-enk) sont à cent pourcent homologues aux molécules de vertébrés. Une forte homologie de la partie C-terminale des précurseurs est également observée. En 1998, Metz-Boutigue et coll. ont montré que cette extrémité portait deux peptides antimicrobiens : le peptide B et l'enkebytine qui correspond à la séquence du peptide B réduite des deux acides aminés C-terminaux (Goumon, Lugardon et al. 1998). L'extrême conservation de cette portion du précurseur nous a conduit à rechercher la présence de ces peptides antibiotiques chez deux modèles invertébrés. Par le biais de diverses techniques biochimiques, nous avons confirmé cette présomption. En effet, que ce soit chez la sangsue ou chez la moule, un peptide présentant de fortes homologies avec le peptide B bovin a été mis en évidence. Le peptide B d'invertébrés possède la même activité antibactérienne que la molécule bovine. Il est libéré rapidement dans le liquide biologique de ces animaux suite à une injection de LPS (de manière dose-dépendante) ou suite à une blessure occasionnée à l'animal. L'équipe du Professeur G.B Stefano a montré chez la moule soumise à une infection

expérimentale que la libération de peptide B s'accompagnait d'une libération de met-enk. Le peptide opioïde met-enk ainsi libéré pourrait constituer un signal chémoattractant responsable du recrutement des cellules circulantes au niveau du site infectieux. La présence de sites de liaison delta-2 à la surface des hémocytes abonde d'ailleurs dans ce sens (Salzet and Stefano 1997). La PEA aurait donc un double rôle dans l'immunité antibactérienne puisque certains de ses produits de maturation exercent une action antimicrobienne et d'autres possèdent des capacités chémoattractantes vis-à-vis des cellules circulantes. Par ailleurs, l'analyse de la séquence du peptide B a révélé l'existence d'une séquence correspondant à l'heptapeptide met-enk arg phe (met-enk RF), au sein du peptide antibiotique. Sachant que les enképhalines sont les substrats de métallo-protéases telles que l'endopeptidase neutre (NEP) et l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ACE), nous avons émis l'hypothèse que ces enzymes pouvaient participer à la dégradation du peptide B (Laurent and Salzet 1996; Laurent, Stefano et al. 1997). Chez la sangsue et la moule, l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes a montré qu'effectivement des métallo-protéases sensibles aux inhibiteurs de la NEP et de l'ACE pouvaient dégrader le peptide *in vivo*. Chez *Mytilus edulis*, une étude menée *in vitro* a révélé que l'action de ces enzymes sur le peptide B générait de la met-enk RF qui comme la met-enk possède la faculté d'activer et de recruter les hémocytes.

Cette étude met en évidence pour la première fois chez des invertébrés, l'existence et la libération dans le milieu extracellulaire d'un peptide antimicrobien porté par un précurseur de neuropeptides. Les résultats obtenus ont servi de support à une approche menée chez l'homme opéré à cœur ouvert qui fait l'objet du deuxième chapitre. Par ailleurs, lors de la purification biochimique du peptide B, d'autres peptides antimicrobiens ont été isolés. L'étude poussée de l'un d'entre eux est exposée dans le troisième chapitre.

Proenkephalin A Derived Peptides in Invertebrate Innate Immune Processes

Aurélie Tasiemski ^a, Martine Verger-Bocquet ^a, Mario Cadet ^b, Yannick Goumon ^c, Marie-Hélène Metz-Boutigue ^c, Dominique Aunis ^c, George B. Stefano ^{a,b} and Michel Salzet ^{a,b*}

a : Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, UPRES-A CNRS 8017, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

b : Multidisciplinary Center for the study of Aging, Neuroscience Research Institute, State University of New York, College at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568-0210, USA

c: : INSERM U 338 de Biologie de la Communication Cellulaire, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cédex, France

Correspondence : Pr. M. Salzet, Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, UPRES-A CNRS 8017, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: (33) 3 2043-4054, Fax : (33) 3 2004-1130, e-mail address : salzet@pop.univ-lille1.fr

The abbreviations used are: ACE: angiotensin converting enzyme, DIA: Dot Immunobinding Assay, ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assays, HPGPC: High Performance Gel Permeation Chromatography, HPLC: High Performance Liquid Chromatography, LE: Leucine-enkephalin, LPS: Lipopolysaccharides, PEA: proenkephalin A, ME: Methionine-enkephalin, MERGL: Methionine-enkephalin arginine glycine leucine, MERF: Methionine-enkephalin arginine phenylalanine, NEP: Neutral Endopeptidase, MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight.

ABSTRACT

Lipopolsaccharides (LPS) injection into the coelomic fluid of the leech *Theromyzon tessulatum* stimulates release of proenkephalin A (PEA) derived peptides as determined by immunoprecipitation and western blot analyses. This release occurs in the first fifteen minutes after LPS exposure and yields a 5.3 kDa peptide fragment corresponding to the C-terminal part of the precursor. This fragment is then cleaved to free an antibacterial peptide related to mammals arginine phenylalanine extended enkelytin : the peptide B. These PEA processing peptides were characterized using a combination of techniques including reversed-phase HPLC and mass spectrometry. The isolated invertebrate peptide B presents a high sequence homology with the bovine's one and the same activity against Gram + bacteria. Titrations revealed the simultaneous appearance of Methionine-enkephalin (ME) and peptide B in invertebrates after stimulation by LPS (in a dose dependent manner), surgical trauma or electrical stimulations to neural tissues of the mussel. Furthermore, peptide B processing *in vitro* yields Methionine-enkephalin arginine phenylalanine (MERF), which exhibits *via* the delta receptors, immunocyte excitatory properties *i.e* movement and conformational changes but no antibacterial activity. We surmise that this unified response to the various stimuli is a survival strategy for organism by providing immediate antibacterial activity and immunocyte stimulation, thereby reducing any immune latency period needed for an adequate immune response.

Key Words: antibacterial peptide, opioids, innate immunity, neuroimmunity.

1. INTRODUCTION

Regardless of whether an organism is an invertebrate or a vertebrate, bacteria have always represented a threat to their health. The more simple invertebrates like the more complex vertebrates have developed an immune system to meet this challenge. In this regard, naturally occurring antibacterial peptides have been found in both vertebrates and invertebrates reflecting a common immune response (2,3,6,20).

In the present study, we demonstrate for the first time in invertebrates the presence of an antibacterial peptide at the C-terminal part of neuropeptide opioid precursor *i.e.* the proenkephalin (PEA). Leech and mussel PEA have already been characterized : they contain Methionine-enkephalin Arg Gly Leu (MERGL), Met-Enkephalin Arg Phe (MERF), Met-enkephalin (ME) and Leucine-enkephaline (LE) in a ratio of 3:1 for the mussel one and 1:2 for the leech one (18,26). Dibasic residues which are potential proteolytic cleavage sites flank all these peptides. Although invertebrates PEA possess a low sequence identity (30% in average) with mammal's one, sequences of the biological active peptides are well conserved (100% of sequence identity for enkephalins) (23). By sequence comparison with vertebrates, we noticed that invertebrate C-terminal PEA part exhibits 95-98% sequence identity with the mammal material. This includes the homologous sequence of bovine PEA 209-237/239 (enkelytin/peptide B) (5,21). This supports the hypothesis advanced by our group that these molecules first evolved in simpler animals. At this time, we speculated that immune signaling molecules may lead to enhance the release of PEA derived peptides such as opioid molecules and the peptide B. In this scenario, the opioid peptides would stimulate immunocyte chemotaxis and phagocytosis as well as the secretion of classical cytokines (33,34,35). The simultaneously release of peptide B would allow to generate an immediate immune response against bacteria attacks. This leaves time to start the inflammation by the way of opioid

peptides actions. This hypothesis is supported by the presence of specific ME receptors on invertebrates immunocytes (26,31,34).

The aim of this paper is consequently to evaluate the immediate effects of the LPS on the release of PEA derived peptides and the implication of these yielded products on the non-specific immune response in invertebrates, in order to get more knowledge about the innate immune mechanism in these simple animals. This will allow to get a better understanding of these processes in more complex organisms that are mammals.

2. MATERIAL METHODS

2.1. Animals

Rhynchobdellid leeches of the species *Theromyzon tessulatum* were used for these experiments and they were reared under laboratory conditions (19). Leeches are parasites of aquatic birds. Their life is divided into 4 stages. For this study, leeches in stage 3 were used. This stage corresponds to the gametogenesis phase, which is characterized by water uptake, apoptosis of the salivary glands and an empty mid gut, avoiding any contaminations by blood cell of the host (duck).

In order to avoid the leech peptides resulted from contamination from duck blood cells, *Mytilus edulis*, a free-living marine bivalve was also used. These animals were harvested from local waters of Wimereux (France) or Montauk Point (Long Island, NY) and maintained in the laboratory as noted elsewhere in detail (32).

2.2. Experimental treatments

2.2.1. LPS : LPS at different concentration (0.1, 1, 10 µM) were injected (10 µl) to the leeches and the mussels. The mussel and leech hemolymph collected at 5 min. intervals up to

4 h. after LPS or vehicle injection with a tuberculin syringe were supplemented by 100 µM of metalloenzyme inhibitors : phosphoramidon and captopril which inhibit NEP and ACE respectively (16, 25, 36). The cells were separated from the hemolymph by centrifugation (SIGMA 15,000 rpm for 15 min.).

2.2.2. Surgical cuts : Surgical cuts in the tegument (3mm in length) of the animals were performed with a thin razor. The hemolymph was then collected as noted above.

2.2.3. Electrical shocks : To gain further information on the presumed modulatory role of endogenous opioid activity, *in vivo* studies on experimentally induced stress, previously reported in the mollusk *Mytilus edulis* (34) were repeated in greater detail here. The animals were subjected to repeated electrical shocks (1V over the pedal ganglia {mA could not be determined because a salt water film is over the tissue surface} for 10 ms at 50 Hz (repeated 5 times). Control animals just experienced the placement of the electrode. Hemolymph samples were taken 5 min post exposure and for up to 60 min..

2.3. Immunoassays

2.3.1. Antibodies: Polyclonal antibodies directed against different synthetic peptides were generated in the rabbit using the usual procedure (27): ME, LE, and N-terminal part of PEA.

-Polyclonal antibodies recognizing FMRF-amide and bovine enkelytin were a kind gift from Dr Van-Minnen (Dept of Biology, Vrije Universiteit Amsterdam, The Netherlands) and from Dr M.H. Metz-Boutigue (Strasbourg), respectively.

The cross-reactivity of each antibody was determined by competitive ELISA assay.

Antibodies	Anti-ME	Anti-LE	Anti-enkelytin PEA 220-237	Anti-PEA N-term PEA 63-70
Cross-reactivity (%)	3 % with LE	0 % with ME	10 % with ME and 5 % with FMRF	0 % with ME, LE and FMRF

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Dot Immunobinding Assay (DIA) were used to detect and quantify the peptides during the purification.

2.3.2. DIA : The procedure was conducted according to Salzet *et al* (26). Synthetic peptides corresponding to the antibodies epitope were spotted in parallel as a positive control (1, 0.1, 0.01 mg/ml).

2.3.3 ELISA : Indirect competitive and non-competitive ELISA were conducted according to the procedure of Salzet *et al* (28). In parallel, synthetic peptides (25 ng/ml of enkelytin) were tested as positive control.

2.4. Immunocytochemical procedures :

Anterior parts of *T. tessulatum* were fixed overnight at 4°C in Bouin-Hollande fixative (+10% HgCl₂ saturated solution). They were then embedded in paraffin and serially sectioned at 7 µm. After removal of paraffin with toluene, the sections were treated on consecutive sections with the primary antibody (anti-enkelytin or anti-N-PEA) diluted 1:200 and with goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase as described elsewhere (28). The specificity of the antisera was tested on consecutive sections mounted on different slides by preadsorbing the antisera overnight at 4°C with their corresponding homologous antigen at a concentration of 100 µg/ml of pure antiserum.

2.5. Western-blot analysis :

2.5.1. Immunoprecipitation : 5 mg of protein A sepharose in TBS (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM) were incubated with 100 µl of the primary antibody (LE) at room temperature under agitation. After centrifugation (2,000 g, 15 min.) in TBS, the complex protein A-antibody was incubated with the hemolymph 24 hours at 4 °C under gentle agitation. The

complex protein A-antibody-epitope was separated from the hemolymph immuno-deleted by two centrifugations (6,000 g, 15 min.). The pellet containing the complex was washed again in the same conditions and placed in sample buffer (Tris/HCl 62.5 mM, pH=6.8, SDS 2% (W/V), saccharose 13% (W/V), β -mercaptoethanol 5% (V/V)). The mix (17 μ l of buffer and 34 μ l of sample) was backed for 1 min. at 100°C and centrifuged at 6,000 g (15 min.) in order to separate the epitopes, the marbles of sepharose and the antibody fragments (reduced by β -mercaptoethanol). The supernatant containing the epitope and these fragments were then separated on SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions.

2.5.2. Electrophoresis : Electrophoresis was performed on a 10-25% polyacrylamide gradient slab gel. Different molecules were used for the gel calibration: phosphorylase B (94 kDa), albumine (67kDa), ovalbumine (45 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa) and lactalbumine (14.4 kDa). The first migration (60-90 min at 15 mA) allowed the concentration of the protein (5% concentrating gel). The second (16-20h at 5mA) lead to the protein separation. The same migration buffer was used for these experiments : tris/HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1%. After electrophoresis, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon P, Millipore). Membranes were then exposed to amidoblack reversible colorant to check the protein transfer efficiency before incubation with the primary antibody. The following steps were similar to ones done in DIA.

2.6. Titration

2.6.1. Amount titration of peptide B : Leech and mussel hemolymph were collected at different time intervals after LPS injection : 5 min., 15 min., 30 min., 60 min., 120 min., 180 min. and 240 min.. After centrifugation and Sep-Pak pre-purification (see purification part), the 50 % eluted product was concentrated. Competitive ELISA using the enkelytin antibody

determined the amount of peptide B. In parallel, the control animals were injected with physiologic sterile water.

2.6.2. Amount titration of Met-enkephalin : Experimental treatments of the mussels were similar but the titration was different to avoid the problem of the cross-reactivity between the anti-ME antibody and the peptide B that could false the titration. Indeed, once collected, the hemolymph was load onto an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). The content of the fractions corresponding to ME were then quantified by RIA using H³-ME. Thirty ml of hemolymph were aspirated from the area of the posterior adductor muscle of 65 to 100 *Mytilus* specimens. Ten ml of 1.5 M NaCl were added to the hemolymph to increase the NaCl concentration by 210 mM. This ensured the dissociation of extracellular endogenous opioid peptides from the surface of the immunocytes. Immunocytes were separated from hemolymph by centrifugation at 400 x g for 10 min.. Separation was shown to be complete by microscopic examination. For the analysis of cell-free hemolymph, 50 ml of an extraction solution containing 1 M acetic acid, 20 mM HCl and 1 µg/ml each of phenylmethylsulfonyl fluoride and pepstatin A plus 1% 2-mercaptoethanol were added to the fluid. This mixture was homogenized with a Brinkmann Polytron homogenizer with four 5-sec bursts. The cell-free hemolymph homogenate was de-proteinized by the addition of 50% trichloroacetic acid (TCA) to a final concentration of 10% TCA. This mixture was then centrifuged at 10,000-x g for 30 min. at 4°C, and the supernatant was extracted 3 times with an equal volume of diethyl ether to remove lipids and the TCA. The aqueous portion was lyophilized and dissolved in 6 ml of 10% acetonitrile (ACN) in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The supernatant was clarified by centrifugation before pre-purified by a Sep-Pak C₁₈ (Waters, Boston, Mass) cartridge. The Sep-Pak was pre-wetted with 5 ml of methanol and 20 ml of H₂O. After the sample was injected into the Sep-Pak, it was rinsed with 10 ml of 1% acetic acid and eluted

with 3 ml of methanol. The eluant was lyophilized and dissolved in 300 µl of 10% ACN in 0.1% TFA. After centrifugation, 220 µl of the supernatant were fractionated by HPLC (BAS HPLC system equipped with a Brownlee RP-300 C₈ reversed-phase column (4.6 x 250 mm)). Under these chromatographic conditions the retention time of ME was 10.5 min.. An aliquot of 220 µl of concentrated purified extract, equivalent to the content of 44 ml of cell-free hemolymph, was subjected to HPLC. One-ml fractions were collected.

ME-titration was determined by RIA (Immuno Nuclear Corp.) in the ME fraction obtained by HPLC. The cross-reactivity of the ME antibody used in this kit is less than 3% for Met-enk-Lys, Met-enk-Lys-Arg, Met-enk-Arg-Phe, Met-enkephalinamide, Leu-enk, β-endorphin or dynorphin. The results of duplicate runs were averaged. Aliquots of 100 µl of cell-free hemolymph were used. Total ME activity in each group was quantified by assaying additional aliquots of diluted samples.

2.7. Antibacterial assays

2.7.1 Strains : Micrococcus luteus (IFO12708) and *Escherichia Coli* (JM 109) were used in this study.

2.7.2 Antibacterial test on solid medium : This test allowed to detect rapidly the presence of the antibacterial peptides in the collected fractions after each steps of purification. The antibacterial activity of the material was assayed by a solid growth inhibition assay using Gram + bacteria (*M. Luteus*) and Gram – bacteria (*E. Coli*). Bacteria were grown on *Luria Bertani* (LB : 1 % (W/V) Bactotryptone, 0.5 % (W/V) NaCl pH=7.2) overnight at 37°C under agitation (1 colony for 3 ml of LB) to an OD₆₀₀ of 0.4. They were then diluted : 230µl in 50 ml of LB agar (0.015 % (W/V) in LB), placed in Petri dishes and stored at 4°C. Five to 0.5 µl

of sample were plated on the nutrient agar containing bacteria and incubated at 37°C overnight. Antibacterial activity was recognized by the lack of growth on the deposit.

2.7.3. Liquid growth inhibition assay : Antibacterial activity was monitored by a liquid growth inhibition assay according to Bulet *et al* (3). The strains were conserved at -80°C in LB. One isolated colony was grown overnight under agitation on 5 ml PB (LB without yeast extract). Antibacterial activity was detected on microtiter plate filled with 100 µl containing bacteria in growth log phase ($OD_{620}=0.001$) and 10 µl of the purified peptide at different concentration or 10 µl of water (control). After 24 h. incubation at 37 °C under agitation, the absorbance of each well was measured at 620 nm with an ELISA reader. MIC was then defined as the lowest concentration for which no bacteria was optically detectable. This antibacterial test allowed determining the % of growth inhibition of the bacteria in presence of different concentration of peptide B.

$$\% \text{ of growth inhibition} = (1 - (OD_{620\text{nm}} \text{ read}) / (OD_{620\text{nm}} \text{ control})) \times 100$$

2.8. Purification and characterization

2.8.1. Peptide B : The mussel and leech hemolymph (50 animals) was collected with a tuberculin syringe 15 min. post injection of LPS (10 µl, 10 µM, SIGMA *E. Coli*) and supplemented with phosphoramidon (100 µM) and captopril (100 µM). After centrifugation (12,000 rpm/min. Sigma 2K15 for 30 min. at 4°C), the pellet containing the cells was discarded and the supernatant subjected to an acetic acid (1N, V/V) extraction (centrifugation 12,000 trs for 15 min.). The supernatant was then pre-purified on a Sep-Pak C18 cartridges (Waters, 2 ml extract/cartridge). After washing of the cartridges with 5 ml methanol and 5 ml acetic acid (1N), elution was performed with 5 ml 50% and 80% ACN. The 50% and 80% eluted fractions were then concentrated by evaporation (vacuum centrifuge Savant) but not to

dryness and were taken up in 250 µl of acidified water (0.1 % TFA (V/V)). The immunoassays (ELISA and DIA) with enkelytin antibody and antibacterial test on solid medium were then realized. The 50 % eluted fraction presenting an antibacterial activity was fractionated on a High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC) column (Ultraspherogel, 7.5 x 300 mm, Sec 2000, Beckman). The elution was performed with 30 % ACN-TFA (0.1 % (V/V)) at a flow rate of 500 µl/min. The fractions collected min./min. were concentrated by evaporation and tested. Immunopositive to anti-enkelytin and antibacterial fractions were then separated on reversed-phase HPLC column (C-8 RP-100 Lichrosphere : 4.6 x 125 mm, Waters) equilibrated with acidified water. Elution was realized with a linear gradient (1% ACN/min) of ACN in acidified water at a flow rate of 1 ml/min. and monitored by absorbance at 226 nm. Aliquots of each fraction were tested and the positive ones were analyzed on a narrowbore column (2 x 250 mm, Beckman) with a linear gradient of ACN (2.6 %/min) at a flow rate of 200 µl/min.. After evaporation, fraction aliquots were then tested in both DIA and for antibacterial activity. All HPLC purification were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photo diode array detector (Beckman 168). Peptide purity was ascertained by capillary zone electrophoresis (28) and its mass measurement was done by mass spectrometry (28).

-5.3 kDa fragment: Western-blot analysis underlined the release of a peptide fragment contained in the collected fractions issued from the HPGPC (see above). This fragment was further purified on a C8 reversed phase column (HPLC 250 x 4.6 mm). The elution was performed with a linear gradient of ACN 0-60 % for 60 min. at a flow rate of 1 ml/min..

The purity of the fragment was check by capillary zone electrophoresis. The product was then subjected to a mass spectrometry measurement.

2.9. Peptidase activity :

Injection (10 µl) of a cocktail of phosphoramidon and captopril (100 µM) was performed 5 min. prior to LPS injection (10 µl). The hemolymph was treated as developed previously. The titration was performed by ELISA.

2.10. Determination of NEP and ACE kinetic parameters toward peptide B :

Mussel purified peptide B was incubated with NEP and ACE in presence or not of their respective inhibitors: phosphoramidon (100 µM) and captopril (100 µM) in Tris Buffered Saline (100 µl, 50mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH=7.4). Enzymatic activity was stopped by addition of 30% (V/V) TFA. Samples were then centrifuged (12,000 g, 15 min.) and the supernatants were diluted in 100 µl of acidified water and analysed on a C-8 Lichrosphere RP-100 HPLC column (125 x 4.6 mm, Merck). The fractions recognized only by the FMRFamide antibody were selected and quantified. The molar ratio of YGGFMRF (MERF) / peptide B was calculated from data given by Welling G.W. et al. (39). This ratio determinates the relative activity (%) of the enzymes.

2.11. Binding Assay :

Immunocyte membranes from mussels were used for binding assays ; they were obtained and processed as detailed elsewhere (34). Binding of ^3H -(D-ala₂-met₅-enkephalinamide (DAMA) was performed in TBS (50 mM, pH 7.4, 40°C) in the presence of captopril and phosphoramidon (100 µM). For the IC₅₀ determination (defined as the concentration of drug that elicits half-maximal inhibition of specific ^3H -DAMA binding), an aliquot of the immunocyte membrane suspension was incubated with non-radioactive opioid compounds at different concentrations ranged between 10⁻¹⁰ and 10⁻⁵ M (10 min. ; 22°C) and

then with ^3H -DAMA (60 min. ; 4°C). For each compound, we recorded the mean +/- S.E.M. for three experiments.

2.12. Analysis of cellular activity :

Mytilus immunocytes were obtained as noted above. The pharmacological effect of exposure of immunocytes to MERF was determined as previously described by Stefano et al. (35). Briefly, a petroleum jelly ring was made on a glass slide. Cells, suspended in physiological saline (100 µl), were placed at the extreme right side of the ring and then covered with a glass cover slip. Test substances (in 100 µl physiological saline), were added to the cells by making an opening in the right edge of the jelly ring which allowed the entry the solution by capillary action. Naloxone was added 5 min. prior the test whenever it was used. Experimental measurements were initiated at this time. Chemotaxis was differentiated from chemokinesis by determining the axis of movement of individual cells using cell analysis software (American Innovision, Inc., San Diego, CA). The axis is the moment, or location in a cell, that exhibits minimum rotation around a point and is calculated from the arc tangent of multiple moments, including the centroid location of a cell. About 35 to 46 activated cells were observed for each 400-µm viewing diameter; four viewing diameters were observed per slide. The entire process was repeated three more times and the resulting mean (\pm SEM) was graphed. The variation for individual readings was between 5% and 9%. Random movement was also visualized using the Tracksh program (American Innovision, San Diego, CA). Chemokinesis is identified as a lack of general cell movement toward a concentration gradient and a lack of correlation of the cell axis with that same gradient (i.e., not parallel).

The degree of cellular activation was determined as noted elsewhere. Briefly, under phase contrast optics, round cells appear light and amoeboid cells dark. The system, manually tuned, identifies these color differences and the proportion of each is used as an index of activation.

Student's-test was used to compare the values obtained from cells exposed to drugs or vehicle. In order to reduce inaccuracies due to varying levels of spontaneous immunocytes activation, controls were run for each individual time period and drug treatment.

3. RESULTS

3.1. PEA derived peptides in hemolymph after a LPS stimulation

Analysis of the PEA fragments in hemolymph was performed to sustain the hypothesis of the release of ME and peptide B after LPS stimulation. We firstly demonstrated the presence of PEA in leech hemolymph. One hundred μ l of non-treated leech hemolymph were supplemented with phosphoramidon and captopril and then immunoprecipitated with LE antibody. After electrophoresis, the immunoblot analysis was performed with either anti-ME (Fig. 1A, lane a) or anti-enkelytin (Fig. 1A, lane c). Control was conducted in parallel without hemolymph (Fig. 1A, lane b). The results shown that both antibodies recognized a single protein having a molecular mass of 18.5 kDa, absent in control experiment. This molecule corresponded to the leech PEA (26). To further characterize the precursor, the hemolymph extract was subjected to gel permeation. The collected fractions were analyzed by DIA using antibodies specifically directed against different parts of PEA *i.e.* ME, LE, enkelytin and FMRF-amide (Peptide B = enkelytin +RF). Fractions between 10-20 kDa are positives to all antibodies. Moreover, immunoblot analysis using a specific PEA N-term antibody revealed a protein of 18.5 kDa (Fig. 1 B) confirming the above results (Fig. 1 A, lane a). PEA seems consequently to be present in hemolymph of non-stimulated animals.

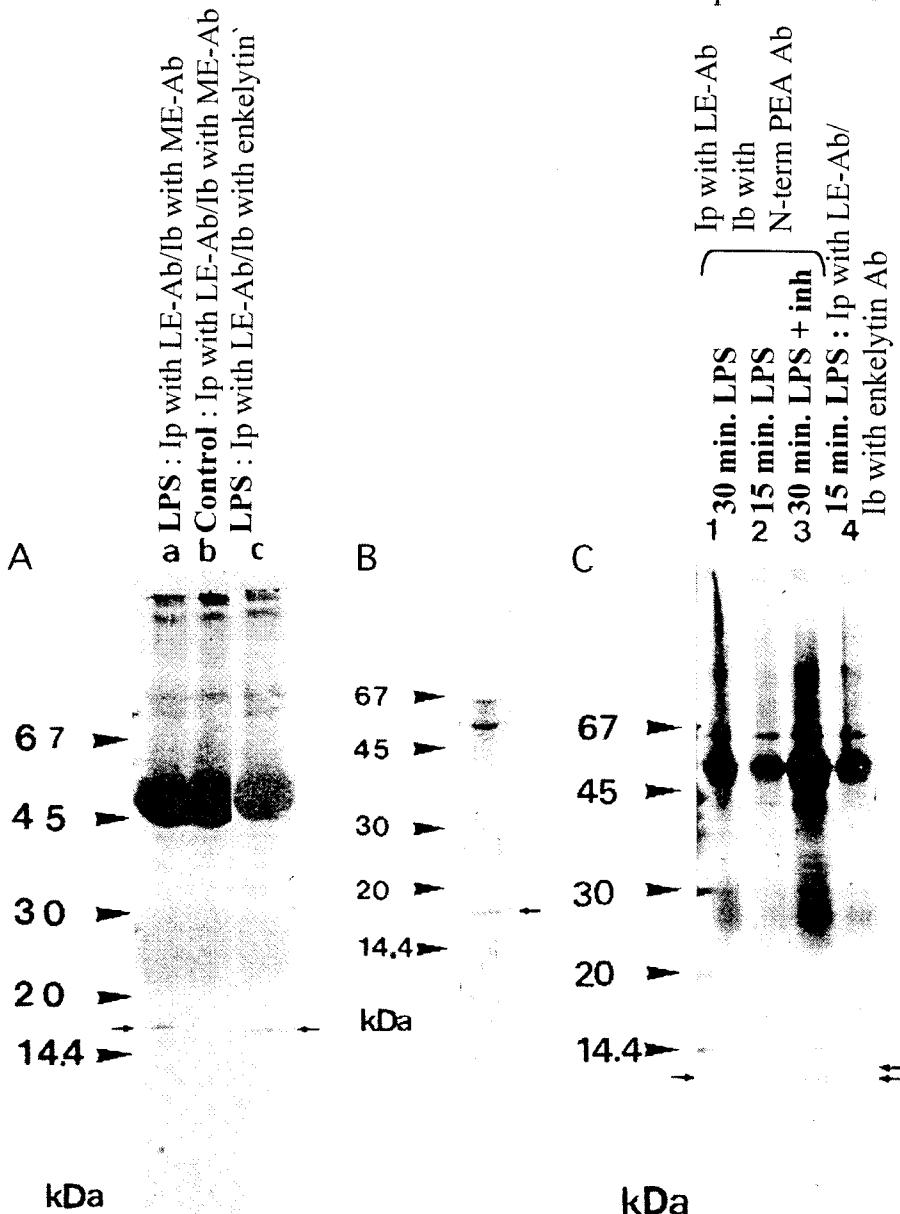


Figure 1 :Western-blots analyses of proenkephalin processing.

A/ Leech hemolymph supplemented with phosphoramidon and captopril (lane a, c) or TBS (control ; lane b) were immunoprecipitated with anti-Leu enkephalin, separated on SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to nitrocellulose. Proteins were immunodetected with anti-met-enk (lane a, b) and anti-enkelytin (lane c) :

Ab : antibody Ip : immunoprecipitation Ib : immunoblot

B/ Freshly collected hemolymph was supplemented with enzyme inhibitors. Molecules were separated by size exclusion chromatography on a Sec 2000 (300 x 7.5 mm, ultraspherogel, Beckman). Purified fractions were screened using anti-Leu-enk, anti-Met-enk, anti-enkelytin, and anti-FMRF-amide. Immunoblot was realized with anti-N-term PEA.

C/ Hemolymph of leeches, injected with LPS (lane 1, 2, 4) alone or with LPS added of enzyme inhibitors (phosphoramidon and captopril) (lane 3) were collected 15 and 30 min post-injection. Hemolymph were supplemented with these same inhibitors. The immunoprecipitation was carried out with anti-Leu-enk and the immunoblot with anti- N-term PEA or anti-enkelytin.

Footnotes : higher molecular weight bands are immunoglobulin L and H chains from the immunoprecipitation.

We next studied the time-course of release of the PEA derived peptides following LPS injection. The hemolymph was collected at different times intervals after injection (15 min.-30 min.). Fifteen minutes post-injection, the immunoblot performed with a PEA N-term antibody revealed a single protein of 13 kDa. This suggest a quick process of the PEA in the hemolymph and/or the massive release of fragments (including the 13 kDa and a 5.5 kDa molecules) already mature and stored in hemocytes and/or in nervous system (Fig. 1 C, lane 2). Indeed, enkelytin immunoreactivity was located in leeches in nerve cell bodies (Fig. 2 a, 2 b), in fibers of the ventral nerve cord and in nerve roots that arise from each side of segmental ganglia (Fig. 2 c). Immunoreactivity was also detected in coelomic cavities containing hemolymph (Fig. 2 d) and coelomocytes (Fig. 2 e) (Pre-adsorption of the anti-enkelytin with synthetic homologous peptide showed a complete staining abolition, demonstrating the specificity of the immunoreactivity).

In a second time, the hemolymph collected 15 min. after LPS stimulation was immunoprecipitated with anti-LE. The immunoblot was then realized with anti-enkelytin (Fig. 1 C, lane 4). No proteins are detected using this antibody showing that the 5.5 kDa fragment contains the peptide B sequence. From the previous sequences of invertebrates PEA (26), we knew that leech C-terminus PEA contained peptide B, FMRF peptide and ME. Therefore, we used antibodies raised against these peptides to screen fractions eluted from the gel permeation. The 3 antibodies recognized a single immunoreactive zone ranged between Mr 4.5 to 7 kDa (Fig. 3 A, dotted bar). The peptides in this zone were then separated on a C8-HPLC column. A single immunoreactive peak to 3 antibodies with a retention time of 36.3 min (corresponding to 36.3 % ACN) was detected (Fig. 3 B). This peptide was further separated and purified on C18 reversed-phase HPLC narrowbore column. The purity of the material was checked by capillary zone electrophoresis (Fig. 3 C) before being subjected to a

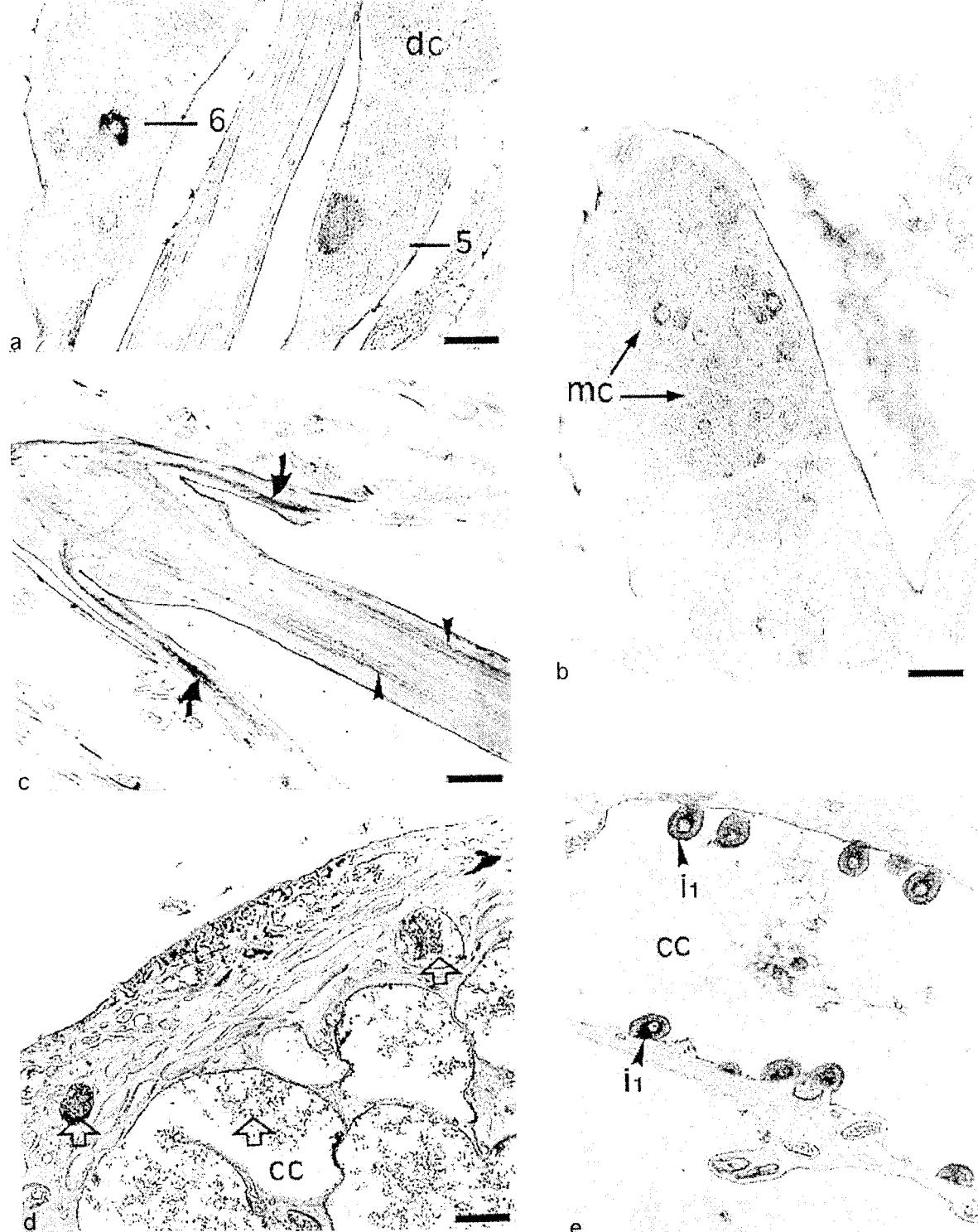


Figure 2 : Cellular localization of peptide B in *T. tessulatum* :

c.c : coelomic cavity, d.c.: dorsal compartment, m.c.: median compartment, 5-6 : compartments 5,6.

a.b. : immunoreactivity was detected in some cells of the dorsal (a) and median (b) compartments of the brain.

c : immunoreactivity was present in fibers (arrowheads) of ventral nervous cord and in nerve roots (arrows)

d.e. : immunoreactivity was located in the coelomic cavity (d) and in the hemocytes (i) (e).

mass measurement in MALDI-TOF. The measured mass of this peptide was m/z of 5385 +/- 2.3 Da (Fig. 3 D), which is in agreement with the C-terminus sequence of a leech PEA fragment : RGLRRSTRPEWKKFAEFLPSEEGESYSKEVPEMERRYGGFMRF (**peptideB**) (5387.1). This peptide corresponds to the fragment released 15 minutes post-injection as demonstrated by western-blot experiments analysis (Fig. 1 C, lane 2)

As PEA was found in the hemolymph of non-treated animals, we tried to study the enzymes implicated in this processing after a LPS stimulation. Hemolymph of injected animals by either LPS in presence or absence of enzyme inhibitors was collected 30 minutes post injection. An immunoprecipitation procedure was undergone with anti-LE and immunoblot analysis performed with anti-PEA N-term (Fig. 1 C, lane 3). The result underlined the presence of several proteins ranging between 11 to 18.5 kDa. These data compared to ones obtained without enzyme inhibitors i.e. a single protein with a Mr of 11 kDa (Fig. 1 C, lane 1), we can then conclude that endopeptidases such as NEP and/or ACE could be implicated in PEA processing in the hemolymph. But addition of captopril and phosphoramidon did not block the presence of several protein bands ranged between 11 to 18.5 kDa (Fig. 1 C, lane 3). Upon stimulation, hemocytes and/or neurons could consequently release into the extracellular fluid PEA derived peptides (already mature) and LPS could in parallel lead to the process of the PEA in the hemolymph by the NEP and/ or the ACE.

3.2. Isolation, characterization, activity and localization of peptide B

In order to confirm the release of leech peptide B, we tried to isolate this peptide. To optimize the purification, hemolymph from LPS-injected animals were collected at different time intervals and then quantified by competitive ELISA using the anti-enkelytin. The

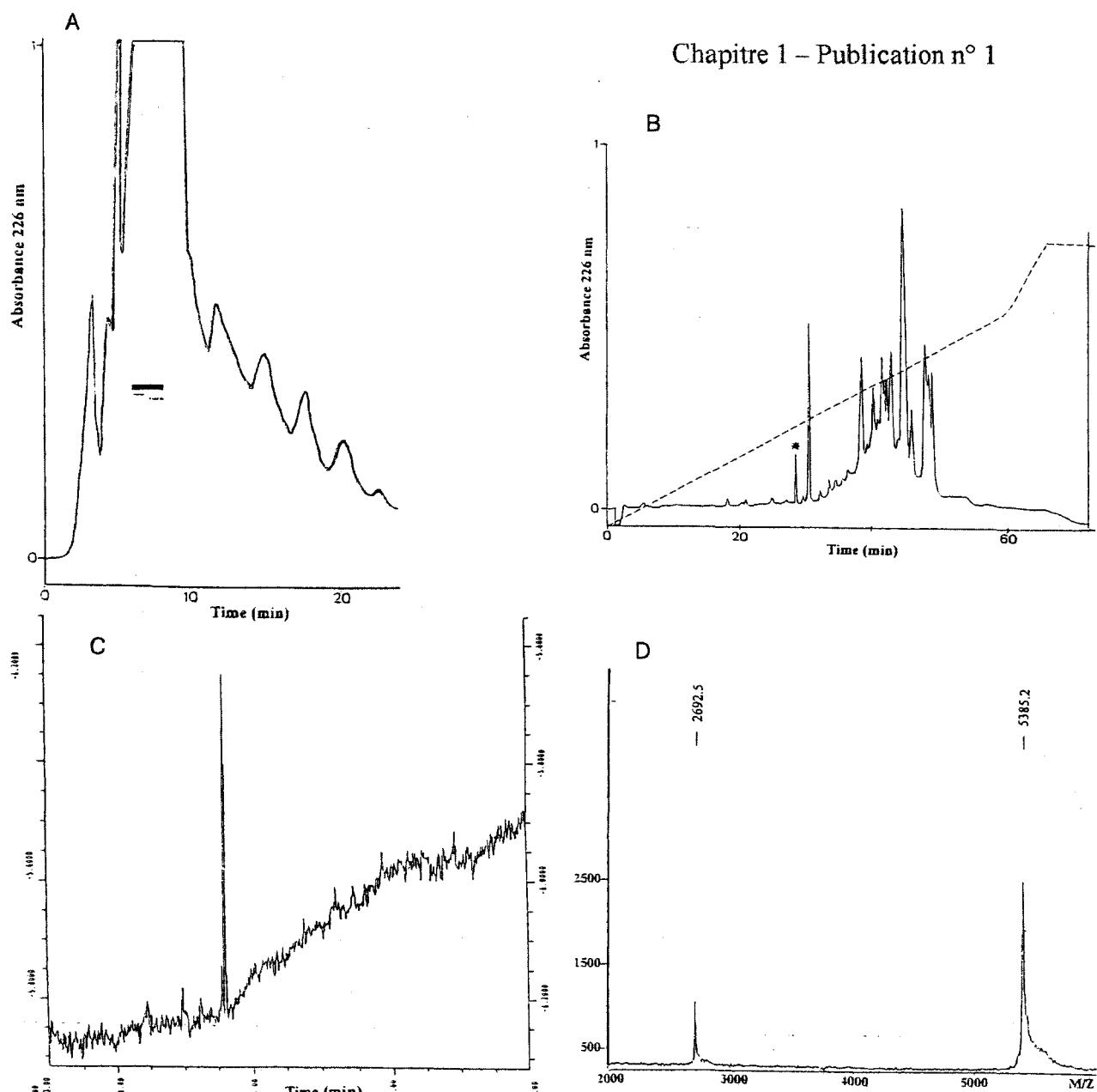
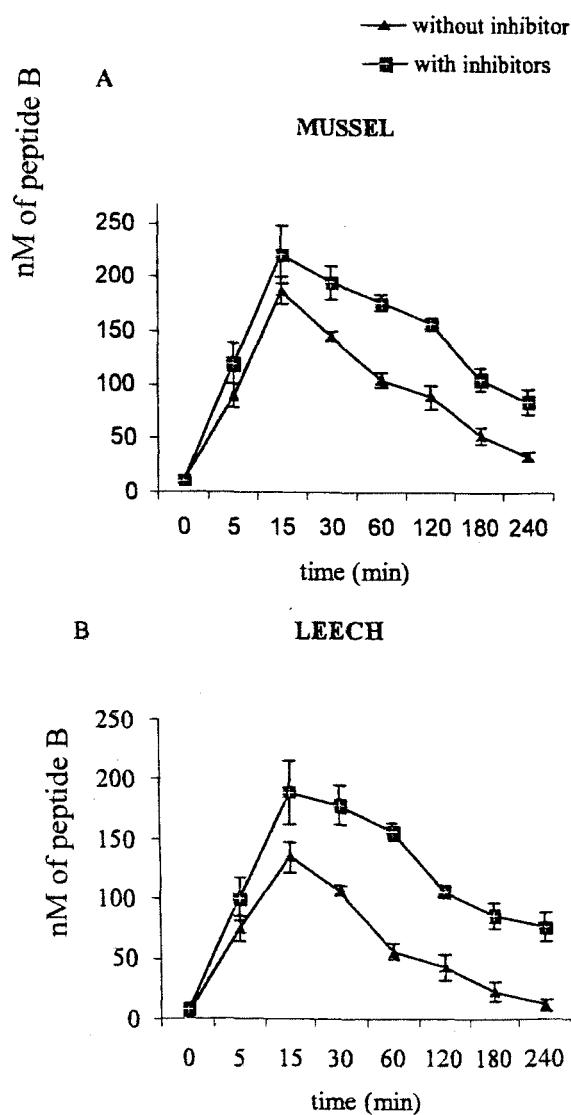


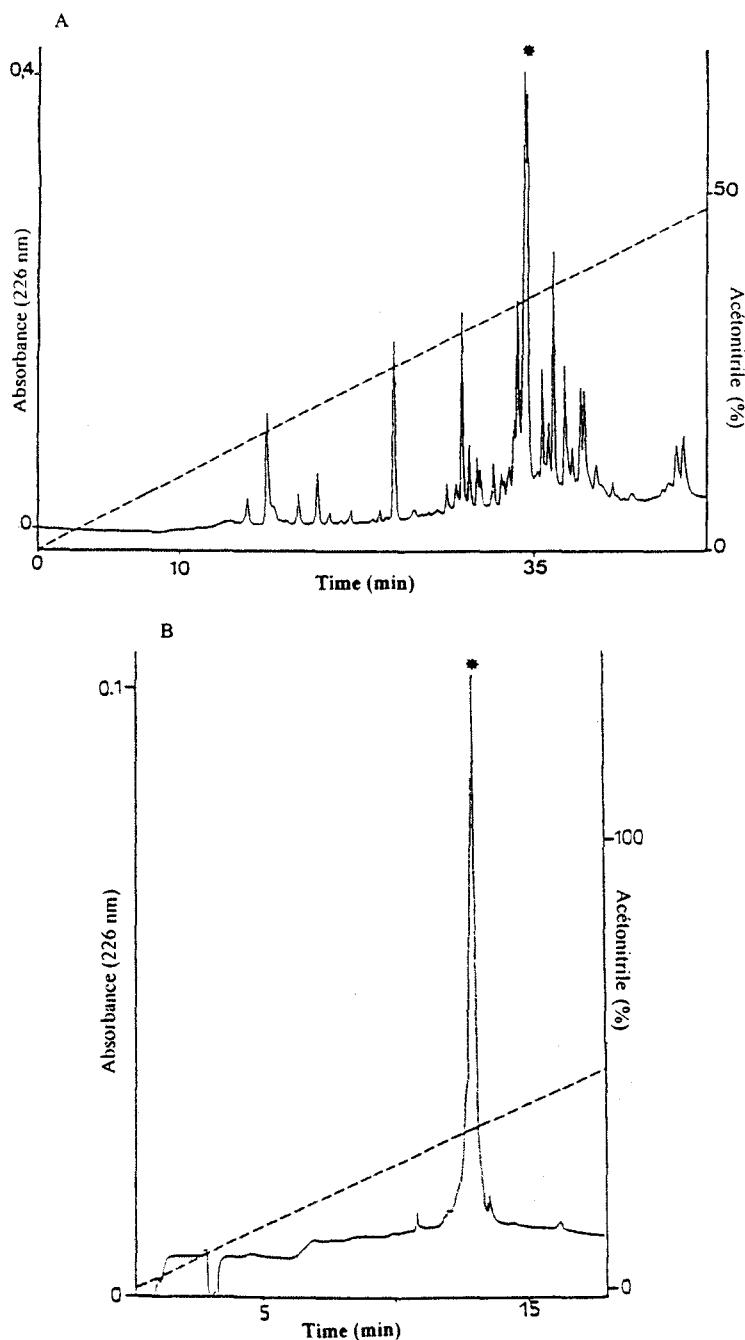
Figure 3 (A) : Purification of peptide B. HPGPC elution profile of a C18 Sep-Pak pre-purified extract of hemolymph from injected leeches (LPS,-15 min. post-injection). After solid phase extraction on Sep-Pak C 18 cartridges, the fraction eluted by 50 % of acetonitrile in acidified water (0.1 % TFA) containing the immunopositive to anti-enkelytin material was loaded onto a HPGPC column and eluted with 30 % of acetonitrile (flow 500 µl / min). The full and dash bar corresponds to immunoreactive fractions. The antibacterial tests underline a positive zone corresponding to molecular mass of 2.5-3.5 kDa (full thin bar).The dotted bar (5-7 kDa) corresponds to fractions immunoreactive to anti-enkelytin, anti-FMRFamide and anti-Met-enk. **(B) : Purification of PEA C-terminal fragment.** After HPGPC purification, fractions immunoreactive to anti-FMRFamide, anti-Met-enkephalin and anti-enkelytin were purified to homogeneity on a C8 reversed-phase column using a linear gradient of 0-60 % acetonitrile in acidified water (0.1 % trifluoroacetic acid) for 60 min at a flow rate of 1 ml/min. * Corresponds to immunoreactive material. **(C) : Capillary zone electrophoresis.** After a C-8 reversed-phase HPLC separation, the immunoreactive fractions were further purified on a C18 reversed-phase HPLC column (250 x 2 mm ultrasphere, Beckman). Purity of the immunoreactive product was checked by capillary zone electrophoresis. Analyses were performed on a 72 cm capillary in 50mM phosphate buffer at pH 2.5. **(D) : MALDI-TOF MS measurement of the purified peptide.** 2692.5 is a double charged ion of the C-terminal proenkephalin peptide 5385.2 ± 2.3 Da.

hemolymph was then subjected to an acetic acid extraction and Sep-Pack pre-purification. Only the 50 % ACN eluted samples possessed an antibacterial activity and an immunoreactivity to anti-enkelytin. ELISA titration (Fig 4) reflected a rapid release of molecule, recognized by enkelytin antibody, peaked at 15 min. post-injection. Consequently, fractions collected at this time were used for peptide B purification. The 50% ACN sample was subjected to a HPGPC (Fig. 3 A, full thin bar) and eluted fractions tested in DIA and antibacterial assay. A single immunoreactive zone corresponding to peptides with a molecular mass of 2.5-3.5 kDa was detected. Quantification by ELISA revealed in this zone an amount of 120 nmol anti-enkelytin material/ μ l of hemolymph (recovery of 80 %). The positives fractions were then concentrated and further purified by two cycles of reversed-phase HPLC separation. In the first step (C8-Lichrosphere, Fig 5 A) the enkelytin immunoreactive material was eluted from the column at a retention time of 34.7 min (34.7 % ACN; 104 nmol/ μ l; recovery of 69.3 %). In a second step (C18, Fig 5 B), the positive material was eluted as a sharp peak with a retention time of 13.32 min (35 % ACN). The peptide contained in this peak presented an antibacterial activity. The final amount of this material was 73 nmol anti-enkelytin material/ μ l of hemolymph (recovery of 48.6 %). Based on the N-terminal sequence, the mass spectrometry measurement, and the known sequence of leech PEA (26), we deduced the complete sequence of the leech peptide B: FAEFLPSEEEGESYSKEVPEMERRYGGFM RF. It exhibits a 93.6 % sequence identity with bovine peptide B, previously isolated from adrenal medulla chromaffin cells, and human polymorphonuclear cell secretions (4,5). The same procedures were done for the mussel peptide B and its deduced sequence exhibits (96.7%) sequence identity with the bovine and the leech ones. Consequently peptide B seems to be highly conserved in course of evolution. Purified leech and mussel peptide B have



Figures 4 :

Time course of appearance of peptide B following LPS injection ($10 \mu\text{M}/\text{animal}$) in presence or not of inhibitors (phosphoramidon and captopril) in mussels (A) and in leeches (B)



Figures 5 : Peptide B purification

A- After HPGPC, peptide B was further purified on a C8 RP-100 reversed phase column with a linear gradient of 1 % acetonitrile in acidified water (0.1 % TFA). The peptide B material was detected on aliquots of each fraction by DIA using the anti-enkelytin.

* Corresponds to immunoreactive material.

B- After two successive purification steps, leech peptide B was purified to homogeneity on a C18 reversed phase column and eluted with a linear gradient of 2.6 % of acetonitrile in acidified water (0.1 % TFA).

* Corresponds to immunoreactive material.

marked activity against the Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* (MIC 100-120 nM). The invertebrate peptide B like the mammal ones in a concentration dependent manner inhibits the growth of the strain (Fig 6). Moreover, the previous result showed that the LPS, in a dose dependant manner seemed to contribute to the release of peptide B. Although we did not know if the effects were related to the LPS or to the injection itself the results showed that the increase in concentration of injected LPS provoked a higher release of invertebrate peptide B in hemolymph (Fig 7). This effect is dose-dependant. However, LPS are not the only stimulus to generate this mechanism. Indeed the surgical trauma experiments underlined a quick release of leech peptide B (in the first 15 min, peaked at 15 min). Similar experiments performed in mussels, gave the same results (Fig 8).

3.3. Peptide B catabolism

In mammals ME is known to be regulated by NEP (29). In leeches, Laurent and Salzet have previously shown that ACE is also able to process ME (14,15). So we surmise that peptide B possesses the same cleavage site for NEP and ACE in ME. To confirm this hypothesis, animals were injected with phosphoramidon and captopril prior to LPS injection (Fig 4). Hemolymph was collected at different times intervals and titration of the amount of peptide B released was performed with the anti-enkelytin. The results underlined a significant increase in amount from 135 nM to 189 nM in leech and from 187 nM to 221 nM in mussel at 15 min post-injection. This reflects that peptide B could be a substrate for NEP and / or ACE enzymes and that these enzymes most likely act on the neuropeptide catabolism rather than on the precursor processing. Indeed the processing of PEA is not blocked by injection of their inhibitors and the amount of peptide B is increased when they are injected.

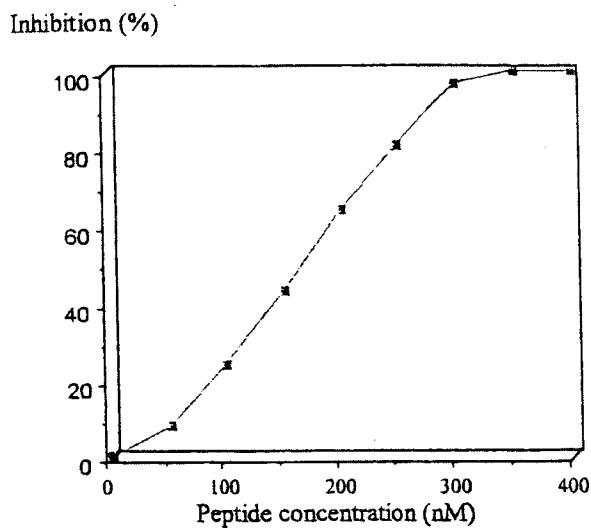


Figure 6 : Biological activity of peptide B.

Micrococcus luteus is incubated with increasing concentrations of purified peptide B in bacteria liquid growth medium (see Methods). Microbial growth is assessed by measuring the increase in A_{620} after incubation at 37°C for 24 h relative to control cultures (no peptide). Data are means of triplicate assays (SEM <5%).

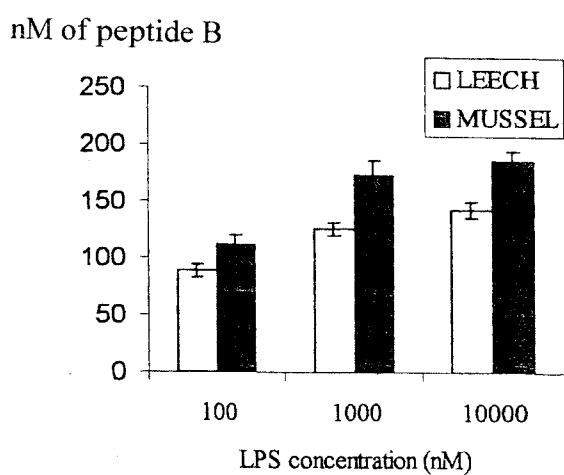


Figure 7 : The effect of LPS-dose on the concentration of peptide B amount titration after 15 minutes injection of the dose of injected LPS.

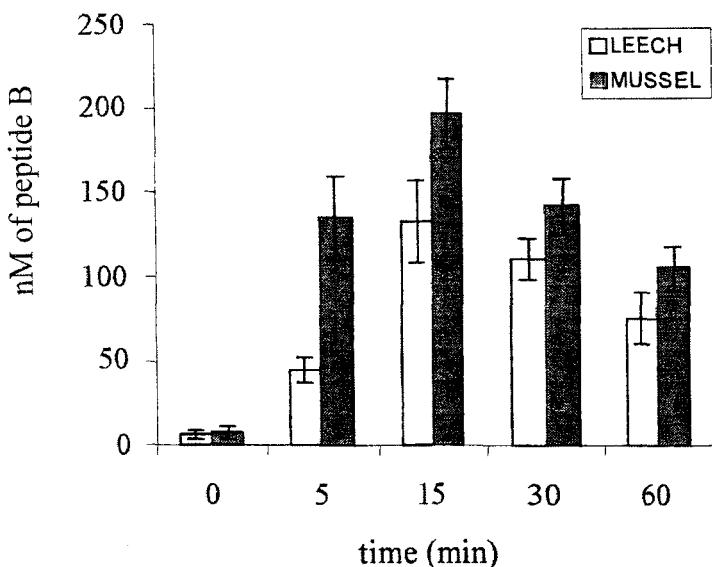


Figure 8 :
Peptide B amount titration after skin incision. Data are means of triplicate assays (SEM <5%).

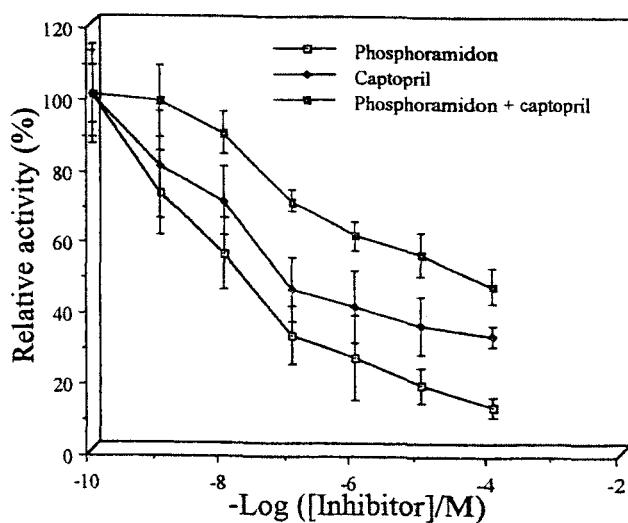


Figure 9 : Inhibition of *Mytilus* peptide B hydrolysis by phosphoramidon and captopril.

Inhibition of the cleavage of the Arg²⁴-Tyr²⁵ bonds of peptide B (10 µM) by different concentrations of phosphoramidon and captopril was determined. Peptidase activity was measured by quantifying the peptide product Met-enkephalin-arg-phe by HPLC. Data are the means of triplicate assays (S.E.M. < 5%).

In vitro incubation of the *mytilus* enzymes (NEP, ACE) with peptide B in presence or absence of their respective inhibitors were conducted to sustain our hypothesis. In a first step, a fraction aliquot of a mixture (enzyme-peptide B) was taken up at different time intervals during incubation. Aliquots were subjected to a reversed-phase HPLC separation and comparison of the elution profiles of the products alone or the ones coming from enzymatic digestion, revealed appearance of new peaks only in digestion experiments. One of these peaks is immunopositive to anti-FMRFamide and presented exactly the same retention time than the MERF synthetic peptide, eluted in the same conditions. Co-elution of synthetic MERF and the yielded product gave a single peak confirming the identity of the peptide (data not shown). Consequently, we can postulate that peptide B is degraded by ACE/NEP to generate MERF. Mussel NEP exhibits a specific activity of 15 nmol of MERF min⁻¹ mg protein⁻¹ ($K_{cat} / Km = 3000 S^{-1}mM^{-1}$). Inhibitions curve with phosphoramidon generated by measuring the rate of formation of MERF over a range of inhibitor concentrations (Fig 9) shown a maximum inhibition (about 80%) with 10 µM phosphoramidon ($IC_{50} = 50 nM$). Similar experiments were conducted with ACE ($IC_{50} = 0.1 \mu M$). The specific activity of *Mytilus* ACE is 2 nmol of MERF min⁻¹ mg protein⁻¹ ($K_{cat} / Km = 1500S^{-1} mM^{-1}$).

These results demonstrate that peptide B is *in vitro* a substrate for NEP and ACE and that ACE presents a lower activity than the NEP one towards this peptide.

3.5. Enkephalin titration and immune action

Since invertebrate PEA also contains ME, it was important to also determine if LPS affected its levels as well : increased ME would substantiate our hypothesis that the peptides (ME and peptide B) are released in parallel. As predicted, mussel hemolymph ME levels also increased with time, peaking at 15 min (Fig 10). Besides we can notice that ME levels return

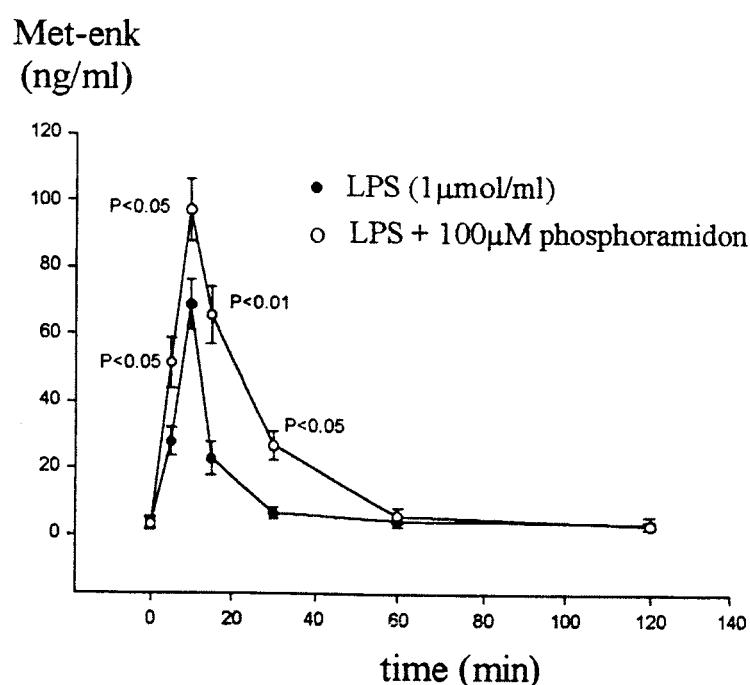


Figure 10 : Time course of appearance of Met-enk peptide in *Mytilus* after LPS injection (10 μM/animal) or injection of phosphoramidon (100 μM/animal) prior to LPS injection. The amount of material is determined by HPLC isolation followed by RIA. Data are the means of triplicate assays (SEM < 5%).

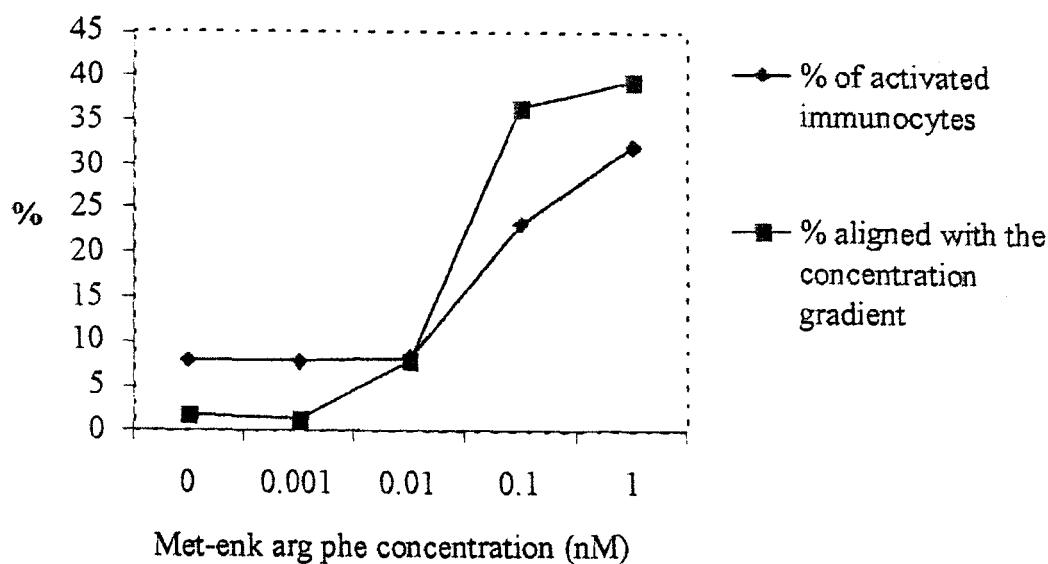


Figure 11 : Met-enkephalin arg phe induction of chemotaxis.

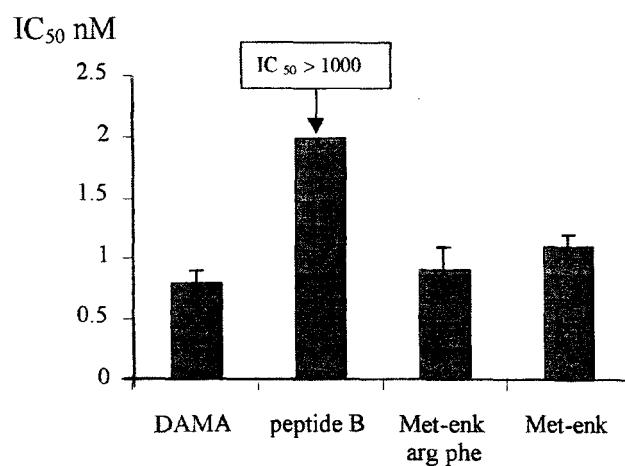


Figure 12 : Displacement of ³H-D ala2-Met5-enkephalinamide (DAMA) (1nM) by Opioid Ligands in Mytilus immunocyte membrane suspensions.

Determination of IC₅₀ defined as the concentration of drug, which elicits half-maximal inhibition of specific ³H-DAMA binding.

to control values soon (30 minutes for ME *versus* 4 hours for peptide B). In parallel, titration of ME was realized in animals injected by LPS and phosphoramidon to determine if invertebrate ME is a substrate or not for the NEP in invertebrates. The results (Fig 10) showed an increase of ME in presence of the specific inhibitor confirming the role of this enzyme. These results are in line with the ones of Leung *et al* (17) who demonstrated that ME once secreted was degraded by hemolymph peptidases in the mussel. Similar experiments were conducted in leech. In non-injected animals, the amount of ME was 1.34 ± 0.25 pmol/ μ l of hemolymph. With LPS injection it reached a peak at 10 min. (6.5 ± 0.75 pmol/ μ l hemolymph) before being rapidly metabolized (20 min. post-injection, 0.56 ± 0.18 pmol/ μ l). Addition of enzyme inhibitors stabilized the ME levels at 2.28 ± 0.15 pmol/ μ l for 30 min.

PEA processing in mammals can be stimulated by a variety of other stimuli, including electrical shock and trauma. The same stimuli were used in the leech and mussel to demonstrate the rapid nature of PEA processing. Electrical stress, repeated shocks to the pedal ganglia of *Mytilus*, resulted in a significant increase in ME levels (3.0 ± 1.2 ng/ml *vs* 6.5 ± 7.5 ng/ml) 10-15 minutes after cessation of the electrical shocks ; they returned to control levels by 30 minutes. This response was similar to that observed with LPS.

Since invertebrate peptide B can be processed just before the MERF sequence, we hypothesized, based on previous studies (33) that this opioid peptide could also be part of the immune response. Indeed, when invertebrate peptide B is cleaved MERF would be released since it is flanked by basic amino acids. In human and invertebrate coelomocytes an immunoregulatory function for MERF has been reported (31,33,34). Indeed MERF exhibits stimulatory effects similar to those of ME ; it induces conformational changes in immunocytes. In this study we found that MERF induce chemotaxis of mussel and human

immunocytes whereas peptide B is not (data not shown). Exposure (Fig 11) of mussel or human immunocytes (10^6 /ml) to MERF (10^{-9} M) for 20 minutes significantly increases the percentage of activated immunocytes : the percentage of motile human granulocytes increased from $8.7 +/- 1.5$ (SEM) to $26.4 +/- 2.7$ and for *Mytilus* immunocytes from $9.3 +/- 2.1$ to $30.6 +/- 3.1$. The heptapeptide could initiate the alignment of invertebrate immunocytes central axis so as to be parallel with a concentration gradient. The heptapeptide activated the cells at low concentrations, acting just like DAMA (an agonist of delta receptor), whereas peptide B could not. Then we try to determine whether MERF act through delta receptor as ME does. In an opioid binding displacement assay (Fig 12), only MERF, not peptide B, displaced 3 H DAMA from *Mytilus* immunocyte membrane suspensions, demonstrating that peptide B is involved in the immune response by its antibacterial activity but not on immunocyte activation. The addition of $100 \mu\text{M}$ thiorphan to the incubation completely inhibited the increased activation of both cell types, demonstrating the significance of NEP in this process as well as a role for MERF in immunocyte activation.

4. DISCUSSION

In mammals, opioid peptides have been implicated in neural, neuroimmune and autoimmunoregulatory signaling. These phenomena have been supported by studies documenting the presence of stereospecific opioid receptors and neuropeptide precursors in immune cells (31,35). Additionally, opioid peptides induce immunocytes chemotaxis as well as they initiate the release of cytokines. ME is now considered as a cytokine (11,24).

In the present study we demonstrate that upon stimulation by LPS, the levels of PEA derived peptides *i.e.* the peptide B, the 5.3 kDa fragment and the ME are significantly increased. As the PEA is present in the hemolymph, in the hemocytes and in the neurones of

non-treated animals, we suggested two possible processing pathways : an intracellular and/or an extracellular processing. Most data in Vertebrates, show that PEA is processed in the intracellular compartment. *In vitro* and *in vivo* analysis underline the implication of Prohormone Converting enzymes (PC) on this PEA processing in Mammals (1, 7). Breslin *et al* demonstrated that furin and PC1/3 appeared to be able to generate peptide B and a 5.3 kDa fragment and that proteolytic processing of PEA by PC 2 could lead to the release of ME and MERF : these data are in good agreement with our results (1). Moreover PC1/3 was shown to be co-present with enkephalin in human immunocytes suggesting its involvement on the PEA processing in these immune cells as well (12,13). All these data are in line with the eventual presence and proteolytic implication of PC on the PEA in leech. Indeed PC are known to cleave the peptidic chains at the C-terminal side of the single monoarginyl or dibasic residues (8)and in these animals ME and peptide B release is due to an enzymatic action at the C-terminal side of the dibasic sites lysine-arginine KR 78-79 and KR 96-97 respectively. Consequently, we suggest a quick release in the leech hemolymph, of the PEA derived product processed by PC and stored in the neurones and/or the hemocytes after a LPS stimulation

Moreover, in this model as well as in mussel, other enzymes such like the NEP and the ACE seemed to also play a role on the processing of the PEA on the extracellular compartment. Indeed the addition of metallopeptidase inhibitors in the hemolymph of stimulated animals generates fragments of PEA not existing without inhibitors. This could be in line with the results found in insects by Isaac team. They demonstrated that insect ACE can cleave peptides by acting at dibasic residues whereas it is usually known to cleave at the N-terminal side of the hydrophobic residues (7).

On the other hand, after extensive purification, we demonstrate that the peptide B is released in invertebrate's hemolymph in first 15 minutes after LPS stimulation, suggesting a quick catabolism of the 5.3 kDa fragment in the hemolymph and/or the massive release of peptide B contained in hemocytes or neurones. This invertebrate peptide B was found to possess a strongly antibacterial towards Gram + bacteria. Of equal importance, is the finding that ME and peptide B are simultaneously released and both play a role in these early immune events. Human and invertebrate immunocytes contain delta 2 opioid receptors that appear to mediate activation of these cells. In this regard, ME can be envisioned to activate immunocytes and provide a chemotactic signal to further stimulate immunocytes recruitment. However, since this process may take many minutes to accomplish, the bactericidal peptide B covers this activation latency period. In this scenario, peptide B is broken down with time, it could release during this time, the heptapeptide MERF. Since we demonstrate that this peptide is able to interact with delta 2 opioid receptors, MERF can keep the rate of immunocyte activity. This hypothesis is supported by previous studies demonstrating an immune activating role for MERF in human and invertebrate immunocytes (33,35). MERF was shown to induce rounded invertebrate immunocytes to become mobile and amoeboid as well as to initiate chemotaxis. This is also supported by the displacement data in the present study and the demonstration that phosphoramidon potentiates the actions of this heptapeptide. Thus, after peptide B is processed in MERF, this heptapeptide give a boost to immunocyte activation and recruitment. In this regard, recruitment of immunocytes is important since they carry the NEP proteolytic enzyme: (16,29). Thus, we conclude that MERF is another opioid signaling molecule that uses delta 2 opioid receptor subtypes for triggering proinflammatory response.

This mechanism is also present in Vertebrates. Indeed, Kowalski demonstrated that ME stimulate the B and T cell proliferation and its degrading fragments, the number of T helper and T cytotoxic cells (11). Kamphuis *et al* demonstrated the increase of PEA mRNA in human circulatory monocytes by th2 cell cytokines, confirming the both presence of opioids and cytokines at the inflammatory site (9,10). Moreover, an important point for the understanding of the significance of such a system in diverse organisms is the fact that surgical trauma and electrical shocks directed to neural tissues provoked the same effect than LPS i.e. an increase of circulating levels of peptide B and ME. Previously, we demonstrated that the electrical shock protocol represented a stress process in *Mytilus*, which activated immunocytes via the secretion of ME (18). We can now add peptide B to this stress response.

We surmise that the co-processing and liberation of peptide B and ME represent a unified neuroimmune protective response to immediate threat to the organism ir-regardless of the form the stimulation takes. Clearly, the above stimuli may be accompanied by bacteria: thus to avoid the complication of a bacterial infection, peptide B is released for either specific bacterial assaults or as a precautionary action, whereas ME stimulates or activates immunocytes during the initial stages of the immune response (Fig 13). With this in mind, the unified neuroimmune response would provide a highly beneficial survival strategy at a time when it is most needed, i.e. at the very beginning of a proinflammatory process.

Taken together, these results suggest that this type of innate immunity is conserved and that derived opioid precursor play an important role in activation of such non-specific immune response.

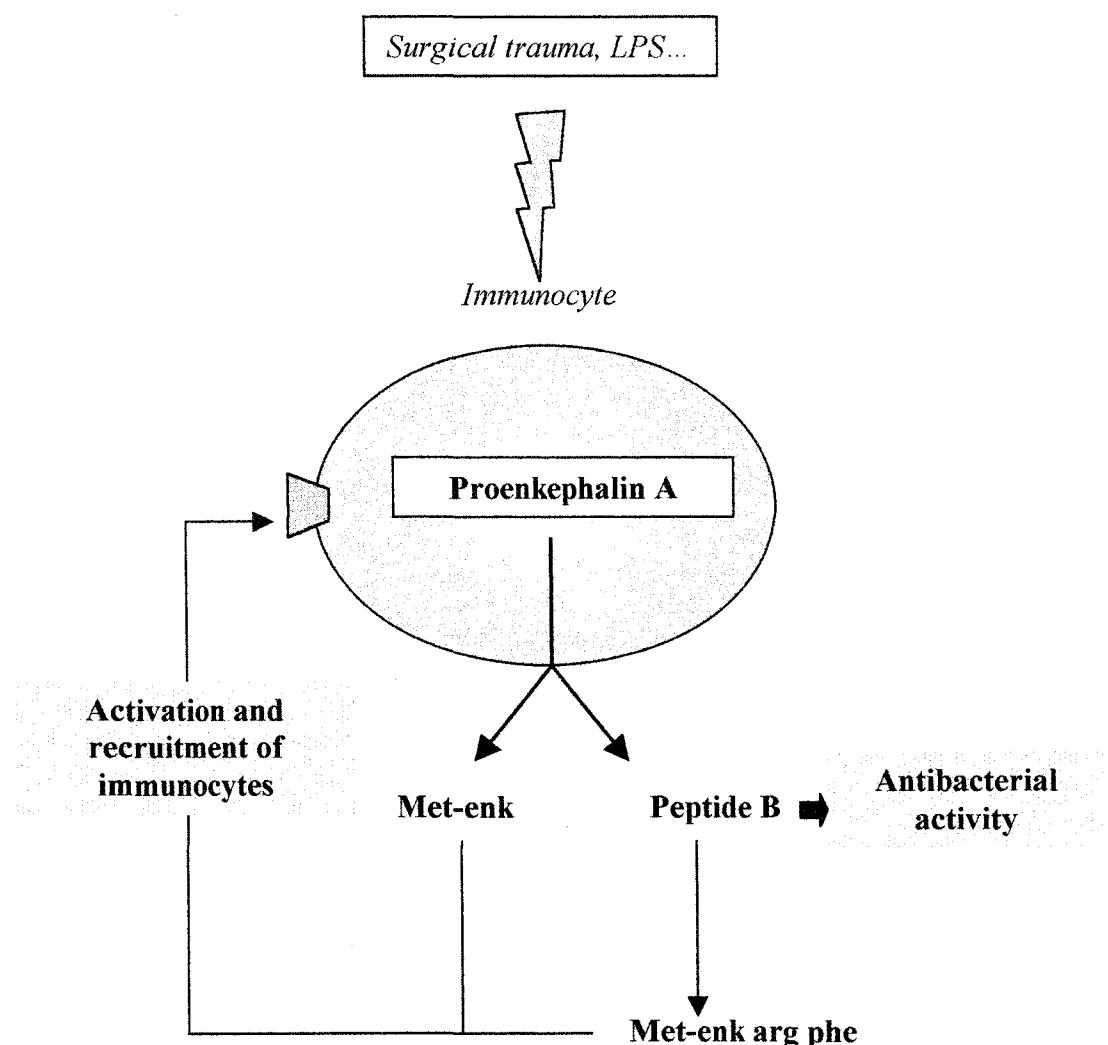


Figure 13 : Illustration for opioid peptides involvement in the immune response.

Invertebrate hemocytes contain opioid precursors such as PEA. Upon an initial stimulus *i.e.* trauma, LPS etc.. smaller bioactive peptides (ME and peptide B) processed by different enzymes (PC, NEP, ACE...) are released. ME can recruit immunocytes. Peptide B plays its antibacterial role and is cleaved in a second time into MERF.

Acknowledgments

The authors are grateful to Annie Desmons, Christos M. Rialas, Federico Casares and for expert technical assistance. The authors would like to express their thanks to Dr. Susan C. Feldman, New Jersey College of Medicine is gratefully acknowledge for thoughtful criticisms and editorial assistance. Also sincere thanks to DR. J. Van Minnen (Dept. of Biology, Vrije Universiteit, Amsterdam, the Netherlands) for his kind gift of the anti-FMRFamide, respectively. This work was supported, in part, by the CNRS, the MNERT, and the following grants: NIMH COR 17138, NIDA 09010 and the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (GBS) and NIH Fogarty INT 00045 (MS and GBS).

Références

- [1] M.B. Breslin, I. Lindberg, S. Benjannet, J.P. Mathis, C. Lazure, N.G. Seidah, Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 27084-27093.
- [2] P. Bulet, Les peptides antimicrobiens de la drosophile, *Med. Sci.* 15 (1999) 23-29.
- [3] P. Bulet, J.L. Dimarcq, C. Hetru, M. Lagueux, M. Charlet, G. Hegy, A. Van-Dorselaer, J.A. Hoffman, A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 14893-14897.
- [4] Y. Goumon, J.M. Strub, M. Moniatte, G. Nullans, L. Poteur, P. Hubert, A. Van-Dorselaer., D. Aunis, M.H. Metz-Boutigue, The C-terminal biphasphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity, *Eur. J. Biochem.* 235 (1996) 516-525.
- [5] Y. Goumon, K. Lugardon, B. Kieffer, J.F. Lefevre, A. Van-Dorselaer, D. Aunis, M.H. Metz-Boutigue, Characterization of antibacterial C-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP 209-237 secreted by stimulates chromaffin cells, *J.Biol.Chem.* (1998) 29847-29856.
- [6] P.M. Hwang, H.J. Vogel, Structure-function relationships of antimicrobial peptides, *Biochem. Cell. Biol.* 76 (1998) 235-246.
- [7] R. Isaac, L. Schoofs, T.A. Williams, D. Veelaert, M. Sajid, P. Corvol, D. Coates, A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I converting enzyme) : the hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide, *Biochem. J.* 330 (1998) 61-65.

- [8] K. Johanning, M.A. Juliano, L. Juliano, C. Lazure, N.S. Lamango, D.F. Steiner, I. Lindberg, Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22672-22680.
- [9] S. Kamphuis, F. Eriksson, A. Kavelaars, J. Zijlstra, M. Van de Pol, W. Kuis, C.J. Heijnen, Role of endogenous pro-enkephalinA-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production, *J. Neuroimmunol.* 84 (1998) 53-60.
- [10] S. Kamphuis, A. Kavelaars, R. Brooimans, W. Kuis, B.J. Zegers, C.J. Heijnen, T helper 2 cytokines induce preproenkephalin mRNA expression and proenkephalin A in human peripheral blood mononuclear cells, *J. Neuroimmunol.* 79 (1997) 91-99.
- [11] J. Kowalski, Immunologic action of [Met5]enkephalin fragments, *Eur. J. Pharmacol.*, 347 (1998) 95-99.
- [12] W. Kuis, P.M. Villiger, H.G. Leser, M. Lotz, Differential processing of proenkephalin A by human peripheral blood monocytes and T lymphocytes, *J. Clin. Invest.* 88 (1991) 817-824.
- [13] J. Lamendola, S.K. Martin, D.F. Steiner, Expression of PC3, carboxypeptidase E and enkephalin in human monocyte-derived macrophages as a tool for genetic studies, *FEBS Lett.* 404 (1997) 19-22.
- [14] V. Laurent, G.B. Stefano, M. Salzet, Leech angiotensin converting enzyme, *Trends in Comparat. Endocrinol. and Neurobiol.*, 839 (1998) 501-503.
- [15] V. Laurent, M. Salzet, Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases, *Regul. Peptides* 65 (1996) 123-131.
- [16] V. Laurent, M. Salzet, Isolation of a neuropeptide-degrading endopeptidase from the leech *Theromyzon tessulatum*, *Eur. J. Biochem.* 233 (1995) 186-191.

- [17] M.K. Leung, S. Le, S. Houston, G.B. Stefano, Degradation of Met-enkephalin by hemolymph peptidases in *Mytilus edulis*, *Cell. Mol. Neurobiol.* 12 (1992) 367-378.
- [18] M.K. Leung, G.B. Stefano, Isolation and identification of enkephalin in pedal ganglia of *Mytilus edulis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (1984) 955-956.
- [19] J. Malecha, M. Verger-Bocquet, G. Tramu, Mise en évidence et évolution au cours du cycle biologique de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motilin porcine dans le ganglion supraœsophagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*, *Can. J. Zoolog.* 67 (1989) 636-640.
- [20] R. Medzhitov, P. Preston-Hulbert, C.A. Janeway, A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 388 (1997) 394-397.
- [21] M.H. Metz-Boutigue, Y. Goumon, K. Lugardon, J.M. Strub, D. Aunis, Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules, *Mol. Cell. Neurobiol.* 18 (1998) 249-266.
- [22] E. Ottaviani, E. Caselgrandi, Neutralendopeptidase-24.11 (NEP)-like activity in molluscan hemocytes, *Peptides*, 18 (1997) 1107-1110.
- [23] G. Patey, J. Rossier, Découverte, anatomie et biosynthèse des différentes familles de peptides opioides endogènes, *Ann. Endocrinol.* 47 (1986) 71-87.
- [24] N.P. Plotnikoff, R.E. Faith, A.J. Murgo, R.B. Heberman and R.A. Good, Methionine-enkephalin a new cytokine-human studies, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 82 (1997) 93-101.
- [25] B. Rubin, R.J. Laffan, D.J. Kotler, E.H. O'Keefe, D.A. De Maio, M.E. Goldberg, SQ 14,225(D-3-mercaptopropanoyl-L-proline), a novel orally active inhibitor of angiotensine-I-converting enzyme, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 204 (1981) 271-282.



- [26] M. Salzet, G.B. Stefano, Invertebrate proenkephalin : δ opioid binding sites in leech ganglia and immunocytes, Brain Research 768 (1997) 224-232.
- [27] M. Salzet, C. Wattez, M.C. Slomianny, Epitope mapping with ELISA of an antibody against oxytocin-like epitope in the sex segmental ganglia of the leech Erpobdella octoculata, Comp. Biochem. Physiol. 104 (1995) 75-81.
- [28] M. Salzet, C. Wattez, J.L. Baert, J. Malecha, J., Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain in the Rhynchobdellid leech *T. tessulatum*, Brain Res. 631 (1993) 247-255.
- [29] M.A. Shipp, G.B. Stefano, L. D'Adamio, S.N. Switzer, F.D. Howard, J. Sinisterra, B. Scharrer, E. Reinherz, Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase, Nature, 247 (1990) 394-396.
- [30] G.B. Stefano, M. Salzet, T.K. Hughes, T.V. Bilfinger, $\delta 2$ opioid receptor subtype on human vascular endothelium uncouples morphine stimulated nitric oxide release, Int. J. of Cardiol. 64 (1998) 543-551.
- [31] G.B. Stefano, B. Scharrer, E.M. Smith, T.K. Hughes, H.I. Magazine, T.V. Bilfinger, A. Hartman, G.L. Fricchione, Y. Liu, M.H. Makman, Opioid and opiate immunoregulatory processes, Crit. Rev. In immunol. 16 (1996) 109-144.
- [32] G.B. Stefano, B. Scharrer, Endogenous morphine and related opioids, a new class of chemical messengers, Adv. Neuroimmunolog. 4 (1994) 57-68.
- [33] G.B. Stefano, M.A. Shipp, B. Scharrer, A possible immunoregulatory function for Met-Enkephalin-Arg6-Phe7 involving human and invertebrate granulocytes, J. Neuroimmunol. 31 (1991) 97-103.

- [34] G.B. Stefano, E.R. Smith, T.K. Hughes, Opioid induction of immunoreactive interleukin-1 in *Mytilus edulis* and human immunocytes : and interleukin-1-like substance in invertebrate neural tissue, *J. Neuroimmunol.* 32 (1991) 29-34.
- [35] G.B. Stefano, P. Cadet, B. Scharrer, Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes : Evidence for a subtype of δ receptor, *Immunology* 86 (1989) 6307-6311.
- [36] A. Turner, M.K. Leung, G.B. Stefano, Peptidases of significance in neuroimmunoregulation, *Neuropeptides in neuroimmunology* eds Springer-Verlag, pp152-169.
- [37] D.A. Weigent, J.E. Blalock, Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system, *Neuroimmunoendocrinology* 69 (1997) 1-30.
- [38] G.W. Welling, A.J. Scheffer, S. Welling-Wester, Determination of enzyme activity by high-performance liquid chromatography, *J. chromatogr. B.* 659 (1994) 209-225.
- [39] F. Zhong, X.Y. Liu, S.L. Yang, G.B. Stefano, C. Fimiani, T.V. Bilfinger, Methionine enkephaline stimulates interleukin 6 mRNA expression human plasma levels in coronary artery bypass grafting, *Int. J. of Cardiol.* 64 (1998) 553-559.

CHAPITRE II

Implication des peptides dérivés de la proenképhaline A et des chromogranines dans la réponse inflammatoire des patients opérés à cœur ouvert

L'extrême conservation des peptides dérivés de la PEA *i.e.* enkélytine/peptide B et des peptides opioïdes suggère que ces molécules interviennent dans la réponse innée des vertébrés selon un mécanisme proche de celui décrit précédemment chez la sangsue et la moule. Dans cette optique, une étude a été menée chez l'homme afin de déterminer le rôle de ces peptides dans la réponse inflammatoire qui accompagne les opérations à cœur ouvert. En effet, au cours de ce type d'opération, les patients sont sujets à une réaction systémique de phase aiguë dont les symptômes, et c'est en cela que ce modèle suscite notre intérêt, sont quasi-identiques à ceux décrits lors d'un choc endotoxique. Différents facteurs sont à l'origine de cette réaction inflammatoire, le principal étant le stress et les traumatismes occasionnés aux cellules sanguines lors du contact du sang avec les surfaces artificielles de l'appareillage assurant la circulation extracorporelle. Cette « agression » des composants sanguins entraîne une activation du complément et la libération massive d'un ensemble de molécules dont des cytokines pro inflammatoires telles que l'IL-6 ou encore des peptides antibactériens comme la BPI et beaucoup d'autres médiateurs hormonaux ou immunitaires (Fransen Erik 1998). Récemment, Zhong et coll. ont mis en évidence une augmentation de met-enk plasmatique qui allait de pair avec celle d'IL-6 lors de l'opération [Zhong, 1998 #189]. Des études complémentaires ont en effet montré que la met-enk stimulait la libération d'IL-6 par les monocytes. En plus d'activer la libération de cytokines, la met-enk de vertébrés possède des capacités chémoattractantes vis à vis des immunocytes [Bilfinger, 1993 #190][Stefano, 1989]

#191]. Il apparaît donc clairement que l'un des dérivés de la PEA participe à la réaction inflammatoire liée à l'opération à cœur ouvert. Dans l'article présenté, nous avons dans un premier temps recherché et mis en évidence la présence d'enkélytine et de peptide B dans le sang de patients opérés. Des tests antimicrobiens ont révélé que les deux peptides étaient actifs contre les bactéries à Gram positif. Par la suite, des dosages sur des prélèvements effectués à différents moments de l'opération ont montré une augmentation plasmatique de peptide B et d'enkélytine. Cette libération rapide se produit dès l'incision de la peau du patient et est suivie par la libération de met-enk RF. Ceci suggère un mécanisme de dégradation du peptide B proche de ce qui a été décrit chez la moule. Des expériences menées *in vitro*, ont confirmé cette hypothèse en montrant que le clivage du peptide B par la NEP exprimée à la surface des immunocytes assurait la libération de met-enk RF capable de recruter les granulocytes humains.

Ces résultats qui mettent en évidence un mécanisme immunitaire inné conservé à la fois chez la sangsue, la moule, et chez l'homme, ont été publiés dans « Journal of Neuroimmunology » (109(2000) 228-235).

En complément de ce travail, nous avons recherché dans le sang de patients opérés à cœur ouvert, la présence d'autres peptides antimicrobiens également issus de précurseurs de neuropeptides : la sécrétolytine et la vasostatine (voir Généralités page). Les dosages effectués ont révélé une augmentation plasmatique de ces peptides dans les mêmes temps que ceux observés pour le peptide B et l'enkélytine. Ces résultats, couplés à la mise en évidence d'une origine immunitaire de ces peptides font l'objet d'un article soumis à Blood « Presence of chromogranin antimicrobial peptides in plasma during coronary artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides » (en cours de révisions).

The presence of antibacterial peptides in human plasma during coronary artery bypass surgery

Aurélie Tasiemski ^a, Michel Salzet ^a, Herbert Benson ^b, Gregory L. Fricchione ^b, Thomas V.Bilfinger ^c, Yannick Goumon^d, Marie-Hélène Metz-Boutigue ^d, Dominique Aunis ^d, and George B. Stefano ^b

Running Title: Innate antibacterial peptide response in surgery

Key Words : Antibacterial peptides, Coronary artery bypass grafting, peptide-B, Enkelytin, Enkephalin, Heptapeptide, Opioids, Proenkephalin

a. Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, UPRESA CNRS 8017, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

b. Neuroscience Research Institute, State University of New York/ College at Old Westbury, P.O. Box 210, Old Westbury, New York, 11568.

c. Cardiac Research Program, Department of Surgery, Health Sciences Center, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York, 11794.

d : INSERM U 338 de Biologie de la Communication Cellulaire, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.

To whom correspondence should be addressed to G.B.Stefano, Neuroscience Research Institute, State University of New York/ College at Old Westbury, P.O. Box 210, Old Westbury, New York, 11568. Phone-516-876-2732, Fax 2727, email: gstefano@li.net

ABSTRACT

Antibacterial peptides, found in both invertebrates and vertebrates, represent a potential innate defense mechanism against microbial infections. However, it is unknown whether this occurs in humans during surgery. We looked for evidence of release of antibacterial peptides during coronary artery bypass grafting (CABG). We used immunological techniques and antibacterial assays combined with high-performance gel-permeation chromatography, reversed-phase HPLC, N-terminal sequencing and comparison with synthetic standards to characterize the bisphosphorylated peptide B/enkelytin. We show the presence of anionic antibacterial peptide, the bisphosphorylated peptide B/enkelytin which correspond to the bisphosphorylated C-terminal part of proenkephalin A (PEA), from the sera of patients undergoing CABG. Time-course studies show that peptide B/enkelytin is initially present at low level in sera and is then released in increased amounts just after skin incision. Antibacterial assays confirmed that the peptides specifically target gram-positive bacteria. We also demonstrate that peptide B/enkelytin is metabolized *in vivo* to the opioid peptides methionine-enkephalin-Arg-Phe and methionine-enkephalin, peptides that we show have granulocyte chemotactic activity. These findings suggest that in humans, surgical incision leads to the release of antibacterial peptides. Furthermore, these antibacterial peptides can be metabolized into compounds that have immune-activating properties.

INTRODUCTION

Recurring reports of bacterial strains resistant to our most potent antibiotics underscore the importance of developing new classes of antimicrobial compounds (McCormick 1998). Antibacterial peptides, found in both invertebrates and vertebrates, represent a potential innate defense mechanism to combat microbial infection (Lehrer and Ganz 1999). For example, cytotoxic T-cells synthesize the antibacterial peptide granulysin, which can kill pathogens like *Mycobacterium tuberculosis*, and the antibacterial peptide β-defensin is induced at sites of inflammation in mammalian epithelia (Stenger, Hanson et al. 1998) (Schonwetter, Stolzenberg et al. 1995). A better understanding of the biology of these peptides may facilitate their development into useful therapeutic agents.

Antibacterial peptides have been isolated from a wide variety of organisms, including plants, invertebrates and vertebrates (Ganz and Lehrer 1999). Most of these peptides are cationic, having a net positive charge of at least +2 that allows them to bind to bacterial surfaces. In addition, however, two anionic peptides, enkelytin and bisphosphorylated peptide B which correspond to the bisphosphorylated C-terminal part of PEA, isolated from invertebrates and vertebrates, has recently been shown to have antibacterial activity against Gram-positive bacteria, including *Staphylococcus aureus* (Goumon, Strub et al. 1996; Goumon, Lugardon et al. 1998).

METHODS

Patients

After approval by the institutional review board for human experimentation, informed consent was obtained from 6 patients undergoing elective CABG (3 men, 3 women, mean age 61 years). Their only known disease process was coronary arteriosclerosis. Patients were

excluded if they had chronic afflictions such as diabetes, cancer, or AIDS, as well as acute illnesses such as pneumonia or a recent myocardial infarction. 5 cc of blood was removed from an arterial catheter placed in a radial artery at the time points indicated. The specimens were taken immediately on ice to the lab, where they were spun down, and the plasma stored at - 170°C until analyzed.

Antibodies

Polyclonal antisera used in competitive enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) assays were made as previously described (Salzet, Bulet et al. 1996; Goumon, Lugardon et al. 1998) by immunizing rabbits with synthetic peptides corresponding to bovine proenkephalin-A (PEA) 224-237 (the C-terminal part of enkelytin). This antibody-recognized peptide B/enkelytin (bisphosphorylated bovine fragment 209-237/239), exhibited 10% cross-reactivity with methionine enkephalin (Met-Enk) and 5% with FMRF-amide. The cross-reactivity of the Met-Enk antibody used is less than 3% for Met-Enk-Lys, Met-Enk-Lys-Arg, Met-Enk-Arg-Phe, Leu-Enk, β-endorphin or dynorphin. The polyclonal antiserum against FMRFamide is a kind gift from Dr. Van Minnen (Department of Biology, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands).

Purification and analysis of peptides

Antibacterial peptides

The purification procedure for antibacterial peptides is the same as described previously (Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000). For the HPGC column (Ultraspherogel, 7,5 x 300 mm, SEC2000, Beckman) the standards used were trypsin inhibitor (20 kDa), α-lactalbumin (14.4 kDa), hirudin (7kDa), defensin (3.4 kDa), adrenocorticotropic hormone (4.5

kDa), melanocyte stimulating hormone (2.5 kDa) and angiotensin II (1.46 kDa). After the final purification step, the eluent was concentrated by freeze-drying and 0.5 ml aliquots were tested by dot immunobinding assay (DIA) and for antibacterial activity. The purity of each antibacterial peptide was finally checked by capillary zonal electrophoresis (CZE). All HPLC purifications were performed with a Beckman Gold HPLC system equipped with a photo diode array detector (Beckman 168).

Prior to N-terminal Edman degradation, aliquots of each isolated peptide were checked by capillary zonal electrophoresis, DIA (Salzet, Verger-Bocquet et al. 1996) with specific antisera, antibacterial activity assay (Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000), and co-elution in reversed-phase HPLC with synthetic peptides. For the CZE, samples (2 nmol) were injected under vacuum into a model PACE 2000 capillary electrophoresis system (Beckman) equipped with a fused silica capillary (72 cm length). Separation from anode to cathode was carried out in 20 mM citrate buffer at pH 2.5 with a voltage of 20 kV, at 30°C. Capillary effluent was monitored by its U.V. absorption at 200 nm. Peptides were analyzed by co-elution in reversed-phase HPLC and HPGPC (SEC 2000, Beckman). MALDI-TOF measurements were performed as previously described (Salzet, Verger-Bocquet et al. 1996). First amino acid residues were obtained by microsequencing of the purified peptide (Salzet, Verger-Bocquet et al. 1996). The complete amino acid sequence of human peptideB/enkelytin was retrieved from the Swiss-Prot or GenBank data bases.

Opioid peptides

Opioid peptides were isolated from cell-free plasma as previously described (Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000). After the initial purification using a Sep-Pak C18 (Waters, Boston, Mass) cartridge, the eluent was lyophilized and dissolved in 300 µl of 10%

acetonitrile in 0.1% TFA and fractionated by HPLC (BAS HPLC with a Brownlee RP-300 C8 reversed-phase column (4.6 x 250 mm)). Under these chromatographic conditions the retention time of Met-Enk was 10.5 min. Met-Enk-was titrated by RIA (Immuno Nuclear Corp.) in the Met-Enk fraction obtained by HPLC. The results of duplicate runs were averaged. Total Met-Enk in each group was quantified by assaying additional aliquots of diluted samples. Antiserum against Met-Enk was prepared in the laboratory with the same procedure described earlier and it exhibits 3% cross-reactivity with Leu-Enkephalin. For Met-Enk-arg-phe titration both anti-Met-Enk and anti-FMRFamide were used and titration was done using competitive ELISA.

Antibacterial assays

Bacteria (*Micrococcus luteus* (IFO12708) and *Escherichia coli* (JM109) were grown in LB (Luria bertani) media (LB : 1% BactoTrypton,0.5% NaCl, W/V ; pH 7.2) overnight at 37°C with agitation (1 colony in 3ml of LB) to an OD₆₀₀ of 0.4. They were then diluted 230 µl in 50 ml LB-Agar (0.015% agar in LB), placed in Petri dishes and stored at 4°C. 5 to 0.5 µl of sample were plated on the nutrient agar containing bacteria and incubated overnight. Antibacterial activity is recognized by zone of inhibition of bacterial growth on the deposit (Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000). Antibacterial activity was also monitored by a liquid growth inhibition assay according to Bulet *et al* (Bulet, Dimarcq et al. 1993).

Granulocyte chemotaxis and activation assays

Human granulocytes for cellular analyses were obtained from patient volunteers at Long Island Blood Services (Melville, NY, USA). Cells were separated by the standard Ficoll-Hypaque method and they were washed three times in RPMI medium. Briefly, cells

were placed at the extreme right of a petroleum jelly ring in saline in 100- μ l volume on a sterile glass slide and then covered with a glass cover slip (Stefano and Bilfinger 1993). At the right edge of a the petroleum jelly ring, an opening was made and a 100- μ l (in RPMI) volume of the respective signal molecule was added. The solution moves under the slide by capillary action as determined with control experiments utilizing methylene blue and timing how long it took the dye to reach the opposite side. This procedure provides for a concentration gradient as also noted by the dye density readings that are denser at the drop origin than at the edge of the distant area of the Vaseline ring. Experimental measurements were initiated at this time. The pharmacological effects of exposure of granulocytes to opioid peptides were determined as previously described (Stefano, Cadet et al. 1989). In this regard, in chemotaxis over 30% of the cells had their axis in parallel with the concentration gradient whereas in chemokinesis less than 7% exhibited the axis alignment. Thus, chemotaxis was differentiated from chemokinesis by determining the axis of movement of individual cells using commercial cell analysis software (American Innovision, San Diego, CA, USA) (Stefano, Cadet et al. 1989; Stefano, Leung et al. 1995). 35 to 46 activated cells, were observed for each 400 μ m-viewing diameter; four viewing diameters were observed per slide. The entire process was repeated three more times and the resulting mean (\pm SEM) was graphed. The variation for individual readings was between 5% and 7%. Chemokinesis is identified as a lack of general cell movement toward a concentration gradient and a lack of correlation of the cell axis with that same gradient (*i.e.*, not parallel). Thus, when the activation level is much higher than the axis-alignment, *i.e.*, random non-alignment, this suggests that the chemical signal may initiate chemokinesis.

The degree of cellular activation was determined as noted elsewhere (Stefano, Leung et al. 1995). Briefly, under phase contrast optics, round cells appear light and ameboid cells dark.

The system, manually tuned, identifies these color differences and the proportion of each is used as an index of activation. Activated cells exhibit form factors indicating an ameboid shape whereas inactive-cell exhibit form factors indicating a round shape.

Student's t-test was used to compare the values obtained from cells exposed to drugs or vehicle. In order to reduce inaccuracies due to varying levels of spontaneous immunocyte activation, controls were run for each drug treatment. In addition, observers were unaware of the experimental situations.

RESULTS

Release of antibacterial peptides during surgery

Using dot immunobinding assays (DIA) with specific antisera, we detected immunoreactivity in the plasma of patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) for several peptides: the phosphorylated and non phosphorylated forms of peptide-B/enkelytin, Met-Enk and Met-Enk-Arg-Phe.

To characterize the secretion of these peptides before and during the surgical procedure, we quantified all peptides by ELISA assay (Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000) (Fig. 1). ELISA assays show that all forms peptide B/ enkelytin (*i.e.*, non and phosphorylated forms) and Met-Enk levels peak immediately upon skin incision ($P < 0.01$ ANOVA; Fig. 1). In contrast, Met-Enk-Arg-Phe (representing the C terminal part of peptide B) peaked 15 min after the start of CABG, 45 minutes after the first peak ($P < 0.01$ ANOVA). Interestingly, peptide B/enkelytin level decreased 15 min after termination of CABG (compared to peak levels; $P < 0.01$ ANOVA). The order of the appearance of these peptides corresponds to the processing order in PEA, that is going from larger peptides to smaller ones over time.

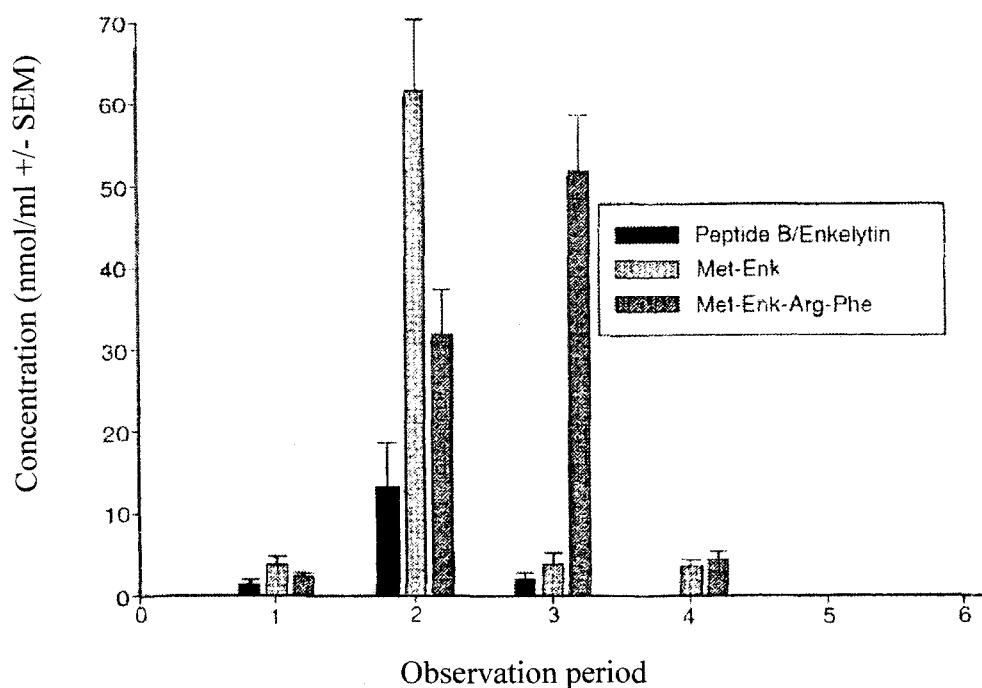


Figure 1 : Time course of antibacterial peptide release during CABG. Peptide B/enkelytin, Met-Enk and Met-Enk Arg Phe immunoreactivities in plasma during CABG. The amount of each immunoreactive peptide was determined by competitive ELISA. Observation periods : 1. awake, before induction of anesthesia. 2. 15 min. after induction of anesthesia (skin incision). 3. 15 min. after the start of cardiopulmonary bypass (CPB). 4. 15 min after termination of CPB (6 hours later). 5. 24 hrs after termination of surgery. Determinations were performed in triplicate. Observation levels between periods 2 and 3 are significant ($P < 0.01$) by ANOVA.

Since some of the antibacterial peptides appear at the time of anesthetic exposure, we attempted to duplicate this exposure process *in vitro* to determine whether the anesthetic exposure itself led to release of the peptides into the plasma. Following exposure of 10^6 white blood cells /ml (total 5 ml volume; cells obtained from the Long Island Blood Service Center, Melville, NY) to fentanyl (60 nM, considered a high dose), the anesthetic agent, no Met-Enk (metabolite of PEA) immunoreactivity was detected in the medium. Exposure of the same type of cells to lipopolysaccharide (1 mM), however, resulted in Met-Enk levels of 14.2 ± 3.6 nmol/ml of medium, indicating PEA processing as well as its presence in these cells (repeated in triplicate; $P < 0.01$ ANOVA). Interestingly, in invertebrates lipopolysaccharides or tissue cutting releases the antibacterial peptide enkelytin as a result of peptide B processing, suggesting that the release of antibacterial peptides can also be due to mechanical insult (Stefano, Salzet et al. 1998; Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000). This suggests that in our study, the surgical incision itself may represent the primary stimulus for the release of the antibacterial peptides.

Purification, characterization and sequencing of peptides

To further determine the identity of the peptides and their antibacterial characteristics, the respective peptides were purified from serum. After an acidic crude extract each sample, coming from different patients at different times of experiment, was analyzed in a antibacterial test. As seen in figure 2, antibacterial activity against Gram positive bacteria was found and present at different levels depending on the CABG observation period. In this regard, it peaked just after the skin incision, coinciding with the ELISA test presence and peaking of peptide B/enkelytin (Fig. 1). Again, before CABG the antibacterial assay appears weak, coinciding with the low level of peptide B/enkelytin (Figs 1 and 2A). Nevertheless, we

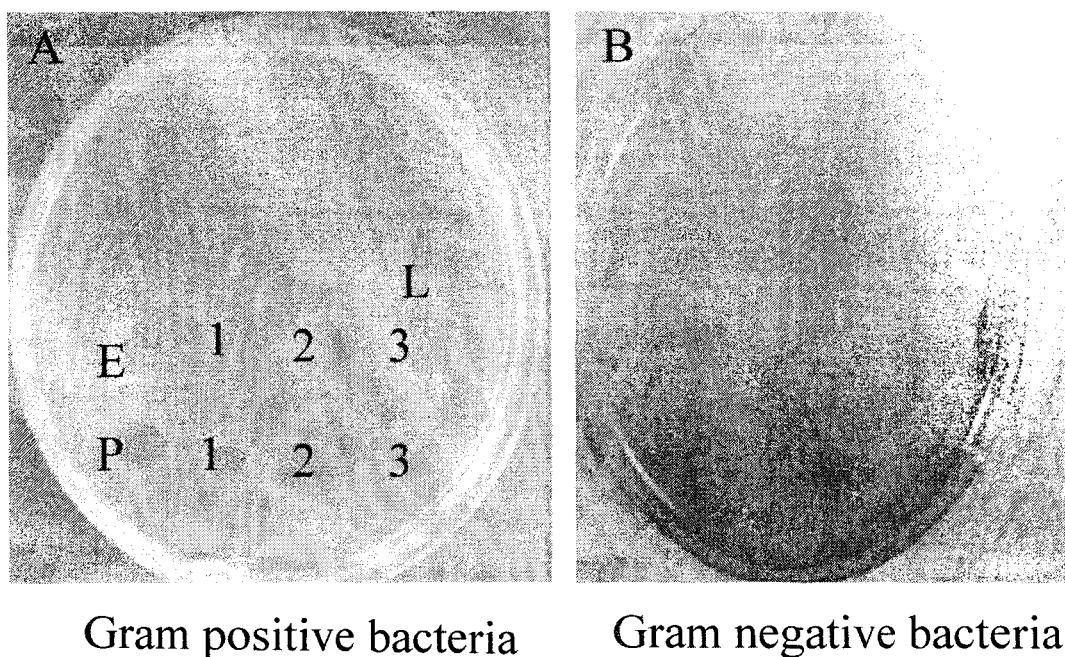


Fig 2 : Representative antibacterial test on Gram positive and Gram negative bacteria of plasma from patients at different steps of the experiment . Bacteria *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli* were bred on LB (Luria Bertani). Growth was overnight at 37°C under shaking (one colony for 3 ml of LB). At 0.4 optic density at 600 nm, they were diluted 230µl for 50 ml LB-agar. This material is then placed on Petri dishes and stored at 4°C. Samples (5µl have been deposit) were plated on nutrient agar containing bacteria then incubated overnight with the bacterial culture. The dark circle indicates zone of bacterial growth inhibition. **A**: test on *Micrococcus luteus* : **1**: awake, before induction of anesthesia. **2** : 15 min. after induction of anesthesia (skin incision). **3** : 15 min. after the start of cardiopulmonary bypass (CPB). **4** : 15 min after termination of CPB (6 hours later). **5** : 24 hrs after termination of surgery. **E** : 1 µl of sample 3 after 50% acetonitrile elution from Sep-Pak. **P** : 1µl of sample obtained at the final step of purification. **L**: Leech peptide B (positive control). **B**: test on *E. coli* of the fractions obtained at the final step of purification of the human peptide B/ enkelytin (1µl).

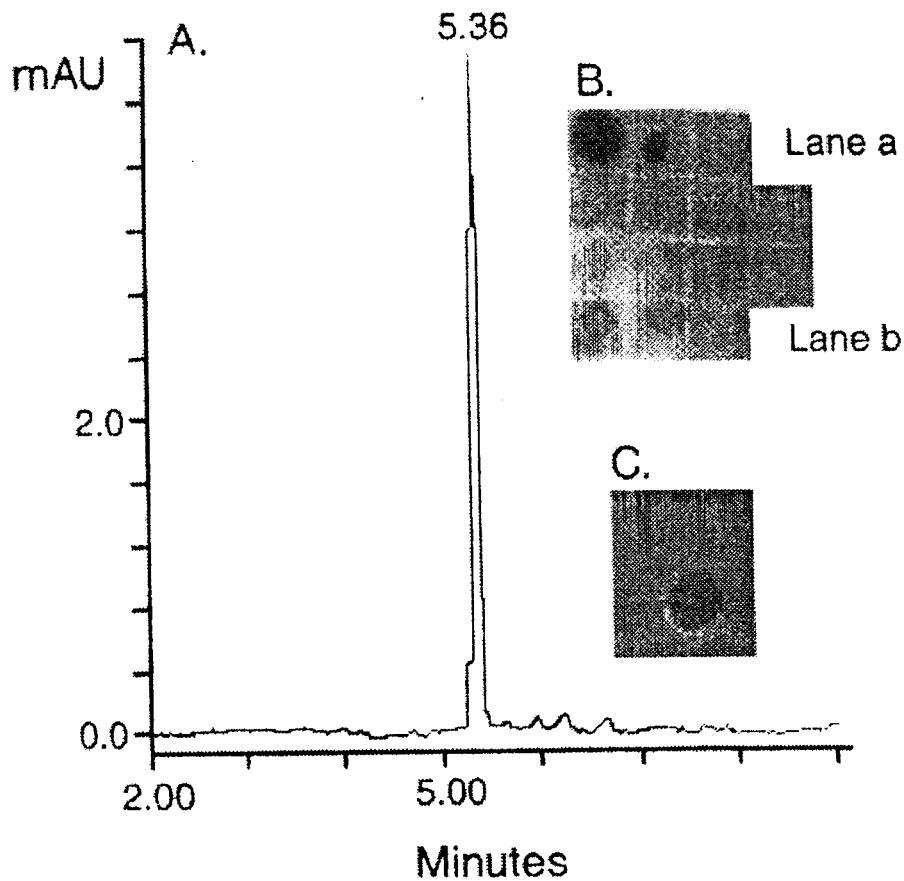


Figure 3: Characterization of enkelytin. (A) Capillary zone electrophoresis of isolated enkelytin from human plasma. Analyses were performed on a 72 cm capillary in 20 mM citrate buffer at pH 2.5. (B) DIA of synthetic enkelytin (standard 10^{-3} M to 10^{-5} M lane a), after sep-pack prepurification and at the final step purification (lane b). (C) Antibacterial activity of the purified human plasma antibacterial peptide. The dark circle indicates zone of bacterial growth inhibition.

can not conclude that this activity is essentially due to peptide B/enkelytin. Other antimicrobial peptides like defensin or cathelicidin might probably be released in the same time (Panyutich, Panyutich et al. 1993; Lerrick, Hirata et al. 1994).

Each sample was then individually subjected to biochemical analysis to further confirm its identity. After HPLC, we identified a single immunoreactive zone corresponding to peptides with a molecular mass ranging between 4.5 and 3.5 kDa and immunoreactive to peptide B/enkelytin, and anti-Met-Enk and an additional one less than 1 kDa immunoreactive to anti-Met-Enk (data not shown), which correlates with the known molecular weights of the peptides (6, 21) (enkelytin - Mr. 3.5 kDa; peptide B - Mr. 3.7 kDa; Met-Enk - Mr. 0.57 kDa). After controlling the purity of the peptides by capillary zonal electrophoresis (Fig. 3A), N-terminal sequencing (first five residues) was undertaken (Table 1). Based on these different experiments: specific antibody recognition, mass determination by high-performance gel-permeation chromatography (HPGPC), co-elution experiments with synthetic peptides, N-terminal sequencing, biological activity, and in comparison to the human PEA sequence, we deduced the complete sequence of the human peptides (Tables 1 and 2) These results show that the peptides purified from human plasma samples are the same compounds as first isolated from bovine adrenal medulla (Aunis 1998), in human polymorphonuclear secretions (Goumon, Lugardon et al. 1998) and in invertebrates (Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000).

Antibacterial activity of purified peptides

Following peptide purification and identification, the antibacterial profile of peptide B/enkelytin was determined against one Gram-positive and one Gram-negative bacterial strain. Peptide B/ Enkelytin acted only against Gram-positive bacteria, in agreement with

Peptide	Immuno-reactivity to	Antibacterial activity towards	Mass measurement	Co-elution	N-terminal sequence
			After HPGPC (kDa)	With synthetic	
Peptide B /enkelytin	Anti-enkelytin Anti-Met-Enk Anti-FMRFamide	Gram +	3.5	Peptide B /enkelytin	FAEALP

Table 1 : Identification and of human antibacterial peptide B/enkelytin

Peptides	Sequences
Met-Enk	<i>YGGFM</i>
Met-Enk Arg Phe	<i>YGGFMRF</i>
Peptide B	<i>FAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF</i>
Enkelytin	<i>FAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFM</i>

Table 2 : Deduced human antibacterial and opioid peptide sequences.

The sequences were deduced by antisera recognition, antibacterial spectra, N-terminal sequence, synthetic peptide co-elution and databank sequence comparison.
 In bold (sequence determined) and in italic (the epitopes recognized by the different antisera).

previous biochemical characterizations (Goumon, Strub et al. 1996). Purified Peptide B/enkelytin showed antibacterial activity against *M. luteus* in the micromolar range (0.2-0.4 μM) as previously demonstrated as well (Goumon, Lugardon et al. 1998). In contrast, the peptide B metabolite Met-Enk-Arg-Phe did not have antibacterial activity (see below) as described for Met-Enk (Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000).

Immunocyte activation by opioid peptide precursor metabolites

Peptide B contains within its sequence the opioid peptide Met-Enk-Arg-Phe with a pair of basic amino acids at its N-terminal end that represents the site of enzymatic processing (Shipp, Stefano et al. 1990; Stefano, Shipp et al. 1991). Based on these studies, we hypothesized that this opioid peptide could also be part of the initial immune response. We found that while peptide B is antibacterial, its metabolite, the opioid peptide Met-Enk-Arg-Phe is not. In agreement with our earlier studies (Stefano, Shipp et al. 1991), we found that rather than being antibacterial, Met-Enk-Arg-Phe, acting through the δ opiate receptor, is significantly chemotactic for granulocytes, simultaneously stimulating conformational change as well *i.e.*, activation (going from round to an ameboid shape; table 3) at nanomolar concentrations (Stefano, Shipp et al. 1991). Peptide B in presence of the neutral endopeptidase inhibitor phosphoramidon, is not chemotactic nor can it stimulate conformational change (table 3). These results clearly differentiate between the antibacterial activity of peptide B and the granulocyte-activating property of its metabolite, the opioid peptide Met-Enk-Arg-Phe.

To further elucidate the role of these peptides in immune function, we incubated purified peptide B (10^{-6} M) with human granulocytes ($10^6/\text{ml}$) expressing neutral

Treatment	Agent (nM)	% Activation± S.E.M	% Axis alignment± S.E.M
Control		7.6±2.1	1.9±0.4
Peptide B ^b	1	9.5±2.7	2.3±0.5
Peptide B ^b	0.5	8.8±2.1	2.1±0.6
Peptide B ^b	0.1	8.9±2.2	2.2±0.6
Control		8.7±1.5 ^d	2.1±0.5 ^d
Peptide B ^c	1	26.4±2.7 ^d	24.3±4.1 ^d
Peptide B ^c	0.5	13.7±2.3 ^d	8.3±1.8 ^d
Met-Enk-Arg-Phe	1	43.2±3.6 ^d	37.2±4.8 ^d
Met-Enk-Arg-Phe	0.5	24.8±2.1 ^d	19.4±3.0 ^d
Met-Enk-Arg-Phe	0.1	9.1±2.9	4.3±1.6

Table 3 : Peptide B does not induce granulocyte conformational change or chemotaxis. Met-enk Arg-Phe exhibits granulocytes chemotactic and conformational changing actions as determined by computer-assisted image analysis and the commercially available Tracksh Program (American Innovision) following a 20-min. incubation with the respective agents. Each test involved from 70 to 87 cells replicated 5 times and the mean +/- SEM noted.

^b preparations were performed in the presence 1mM phosphoramidon (a potent NEP inhibitor)

^c indicates without enzyme inhibitor

^d ANOVA P<0.5 level of confidence

endopeptidase 24.11 (NEP) (Shipp, Stefano et al. 1990). Following exposure of the cells to purified peptide B for 20 minutes, the percentage of activated immunocytes increased significantly with cells exhibiting form factors below 0.5, from a spontaneous level of $8.7 \pm 1.5\%$ (SEM) to $26.4 \pm 2.7\%$ ($P < 0.005$ Students T-test, each condition had its own control). The addition of 1 mM phosphoramidon (a potent NEP inhibitor) to the incubation completely inhibited the increased activation, suggesting the role of peptide B processing in granulocyte activation. These results demonstrate that in response to tissue damage, peptides with both antimicrobial and immune-stimulating function are released into the bloodstream and that they originate from an opioid precursor.

DISCUSSION

We demonstrate here the presence and the release of the naturally occurring antibacterial peptides enkelytin/peptide B into human plasma immediately after the start of CABG. In this regard, these same peptides have been found in the hemolymph of invertebrates, animals that are 500 million years divergent in evolution from man, after bacterial and surgical challenge (Tasiemski, Verger-Bocquet et al. 2000). In mammals, they have been found in wound fluids and in polymorphonuclear secretions after infections (Goumon, Lugardon et al. 1998). In these fluids, these antibacterial peptides are active and quickly released (15 min after bacteria challenge) as is also the case in invertebrates supporting the present findings in human plasma. Thus, based on our activity studies, we surmise that peptide B/enkelytin is active if free in plasma and released higher concentrations as a result of trauma, despite the presence of apolipoproteins or serum albumin that are known to be peptide scavengers. Supporting this view is the fact that apolipoproteins and serum albumin can act as carrier for the antibacterial peptides and may also serve as reservoir for them

(Sorensen, Bratt et al. 1999). In the present report we also hypothesized that peptide B is further metabolized to the opioid peptide Met-Enk-Arg-Phe, and that this peptide has immune-activating functions (fig 4). Taken together, as first hypothesized elsewhere, the sequential presence of peptides with both antibacterial and immunocyte-activating activities represents an initial neuroimmune protective response to an immediate threat (Stefano, Salzet et al. 1998).

In this regard, we surmise that the surgical incision represents the stress stimulus. The peptides we identified in this study, are contained within chromaffin granules in cells of the adrenal medulla (Goumon, Strub et al. 1996; Aunis 1998). Chromaffin cells are innervated by preganglionic fibers conveyed by the splanchnic nerves which pass through coeliac and renal sympathetic nerve plexuses and are under the control of stress-sensitive supra spinal centers in the brain (Aunis 1998). Thus, the increases in peptide levels we observe may be due to release of adrenal chromaffin granules caused by a systemic stress response. Additionally, some neuronal cell bodies located in sensory neurons of dorsal root ganglia can be activated by sensory receptors located in the skin, suggesting that incision may cause the release of these peptides from the adrenal medulla.

Interestingly, another source of these antibacterial peptides may be the skin itself (Nissen, Lund et al. 1997), possibly released by macrophages located in the dermis. In fact, several epithelial peptide antibiotics are constitutively expressed; others are inducible either by the presence of microorganisms or endogenous proinflammatory cytokines (Huttner and Bevins 1999; Schroder 1999).

We cannot, however, exclude the possibility that peptide B/enkelytin may be directly derived from proenkephalin expressed in immunocytes. In fact, recent work has shown that macrophages express proenkephalin mRNA, PC1/3 (LaMendola, Martin et al. 1997) and PC2

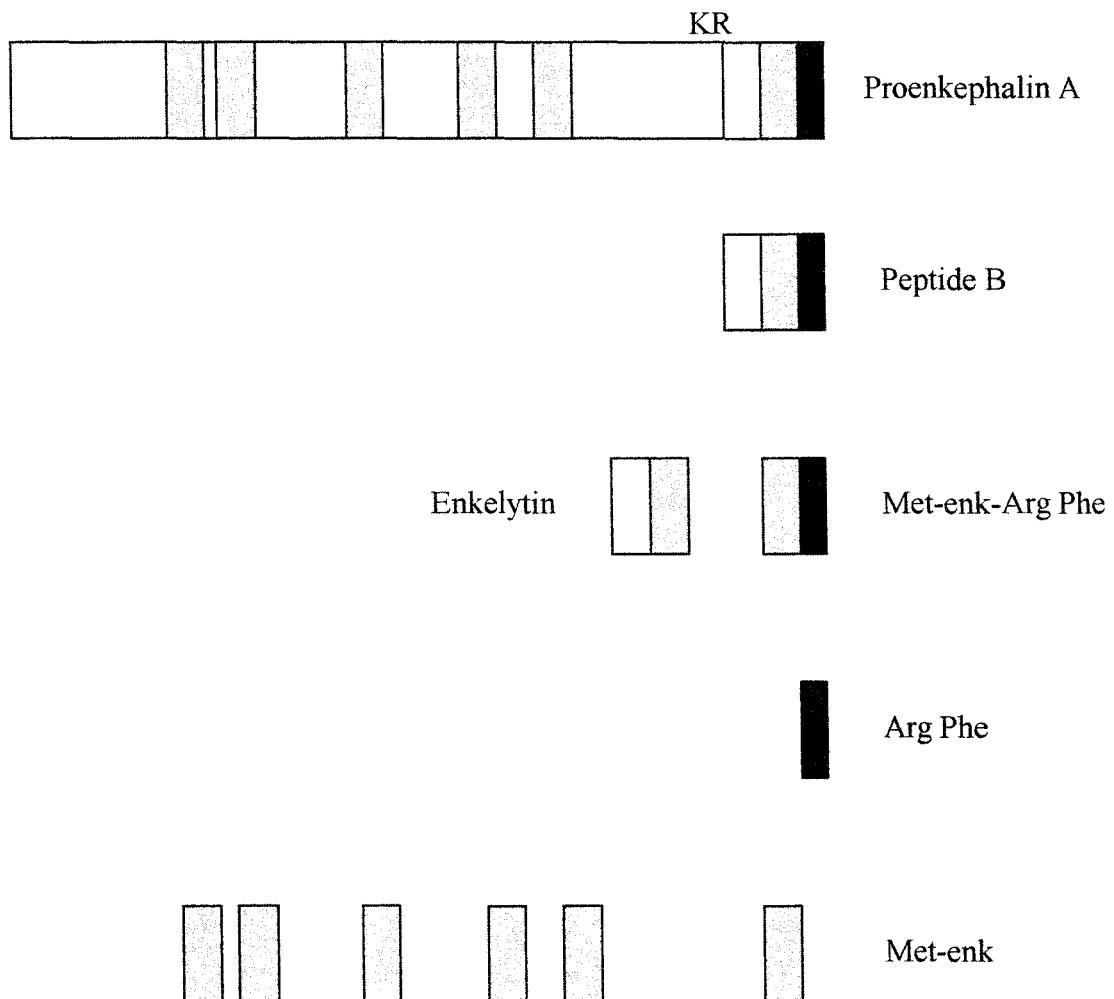


Figure 4 : Degradation products of proenkephalin A. The proteolytic maturation of the precursor lead to the release of several peptides including Met-enk. Longer peptides as peptide B/enkelytin can be proteolysed afterwards to the Met-enkephalin and Met-enkephalin Arg Pha.

prohormone convertases (Johanning, Juliano et al. 1998), which would allow proenkephalin a processing yielding peptide B/enkelytin (Stern, Jones et al. 1981).

Finally, we also detected baseline Met-Enk, peptide B and enkelytin levels even before skin incision in these patients with cardiovascular disease. We surmise these molecules may be indicators of blood vessel injury and local inflammation. In fact recent research has shown the presence of bacteria such as *Chlamydia pneumoniae*, *Pneumococal endocarditis* and *Staphylococcus aureus endocarditis* in patients with cardiovascular disease (Lindberg, Prag et al. 1998; Sinisalo, Mattila et al. 1998).

In conclusion, we demonstrate that in humans, peptides with both antibacterial and immune-activating properties are present in plasma and are released into the bloodstream during CABG. This innate response may be an important initial event to limit the spread of pathogens following trauma.

Acknowledgements:

This work was in part supported by the following grants: NIMH COR 17138, NIDA 09010, the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (GBS), NIH Fogarty INT 00045 (MS and GBS), the Centre National de la Recherche Scientifique (UPRESA CNRS 8017) and DRET (96-109; DA). The authors are grateful to Christos M. Rialas, Federico Casares and Karine Lugardon for their technical expertise.

REFERENCES

- Aunis, D. (1998). "Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla." Int Rev Cytol **181**: 213-320.
- Bulet, P., J. L. Dimarcq, et al. (1993). "A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution." J Biol Chem **268**(20): 14893-7.
- Ganz, T. and R. I. Lehrer (1999). "Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications." Mol Med Today **5**(7): 292-7.
- Goumon, Y., K. Lugardon, et al. (1998). "Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells." J Biol Chem **273**(45): 29847-56.
- Goumon, Y., J. M. Strub, et al. (1996). "The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity." Eur J Biochem **235**(3): 516-25.
- Huttner, K. M. and C. L. Bevins (1999). "Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense." Pediatr Res **45**(6): 785-94.
- Johanning, K., M. A. Juliano, et al. (1998). "Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates." J Biol Chem **273**(35): 22672-80.
- LaMendola, J., S. K. Martin, et al. (1997). "Expression of PC3, carboxypeptidase E and enkephalin in human monocyte- derived macrophages as a tool for genetic studies." FEBS Lett **404**(1): 19-22.
- Lerrick, J. W., M. Hirata, et al. (1994). "A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide- neutralizing activity." J Immunol **152**(1): 231-40.

- Lehrer, R. I. and T. Ganz (1999). “Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence.” Curr Opin Immunol **11**(1): 23-7.
- Lindberg, J., J. Prag, et al. (1998). “Pneumococcal endocarditis is not just a disease of the past: an analysis of 16 cases diagnosed in Denmark 1986-1997.” Scand J Infect Dis **30**(5): 469-72.
- McCormick, J. B. (1998). “Epidemiology of emerging/re-emerging antimicrobial-resistant bacterial pathogens.” Curr Opin Microbiol **1**(1): 125-9.
- Nissen, J. B., M. Lund, et al. (1997). “Enkephalin-like immunoreactivity in human skin is found selectively in a fraction of CD68-positive dermal cells: increase in enkephalin-positive cells in lesional psoriasis.” Arch Dermatol Res **289**(5): 265-71.
- Panyutich, A. V., E. A. Panyutich, et al. (1993). “Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis.” J Lab Clin Med **122**(2): 202-7.
- Salzet, M., P. Bulet, et al. (1996). “Structural characterization of a novel neuropeptide from the central nervous system of the leech Erpobdella octoculata. The leech osmoregulator factor.” J Biol Chem **271**(12): 7237-43.
- Salzet, M., M. Verger-Bocquet, et al. (1996). “Purification, sequence analysis, and cellular localization of a prodynorphin-derived peptide related to the alpha-neo-endorphin in the rhynchobdellid leech Theromyzon tessulatum.” J Biol Chem **271**(22): 13191-6.
- Schonwetter, B. S., E. D. Stolzenberg, et al. (1995). “Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation.” Science **267**(5204): 1645-8.
- Schroder, J. M. (1999). “Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements.” Cell Mol Life Sci **56**(1-2): 32-46.

- Shipp, M. A., G. B. Stefano, et al. (1990). "Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11." Nature **347**(6291): 394-6.
- Sinisalo, J., K. Mattila, et al. (1998). "The effect of prolonged doxycycline therapy on Chlamydia pneumoniae serological markers, coronary heart disease risk factors and forearm basal nitric oxide production." J Antimicrob Chemother **41**(1): 85-92.
- Sorensen, O., T. Bratt, et al. (1999). "The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma." J Biol Chem **274**(32): 22445-51.
- Stefano, G. B. and T. V. Bilfinger (1993). "Human neutrophil and macrophage chemokinesis induced by cardiopulmonary bypass: loss of DAME and IL-1 chemotaxis." J Neuroimmunol **47**(2): 189-97.
- Stefano, G. B., P. Cadet, et al. (1989). "Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: evidence for a subtype of delta receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(16): 6307-11.
- Stefano, G. B., M. K. Leung, et al. (1995). "Effect of prolonged exposure to morphine on responsiveness of human and invertebrate immunocytes to stimulatory molecules." J Neuroimmunol **63**(2): 175-81.
- Stefano, G. B., B. Salzet, et al. (1998). "Enkelytin and opioid peptide association in invertebrates and vertebrates: immune activation and pain." Immunol Today **19**(6): 265-8.
- Stefano, G. B., M. A. Shipp, et al. (1991). "A possible immunoregulatory function for [Met]-enkephalin-Arg6-Phe7 involving human and invertebrate granulocytes." J Neuroimmunol **31**(2): 97-103.

- Stenger, S., D. A. Hanson, et al. (1998). “An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin.” Science **282**(5386): 121-5.
- Stern, A. S., B. N. Jones, et al. (1981). “Two adrenal opioid polypeptides: proposed intermediates in the processing of proenkephalin.” Proc Natl Acad Sci U S A **78**(3): 1962-6.
- Tasiemski, A., M. Verger-Bocquet, et al. (2000). “Proenkephalin A-derived peptides in invertebrate innate immune processes.” Brain Res Mol Brain Res **76**(2): 237-52.

**Presence of chromogranin derived antimicrobial peptides in plasma during coronary
artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides**

Aurélie Tasiemski, Hamida Hammad, Franck Vandenbulcke, Christophe Breton,
Thomas J. Bilfinger, Joel Pestel and Michel Salzet

From the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, CNRS ESA8017, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille 59655 Villeneuve d'ascq, France; the Unite INSERM U-416, Institut Pasteur de Lille, France and the Cardiac Research Program, Department of Surgery, Health Sciences Center, State University of New York, Stony Brook, NY 11794, USA.

Reprints: Prof. Michel Salzet, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, CNRS ESA8017, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille 59655 Villeneuve d'ascq, France. E-mail: michel.salzet@univ-lille1.fr

ABSTRACT

Chromogranin A (CGA) and chromogranin B (CGB) are acidic proteins stored in secretory organelles of endocrine cells and neurons. In addition, to their roles as helper proteins in the packaging of peptides, they may serve as pro-hormones to generate biologically active peptides such as vasostatin-1 and secretolytin. These molecules derived from CGA and CGB respectively, possess antimicrobial properties. The present study demonstrates that plasmatic levels of both vasostatin-1 and secretolytin increase during surgery in patients undergoing cardiopulmonary bypass (CPB). Vasostatin-1 and secretolytin initially present in plasma at low levels, are released just after skin incision. Consequently, they can be added to enkelytin, an antibacterial peptide derived from proenkephalin A, for the panoply of components acting as a first protective barrier against hypothetical invasion of pathogens which may occur during surgery. CGA and CGB, more commonly viewed as markers for endocrine and neuronal cells, were also found to have an immune origin. RNA messengers coding for CGB were amplified by RT-PCR in human monocytes and immunocytochemical analysis by confocal microscopy revealed the presence of CGA and/or CGB in monocytes and neutrophils. A combination of techniques including confocal microscopic analysis, mass spectrometry measurement and antibacterial tests allowed for the identification of the positive role of interleukin-6 (IL-6) in the secretolytin release from monocytes *in vitro*. Since IL-6 release is known to be strongly enhanced during CPB, we suggest a possible relation between IL-6 and the increased level of secretolytin in patients undergoing CPB.

INTRODUCTION

Chromogranin B (CGB) and chromogranin A (CGA) are members of a family of acidic secretory proteins called granins. This family also includes secretogranin II/chromogranin C (CGC). Granins are characterized by their high content of acidic amino acids, their localization in secretory organelles of endocrine cells and neurons, and the presence in their sequences of multiple pairs of basic residues which represent potential cleavage sites for processing enzymes¹. Intracellularly, granins might play multiple roles in the secretory process². They act as helper proteins in the packaging of peptides, hormones or neuropeptides^{3,4} and they also modulate the processing of the secretory granule components¹. Extracellularly, they are postulated to serve as pro-hormones to generate biologically active peptides, which may influence hormonal release⁵ and have vascular⁶ and chemoattractant functions⁷. Recently, Metz-Boutigue and colleagues demonstrated that several peptides displaying antimicrobial properties (at micromolar range) were naturally generated from CGB and CGA in bovine chromaffin granules. Among these active peptides, secretolytin and vasostatin-1 corresponding to CGB 614-626 and CGA 1-76, respectively, were identified. Secretolytin presents an activity specially directed against gram positive bacteria. Its alpha-helical amphipathic structure which is similar to the structure of the antimicrobial peptide cecropin, may account for its biological activity⁸. Vasostatin-1 displays also antibacterial activities against gram-positive bacteria and is able to kill a large variety of filamentous fungi and yeast cells⁹.

Biological assays on soluble chromaffin granule material have indicated the presence of other endogenous peptides with potent antibacterial activity. Among the complex mixture of intragranular matrix components, a peptide corresponding to the bovine bi-phosphorylated

proenkephalin A (PEA) 209-237 was identified and named enkelytin¹⁰. Enkelytin inhibits the growth of gram positive bacteria including *Staphylococcus aureus* but has no effect on gram negative bacteria. PEA, the major precursor of enkephalins, was first described in various brain regions as well as in neuroendocrine cells¹¹. In addition to their expression in neural tissues, PEA and its derived peptides are also expressed in a variety of immune cells as monocytes/macrophages, T lymphocytes, mast cells¹². It appears that enkephalins and more particularly, Methionin-enkephalin (ME) modulates immunocytes chemotaxis and¹³ cytokine secretion^{14,15}. For example, ME stimulates IL-6 liberation by human monocytes¹⁶. Recent studies demonstrate that the increase in IL-6 level in human plasma during surgery using cardiopulmonary bypass (CPB) was correlated with an increase in ME plasmatic levels¹⁷. In parallel, we showed the existence and the release of the antibacterial enkelytin (PEA) into human plasma at the same time as ME, *i.e.*, immediately after the start of the CPB. Interestingly, enkelytin was secondarily metabolised to free ME¹⁸. Consequently, a peptide with both antibacterial activity and immunocyte-activating properties (*via* its metabolic product) was demonstrated to be released into the bloodstream during CBP. We suggest that this innate response may be an initial event to limit the spread of pathogens following trauma.

The purpose of this present study was to determine whether the antibacterial chromogranin-derived peptides (secretolytin and vasostatin-1) were released in the plasma during CPB and whether this release is provoked by IL-6. Finally, we tried to demonstrate the immune origin of these peptides by examining CGA and CGB gene products in immune cells.

MATERIALS AND METHODS

Patients

After approval by the institutional review board for human experimentation, informed consent was obtained from six patients undergoing elective coronary artery bypass grafting (CABG) surgery: three men, three women (mean age 61 years). Their only known disease process was coronary arteriosclerosis. Patients were excluded if they had chronic afflictions such as diabetes, cancer, or AIDS, as well as acute illnesses such as pneumonia or a recent myocardial infarction. All patients were pre-medicated with scopolamine intra-muscularly and diazepam orally, 60-90 min before the scheduled time of operation. Radial and pulmonary artery catheters were introduced under local anaesthesia. General anaesthesia was induced and maintained with fentanyl. For muscle relaxants, either pancuronium or vecuronium bromide was used. CPB was initiated with an ascending aortic canula and a two-staged right atrial canula. Five millimeters of blood were removed from an arterial catheter placed in a radial artery at the time points indicated in Table 1. Immunocytes were separated from the plasma by centrifugation at 400 g for 10 min, and the cell-free plasma was immediately stored at -80°C until the assay.

Cell biology

For reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and confocal microscopic analysis, we used human peripheral blood cells (Institut Pasteur, Lille, France). Total blood was centrifuged (1000 rpm, 10 min). The platelet-rich plasma was discarded and the cells were diluted in 35 ml of Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640). Peripheral blood mononuclear cells were separated over a Ficoll gradient following

centrifugation for 30 min at 1600 rpm. Two fractions were obtained: a top leukocyte band containing mononuclear cells (mainly monocytes and lymphocytes) and a lower band containing polymorphonuclear leukocytes (granulocytes) and red cells.

Briefly, following centrifugation, cells pellets were dissolved in phosphate buffered saline (PBS) containing bovine serum albumin (BSA) and ethylene-diamine-tetra-acétique acid (EDTA). Monocytes and neutrophils were purified using magnetic microbeads coated with anti-CD14 or anti-CD16 antibodies, respectively (Miltenyl Biotech, Germany). CD14 antigen is expressed in large quantities on monocytes and /or macrophages and in low amount on granulocytes. CD16 is expressed on virtually all natural killer cells and eosinophils. For MACS separation, cells were magnetically labelled with either CD14 or CD16 microbeads and separated on a column that was placed on the magnetic field of a MACS separator.

Monocyte purification

Peripheral blood mononuclear cells were harvested, washed with RPMI and enumerated. 10×10^6 mononuclear cells were incubated for 30 min on ice with 20 µl of CD14 microbeads. Cells were then applied onto the column that was rinsed with 10-15 ml of PBS-BSA-EDTA to allow the CD14⁻ cells to pass through. The column was removed from the separator and placed on a collection tube. CD14+ cells (monocytes) were flushed out with 10 ml of PBS-BSA-EDTA.

Neutrophil purification

Dextran sedimentation was used to isolate the granulocytes from the red cells. Granulocytes were washed in RPMI, counted and centrifuged. 50 µl of CD16 microbeads were added to 50×10^6 granulocytes and incubated for 30 min on ice. Cells were applied onto

the column of a MACS separator that was rinsed with 10-15 ml of PBS-BSA-EDTA to allow the CD16 (neutrophils) to pass through.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from monocytes or neutrophils using Trizol (GIBCO/BRL, Strasbourg, France). RNA (3 µg) was reverse transcribed into cDNA using random hexamers and Maloney murine leukaemia virus RT (GIBCO/BRL) as previously described²⁰. One sixth of the first strand synthesis reaction was amplified for 40 cycles using 1 unit Taq polymerase (Eurogentec, Liege, Belgium) and 100 pmol of each forward and reverse primer. The cycling parameters were 94°C for 90 seconds, 65°C for 90 seconds, and 72°C for 120 seconds. Omitting RT or RNA from the reaction mixture resulted in negative control RT-PCR reactions. In all primer pairs excepted for CGA, the priming sites were separated by an intron, thus preventing amplification of any contaminating genomic DNA. For CGA amplification, the primer pair (25-mer) was designed to amplify a 331-base pair (331-bp) cDNA fragment (residues, 97-428). For CGB amplification, the primer pair (25-mer) was designed to amplify a 375-bp cDNA fragment (residues, 216-341). Adrenals RNA was used as positive control because it has been shown to express CGA and CGB. As a positive control for monocytes, PEA mRNA was also amplified using a primer pair (25-mer) designed to amplify a 326-bp (residues, 277-929). GAPDH mRNA was amplified also using a primer pair (25-mer) designed to amplify a bp as positive control for neutrophils. PCR products were sub-cloned using the P-GEM T Easy vector and sequenced to verify the specificity of the amplification. Briefly, the PCR products were ligated into the PGEM T easy vector (protocol of the manufacturer) and transformed into competent *Escherichia coli* JM 109 cells (Promega).

Plasmid DNA was sequenced with a T7 sequencing kit (Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions.

Polyclonal antisera

Polyclonal antisera used in competitive enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) and confocal microscopic analysis was kindly provided by Dr M.H. Metz-Boutigue (INSERM U 338, Strasbourg, France). These rabbit antibodies recognize synthetic peptides corresponding to bovine enkelytin (PEA 220-237), bovine secretolytin (CGB 614-626), and the C-terminal part of bovine vasostatin (CGA 65-76). Because of the high conservation between bovine and human epitopes, these antisera were used for our analysis.

ELISA quantification of plasma secretolytin and vasostatin-1 levels

Acetic acid 1N was added to the plasma (Vol/Vol) to precipitate proteins. Following centrifugation (15,000 rpm, 4°C, 15 min), the supernatant was removed and loaded onto a Sep-Pak cartridge C18 (Waters) equilibrated with methanol and acetic acid, as previously described^{18,21}. The elution was performed with 60% of acetonitril (ACN)(Beckman) acidified with 0.1 % of trifluoroacetic acid (TFA) (Beckman). The eluted product was lyophilised and dissolved in 300 µl of water. Competitive ELISA was performed in triplicate, as previously described¹⁸.

Confocal microscopic analysis

10 x 10⁶ purified monocytes or neutrophils were centrifuged and the pellet was dissolved in 2 ml of phosphate buffer 0.1 M pH=7.4. Cells were then fixed for 30 min at 4°C by addition of 8 ml of ice cold 4% paraformaldehyde solution. Cells were then centrifuged on slides (100,000 cells per slide) and immersed for 10 min. in tris-buffered saline (TBS : 0.1 M

tris, pH=7.5, 0.9 % NaCl). After 1 h. of incubation in TBS containing 3% normal goat serum (NGS), cells were incubated overnight at 20°C with rabbit anti-secretolytin Abs (1/200), anti-enkelytin Abs (1/200) or with anti-vasostatin-1 Abs (1/200) in TBS containing 2% NSG and 0.01% Triton X-100. Next, cells were rinsed 3 times with TBS and incubated for 2 h. at room temperature with Texas red conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1/100 (Jackson, immunoresearch). As a control, the immunolabelling procedure was carried out either in the absence of the primary antibody or in the presence of primary antibodies which had been adsorbed overnight at 4°C with 1 µg of corresponding antigen for 1µl of antibody. The slides were then mounted with glycerol containing 25% TBS and 0.1% p-phenylenediamine.

Cells were examined under a Leica laser scanning microscope (TCS NT) equipped with a Leica (DMIRBE) inverted microscope and an argon/tryptan laser. Tagged molecules were excited at a wavelength of 568 nm. Images were acquired as single transcellular optical sections and averaged over 16 scans per frame.

Cell stimulation

Purified monocytes or neutrophils were diluted to approximately 300,000 cells per chamber slide (Nunc, Naperville, IN) and incubated for 30 min at 37°C in 5% carbon dioxide until the beginning of the experiment. Monocytes or neutrophils were then incubated for 15 min. at 37°C with IL-6 (200 pg per ml) (Promocell). After centrifugation at 800g, cell pellets were dissolved in 2 ml of phosphate buffer 0.1 M, pH=7.4. Cells were fixed and processed for confocal microscopic analysis.

Incubation medium of stimulated cell analysis

Antibacterial assays: The antibacterial activity was tested by liquid growth inhibition assay as described by Bulet *et al* ²². Briefly, 10 µl of the interest product was incubated in microtiter plates with 100 µl of a mid-logarithmic phase culture of *Micrococcus luteus* (strain A270) or *E. coli* (strain D31) with a starting absorbance of 0.001 at 620 nm in Poor Broth medium. Microbial growth was assessed by the increase in A620 nm after a 16-h. incubation at 30°C for *M. luteus* and 37°C for *E. coli*.

Dot immunobinding assay (DIA) : Supernatants of both unstimulated and IL-6-stimulated cells were purified, as described above for ELISA quantification. The 60% ACN eluted product of the Sep-Pak cartridge was lyophilised and dissolved in 100 µl of water. The procedure was conducted according to Salzet *et al* ²³. One microliterl of the 100 µl was spotted onto a nitrocellulose membrane and was incubated with the secretolytin antiserum (1/1000). Synthetic secretolytin was spotted in parallel as a positive control (1.0, 0.1, 0.01 mg/ml).

Mass spectrometry

Supernatants of immune cells were desalted using ZipTip pipette tips containing C₁₈ reversed-phase (Millipore) and analysed by mass spectrometry measurement on a MALDI TOF voyager (Perkin Elmer).

RESULTS

Release of vasostatin-1 and secretolytin during CPB

The secretion of secretolytin and vasostatin-1 before and during the surgical procedure was quantified by competitive ELISA (Fig. 1). Before induction of anaesthesia, the amounts of vasostatin-1 and secretolytin were on average 1.83 nmol/ml and 0.75 nmol/ml of plasma, respectively. The vasostatin-1 human plasma level significantly increased immediately after the induction of anaesthesia (11.16 nmol/ml), *i.e.*, 15 min. following introduction of the pulmonary and radial catheters (which corresponds to the skin incision). The level remained elevated until the end of the surgery. Examination of human plasma for the presence of secretolytin showed an important increase 15 min post-start of CPB (8 nmol/ml vs 0.75 nmol/ml). No peptides were detected 24 h. post-surgery. In order to check the identity of the peptides, antimicrobial tests and purification steps were performed. Co-elution experiments of synthetic peptides with antimicrobial purified peptides confirmed the identity. They corresponded to secretolytin and vasostatin-1 previously purified from human plasma samples by the Metz-Boutigue team⁹.

CGB and CGA gene expression in human monocytes and neutrophils

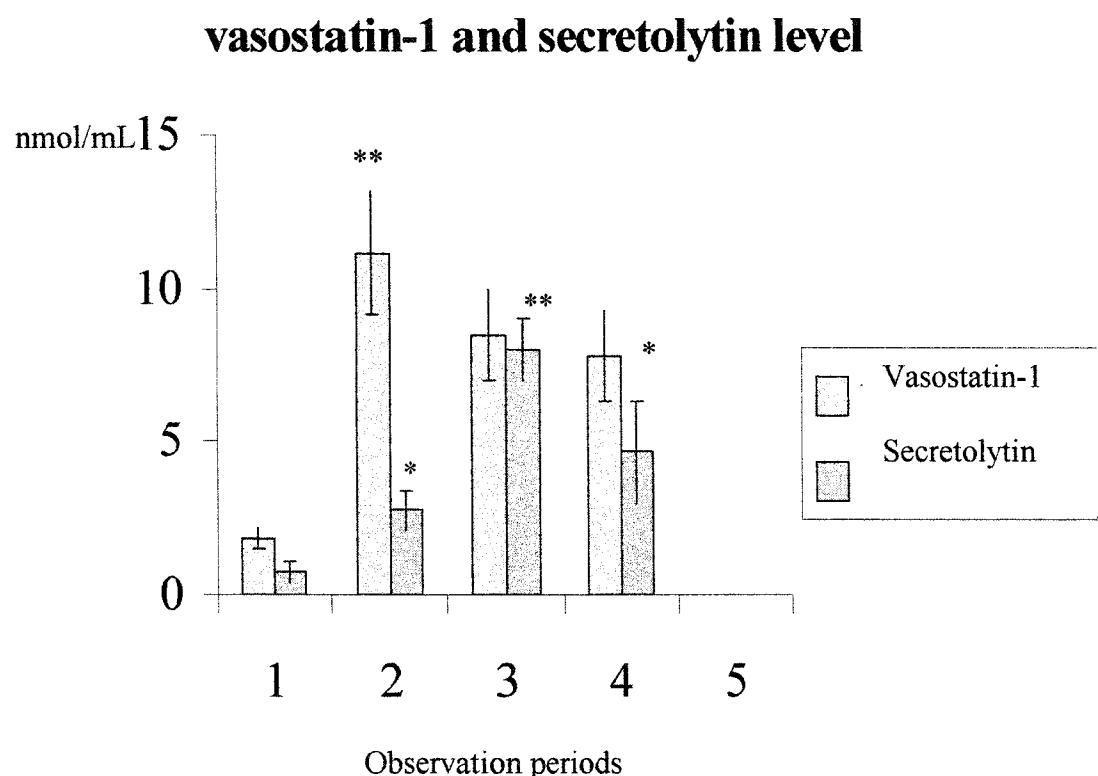
CGA- and CGB-derived antibacterial peptides are known to be stored with catecholamines and glucocorticoïdes in the chromaffin cells of adrenal gland. Glucocorticoids and catecholamines play key roles in stress situations and secretolytin and vasostatin-1 may thus be released in major part by the adrenal medulla during bypass surgery. To determine if immune cells could be another source of these peptides as well, RT-PCR was then performed to study the gene expression of CGA and CGB in purified monocytes and neutrophils (Fig. 2).

Table 1 : Plasma sampling periods

Observation period	Activity
1.	prior to operation
2.	15 min. post-induction of anesthesia (skin incision)
3.	15 min. post-start of CPB*
4.	15 min. post-end of CPB (6 h. later)
5.	24 h. post-surgery

CPB : Cardiopulmonary Bypass

Figure 1 : Plasma levels of secretolytin and vasostatin-1 in patients undergoing coronary artery bypass grafting. The observation periods are as described in Table 1.



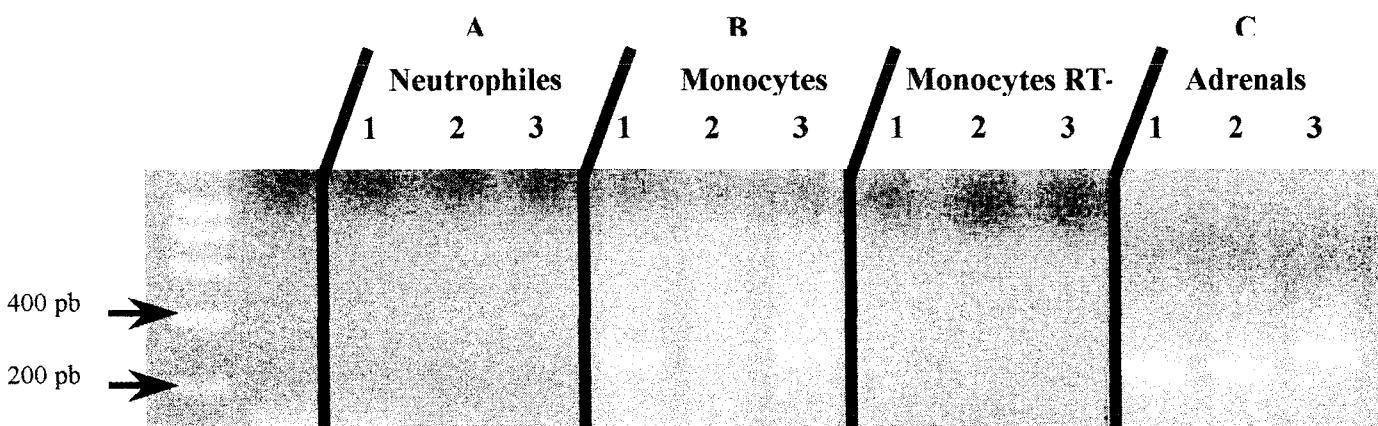
Since the PEA gene is known to be expressed in monocytes, PEA primer pair was used as control²⁴. In neutrophils, no amplification was detected with either PEA primer pair (lane 1A), CGA primer pair (lane 2A) or with CGB primer pair (lane 3A). In contrast, in monocytes, amplification signals for PEA (lane 1B) and for CGB (lane 3B) but not for CGA (lane 2B), were observed. Sub-cloning and sequencing of the specific bands confirmed the identity of the PCR products. Comparaison with CGB and PEA cDNA sequences obtained from PCR products of RNA from human adrenal medulla confirmed the identity of the amplified products (lanes 1C, 2C, 3C).

Microscopic analysis

Immunocytochemical procedures with secretolytin (CGB 614-626) antiserum were carried out on monocytes and neutrophils in order to detect the presence of CGB in these cells. Confocal microscopic examination revealed that the label formed small “hot spots” distributed throughout the cytoplasm of the cells, but sparing the nucleus. Most “hot spots”, probably corresponding to granules and/or vesicles, were detected at the periphery of the cells, next to the plasma membrane (Fig. 3A). This labelling was specific in that it was not observed after preadsorption of the antiserum by its homologous antigen (Fig. 3B). In comparing the sequence of events during CPB, we found that a release of IL-6 precedes that of secretolytin¹⁷. Given that IL-6 receptors are present on the surface of monocytes, we attempted to determine if these events were linked. Preincubation of monocytes with IL-6 for 15 min. completely abolished the immunocytochemical detection of secretolytin. Note that the signal was not altered when monocytes were preincubated with LPS or ME evidencing a specific action of IL-6 (data not shown). Moreover, IL-6 was used at a concentration corresponding to the IL-6 plasmatic level observed by Zhong *et al* in patients during a CPB.

Figure 2 : CGA, CGB and PEA gene expression in human monocytes and neutrophiles

RT-PCR were performed by using RNA from human monocytes, neutrophiles or adrenals and PEA primer pair (1), CGA primer pair (2) or CGB primer pair (3). Negative controls were also performed by omitting RT (monocytes RT-) from the reaction mixture. The PCR products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel. DNA markers were run in parallel.



These results are in the favour of a release of the immunoreactive material in the extracellular medium, probably by exocytosis (Fig. 3C). Since the presence of the PEA protein has been previously demonstrated in monocytes²⁵, enkelytin (PEA 220-237) antiserum was also used. An intense signal having the same features as CGB labelling was detected (Fig. 3D). In contrast, the pattern of the immunoreactivity was unchanged following stimulation of monocytes by IL-6 under the same conditions (Fig. 3E).

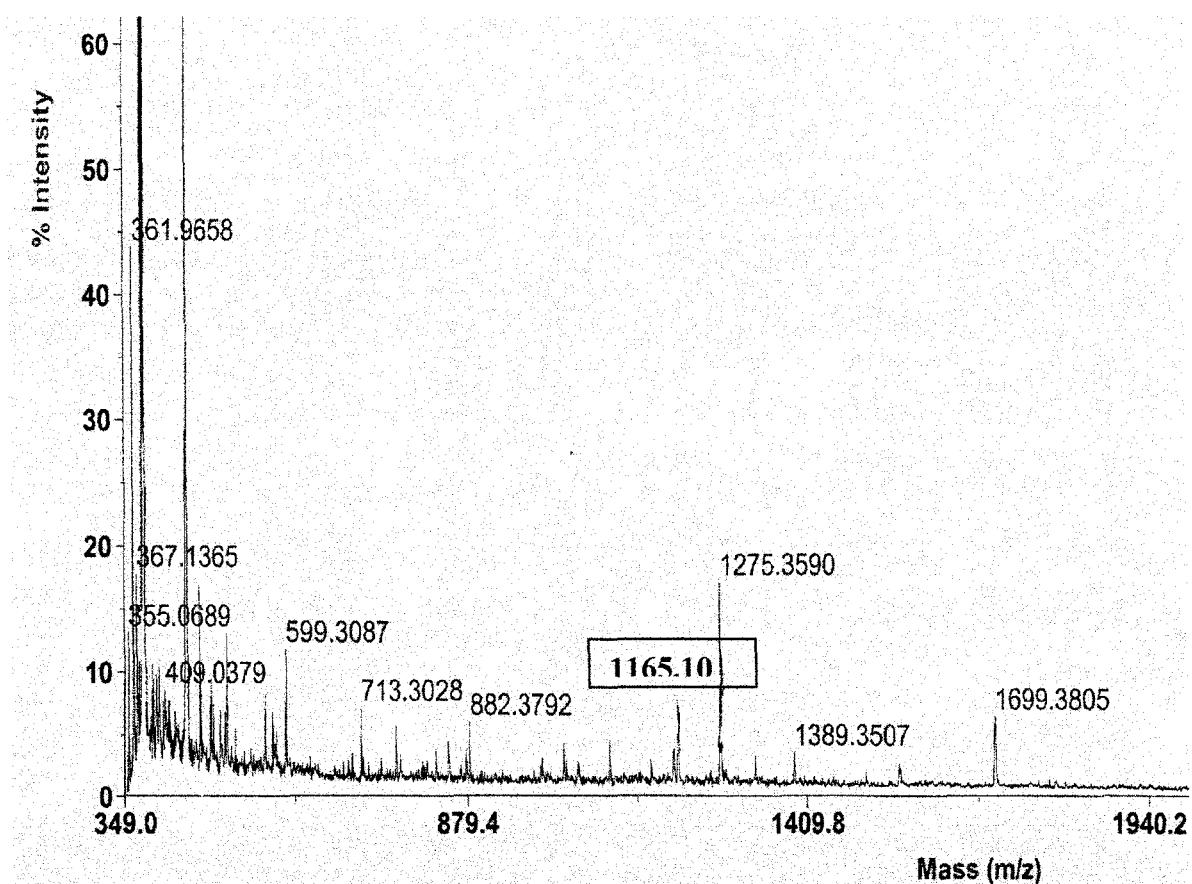
In parallel, neutrophils were processed for the immunocytochemical detection of secretolytin, vasostatin, and enkelytin. The results showed an immunoreactivity in human neutrophils with the three antisera (Fig. 4A, 4C, 4E). Preadsorption of each antibody by its respective homologous antigen completely abolished the labelling (data not shown). Besides, preincubation of neutrophils with IL-6 did not affect the patterns of immunoreactivity for secretolytin, vasostatin and enkelytin (Fig. 4B, 4D, 4F).

In conclusion, these results show that immune cells such as monocytes and neutrophils may contain chromogranin-derived antimicrobial peptides. Moreover, we observed that exposure to IL-6 incubation abolished the secretolytin immunoreactivity only in monocytes, suggesting that IL-6 induced the release of CGB-derived peptide from these cells.

Analysis of the supernatants of IL-6-stimulated monocytes

To further test the above hypothesis, the culture medium of IL-6-stimulated monocytes was stored and tested for its antimicrobial activity by liquid growth inhibition assay. The results showed an antibacterial activity against *M.*, but not against *E. coli*. Supernatants of unstimulated cells were tested as a control and no antibacterial activity was detected (data not shown). Although this finding is consistent with the activity spectrum of secretolytin, nothing allows us to conclude that the activity is essentially due to secretolytin. In fact, the results of

Figure 5 : Mass spectrometry measurement on supernatant of monocyte incubated with IL-6.



the antibacterial assays just indicate the presence of antimicrobial substances in the supernatant.

To verify that the peptide released in the medium is secretolytin, a DIA test using the secretolytin antibody and an analysis by mass spectrometry were performed. Supernatants of both IL-6-stimulated and unstimulated monocytes were subjected to the pre-purification step described in Materials and methods, ELISA quantification section. The DIA test revealed an immunoreactivity to secretolytin antiserum, in the supernatants of only the stimulated monocytes. Mass spectrometry measurement confirmed the presence of a molecule with a $[M + H]^+$ of 1165 Da which is in perfect agreement with the molecular mass of the human secretolytin. No mass corresponding to human enkelytin, vasostatin, defensin or cathelicidin was found. The supernatants of both IL-6-stimulated and unstimulated neutrophils were analyzed in parallel under the same conditions and only a mass corresponding to human defensin was detected. Taken together, these results sustain the hypothesis of a positive action of IL-6 on the release of secretolytin from monocytes.

DISCUSSION

The present study demonstrated the release of two antibacterial chromogranin-derived peptides known as vasostatin-1 and secretolytin, into the blood during CABG surgery using CPB. The results showed that these peptides can be produced not only by the adrenals or brain but also by the immune cells. Indeed, this study demonstrated for the first time the gene expression of CGB in human monocytes. Interestingly, it appeared that the stimulation of these immune cells with the pro-inflammatory cytokine IL-6 leads to the release of the antibacterial secretolytin. IL-6 induced *in vitro* a total depletion of secretolytin-

immunoreactive material from monocytes and the release of secretolytin in the incubation medium. Consequently, the increase in plasmatic secretolytin could be associated with the increasing amounts of IL-6 during the surgery¹⁷. We noted that the PEA-derived peptides and, particularly, the antibacterial enkelytin were not released when monocytes were stimulated with IL-6. Thus, we can hypothesize that, in monocytes, secretolytin and enkelytin may not be stored in the same granules or vesicles. Furthermore, it appears that these cells are not the only immune source of chromogranins. Even if no RNA levels of CGA, CGB, or PEA was detected by RT-PCR, confocal microscopy analysis using vasostatin-1, secretolytin, or enkelytin antisera demonstrated a granular labelling in neutrophils. Thus, chromogranins, which are more commonly considered and used as markers for normal and neoplastic endocrine and neuronal cells, can have an immune origin^{1 19}. We previously demonstrated that enkelytin was implicated in the innate immune response as a first barrier of defense towards pathogens in both invertebrates and humans^{18,21 15,26}. We also demonstrated that during CPB, this peptide is released with enkephalins in the first 15 min of the CABG surgery. In this context, we tried to investigate whether chromogranin-derived peptides could be released and would play a role in the innate immune response.

CPB is an unphysiologic state. The blood flow is nonpulsatile and during the bypass period, the blood interacts with the artificial surfaces of the bypass circuit. This provokes a stress or trauma-associated response that prompts the release of several endocrine and immunologic mediators leading to an acute systemic inflammatory response. Among these factors, IL-6 plays an important role. IL-6 is a pluripotent cytokine produced by a variety of cell types such as monocytes/macrophages, fibroblasts, endothelial cells, T cells, and astrocytes²⁷. This interleukin, classified as a proinflammatory cytokine, is associated with the diffuse inflammatory response that arises from CPB²⁸. Aortic post-clamping followed by reperfusion

after release of the crossclamp is often used for CPB. Recent data demonstrate that this reperfusion accelerates the synthesis and the release of IL-6 in the absence of endotoxin²⁹. Here, we demonstrated that IL-6 stimulates *in vitro* the release of the antibacterial secretolytin from human monocytes. *In vivo*, in patients undergoing CPB for CABG, plasmatic levels of secretolytin reached a peak 15 min post-start of the CPB. This observation could be correlated with the enhanced production of IL-6 described during the CPB by Zhong *et al*¹⁷. We suggest that IL-6 may act on monocytes by a paracrine or autocrine action to lead to the release of secretolytin in the bloodstream.

Another antimicrobial chromogranin-derived peptide is released during the CABG surgery. Indeed, increasing levels of human vasostatin-1 are observed in operated patients. This peptide possesses antifungal and antibacterial activities, and is also known to provoke coronary vasodilatation⁹. However, it seems not to be produced by monocytes. In counterpart, neutrophils which are much more abundant in blood, appear to produce CGA, CGB, and PEA. These data are consistent with the findings of Metz-Boutigue and colleagues who identified vasostatin-1 and enkelytin in culture medium of neutrophils upon stress⁹. Consequently, since antibacterial CGA-, CGB-, and PEA-derived peptides are stored in immune cells, as well as in endocrine cells, and neurons, they may represent a new active component in innate immunity. Moreover, we noted that vasostatin-1 and, to a lesser extent, secretolytin levels were enhanced immediately after the introduction of pulmonary and radial catheters. Thus, we surmise that the skin incision may represent a stress stimulus which leads to the liberation of antimicrobial peptides. Taken together, these titration results are in agreement with those we observed in a previous study¹⁸. We can now add secretolytin and vasostatin-1 to enkelytin for the panoply of components acting as a first protective barrier against hypothetical invasion of pathogens which may occur during CABG surgery.

Immune cells are not the main source of CGA-, CGB-, and PEA-derived peptides. Indeed, these molecules are abundant in the chromaffin cells of the adrenal glands where they are co-stored with catecholamines. Catecholamines being free during stress, the potential major source of antimicrobial peptides is the adrenals. This release correlated with stress could also explain the baseline levels of vasostatin-1 and secretolytin detected before the surgery. Another explanations for this basal concentration of secretolytin and vasostatin-1 is recent data showing the presence of bacteria as causative agents of cardiovascular disease. Indeed, over the past decade, increasing evidence obtained from epidemiological studies have accumulated, suggesting a role for infectious agents (*Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*³⁰) in the genesis of arteriosclerosis. These data led to the development of clinical trials to evaluate the putative protective effect of antibiotics in patients with a coronary artery disease³¹. In fact, exogenous pathogens as bacteria or modified cholesterol-rich lipoproteins constitute antigenic stimuli which enhance immunological activities within atherosclerotic plaque³². Information obtained in the past few years concerning the various atheromatous components in spontaneous atherogenesis points to an early involvement of monocyte-derived macrophages, foam cell formation and interactions among lipoproteins, lymphocytes, and others immune mediators. The process ultimately involved an inflammatory state in which macrophages and T lymphocytes play a key role. It has been suggested that “plaque activity” can be a more important determinant of the clinical manifestations of atherosclerosis than the percentage of stenosis of arterial lesions. The significant association between infection and the presence of atherosclerotic lesions could imply similar associations with acute ischemic phase of the disease, such as stroke. The disruption of the atherosclerotic plaque, the most frequent critical step leading to ischemia, depends on the formation of the lesion which bacterial infection contributes³¹.

Acknowledgements

The authors would like to thank the MNERT, the CNRS, the FEDER, the regional Nord-Pas de Calais council, the NIH-Fogarty grant for their support. Also thanks are due to Dr M.H Metz-Boutigue (INSERM U 338, Strasbourg) for the kind gift of antibodies, to the Service Commun d'Imagerie Cellulaire (IFR 22, Lille) for access to the confocal microscope and to Pr. J. Lemoine (CNRS UMR 8576, Villeneuve d'Ascq) for mass spectrometry analysis.

REFERENCES

1. Huttner WB, Gerdes HH, Rosa P. The granin (chromogranin/secretogranin) family. Trends Biochem Sci. 1991;16:27-30.
2. Gorr S, Jain RK, Kuehn U, Joyce PB, Cowley DJ. Comparative sorting of neuroendocrine secretory proteins: a search for common ground in a mosaic of sorting models and mechanisms. Mol Cell Endocrinol. 2001;172:1-6.
3. Gerdes HH, Glombik MM. Signal-mediated sorting to the regulated pathway of protein secretion. Anat Anz. 1999;181:447-453
4. Chanat E, Huttner WB. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. J Cell Biol. 1991;115:1505-1519.
5. Karlsson E, Stridsberg M, Sandler S. Chromogranin-B regulation of IAPP and insulin secretion. Regul Pept. 2000;87:33-39
6. Aardal S, Galindo E, Aunis D, Helle KB. Human chromostatin inhibits endothelin-1-induced contractures in human blood vessels. Regul Pept. 1993;47:25-32.
7. Kong C, Gill BM, Rahimpour R, Xu L, Feldman RD, Xiao Q, McDonald TJ, Taupenot L, Mahata SK, Singh B, O'Connor DT, Kelvin DJ. Secretoneurin and chemoattractant receptor interactions. J Neuroimmunol. 1998;88:91-98
8. Strub JM, Hubert P, Nullans G, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Antibacterial activity of secretolytin, a chromogranin B-derived peptide (614-626), is correlated with peptide structure. FEBS Lett. 1996;379:273-278
9. Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, Bulet P, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. J Biol Chem. 2000;275:10745-10753

10. Goumon Y, Strub JM, Moniatte M, Nullans G, Poteur L, Hubert P, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH. The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity [published erratum appears in Eur J Biochem 1996 May 1;237(3):883]. *Eur J Biochem.* 1996;235:516-525
11. Patey G, Rossier J. [Discovery, anatomical mapping and biosynthesis of various families of endogenous opioid peptides]. *Ann Endocrinol.* 1986;47:71-87
12. Kuis W, Villiger PM, Leser HG, Lotz M. Differential processing of proenkephalin-A by human peripheral blood monocytes and T lymphocytes. *J Clin Invest.* 1991;88:817-824
13. Kamphuis S, Eriksson F, Kavelaars A, Zijlstra J, van de Pol M, Kuis W, Heijnen CJ. Role of endogenous pro-enkephalin A-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production. *J Neuroimmunol.* 1998;84:53-60
14. Plotnikoff NP, Faith RE, Murgo AJ, Herberman RB, Good RA. Methionine enkephalin: a new cytokine--human studies. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;82:93-101.
15. Salzet M, Tasiemski A. Involvement of pro-enkephalin-derived peptides in immunity. *Dev Comp Immunol.* 2001;25:177-185.
16. Li XY. Immunomodulating effects of methionine enkephalin. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao.* 1998;19:3-6
17. Zhong F, Li XY, Yang SL, Stefano GB, Fimiani C, Bilfinger TV. Methionine-enkephalin stimulates interleukin-6 mRNA expression: human plasma levels in coronary artery bypass grafting. *Int J Cardiol.* 1998;64 Suppl 1:S53-59.

18. Tasiemski A, Salzet M, Benson H, Fricchione GL, Bilfinger TV, Goumon Y, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Stefano GB. The presence of antibacterial and opioid peptides in human plasma during coronary artery bypass surgery. *J Neuroimmunol.* 2000;109:228-235.
19. Sumiyoshi Y, Shirakusa T, Yamashita Y, Maekawa T, Hidemitsu T, Sakai T, Kawahara K, Kikuchi M. Detection of chromogranin A mRNA in small cell lung carcinoma using a new, highly sensitive *in situ* hybridization method with a non-radioisotope oligonucleotide probe [see comments]. *Cancer.* 1998;82:468-473
20. Breton C, Pechoux C, Morel G, Zingg HH. Oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization, regulation, and cellular localization in the rat pituitary gland. *Endocrinology.* 1995;136:2928-2936.
21. Tasiemski A, Verger-Bocquet M, Cadet M, Goumon Y, Metz-Boutigue MH, Aunis D, Stefano GB, Salzet M. Proenkephalin A-derived peptides in invertebrate innate immune processes. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;76:237-252.
22. Bulet P, Cociancich S, Dimarcq JL, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, Hetru C, Hoffmann JA. 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.* 1991;266:24520-24525.
23. Salzet M, Bulet P, Wattez C, Malecha J. FMRFamide-related peptides in the sex segmental ganglia of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Identification and involvement in the control of hydric balance. *Eur J Biochem.* 1994;221:269-275.
24. LaMendola J, Martin SK, Steiner DF. Expression of PC3, carboxypeptidase E and enkephalin in human monocyte- derived macrophages as a tool for genetic studies. *FEBS Lett.* 1997;404:19-22.

25. Vindrola O, Padros MR, Sterin-Prync A, Ase A, Finkelman S, Nahmod V. Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin. *J Clin Invest.* 1990;86:531-537.
26. Salzet M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.* 2001;22:285-288.
27. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:253-278
28. Tonnesen E, Christensen VB, Toft P. The role of cytokines in cardiac surgery. *Int J Cardiol.* 1996;53 Suppl:S1-10.
29. Kukiela GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation.* 1995;92:1866-1875.
30. Mahony JB, Coombes BK. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: does the evidence support a causal or contributory role? *FEMS Microbiol Lett.* 2001;197:1-9.
31. Albert NM. Inflammation and infection in acute coronary syndrome. *J Cardiovasc Nurs.* 2000;15:13-26.
32. Kadar A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg.* 2001;9:109-121.

CHAPITRE III

Mise en évidence d'un nouveau peptide antimicrobien inductible chez *Theromyzon tessulatum*

Lors de la purification du peptide B, il est apparu que d'autres peptides antimicrobiens étaient également présents dans le liquide cœlomique de la sangsue. La caractérisation biochimique et moléculaire ainsi que le rôle dans l'immunité anti-infectieuse de l'un d'entre eux ont été entrepris et font l'objet du présent travail.

Dans un premier temps, le peptide a été purifié par une série de chromatographies sur colonnes de phase inverse. L'analyse de la séquence primaire par dégradation automatique d'Edman et par spectrométrie de masse a révélé que la molécule était cationique et qu'elle ne présentait aucune homologie avec d'autres peptides antimicrobiens connus : nous avons décidé de la nommer théromacine. La théromacine est riche en cystéines, dix au total, impliquées dans des ponts disulfures. Par ailleurs sur les bases de la séquence biochimique, une approche en génétique inverse (RT-PCR et 5'RACE PCR) a permis l'obtention de l'ADN complémentaire de la théromacine. L'étude de l'expression du gène par northern-blot a dès lors été envisagée. Une augmentation du taux de transcrits chez les animaux injectés de bactéries a été observée. Afin de préciser le site d'expression et d'induction du gène, des expériences d'hybridation *in situ* ont été conduites et ont révélé un unique marquage au niveau de cellules graisseuses en contact avec les cavités cœlomiques. Les expériences immunocytochimiques ont montré que le peptide était présent dans ces mêmes cellules mais aussi dans les épithélia en contact avec le milieu environnant *i.e.* épithélium intestinal et tégument. Dans un dernier temps, la concentration dans le liquide cœlomique de théromacine

a été déterminée à différents temps après une injection de bactéries, ceci afin de préciser l'implication physiologique de la théromacine dans la réponse anti-infectieuse.

Toute cette étude, qui a permis la mise en évidence pour la première fois d'un peptide antimicrobien induit chez un invertébré non-insecte, fait actuellement l'objet d'un dépôt de brevet et d'un article qui sera soumis à PNAS.

**Inducible expression of Theromacin, a novel cystein rich antibacterial peptide in
bacteria-challenged leech, *Theromyzon tessulatum***

Aurélie Tasiemski,[†], Franck Vandenbulcke[†], Guillaume Mitta ^{††}, Jérôme Lemoine [‡], Pierre-Eric Sautière[†], and Michel Salzet[†]

Key words : antimicrobial, cysteine-rich, systemic, induction, invertebrates.

[†] Laboratoire de Neuroimmunité des Annélides ESA 8017, SN3, Université des Sciences et Techniques de Lille 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

^{††} Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan, Avenue de Villeneuve, 66860 Perpignan Cedex, France.

[‡] Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche, C9, Université des Sciences et Techniques de Lille 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

[†] To whom reprint requests should be sent at the following address : Prof. Michel Salzet, Laboratoire de Neuroimmunité des Annélides, CNRS ESA8017, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille 59655 Villeneuve d'ascq, France. e-mail : michel.salzet@univ-lille1.fr

ABSTRACT

We report here the isolation of a novel antibacterial peptide from coelomic liquid of the leech *Theromyzon tessulatum*, which we named theromacin. A combination of Edman degradation and mass spectrometry revealed a cationic peptide of 75 amino acids with 10 cysteine residues arranged in a disulfide array showing no obvious similarities with other known antimicrobial peptides. Theromacin exhibits a bactericidal activity towards Gram + bacteria (MIC 16.5-33 nM). The cDNA sequence coding the theromacin precursor was obtained by PCR and 5'RACE-PCR. This precursor contains a putative signal peptide of X residues followed by the sequence of the mature peptide. In Situ Hybridisation revealed that theromacin messenger was located in large fat cells which seems to be a functional equivalent of the insect fat body and immunocytochemistry at optical level revealed a production of theromacin at intestinal and epidermal levels where it provides a local first defense against microorganisms.. Furthermore, in an experimental model of infection we showed (i) by Northern-Blot analysis, an induction of theromacin gene expression after septic injury and(ii) by HPLC titration of the peptide, gave evidence of an immediate theromacin release into the coelomic liquid after bacterial challenge. All these data are evocative of the innate immune response of the fruitfly *Drosophila melanogaster*, which massively synthesizes a battery of potent antibiotic molecules from fat body in response to septic injury. As no inducible antimicrobial molecules had been described so far in the other groups of invertebrates than the insect's group, we report here the isolation and the characterization of the first inducible antimicrobial peptide described in a non-insect invertebrate.

INTRODUCTION

All multicellular organisms including plants, invertebrates and vertebrates have developed an immediate response to defend themselves against infectious micro organisms. During the last few years studies on the components of the innate immune system fully demonstrated the contribution of the antimicrobial peptides to the host defense (1) (2) (3). Antibiotic peptides are small cationic molecules (size comprised between 2kDa and 8kDa) (4). Basis on their structural features, three classes were defined : 1/ linear α helical peptides without cysteines , the prototype of this family are the cecropins ; 2/ open-ended cyclic cysteine-rich peptides among which defensins are the most widespread and 3/ linear peptides containing a high proportion of one or two amino acids like indolicidin.

These peptides appear to be one of the essential actors that have been conserved during evolution. Meanwhile, their involvements in anti-infectious processes are different according to species, cells and tissues.

Involvement of antimicrobial peptides in natural resistance to infection is sustained by their strategic location in phagocytes, in body fluids and at epithelial level *i.e.* at interfaces between organisms and its environment. This action is strengthened by the rapid induction of such antibacterial peptide genes in plants or animals submitted to bacteria challenge(1, 5) (6) (7). *Drosophila melanogaster* submitted to a septic injury, massively induces and synthesizes a battery of potent antibiotic molecules from fat body, a functional equivalent of the mammalian liver (8). Active peptides are then released into the hemolymph where they exert their antifungal and/or antibacterial activities. Adding to their systemic response, antibiotic molecules of the fruitfly are produced by cells of most of the barrier epithelia such tracheal epithelium, gut lining or salivary glands, where they provide a local first defense against

microorganisms (9). In invertebrates, inducible antimicrobial peptides were not so far evidenced in other classes than the insect's one. Moreover, recent data made a distinction between insects undergoing complete (holometabols) or incomplete (heterometabols) metamorphosis. In lot of studied holometabols *i.e.* in dipterans or in lepidopterans, antibiotic peptide genes are induced by bacteria challenge (10) (11) (12). In contrast, no inducible system was found in heterometabols (13). This constitutive expression has already been reported in phylogenetically less evolved invertebrates such like the shrimp *Penaeus vannamei* (14), the mussel *Mytilus galloprovincialis*... (15) In these animals, antibiotic peptides are expressed and stored in hemocytes : no specific organ like the fat body is involved. These results suggest that such inducible systems of antimicrobial peptide gene could appear at the time of the divergence of holometabols from heterometabol insects. Nothing is known of the localisation and regulation of antimicrobial peptide expression in worms. In the present study, we report the primary and secondary structure of a new bactericidal peptide isolated from the body fluids of the leech *Theromyzon tessulatum*. We examined precursor structure and distribution of mRNA and of the peptides in various leech tissues. In an experimental model of infection, we obtained evidence for enhancement of the theromacin transcription level in a particular tissue which could be assimilated to the fat body of *Drosophila m.* Theromacin is the first inducible antimicrobial peptides evidenced in a non-insect invertebrates.

MATERIALS METHODS

Animals :

Rhynchobdellid leeches of the species *Theromyzon tessulatum* were used for these experiments. This species is an ectoparasite of aquatic birds. It enters the nostrils of

swimming birds and feed from the mucous membrane. Life of *Theromyzon t.* is divided into 4 stages (stage 0 to stage 3) each separated by a blood-meal (16). The stage 3 assimilated to the gametogenesis phase, is divided itself into two phases. Leeches being protandrous hermaphrodites, the first phase corresponds to the spermatogenesis stage and the second phase to the oogenesis stage. *Theromyzon t.* is semelparous : it breeds once and then dies.

For this study, leeches in stage 2 and 3 were employed.

Purification procedure :

Stage 3 Animals were individually pricked with a saline solution or with a solution containing 10^7 of killed *E. coli* (D31). Coelomic fluid was collected, as previously described, at $t=0$, $t=3$ h. and $t=24$ h after challenge (17). In parallel, mucus recovering the animals was collected with a tuberculin syringe. Liquids were immediately centrifuged at 800 g for 15 min. at 4°C and supernatants were diluted (1:1 v/v) in pure water (Beckman) containing 0.1% of trifluoroacetic acid (TFA). To precipitate proteins, the pH was brought to 3.9 with 1 M HCl in a ice cold water bath under gentle stirring for 30 min. Centrifugation (10000 g, 20 min., 4°C) was then used to clarify the supernatants, which were loaded onto Sep-Pak C18 Vac cartridges (Waters) equilibrated in water acidified with 0.05% of TFA. After washing with acidified water, two successive elution steps were performed with 5% and 40% acetonitril (ACN) in acidified water. The obtained fractions were then concentrated by evaporation (vacuum centrifuge,Savant) and reconstituted in 420 μ l of pure water. 10 μ l were tested for antimicrobial activity as described below. Only 40% fractions were active and submitted to reversed-phase.HPLC. All the HPLC steps were carried out on a Beckman Gold HPLC system equipped with a Beckman 168 photodiode array detector. Column effluent was monitored by UV absorption at 225 nm.

Step 1 : Aliquots of the 40% Sep-Pak fractions were subjected to reversed phase HPLC on a Sephasyl C18 column (250 x 4.1 mm, Vydac). Elution was performed with a linear gradient of 2-52 % ACN in acidified water over 90 min. at a flow rate of 1 ml/min. Fractions corresponding to absorbance peaks were collected in polypropylene tubes, dried, reconstituted in water and tested for antimicrobial activity.

Step 2 : Active fractions were further loaded onto a C18 column (250 x 2.1 mm, Vydac) with a gradient consisting in 2-25% ACN in acidified water for 10 min. and 25-35% ACN for 40 min. at a flow rate of 0.2 ml/min. Fractions were collected and treated as above.

Step 3 : One additional step was performed on a narrowbore C18 reversed phase column (150 x 2 mm, Waters) at a flow rate of 0.2 ml/min using the ACN gradient described in the step 2

Purity of the peptide was ascertained by capillary electrophoresis (PACE 2000, Beckman). Migration was realized in phosphate buffer (50 mM, pH=2.5) at 20 kV for 20 min., at 25°C. Amino acids analysis of the purified peptide was performed by automated Edman degradation on a pulse liquid automatic peptide sequenator (Perkin Elmer). The exact molecular mass of intact theromacin (five picomol.) was determined by an electrospray ionisation mass spectrometer. The quadrupol was scanned over 300-1700 Da. mass analyser and molecular mass was calculated from a series of multiple charged protonated molecular ions.

Titration of plasmatic amount of theromacin :

Aliquots of 40 % ACN Sep-Pak and β-lactoglobulin (Applied biosystems) at different concentration (250, 375 and 500 pmol) were subjected to reversed phase HPLC on a C18

column (250 x 4.1 mm, Vydac). Elution was performed as described above. Height of peak corresponding to theromacin was calculated and amount peptide was deduced by comparing the values with the β -lactoglobulin standard. Obtained amount divided by the volume of initially collected hemolymph allowed to determinate the concentration of theromacin in the coelomic fluid of the leech.

Determination of the disulfide array

A matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used (Voyager, Perkin Elmer) to determine the mass of the reduced-alkylated Theromacin and the mass of the fragments derived from protease digestion. Products were desalted and concentrated by using Zip Tip pipette tips containing C18 reversed phase (Millipore) before mass spectrometry measurement.

Reduction and alkylation : 50 picomoles of purified peptide was dissolved in 100 μ l of 0.2 M amino bicarbonate buffer pH=8 containing 0.05 M dithiothreitol and 6 M guanidine hydrochloride. The sample was flushed with argon and incubated at 70°C for 30 min. 50 μ l of 6M acrylamide was added and the sample was flushed with argon again and incubated at 4°C for 1 hour.

Lysyl Endopeptidase Digestion : 10 pmoles of purified Theromacin were dissolved in 10 μ l of 25 mM Tris/HCl buffer pH 8.5 containing 1mM EDTA. 0.05 μ g of lysyl-endopeptidase (Roche) was added. The digestion was carried out overnight at room temperature.

Trypsique Digestion : 10 pmoles of purified peptide was dissolved in 10 μ l of 100 mM Tris/HCL buffer pH 8.5 (Promega). The digestion was performed overnight at room temperature.

Antimicrobial and bactericidal assays

Microorganisms : Bacteria *E.coli* D31 (streptomycin resistant) and *Micrococcus luteus* IFO12708 were used.

Antimicrobial tests : After each purification step, antibacterial activity was monitored by a liquid growth inhibition assay as described by Bulet *et al* (11). The minimal inhibitory concentration (MIC) of Theromacin was determined as corresponding to the interval of concentration (a-b), where (a) represents the highest theromacin concentration at which bacteria are still growing and (b) the lowest concentration that causes 100 % growth inhibition.

The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined according to the method of Hancock (18). MBC correspond to the lowest concentration of peptide that prevented any residual colony formation on agar plate.

Antifungal activity was monitored against *Fusarium oxysporum* as described by Felhbaum *et al* by a liquid growth inhibition assay (19).

Bactericidal test : Ten µl of purified peptide, at a concentration 10 times higher than the MIC, was mixed with 90 µl of an exponential phase culture of *M. luteus* (starting OD₆₀₀ of 0.01) in PB and incubated at 30°C. Aliquots of 10 µl were plated after 0, 3, 10 and 30 min, 2, 6 and 24 h of incubation on nutrient agar and number of colony-forming units was counted after overnight incubation at 37°C. Controls consisted in bacterial culture incubated with 10 µl of sterile water.

cDNA cloning

cDNA for Theromacin was cloned using three steps PCR amplification

step 1 : Reverse Transcriptase PCR : Total RNA from whole leech was extracted using Trizol (Life Technologies). RNA (3µg) was transcribed into single stranded cDNA using oligo(dT)₁₈-adaptator primer, 5'-CGAGTCGACATCGATCG(T)₁₈ -3' (Kit superscript Tm, GIBCO/BRL, protocol of the manufacturer). One fourth of the reaction was amplified by PCR using the oligodT primer and a degenerate sens oligonucleotide pool (26-mer) whose sequence is deduced from Gly1-Ser7 with a designed 5' flanking sequence 5'-GAATTCTGG(A/T/G/C)TG(C/T)TT(C/T)GA(A/G)GA(C/T)TGGAG-3'. PCR was performed for 25 cycles using one unit of Taq polymerase (Appligene quantum) in 1.5 mM of MgCl₂. The cycling parameters were : 94°C for 1 min., 50°C for 1 min. and 72°C for 1 min..

step 2 : nested-PCR : 1 µl of the amplified product was then used as template for a second run PCR with a more internal sens oligonucleotide (26-mer) designed by back translation of the amino acids residues Gly16-Asp23 : 5'-GGATTCTGG(G/A/T/C)AC(G/A/T/C)GG(G/A/T/C)GT(G/A/T/C)(C/T)T(G/A/T/C)TGGGA-3' and the oligodT.

Step 3 : Rapid Amplification of 5'cDNA End. Reverse-transcription was performed using an antisens oligonucleotide (21-mer) deduced from the cDNA sequence previously obtained 5'-TTGCAGTTCTGTAGCGTTATGC-3'. After first strand cDNA synthesis and addition of a poly-d(A) tail at its 3' end using a terminal transferase (GIBCO, protocol of the manufacturer), PCR was performed with an oligo(dT) anchor primer and an internal antisens primer (21-mer) deduced from the cDNA obtained in step 1 and 2 : 5'-CATTCTCCCTATCAGCTTG-3'. PCR parameters were identical to those described in step 1.

All PCR products were sub-cloned into pGEM-T easy vector (Promega) and several different cDNA clones were sequenced.

Northern Blot analysis

Leeches were crushed in Trizol (2ml/animals) using a polytron. Total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). 10 µg of total RNAs and size markers were separated on a 1 % agarose gel electrophoresis containing 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.2, 8.5% formaldehyde and transferred to Hybond N membrane (Amersham). After checking RNA transfer efficiency under UV, membrane was cooked 2 h at 80°C.

Theromacin probe was synthesized from the 329 pb fragment amplified in the first PCR (see above). A 18S subunit probe was also performed as control. For that, a sense oligonucleotide 5'-GCAGGAACGAGCGCGCTTTATTAGAT-3' and an antisense oligonucleotide 5'-TGGCACCAAGACTTGCCCTCCAATT-3' were designed from the ribosomal RNA 18S subunit of *Theromyzon t.* (Genbank accession number : AFO99942), and used in PCR experiments before being sub-cloned into pGEM T easy vector. Plasmids containing Theromacin cDNA or 18S cDNA were digested with EcoRI and inserts were purified from 1% agarose gel using the Wizard PCR preps DNA purification system (Promega). 25 ng of each fragments were then ³² P labelled by random priming using the Ready-to-go DNA labelling kit (Pharmacia).

Theromacin labelled probe was hybridised overnight to immobilized RNA in 50% formamide (vol/vol), 5X SSPE, 5X Denhardt's solution, 0.002% DNA salmon sperm (wt/vol) and 1% SDS (wt/vol) at 42°C. Membrane was then washed at high stringency in 2X SSC/0.1% 20 min. at room temperature and 10 min at 65°C. Autoradiography was carried out after a last washing in 0.1X SSC/0.1%SDS at 65°C for 10 min. After autoradiography, the membrane was stripped by incubating the blot with a boiling solution of 0.1% SDS for 1 h and submitted to a subsequent hybridisation with the 32P labelled 18S DNA probe.

In Situ Hybridization

Leeches were fixed overnight in a 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4, containing 4% paraformaldehyde (wt/vol). After dehydratation, animals were embedded in paraplast and 8 µm sections were cut, mounted on poly-L-lysin coated slides and stored at 4°C until use. Digoxigenin UTP labelled antisense and sense theromacin riboprobes were generated from linearized cDNA plasmids by *in vitro* transcription using dig-RNA-labelling-kit (Roche). Sense and antisense $\alpha^{[35]S}$ -UTP theromacin riboprobes were prepared from the same linearized plasmids using the dUTP-RNA-labelling kit (Roche).

Animal's sections were incubated in 0.1 M glycine, 0.2 M Tris, pH 7.4, during 10 minutes prior to proteinase K treatment (1 µg/ml in 0.1 M Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA) for 15 minutes at 37°C. Sections were rinsed in water, fixed in 0.1M phosphate buffer containing 4% paraformaldehyde and 5mM MgCl₂ during 15 minutes at 20°C and incubated in 0.1M triethanolamine pH 8.0, during 10 minutes and in 0.25% acetic acid during 10 minutes. The sections were then rinsed in water, dehydrated by graded alcohol, and air dried.

The DIG-labelled riboprobes or the radiolabelled probes were diluted in hybridisation buffer containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 10X Denhardt's solution, 0.5 mg/ml tRNA from *E. coli*, 0.1 M dithiothreitol (DTT) and 0.5 mg/ml salmon sperm DNA. Hybridisation was carried out overnight at 55°C in a humid chamber.

The next steps of the isotopique ISH were the same than those previously described by Mitta *et al.* For the ISH using the radiolabelled probes, sections were washed twice (2x30 minutes) with 2X SSC, treated with RNase A (20 µg/ml in 2X SSC) for 30 minutes at 37°C, and consecutively rinsed during 10 minutes each in 1X SSC, in 0.5X SSC and in 0.1X SSC containing 0.07% of β-mercaptoethanol. Sections were then immersed in 0.1X SSC/0.07% β-mercaptoethanol, 2x15 minutes at 55°C and rinsed in 0.1X SSC at 20°C. Probe was visualized

either by exposing the target tissue to an X-Ray film (Hyperfilm-bmax) or by coating the sections with a LM-1 autoradiography emulsion (Amersham). Coated sections were then air dried, and exposed 2-4 weeks before being developed.

Titration of radiolabelled ISH was performed according to the protocol of Bouret *et al* (20). A t-test was used to compare levels of ISH labelling between two groups (bacteria injection versus saline injection and bacteria injection versus no injection).

Anti-theromacin antibody

The more immunogenic region (Gln₄₉-Arg₆₃) of theromacin was chemically synthesised, coupled to ovalbumin and then used for the immunization procedure of two New Zealand White rabbits according to the protocol of Agrobio (France).

Immunoblotting

Leeches were homogenized in 0.125 M Tris pH 6.8. After centrifugation (10,000 rpm, 20 min.), supernatant was loaded onto a Sep-Pak cartridge. The 40 % ACN fraction was dried, mixed with SDS loading buffer and displayed on a tris-tricine gel. Separated peptides were transferred to Hybond-P membranes (Amersham), blocked with 5% dry milk, and incubated with the theromacin antiserum (1/4,000). Bound antibodies were detected by a goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Jackson Laboratory, dilution : 1/10000) by using a chemiluminescence kit (ECL detection system, Amersham).

Light microscopy

To study the immunoreactivity on the whole animals, leeches were fixed as mentioned above. Immunohistochemical procedure was followed according to Mitta *et al* (21). After

dehydration, tissues were embedded in Paraplast and 8 µm sections were cut, mounted on glass slides. Sections were incubated with anti-theromacin IgG (1/800) and with 1 nm colloidal gold-labelled goat anti-rabbit IgG (Amersham, dilution 1:50) Signal was amplified by using silver amplification with the IntenSETM M kit (Amersham). The sections were then stained with Evans blue and examined with a Zeiss light microscope.

For light microscopy on semi-thin sections, pre-embedding procedure was used. Anterior parts of leech were fixed and prepared as described by Mitta *et al.* (21). Sections were incubated with anti-theromacin IgG (1/800) and with 1 nm colloidal gold-labelled goat anti-rabbit IgG (Amersham, dilution 1:50). As above, signal was amplified by using silver amplification with the IntenSETM M kit (Amersham). The sections were stained with 1% toluidine blue solution and examined with light microscope.

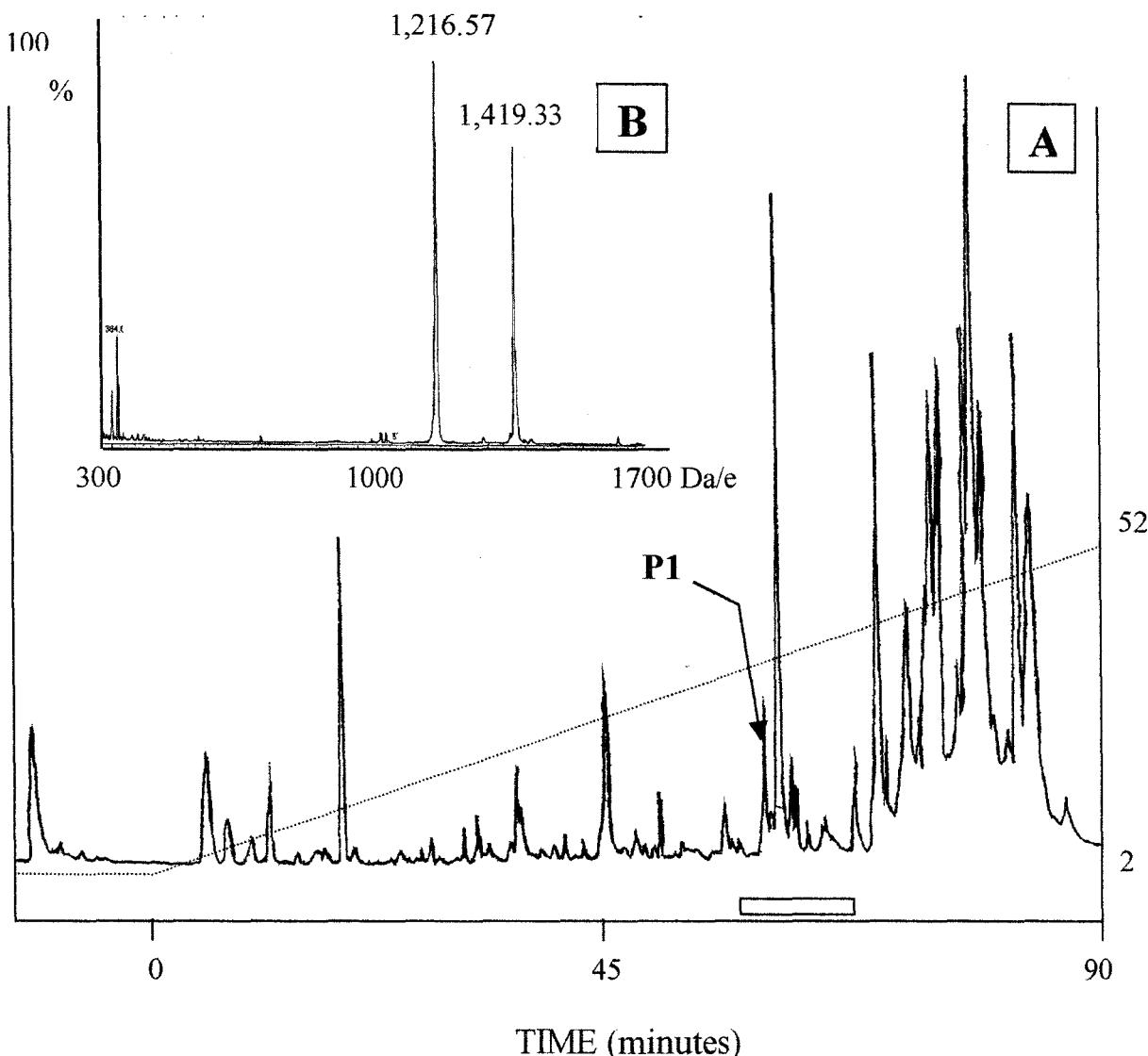
RESULTS AND DISCUSSION

Biochemical and molecular characterization of theromacin

We report here the isolation of a novel bactericidal peptide named theromacin, from the leech *Theromyzon tessulatum*. Theromacin was isolated from body fluid in acidic conditions. The extract was pre-purified by solid phase extraction on a reversed-phase (RP) cartridge. The 40% ACN fraction was then submitted to a first reversed phase chromatography (fig. 1A). Each individually collected peak was dried, reconstituted in pure water and tested for its antimicrobial activity by liquid growth inhibition assays. Four fractions in particular fraction P1 (eluted at 33 % ACN) were found to be active exclusively against *M. luteus*. This fraction was further purified by two additional reversed phase HPLC purification steps. After checking the purity of the molecule by capillary zone electrophoresis,

Figure 1 : A/ Reversed phase HPLC of acidic extract obtained from coelomic fluid of leech. After prepurification by solid phase extraction, the 40% ACN eluted material was loaded onto a C18 column (250x4 mm, Vydac). Elution was performed with a linear gradient of ACN from 2 to 52 % ACN (dotted line) over 90 min. at a flow rate of 1 ml/min. Absorbance peak was monitored at 225 nm (solid line). Biological activity was detected by antibacterial assay against M. luteus (white rectangle). P1 corresponds to theromacin.

B/ Electrospray analysis of theromacin : after two additional HPLC steps, exact mass of purified theromacin was determined by electrospray ionisation mass spectrometer. Quadrupol was scanned over 300-1700 Da. Two unequivocal pseudomolecular ions ($[M+6H]^{6+} / 6 = 1,419.33$ and $[M+7H]^{7+} / 7 = 1,216.57$) were observed that correspond to protonated species whose molecular mass was 8516 Da in average.



sequencing was performed by automatic Edman degradation. A 30 residue NH₂-terminal sequence was then obtained. In parallel, electrospray mass spectrometry and analysis of the wide scan spectrum revealed a deduced molecular mass of 8,516 Da illustrating that the sequence obtained by Edman degradation was incomplete (fig 1B).

To fully identify the amino acid sequence of the peptide P1 and to obtain information on the precursor, cDNA cloning was envisaged. A cDNA for P1 was then cloned using three steps PCR based approach with total RNA from whole leeches as template (see materials and methods and fig. 2). Sequence deduced from the cDNA allowed us to obtain the complete sequence of the mature peptide (75 amino acids). This sequence presenting no obvious similarity with other known peptides, we proposed to name this molecule : theromacin. Mature theromacin is a cationic antibacterial peptide since calculated pI was 8.61.

A precursor peptide for theromacin was also deduced from the cDNA sequence. The precursor sequence (97 amino acids) was submitted to Signal PVI software analysis. Results confirmed that (i) theromacin was flanked at the N terminus by a putative hydrophobic signal peptide Met₁-Ala₂₂, and (ii) the cleavage site for signal peptidase was most likely located after the Ala₂₂ preceding the Gly at the position 23. This led to the notion that mature theromacin might be generated through conventional processing mechanisms. The amino carboxyl-terminal portion of the pro-peptide may serve to the translocation of the peptide to the lumen of the rough endoplasmic reticulum before being cleaved by signal peptidase (22). Note that by contrast with precursor of several invertebrate antimicrobial peptides, no anionic region and no COOH-terminal extension were observed (23) (24). This kind of structure has also been observed in other antimicrobial peptide precursor like the lumbricin precursor of the earthworm *Lumbricus terrestris* (25).

Figure 2: Nucleotide sequence of theromacin cDNA. Complete sequence of cDNA was obtained by RT-PCR using degenerated oligonucleotid primers deduced from the biochemical sequence. Dduced amino acid sequences of the ORF are shown under the nucleotide sequence. Initiator and stop codons are framed. Polyadenylation signal is underlined. The double-headed arrows indicate the limits of the mature peptide.

Determination of the disulfide array

It appeared that mass value corresponding to the theromacin sequence deduced from the cDNA was 10 Da in excess of that biochemically calculated mass of the native peptide (8,527.57 in average versus 8,516+/-0.72). The difference in mass could be attributable to the arrangement of the 10 cysteine residues, contained in the sequence, in five disulfide intramolecular bridges (10 Da). To sustain this hypothesis, theromacin was reduced and alkylated with acrylamid. MALDI-TOF MS measurement revealed that reduction and alkylation of the molecule lead to an enhancement of the molecular mass which is in perfect agreement with an addition of one acrylamid molecule to each 10 cysteine residues of theromacin. This enhancement was not observed when the molecule was only alkylated demonstrating that all the cysteine residues were implicated in disulfide bonds.

Analysis of the primary structure of the antibacterial peptide showed that theromacin did not harbor the Cysteine Stabilized $\alpha\beta$ motif (CS $\alpha\beta$) described in arthropods defensins (26). Determination of the disulfide array was then envisaged by protease digestion of the native peptide. The peptidic fragments resulting from the Lysyl Endopeptidase digest were concentrated, desalted and analyzed by MALDI-TOF-MS. As illustrated in figure 3, observed mass of 1,569.65 +/- 0.1 MH⁺ was in perfect agreement with the connection of the fragment Val₃₀-Lys₃₃ (496.25 MH⁺) to fragment Asp₆₇-Ala₇₅ (1,076.45 MH⁺) through one intramolecular bond Cyst₃₂(5)-Cyst₇₃(10) (downer numbering relative to the residue number in the theromacin sequence). A molecular mass of 1,261.61 +/- 0.1 MH⁺ revealed the existence of an intramolecular bridge Cyst₅₇(8)-Cyst₅₉(9) in the fragment Gln₅₆-Lys₆₆ (1,263.64 MH⁺). In the same manner, an intramolecular bridge Cyst₃₉(6)-Cyst₄₇(7) in the fragment Ala₃₄-Lys₅₅ (2,461.7 MH⁺) was deduced from the observed 2,459.96 +/- 0.1 MH⁺ mass. A 3,299.5 +/- 0.1 MH⁺ mass corresponding to the Gly₁-Lys₂₉ (3,301.39 MH⁺)

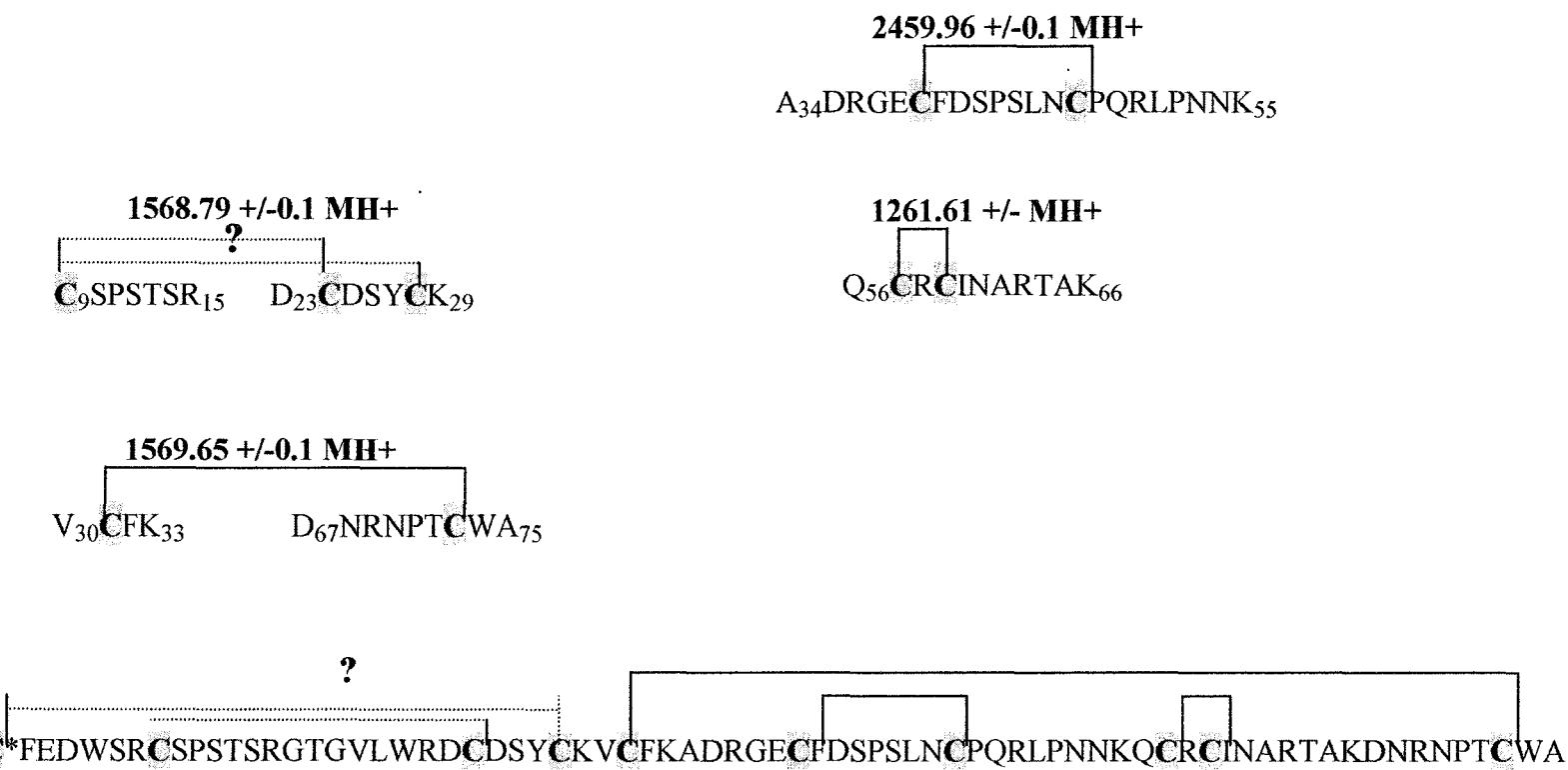


Figure 3 : Determination of theromacin structure by analysis of the proteolysis products. Theromacin digested by a combination of endoproteinases Lys C and trypsin was concentrated, desalting and then submitted to MALDI-TOF MS. Analysis allowed to determine the emplacement of disulfide bridges which are indicated by the lines connecting Cyst pairs. Dotted line corresponds to uncertain disulfid-bridges.

informed us on the presence of one intramolecular disulfide bond in this fragment but was not sufficient to determinate which cysteine was engaged in this bridge. Trypsiq digest was then investigate. Analysis by MALDI-TOF MS confirmed the above results and allowed(en cours de verification).....

Consequently, mature theromacin is a 75 amino acids peptide with ten cysteine residues arranged in a disulfide array showing no obvious similarities with other known antimicrobial peptides. No modification, *i.e.* glycosylation or phosphorylation was indicated based on mass spectrometry data. Theromacin is consequently a novel cysteine rich antibacterial peptide.

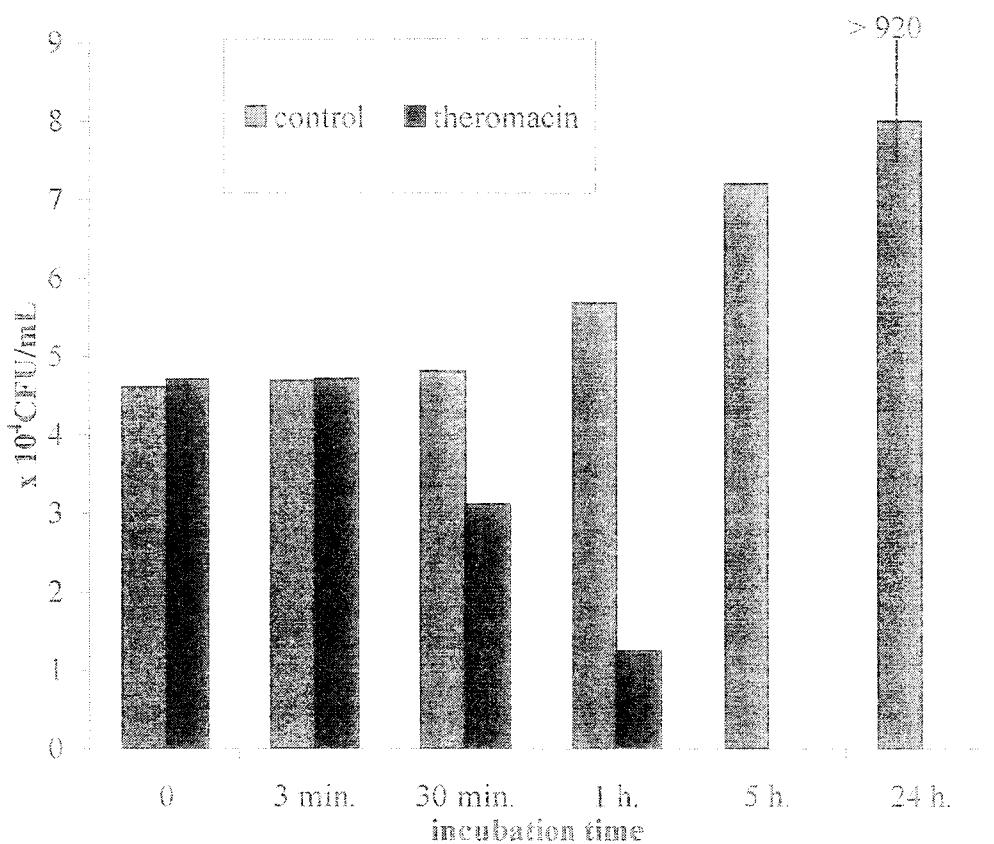
Biological activity of theromacin

In liquid growth inhibition assay, the purified theromacin was strongly active against *M. luteus* activity (MIC 16.5-33 nM ; MBC 0.26 µM). No activity was found towards *E.coli*, or *Fusarium oxysporum*.at the same concentration. When theromacin is incubated with *M. luteus* at 165 nM, a concentration 10 times higher than the MIC value, all the bacteria were killed in less than 5 h (fig.4). Consequently, theromacin exerts a bactericidal activity. Loss of antibacterial property was noticed when theromacin was reduced demonstrating that the disulfid brigdes play an important role in the biological activity of the molecule.

Theromacin gene response to bacteria challenge

Northern-blot analysis was investigate to study the eventual induction of the theromacin gene during immune response. The relative amount of theromacin transcripts was firstly studied at the stage 3. Analysis of RNA level in leech was assessed 0, 6h, 12h, 24h, 48h and 72h after saline or killed bacteria (*E. coli* or *M. luteus*) injections. These kinetics were

Figure 4 : Bacteriolytic activity of 165nM theromacin on *Micrococcus luteus*. Water was also tested as control.



chosen since their are conventionally referred to as acute phase kinetics. As illustrated in figure 5, theromacin gene is rapidly (12h) induced by both Gram positive, Gram negative or saline challenges. The strong expression was sustained 3 days after infection. These Northern-Blot experiments were extended to stage 2 animals pricked or not with a mixture of killed Gram + and Gram - bacteria. RNAs were extracted 24h after injury. Results which are presented in figure 5, pointed of the detection of theromacin RNA in challenged animals only. By contrast to stage 3 animals, no RNA baseline level was observed in stage 2 leeches. Then, we hypothesized that several physiologic event which occurred during the transition stage 2/stage 3 may be inducers of theromacin gene expression. To sustain this hypothesis, stage 2 leeches were collected 24h, 48h and 72h after the blood meal, which corresponds to the tripping factor of the transition. Total RNAs of now named stage 3 leeches were extracted and probed with the theromacin cDNA. Results presented in figure 5, underlined a low but progressive increase of the theromacin transcripts after the blood meal confirming our assumption.

Altogether these northern-blot data indicated that (i) treatment with bacteria induced a rapid, strong and persistent expression of the theromacin gene (ii) the level of induction did not depend on the type of septic injury (iii) physiological events occurring during the transition stage 2/stage3 were also inducers of the theromacin gene expression. These results underlined a regulation of the theromacin gene similar to the regulation of the insect antimicrobial peptides genes. Indeed, in the fruitfly, genes encoding antibiotics peptides are rapidly induced following a septic injury and their expression continuous over one to three days following a septic injury (27). Moreover, a developmental induction had already been reported for the drosophila diptericin gene. Meister *et al* presented evidence that an important increase in the response of the gene, occurred during the third larval instar leading to a

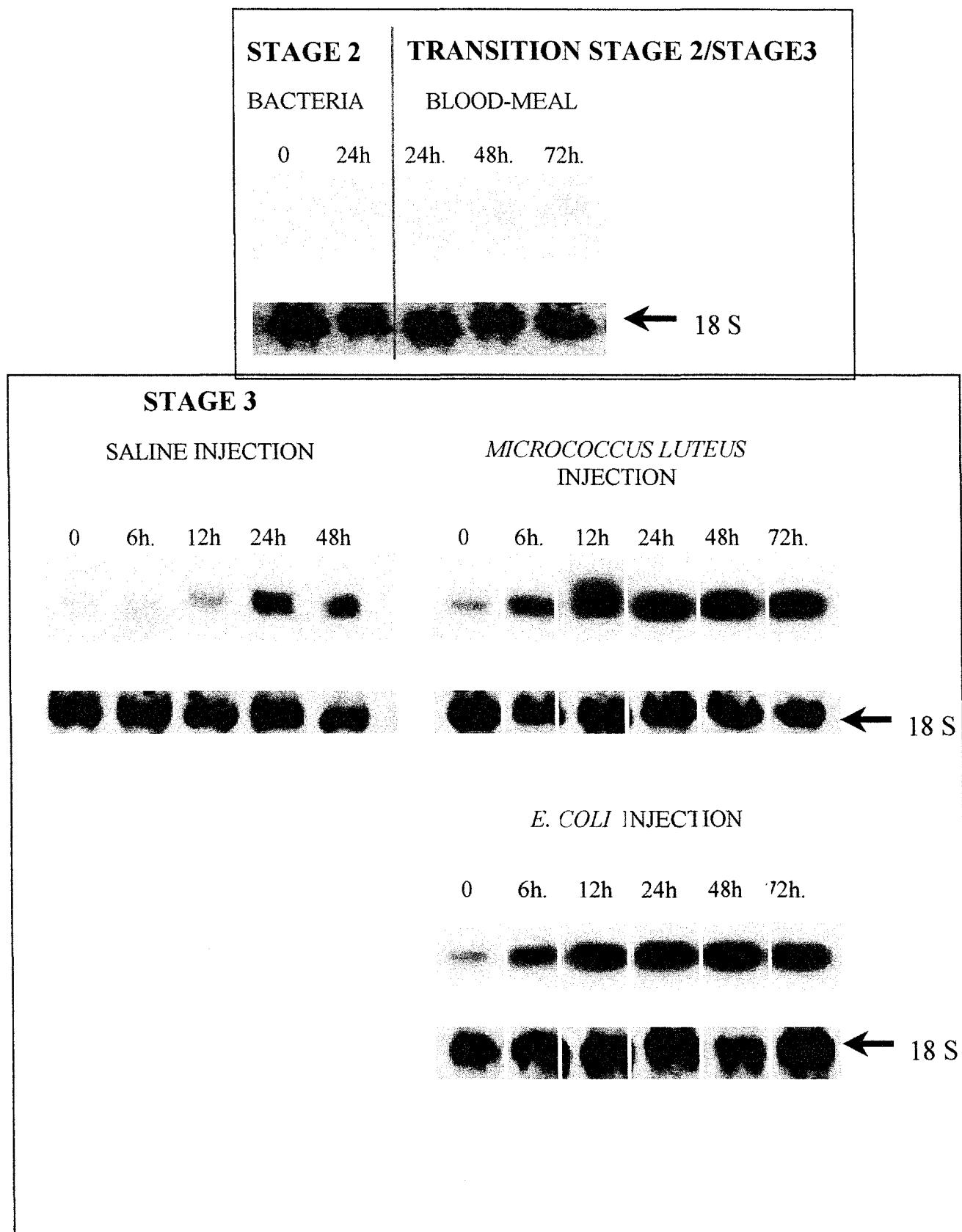
maximum in late larvae and early prepupae, after a septic injury (28). Interestingly, this response depends upon a steroid hormone implicated in the insect metamorphosis (ecdysone). Since stage 3 leeches entered their gametogenesis phase, we hypothesised that such hormonal factors implicated in this sexual maturation may participate to the induction of theromacin gene.

Localization of theromacin gene expression

To corroborate Northern-Blot results and to better understand physiological role of this antibacterial peptide in leech, we investigated to localize expression site of theromacin by using ISH. Figure 6A gave results obtained with the digoxigenin dUTP labelled theromacin antisense probe on stage 3 leech sections. Analysis showed the mRNA to be strongly expressed in large fat cells evenly distributed in whole leech. Interestingly, these cells are in close contact with cavities containing coelomic fluid from which theromacin peptide was isolated. No hybridisation was noticed in circulating hemocyte.

Since all these ISH experiments were carried out with sections of non challenged leech, we concluded that RNA baseline level of stage 3 animals observed by Northern-Blot could be attributed to the transcripts localized in the large fat cells. We then further attempted to analyse whether the inducibility evidenced by Northern Blot experiments was relevant in these large fat cells or in others tissues. The induction was monitored by injecting leeches (stage 2 or 3) with bacteria or saline solution. Sections were hybridised with antisense 35S theromacin ribosonde. The signal, apparent after 2 weeks exposure to photographic emulsion, appeared under light microscopy as an accumulation of spots. An enhancement of the theromacin transcripts amount was underlined in the large fat cells of challenged stage 2 and stage 3 leeches although no variation of the RNA level was detected in intestine epithelium or

Figure 5 : Northern blot analysis of RNA from stage 2 and stage 3 leeches extracted at different times after challenge with saline buffer, killed *E. coli* and killed *M. luteus*. RNA from stage 2/stage 3 animals were also extracted at different times after the bloodmeal. RNAs were probed were theromacin and 18S subunit cDNA.



other tissues (data not shown). Counting of the spots was performed to quantify theromacin transcript level in these large fat cells (see fig. 6A). Markedly though, the level of induction in large fat cells was stronger with bacteria than with saline injection both in stage 2 (73.6 versus 59.16 Arbitrary Unit) and stage 3 animals (41.87 versus 27.27 A.U.). In non injected stage 2 leeches, no theromacin gene expression was observed even though transcripts were evidenced in the fat body cells of non challenged stage 3 animals (28.23 A.U.).

All these results corroborated and extended Northern-Blot data by precising the cells implicated in the theromacin RNA synthesis. We concluded that in all cases of induction *i.e.* bacteria or saline injections as well as transition stage2-stage3, the enhancement of theromacin transcripts was observed exclusively in large fat cells. Another antibacterial peptide, recently characterized, was shown to be also produced by the leech fat cells (data not published). This allowed to conclude that this tissue may constitute an organ implicated in the synthesis of antimicrobial molecules, like the insect fat body (8).

Localization of theromacine peptide and dynamic of the peptide release in the plasma

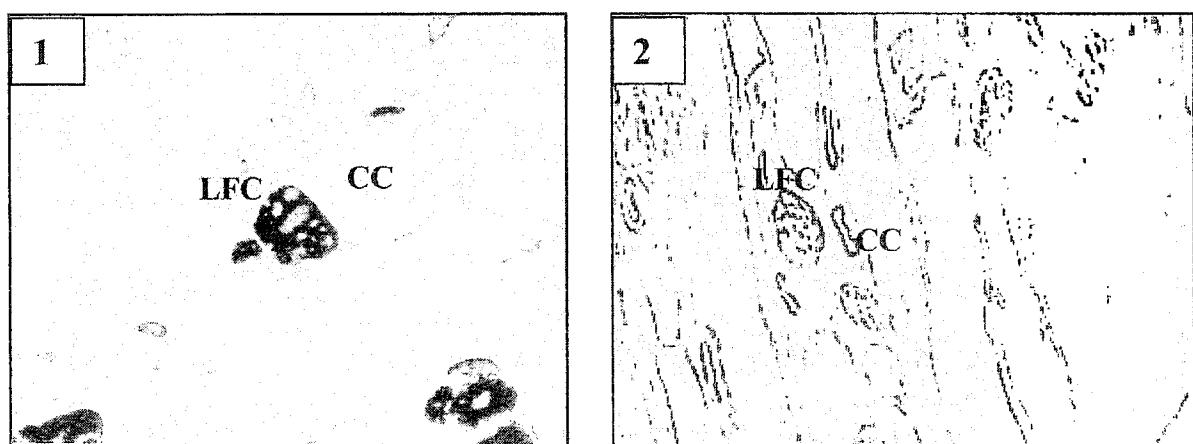
In order to specify the participation of theromacin in anti-infectious processes immunohistochemical and plasmatic titration procedures were employed in leeches subjected to bacterial challenge.

For immunohistochemical procedure, an antiserum against theromacin was used to probe sections of leeches. Specificity of the antiserum was firstly ascertained by immunoblot on tris/tricine SDS PAGE electrophoresis. As illustrated in figure 7, the major band immunodetected at a molecular mass of 11,000 Da., was completely abolished when

Figure 6 : A/ ISH with digoxigenin dUTP labelled theromacin antisense riboprobe. **1.** Signal was detected in large fat cells (LFC) which are in contact with coelomic cavities (CC). **2.** No hybridisation was noticed with the sense riboprobe, confirming the specificity of the antisense probe.

B/ Quantification of theromacin gene expression in large fat cells of stage 2 and stage 3 animals after saline and bacteria injections.

A/



B/

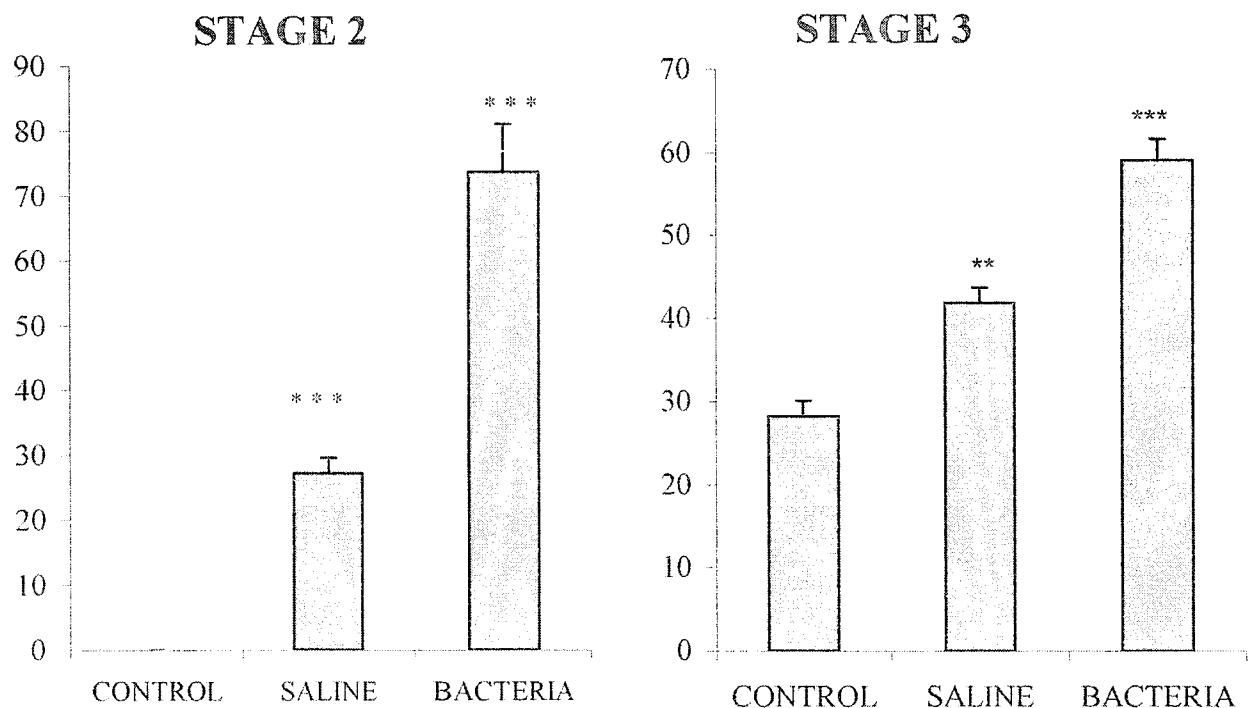
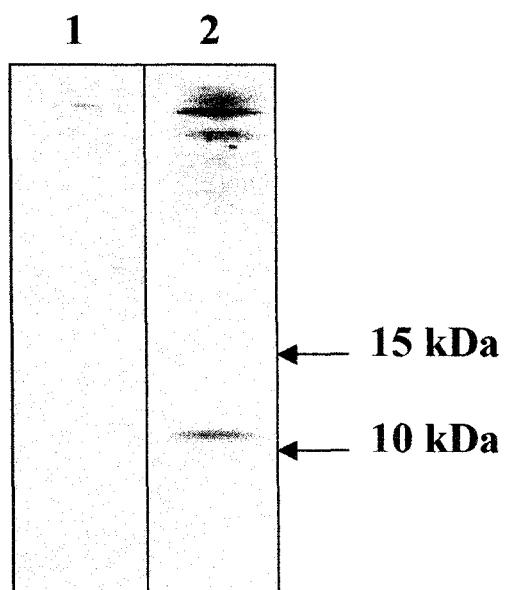


Figure 7 : Immunoblot analysis using the theromacin antiserum. Entire leeches were homogenised and prepurified on Sep-Pak cartridge. The 40% ACN eluted product was separated by non-reducing tris/tricine SDS PAGE, transferred to Hybond membrane and incubated with the theromacin antiserum preadsorbed (lane 1) or not (lane 2) with its specific antigen. No signal was observed with preadsorbed antiserum (lane A), confirming the specificity of the signal observed with the antiserum (lane B). Comparison of the molecular mass determined by ion spray mass spectrometry (8.5 kDa) with the molecular mass assessed by tris/tricine SDS PAGE (\approx 11 kDa) confirmed the oligomerization of theromacin *i.e.* the presence of disulfid bonds.



antiserum was preadsorbed with its specific antigen, indicating that antiserum was specific of theromacin.

Figure 8 gives results of the immunohistochemical approach. On paraffin sections of the entire body of leech, positive theromacin immunoreactivity was found in large fat cells (LFC.) and in intestine epithelium (IE). No signals were observed in circulating coelomocytes (C). This implies that theromacin is processed from precursor to active compound within large fat cells and intestine epithelium. Semi-thin sections confirmed the labelling of the large fat cells and evidenced a strong immunoreactivity of coelomic cavities (CC) which large fat cells were in contact with. This was according to biochemical data since coelomic cavities contained the coelomic fluid from which theromacin was isolated. Consequently, results argued in favour of an exocytosis of theromacin from the large fat cells to the body fluid of the leech. To study the effect of injury on exocytosis mechanism, titration of theromacin level was envisaged. Liquid coelomic of leech was extracted at T=0, T=3h and T=24h after saline or bacteria injection, and body fluid theromacin amount was determined after HPLC purification. Results presented in figure 9, demonstrated an increase of the baseline level (86 nM) of theromacin 3h after bacteria or saline challenge. This rapid and massive release was stronger in leech injected by bacteria (205.61 nM) than by saline solution (161.3 nM). It appeared that 24h post-injection theromacin amount returned to baseline values (68 nM). These concentrations are in line with the MIC values (16.5-33 nM) demonstrating that theromacin can exert its antibacterial activity into the body fluid of the animal.

Based on ISH data, theromacin messenger concentration in the large fat cells was transiently increased at this moment *i.e.* 24h after challenge. An explanation of this RNA increase is a renewal of the theromacin amount in large fat cells.

Figure 8 : Theromacin-immunoreactivity on paraffin sections was observed (A) in large fat cells “LFC”, (B) in intestinal epithelia “IE” and (C) at epidermis level “Ep”. On semi-thin section (D) using a pre-embedding procedure, positive signal was detected at the periphery of the large fat cells and into the coelomic cavities “CC”.

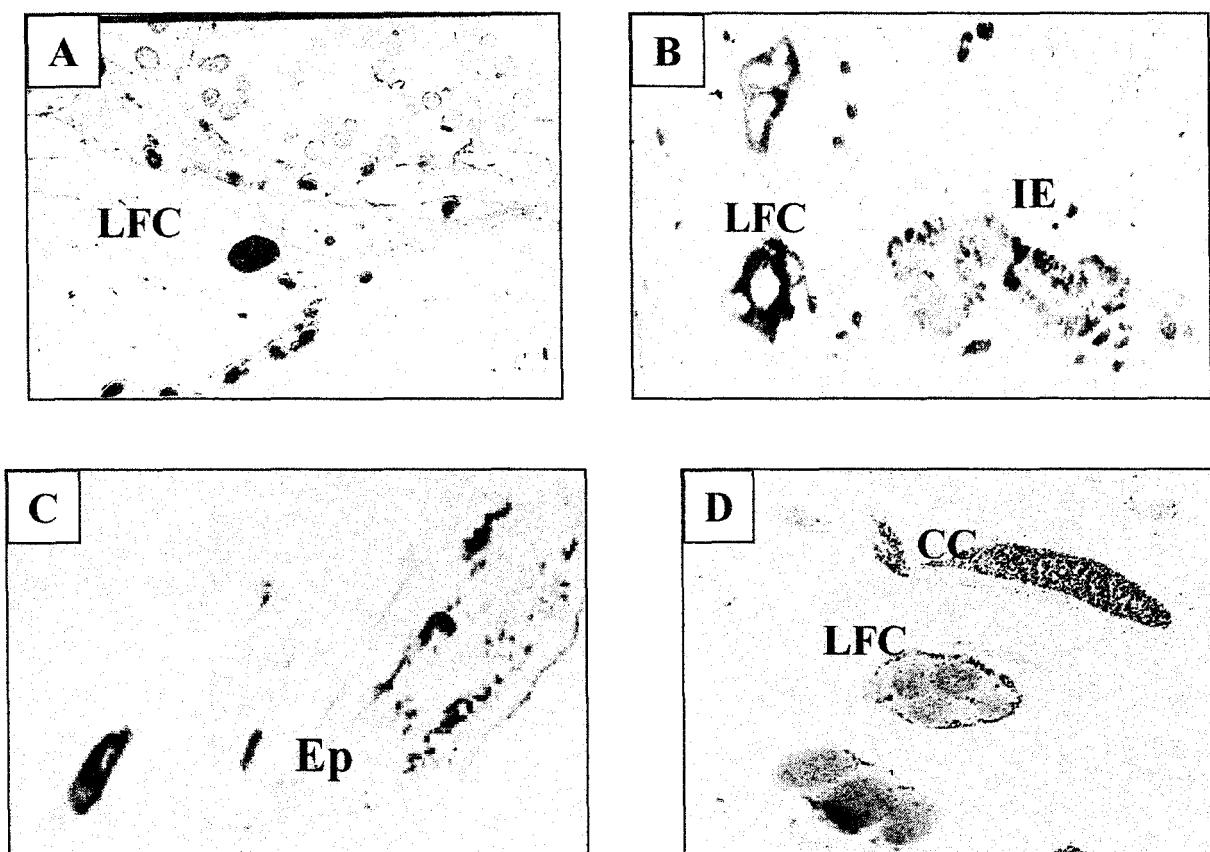
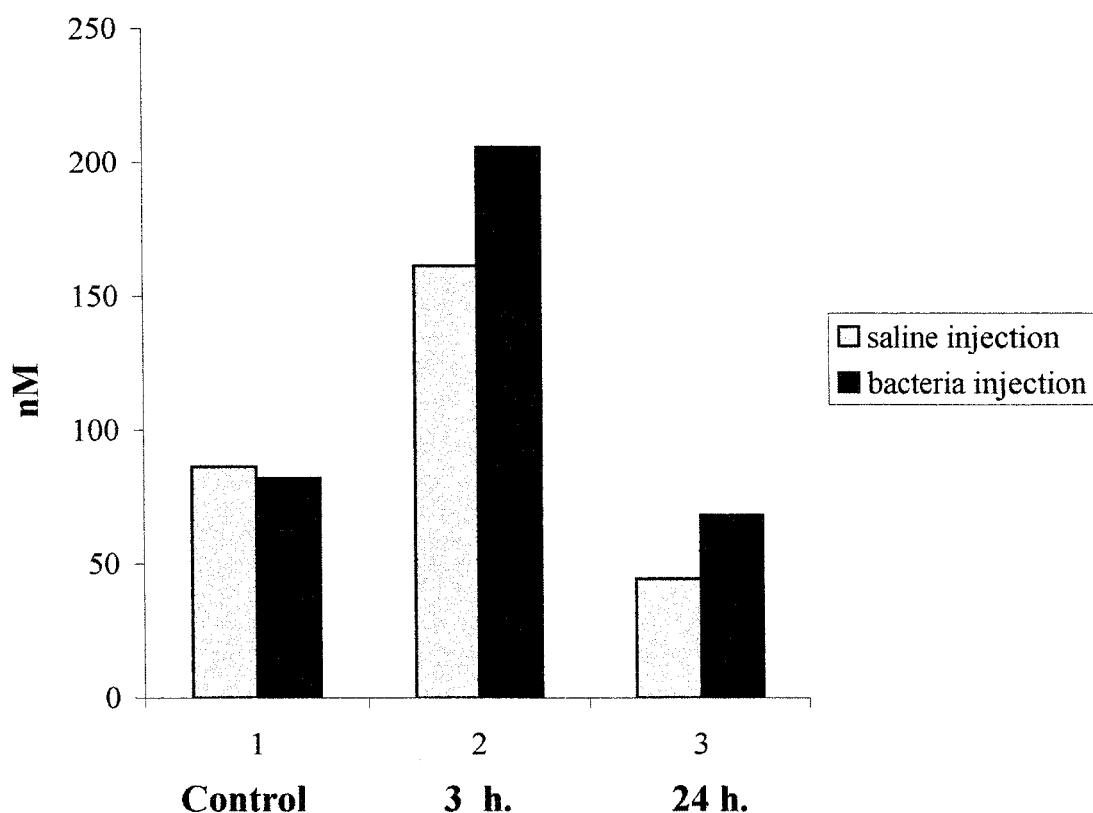


Figure 9 : Time course of coelomic liquid theromacin amount following bacterial or saline challenge. Theromacin presents in body fluid was quantified by RP-HPLC. Histograms referred to concentrations in coelomic fluid collected at different times (0, 3, 24 hours) after saline or bacterial (10^7 bacteria/animal) injection.



We conclude that like antimicrobial peptides of holometabole insects, theromacin peptide is principally induced in specialized tissue (in this case large fat cells) and is immediately released into the coelomic after septic injury (27).

Adding to its participation in the systemic response, theromacin may have a role in mucosal defense. Immunohistochemical procedure (Fig 8) underlined theromacin positive structure in epithelia in contact with the external environment : intestine epithelium (IE) and epidermis (Ep). Such a location of antimicrobial peptides in gastrointestinal tracts are also been reported in insects (29) and in mammals (30) where the epithelial Paneth cells contribute to mucosal barrier function by the apical release of defensins.

The localization at the epidermis level drive us to search for the peptide in the mucus covering the animals. This investigation was also based on physiological observations made during the injection. Indeed, we notified a strong enhancement of mucus production by leech after bacteria challenge. To answer the question, isolation of theromacin was undertaken from mucus. After HPLC purification, one peak eluted at the same ACN percentage than theromacin was selected. Sequencing by Edman degradation and MALDI-TOF MS analysis confirmed that the peptide isolated from the mucus corresponded to theromacin (data not shown). The presence of antimicrobial peptide in skin secretion has already been reported in frogs where they constitute a local defensive response by preventing bacteria colonization and/or subsequent infection (31). Our data suggest that similar mechanism defence also exists at leech skin level. In addition, since a mucous membrane covers the eggs after laying, we hypothesised a protective role of theromacin against bacteria during eggs development.

CONCLUSION

In a previous study, we demonstrated the role of the peptides derived from the proenkephalin A (a neuropeptide precursor) in the innate immune processes of the leech. Indeed lipopolysaccharides injection to the animals lead to the release from hemocytes and/or nervous system of peptide B, an antimicrobial peptide corresponding to the C terminal part of PEA (17). Interestingly, the implication of PEA derived peptide in the innate immune response was proved to be conserved in human (32). Here, we evidenced that a cationic antimicrobial peptide was also implicated in the defense of the leech against bacteria. This data, evocative of the *Drosophila m.* antimicrobial defense, are the firsts reporting the induction of an antimicrobial peptide in a non insect invertebrate.

Acknowledgments

The technical assistance of Annie Desmons is gratefully acknowledged. We also thanks David Vergote for assistance in the western-blot analysis and Dr Jean Lesage for his precious advices in northern-blot and statistical analysis. We are indebted to Dr Evelyne Bachère for her kind gift of *Fusarium oxysporum*.

This work was supported in part by the ANVAR, the CNRS and the MNERT.

REFERENCES

1. Fritig, B., Heitz, T. & Legrand, M. (1998) *Curr Opin Immunol* **10**, 16-22.
2. Cole, A. M. & Ganz, T. (2000) *Biotechniques* **29**, 822-6, 828, 830-1.
3. Boman, H. G. (1995) *Annu Rev Immunol* **13**, 61-92.
4. Hancock, R. E. & Lehrer, R. (1998) *Trends Biotechnol* **16**, 82-8.
5. Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L. & Hoffmann, D. (1999) *Dev Comp Immunol* **23**, 329-44.
6. Mitta, G., Hubert, F., Dyrynda, E. A., Boudry, P. & Roch, P. (2000) *Dev Comp Immunol* **24**, 381-93.
7. Rivas, L. & Ganz, T. (1999) *Drug Discov Today* **4**, 254-256.
8. Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M. & Rodriguez-Palenzuela, P. (1998) *Biopolymers* **47**, 479-91.
9. Engstrom, Y. (1999) *Dev Comp Immunol* **23**, 345-58.
10. Diamond, G., Russell, J. P. & Bevins, C. L. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5156-60.
11. Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M. & Hetru, C. (1996) *Curr Opin Immunol* **8**, 8-13.
12. Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J. M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A. & Imler, J. L. (2000) *Immunity* **13**, 737-48.
13. Lamberty, M., Ades, S., Uttenweiler-Joseph, S., Brookhart, G., Bushey, D., Hoffmann, J. A. & Bulet, P. (1999) *J Biol Chem* **274**, 9320-6.
14. Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J. L., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1991) *J Biol Chem* **266**, 24520-5.

15. Fehlbaum, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briand, J. P., Roussel, J. P., Letellier, L., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 1221-5.
16. Lamberty, M., Zachary, D., Lanot, R., Bordereau, C., Robert, A., Hoffmann, J. A. & Bulet, P. (2001) *J Biol Chem* **276**, 4085-92.
17. Destoumieux, D., Munoz, M., Bulet, P. & Bachere, E. (2000) *Cell Mol Life Sci* **57**, 1260-71.
18. Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M. & Roch, P. (2000) *J Biol Chem* **275**, 12954-62.
19. Cho, J. H., Park, C. B., Yoon, Y. G. & Kim, S. C. (1998) *Biochim Biophys Acta* **1408**, 67-76.
20. Malecha *reproductive biology of invertebrates Volume V*, 231-248.
21. Tasiemski, A., Verger-Bocquet, M., Cadet, M., Goumon, Y., Metz-Boutigue, M. H., Aunis, D., Stefano, G. B. & Salzet, M. (2000) *Brain Res Mol Brain Res* **76**, 237-52.
22. Hancock, R. E. (1997), <http://www.interchg.ubc.ca/bobh/methods.htm>.
23. Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 33159-63.
24. Bouret, S., Prevot, V., Croix, D., Howard, A., Habert-Ortoli, E., Jegou, S., Vaudry, H., Beauvillain, J. C. & Mitchell, V. (2000) *Endocrinology* **141**, 1780-94.
25. Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. & Roch, P. (1999) *J Cell Sci* **112**, 4233-42.
26. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997) *Protein Eng* **10**, 1-6.
27. Shigenaga, T., Muta, T., Toh, Y., Tokunaga, F. & Iwanaga, S. (1990) *J Biol Chem* **265**, 21350-4.
28. Mitta, G., Hubert, F., Noel, T. & Roch, P. (1999) *Eur J Biochem* **265**, 71-8.
29. Dimarcq, J. L., Bulet, P., Hetru, C. & Hoffmann, J. (1998) *Biopolymers* **47**, 465-77.

30. Lemaitre, B., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14614-9.
31. Meister, M. & Richards, G. (1996) *Insect Biochem Mol Biol* **26**, 155-60.
32. Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J. & Hoffmann, J. A. (1998) *Embo J* **17**, 1217-27.
33. Bevins, C. L., Martin-Porter, E. & Ganz, T. (1999) *Gut* **45**, 911-5.
34. Bevins, C. L. & Zasloff, M. (1990) *Annu Rev Biochem* **59**, 395-414.
35. Tasiemski, A., Salzet, M., Benson, H., Fricchione, G. L., Bilfinger, T. V., Goumon, Y., Metz-Boutigue, M. H., Aunis, D. & Stefano, G. B. (2000) *J Neuroimmunol* **109**, 228-35.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

L'ensemble des travaux effectués au cours de cette thèse ont permis d'éclairer nos connaissances dans le domaine de l'immunité chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*. En effet, par cette étude nous mettons en évidence la présence de peptides antimicrobiens dans le liquide cœlomique de cet Annélide. Leur caractérisation biochimique ainsi que leur participation dans les processus anti-infectieux ont été appréhendées par le biais de diverses techniques. Pour l'une de ces molécules antibactériennes, la théromacine, la connaissance de la séquence codante du gène a permis d'étudier les variations du taux de messagers en réponse à différentes stimulations. Par ailleurs, l'obtention d'immunsera respectivement dirigés contre le peptide B et la théromacine a rendu possible la détermination des sites de stockage des deux peptides ainsi que l'étude de leur cinétique de libération dans le liquide biologique en réponse à une infection expérimentale. Les résultats obtenus pour l'un des peptides, le peptide B, a servi de base à des travaux menés chez l'homme, montrant ainsi que l'étude d'organismes simples peut contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes mis en place chez des organismes plus complexes.

Tout au long de cette partie, nous discuterons l'ensemble de ces résultats et nous développerons les différentes perspectives qu'ouvrent ces données à plus ou moins long terme.

A/ Les peptides antibactériens de *Theromyzon tessulatum*

L'approche biochimique repose sur une série de chromatographies sur colonne de phase inverse effectuée à partir du liquide coelomique d'individus sexuellement matures. Deux

molécules le peptide B et la théromacine, ont été caractérisées par des analyses combinées de spectrométrie de masse et de séquençage par dégradation automatique d'Edman et dans le cas de la théromacine, par l'obtention de la séquence en acides aminés déduites de l'ADNc. Un troisième peptide est en cours de caractérisation au laboratoire.

Le premier peptide, appelé peptide B provient de la maturation d'un précurseur de neuropeptides : la proenképhaline A. Le peptide B de sangsue est très conservé puisqu'il possède 93.6 % d'homologies de séquence avec le peptide B bovin et la même activité dirigée contre les bactéries à Gram positif (MIC 200-400 nM contre *M. luteus*). Comme son équivalent mammalien, il est biphasphorylé. Chez le bœuf, différentes études effectuées par l'équipe du Dr D. Aunis ont révélé que cette biphasphorylation était indispensable à l'activité du peptide, on peut donc penser qu'il en est de même pour le peptide B de sangsue [Kieffer, 1998 #153]. La même approche biochimique que celle employée chez la sangsue a été appliquée sur du plasma de moules du genre *edulis* par l'équipe du Prof. G.B. Stefano, ainsi que sur du sang humain. Les résultats ont permis la mise en évidence de peptide B chez ces deux espèces ce qui confirme l'extrême conservation de cette molécule au cours de l'évolution.

La deuxième molécule antibactérienne isolée et caractérisée chez *Theromyzon tessulatum* ne présente aucune homologie de séquence avec des peptides antimicrobiens connus, nous avons donc décidé de l'appeler théromacine. La théromacine est un peptide cationique de 75 acides aminés, riche en résidus de cystéines. Ces cystéines impliquées dans des ponts disulfures, sont organisées selon un motif nouveau, différent de ceux défâ identifiés pour d'autres peptides antimicrobiens. La théromacine possède, par conséquent, une structure primaire originale : il serait intéressant à l'avenir, d'étudier également sa structure secondaire. Par ailleurs, la séquence en acides aminés déduite de l'ADNc révèle que le

précurseur n'est pas polypeptidique contrairement à la PEA mais qu'il s'agit d'un propeptide constitué d'un peptide signal directement suivi par le peptide actif. Aucune prorégion anionique ou extension C-terminale n'a été mise en évidence. L'existence d'un peptide signal suggère un processus classique de sécrétion de la théromacine dans le milieu extracellulaire. Cela justifierait la présence de la molécule dans le liquide coelomique. Les tests antimicrobiens montrent que la théromacine est fortement active contre *Micrococcus luteus* (MIC 16.5-33 nM). L'activité bactéricide vis à vis de cette bactérie à Gram positif est cependant relativement lente comparée à d'autres molécules antimicrobiennes puisque trois à cinq heures sont nécessaires à la théromacine pour tuer toute une population de *M. luteus*. La « lenteur » de ce processus de destruction suggère un mécanisme d'action de la théromacine au niveau du métabolisme de la bactérie plutôt qu'une action basée sur la membranolyse par formation de pores comme c'est le cas pour les défensines d'insectes. L'activité de la théromacine a également été testée vis à vis d'autres microorganismes : aucune activité dirigée contre les bactéries à Gram négatif *E. coli*, *E. aerogenes* et *Y. pseudotuberculosis*, le champignon filamenteux *Fusarium oxysporum* et la bactérie à Gram positif *S. Aureus* n'a été observé à une concentration ne dépassant pas 2 µM. A ce niveau, on ne peut pas exclure une absence d'activité liée aux trop faibles quantités de peptide utilisées pour le test. La purification de théromacine native ne permettant pas d'obtenir une grande quantité de matériel, nous envisageons très prochainement la production de la molécule recombinante.

Récemment une troisième molécule a été partiellement caractérisée chez notre modèle d'étude. L'obtention des 25 premiers acides aminés par dégradation automatique d'Edman a permis de concevoir des oligonucléotides de synthèse afin de rechercher l'ADN complémentaire codant cette molécule par génétique inverse (RT-PCR). L'ADNc obtenu est pour l'instant encore incomplet : seule la séquence correspondant à la molécule mature a été

clonée. L'obtention de la partie 5' de cet ADNc nous permettra de déterminer la structure complète du précurseur de ce peptide. Comme la théromacine, cette molécule ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres peptides antimicrobiens connus : nous l'avons nommée théromyzine. La théromyzine est un peptide antimicrobien linéaire de 86 acides aminés, dépourvu de modifications post-traductionnelles *i.e* glycosylation, phosphorylation... Comme le peptide B et la théromacine, l'activité de la théromyzine semble être principalement dirigée contre les bactéries à Gram positif.

Jusqu'à présent, aucune molécule active contre les bactéries à Gram négatif ou les champignons testés n'a été détectée dans le liquide coelomique de *Theromyzon tessulatum*. On ne peut cependant pas exclure la présence de telles molécules chez la sangsue. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le fait que ces peptides n'aient pas été détectés:

- les tests antimicrobiens sont réalisés avec des concentrations en peptide inférieures à la concentration minimale d'inhibition de croissance des microorganismes
- les microorganismes testés ne sont pas ceux contre lesquels ces éventuels peptides seraient actifs. Les tests devraient en effet être effectués sur une plus grande gamme de microbes. L'idéal serait d'ailleurs de pouvoir travailler sur des souches naturellement pathogènes pour la sangsue. Malheureusement, aucun microorganisme de ce type n'a été identifié à ce jour.
- enfin, il est également possible que certains peptides, comme cela a été mis en évidence chez la drosophile, répondent préférentiellement à une stimulation par des champignons plutôt que par des bactéries. Auquel cas des purifications à partir d'animaux infectés par des champignons doivent également être envisagées.

B/ Sites de production et de stockage des peptides antimicrobiens identifiés

1/ sites d'expression

La caractérisation des ADNc a permis d'étudier le site d'expression de la théromacine et de la théromyzine chez *T. tessulatum*. Les expériences d'HIS menées chez des animaux adultes ont révélé la présence des messagers codant la théromacine et la théromyzine dans des cellules qualifiées de graisseuses du fait de leur richesse en granules lipidiques. Ces cellules qui constituent un tissu largement distribué dans tout le corps de l'animal, sont en étroit contact avec les cavités qui renferment le liquide cœlomique. Aucun autre marquage en particulier au niveau des cellules circulantes ou des épithélia en contact avec le milieu extérieur, n'a été observé.

L'ADNc de la PEA de sangsue n'ayant pas encore été caractérisé, les sites de synthèse de ce précurseur n'ont pas été étudiés.

2/ sites de stockage des peptides

Deux immunséra produits chez le lapin ont été utilisés pour cette étude : un immunsérum polyclonal dirigé contre l'enkélytine bovine (aimablement fourni par le Dr M.H. Metz-Boutigue) et un immunsérum polyclonal reconnaissant la théromacine.

Les expériences d'immunocytochimie réalisées au niveau optique ont permis de mettre en évidence une immunoréactivité avec l'anticorps anti-enkélytine au niveau du système nerveux, du cerveau et des cellules circulantes de la sangsue. L'immunsérum reconnaissant à la fois la PEA et le peptide B, ce marquage nous informe uniquement sur la localisation du précurseur. Aucun élément ne nous permet, à ce niveau de l'étude, de déterminer si la PEA est réellement maturée de manière à produire du peptide B, dans chacune de ces structures marquées. De plus, il est probable que le processus de maturation de la PEA soit tissu-

spécifique comme cela est observé chez les vertébrés. Afin, entre autre, de répondre à cette question une approche par spectrométrie de masse sur cellules isolées va être développée au laboratoire.

Le marquage obtenu avec l'anticorps anti-théromacine est complètement différent du marquage observé avec l'anticorps anti-enkélytine. En effet, l'immunoréactivité anti-théromacine est essentiellement localisée au niveau des cellules graisseuses : aucune cellule circulante et aucun neurone n'est marqué. Ce marquage des cellules graisseuses est en accord avec les résultats obtenus en HIS qui suggèrent que les cellules graisseuses constituent l'unique site de synthèse de la théromacine. Cependant, des cellules situées dans le tégument et sous le tégument ainsi que des cellules de l'épithélium intestinal sont également immunopositive à la théromacine.

Au niveau de l'épithélium intestinal, cette discordance entre HIS et immunocytochimie pourrait s'expliquer par l'existence d'un isoforme de la théromacine. La séquence biochimique serait suffisamment proche de la théromacine pour être reconnue par l'immunsérum alors que la séquence nucléotidique serait trop éloignée pour être reconnue par la sonde nucléique. Ce type de discordance est courant et a déjà été observé, par exemple, pour un peptide antimicrobien isolé chez *Mytilus galloprovincialis* [Mitta, 2000 #155].

Au niveau du tégument, un élément tend à montrer que le marquage différentiel ne se justifierait pas uniquement par l'existence d'un isoforme. Cet élément repose sur l'isolement et la caractérisation biochimique de la théromacine (et non pas d'un isoforme) à partir du mucus qui recouvre l'animal. En fait, le marquage détecté en immunocytochimie est localisé au niveau de cellules sous-épithéliales qui paraissent être les mieux disposées pour être à même de libérer de la théromacine à la surface du tégument de la sanguine. Ces cellules pourraient être des cellules de stockage, dans un état de différenciation particulier qui leur



aurait fait perdre toute activité de synthèse. Suite à une infection, ces cellules sous-épithéliales sécrèteraient de la théromacine qui serait véhiculée vers le milieu extérieur *via* des canalicules. Des observations en microscopie électronique devraient apporter des éléments de réponse à cette hypothèse en nous permettant, notamment, de vérifier l'existence des canalicules.

Concernant la theromyzine, un immunsérum est en cours de production chez la souris. Les premières données obtenues en HIS montrent également une synthèse limitée aux cellules graisseuses uniquement. Des expériences de co-localisation en immunocytochimie seront réalisées afin d'étudier la distribution sub-cellulaire de ces deux molécules ainsi que le comportement de ces cellules lors d'une infection.

C/ Rôle des peptides antimicrobiens dans le processus anti-infectieux

Les outils utilisés pour l'étude de la localisation du peptide B (anticorps) et de la théromacine (anticorps et sonde nucléique), ont également permis d'appréhender le rôle de ces peptides dans le processus anti-infectieux. Nous avons notamment suivi l'expression génique ainsi que la cinétique de libération de ces peptides antimicrobiens dans le liquide biologique, chez des animaux soumis ou non à une infection expérimentale. Les données concernant le peptide B et la théromacine seront discutés séparément.

1/ le peptide B

Des ELISA compétitifs effectués à partir du liquide coelomique prélevé à différents temps après l'injection de LPS ou une lésion tégumentaire, ont révélé une augmentation rapide (dans les 15 min. qui suivent la stimulation) de la concentration en peptide B chez la

sangsue. Cette augmentation, qui est dose-dépendante, est le reflet d'une libération de peptide B stocké et/ou du déclenchement rapide du processus de maturation conduisant à la libération du peptide B.

Les données recueillies chez les vertébrés mettent en évidence une maturation intracellulaire de la PEA à partir de l'extrémité C-terminale. Des analyses réalisées *in vivo* et *in vitro* soulignent l'implication de pro-hormones convertases (PC) dans ce processus de maturation. Breslin et coll. ont, en effet, montré que l'action conjointe de PC1/PC3 sur la PEA générait du peptide B alors que le clivage protéolytique par PC2 assurait la libération de met-enk et de met-enk arg phe. Chez la sangsue, plusieurs arguments sont en faveur d'un mécanisme de maturation intracellulaire de la PEA proche de celui décrit chez les Mammifères : (i) la maturation du précurseur de la sangsue semble débuter par l'extrémité C-terminale (ii) le peptide B et la met-enk de sangsue sont délimités par des résidus basiques qui sont les sites de clivage préférentiels des PC or une PC de sangsue a récemment été clonée au Laboratoire (données non publiées). Afin de vérifier l'implication de cette PC dans la maturation de la PEA de sangsue, il conviendra dans un premier temps, de déterminer si PEA et PC sont localisées dans les mêmes compartiments intracytoplasmiques.

Un autre processus de maturation, cette fois extracellulaire, semble également exister chez la sangsue. Il est en effet apparu que certaines enzymes pouvant être inhibées par le phosphoramidon ou le captopril pouvaient intervenir à ce niveau. Cependant, ni les enzymes ni les fragments générés par leur action n'ont été caractérisés à l'heure actuelle.

Par ailleurs, des expériences menées chez la moule *Mytilus edulis* par l'équipe du Professeur G.B. Stefano, ont montré une libération concomitante de peptide B et de Met-enk dans les 15 minutes qui suivent l'injection de LPS. La Met-enk est un peptide opioïde capable

d'activer et de recruter les hémocytes de moule *via* des sites de liaison *delta* présents à leur surface. Ce phénomène nécessite un certain lapse de temps pendant lequel le peptide B assurerait une protection antimicrobienne. Des expériences menées *in vitro* suggèrent que le peptide B de moule serait ensuite dégradé ce qui entraînerait la libération d'un autre peptide opioïde, la Met-enk arg phe. La Met-enk arg phe possède comme la Met-enk la faculté d'activer et de recruter les hémocytes. D'après ces travaux, le peptide B jouerait donc un double rôle dans la réponse immunitaire en assurant dans l'immédiat la destruction des bactéries puis en recrutant les hémocytes *via* un de ses produits de dégradation.

Ce processus semble très conservé puisque les travaux effectués chez des patients opérés à cœur ouvert montre également une augmentation de la concentration plasmatique en peptide B, en enkélytine et en Met-enk. Chez l'homme, la Met-enk participerait à la réaction inflammatoire qui accompagne les opérations à cœur ouvert, en stimulant entre autre, la libération d'Il-6 par les macrophages. Il est apparu que la dégradation du peptide B générait de la Met-enk arg phe qui possède la même activité que la Met-enk vis à vis des cellules immunitaires. Par conséquent, le peptide B exercerait dans un premier temps une action antibactérienne puis son produit de dégradation participerait au processus inflammatoire. D'autres peptides antibactériens viennent compléter l'action du peptide B. Ces peptides, sécrétolytine et vasostatine-1, proviennent également de précurseurs neuropeptidiques, respectivement la chromogranine B et la chromogranine A (voir Généralités).

Les augmentations plasmatiques en peptide B, enkélytine, Met-enk, sécrétolytine et vasostatin-1 se produisent immédiatement après la pause du cathéter dans la veine radiale ce qui peut être assimilé à une blessure aseptique du patient. Cette observation rejoint celle faite chez la sangsue soit, une libération de peptides antimicrobiens suite à une lésion tégumentaire

de l'animal. Chez l'homme, ces peptides antimicrobiens peuvent être libérés par les cellules chromaffines de la médullosurrénale et/ou par les cellules immunitaires.

En ce concerne l'origine « immunitaire », nous avons amplifié par RT-PCR un messager codant la CGB à partir de monocytes. Des analyses en microscopie confocale avec un immunosérum dirigé contre la sécrétolytine ont révélé un marquage granulaire qui s'éteint lorsque les cellules sont incubées avec de l'IL-6. Aucune variation n'apparaît lorsque les cellules sont mises en contact avec des LPS ou de la Met-enk. L'analyse du surnageant de culture montre qu'effectivement la sécrétolytine est libérée par les monocytes mis en présence d'IL-6. Par conséquent, l'augmentation plasmatique de sécrétolytine observée pendant l'opération pourrait, en partie, être due à l'action de l'IL-6 sur les monocytes. La PEA étant également synthétisée par les monocytes, les mêmes expériences de stimulation par l'IL-6 ont été conduites. Aucune extinction du signal n'est apparue lorsque les cellules étaient incubées avec cette cytokine. Ceci tend à montrer que la PEA et la CGB ne sont pas stockées dans les mêmes granules intracytoplasmiques. Par ailleurs, de la PEA, de la CGA et de la CGB ont également été détectées par immunocytochimie dans les neutrophiles. Ces résultats obtenus en microscopie confocale rejoignent ceux de Metz-Boutigue et coll.. Ces auteurs ont, en effet, isolé ces molécules dans le surnageant de culture de neutrophiles. La présence de peptides antimicrobiens issus de précurseurs de neuropeptides à la fois au niveau des cellules immunitaires et des cellules endocrines va de pair avec le concept de Neuroimmunité.

En ce qui concerne l'origine endocrinienne, les peptides antimicrobiens dérivés de la CGA, de la CGB ou de la PEA sont très abondants au niveau des cellules chromaffines de la médullosurrénale où ils sont stockés dans les mêmes granules de sécrétion que les catécholamines. Les catécholamines sont des molécules connues pour être libérées lors d'un stress. Par conséquent, les patients étant soumis à un stress important avant et pendant l'opération, la

source majeure de ces peptides serait la médullosurrénale. Cette corrélation entre la libération et le stress justifierait d'ailleurs le taux basal des peptides antimicrobiens (peptide B, sécrétolytine et vasostatine-1) observé chez ces patients avant l'opération. Cette concentration basale pourrait également refléter un état d'inflammation de certaines zones des vaisseaux sanguins. En effet, des études épidémiologiques ont montré que certains agents infectieux tels que *Helicobacter pylori* et *Chlamydia pneumoniae* pouvaient être à l'origine du phénomène d'artérosclérose. En fait, ces bactéries exogènes constituaient un stimulus antigénique qui amplifierait l'état inflammatoire des plaques athérosclérotiques. Cet état inflammatoire des plaques est principalement lié à l'activité des monocytes et des lymphocytes T qui s'y sont accumulés. Selon notre hypothèse, ces cellules activées pourraient libérer du peptide B de la Met-enk et de la sécrétolytine. Afin de vérifier si la présence de ces molécules dans le sang est réellement le reflet d'un état d'athérosclérose avancé ou non, des études épidémiologiques vont être effectuées en collaboration avec le Professeur Amouyel de l'Institut Pasteur de Lille. Ce travail reposera notamment sur une comparaison entre des dosages effectués sur des patients atteints d'athérosclérose et des dosages effectués à partir de sang de patients sains.

2/ la théromacine

Dans un premier temps, nous avons étudié les variations d'expression du gène codant la théromacine en réponse à des infections expérimentales. Les données obtenues en northern-blot ont révélé une augmentation rapide (à 6 heures), forte et durable du taux basal de transcrits en réponse à un traitement bactérien. Aucune différence d'expression génique n'a été observée lorsque les animaux étaient injectés de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. Cela suggère que le processus observé est indépendant du type de bactéries injectées (*E. coli* et *M. luteus*). Par ailleurs, il est apparu que des injections salines entraînaient une

augmentation plus faible et plus tardive du taux de transcrits, comparée aux animaux injectés de bactéries (12h. versus 6h.). Par conséquent, l'augmentation rapide du taux de messagers observée après l'injection de microorganismes est bel et bien occasionnée par la présence de motifs bactériens. L'augmentation de la quantité de transcrits observée chez les animaux injectés de solution saline pourrait d'ailleurs s'expliquer par une entrée parasite, lors de l'injection, de bactéries présentes au niveau du tégument de l'animal. On ne peut pas non plus exclure un éventuel impact du stress occasionné par la piqûre, sur cette augmentation de messagers.

Toutes ces expériences ayant été menées sur des animaux entiers, nous ne pouvions pas déterminer à ce niveau, si l'augmentation de messagers se produisait uniquement dans les cellules graisseuses ou si d'autres cellules et/ou tissus qui n'expriment pas le gène dans les conditions normales, étaient également mis en jeu. L'HIS isotopique nous a permis de répondre à cette question. L'hybridation effectuée sur des animaux de stade 3 a révélé un taux basal de messagers codant la théromacine. Il est apparu, suite à une injection bactérienne, que ce taux basal augmentait uniquement dans les cellules graisseuses : aucun marquage n'a été détecté ni dans les cellules circulantes, ni dans les épithélia. Aucun tissu autre que les cellules graisseuses ne semble par conséquent participer au mécanisme de synthèse de la théromacine. Une augmentation du niveau d'expression est également perçue lors d'une injection saline mais celle-ci est moins importante. Ceci rejoint les données de northern-blot. Par ailleurs, ces expériences de quantification des messagers ayant été effectuées sur des cellules isolées, nous pouvons dire que l'augmentation de la quantité de transcrits est bien le fait d'un mécanisme d'induction du gène et non pas le fait d'une augmentation du nombre de cellules exprimant le gène. D'ailleurs, l'observation microscopique des préparations ne suggère en rien une telle augmentation.

Le clonage complet du gène est actuellement envisagé. Nous souhaiterions notamment déterminer si le promoteur du gène de ce peptide antibactérien comprend des éléments de réponse à l'IL-6, à l'IFN, des motifs GATA ou κB, comme c'est le cas chez la drosophile.

Par ailleurs, les premiers résultats d'HIS « à chaud » obtenus avec la sonde d'ADNc codant la théromyzine tendent à montrer une augmentation de l'expression du gène dans les mêmes cellules graisseuses que celles qui expriment la théromacine. Ces cellules par leur capacité à produire des peptides antibactériens, peuvent par conséquent être assimilées au corps gras des insectes. La similitude va plus loin puisque comme le corps gras des insectes, ces cellules graisseuses synthétisent des molécules de réserve de l'œuf telles que l'ovohémérythrine.

Afin de préciser son rôle dans le processus anti-infectieux, les variations de la concentration en théromacine dans le liquide coelomique ont été dosées chez des animaux soumis à une infection expérimentale. Les dosages ont révélé une concentration basale de théromacine rapidement doublée lorsque l'animal subissait une injection de bactéries. Une augmentation un peu moins importante est également observée chez des sangsues injectées d'une solution saline. Ce phénomène serait lié à une libération massive de théromacine par les cellules graisseuses. En effet, une approche en immunocytochimie sur des coupes semi-fines a révélé une atténuation du marquage des cellules graisseuses chez des sangsues injectées de bactéries *versus* sangsues contrôles. Une approche en microscopie électronique est en cours afin de (i) déterminer dans quelle(s) structure(s) intracellulaire(s) est stockée la théromacine et (ii) de vérifier si la « vidange » s'effectue bien dans le liquide coelomique comme nous le pensons.

Par ailleurs, il est important de noter que la concentration en théromacine détectée dans le liquide coelomique, est supérieure à la valeur de la MIC, montrant ainsi que le peptide peut exercer son activité bactéricide dans le liquide biologique de l'animal.

La théromacine participerait donc à la défense anti-infectieuse par une action systémique. Les dosages par RP-HPLC de la théromyzine montre un profil de libération de ce peptide dans le liquide coelomique similaire à celui de la théromacine. Ce mode d'action systémique ne semble donc pas être limité à la théromacine.

En plus de cette action systémique, les résultats d'immunocytochimie suggèrent un rôle de la théromacine et/ou d'un isoforme dans la défense des épithélia en contact avec le milieu extérieur. La présence de structures immunoréactives au niveau du tégument nous a conduit à rechercher la présence de théromacine dans le mucus qui recouvre la sangsue. Cette curiosité était également étayée par des observations physiologiques faites lors des injections. Nous avions en effet noté une importante libération de mucus chez les animaux injectés de bactéries. Des purifications réalisées à partir de ce mucus ont révélé qu'il contenait effectivement de la théromacine. La présence de ce peptide antibactérien dans le mucus pourrait en partie s'expliquer par une libération du contenu des cellules sous-épithéliales. La théromyzine a également été détectée dans le mucus.

La sangsue a donc développé un double système de défense afin de limiter la pénétration des microorganismes : (i) libération renforcée de mucus qui constitue une barrière physicochimique très efficace pour piéger les microbes et limiter leur dispersion dans les tissus plus profonds et (ii) libération de peptides antibactériens afin de détruire les microrganismes. Cela évoque le processus de protection mis en place au niveau de la peau des amphibiens (voir Généralités).

Les expériences d'analyse d'expression du gène codant la théromacine ont été répétées avec des animaux au stade 2 de leur cycle vital. A ce stade, une augmentation de l'expression du gène codant la théromacine a également été observée dans les cellules graisseuses d'animaux injectés de bactéries ou d'une solution saline. Comme chez les sangsues adultes, l'augmentation d'expression est bien plus importante lors d'une injection de bactéries que lors d'une injection saline. Cependant, contrairement aux adultes, les sangsues de stade 2 ne présentent pas de taux basal d'expression du gène codant la théromacine. Ces observations suggèrent qu'un phénomène physiologique se déroulant lors du passage des animaux au stade adulte pourrait induire l'expression du gène codant la théromacine. Ce type d'induction liée au développement a déjà été rapportée pour un peptide antimicrobien de drosophile : la drosomycine.

Ces expériences d'ontogénèse seront étendues à des animaux de stade 0, de stade 1 et à l'oeuf. En fait, quelques éléments suggèrent déjà une participation de la théromacine dans la défense de l'œuf :

- chez la sangsue, certaines protéines telles que la vitellogénine et l'ovohémérythrine, après libération dans le liquide coelomique, sont recapturées par l'œuf (par pinocytose) où elles servent de molécules de réserve. On peut parfaitement imaginer un mécanisme similaire pour la théromacine et/ou la théromyzine d'autant que ces peptides antimicrobiens sont synthétisés dans les mêmes cellules que l'ovohémérythrine. Cette hypothèse pourra être vérifiée en réalisant des purifications à partir d'œufs prélevés avant la ponte.
- lors de la ponte les parents recouvrent le cocon de mucus qui contient de la théromacine et de la théromyzine. Par ce biais, ces peptides antimicrobiens pourraient donc assurer la défense des œufs au cours de leur développement.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les données obtenues nous permettent de présenter un modèle d'intervention des peptides antimicrobiens dans la réponse anti-infectieuse de la sangsue (voir schéma).

Au niveau du tégument : Une blessure septique provoquerait une importante libération de mucus par les glandes encastrées entre les cellules épithéliales. Ce mucus aurait pour rôle de limiter, par piégeage, l'expansion des pathogènes dans les tissus plus profonds. Parallèlement, deux peptides antibactériens, la théromacine et la théromyzine seraient libérées par les cellules sous-épithéliales et/ou les cellules graisseuses et contribueraient à la destruction des microorganismes piégés.

Au niveau du liquide coelomique : La théromacine et la théromyzine seraient également libérées dans le liquide coelomique où elles exerceraient un rôle systémique dans la défense antibactérienne. La présence de microrganismes induit également une forte augmentation de l'expression des gènes codant ces peptides antimicrobiens. Un troisième peptide, le peptide B serait également libéré dans le liquide coelomique. Cette libération serait accompagnée par celle d'un peptide opioïde, la met-enk. La met-enk délivrerait un signal chémoattractant qui assurerait le recrutement des cellules circulantes au site infectieux. Les cellules recrutées pourraient à leur tour libérer du peptide B et de la met-enk ce qui renforcerait le processus de défense.

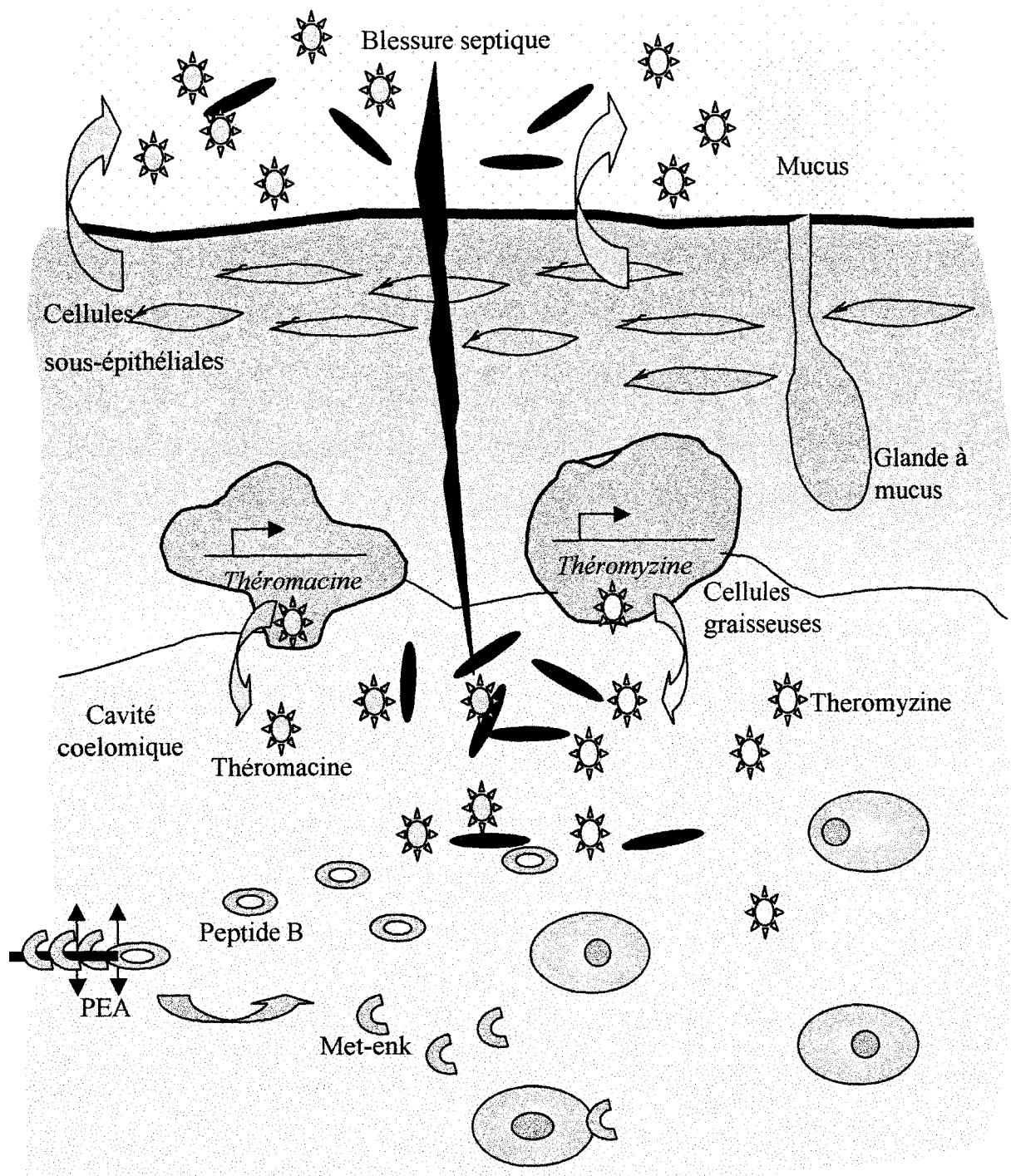
Jusqu'à présent, seuls les insectes holométaboles présentaient un mécanisme d'induction des gènes codant des peptides antimicrobiens. En effet, chez bon nombre d'invertébrés « phylogénétiquement moins évolués » tels que la moule, la crevette ou encore chez des insectes hétérométaboles, les gènes codant ces molécules antibiotiques s'expriment de

manière constitutive. Ces données suggéraient la mise en place d'un mécanisme d'induction des peptides antimicrobiens, lors de la transition hétémétaboles/holométaboles. Par le présent travail, nous montrons qu'un tel système existe chez un Annélide. Le mécanisme de défense mis en place chez *T. tessulatum* est en fait très proche de celui existant chez les insectes holométaboles : production, suivie d'une libération massive par un tissu spécifique de peptides antimicrobiens dans le liquide coelomique des animaux, suite à une infection expérimentale.

Par ailleurs, le travail portant sur l'intervention des peptides dérivés de la PEA dans l'immunité de la sangsue et de l'homme, a contribué à mettre en évidence de nouvelles homologies entre les systèmes immunitaires d'invertébrés et de vertébrés. L'idée selon laquelle les systèmes immunitaires des vertébrés seraient constitués d'une mosaïque de systèmes de défense empruntés aux invertébrés est une fois de plus confortée.

De nombreuses questions concernant ce travail de thèse restent cependant encore en suspens :

- de quelle manière la sangsue parvient-elle à « détecter » la présence de microorganismes ?
- est ce que la synthèse de peptides antimicrobiens met en jeu des récepteurs de type Toll chez *T. tessulatum* ?
- la théromacine et/ou la théromyzine n'exercent-elles d'autres fonctions que leur activité antibactérienne comme cela est observé pour le peptide B et les défensines de vertébrés ?



**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Agarwala, K. L., S. Kawabata, et al. (1996). "Limulus intracellular coagulation inhibitor type 3. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization." J Biol Chem **271**(39): 23768-74.
- Aley, S. B., M. Zimmerman, et al. (1994). "Killing of Giardia lamblia by cryptdins and cationic neutrophil peptides." Infect Immun **62**(12): 5397-403.
- Al-Sharif, W. Z., J. O. Sunyer, et al. (1998). "Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3." J Immunol **160**(6): 2983-97.
- Amiche, M., A. A. Seon, et al. (1999). "The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain." FEBS Lett **456**(3): 352-6.
- Anderson, W. A., Y. H. Kang, et al. (1979). "Mammalian endogenous peroxidases as cellular markers and as biosynthetic endpoints of hormone-mediated activity: viewpoint from cytochemistry." Prog Histochem Cytochem **11**(4): 1-27.
- Andersson, M., H. Gunne, et al. (1996). "NK-lysin, structure and function of a novel effector molecule of porcine T and NK cells." Vet Immunol Immunopathol **54**(1-4): 123-6.
- Aravind, L., V. M. Dixit, et al. (2001). "Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons." Science **291**(5507): 1279-84.
- Arnljots, K., O. Sorensen, et al. (1998). "Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells." Leukemia **12**(11): 1789-95.
- Aumelas, A., M. Mangoni, et al. (1996). "Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin- 1." Eur J Biochem **237**(3): 575-83.

- Basset, A., R. S. Khush, et al. (2000). "The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3376-81.
- Bayne, C. J. and S. E. Fryer (1994). "Phagocytosis and invertebrate opsonins in relation to parasitism." Ann N Y Acad Sci **712**: 162-77.
- Belvin, M. P. and K. V. Anderson (1996). "A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 393-416.
- Bettencourt, R., Y. Assefaw-Redda, et al. (2000). "The insect immune protein hemolin is expressed during oogenesis and embryogenesis." Mech Dev **95**(1-2): 301-4.
- Bevins, C. L., E. Martin-Porter, et al. (1999). "Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract." Gut **45**(6): 911-5.
- Bevins, C. L. and M. Zasloff (1990). "Peptides from frog skin." Annu Rev Biochem **59**: 395-414.
- Blackwell, T. K. and F. W. Alt (1989). "Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals." Annu Rev Genet **23**: 605-36.
- Borenstein, L. A., M. E. Selsted, et al. (1991). "Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensins against *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*." Infect Immun **59**(4): 1359-67.
- Brey, P. T., D. B. Stoltz, et al. (1991). "Use of nitrocellulose membrane to activate and measure insect prophenol oxidase." Anal Biochem **194**(2): 359-64.
- Bruce, C., L. J. Beamer, et al. (1998). "The implications of the structure of the bactericidal/permeability- increasing protein on the lipid-transfer function of the cholesteryl ester transfer protein." Curr Opin Struct Biol **8**(4): 426-34.

- Bulet, P., J. L. Dimarcq, et al. (1993). "A novel inducible antibacterial peptide of Drosophila carries an O-glycosylated substitution." J Biol Chem **268**(20): 14893-7.
- Bulet, P., C. Hetru, et al. (1999). "Antimicrobial peptides in insects; structure and function." Dev Comp Immunol **23**(4-5): 329-44.
- Cerenius, L., Z. Liang, et al. (1994). "Structure and biological activity of a 1,3-beta-D-glucan-binding protein in crustacean blood." J Biol Chem **269**(47): 29462-7.
- Charpentier, S., M. Amiche, et al. (1998). "Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics." J Biol Chem **273**(24): 14690-7.
- Chiou, S. T., Y. W. Chen, et al. (2000). "Isolation and characterization of proteins that bind to galactose, lipopolysaccharide of Escherichia coli, and protein A of Staphylococcus aureus from the hemolymph of Tachypleus tridentatus." J Biol Chem **275**(3): 1630-4.
- Chu, C., C. H. Chiu, et al. (2001). "Large Drug Resistance Virulence Plasmids of Clinical Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis." Antimicrob Agents Chemother **45**(8): 2299-303.
- Cole, A. M. and T. Ganz (2000). "Human antimicrobial peptides: analysis and application." Biotechniques **29**(4): 822-6, 828, 830-1.
- Daher, K. A., M. E. Selsted, et al. (1986). "Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins." J Virol **60**(3): 1068-74.
- Darmoul, D. and A. J. Ouellette (1996). "Positional specificity of defensin gene expression reveals Paneth cell heterogeneity in mouse small intestine." Am J Physiol **271**(1 Pt 1): G68-74.
- Destoumieux, D., M. Munoz, et al. (2000). "Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge." J Cell Sci **113**(Pt 3): 461-9.

- Dimopoulos, G., A. Richman, et al. (1997). "Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11508-13.
- Engstrom, Y., L. Kadalayil, et al. (1993). "kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*." J Mol Biol **232**(2): 327-33.
- Ferrandon, D., A. C. Jung, et al. (1998). "A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway." Embo J **17**(5): 1217-27.
- Ferrier, P., B. Krippl, et al. (1989). "Control of VDJ recombinase activity." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54**(Pt 1): 191-202.
- Frohm, M., B. Agerberth, et al. (1997). "The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders." J Biol Chem **272**(24): 15258-63.
- Ganz, T., M. E. Selsted, et al. (1985). "Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils." J Clin Invest **76**(4): 1427-35.
- Ganz, T. and J. Weiss (1997). "Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia." Semin Hematol **34**(4): 343-54.
- Gillespie, J. P., M. R. Kanost, et al. (1997). "Biological mediators of insect immunity." Annu Rev Entomol **42**: 611-43.
- Gokudan, S., T. Muta, et al. (1999). "Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10086-91.

- Goraya, J., Y. Wang, et al. (2000). "Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*." Eur J Biochem **267**(3): 894-900.
- Goumon, Y., K. Lugardon, et al. (1998). "Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells." J Biol Chem **273**(45): 29847-56.
- Guillemot, D. and P. Courvalin (2001). "Better control of antibiotic resistance." Clin Infect Dis **33**(4): 542-7.
- Guthridge, J. M., J. K. Rakstang, et al. (2001). "Structural studies in solution of the recombinant N-terminal pair of short consensus/complement repeat domains of complement receptor type 2 (CR2/CD21) and interactions with its ligand C3dg." Biochemistry **40**(20): 5931-41.
- Hall, M., T. Scott, et al. (1995). "Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7764-8.
- Hancock, R. E. (1997). "Peptide antibiotics." Lancet **349**(9049): 418-22.
- Hancock, R. E. and G. Diamond (2000). "The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences." Trends Microbiol **8**(9): 402-10.
- Harder, J., J. Bartels, et al. (1997). "A peptide antibiotic from human skin." Nature **387**(6636): 861.
- Harrod, K. S., B. C. Trapnell, et al. (1999). "SP-A enhances viral clearance and inhibits inflammation after pulmonary adenoviral infection." Am J Physiol **277**(3 Pt 1): L580-8.

- Haziot, A., E. Ferrero, et al. (1995). "CD14-deficient mice are exquisitely insensitive to the effects of LPS." *Prog Clin Biol Res* **392**: 349-51.
- Henkle-Duhrsen, K. and A. Kampkotter (2001). "Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes." *Mol Biochem Parasitol* **114**(2): 129-42.
- Higazi, A. A., E. Lavi, et al. (1997). "Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells." *Blood* **89**(12): 4290-8.
- Hoffmann, J. (2001). *L'immunité de la drosophile*. Réunion d'Immunologie des Invertébrés, Villeneuve d'ascq.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, et al. (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." *Science* **284**(5418): 1313-8.
- Holmblad, T., P. O. Thornqvist, et al. (1997). "Identification and cloning of an integrin beta subunit from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*." *J Exp Zool* **277**(3): 255-61.
- Hubacek, J. A., C. Buchler, et al. (1997). "The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved." *Biochem Biophys Res Commun* **236**(2): 427-30.
- Imler, J. L. and J. A. Hoffmann (2001). "Toll receptors in innate immunity." *Trends Cell Biol* **11**(7): 304-11.
- Iovine, N. M., P. Elsbach, et al. (1997). "An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability- increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10973-8.
- Iwanaga, S. and S. Kawabata (1998). "Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab." *Front Biosci* **3**: D973-84.

- Iwanaga, S., S. Kawabata, et al. (1998). "New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions." J Biochem (Tokyo) **123**(1): 1-15.
- Iwanaga, S., T. Muta, et al. (1994). "Role of hemocyte-derived granular components in invertebrate defense." Ann N Y Acad Sci **712**: 102-16.
- Jacklet, J. W. (1997). "Nitric oxide signaling in invertebrates." Invert Neurosci **3**(1): 1-14.
- Ji, X., K. Azumi, et al. (1997). "Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6340-5.
- Kadalayil, L., U. M. Petersen, et al. (1997). "Adjacent GATA and kappa B-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene." Nucleic Acids Res **25**(6): 1233-9.
- Kagan, B. L., T. Ganz, et al. (1994). "Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides." Toxicology **87**(1-3): 131-49.
- Kawabata, S., H. G. Beisel, et al. (2001). "Role of tachylectins in host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachylepus tridentatus*." Adv Exp Med Biol **484**: 195-202.
- Kawabata, S., R. Nagayama, et al. (1996). "Tachycitin, a small granular component in horseshoe crab hemocytes, is an antimicrobial protein with chitin-binding activity." J Biochem (Tokyo) **120**(6): 1253-60.
- Kawasaki, N., T. Kawasaki, et al. (1983). "Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum." J Biochem (Tokyo) **94**(3): 937-47.
- Kenjo, A., M. Takahashi, et al. (2001). "Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*." J Biol Chem **276**(23): 19959-65.

- Kieffer, B., B. Dillmann, et al. (1998). "Solution conformation of the synthetic bovine proenkephalin-A209-237 by ¹H NMR spectroscopy." *J Biol Chem* **273**(50): 33517-23.
- Kim, Y. S., J. H. Ryu, et al. (2000). "Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells." *J Biol Chem* **275**(42): 32721-7.
- Klebanoff, S. J., D. T. Durack, et al. (1977). "Functional studies on human peritoneal eosinophils." *Infect Immun* **17**(1): 167-73.
- Kreil, G., C. Mollay, et al. (1980). "Prepromelittin: specific cleavage of the pre- and the propeptide in vitro." *Ann N Y Acad Sci* **343**: 338-46.
- Krensky, A. M. (2000). "Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells." *Biochem Pharmacol* **59**(4): 317-20.
- Kromer, E., N. Nakakura, et al. (1994). "Cloning of a *Locusta* cDNA encoding a precursor peptide for two structurally related proteinase inhibitors." *Insect Biochem Mol Biol* **24**(3): 329-31.
- Ladokhin, A. S., M. E. Selsted, et al. (1997). "Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids." *Biophys J* **72**(2 Pt 1): 794-805.
- Lerrick, J. W., M. Hirata, et al. (1995). "Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein." *Infect Immun* **63**(4): 1291-7.
- Laurent, V. and M. Salzet (1996). "Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases: isolation of an enkephalin-degrading aminopeptidase." *Regul Pept* **65**(2): 123-31.

- Laurent, V., G. Stefano, et al. (1997). "Presence and biochemical properties of a molluscan invertebrate angiotensin-converting enzyme." Regul Pept **69**(2): 53-61.
- Lee, W. J., J. D. Lee, et al. (1996). "Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7888-93.
- Lehane, M. J., D. Wu, et al. (1997). "Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11502-7.
- Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein, et al. (1993). "Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells." Annu Rev Immunol **11**: 105-28.
- Lemaitre, B., J. M. Reichhart, et al. (1997). "Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14614-9.
- Lencer, W. I., G. Cheung, et al. (1997). "Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptdins 2 and 3." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8585-9.
- Lessing, M. P. and M. J. Raftery (1998). "Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*." Lancet **351**(9102): 601-2.
- Levashina, E. A., L. F. Moita, et al. (2001). "Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*." Cell **104**(5): 709-18.
- Liang, Z., L. Sottrup-Jensen, et al. (1997). "Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6682-7.

- Little, R. G., D. N. Kelner, et al. (1994). "Functional domains of recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI23)." *J Biol Chem* **269**(3): 1865-72.
- Liu, L., C. Zhao, et al. (1997). "The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry." *Genomics* **43**(3): 316-20.
- Loprasert, S., P. Vattanaviboon, et al. (1996). "Regulation of the oxidative stress protective enzymes, catalase and superoxide dismutase in Xanthomonas--a review." *Gene* **179**(1): 33-7.
- Lugardon, K., R. Raffner, et al. (2000). "Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A." *J Biol Chem* **275**(15): 10745-53.
- Malecha, J. (1979). *Annelida-Hirudinea*, Oxford & IBH publishing CO.PVT.LTD.
- Mangoni, M. L., N. Grovale, et al. (2000). "Structure-function relationships in bombinins H, antimicrobial peptides from Bombina skin secretions." *Peptides* **21**(11): 1673-9.
- Mangoni, M. L., A. C. Rinaldi, et al. (2000). "Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin." *Eur J Biochem* **267**(5): 1447-54.
- Marodi, L., S. Schreiber, et al. (1993). "Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors." *J Clin Invest* **91**(6): 2596-601.
- Matsushita, M. (1996). "The lectin pathway of the complement system." *Microbiol Immunol* **40**(12): 887-93.
- Matsushita, M., Y. Endo, et al. (1998). "Complement-related serine proteases in tunicates and vertebrates." *Curr Opin Immunol* **10**(1): 29-35.
- Means, T. K., D. T. Golenbock, et al. (2000). "The biology of Toll-like receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* **11**(3): 219-32.

- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N Engl J Med **343**(5): 338-44.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Meister, M., B. Lemaitre, et al. (1997). "Antimicrobial peptide defense in Drosophila." Bioessays **19**(11): 1019-26.
- Metz-Boutigue, M. H., Y. Goumon, et al. (1998). "Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules." Cell Mol Neurobiol **18**(2): 249-66.
- Metz-Boutigue, M. H., K. Lugardon, et al. (2000). "Antibacterial and antifungal peptides derived from chromogranins and proenkephalin-A. From structural to biological aspects." Adv Exp Med Biol **482**: 299-315.
- Mitta, G., F. Hubert, et al. (2000). "Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis." Dev Comp Immunol **24**(4): 381-93.
- Mitta, G., F. Vandenbulcke, et al. (2000). "Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel." J Cell Sci **113**(Pt 15): 2759-69.
- Mitta, G., F. Vandenbulcke, et al. (2000). "Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity." FEBS Lett **486**(3): 185-90.
- Miura, Y., S. Kawabata, et al. (1995). "A limulus intracellular coagulation inhibitor type 2. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization." J Biol Chem **270**(2): 558-65.
- Nagaoka, I., S. Hirota, et al. (2000). "Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins." Inflamm Res **49**(2): 73-9.
- Nappi, A. J., E. Vass, et al. (1995). "Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites." Eur J Cell Biol **68**(4): 450-6.

- Nonaka, M. and K. Azumi (1999). "Opsonic complement system of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*." Dev Comp Immunol **23**(4-5): 421-7.
- Panyutich, A. and T. Ganz (1991). "Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein." Am J Respir Cell Mol Biol **5**(2): 101-6.
- Panyutich, A., J. Shi, et al. (1997). "Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted proproteinases." Infect Immun **65**(3): 978-85.
- Panyutich, A. V., P. S. Hiemstra, et al. (1995). "Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other." Am J Respir Cell Mol Biol **12**(3): 351-7.
- Panyutich, A. V., E. A. Panyutich, et al. (1993). "Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis." J Lab Clin Med **122**(2): 202-7.
- Panyutich, A. V., O. Szold, et al. (1994). "Identification of defensin binding to C1 complement." FEBS Lett **356**(2-3): 169-73.
- Pier, G. B., M. Grout, et al. (1996). "Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections." Science **271**(5245): 64-7.
- Pipe, R. K. (1990). "Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*." Histochem J **22**(11): 595-603.
- Poltorak, A., P. Ricciardi-Castagnoli, et al. (2000). "Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2163-7.
- Poppe, C., M. Ayroud, et al. (2001). "Trends in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animals, foods of animal origin, and the environment of animal production in Canada, 1994-1997." Microb Drug Resist **7**(2): 197-212.

- Pujol, N., E. M. Link, et al. (2001). "A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*." Curr Biol **11**(11): 809-21.
- Raad, I., J. Abbas, et al. (1997). "Infection control of nosocomial respiratory viral disease in the immunocompromised host." Am J Med **102**(3A): 48-52; discussion 53-4.
- Reichhart, J. M., M. Essrich, et al. (1989). "Insect immunity. Isolation of cDNA clones corresponding to diptericin, an inducible antibacterial peptide from *Phormia terraenovae* (Diptera). Transcriptional profiles during immunization." Eur J Biochem **182**(2): 423-7.
- Reid, K. B., M. G. Colomb, et al. (1998). "Complement component C1 and the collectins: parallels between routes of acquired and innate immunity." Immunol Today **19**(2): 56-9.
- Richman, A. M., G. Dimopoulos, et al. (1997). "Plasmodium activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes." Embo J **16**(20): 6114-9.
- Ritonja, A., M. Kopitar, et al. (1989). "Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes." FEBS Lett **255**(2): 211-4.
- Saito, T., S. Kawabata, et al. (1995). "A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity." J Biochem (Tokyo) **117**(5): 1131-7.
- Salzet, M. and G. B. Stefano (1997). "Invertebrate proenkephalin: delta opioid binding sites in leech ganglia and immunocytes." Brain Res **768**(1-2): 224-32.
- Sawyer, R. T., Ed. (1986). Leech Biology and Behaviour.
- Schroder, J. M. (1999). "Epithelial peptide antibiotics." Biochem Pharmacol **57**(2): 121-34.

- Shi, J., C. R. Ross, et al. (1996). "PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6014-8.
- Shigenaga, T., T. Muta, et al. (1990). "Antimicrobial tachyplesin peptide precursor. cDNA cloning and cellular localization in the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*)."J Biol Chem **265**(34): 21350-4.
- Shigenaga, T., Y. Takayenoki, et al. (1993). "Separation of large and small granules from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes and characterization of their components." J Biochem (Tokyo) **114**(3): 307-16.
- Silverman, N. and T. Maniatis (2001). "NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity." Genes Dev **15**(18): 2321-42.
- Smith, J. J., S. M. Travis, et al. (1996). "Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid." Cell **85**(2): 229-36.
- Smith, L. C., C. S. Shih, et al. (1998). "Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system." J Immunol **161**(12): 6784-93.
- Soderhall, K. and L. Cerenius (1998). "Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity." Curr Opin Immunol **10**(1): 23-8.
- Song, W. C., M. R. Sarrias, et al. (2000). "Complement and innate immunity." Immunopharmacology **49**(1-2): 187-98.
- Sorensen, O., K. Arnljots, et al. (1997). "The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils." Blood **90**(7): 2796-803.

- Stahl, P. D. and R. A. Ezekowitz (1998). "The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense." Curr Opin Immunol **10**(1): 50-5.
- Stenger, S., J. P. Rosat, et al. (1999). "Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells." Immunol Today **20**(9): 390-4.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-51.
- Takeuchi, O., T. Kawai, et al. (1999). "TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family." Gene **231**(1-2): 59-65.
- Tauszig, S., E. Jouanguy, et al. (2000). "Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10520-5.
- Tobias, P. S., K. Soldau, et al. (1997). "Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS." J Biol Chem **272**(30): 18682-5.
- Torreilles, J., M. C. Guerin, et al. (1996). "[Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves]." C R Acad Sci III **319**(3): 209-18.
- Turner, M. W. (1996). "The lectin pathway of complement activation." Res Immunol **147**(2): 110-5.
- Turner, M. W. (1996). "Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system." Immunol Today **17**(11): 532-40.
- Valore, E. V., E. Martin, et al. (1996). "Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its propiece." J Clin Invest **97**(7): 1624-9.
- Vattanaviboon, P., R. Sriprang, et al. (2001). "Catalase has a novel protective role against electrophile killing of *Xanthomonas*." Microbiology **147**(Pt 2): 491-8.

- Weiss, J., P. Elsbach, et al. (1992). "Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria." J Clin Invest **90**(3): 1122-30.
- Wenzel, R. P., C. A. Osterman, et al. (1976). "Hospital-acquired infections. I. Surveillance in a university hospital." Am J Epidemiol **103**(3): 251-60.
- Williams, M. J., A. Rodriguez, et al. (1997). "The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense." Embo J **16**(20): 6120-30.
- Wilson, C. L., K. J. Heppner, et al. (1995). "The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse." Mol Biol Cell **6**(7): 851-69.
- Wilson, C. L., A. J. Ouellette, et al. (1999). "Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense." Science **286**(5437): 113-7.
- Wurfel, M. M., B. G. Monks, et al. (1997). "Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact." J Exp Med **186**(12): 2051-6.
- Yamamoto, Y., T. W. Klein, et al. (1997). "Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL- 1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of Candida albicans to macrophages." Infect Immun **65**(3): 1077-82.
- Yang, D., O. Chertov, et al. (2001). "Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti- microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37)." J Leukoc Biol **69**(5): 691-7.

Zanetti, M., R. Gennaro, et al. (2000). "Structure and biology of cathelicidins." Adv Exp Med Biol **479**: 203-18.

Zasloff, M. (2000). "Reconstructing one of nature's designs." Trends Pharmacol Sci **21**(7): 236-8.

PUBLICATIONS-COMMUNICATIONS

ARTICLES PUBLIES

M. Salzet, A. Tasiemski, « Involvement of proenkephalin derived peptides in immunity » *Developmental and Comparative Immunology*, 2001; 25: 177-185.

A. Tasiemski, M. Verger-Bocquet, M. Cadet, Y. Goumon, M.H. Metz-Boutigue, D. Aunis, G.B. Stefano, M. Salzet, « PEA derived peptides in invertebrate innate immune processes » : *Molecular Brain Research*, 2000; 76: 237-252

A. Tasiemski, H. Benson, G.L. Fricchione, T.V. Bilfinger , Y. Goumon, M.H. Metz-Boutigue, D. Aunis, G.B. Stefano, M. Salzet « The presence of antibacterial and opioid peptides in human plasma during coronary artery bypass surgery» *Journal of Neuroimmunology*, 2000; 109 (2): 228-235

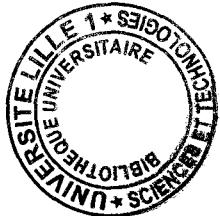
C. Lefebvre, A. Tasiemski, M. Salzet « Peptides opioïdes, substances opiacées et réponse immunitaire » *Médecine-Sciences*, 2000 ;16: 235-242

A. Tasiemski, C. Lefebvre, D. Vieau, M. Salzet, « Immune response modulation by opioids in mammals and invertebrates » *Current Trends in Immunology*, 1999; Vol. 2.

ARTICLE SOUMIS OU EN PREPARATION

A. Tasiemski, H. Hammad, F. Vandenbulcke, C. Breton, J. Pestel, T. V. Bilfinger, M. Salzet, "Presence of chromogranin-derived antimicrobial peptides in plasma during coronary artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides" (*en révision Blood*)

A. Tasiemski F. Vandenbulcke, G. Mitta, J. Lemoine, P.E. Sautière, M. Salzet, « Inducible expression of Theromacin, a novel cystein rich antibacterial peptide in bacteria challenged leeches, *Theromyzon tessulatum*”



COMMUNICATIONS

A. Tasiemski, F. Vandenbulcke, G. Mitta, J. Lemoine, P.E. Sautière, M. Salzet, « Inducible expression of Theromacin, a novel cystein rich antibacterial peptide in bacteria challenged leeches, *Theromyzon tessulatum*” *Réunion d'Immunologie des Invertébrés, Villeneuve d'Ascq, France, Sept 11-14, 2001*

A. Tasiemski, H. Benson, G.L. Fricchione, T.V. Bilfinger, Y. Goumon, M.H. Metz-Boutigue, D. Aunis, G.B. Stefano, M. Salzet : “Implication of proenkephalin A derived peptides in the immune system of the leech : evidence of a conserved mechanism in human”, *Société Française d'Immunologie, Lille, France, Nov 24-26, 1999.*

A. Tasiemski, M. Verger-Bocquet, M. Cadet, Y. Goumon, M.H. Metz-Boutigue, D. Aunis, G.B. Stefano, M. Salzet : “Implication of proenkephalin A derived peptides in the immune system of the leech », *2^{ème} journée scientifique de réseau LARC-Neurosciences, Caen, France, oct 1998.*

A. Tasiemski, M. Salzet: “Modulation of the leech immune system”, *Réunion du groupe Immunologie des Invertébrés, Brest, France, mars 1998.*

A. Tasiemski, M. Salzet : “Presence of an antibacterial peptide at the C-terminal part of the invertebrate proenkephalin A”, *1^{ère} journée scientifique du réseau LARC-Neurosciences Mont Saint Aignan , France, oct. 1997.*