HAL
archives-ouvertes.fr

Etude du système immunitaire chez la seiche Sepia officinalis : un potentiel pour l'aquaculture

Louis Benoist

▶ To cite this version:

Louis Benoist. Etude du système immunitaire chez la seiche Sepia officinalis : un potentiel pour l'aquaculture. Biologie animale. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC226 . tel-03231615

HAL Id: tel-03231615
https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03231615

Submitted on 21 May 2021

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

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

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude du système immunitaire chez la seiche Sepia officinalis : un potentiel pour l'aquaculture

Présentée et soutenue par
Louis BENOIST

Thèse soutenue publiquement le 20/11/2020 devant le jury composé de		
Mme CHRISTINE BRAQUART-VARNIER	Professeur des universités, Université de Poitiers	Rapporteur du jury
M. VIANNEY PICHEREAU	Professeur des universités, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur du jury
Mme DELPHINE DESTOUMIEUX-GARZON	Directeur de recherche au CNRS, Université de Montpellier	Membre du jury
M. JOEL HENRY	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. YANNICK LABREUCHE	Cadre de recherche, IFREMER	Membre du jury
Mme CELINE ZATYLNY - GAUDIN	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par CELINE ZATYLNY - GAUDIN, Biologie des organismes et ecosystèmes aquatiques (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

BOREA
Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes ayant contribué à ces travaux de thèse, que ce soit personnellement ou professionnellement, ainsi que la région Normandie pour la bourse qui m'a été accordée.

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à ma directrice de thèse, le Dr Céline Zatylny-Gaudin pour son encadrement au cours de ces trois années de thèse ainsi que son accueil au sein du laboratoire BOREA. Après deux stages très enrichissants, vous m'avez fait confiance pour réaliser cette thèse et je vous en suis reconnaissant. Merci pour votre soutien et votre disponibilité dans les moments les plus difficiles ainsi que l'ensemble de vos remarques et de vos conseils.

J'exprime mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury,
Au Pr Christine Braquart-Varnier et au Pr Vianney Pichereau, pour avoir accepté de rapporter ces travaux de thèse. Au Dr Delphine Destoumieux-Garzón pour avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur. Au Pr Joël Henry pour avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur et président. Enfin au Dr Yannick Labreuche pour avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur ainsi que pour son implication dans mon comité de suivi individuel au cours de cette thèse.

Merci au Dr Sophie Réhault-Godbert, au Dr Thomas Knigge et à Matthieu Lépine d'avoir également participer à mon comité de suivi de thèse.

Merci au Dr Erwan Corre de la plateforme ABiMS pour son aide dans l'obtention et l'analyse des données transcriptomiques.

Merci au Dr Benoit Bernay et à Julien Pontin de la plateforme PROTEOGEN pour leur implication dans les analyses protéomiques et peptidomiques en spectrométrie de masse.

Merci au Dr Didier Goux de la plateforme CMABio pour son aide dans la préparation des échantillons et leur observation en microscopie électronique à balayage. Merci au CRISMAT de m'avoir accueilli afin de réaliser ces observations.

Merci à Béatrice Adeline, Mélanie Lepoittevin et Nadège Villain-Naud pour leur implication dans les études histologiques menées au cours de cette thèse.

Merci à Marie-Pierre Dubos pour son aide précieuse lors des dernières manips de thèse ainsi que son implication dans le projet portant sur le microbiome. Merci à Sabrine Lachaal pour son aide en bactériologie.

Merci à Fabienne Marais et Christophe Roger pour leur appui technique. Un grand merci à Sandra Sritharan pour son implication, sa bonne humeur et ses encouragements tout au long de ces trois années.

Merci à Catherine Eudes, Sylvia Forte et Myriam Tayou pour leur aide dans l'ensemble des démarches administratives.

Merci à l'ensemble des doctorants anciens ou nouveaux du laboratoire. Merci au Dr Baptiste Houyvet pour son aide et ses conseils. Merci aux membres du « bureau des filles » et notamment Dr Julie, Floriane et Lorane pour leur bonne humeur et leur soutien. Merci à tous les stagiaires passés par le bureau Anna, Florian, Morgan, Gaspard et Maud. Merci Baptiste V. Enfin merci à tous les membres de notre bureau, Charles, Quentin, Angela et Alexandre pour les bons moments passés ensemble en compagnie de nos chères plantes.

Merci à tous mes amis dont les plus proches me supportent depuis près de 25ans. Merci d'avoir été là tout au long de ces trois ans. Un grand merci à ma famille, mes parents, ma sœur et mes grands-parents pour leur soutien inconditionnel tout au long des années.

Table des matières

Introduction générale ***1***

1. Contexte **3**

2. Classification des Céphalopodes et généralités **4**

3. Cycle biologique de la seiche **6**

4. La fonction reproductrice **8**

4.1. Anatomie de l'appareil reproducteur et gamétogénèse 8

4.1.1. Appareil génital femelle et ovogénèse 8

4.1.2. Appareil génital mâle et spermatogénèse 9

4.2. Accouplement 10

4.3. Régulation de la ponte et formation de l'œuf 11

5. La fonction neuroendocrine **11**

5.1. Anatomie du système nerveux et Neuropeptidome 11

6. La fonction de nutrition **13**

6.1. Anatomie de l'appareil buccal et du tractus digestif 13

6.2. Comportements de prédation 14

6.3. Venin et facteurs immunitaires 15

6.4. Digestion 15

6.5. Microbiome associé à l'appareil digestif 16

7. Le système immunitaire chez la seiche et les Céphalopodes **16**

7.1. Le système circulatoire 17

7.2. Pathogènes chez les Céphalopodes 18

7.2.1. Bactéries 18

7.2.2. Champignons 18

7.2.3. Virus 19

7.2.4. Parasites protozoaires ou métazoaires 19

7.3. Réponse immunitaire 19

7.3.1. Barrières physiques et zones d'interactions avec le milieu 20

7.3.2. Reconnaissance 20

7.3.3. Signalisation 21

7.3.4. Effecteurs 22

8. Objectifs de la thèse **23**

Chapitre 1. Etude de l'organe hématopoïétique : le Corps Blanc ***27***

1. Introduction 29

1.1. Structure et localisation de l'organe hématopoïétique (OHP) chez les Protostomiens aquatiques 31

1.1.1. Description de l'OHP chez les Annélides Polychètes 32

1.1.2. Description de l'OHP chez les Crustacés aquatiques 32

1.1.3. Description de l'OHP chez les Mollusques aquatiques 33

Description de l'OHP chez les Gastéropodes 34

Description de l'OHP chez les Bivalves 35

Description de l'OHP chez les Céphalopodes 36

1.2. Régulation de l'hématopoïèse chez les Protostomiens 37

1.2.1. Chez les Crustacés 37

1.2.2. Chez les Gastéropodes 38

1.2.3. Chez les Bivalves 38

1.2.4. Chez les Céphalopodes 39

2. Le corps blanc chez la seiche *Sepia officinalis*. 39

2.1. Exploration morphologique du corps blanc 39

2.2. Exploration moléculaire du corps blanc 41

3. Discussion 67

Chapitre 2. Les Hémocytes *71*

1. Introduction 73

1.1. Les différent types d'hémocytes chez les mollusques 73

1.1.1. Chez les Bivalves 73

1.1.2. Chez les Gastéropodes 76

1.1.3. Chez les Céphalopodes 77

1.2. Fonction immunitaire des hémocytes chez les Mollusques 78

1.2.1. La phagocytose 79

1.2.2. L'encapsulation 81

1.2.3. Libération de molécules cytotoxiques 82

1.2.4. Production de peptides antimicrobiens 82

Les peptides antimicrobiens 82

Les peptides antimicrobiens de Mollusques 83

1.2.5. Le priming immunitaire 84

1.3. La cicatrisation 84

1.4. Autres fonctions des hémocytes chez les Mollusques 85

2. Recherche de peptides antimicrobiens à partir des hémocytes chez *Sepia officinalis* 86

3. Discussion 111

Chapitre 3. Peau, mucus et microbiome associé ***115***

1. Introduction 117

1.1. La Peau des organismes aquatiques : barrière entre le milieu interne et un environnement extérieur complexe 117

1.1.1. Structure de la peau chez les organismes aquatiques 117

1.1.2. La sécrétion du mucus 121

1.1.3. Facteurs immunitaires de la peau 121

1.2. Le mucus associé à la peau ou à l'épiderme chez les organismes aquatiques 122

1.3. Le rôle immunitaire du mucus associé à la peau chez les organismes aquatiques 123

1.4. Microbiome associé à la peau/mucus chez les organismes marins 124

1.5. Objectifs du chapitre 126

2. Matériel et méthodes 128

2.1. Matériel biologique 128

2.2. Etude histologique 128

2.2.1. Microscopie optique 128

2.2.2. Microcopie électronique 129

2.3. Approche microbiologique 129

2.3.1. Mise en culture des bactéries présentes dans le mucus 129

2.3.2. Isolement et identification des espèces bactériennes 129

2.4. Approche transcriptomique 130

2.5. Approche protéomique 130

2.6. Approche peptidique 131

3. Résultats et Discussion 133

3.1. Approche cellulaire 133

3.1.1. Etude structurale de la peau 133

3.1.2. Etude du microbiome cultivable associé à la peau 137

Présence de bactéries au niveau de la peau 137

3.1.3. Isolements de bactéries et espèces identifiées 140

3.2. Approche moléculaire 143

3.2.1. Etude du transcriptome de la peau 143

3.2.2. Etude du protéome du mucus 148

3.2.3. Etude du peptidome du mucus 150

4. Conclusions 153

Discussion générale et Perspectives ***155***

1. Discussion générale _____ **157**

2. Perspectives _____ **163**

Bibliographie _____ ***167***

Liste des figures

Figure 1. Classification des Céphalopodes 5
Figure 2. Cycle biologique de la seiche Sepia officinalis en Manche 7
Figure 3. Représentation schématique de l'appareil génital femelle 8
Figure 4. Représentation des structures impliquées dans la reproduction chez le mâle 9
Figure 5. Représentation schématique du système nerveux central (SNC) 12
Figure 6. Représentation schématique de l'appareil digestif 13
Figure 7. Anatomie du bulbe buccal 14
Figure 8. Représentation schématique simplifiée du système circulatoire 17
Figure 9. Structure générale de la voie de signalisation Toll/NF-κB 22
Figure 10. Représentation schématique et simplifiée des différentes étapes de l'hématopoïèse 29
Figure 11. Arbre phylogénétique représentant les plans d'organisation du corps chez différents taxons du règne animal et l'apparition des différentes structures en lien avec l'hématopoïèse 30
Figure 12. Origine des cellules circulantes chez les Annélides Polychètes 32
Figure 13. Organe HématoPoïétique (OHP) chez l'écrevisse Pacifastacus leniusculus 33
Figure 14. Organe HématoPoïétique (OHP) chez l'escargot d'eau douce Biomphalaria glabrata 34
Figure 15. Organe HématoPoïétique (OHP) chez l'huitre creuse, Crassostrea gigas 35
Figure 16. Organe HématoPoïétique (OHP) chez la seiche Sepia officinalis 36
Figure 17. Structure morphologique du corps blanc 40
Figure 18. Proposition de classification des types cellulaires au sein du corps blanc 41
Figure 19. Observations en microscopie optique de différents types d'hémocytes décrits chez les Mollusques Bivalves 74
Figure 20. Observations en microscopie optique de différents types d'hémocytes décrits chez les Mollusques Gastéropodes 77
Figure 21. Observations en microscopie optique de différents types d'hémocytes décrits chez les Mollusques Céphalopodes 78
Figure 22. Représentation schématique des trois étapes de la réponse immunitaire innée 79
Figure 23. Représentation schématique des étapes de la phagocytose 80
Figure 24. Représentation schématique des étapes de l'encapsulation 81
Figure 25. Représentation schématique des différents types de précurseurs de peptides antimicrobiens 83
Figure 26. Alignements de peptides possédant des motifs conservés 86
Figure 27. Représentation schématique de la peau chez les Poissons et les Anoures 118
Figure 28. Représentation schématique des types cellulaires de l'épiderme chez les Mollusques 120
Figure 29. Représentation schématique des différentes approches menées autour de la peau chez la seiche 127
Figure 30. Observation en microscopie optique de la structure générale de la peau chez la seiche 133
Figure 31. Observations microscopiques des vaisseaux présents au sein du derme chez la seiche 134
Figure 32. Observations en microscopie optique des structures sécrétrices retrouvées au niveau de la peau chez la seiche 135

Figure 33. Observation en microscopie optique des différents types de cellules muqueuses retrouvées au sein de la peau chez la seiche _____ *136*
*Figure 34. Observations en microscopie optique de coupes de peau ventrale et dorsale*_____ *137*
*Figure 35. Observation en MEB de l'aspect général de la peau*_____ *138*
Figure 36. Observations en MEB d'un amas de bactéries au niveau de la surface de la peau des nageoire ___ *139*
Figure 37. Photographies des boites de pétri ensemencées avec du mucus de seiche _____ *141*
Figure 38. Alignement des six PGRP identifiées dans le transcriptome de peau chez la seiche _____ *147*
Figure 39. Alignement des PAM potentiels avec des PAMs identifiés chez les grenouilles correspondant aux résultats sur APD _____ *152*
Figure 40. Représentation schématique de l'ensemble des facteurs impliqués dans le système immunitaire chez Sepia officinalis _____ *158*
*Figure 41. Représentation schématique des facteurs en lien avec l'hématopoïèse identifiés chez les Céphalopodes*_____ *161*

Liste des tableaux

*Tableau 1. Bactéries cultivables identifiées dans le mucus de la seiche.*_____ *140*
*Tableau 2. Facteurs immunitaires identifiés dans le transcriptome de peau.*_____ *145*
*Tableau 3. Facteurs en lien avec l'immunité identifiés dans le mucus cutané.*_____ *149*
Tableau 4. Peptides possèdant un potentiel antimicrobien identifié au niveau du mucus. _____ *151*

Liste des abréviations

ACN	ACétoNitrile
AC	acide ACétique
APC	*Anterior Proliferation Center*
APD	*the Antimicrobial Peptide Database*
APO	*Amebocyte-Producing Organ*
APS	Acide Périodique - réactif de Schiff
ARN	Acide RiboNucléique
BA	Bleu Alcian
BC	Bleu de Coomassie
BLAST	*Basic Local Alignement Search Tool*
BPI	*Bactericidal/Permeability-Increasing protein*
CAMP	*Collection of Anti-Microbial Peptide*
CB	Corps Blanc
Da	Dalton
DTT	DiThioThréitol
ERN	Espèces Réactives Nitriques
ERO (ROS)	Espèces Réactives de l'Oxygène (*reactive oxygen species*)
ESI	*ElectroSpray Ionization*
GNA	Glandes Nidamentaires Accessoires
GNP	Glandes Nidamentaires Principales
GO	Glande Optique
GOterm	*Gene Ontology terms*
GOVI	Glande de l'OVIducte
GSA	Glandes Salivaires Antérieures
GSP	Glandes Salivaires Postérieures
GST	Glutathion-S Transférase
hct	hémocyte
HFBA	*HeptaFluoroButyric Acid*
IAA	IodoAcétAmide
IFS	*Irregularly Folded Structures*
IκB	*Inhibitor of NF-κB*
IKK	*Inhibitor of NF-κB Kinase*
iNOS	*inducible Nitric Oxide Synthase*
IRAK	*Interleukin*-1 *Receptor Associated Kinase*
JAK-STAT	JAnus *Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription*
LBP	*Lipopolysaccharide Binding Protein*
LO	Lobe Optique
LPS	LipoPolySaccharide
MAC	Méthanol-acide ACétique
MALDI	*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*
MAMP	*Microbial-Associated Molecular Pattern*
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MIF	*Macrophage migration Inhibotory Fator*
MO	Microscopie Optique
MS	*Mass Spectrometry* (spectrométrie de masse)

MSSO	Masse SouS-Oesophagienne
MSO	Masse Sus-Oesophagienne
nanoLC	*nano-Liquid Chromatography*
NF-κB	*Nuclear Factor kappa* B
NO	*Nitric Oxide*
OHP	Organe HématoPoïétique
PAGE	*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
PAM	Peptide AntiMicrobien
PAMP	*Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PGN	PeptidoGlycaNe
PM (MW)	Poids Moléculaire (*Molecular Weight*)
PMSF	*PhenylMethylSulfonyl Fluoride*
PPAM	Précurseur de Peptide AntiMicrobien
PRM	*Pathogen Recogition Molecule*
PRR	*Pathogen Recognition Receptor*
PRX	PéRoXyredoxine
PS	Peptide Signal
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfate*
SNC	Système Nerveux Central
SOD	SuperOxyde Dismutase
TFA	*TriFluoroacetic Acid*
TLR	Toll-*Like Receptor*
TOF	*Time Of Flight*
TRAF	*TNF receptor associated factor*

Introduction générale

1. Contexte

La seiche *Sepia officinalis* est un Mollusque Céphalopode dont l'aire de répartition s'étend des côtes Atlantiques de l'Afrique à la Méditerranée et à la Mer du Nord en passant par la Manche. Consommée pour sa chair et son encre, cette espèce présente un intérêt économique important. En Normandie, la seiche représente la sixième ressource halieutique en matière de valeur avec plus de 2000 tonnes débarquées en criée en 2017 (Ifremer). Néanmoins, l'espèce étant sémelpare le renouvellement du stock d'une année sur l'autre repose sur chaque génération et des fluctuations du stock ont été observées d'une année sur l'autre (Gras *et al.*, 2014). En accord avec une politique visant à préserver cette ressource importante pour le territoire normand, le stock de seiches en Manche a fait l'objet d'un suivi particulier depuis plusieurs années (Gras *et al.*, 2016, Alemany *et al.*, 2017). Aussi, la reproduction ainsi que les processus associés comme la formation de l'œuf et la régulation de la ponte ont fait l'objet de nombreux travaux qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre et qui ont fait récemment l'objet d'un chapitre d'ouvrage (Zatylny-Gaudin et Henry, 2017).

La seiche, présente en Manche, possède un cycle de vie court de vingt mois. Ce cycle est marqué par la succession de migrations des côtes normandes vers l'ouest de la Manche, permettant l'hivernage. A l'issue de la deuxième migration, les animaux matures se reproduisent puis meurent, entrainant un échouage massif d'os de seiches au niveau des côtes. Malgré ce cycle de vie de court, les Céphalopodes sont présents dans les océans depuis des millions d'années. Peu de pathologies ont été observées par comparaison avec d'autres Mollusques comme les Bivalves. Les principaux cas ont été décrits chez des animaux en captivité ou en fin de vie lors de la dégénérescence de l'animal (Gestal *et al.*, 2019). Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré les capacités de cicatrisation et de régénération chez les Céphalopodes (Imperadore et Fiorito, 2018) suggérant la présence d'un système immunitaire efficace pour éviter les infections. Le système immunitaire chez les Céphalopodes a été principalement étudié chez *Euprymna scolopes* et *Octopus vulgaris* (Gestal and Castellanos-Martínez 2015). Les Céphalopodes comme tous les Protostomiens possèdent un système immunitaire reposant majoritairement sur des mécanismes innés. Les cellules circulantes ou hémocytes sont les principales cellules immunitaires intervenant dans de nombreux mécanismes tels que la phagocytose (Hose *et al.*, 1990, Castellanos-

Martínez et al., 2014a, Le Pabic et al., 2014a) ou la production de peptides antimicrobiens (Zhao *et al.*, 2007, Gueguen *et al.*, 2009, Sperstad *et al.*, 2010).

Les cellules épithéliales associées aux branchies, à la peau ou au tractus digestif sont également impliquées dans le système immunitaire. La peau, principale surface d'échange avec le milieu extérieur est particulièrement sujette aux agressions extérieures. Celle-ci constituée de plusieurs types cellulaires est recouverte d'un mucus comme chez de nombreux organismes aquatiques, dont les Téléostéens. Chez ces derniers, le microbiome complexe associé au mucus a particulièrement été étudié (Llewellyn *et al.*, 2014, Chiarello *et al.*, 2015).

L'objectif de ce travail de thèse a été d'explorer le système immunitaire de la seiche en ciblant les hémocytes, l'organe hématopoïétique et la peau afin de mieux comprendre les modes de protection mis en place par la seiche pour se protéger des pathogènes.

2. Classification des Céphalopodes et généralités

Les Céphalopodes sont des animaux Protostomiens Lophotrochozoaires. Ils appartiennent à l'embranchement des Mollusques aux côtés de sept autres classes dont notamment celles des Bivalves et des Gastéropodes (Figure 1). Les trois sous-classes décrites chez les Céphalopodes *Nautiloidea*, *Coleoidea* et *Ammonoidea* regroupent 30 000 espèces éteintes et 1 000 espèces existantes (Haszprunar et Wanninger, 2012). La sous-classe des *Ammonoidea*, entièrement éteinte (Landman *et al.*, 2015), et celle des *Nautiloidea* se caractérisent par la présence d'une coquille externe possédant plusieurs chambres impliquées dans la flottaison et assurant la protection vis-à-vis des prédateurs pour ces espèces peu mobiles. Au contraire, les membres de la sous-classe des *Coleoidea* regroupant les deux super-ordres des Décapodes (*Decabrachia*) et des Octopodes (*Octobrachia*), plus mobiles, possèdent une coquille interne réduite ou vestigiale. Chez la seiche, la coquille interne est appelée « os de seiche ». Elle est composée majoritairement d'aragonite et organisée en plusieurs chambres stockant les gaz et permettant de réguler la flottabilité. Par ailleurs, les *Coleoidea* présentent des cellules pigmentées ou chromatophores, permettant des changements de couleur important pour le mimétisme ou la reproduction. La seiche est capable de se camoufler dans son environnement en mimant les couleurs et l'aspect du substrat.

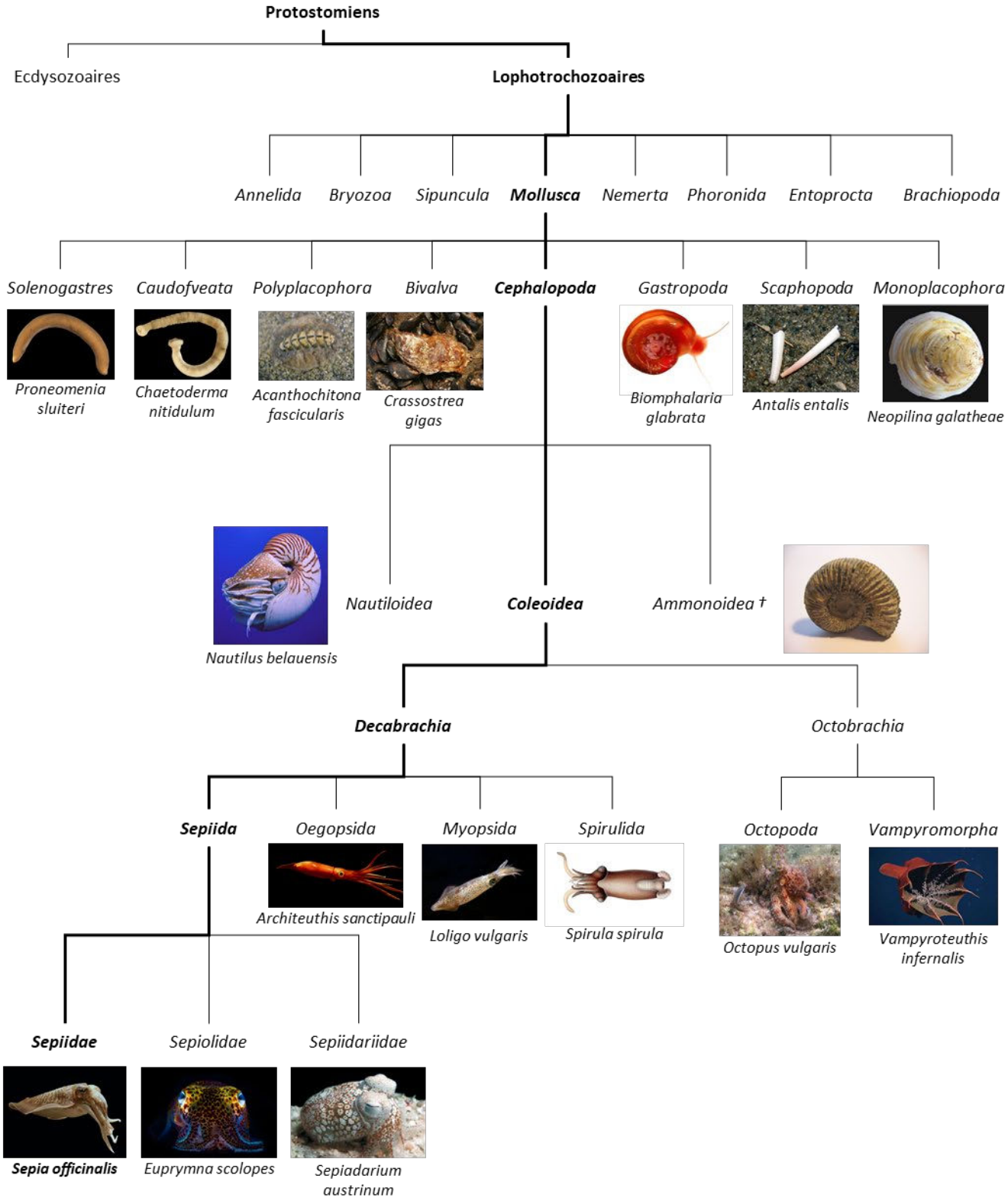


Figure 1. Classification des Céphalopodes, d'après WORMS (*World Register of Marine Species*, marinespecies.org) (†: espèce fossile).

Les Céphalopodes se caractérisent par un céphalopodium associant la tête et le pied, élément propre et plus ou moins développé chez les Mollusques. Le céphalopodium comprend une partie antérieure formant un appareil brachial constitué de huit à dix membres pour les *Coleoidea* ou allant jusque quatre-vingts pour les *Nautiloidea*. Chez la seiche, l'appareil brachial comporte 8 bras et 2 tentacules préhensiles. La partie postérieure du céphalopodium correspond au siphon ou entonnoir indispensable à la locomotion et à la ventilation. Le céphalopodium comporte également deux yeux très volumineux caractérisés par une pupille en « W ». Très perfectionnés, ces yeux sont comparables à ceux des Vertébrés et assurent une bonne vision nécessaire pour la prédation et le mimétisme. Les yeux sont en relation avec les lobes optiques qui constituent l'un des éléments du système nerveux central protégé par un « crane » cartilagineux chez les Céphalopodes. Ce système nerveux permet aux Céphalopodes d'élaborer des comportements complexes et leur procure des capacités de mémorisation et d'apprentissage (Dickel *et al.*, 2013, Cartron *et al.*, 2013). Toutes ces caractéristiques font des Céphalopodes de très bons prédateurs. Le modèle étudié lors de cette thèse est la seiche commune *Sepia officinalis* appartenant à l'ordre des *Sepiida* et à la famille des *Sepiidae*. Sa zone de répartition dans l'Est Atlantique s'étend de la mer Baltique aux côtes de l'Afrique du Sud et en Méditerranée. La population étudiée ici est celle présente en Manche, sur les côtes normandes en périodes printanière et estivale.

3. Cycle biologique de la seiche

Le cycle biologique de la population de seiches en Manche a été décrit par Boucaud-Camou et Boismery (1991) et Boucaud-Camou et collaborateurs (1991). Animal necto-benthique, la seiche présente un cycle de vie de vingt mois, ponctué par différentes migrations (Figure 2). Les œufs pondus au printemps sur les côtes de la Baie de Seine et de l'Ouest Cotentin, en Normandie, éclosent après trois mois de développement embryonnaire. Le pic d'éclosion intervient à la fin du mois de juillet, moment propice au développement des juvéniles par ses températures favorables et par l'abondance de proies. Durant l'automne, la température des eaux côtières diminue, les juvéniles réalisent alors leur première migration en direction de l'Ouest Manche, accompagnés par les seiches d'un an. Ils hivernent de novembre à février bénéficiant d'eaux profondes tempérées (60 à 100m). Au printemps, les seiches encore immatures rejoignent les côtes normandes afin de profiter de températures plus élevées et d'un abondant stock de proies. Quatorze mois après l'éclosion, les seiches

mâles sont matures tandis que les femelles débutent leur maturation sexuelle. C'est à ce moment que débute la seconde migration pour ces animaux plus âgés vers les eaux profondes de l'Ouest Manche, en compagnie des jeunes juvéniles. Après ce second hivernage, les seiches retrouvent les côtes normandes au printemps. Mâles et femelles sont matures et se regroupent pour s'accoupler. A l'issue de la ponte, les géniteurs meurent résultant en l'échouage massif d'os de seiches sur les côtes.

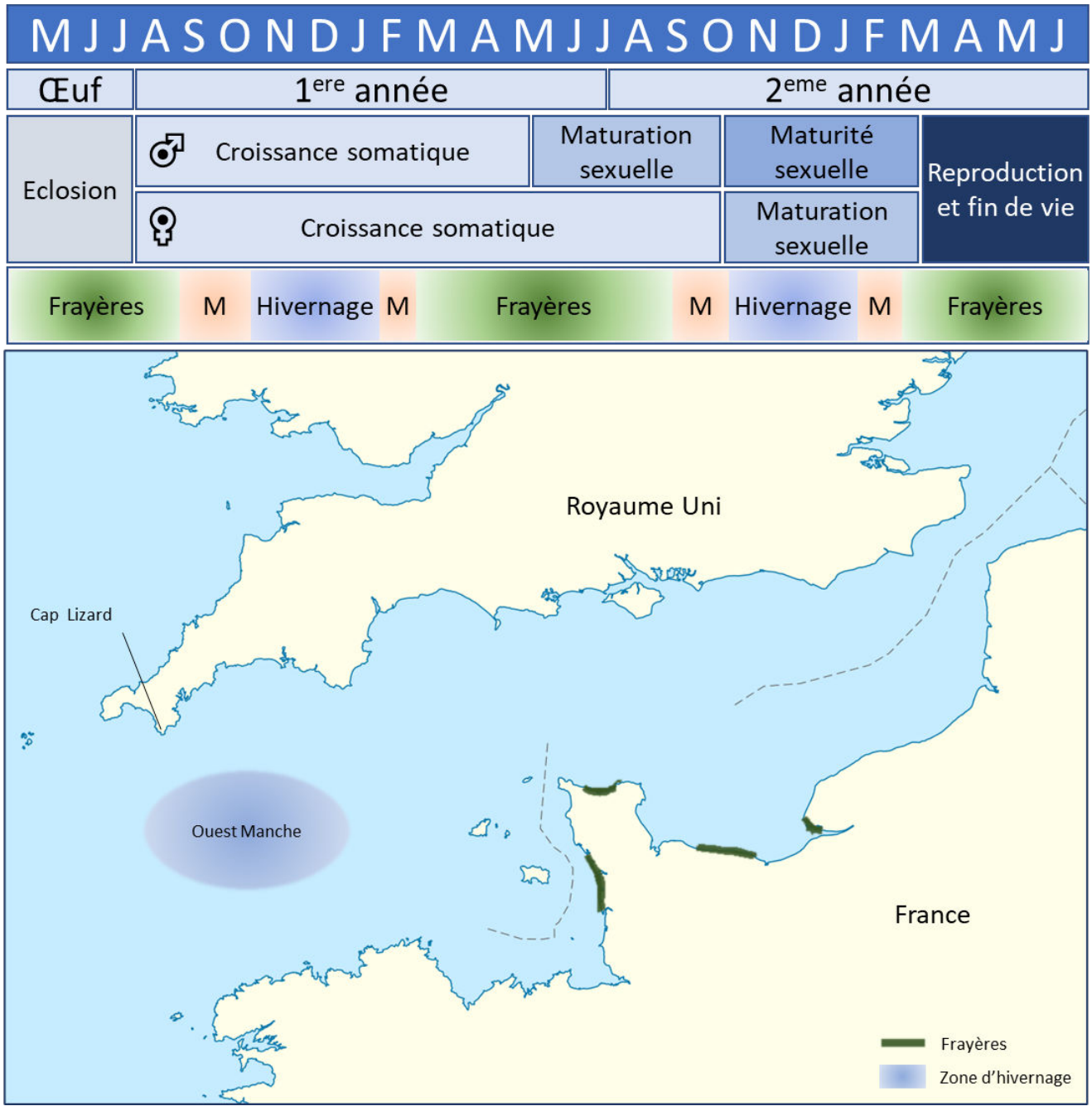


Figure 2. Cycle biologique de la seiche *Sepia officinalis* en Manche.

4. La fonction reproductrice

4.1. Anatomie de l'appareil reproducteur et gamétogénèse

La seiche est une espèce gonochorique à fécondation externe. Chacun des deux sexes possède une gonade unique complexe associée à plusieurs glandes (Mangold, 1989).

4.1.1. Appareil génital femelle et ovogénèse

L'appareil génital femelle (Figure 3) se compose d'un ovaire unique suspendu à la paroi dorsale du cœlome génital et de glandes associées.

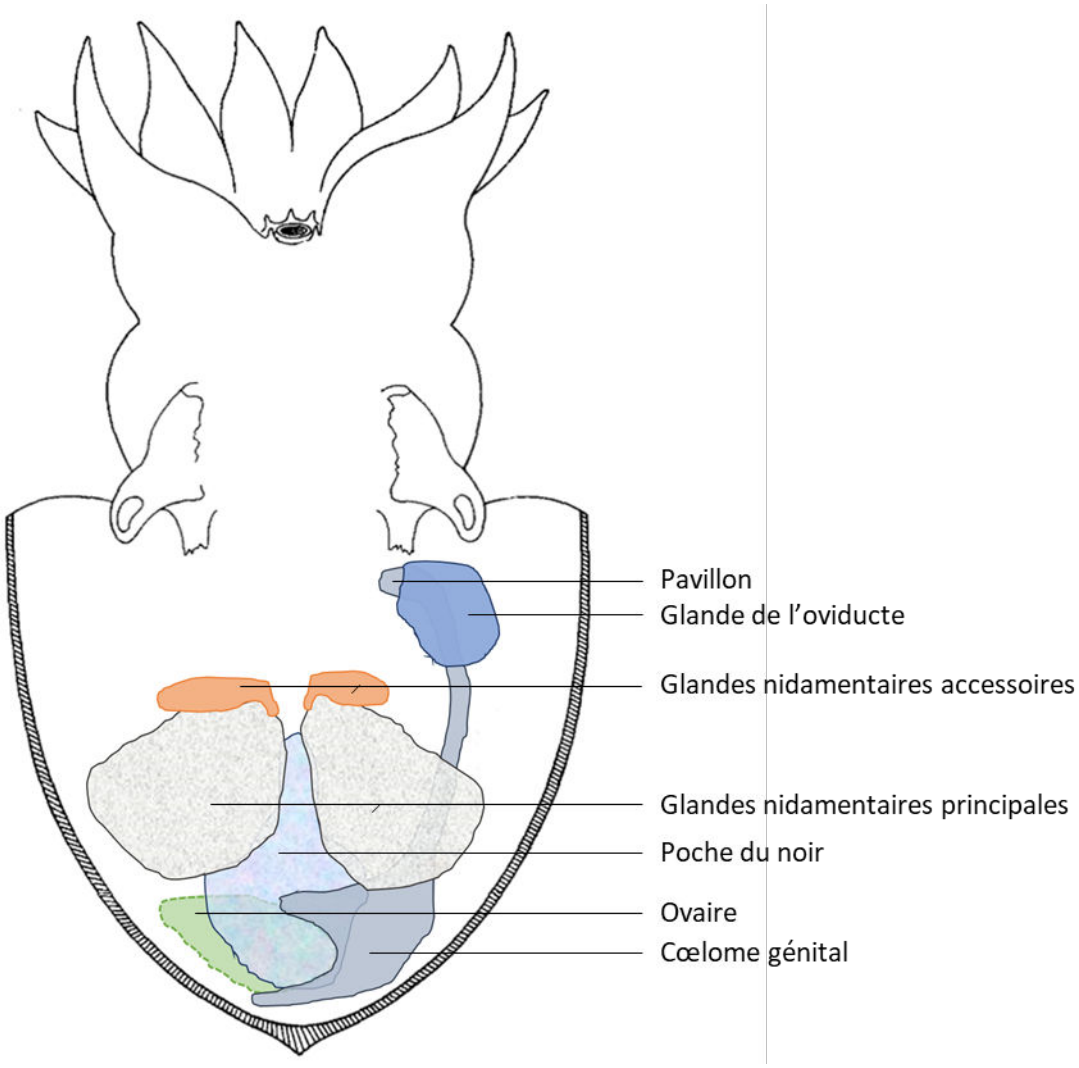


Figure 3. Représentation schématique de l'appareil génital femelle.

L'oviducte présente une partie proximale qui est en continuité avec le cœlome génital et une partie distale correspondant à une structure glandulaire ou Glande de l'OVIducte (GOVI) aboutissant au pavillon. Deux autres glandes impliquées dans la formation de l'œuf sont présentes, les Glandes Nidamentaires Principales (GNP) de couleur blanche et les Glandes

Nidamentaires Accessoires (GNA) de couleur orange. L'ovaire est composé de trois parties : une zone médullaire composée de tissu conjonctif richement vascularisé ; une zone corticale correspondant aux cellules germinales et un épithélium mince correspondant aux futures cellules folliculaires. L'ovogénèse asynchrone a lieu au sein de l'ovaire et débute par les mitoses goniales suivies des prophases méiotiques (Dhainaut et Richard, 1976). La pré-vitellogenèse marquée par les divisions des cellules folliculaires est ensuite initiée et suivie de la vitellogenèse permettant l'accumulation des réserves vitellines au sein du cytoplasme ovocytaire. Après la vitellogenèse, un chorion se forme autour des ovocytes entrainant la dégénérescence des cellules folliculaires. Les ovocytes matures sont libérés dans le cœlome génital et s'accumulent dans l'oviducte distal jusqu'à l'accouplement.

4.1.2. Appareil génital mâle et spermatogénèse

L'appareil génital mâle (Figure 4) se compose d'un testicule unique en position postérieure.

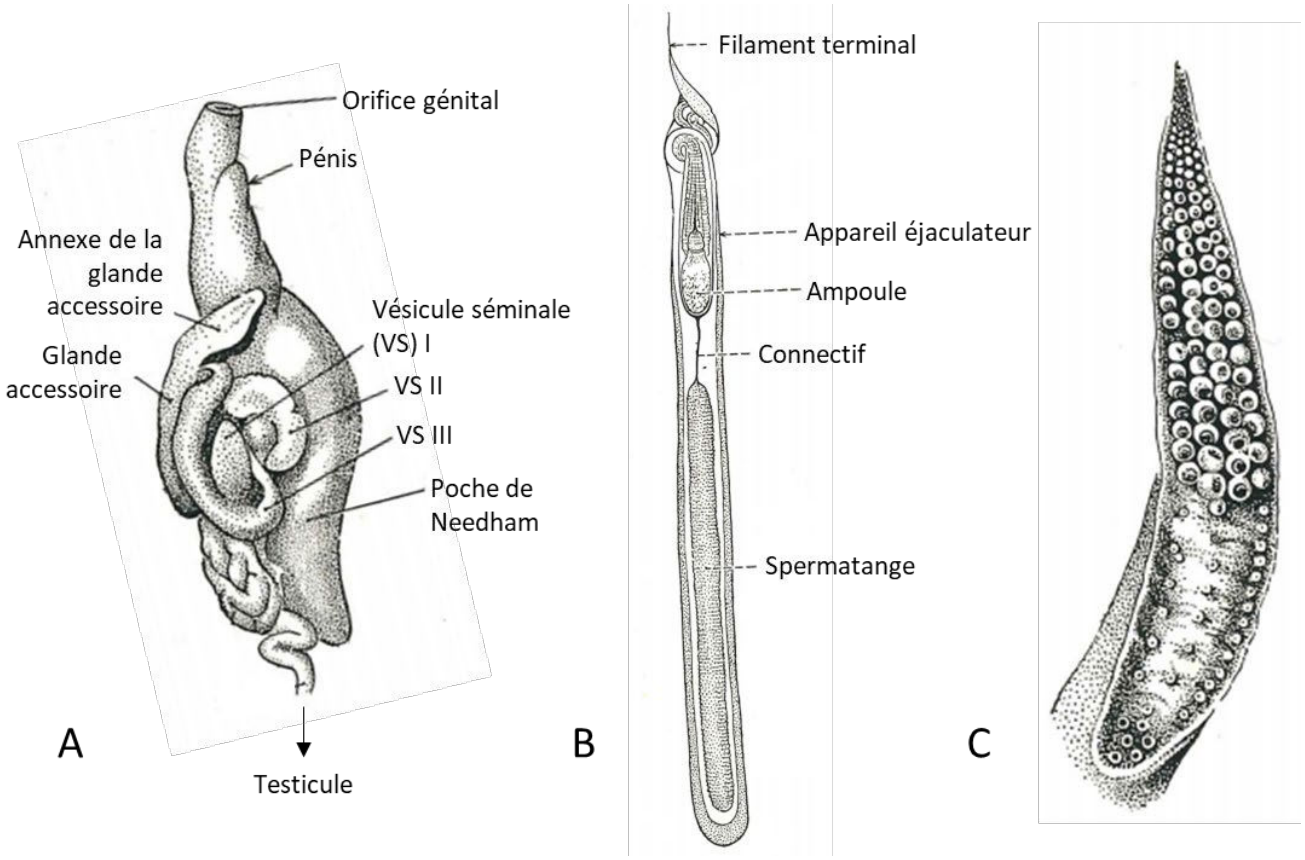


Figure 4. Représentation des structures impliquées dans la reproduction chez le mâle, d'après Mangold (1989). A. Anatomie de l'appareil génital mâle. B. Représentation d'un spermatophore. C. Représentation du bras hectocotyle.

Celui-ci est relié par le canal déférent à différentes glandes annexes : trois vésicules séminales et une glande accessoire. Ces glandes contribuent à la formation des spermatophores, qui seront stockés dans la poche de Needham avant d'être libérés dans la cavité palléale par le pénis.

La différentiation des spermatogonies en spermatozoïdes au sein du testicule a été décrite par Richard (1971). Les spermatogonies subissent plusieurs mitoses puis entrent en phase d'accroissement pour passer successivement du stade spermatocyte I à spermatocyte II puis finalement au stade spermatide. Après une phase d'allongement et de différenciation, les spermatozoïdes matures commencent leur trajet dans le tractus génital mâle afin d'être encapsulé dans les spermatophores. Les spermatophores sont composés d'un appareil éjaculateur et d'un réservoir spermatique ou spermatange (Figure 4B). Au contact de l'eau, le spermatophore gonfle et l'appareil éjaculateur se dévagine et libère le spermatange.

4.2. Accouplement

Le comportement reproducteur de la seiche a été largement décrit (Adamo et Hanlon, 1996, Hanlon *et al.*, 1999, Adamo *et al.*, 2000). Quatre étapes ont été décrites par Hanlon et collaborateurs (1999) : l'initiation, le nettoyage, le transfert des spermatophores et le stockage des spermatanges. L'accouplement est réalisé en position « tête à tête ». Lors de l'initiation, le mâle saisit la femelle entrainant l'entremêlement des bras des deux animaux. La seconde étape est le nettoyage durant laquelle le mâle expulse de l'eau grâce à son entonnoir dans la cavité buccale de la femelle afin d'éliminer les spermatanges provenant d'éventuels accouplements précédents. Les spermatophores expulsés dans la cavité palléale par le pénis sont récupérés par le bras hectocotyle du mâle (Figure 4C). Ce bras ventral gauche est dépourvu de ventouse au niveau proximal et permet au mâle de déposer les spermatophores dans la poche copulatrice ou sous-buccale de la femelle. Au contact de l'eau de mer, les spermatanges sont expulsés puis stockés dans les réceptacles séminaux de la poche copulatrice. L'accouplement déclenche chez la femelle la reprise du transport des ovocytes dans le tractus génital femelle et le dépôt des œufs ou ponte après fécondation au niveau de la cavité buccale.

4.3. Régulation de la ponte et formation de l'œuf

Avant l'accouplement, les ovocytes sont bloqués dans l'oviducte proximal par la sécrétion de facteurs ovariens comme la 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Zatylny *et al.*, 2000a) et les *Sepia Capsule Releasing Peptides* ou SepCRPs (Bernay *et al.*, 2004, 2005). Après l'accouplement, les ovocytes poursuivent leur progression dans l'oviducte et transitent au sein de la GOVI sous l'action de facteurs ovariens tels que la SepOvotropine (Zatylny *et al.*, 2000c), ILME (Zatylny *et al.*, 2000b) ou les SepCRPs (Bernay *et al.*, 2004, 2005). La GOVI est responsable de la production de mucopolysaccharides et de glycoprotéines qui viennent recouvrir le chorion pour former la première enveloppe de la capsule de l'œuf (Boismery, 1988). L'ovocyte est ensuite libéré dans la cavité palléale grâce aux contractions de l'oviducte régulées par des neuropeptides appartenant notamment à la famille de l'APGWamide (Henry *et al.*, 1997) ou du FMRFamide (Henry *et al.*, 1999) et des peptides ovariens comme la Sepovotropine et ILME (Zatylny *et al.*, 2000b, 2000c). L'ovocyte reçoit une seconde enveloppe composée de sécrétions des GNP, des GNA et de la poche du noir. Les principaux constituants protéiques de cette enveloppe correspondent aux *Sepia Egg Cases Proteins* ou SepECPs (Cornet *et al.*, 2015b). L'ovocyte encapsulé quitte ensuite la cavité palléale par l'entonnoir et est fécondé au niveau de la poche copulatrice. La fécondation est facilitée par la sécrétion de molécules chémo-attractantes comme le *Sepia SpermAttracting Peptide* ou SepSAP libéré par les ovocytes (Zatylny *et al.*, 2002). L'œuf est finalement attaché à un support grâce à deux languettes enroulées par la femelle (Boletzky, 1986).

5. La fonction neuroendocrine

5.1. Anatomie du système nerveux et Neuropeptidome

Le Système Nerveux Central (SNC) des Céphalopodes est très développé, il correspond à la fusion des ganglions cérébroïdes, pédieux et palléo-viscéraux. Chez *Octopus vulgaris*, celui-ci est constitué de plus de 500 millions de neurones (Young, 1963). Chez la seiche, se distinguent quatre structures bien décrites protégées par un « crâne » cartilagineux : la Masse SouS-Oesophagienne (MSSO), la Masse Sus-Oesophagienne (MSO), deux Lobes Optiques (LO) et deux Glandes Optiques (GO) (Boycott, 1961) (Figure 5). Le SNC est à l'origine du neuropeptidome comprenant des neurohormones transportées par l'hémolymphe et des neuromédiateurs acheminés par les axones et terminaisons nerveuses périphériques jusqu'aux structures cibles comme les organes de l'appareil génital (Zatylny-Gaudin *et al.*,

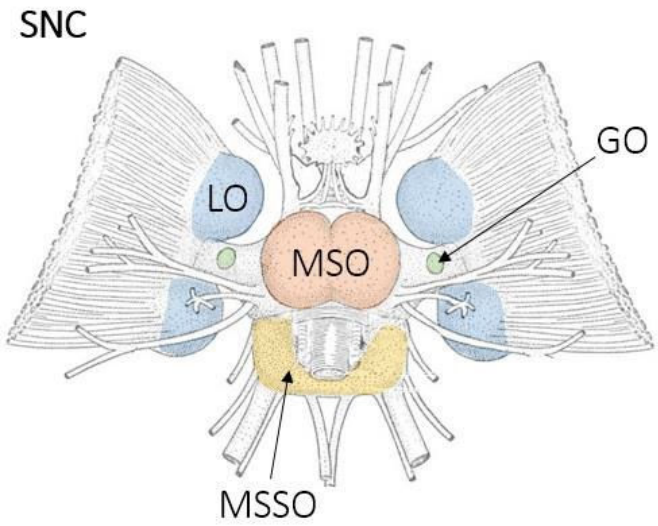


Figure 5. Représentation schématique du système nerveux central (SNC). LO : lobe optique, GO : glande optique, MSSO : masse sous-œsophagienne, MSO : masse sus-œsophagienne, d'après Cornet (2015).

2016). Les neurohormones sont libérées dans la circulation au niveau de la veine cave *via* l'aire neurohémale (Alexandrowicz, 1965).

Le neuropeptidome intervient dans la régulation de nombreuses fonctions comme la reproduction, la nutrition ou le comportement (Hartenstein, 2006). Un neuropeptide est issu d'un prepropeptide pouvant contenir plusieurs copies du même neuropeptide ou plusieurs neuropeptides différents. Le neuropeptidome de la seiche et particulièrement celui des géniteurs a été récemment décrit par des approches transcriptomique et peptidomique (Zatylny-Gaudin *et al.*, 2016). Trente-huit familles de neuropeptides exprimées par 55 transcrits ont été caractérisées dans le transcriptome. A partir de ces transcrits, 170 neuropeptides ont été prédits dont 131 ont été identifiés en spectrométrie de masse. Cinquante-neuf de ces peptides ont été détectés dans l'hémolymphe ou l'aire neurohémale. Parmi les familles de neuropeptides identifiées, certaines interviennent dans la régulation de la reproduction comme celle de l'APGWamide (Henry *et al.*, 1997) ou des *Crustacean CArdioactive Peptides* (CCAP) (Endress *et al.*, 2018).

6. La fonction de nutrition

6.1. Anatomie de l'appareil buccal et du tractus digestif

L'appareil digestif chez la seiche a été étudié par Boucaud-Camou (1973). Il a la forme d'un « U » qui s'ouvre sur le bulbe buccal, suivi de l'œsophage puis de l'estomac et du caecum spiral et enfin l'intestin. La deuxième extrémité du U est formée par l'anus qui s'ouvre sur la cavité palléale (Figure 6). Différentes glandes sont associées au tractus digestif. La glande digestive et ses appendices sont les équivalents du foie et du pancréas, respectivement, et sont impliqués dans les mécanismes de digestion ainsi que dans le stockage des réserves (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983).

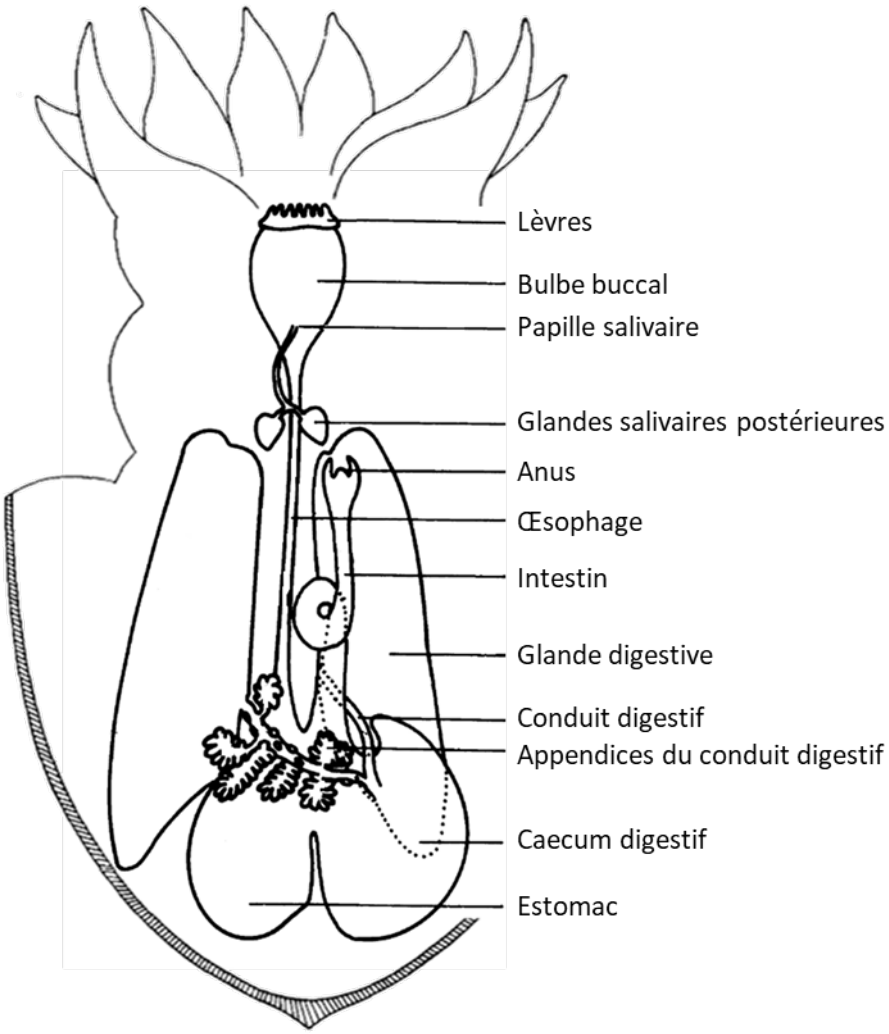


Figure 6. Représentation schématique de l'appareil digestif, d'après Boucaud-Camou (1973).

Deux types de glandes salivaires ont également été décrites : les Glandes Salivaires Antérieures (GSA) situées au niveau du bulbe buccal et les Glandes Salivaires Postérieures (GSP) situées en arrière du SNC au-dessus de la partie antérieure de la glande digestive. Peu de données existent concernant les GSA, cependant les GSP ont été étudiées chez la seiche et sont responsable de la sécrétion d'une salive neurotoxique comprenant des enzymes, des toxines et des facteurs immunitaires (Cornet *et al.*, 2014). Cette salive est sécrétée au niveau du bulbe buccal par la papille salivaire. Le bulbe buccal est composé de nombreux muscles mandibulaires permettant l'action d'un bec chitineux (Figure 7).

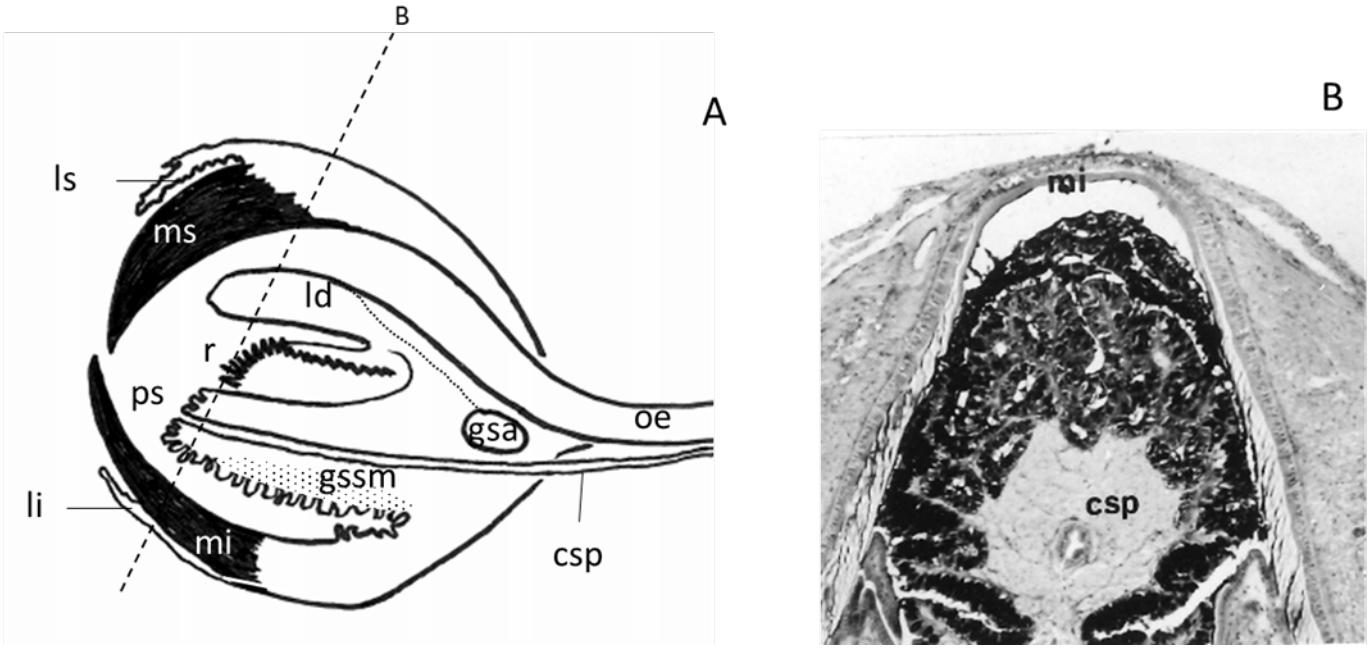


Figure 7. Anatomie du bulbe buccal, d'après Boucaud-Camou (1973). A. Structure générale du bulbe buccal. B. Coupe transversale de la papille salivaire (csp : canal salivaire postérieur, gsa : glande salivaire antérieure, gssm : glande sous maxillaire, li : lèvre inférieure, ld : lobe dorsal, ls : lèvre supérieure, mi : mandibule inférieure, ms : mandibule supérieure, oe : œsophage, ps : paille salivaire, r : radula).

6.2. Comportements de prédation

Comme les autres Céphalopodes, la seiche est un redoutable prédateur se nourrissant de crevettes, de crabes et de poissons. Le comportement de prédation a été étudié et deux stratégies ont été décrites. Les proies rapides comme les poissons ou les crevettes sont capturées à l'aide des deux tentacules préhensiles rapidement projetées vers la proie (Messenger, 1968). Les proies plus lentes comme les crabes sont quant à elles capturées par

la méthode appelée « coiffage », au cours de laquelle la seiche s'élance sur sa proie et l'enveloppe avec ses bras (Duval *et al.*, 1984). Dans les deux cas la seiche injecte sa salive neurotoxique à la proie à l'aide de son bec chitineux.

6.3. Venin et facteurs immunitaires

La salive des Céphalopodes a une composition protéique proche de celle des venins de certains Chélicérates, Hexapodes ou reptiles venimeux incluant des enzymes comme les hyaluronidases ou phospholipases A2, des protéines de type kallikreine ou CAP *Cysteine-rich secretory proteins*, *Antigen* 5, and *Pathogenesis-related* 1 *proteins* (Fry *et al.*, 2009). Au niveau des toxines, les octopodes se différencient des Décapodes par l'absence de céphalotoxines (Ruder *et al.*, 2013b) et la présence de peptides apparentés aux tachykinines (Ruder *et al.*, 2013a).

Chez *Sepia officinalis*, une étude associant trois approches transcriptomique, peptidomique et protéomique a permis l'identification de plusieurs toxines dont deux céphalotoxines et une CRiSP *Cystein Rich Secreted Protein* proche des CAP (Cornet *et al.*, 2014). De nombreuses enzymes ont été caractérisées dont la phospholipase A2, des peptidases et une chitinase caractéristique des venins de prédateurs de crustacés. Certains facteurs immunitaires, comme la *Bactericidal/Permeability-Increasing protein* (BPI), la *Lipopolysaccharide Binding Protein 3* (LBP), deux *PeptidoGlycan Recognition Proteins* (PGRP) ou le lysozyme ont également été décrits à partir du transcriptome des GSP. Enfin, une activité bactériostatique a été observée à partir d'extraits peptidiques de GSP suggérant un rôle de la salive de seiche dans la protection de la cavité buccale vis-à-vis des agents pathogènes. (Cornet *et al.*, 2014).

6.4. Digestion

Les étapes de la prise alimentaire et la digestion ont été décrites par Boucaud-Camou (1973). La digestion s'étale sur environ 15h mais des variations dues à la température ont été observées. Les proies sont déchiquetées en morceaux par le bec. Ces morceaux sont acheminés par la radula puis commencent leur séjour dans le tractus digestif. Ils sont rapidement transportés grâce à des mouvements péristaltiques de l'œsophage jusqu'à l'estomac pour la digestion (Boucaud-Camou, 1973), initiée par les enzymes identifiées dans la salive (Cornet *et al.*, 2014). Après la liquéfaction des aliments par les enzymes digestives,

ceux-ci passent par le caecum qui serait impliqué dans l'absorption mais aussi dans la digestion par la présence d'enzymes hépatopancréatiques et de sécrétions caecales. Seuls, les aliments liquides transitent dans le caecum. Si le caecum est plein, le liquide stomacal passe par l'intestin antérieur au sein duquel s'achève l'absorption des nutriments. A la fin de la digestion, l'ensemble des débris non digérés comme les arêtes ou les fragments de carapaces de Crustacés passe par l'intestin et est éliminé au niveau de l'anus (Boucaud-Camou, 1973).

6.5. Microbiome associé à l'appareil digestif

Le microbiome associé au tube digestif a été étudié chez plusieurs Mollusques herbivores (Huang *et al.*, 2010, Dudek *et al.*, 2014, Vezzulli *et al.*, 2018, Gobet *et al.*, 2018). Celui-ci serait impliqué dans la digestion en dégradant les polysaccharides d'algues afin d'en faciliter l'assimilation (Dudek *et al.*, 2014, Gobet *et al.*, 2018). Le genre *Vibrio* est parmi les plus présents chez *Haliotis tuberculata* (Gobet *et al.*, 2018), *H. diversicolor* (Huang *et al.*, 2010), *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis* (Vezzulli *et al.*, 2018). Chez la seiche, une première étude décrivant le microbiome associé au tractus digestif révèle la présence de bactéries de la famille des *Vibrionaceae* tout le long du tube digestif avec une dominance d'une souche de *Vibrio sp.* au niveau de l'œsophage (Lutz *et al.*, 2019). Des *Vibrionaceae* ont également été retrouvées dans les tractus digestifs de larves d'*Octopus vulgaris* (Roura *et al.*, 2017). Lutz et collaborateurs (2019) suggèrent que les bactéries de la famille des *Vibrionaceae* productrices de chitinases, proteases, amylase ou lipase, pourraient faciliter la digestion chez la seiche.

7. Le système immunitaire chez la seiche et les Céphalopodes

Les organismes aquatiques sont particulièrement exposés à leur milieu environnant. Flemming et Wuertz (2019) estiment à 10^{29} le nombre de bactéries présentes dans le compartiment océanique dont certaines sont responsables de pathologies. La seiche possède un système immunitaire reposant principalement sur des mécanismes innés au travers des réponses humorale et cellulaire. Celles-ci sont principalement modulées par les cellules immunitaires, les hémocytes, qui circulent au sein du système circulatoire.

7.1. Le système circulatoire

Contrairement à l'ensemble des autres classes de Mollusques, les Céphalopodes possèdent un système circulatoire clos dans lequel circule l'hémolymphe. Ce système circulatoire a été décrit par Schipp (1987). Il est composé chez la seiche d'un cœur systémique et de deux cœurs branchiaux (Figure 8).

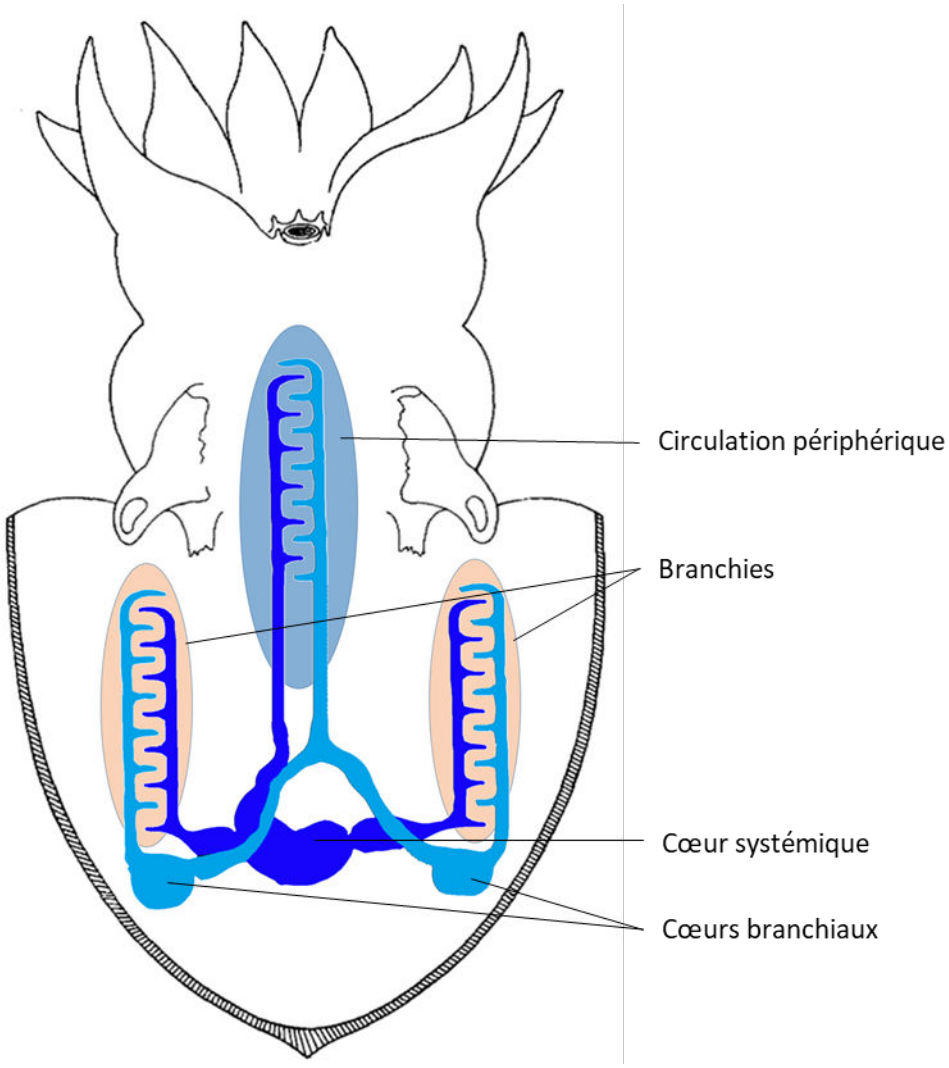


Figure 8. Représentation schématique simplifiée du système circulatoire, modifié d'après Schipp (1987).

Les cœurs branchiaux pompent le sang dans les branchies permettant les échanges gazeux et la respiration. Le cœur systémique reçoit l'hémolymphe après son passage dans les branchies et la redistribue dans les tissus grâce à la circulation périphérique. Le système circulatoire étant clos, un nombre important d'artères, de veines et de capillaires a été décrit. La respiration s'effectue donc grâce aux deux branchies situées de chaque côté de la masse

viscérale en position antérieure de la cavité palléale. Le pigment permettant le transport de l'oxygène, l'hémocyanine, est acellulaire et contient du cuivre, responsable de la couleur bleue de l'hémolymphe. Les cellules circulantes ou hémocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire (Le Pabic *et al.*, 2014a). Il n'est pas exclu également qu'ils puissent jouer un rôle dans la biominéralisation comme cela a été mis en évidence chez l'huitre perlière *Pinctada fucata* (Huang *et al.*, 2018).

7.2. Pathogènes chez les Céphalopodes

Peu de données sont accessibles concernant les pathogènes affectant les Céphalopodes. La grande majorité des cas décrits l'ont été sur des animaux élevés ou maintenus en captivité ou sur des animaux en fin de vie. Les pathogènes décrits appartiennent à une variété de phyla dont les bactéries, les champignons, les virus et les parasites protozoaires ou métazoaires (Gestal *et al.*, 2019).

7.2.1. Bactéries

Les bactéries font partie des organismes les plus impliqués dans les pathologies observées chez les Mollusques, et notamment les bactéries Gram négatives du genre *Vibrio* (Travers *et al.*, 2015). L'espèce *Vibrio alginolyticus* a été isolée à partir de lésions de la peau chez *O. vulgaris* (Fichi *et al.*, 2015), chez *Octopus joubini* (Hanlon *et al.*, 1984) et à partir de plusieurs organes dont les branchies chez trois espèces de seiches *S. officinalis*, *Sepia apama* et *Sepia pharaonis* (Sangster et Smolowitz, 2003). Une autre espèce appartenant au genre *Vibrio* et au clade *Splendidus* est *V. lentus*, isolée au niveau de lésions de la peau chez *O. vulgaris* (Fichi *et al.*, 2015). *V. lentus tout comme V. alginolyticus* seraient capables d'induire des lésions cutanées (Farto *et al.*, 2003). Plusieurs autres espèces du genre *Vibrio* ont également été identifiées comme *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* ou *V. splendidus* (Farto *et al.*, 2019). A partir de lésions cutanée chez *O. vulgaris,* des bactéries d'autres genres comme *Photobacterium swingsii* ou appartenant aux bactéries Gram positives comme *Lactococcus garvieae* ont été isolées (Fichi *et al.*, 2015).

7.2.2. Champignons

Des plaies cutanées infectées par des Deutéromycètes halotolérants du genre *Cladosporium* ont été décrites chez *Eledone cirrhosa* (Polglase *et al.*, 1984) et *S. officinalis* (Harms *et al.*, 2006). Les rares cas observés concernent des animaux en captivité où le stress

induit par la manipulation ou la manipulation en elle-même ont pu contribuer à ces infections (Polglase, 2019).

7.2.3. Virus

Peu de cas d'infections d'origine virale ont été décrits chez les Céphalopodes, contrairement à ce qui a pu être observé chez les Mollusques Bivalves ou Gastéropodes (Arzul *et al.*, 2017). Des particules virales de la famille des *Iridoviridae* formant des tumeurs sur les tentacules chez *O. vulgaris* (Rungger *et al.*, 1971, Farley, 1978) ou retrouvées dans le tubule rénal de nautiles (Gregory *et al.*, 2006) ont été décrites. Chez *O. vulgaris*, un autre virus de la famille des *Nodaviridae* a été identifié au niveau de lésions cutanées ou oculaires (Fichi *et al.*, 2015). Chez *S. officinalis*, un virus de la famille des *Reoviridae* a été mise en évidence au niveau de l'épithélium stomacal, cependant il s'agit d'un virus non pathogène chez la seiche (Devauchelle et Vago, 1971).

7.2.4. Parasites protozoaires ou métazoaires

Des parasites protozoaires ciliés ou coccidies ont été décrits chez les Céphalopodes. Parmi les coccidies, seuls les parasites du genre *Aggregata* ont été observés chez des Décapodes et des Octopodes incluant la seiche (Castellanos-Martínez *et al.*, 2019). La famille *Opalinopsidae*, appartenant aux Ciliés, regroupe les parasites protozoaires les plus communs chez les Céphalopodes dont *Opalinopsis* sp. et *Chromidina* sp. (Souidenne et Furuya, 2019). Des Dicyémides ont également été décrits chez les Céphalopodes, cependant ceux-ci sembleraient avoir opté pour un mode de vie symbiotique plutôt que parasitaire (Furuya et Souidenne, 2019). Chez les Métazoaires, certaines espèces appartenant aux Trématodes, Cestodes, Nématodes ou Crustacés ont été observés chez les Céphalopodes. Ces parasites ne seraient pas à l'origine de pathologies chez les Céphalopodes mais ils pourraient contribuer à la dégradation de l'état de santé des animaux infectés (Pascual *et al.*, 2019).

7.3. Réponse immunitaire

Face à l'ensemble de ces pathogènes, la réponse immunitaire des Céphalopodes s'organise au niveau des zones de contact et d'échange permanents et au niveau interne *via* les hémocytes.

7.3.1. Barrières physiques et zones d'interactions avec le milieu

Les barrières physiques jouent un rôle important dans la protection face aux pathogènes. Les branchies tout comme la peau représentent des zones d'échange importantes et en contact permanent avec le milieu extérieur. Comme vu précédemment, ces zones sont souvent lésées et infectées par les différents types de pathogènes. La peau des Céphalopodes *Coleoidea* est composée d'un épiderme formé par des cellules épithéliales, des cellules glandulaires et des cellules sensorielles. Il repose sur un derme d'épaisseur variable, formé de fibres connectives et de chromatophores (Hanlon *et al.*, 1984, Packard, 1988). Ces couches forment une première barrière face au milieu environnant et peuvent faire face aux infections en libérant des facteurs immunitaires ou des molécules antimicrobiennes comme cela a été bien décrit chez les Téléosteens (Rakers *et al.*, 2013).

Au niveau des branchies, on retrouve un système immunitaire semblable à celui décrit au niveau cutané. Les branchies ont la capacité de faire face aux pathogènes *via* notamment la voie Toll/NF-κB. Chez *Sepiella japonica*, une surexpression du gène *Sj*-TLR ou *Toll-Like Receptor* est observée en présence des pathogènes *Vibrio parahemolyticus* ou *Aeromonas hygrophila* (Liu *et al.*, 2019).

7.3.2. Reconnaissance

La reconnaissance des pathogènes s'effectue à l'aide de molécules capables de lier et de reconnaitre les éléments du non soi. Ces molécules sont appelées PRR pour *Pattern Recognition Receptor* ou PRM pour *Pattern Recognition Molecule*. Ceux-ci permettent la détection de motifs de surface qui caractérisent les pathogènes correspondant aux PAMP et MAMP pour *Pathogen-Associated Molecular Pattern* et *Microbial-Associated Molecular Pattern*. Des PRR de la famille des TLR ont été décrits chez de nombreuses espèces au sein du règne animal (Hoffmann, 1999), dont les Mollusques (Brennan et Gilmore, 2018). Ces récepteurs sont associés à des facteurs de signalisation intracellulaires et forment la voie Toll/NF-κB (*Nuclear Factor*-κB) (Kawasaki et Kawai, 2014). Chez *Euprymna scolopes*, espèce étudiée pour sa symbiose avec la bactérie *Vibrio fischeri*, un TLR a été identifié au niveau de l'organe de lumière, siège de la symbiose (Goodson *et al.*, 2005). Chez *O. vulgaris*, quatre TLR ont été identifiés au niveau des hémocytes, dont un, le TLR-2 est surexprimé chez des animaux parasités par *Aggregata octopiana* (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014b). Au niveau des Glandes Nidamentaires Accessoires (GNA), également siège d'une symbiose bactérienne

(Grigioni *et al.*, 2000), cinq TLR ont été identifiés (Cornet *et al.*, 2015a). Chez *Sepiella japonica*, *Sj*-TLR a été identifié et est exprimé dans divers tissus incluant les branchies, le cœur, les gonades, les GNA et les lobes optiques. Après contact avec *A. hydrophila* et *V. parahaemolyticus*, *Sj*-TLR est surexprimé au niveau des branchies et du foie. Après transfection dans des cellules HEK293, ce TLR est capable d'induire la voie Toll/NF-κB (Liu *et al.*, 2019).

D'autres facteurs de reconnaissance comme les *PeptidoGlycan Recognition Proteins* (PGRP) ou les *Lipopolysaccharide Binding Proteins* (LBP) ont été identifiés chez les Céphalopodes. Cinq PGRP (*Es*-PGRP 1-5) ont été identifiés chez *E. scolopes*, quatre au niveau de l'organe de lumière (Goodson *et al.*, 2005) et un au niveau des hémocytes (Collins *et al.*, 2012) et du corps blanc (Salazar *et al.*, 2015). Chez *S. officinalis*, deux PGRP et deux LBP ont été identifiés au niveau des Glandes Salivaires Postérieures (GSP) (Cornet *et al.*, 2014). Enfin, chez *E. scolopes*, un homologue de la galectine a été identifié au niveau des hémocytes et présente une abondance plus élevée chez les animaux symbiotiques comparé aux animaux asymbiotiques (Schleicher et Nyholm, 2011).

7.3.3. Signalisation

Après l'étape de reconnaissance, la propagation du signal est communément effectuée par des voies de signalisation cytoplasmiques. La voie NF-κB est une cascade de signalisation associée à la réponse immunitaire parmi les plus connues et son association avec les TLR a été bien décrite notamment chez les Vertébrés (Kawai et Akira, 2007, Kawasaki et Kawai, 2014). La structure générale de la voie Toll/NF-κB est présentée Figure 9. Des membres de cette voie ont été identifiés chez les Céphalopodes. La protéine MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*) est un des régulateurs les plus importants des TLR (Janssens et Beyaert, 2002) et a été identifiée au niveau des GNA chez *S. officinalis* (Cornet *et al.*, 2015a), des hémocytes chez *O. vulgaris* (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014b) et de tous les organes testés dont les branchies et les GNA chez *S. japonica* (Huo *et al.*, 2018). Neuf membres de la voie NF-κB ont été identifiés au niveau de l'organe de lumière chez *E. scolopes* (Goodson *et al.*, 2005), neuf au niveau des hémocytes chez *O. vulgaris* (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014b) et huit au niveau des GNA chez *S. officinalis* (Cornet *et al.*, 2015a). Parmi les différents membres identifiés chez ces trois espèces, le facteur de transcription NF-κB, appartenant aux protéines de la famille Rel, a été

identifié. Celui-ci migre vers le noyau afin d'induire des gènes impliqués dans l'immunité (Bonizzi et Karin, 2004).

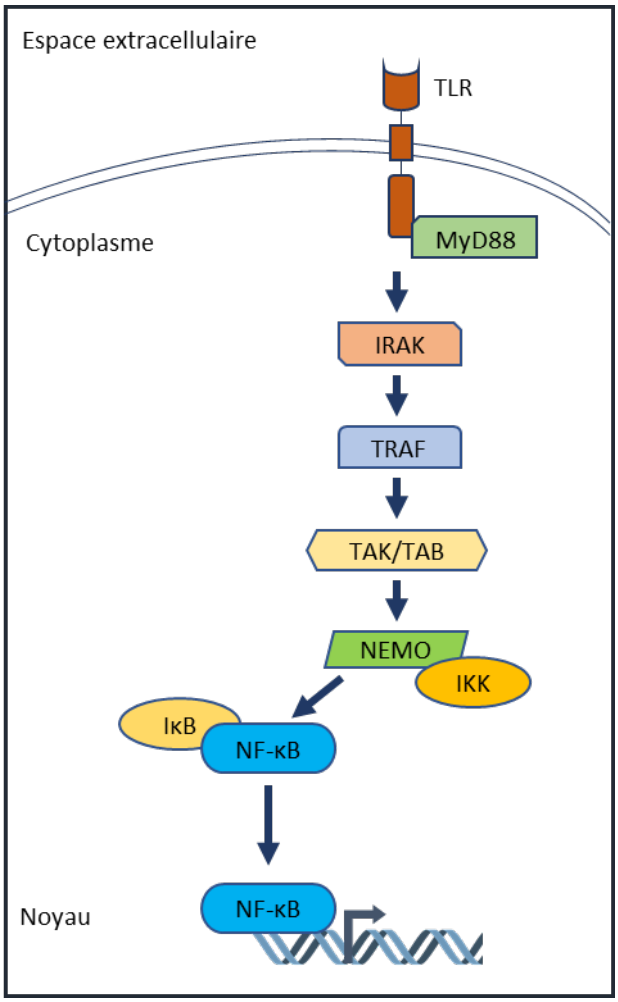


Figure 9. Structure générale de la voie de signalisation Toll/NF-κB, adapté de Brennan et Gilmore (2018). TLR : *Toll-like receptor*, IRAK : *interleukin*-1-*receptor-associated kinase*, TRAF : Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor, TAK : TGF-b-*activated kinase*, TAB : TAK1-*binding protein*, NEMO : NF-kB *essential modulator*, IKK : IκB kinase, IκB : NF-κB *inhibitor*, NF-κB : n*uclear factor* NF-κB .

7.3.4. Effecteurs

Les effecteurs de la réponse immunitaire peuvent prendre différentes formes. De petites molécules comme les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou *Reactive Oxygen Species*, ROS) ou l'oxyde nitrique (*Nitric Oxide,* NO) sont produites et utilisées afin d'endommager la structure des pathogènes. Des protéases comme le lysozyme sont également utilisées afin d'hydrolyser les structures de la paroi de peptidoglycanes présente à la surface des

Procaryotes. Les peptides antimicrobiens sont de courtes chaines polypeptidiques permettant la création de pores dans la membrane, entrainant sa lyse.

Chez les Céphalopodes, certains effecteurs ont été décrits. Au niveau de l'organe de lumière chez *E. scolopes*, une enzyme péroxydase présentant la même action que l'enzyme antibactérienne myélopéroxydase des Mammifères a été décrite (Weis *et al.*, 1996). La production de ROS après un stress a également été observée au niveau des hémocytes chez *Eledone cirrhosa* (Malham *et al.*, 2002) et au niveau du corps blanc chez *O. vulgaris*. Cette même étude a également observé la production de NO (Novoa *et al.*, 2002). Chez la seiche, une étude a permis d'identifier des activités phénoloxydase ou lysozyme au niveau de différents organes incluant le manteau, les GSP, le cœur ou les branchies (Le Pabic *et al.*, 2014b). Chez *E. cirrhosa* (Malham *et al.*, 1998) et *O. vulgaris* (Locatello *et al.*, 2013) l'activité lysozyme est augmentée par l'injection, respectivement, de la bactérie *Vibrio anguillarum* et de LipoPolySaccharides (LPS) d'*Escherichia coli*. Chez *Octopus ocellatus*, un transcrit codant pour le lysozyme a été identifié dans les tissus testés et présente une surexpression au niveau des hémocytes 6h après contact avec *V. anguillarum* et *Micrococcus luteus*. La protéine recombinante induit quant à elle une baisse de l'absorbance à 600nm dans les 20 premières minutes suivant l'incubation avec les bactéries *V. anquillarum*, *E. coli*, *M. luteus* et *Saphylococcus aureus* (Li *et al.*, 2019). Enfin, une étude récente, réalisée à partir de données transcriptomiques chez la seiche a permis l'identification de peptides présentant un potentiel antimicrobien. Après synthèse des peptides, certains ont présenté une activité antibactérienne contre plusieurs souches (Houyvet *et al.*, 2018).

8. Objectifs de la thèse

Les travaux de cette thèse portent sur l'étude du système immunitaire de la seiche en ciblant les hémocytes, l'organe hématopoïétique et la peau.

Le premier chapitre de la thèse abordera l'étude du corps blanc, l'organe hématopoïétique chez la seiche *S. officinalis*. Si des études du corps blanc ont été réalisées chez 2 autres Céphalopodes *Euprymna tasmanica* (Salazar *et al.*, 2015) et *Octopus maya* (Juárez *et al.*, 2019), l'objectif de ce chapitre est d'explorer par deux approches complémentaires transcriptomique et protéomique cet organe et ses fonctionnalités chez la seiche. Par ailleurs, l'approche protéomique originale dans cette exploration permettra de

comparer les protéomes du corps blanc et des hémocytes afin de déterminer la part des hémocytes au sein de l'organe hématopoïétique. Un accent sera mis également sur l'identification des facteurs immunitaires au niveau du transcriptome du corps blanc et au niveau des deux protéomes.

Le second chapitre s'intéressera aux hémocytes et plus particulièrement à l'étude de leur réponse immunitaire en présence de bactéries. La seiche étant une espèce soumise à une règlementation européenne en termes d'expérimentation animale, un test *in vitro* a été développé pour étudier la réponse immunitaire des hémocytes en contact avec des vibrios. A partir de l'analyse comparative de transcriptomes d'hémocytes naïfs ou infectés, nous étudierons la réponse immunitaire et tenterons d'identifier des peptides antimicrobiens à l'aide d'un logiciel développé en interne PepTraq.

Le troisième chapitre portera sur l'étude de la peau. En contact permanent avec le milieu environnant, elle constitue la principale barrière contre les infections. La peau sera explorée en tant que barrière physique, chimique et biologique. Deux approches ont été développées, une approche cellulaire afin d'appréhender la structure de la peau et la diversité du microbiome présent à sa surface et une approche moléculaire afin d'étudier les acteurs de l'immunité présents au sein de la peau et du mucus.

Chapitre 1. Etude de l’organe hématopoïétique : le Corps Blanc

1. Introduction

L'hématopoïèse est le processus physiologique permettant le renouvellement des cellules circulant dans le sang ou l'hémolymphe. Ce processus fait intervenir un ensemble de mécanismes cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la maturation des lignées hématopoïétiques (Figure 10). Les fonctions et le nombre de types de cellules circulantes varient suivant les espèces. Ces cellules sont impliquées dans de nombreux mécanismes immunitaires mais également dans la nutrition ou la respiration *via* le transport du dioxygène.

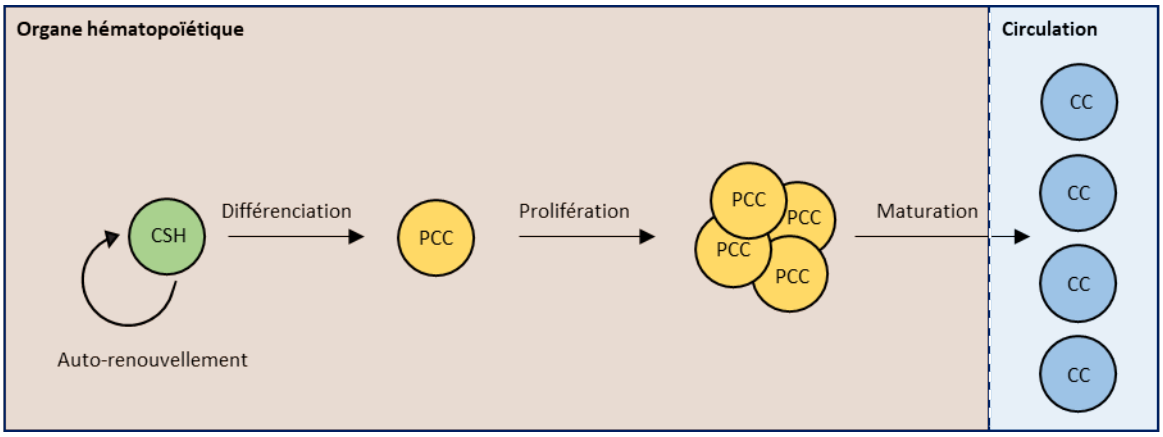


Figure 10. Représentation schématique et simplifiée des différentes étapes de l'hématopoïèse (CSH : cellule souche hématopoïétique ; PCC : progéniteur de cellule circulante ; CC : cellule circulante).

L'origine des premières cellules circulantes semble ancienne, des cellules mobiles ayant été décrites chez les Métazoaires diploblastiques les plus primitifs comme les Spongiaires ou *Porifera*. Ces cellules sont retrouvées entre l'ectoderme et l'endoderme, au sein de la mésoglée et interviennent principalement dans la nutrition. Elles sont également capables de réaliser la phagocytose et possèdent la capacité de régénérer tous les types cellulaires (Sutter et Buscema, 1977, Müller *et al.*, 2003). Chez d'autres espèces diploblastiques comme les *Coelenterata* ou Cnidaires, des cellules souches mobiles, les cellules interstitielles ont également été observées au niveau de la mésoglée (Figure 11a) (Bode, 1996).

Les lignées hématopoïétiques totipotentes semblent apparaitre chez les Bilatériens triploblastiques chez qui le mésoderme, entre l'ectoderme et l'endoderme, participe à la formation de nombreux tissus spécialisés. La plupart des espèces triploblastiques possède une seconde cavité interne, le cœlome. Cependant, chez certains triploblastiques possédant

une organisation simple comme les Plathelminthes le cœlome est absent (Lecointre et Le Guyader, 2017). Chez ces vers plats, l'intérieur du corps est rempli par un assemblage de mésoderme formant le parenchyme. Au sein du parenchyme circulent les néoblastes qui possèdent également la capacité de se différencier en tous les types cellulaires (Figure 11b) (Baguña, 2012).

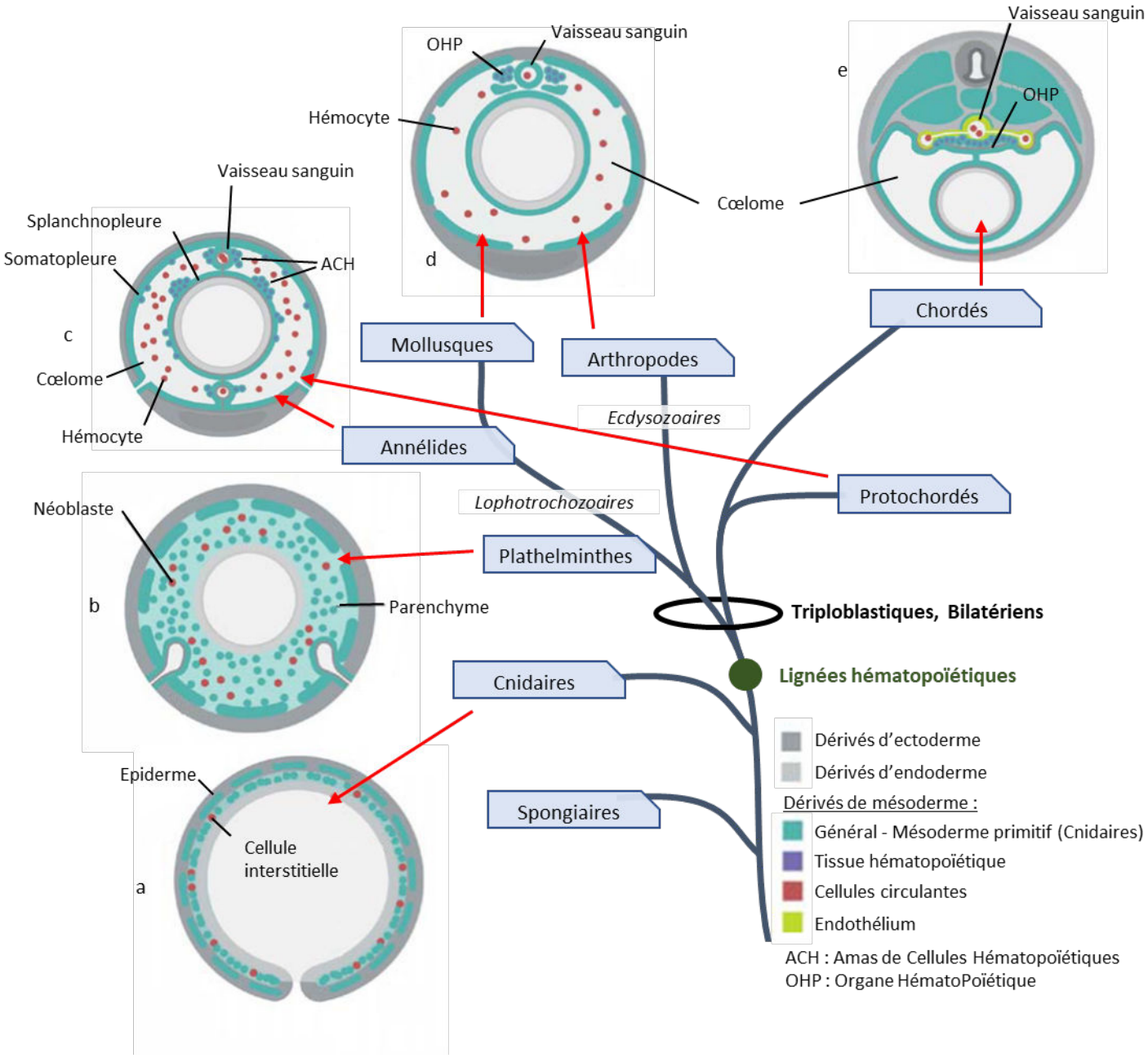


Figure 11. Arbre phylogénétique représentant les plans d'organisation du corps chez différents taxons du règne animal et l'apparition des différentes structures en lien avec l'hématopoïèse, adapté d'après Hartenstein (2006).

Chez les espèces possédant un cœlome, des structures hématopoïétiques ont clairement été identifiées. Celles-ci présentent une grande diversité de formes et sont plus ou moins spécialisées et formées à partir de la migration de cellules du mésoderme lors de l'organogénèse. Une des organisations les plus simples a été décrite chez plusieurs Echinodermes de la classe des *Holothuroidea*, où la production des cellules circulantes est assurée en partie par des cellules mésenchymateuses des vaisseaux sanguins (Figure 11c) (Hetzel, 1965). Chez d'autres espèces, il est question d'un véritable Organe HématoPoïétique ou OHP. Chez les Insectes, cet OHP correspond aux glandes de la lymphe (Figure 11d) (Hoffmann *et al.*, 1979). Chez les Vertébrés, la production de cellules sanguines est assurée par le rein et/ou la moelle osseuse, le rein chez les Téléostéens (Zapata, 1979), les deux organes chez les Anoures (de Abreu Manso *et al.*, 2009) et la moelle osseuse chez les Mammifères (Figure 11e) (Morrison et Scadden, 2014). Dans ce chapitre, l'attention sera portée sur l'OHP et la régulation de l'hématopoïèse chez les Protostomiens aquatiques dont les Céphalopodes.

1.1. Structure et localisation de l'organe hématopoïétique (OHP) chez les Protostomiens aquatiques

La production des hémocytes (amebocytes, cœlomocytes ou leucocytes suivant les espèces) chez les Protostomiens a été étudiée chez des Lophotrochozoaires, comme les Mollusques (Pila *et al.*, 2016a) ou des Ecdysozoaires comme les Arthropodes (Grigorian et Hartenstein, 2013). Les Protostomiens aquatiques sont des espèces appartenant pour la grande majorité aux embranchements des Annélides, des Mollusques et au sous-embranchement des Crustacés. Au sein de ces groupes d'animaux, l'OHP se présente sous plusieurs formes et est localisé dans différentes parties du corps (Smith *et al.*, 2016, Pila *et al.*, 2016a).

1.1.1. Description de l'OHP chez les Annélides Polychètes

Chez les Annélides dont les Polychètes, le système circulatoire est clos, comme chez les Céphalopodes, faisant de ces deux groupes les seuls Protostomiens possédant un système circulatoire clos. Ce système, chez les Annélides, est composé de deux vaisseaux, le vaisseau dorsal et le vaisseau ventral, positionnés de part et d'autre du tube digestif d'où partent de nombreuses ramifications et capillaires (Nicoll, 1954). Chez les Polychètes, les cellules circulantes bourgeonnent à partir de zones du péritoine et/ou des vaisseaux sanguins présentant un taux de prolifération plus élevé (Figure 12) (Dales, 1961, Eckelbarger, 1976).

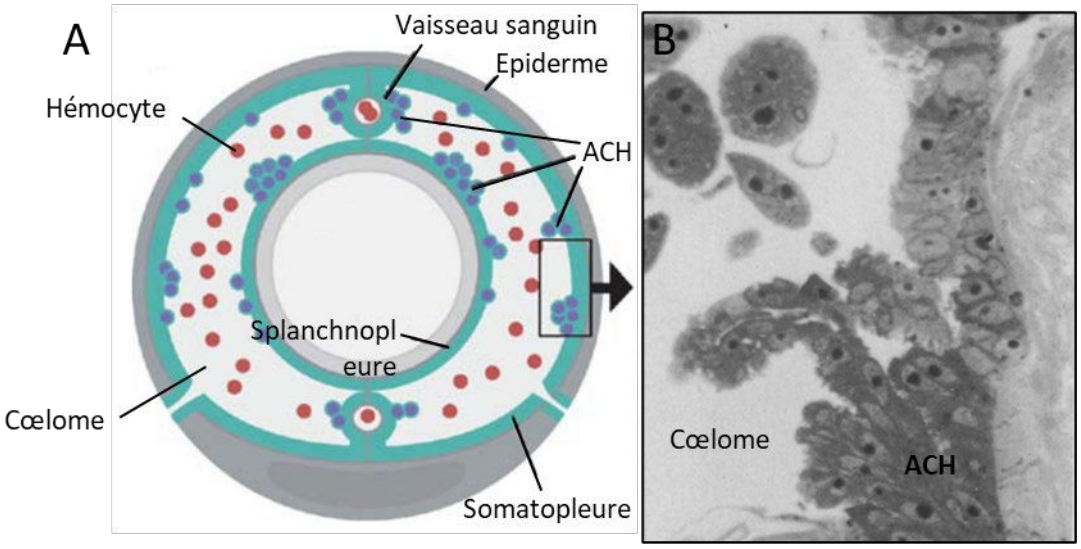


Figure 12. Origine des cellules circulantes chez les Annélides Polychètes. A. Plan d'organisation d'un Annélide Polychète présentant les Amas de Cellules Hématopoïétiques (ACH) au sein de la somatopleure, de la splanchnopleure et de la paroi des vaisseaux sanguins, d'après Hartenstein (2006). B. Observation microscopique de la somatopleure chez *Nicolea zostericola* présentant le bourgeonnement d'hémocytes dans le cœlome, d'après Eckelbarger (1976).

1.1.2. Description de l'OHP chez les Crustacés aquatiques

Le système circulatoire des Crustacés est généralement qualifié d'ouvert. Cependant, de par sa complexité, il est aussi qualifié de partiellement fermé chez les Décapodes (McGaw, 2005). Au sein de ce système circule l'hémolymphe qui est composée d'eau, de sels dissous, de protéines comme l'hémocyanine et des cellules circulantes, les hémocytes. Ceux-ci sont produits par l'OHP, généralement composé chez les Crustacés de plusieurs lobules recouverts de tissus connectif et présentant des cellules souches à l'origine d'hémocytes (Söderhäll,

2016). L'OHP des Décapodes est localisé à proximité de l'artère ophtalmique et sur la face dorsale et/ou latérale de l'estomac cardiaque (Ghiretti-Magaldi *et al.*, 1977, Martin *et al.*, 1993, Chaga *et al.*, 1995) (Figure 13). Une zone localisée dans la région antérieure de cet OHP appelée *Anterior Proliferation Center* (APC) et présentant des cellules capables de proliférer rapidement a été identifiée chez *Pacifastacus leniusculus* (Noonin *et al.*, 2012) et *P. clarkii* (Chaves da Silva *et al.*, 2013). Chez d'autres espèces, la position de l'OHP varie. Celui-ci est composé de lobules en position dorso-latérale de l'estomac chez le crabe *Eriocheir sinensis* (Jia *et al.*, 2016). Chez la crevette *Sicyonia ingentis*, les lobules sont retrouvés au niveau épigastrique (Martin *et al.*, 1987) tandis que chez *Artemia*, ceux-ci sont retrouvés à la base des membres (Lochhead et Lochhead, 1941). Les hémocytes sont libérés à l'une des extrémités des nodules où le tissu connectif est absent, au niveau de zones hémales adjacentes (Martin *et al.*, 1993, van de Braak *et al.*, 2002).

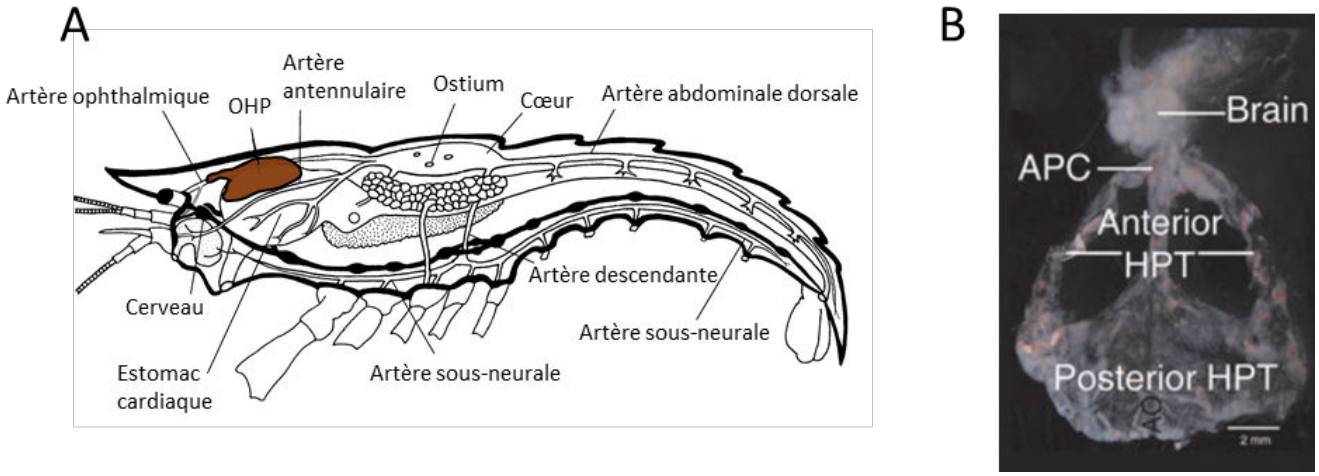


Figure 13. Organe HématoPoïétique (OHP) chez l'écrevisse *Pacifastacus leniusculus*. A. Focus sur l'anatomie du système circulatoire et de l'OHP, apparaissant en marron, adapté de Gherardi et al., 2011. B. Photographie de l'OHP disséqué en vue dorsale (APC : *anterior proliferation center* ; HPT : *hematopoietic tissue*), d'après Noonin (2012).

1.1.3. Description de l'OHP chez les Mollusques aquatiques

Chez les Mollusques, le système circulatoire est plus ou moins développé suivant les espèces. Chez les Bivalves et les Gastéropodes celui-ci est qualifié d'ouvert par l'absence d'un réseau de capillaires (Jones, 1983). Chez les Céphalopodes, le système circulatoire est particulièrement développé et clos possédant des similarités avec celui des Vertébrés (Schipp,

1987). Au sein de ce système circule l'hémolymphe dont la composition est similaire à celle décrite chez les Crustacés.

Description de l'OHP chez les Gastéropodes

L'OHP chez les Gastéropodes est appelé « *Amebocyte-Producing Organ » ou* APO et a été décrit chez *Biomphalaria glabrata* (Lie *et al.*, 1975), *Bulinus truncatus* (Kinoti, 1971), *Helisoma trivolis* (Sullivan, 1988), *Lymnaea palustris* (Rachford, 1976) et *Planorbarius corneus* (Ottaviani, 2006). L'APO est composé d'une fine couche de tissu située au fond de la cavité du manteau, le long de la partie sacculaire du rein appelé paroi péricardique antérieure chez *B. glabrata* (Lie *et al.*, 1975, Sullivan, 1990) (Figure 14).

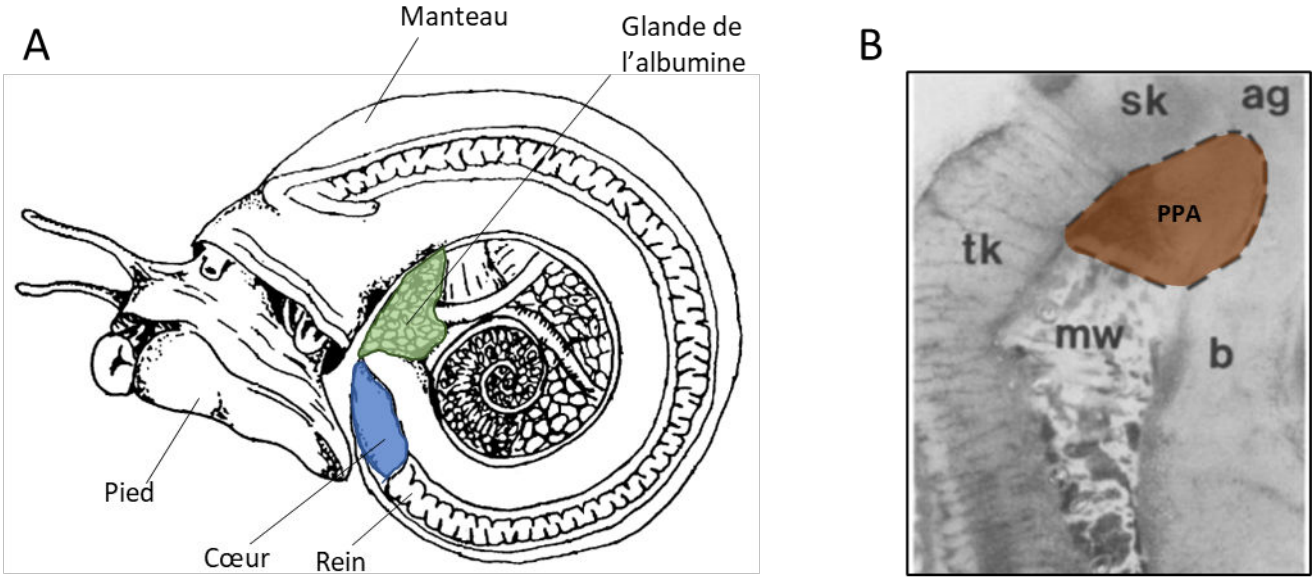


Figure 14. Organe HématoPoïétique (OHP) chez l'escargot d'eau douce *Biomphalaria glabrata*. A. Anatomie générale, adapté de Brown (2001). B. Focus sur la cavité pulmonaire du manteau. La Paroi Péricardique Antérieure (PPA) est représentée en marron, d'après Sullivan (1990) (sk : *saccular kidney*, tk : *tubular kidney*, ag : *albumin gland*, mw : *mantle wall*, b : *body of snail*).

Trois types cellulaires, les ameboblastes, les ameboblastes secondaires et les amebocytes ont été observés au niveau de l'APO (Jeong *et al.*, 1983). Celui-ci possède un sinus par lequel passent les ameboblastes secondaires dont certains évoluent en amebocytes (Jeong *et al.*, 1983). Les escargots d'eau douce du genre Biomphalaria constituent des hôtes intermédiaires du parasite *Schistosoma mansoni*, responsable de la schistosomiase chez l'Homme (Sturrock, 2001). Chez *Biomphalaria tenagophila*, une expérience de transplantation de l'APO d'une population résistante au parasite *S. mansoni* à une autre

population sensible a été menée. L'observation d'hémocytes présentant un marqueur de la population donneuse chez la population receveuse a été observée (Barbosa *et al.*, 2006), permettant d'apporter une nouvelle preuve du caractère hématopoïétique de l'APO.

Description de l'OHP chez les Bivalves

Chez les Bivalves, les cellules du manteau ainsi que certains cœlomocytes indifférenciés ont été décrits comme potentiels précurseurs d'hémocytes chez deux espèces d'huitres *Crassostrea virginica* et *C. gigas* (Elston, 1980). Chez la palourde *Tapes philippinarum*, une population cellulaire circulant au sein de l'hémolymphe et positive au marquage anti-CD34 (marqueur des cellules hématopoïétiques chez les Mammifères) a été identifiée (Cima *et al.*, 2000). Ces cellules appelées hémoblastes ont par ailleurs été reconnues capables de se diviser et pourraient être à l'origine d'une fraction des nouveaux hémocytes (Matozzo *et al.*, 2008). Plus récemment, Jemaà et collaborateurs (2014) proposent que des structures retrouvées au niveau des branchies, les *Irregularly Folded Structures* (IFS) (Figure 15) pourraient être responsables de l'hématopoïèse chez l'huitre *C. gigas*.

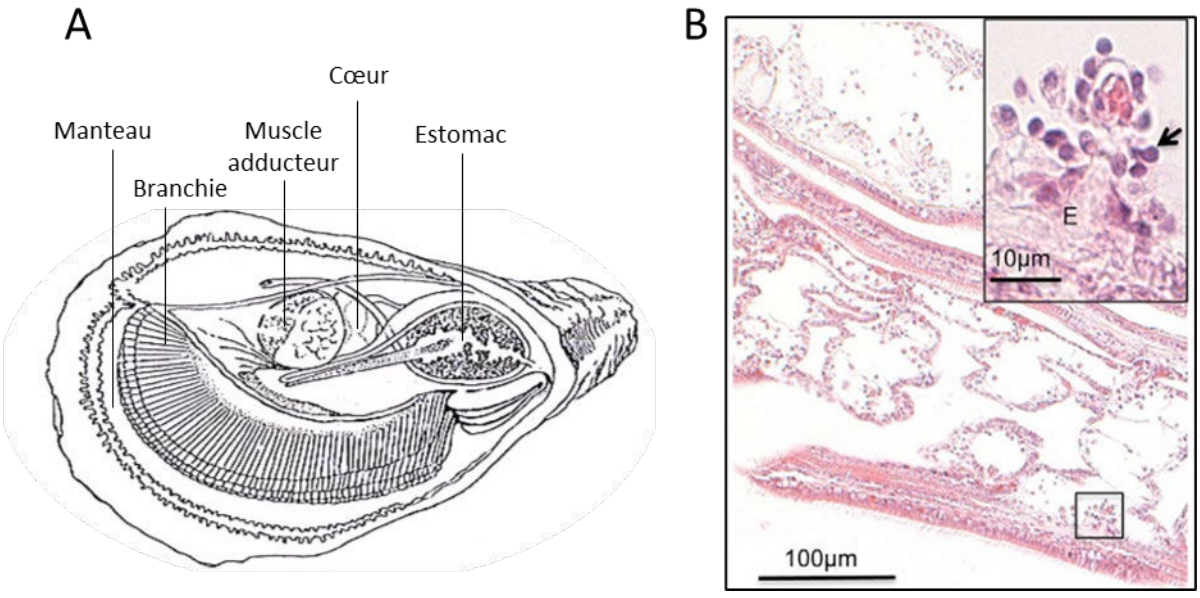


Figure 15. Organe HématoPoïétique (OHP) chez l'huitre creuse, *Crassostrea* gigas. A. Anatomie générale, adapté de Howard et Smith (1983). B. Coupe histologique de branchie présentant les *Irregularly Folded Structures* (IFS) etcolorée avec l'hématoxyline. Dans l'encart, cellules (flèche) bourgeonnant hors de la matrice extracellulaire (E) vers l'hémolymphe, d'après Jemaà *et al.*, 2014.

Les cellules au sein des IFS présentent un co-marquage pour Sox2, marqueur de cellule souche, et la SuperOxyde Dismutase Cu/Zn (SOD Cu/Zn), enzyme désignée comme spécifique

aux hémocytes. Ainsi ces cellules pourraient être des cellules souches hématopoïétiques. Les hémocytes seraient libérés directement dans l'hémolymphe à partir de bourgeonnements cellulaires (Figure 15B) (Jemaà *et al.*, 2014).

Description de l'OHP chez les Céphalopodes

L'OHP des Céphalopodes a été décrit pour les espèces appartenant à la sous classe des *Coleoidea*, en revanche aucune information concernant les espèces de la sous classe des *Nautiloidea* n'est disponible (Gerdol *et al.*, 2018). Chez les *Octobrachia* et les *Decabrachia*, l'OHP correspond au Corps Blanc (CB). Celui-ci est localisé au niveau des sinus optiques et se compose de plusieurs lobes interconnectés entourant les faisceaux de nerfs optiques (Cowden et Curtis, 1974, Claes, 1996) (Figure 16A).

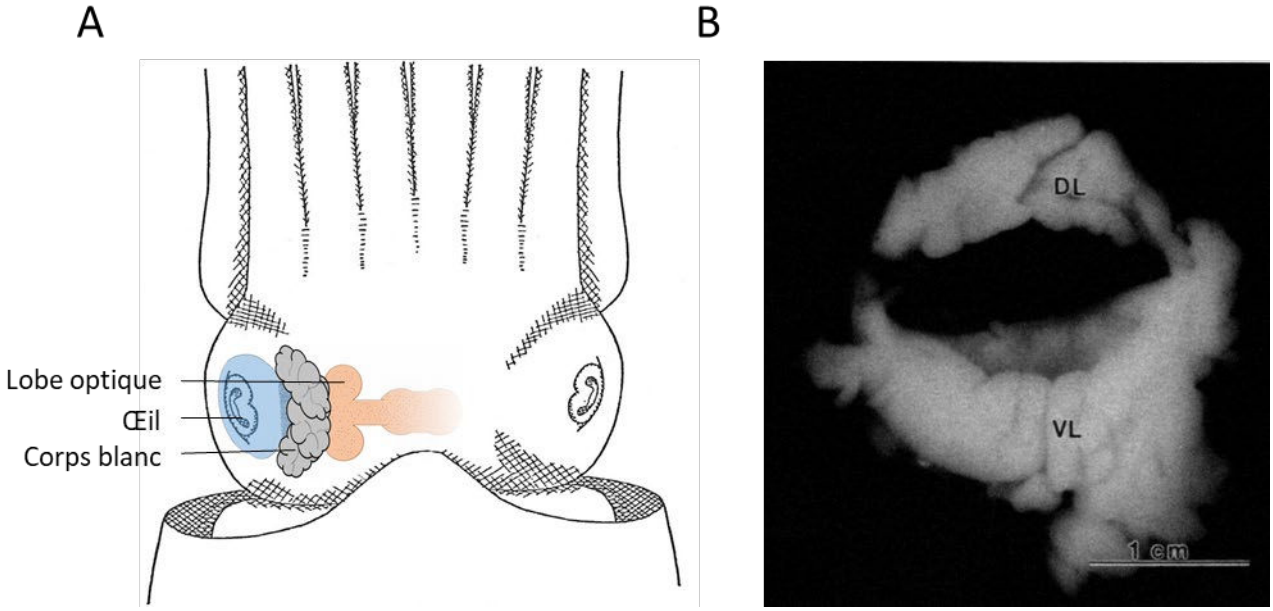


Figure 16. Organe HématoPoïétique (OHP) chez la seiche *Sepia officinalis*. A. Anatomie générale présentant la position du corps blanc par rapport à l'œil et au lobe optique. B. Photographie du corps blanc isolé et présentant les deux lobes dorsal (DL) et ventral (VL), d'après Claes (1996).

Chez *Octopus vulgaris*, Cowden (1972) a décrit trois types de leucoblastes, primaires, secondaires et tertiaires au niveau du CB. A ces trois types cellulaires s'ajoute un type mature, le leucocyte. Celui-ci est identique aux cellules circulantes dans l'hémolymphe. Chez *Sepia officinalis*, Claes (1996) a décrit quatre types cellulaires, l'hémocytoblaste, le leucoblaste primaire, le leucoblaste secondaire et l'hémocyte. Ce dernier est similaire en taille et en morphologie cellulaire aux cellules circulant dans l'hémolymphe. Claes (1996) a également

décrit la morphologie générale du CB. Celui-ci possède deux lobes de tailles inégales (Figure 16B), eux-mêmes organisés en lobes secondaires et richement vascularisés.

1.2. Régulation de l'hématopoïèse chez les Protostomiens

L'hématopoïèse est un processus complexe soumis à une régulation qui a largement été étudiée chez les Vertébrés mais également chez certains Protostomiens. Chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, certaines voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse chez les Vertébrés ont été décrites (Crozatier et Vincent, 2011, Banerjee *et al.*, 2019). La voie de signalisation JAnus Kinase – *Signal Transducers and Activators of Transcription* (JAK-STAT) a été décrite chez la drosophile (Binari et Perrimon, 1994, Hou *et al.*, 1996, Yan *et al.*, 1996, Harrison *et al.*, 1998, Brown *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2002, Agaisse *et al.*, 2003, Gilbert *et al.*, 2005, Hombría *et al.*, 2005) et est impliquée dans la maturation des hémocytes (Minakhina *et al.*, 2011) et la maintenance des pro-hémocytes (Krzemień *et al.*, 2007). La maintenance des pro-hémocytes est également régulée par deux autres voies conservées, *Hedgehog* (Mandal *et al.*, 2007) et *Wingless* (Sinenko *et al.*, 2009). La voie Notch a également été décrite chez la drosophile et intervient dans la différenciation d'un certain type d'hémocytes impliqué dans la mélanisation, les cellules à cristaux (Lebestky *et al.*, 2003). Chez les Protostomiens aquatiques, la régulation de l'hématopoïèse est encore peu connue mais certains facteurs bien conservés ont été décrits de manière ciblée par PCR ou par des approches globales comme la transcriptomique.

1.2.1. Chez les Crustacés

Chez l'écrevisse *Pacifastacus leniusculus*, plusieurs facteurs impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse ont été identifiés. Le facteur de transcription *Pl*-Runt, appartenant à la famille des facteurs de transcription RUNX, impliqués de façon conservée dans l'hématopoïèse, a été identifié au niveau des hémocytes par PCR (Söderhäll *et al.*, 2003). L'astakine-1 a été purifiée à partir de l'hémolymphe chez l'écrevisse, ce peptide possède une activité cytokine-*like* et induit la production d'hémocytes *in vitro* (Soderhall *et al.*, 2005). Par ailleurs, la sérotonine induit une augmentation de la sécrétion d'astakine-1 par les hémocytes, lui donnant un rôle potentiel dans la régulation de l'hématopoïèse chez l'écrevisse (Noonin, 2018). Chez la crevette *Penaeus monodon,* une astakine augmentant le taux de prolifération dans l'OHP a été clonée et est majoritairement exprimée au niveau des hémocytes (Hsiao et Song, 2010). Le *Crustacean Hematopoietic Factor* (CHF), dont la

production est induite par l'astakine-1 a également été décrit chez l'écrevisse. Le taux d'apoptose au sein de l'OHP est augmenté lors d'un KO du gène codant pour le CHF, celui-ci serait donc impliqué dans la survie des cellules de l'OHP (Lin *et al.*, 2011). La *Hemocyte Homeostasis-Associated Protein* (HHAP) a été identifié chez *Pacifastacus leniusculus* et *Penaeus monodon* (Prapavorarat *et al.*, 2010). Chez la crevette, HHAP est impliqué dans l'homéostasie des hémocytes lors d'une infection virale, notamment en inhibant l'apoptose (Prapavorarat *et al.*, 2010, Apitanyasai *et al.*, 2015). Enfin, chez le crabe *Eriocheir sinensis*, un facteur de transcription GATA-*like*, principalement exprimé dans l'OHP et nécessaire à la survie des hémocytes a été identifié (Li *et al.*, 2018).

1.2.2. Chez les Gastéropodes

La régulation de l'hématopoïèse chez les Gastéropodes pourrait faire intervenir des cytokines. Certaines d'entre elles, impliquées dans l'hématopoïèse chez plusieurs espèces de Vertébrés, comme des interleukines-*like* ou TNFα-*like*, ont été identifiées chez plusieurs espèces de Gastéropodes (Ottaviani *et al.*, 1993), néanmoins aucune étude fonctionnelle permettant de le confirmer n'a été décrite. Le facteur MIF ou *Macrophage migration Inhibitory Factor,* semblable à une cytokine impliquée dans la prolifération cellulaire a été identifiée chez l'ormeau *Haliotis diversicolor* (Wang *et al.*, 2009) et l'escargot d'eau douce *Biomphalaria glabrata* (Baeza Garcia *et al.*, 2010). Exprimée au niveau des hémocytes chez *B. glabrata*, le MIF serait nécessaire *in vivo* à leur activation après infection au parasite *Schistosoma mansoni* (Baeza Garcia *et al.*, 2010). Chez *B. glabrata*, un membre de la famille des granulines, *Bg*GRN, capable d'induire la prolifération des hémocytes a été identifié (Pila *et al.*, 2016b).

1.2.3. Chez les Bivalves

Certains homologues de facteurs impliqués dans l'hématopoïèse chez les Vertébrés ont été clonés chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. Le facteur de transcription hématopoïétique *Cg*-SCL (*Stem Cell Leukemia*) a été décrit et est fortement exprimé dans les hémocytes. Le KO du gène *Cg*-SCL engendre une régulation négative d'autres gènes associés aux hémocytes, indiquant un potentiel rôle de *Cg*-SCL dans la régulation des hémocytes (Song *et al.*, 2016). *Cg*-GATA2/3 a également été décrit. Son absence après ARN interférence mène à une régulation négative d'autres gènes associés aux hémocytes mais également à une baisse de leur taux de renouvellement. Il jouerait donc un rôle essentiel dans la régulation de la

production d'hémocytes (Song *et al.*, 2018). Enfin, un membre de la famille des facteurs de transcription RUNX, *Cg*Runx a été caractérisé. Celui-ci est majoritairement exprimé dans les hémocytes et pourrait avoir un rôle dans la fonction hématopoïétique (Song *et al.*, 2019).

1.2.4. Chez les Céphalopodes

Chez les Céphalopodes deux transcriptomes de CB chez *Euprymna tasmanica* (Salazar *et al.*, 2015) et *Octopus maya* (Juárez *et al.*, 2019) ont été obtenus. Les sépioles du genre *Euprymna* sont étudiées depuis de nombreuses années en raison de leur symbiose avec la bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri* au sein de l'organe de lumière (Wei et Young, 1989, McFall-Ngai et Montgomery, 1990). Les hémocytes semblent impliqués dans l'établissement de cette symbiose (Nyholm et McFall-Ngai, 1998, Nyholm *et al.*, 2009), ainsi une étude transcriptomique de l'organe hématopoïétique a été menée chez *E. tasmanica* afin d'explorer les fonctions du CB. Celle-ci a permis l'identification de huit transcrits homologues à des facteurs impliqués dans l'hématopoïèse chez d'autres organismes, incluant le facteur de transcription GATA-2, l'antigène CD109 ou le *fibroblast growth factor receptor* 2 (Salazar *et al.*, 2015). Chez *O. maya*, Juarez et ses collaborateurs ont étudié le profil transcriptomique du CB en mettant l'accent sur les différences de profil entre les mâles et les femelles lors de la reproduction. D'autres facteurs comme le facteur *B-cell lymphoma/leukomia 11A*, *T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2* (TIAM-2) et certains membres de la voie JAK-STAT, en lien avec l'hématopoïèse ont ainsi été identifiés (Juárez *et al.*, 2019).

2. Le corps blanc chez la seiche *Sepia officinalis*.

2.1. Exploration morphologique du corps blanc

Chez la seiche, la morphologie du CB et de ses différents types cellulaires a été décrite par Claes (1996). Le CB est un organe pair, d'apparence blanc opaque organisé en lobes situés au niveau des sinus optiques. Les deux lobes du CB sont richement vascularisés par deux branches de l'artère céphalique, les artères ophtalmiques droite et gauche (Figure 17A). Chaque artère ophtalmique se ramifie en plusieurs branches permettant d'irriguer les structures oculaires (iris, rétine) ainsi que le CB (Figure 17A, B & D).

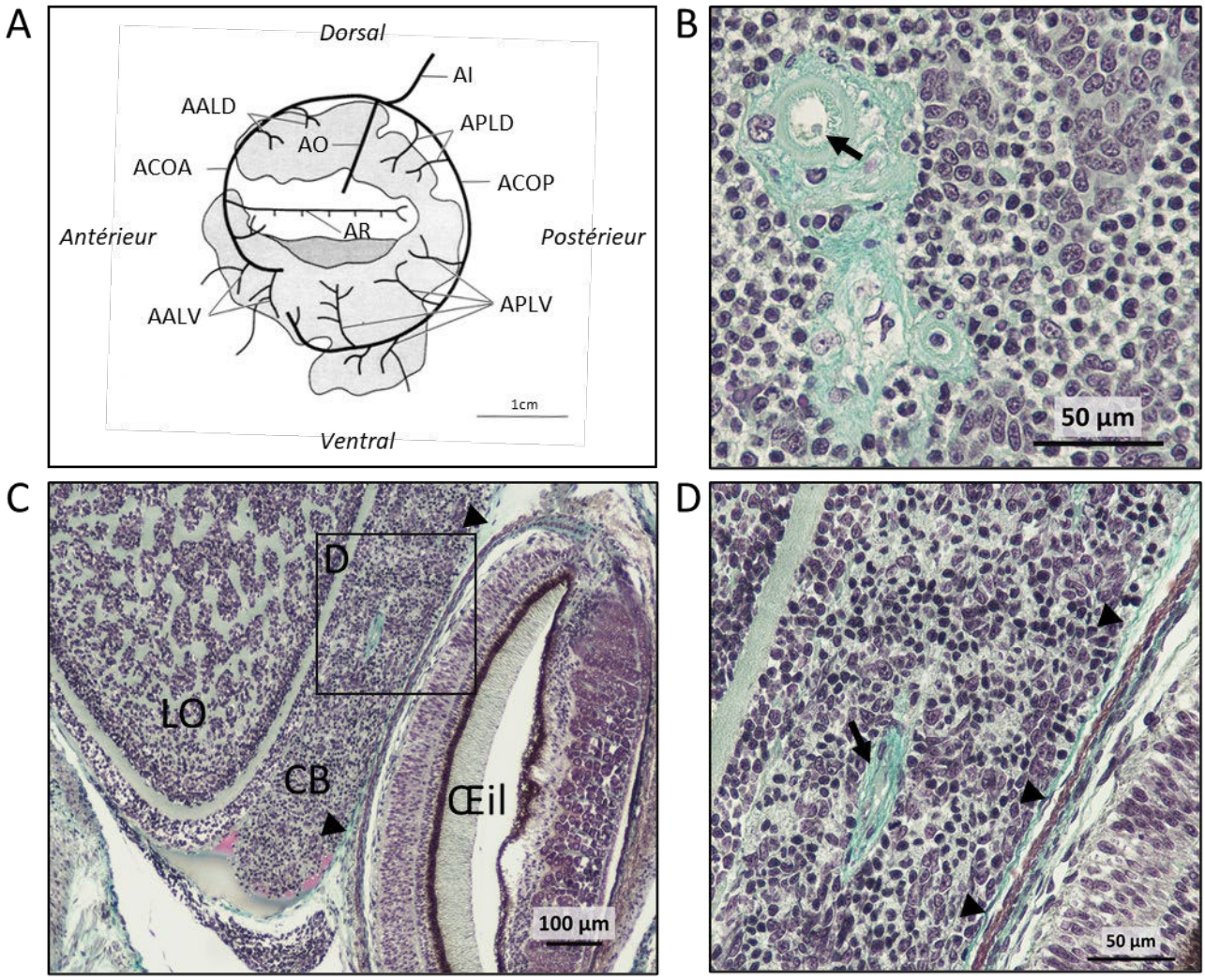


Figure 17. Structure morphologique du corps blanc. A. Représentation schématique présentant les principales artères irriguant corps blanc, d'après Claes (1996) (AI : artère de l'iris, AALD : artère antérieure du lobe dorsal, APLD : artère postérieure du lobe dorsal, AO : artère ophtalmique, ACOA : artère circum-ophtalmique antérieure, ACOP : artère circum-ophtalmique postérieure, AR : artère rétinienne, AALV : artère antérieure du lobe ventral, APLV : artère postérieure du lobe ventral). B. Coupe transversale d'un CB d'adulte présentant un des vaisseaux traversant le CB (flèche) (Objectif x40). C. Coupe transversale du céphalopodium d'un embryon présentant le Lobe Optique (LO), l'œil et le CB ainsi que le tissu connectif reliant le CB à l'œil (apparaissant en vert, pointes de flèches) (Objectif x10). D. Agrandissement présentant un vaisseau (flèche) (Objectif x40).

Les différents lobes du CB sont rattachés à l'œil par des fibres de tissu connectif (Figure 17C & D). Au sein du CB, Claes a décrit plusieurs populations cellulaires distinctes présentant

des différences cytologiques. Ces populations représentent les différents états de développement de la lignée hématopoïétique (Figure 18) (Claes, 1996).

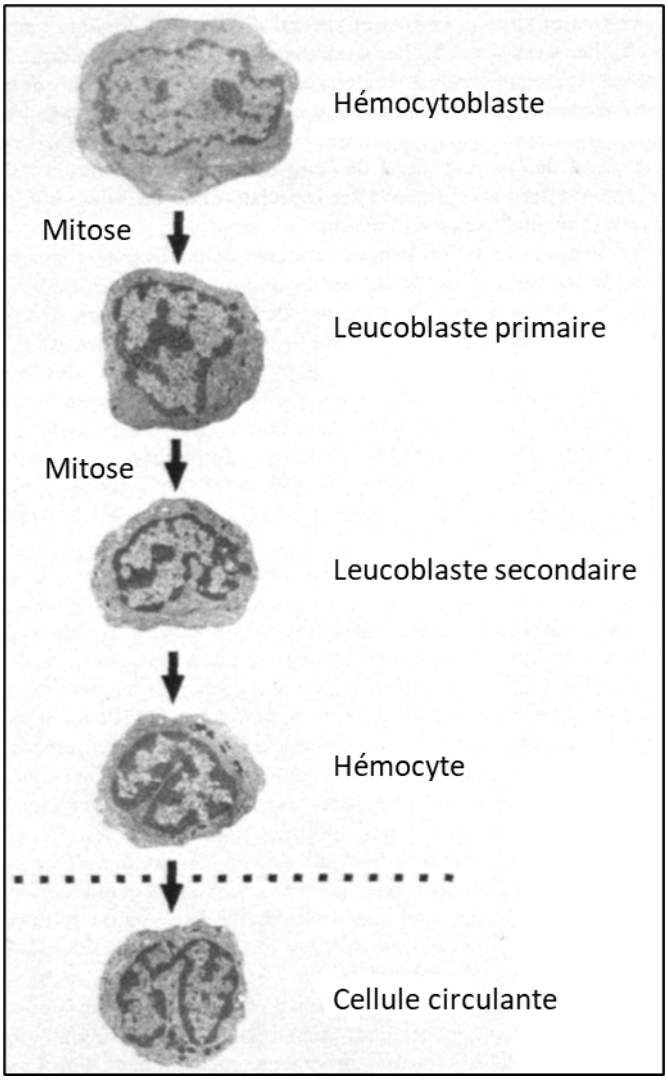


Figure 18. Proposition de classification des types cellulaires au sein du corps blanc sur la base des différences cytologiques permettant d'observer les étapes du développement des hémocytes, par Claes (1996).

2.2. Exploration moléculaire du corps blanc

Afin de compléter l'étude de Claes (1996), une approche moléculaire a été développée pour explorer les fonctions du CB chez la seiche en associant une analyse du transcriptome et une analyse comparative du protéome du CB avec celui des hémocytes. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée « *Omic Analysis of the* Sepia officinalis *White Body: New Insights into Multifunctionality and Haematopoiesis Regulation* » et publiée dans *Journal of Proteome Research*.

Journal of proteome research

pubs.acs.org/jpr

Article

-Omic Analysis of the *Sepia officinalis* White Body: New Insights into Multifunctionality and Haematopoiesis Regulation

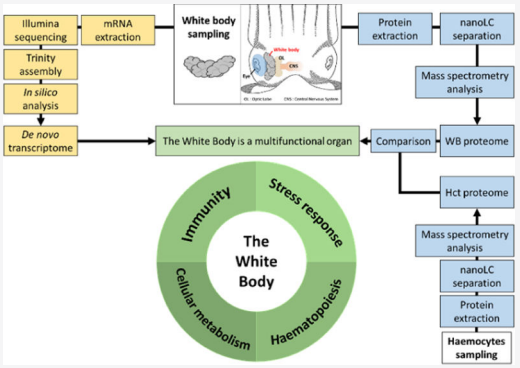
Louis Benoist, Erwan Corre, Benoit Bernay, Joel Henry, and Céline Zatylny-Gaudin*

Cite This: *J. Proteome Res.* 2020, 19, 3072−3087

Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: Cephalopods, like other protostomes, lack an adaptive immune system and only rely on an innate immune system. The main immune cells are haemocytes (Hcts), which are able to respond to pathogens and external attacks. First reports based on morphological observations revealed that the white body (WB) located in the optic sinuses of cuttlefish was the origin of Hcts. Combining transcriptomic and proteomic analyses, we identified several factors known to be involved in haematopoiesis in vertebrate species in cuttlefish WB. Among these factors, members of the JAK-STAT signaling pathway were identified, some of them for the first time in a molluscan transcriptome and proteome. Immune factors, such as members of the Toll/NF-κB signaling pathway, pattern recognition proteins and receptors, and members of the oxidative stress responses, were also identified, and support an immune role of the WB. Both transcriptome and proteome analyses revealed that the WB harbors an intense metabolism concurrent with the haematopoietic function. Finally, a comparative analysis of the WB and Hct proteomes revealed many proteins in common, confirming previous morphological studies on the origin of Hcts in cuttlefish. This molecular work demonstrates that the WB is multifunctional and provides bases for haematopoiesis regulation in cuttlefish.



KEYWORDS: *Sepia officinalis, mollusc, white body, haematopoiesis, JAK-STAT pathway*

INTRODUCTION

Protostomes only rely on their innate immune system to protect themselves against pathogens, whereas vertebrate species possess both an innate and an adaptive immune systems. The innate immune system includes the cellular response and the humoral response. The cellular response involves circulating cells—haemocytes (Hct)—in protostomes. Hct play a key immune role and are involved in antimicrobial factor release, melanization, pathogen encapsulation, or phagocytosis.

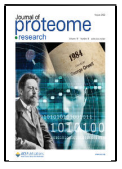
The different types of Hcts among protostomes are classified according to the degree of granulation, cytochemical staining, and/or morphology. In insects, six types of Hct have been described: prohaemocytes, plasmatocytes, granulocytes, cystocytes, spherulocytes (or adipohaemocytes), and oenocytoids (called crystal cells in *Drosophila*).[1] Granulocytes and plasmatocytes are involved in phagocytosis, cystocytes in clotting and cell aggregation, and oenocytoids in prophenoloxidase (proPO) synthesis.[2,3] In crustaceans, Hct are involved in phagocytosis, clotting, viral defense and proPO production. Three types of Hct have been described, namely, the hyaline, granular, and semigranular cells.[1,4]

In molluscs, the second largest phylum of protostomes, one to four types of Hcts have been described depending on the species and the descriptive criteria. Three types of Hct have been found in the gastropod *Biomphalaria glabrata*.[5] In the two marine snails *Aplysia californica* and *Megathura crenulate*, and the freshwater snail *Viviparus ater*, only one type of Hct able to perform phagocytosis has been described.[6,7] In the bivalves, *Crassostrea virginica*, *Mytilus galloprovincialis*, and *Scrobicularia plana*, three types of Hct have been identified, namely, agranular hyalinocytes, basophilic granulocytes, and eosinophilic (acidophilic) granulocytes.[8−10] In clam (*Ruditapes philippinarum*), only hyalinocytes and acidophilic granulocytes have been observed,[11] and granulocytes showed higher phagocytic activity than hyalinocytes.[8,11]

Few studies have been performed on cephalopod Hct. In *Octopus vulgaris*, two types of granulocytes have been described.[12−14] In *Sepia officinalis*, only one type of Hct, capable of phagocytosis and possessing acid phosphatase, lysozyme, and proPO system enzymes, has been described.[15,16]

The haematopoietic organ (HPO) is the seat of Hct production and maturation. It is highly variable among

Received: February 18, 2020
Published: July 9, 2020



ACS Publications © 2020 American Chemical Society

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

protostomes and has mainly been described by cytological and immunohistochemical studies. In insects, the HPO or lymph glands are located along the anterior portion of the dorsal vessel.[2,17−19] In crustaceans, the HPO is generally composed of gland-like lobules located on the dorsal portion, surrounding the ophthalmic artery.[4] HPO localization differs in molluscs. In the gastropod *B. glabrata*, the HPO is called the amebocyte-producing organ and is located at the basal surface of the pericardial epithelium.[20,21] In bivalves, immunohistochemistry staining revealed that a stem cell marker (sox2) and an Hct-specific enzyme [the Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD)] were co-expressed in the irregularly folded structure found in the gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.[22] The authors suggested the involvement of this structure in haematopoiesis.

Knowledge on the drivers of haematopoiesis in protostomes remains limited and restricted to only a few models such as *Drosophila melanogaster*[23−25] and *Pacifastacus leniusculus*.[26,27] However, hardly any homologues of signaling pathways and factors involved in haematopoiesis have been identified in molluscs. Cytokines are involved in many functions including haematopoiesis in vertebrates; some of them have been identified in gastropods, such as IL-like and TNFα-like molecules[28] or the macrophage migration inhibitory factor (MIF).[29,30] MIF, an evolutionarily conserved multifunctional protein, has been characterized in both *Haliotis diversicolor supertexta*[30] and *B. glabrata*.[29] In *B. glabrata*, *Bg*MIF seems to be necessary for Hct activation in response to the parasite *Schistosoma mansoni*.[29] In *C. gigas*, GATA3, a haematopoietic transcription factor homologue,[31,32] is expressed in the gills and in Hct, and it is overexpressed in the gills following a secondary challenge with the pathogenic bacteria *Vibrio splendidus*, suggesting a role in haematopoiesis.[33,34] The transcription factor Tal-1/Scl (Stem Cell Leukemia) is involved in embryonic haematopoiesis in human cells;[35] it was identified in *C. gigas*, where it is involved in the regulation of Hct-specific genes, such as *Integrin*, *GATA3*, *c-Myb*, *c-kit*, or *EcSOD*.[36]

In cuttlefish and octopus, the white body (WB), located in the optic sinuses and composed of interconnected lobes, has been defined as the HPO, from morphological and cytological observations.[37−39] Claes studied the morphology of the WB in cuttlefish. The WB is a paired organ organized in interconnected lobes surrounding the optic tracts. High vascularization has been described and is ensured by two branches of the cephalic aorta, i.e., the left and right ophthalmic arteries. Claes described four cell types according to cytomorphological properties: haemocytoblast, primary leucoblast, secondary leucoblast, and Hct. Based on cytological differences between these cell types, Claes concluded that they represent different stages of development and proposed a pathway for Hct maturation from a stem cell-like entity—the haemocytoblast—to a mature Hct, supporting the haematopoietic function of the WB.[37] Only two molecular studies have been performed on the WB in *Euprymna tasmanica*[40] and *Octopus maya*.[41] Based on transcriptomic and gene ontology analysis, Salazar and collaborators identified 8 transcripts with homology to genes involved in haematopoiesis in other organisms, and 16 transcripts involved in the immune response.[40] Juárez and collaborators confirmed the occurrence of haematopoietic transcripts in *O. maya* WB and the downregulation of immune genes in fertilized females.[41] These results suggest a dual role of the WB in the regulation of the immune system and haematopoiesis. However, no complete signaling pathway underlying haematopoiesis has been identified so far.

The Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) signaling pathway is involved in haematopoiesis in vertebrates,[42,43] and it has been described in *D. melanogaster*.[25,44] The JAK-STAT pathway is a membrane-to-nucleus mechanism allowing the rapid regulation of gene transcription; it is activated by cytokines through cytokine receptors.[45] Four JAK and seven STATs have been described in mice,[43] while only one JAK and one STAT have been identified in *D. melanogaster*.[46] In molluscs, several STATs have been identified in bivalves, gastropods, and cephalopods.[41,47−50] In *Hyriopsis cumingii*, three STATs have been identified and are involved in the antimicrobial peptide expression.[48] In *Pinctada fucata*, a STAT homologue is expressed in several tissues, including heart, gonad, gill, or muscle. Overexpression was observed in the haemolymph after polyinosinic−polycytidylic acid (poly(I:C)) injection, suggesting a role in the immune response.[49] In *B. glabrata*, several transcription factors, including two STATs (STAT1 and STAT2) have been identified; they were upregulated in Hct, 12 and 6 h after challenge with *S. mansoni*, respectively.[47] In *Haliotis discus discus*, a STAT5 homologue was expressed in all tested adult tissues and upregulated in gills and Hct after challenge with *V. parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, or poly(I:C) injection.[50] Altogether, these results suggest that STATs are involved in the immune response of molluscs. However, no complete JAK-STAT pathway has been identified in molluscs, and only a few JAK-STAT pathway components have been described in cephalopods.[41]

The aim of this study is to characterize the transcriptome and, for the first time, the HPO proteome of the cuttlefish (*S. officinalis*). A proteomic analysis coupled with transcriptomic data provides essential information to (1) further investigate the molecular processes involved in Hct formation and (2) identify other additional functions of the WB.

MATERIALS & METHODS

Animals

All the cuttlefish were trapped in the Bay of Seine between January and June 2017. They were maintained in 1000 L outflow tanks at 16 °C at the Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC, marine station of the University of Caen, Luc-sur-Mer, France).

Ethical Statement

This research followed the guidance given by Directive 2010/63/EU, and French regulations regarding the use of animals for experimental procedures. It was approved by the Regional Ethical Committee Cenomexa (Committee agreement number 54; project agreement number 03145.03). The experiment was designed to decrease animal distress by minimizing the number of animals. Moreover, the tanks were modified so as to provide hiding places for the cuttlefish.

Cuttlefish were anaesthetized with ethanol 3%. After exsanguination, the white bodies were dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until mRNA isolation and protein extraction. Hct were separated from the haemolymph by centrifugation. The pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until mRNA and protein extractions.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

Illumina Sequencing

RNA extraction was performed as described by Cornet and collaborators.[51] Briefly, total RNA from five white bodies from the male cuttlefish was extracted using TriReagent (Sigma-Aldrich). After the RNA analysis, library preparation and sequencing were conducted by the McGill University and Génome Québec Innovation Center (Montréal, Québec, Canada) following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA). The detailed protocol is available in the supporting experimental section. These data were submitted to SRA Bioproject PRJNA599385, Biosample SAMN13747092, with Accession number SRR10843375.

Bioinformatic Analysis

Bioinformatic analysis (transcriptome assembly and annotation) was performed on RNA sequencing data from the WB organ. Raw sequencing data corresponded to a total of 43,361,848 paired-end reads with a maximum read length of 150 bp. The raw data set was filtered and cleaned using Trimmomatic v (0.36),[52] using the following parameters: ILLUMINACLIP: adapt.fa: 2: 30: 10, LEADING: 5, TRAILING: 5, SLIDING WINDOW: 4: 5, MINLEN: 25. The overall sequence quality was checked using FastQC (v 0.11.5) (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). The overall assembly was done with Trinity 2.4.0.,[53] a package dedicated to *de novo* transcriptomic assembly. A normalization step was performed according to the kmer coverage (25 nt kmer, maximum coverage 30) proposed by the Trinity package. Relative abundance was estimated using the pseudo aligner Kallisto v0.43.1.[54]

The transcriptome was annotated using the Trinotate protocol (https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io), as described by Bryant and collaborators.[55] Proteins were predicted using TransDecoder software (https://github.com/TransDecoder/TransDecoder). The search for similarity (blastx of the transcripts and blastp of the predicted proteins) was performed against the uniprot-swissprot database (version 2017-01). Signal peptides were predicted using the signal P utility v4.1.[56] Transmembrane domains were detected using a TMHMM v2.0c.[57] The protein domain search was performed using hmmscan of the hmmer suite v.3.1b1 against the Pfam-A database.[58] Finally, the functional annotation of the transcriptome was performed using the Trinotate pipeline. An annotation-based search was performed to identify relevant transcripts involved in several functions such as haematopoiesis or the immune and stress responses. Additionally, a manual search for conserved domains and patterns of known invertebrate factors involved in haematopoiesis and the immune response was performed using a homemade software program called Peptraq as previously described by Zatylny-Gaudin and collaborators.[59] The presence of other relevant proteins from the NCBI nr database was considered by using them as query sequences for the BLAST search against the WB transcriptome. For some proteins, molecular weights (MW) were calculated with the ExPASy ProtParam tool (https://web.expasy.org/protparam/). Specific domains were predicted using InterPro (http://www.ebi.ac.uk/interpro/)[60] and SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/)[61] tools. Multiple sequence alignments were performed using the CLC Main Workbench 8 (CLC BIO). KEGG annotation was performed using the KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) tool for the transcriptome analysis[62] and the BlastKOALA (KEGG Orthology And Links Annotation, version 2.2) tool for the proteome analysis.[63]

Protein Extraction

WBs (n = 3) and Hct pellets (n = 3) were crushed in liquid nitrogen and then resuspended in PBS (phosphate buffered saline) with a cocktail of protease inhibitors (Sigma P2714). The extracts were centrifuged for 10 min at 20,000g at 4 °C, and the supernatants were recovered. Protein concentrations were determined using a BCA (bicinchoninic acid) assay.[64]

SDS-PAGE-MALDI-MS Proteome Analysis

Each WB protein extract (60 μg) was separated on a sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) gel (Tris-HCl 4-12%) for 3 h at 120 V in Tris-HCl migration buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS) with a broad range protein molecular weight marker (Promega V8491). Gels were stained with a methanol 40%—acetic acid 10% solution containing 0.1% Coomassie blue. High-intensity spots were cut off into slices to analyze highly abundant proteins. After discoloration, the slices were reduced with 50 mM dithiothreitol (DTT), alkylated with 55 mM iodoacetamide (IAA), and hydrolyzed with 0.006 μg/μL of trypsin solution. MALDI-MS experiments were performed as described in Cornet and collaborators.[65]

NanoLC ESI-MS Analysis of the WB and Hct Proteomes

For a comparative study between the WB and Hct extracts, 10 μg of each whole WB and Hct extracts (n = 3) were reduced with 10 mM DTT, alkylated with 20 mM IAA, and hydrolyzed with 0.006 μg/μL of trypsin solution.

For nanoLC fragmentation, the resulting peptide samples were first desalted and concentrated onto a μC18 Omix column (Agilent) before the analysis. The chromatography step was performed on a NanoElute (Bruker Daltonics) ultrahigh-pressure nanoflow chromatography system (nanoLC). Two hundred nanograms of peptides were concentrated onto a C18 pepmap 100 (5 mm × 300 μm i.d.) precolumn (Thermo Scientific) and separated at 50 °C on a reversed-phase Reprosil column (25 cm × 75 μm i.d.), packed with 1.6 μm C18-coated porous silica beads (Ionopticks). Mobile phases consisted of 0.1% formic acid in 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% formic acid in 99.9% ACN (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 400 nL/min, and the gradient profile was as follows: from 2 to 15% B within 60 min, followed by an increase to 25% B within 30 min and further to 37% within 10 min, followed by a washing step at 95% B and re-equilibration.

ESI-MS experiments were carried out on a TIMS-TOF pro mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a modified nanoelectrospray ion source (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). The system was calibrated every week, and the mass precision was better than 1 ppm. A 1400 spray voltage with a capillary temperature of 180 °C was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive mode in the 100−1700 m/z mass range. The mass spectrometer was operated in PASEF mode with the exclusion of single charged peptides. A number of 10 PASEF MS/MS scans were performed within 1.25 s from charge range 2−5.

Peptide Sequencing and Protein Precursor Identification

The fragmentation pattern was used to determine the sequence of each peptide. The database searching was performed using Peaks X software. Using a homemade software program called Peptraq, each transcript from the WB transcriptome was

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

translated in all six reading frames, with a cutoff to delete sequences <40 amino acids. This database, which possesses 361,796 entries, was used for MS identifications. The variable modifications allowed were as follows: C-carbamidomethyl, K-acetylation, methionine oxidation, and deamidation (NQ). "Trypsin" was selected as semi-specific. Mass accuracy was set to 40 ppm and 0.05 Da for the MS and MS/MS modes, respectively. Data were filtered according to an FDR of 1%, 2 unique peptides and the elimination of protein redundancy on the basis of proteins being evidenced by the same set or a subset of peptides. The iBAQ (intensity-based absolute quantification) analysis was performed by normalizing MS intensities with putative average molecular weights. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium *via* the PRIDE[66] partner repository with the data set identifier PXD017509.

RESULTS & DISCUSSION

Transcriptome Analysis

The *S. officinalis* WB transcriptome comprised 155,614 transcript sequences including isoforms of 92,295 genes (according to the "gene" definition provided by Trinity assembler) with an average length of 609 nucleotides. Ninety-five percent of the global expression of the transcriptome corresponded to 22,208 transcripts, including a lot of slightly expressed transcripts. Based on the presence of a blastx hit against the uniprot-swissprot database, 19% of all transcripts included in the WB transcriptome were annotated. KEGG annotation using the KAAS annotation tool led to the functional annotation of 21,779 predicted protein sequences, representing 5354 unique K numbers. The low level of annotation of the WB transcriptomes of *S. officinalis* and other cephalopods[40,41]—around 20%—revealed a lot of unknown genes. Such a low level of annotation is commonly found in a special model such as the cuttlefish *S. officinalis*, as already reported for the central nervous system (CNS) transcriptome with only 28%,[59] the accesory nidamental gland with 34% or posterior salivary glands (PSGs) with 45%.[65] The higher level of annotated transcripts in the PSG-causing neurotoxic saliva is explained by previous studies carried out on venoms of invertebrates and snakes.

Besides, 7 of the 10 most expressed transcripts were not annotated. These genes may possess relevant functions, highlighting the need for novel works on cephalopod genomes. The 20 most expressed transcripts in the cuttlefish included histone H1, hephaestin-like protein, ribosomal proteins, peptidoglycan recognition protein 2 (PGRP2), elongation factor 1-α, poly(rC)-binding protein 3, and tubulin α chain. Interestingly, 29,281 proteins were predicted by transdecoder, and 21,323 of them had a blastp hit against the uniprot-swissprot database, corresponding to an annotation level of 73%.

Proteome Analysis

To complete the WB transcriptome analysis, we conducted a double proteome analysis on the WB extract. First, separation on SDS-PAGE coupled with a fast MALDI-MS analysis was performed to provide an overview of the most abundant proteins in the WB extract. Second, separation by nanoLC coupled with an ESI-MS analysis allowed us to access to a large number of proteins, including low-abundant proteins in the WB proteome, but also to compare the WB and Hct proteomes.

The MALDI-MS analysis allowed us to identify the most abundant proteins for each molecular weight (Figure 1, Table S1). We identified twenty-four proteins, ranging from 15 to 160 kDa, including enzymes and proteins associated with general stress (heat shock protein 90) or with oxidative stress (glutathione S-transferase, peroxiredoxin-1). The thioester-containing protein 1 (CD109), whose function remains unclear in cephalopods, was also identified. Numerous cellular process-related proteins such as proteins involved in the energy or calcium metabolisms [*e.g.*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD), malate dehydrogenase, or calmodulin] complete this analysis, along with translation factors (*e.g.*, elongation factor 2), GTPase activators (*e.g.*, Rab GDP dissociation inhibitor beta and Rho GDP-dissociation inhibitor 2), proteasome subunits (*e.g.*, proteasome subunit α 2-like and proteasome subunit α 1-like), or actin and actin-related proteins (*e.g.*, actin II, radixin and actophorin-like).

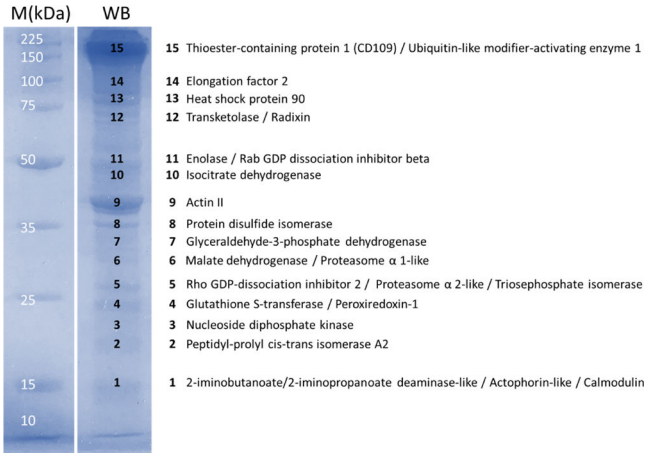


Figure 1. Proteomic analysis of the *S. officinalis* WB extract. Gel lanes of the WB extract and protein standard (M). Numbers represent gel slices subjected to trypsin digestion and MS/MS identification. The list of proteins identified by MALDI-TOF MS/MS from gel slices is represented on the side of the gel.

To study the WB proteome further and compare the WB and Hct proteomes, nanoLC ESI-MS was performed in triplicate on WB and Hct extracts. Totals of 4049 and 2095 proteins were identified, respectively. A comparative study of the WB and Hct proteomes, illustrated by a Venn diagram (Figure 2), highlighted 1870 proteins in common, 2179 proteins specific to the WB extract, and 225 proteins specific to the Hct extract. Among the 10 most abundant proteins in the WB extract, five were also identified by fast MALDI-MS, that is, G3P, calmodulin, Rho GDP dissociation inhibitor, nucleoside diphosphate kinase, and protein disulphide isomerase. Two of the ten most abundant proteins in the WB extract were in common with the Hct extract, namely, nucleoside diphosphate kinase and COMM domain-containing protein 9 (COMD9). Besides, COMD9 was the most abundant protein in the Hct extract and the third most abundant protein in the WB extract. Among the other most abundant proteins in the Hct extract, three proteins involved in the cell shape, such as profilin-2, myosin regulatory light polypeptide, and myosin-2 essential light chain were represented. Finally, 1 of the 10 most abundant proteins remained unknown in both extracts.

KEGG annotation using the BlastKOALA annotation tool was performed to obtain a functional annotation of the

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

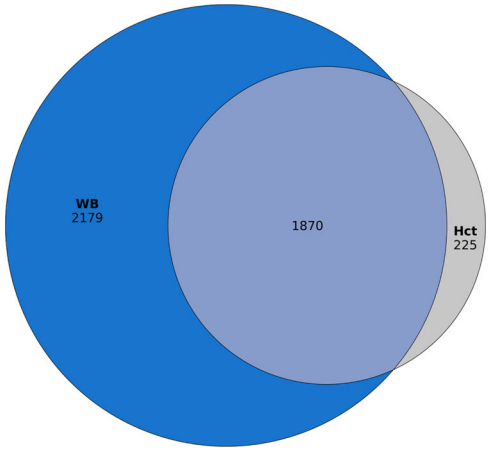


Figure 2. Venn diagram showing the distribution of proteins identified by Tims-TOF nanoLC-MS in the WB only, Hct only, and in both the WB and Hcts.

proteins identified in the WB and Hct extracts. KEGG annotation of the WB proteome led to the functional annotation of 2943 protein sequences, representing 1315 unique K numbers. KEGG annotation of the Hct proteome led to the annotation of 1557 protein sequences, representing 631 unique K numbers. Seventy-two and 74% of the protein sequences identified in the WB and Hct extracts were annotated, respectively, corresponding to the annotation level obtained for predicted proteins by transdecoder.

WB Harbors Intensive Metabolic Activity

Table 1 represents the distribution of the KEGG annotations of the annotated transcripts of the WB transcriptome in relevant categories, representing 27% of all KEGG annotations obtained for the WB transcriptome.

Table 1. Distribution of Functional Annotations into Relevant Pathways of the WB Transcriptome Using the KEGG Orthology (KO) Database

	ID pathways	pathway description	number of matches in gene list
cellular processes	ko01100	metabolic pathways	720
	ko03013	RNA transport	115
	ko03010	ribosome	115
	ko04141	protein processing in endoplasmic reticulum	107
	ko03022	basal transcription factors	32
cell proliferation	ko04151	PI3K-Akt signaling pathway	100
	ko04010	MAPK signaling pathway	88
	ko04110	cell cycle	81
haematopoiesis	ko04630	JAK-STAT signaling pathway	17
	ko04330	Notch signaling pathway	23
immunity	ko04620	NF-κB signaling pathway	34
	ko04064	Toll-like receptor signaling pathway	30

The most represented category was metabolic pathways, with 720 matches (Table 1). Other cellular processes involved in transcription (RNA transport with 115 matches, basal transcription factors with 32 matches) and translation (ribosome with 115 matches, protein processing in the endoplasmic reticulum with 107 matches) were also represented. In addition, elongation factor 1-α, tubulin α chain, and ribosomal proteins were some of the most expressed transcripts. Both -omic approaches demonstrated that the WB had an intense metabolic activity partly associated with haematopoiesis. Indeed, 19 of the 24 proteins identified by the fast MALDI-MS analysis of the WB extract (G3P dehydrogenase, malate dehydrogenase, triosephosphate dehydrogenase, or calmodulin) were found to be involved in metabolic processes. The proteome of PSG of the cuttlefish *S. officinalis* was established using the same MALDI-MS analysis.[65] Out of the 23 proteins identified in PSG extracts, most of them were toxins and toxic enzymes such as cephalotoxins, cystein-rich secreted protein, peptidases S1, or phospholipases A2. Only 5 proteins were involved in metabolic processes, that is, G3PD, chitinase, cytochrome *c* subunits (I and III), and ATP synthase beta subunit, whereas 19 out of 24 proteins identified in the WB were found to be involved in metabolic processes. Comparatively, the fast MALDI-MS analysis allowed us to see that the WB seems to possess a different metabolism than PSG in cuttlefish.

The ESI-MS analysis of the WB proteome evidenced that 5 of the 10 most abundant proteins were involved in cellular processes, such as energy, calcium or amino acid metabolism. Table 2 represents the distribution of the KEGG annotations of the proteins identified by the ESI-MS analysis of WB extracts in relevant categories, representing 40% of all KEGG annotations obtained for the WB proteome.

Most of these proteins are involved in cellular processes such as metabolic pathways (241 matches), transcription (RNA transport with 52 matches, basal transcription factors with 6 matches), and translation (ribosome with 74 matches, protein processing in the endoplasmic reticulum with 38 matches). Moreover, MAPK signaling, cell cycle, and PI3K-AKT pathway members were identified by transcriptomic and proteomic analysis (Figures S1−S3). In mammals, the MAPK and PI3K-AKT pathways are involved in cell proliferation and the cell cycle.[67−69] These two pathways may, therefore, play a role in the regulation of cell proliferation in the cuttlefish WB. Finally, DNA replication licensing factors mcm 2, 3, 4, 5, 6, and 7 were identified in the WB proteome as they were in *P. leniusculus* haematopoietic lineages,[70] confirming the high proliferative rate of WB cells.

WB is Involved in Haematopoiesis

A comparative study of the WB and Hct proteomes (Figure 2) recovered 1870 proteins in common. Proteins involved in the calcium metabolism or the regulation of Ca^{2+}-dependent signaling pathways, such as calreticulin, annexin A7, or calmodulin, were identified in the cuttlefish WB and Hct proteomes as well as in the Hct proteomes of other protostomes.[71−76] Two other proteins 14-3-3 proteins zeta and epsilon, previously identified in the Hct proteomes of *Pomacea canaliculata*,[71] *Armadilidium vulgare*,[73] and *Penaeus monodon*,[77] were identified in the WB and Hct proteomes of the cuttlefish. Moreover, 90% of the Hct proteome was identified in the WB proteome (Figure 2), confirming the morphological observations of Claes[37] regarding the presence of Hct or Hct-like cells in the WB.

The transcriptomic analysis revealed the presence of eighteen haematopoiesis-related transcripts; they are reported

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

Table 2. Distribution of Functional Annotations Into Relevant Pathways of the Proteins Identified by NanoLC ESI-MS in WB Extracts, Hct Extracts, or Both, Using the KEGG Orthology (KO) Database

	ID pathways	pathway description	WB extract	Hct extract	common
cellular processes	ko01100	metabolic pathways	241	117	116
	ko03010	ribosome	74	27	27
	ko03013	RNA transport	52	15	15
	ko04141	protein processing in endoplasmic reticulum	38	22	22
	ko03022	basal transcription factors	6	0	0
cell proliferation	ko04151	PI3K-AKT signaling pathway	30	17	17
	ko04010	MAPK signaling pathway	35	18	18
	ko04110	cell cycle	21	8	8
haematopoiesis	ko04630	JAK-STAT signaling pathway	5	2	2
immunity	ko04620	Toll-like receptor signaling pathway	15	4	4
	ko04064	NF-κB signaling pathway	7	3	2

Table 3. Haematopoiesis-Related Transcripts Identified in *S. officinalis* WB Extracts[a]

transcript	TR length (bp)	PR length (aa)	name	putative function	TPM
DN18877_c5_g6_i1	1638	432	receptor tyrosine-protein kinase erbB-4 (erB4)	positive regulation of receptor signaling pathway *via* JAK-STAT	0.75
DN18468_c4_g1_i1	3015	891	Janus kinase (JAK)	phosphorylates STAT	1.19
DN19189_c7_g1_i2	3248	757	signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1)	transcription activation	8.84
DN19938_c3_g1_i10	2260	696	signal transducer and activator of transcription-2 (STAT-2)	transcription activation	0.46
DN4958_c0_g1_i2	2127	489	suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)	STAT inhibition	0
DN18015_c1_g1_i1	1374	319	suppressor of cytokine signaling-2 (SOCS-2)	STAT inhibition	0.67
DN18952_c6_g1_i10	1991	554	signal transducing adapter molecule 1 (STAM-1)	IL2 signal transduction—JAK interaction	0.029
DN18544_c1_g1_i4	2041	445	STAM binding protein (AMSH)	zinc metalloprotease—STAM1 binding	2.11
DN6680_c0_g1_i1	821	140	transcriptional activator Myb (Myb) (partial)	transcription activation	0.24
DN19493_c9_g3_i1	1359	328	fibroblast growth factor receptor (FGFR) (partial)	FGFR signaling	16.13
DN41498_c0_g1_i1	793	156	myeloid leukemia factor (MLF) (partial)	enhances myeloid formation	0.48
DN18311_c4_g1_i1	2971	830	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 (CPSF-1) (partial)	mRNA polyadenylation	19.15
DN16050_c0_g1_i1	4427	1407	thioester-containing protein 1 (CD109)	endopeptidase inhibitor	5.25
DN18752_c1_g2_i1	1750	396	E3 ubiquitin-protein transferase MAEA (Emp)	erythroblast maturation	14.01
DN4830_c0_g1_i1	1111	114	macrophage migration inhibitory factor (MIF)	haemocyte activation	26.21
DN18927_c3_g1_i11	1460	429	interleukin enhancer-binding factor 2 (NF45)	regulation of transcription—proliferation	415.06
DN18551_c3_g1_i3	1097	179	myeloid-derived growth factor (MYDGF)	endothelial cell proliferation/angiogenesis	16.76
DN19181_c2_g4_i4	2228	434	GATA-binding factor 3 (GATA3)	transcription activation—differentiation	8.52×10^{-5}
DN15952_c0_g1_i1	1728	452	cytokine receptor-like factor 3 (p48)	regulation of cell cycle—differentiation	38.84

[a]TR: transcript, bp: base pair, PR: protein, aa: amino acid, TPM: transcript per million.

in Table 3. The occurrence of WB proteins encoded by seven transcripts was confirmed by the proteomic analysis (Table 4).

KEGG annotation of the WB transcriptome (Table 1) and proteome (Table 2), retrieved 17 transcripts and 5 proteins related to the JAK-STAT pathway (Figure 3).

These JAK-STAT pathway members were aligned with human (*Homo sapiens*) and mouse (*Mus musculus*) homologues. *So*-JAK possessed 27% homology with both human (O60674.2) and mouse (Q62120.2) JAK2. *So*-STAT-1 and *So*-STAT-2 possessed 39 and 27% homology with human (P51692.2) and mouse (P42232.1) STAT5B, respectively. *So*-STAT-1, the most expressed member of the canonical JAK-STAT pathway in the transcriptomic analysis, was detected in the WB protein extract, suggesting a correlation between transcription and protein abundance. *So*-SOCS-1 and *So*-SOCS-2 possessed 52 and 51% homology with human (O14512.2) and mouse (Q8VHQ2.1) SOCS7, respectively. The annotation of protein domains revealed that *So*-STAT-1, *So*-STAT-2, *So*-SOCS-1, and *So*-SOCS-2 possessed the Src homology 2 (SH2) domain, while *So*-JAK lacked this domain. *So*-JAK possessed the protein kinase domain and the catalytic domain of protein kinase (TyrKc domain) also found in mammal homologues. *So*-STAT-1 and *So*-STAT-2 possessed the STAT protein interaction domain (STAT int), the STAT DNA-binding domain (STAT bind), and the STAT alpha domain. *So*-SOCS1 and *So*-SOCS-2, like their mammal homologues, possessed the SOCS box domain.

The JAK-STAT pathway is involved in haematopoiesis in vertebrates, with four JAKs and seven STATs identified in mammals.[42,43] It is also found in one protostome, *D. melanogaster*, with one JAK, called Hopscotch (HOP),[78] and one STAT, called STAT92E.[79,80] In *D. melanogaster*, JAK is coupled with a transmembrane receptor named Domeless (DOME),[81,82] which is activated by three ligands: unpaired (UPD), UPD2, and UPD3.[83−86] In mammals, numerous cytokine receptors are involved in the activation of the JAK-STAT pathway.[45] In *S. officinalis*, no definitive receptor or ligand related to the JAK-STAT pathway has been identified.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

Table 4. Proteins Identified by NanoLC-MS/MS in *S. officinalis* WB and Hct Extracts[a]

				WB extract				Hct extract			
	protein name	transcript	mass (kDa)	score	#Pep	% cover	iBAQ	score	#Pep	% Cover	iBAQ
haematopoiesis	STAT-1	DN19189_c7_g1_i2	88	133.37	10	19.42	81.48	ND	ND	ND	ND
	STAM1	DN18952_c6_g1_i10	60	160.26	11	25.63	204.51	51.24	2	6.32	22.28
	AMSH	DN18544_c1_g1_i4	50	116.18	8	22.7	53.81	101.73	5	12.13	31.80
	CD109	DN16050_c0_g1_i1	158	429.21	296	63.8	7947.57	396.48	193	53.34	4465.78
	MYDGF	DN18551_c3_g1_i3	21	71.93	2	8.38	130.75	43.21	2	8.38	32.91
	NF45	DN18927_c3_g1_i11	47	231.89	36	51.75	2298.56	145.56	8	13.05	449.17
	p48	DN15952_c0_g1_i1	50	190.35	15	55.97	480.16	ND	ND	ND	ND
immune response	Tollip	DN18451_c8_g2_i2	25	88.07	2	13.06	206.45	NI	NI	NI	20.52
	IRAK4	DN17586_c2_g4_i1	35	106.79	5	17.19	110.49	ND	ND	ND	ND
	NF-κB p105	DN17588_c10_g1_i11	62	99.58	3	9.65	73.84	ND	ND	ND	ND
	PGRP-2	DN19986_c8_g1_i3	30	91.75	3	11.41	40.07	NI	NI	NI	17.94
	galectin-1	DN16917_c6_g1_i2	63	110.3	6	16.09	112.36	NI	NI	NI	7.13
	Mx1	DN18954_c2_g1_i6	81	186.94	27	27.77	550.57	ND	ND	ND	ND
	DMBT1 (partial)	DN19666_c3_g1_i2	NA	44.1	3	13.02	30.14	ND	ND	ND	ND
stress response	SOD Cu/Zn	DN19183_c4_g1_i1	16	181.34	13	92	3046.39	94.87	6	90.67	887.37
	SOD Mn	DN19447_c0_g1_i1	26	86.09	2	17.87	77.24	ND	ND	ND	ND
	PRX1	DN12991_c0_g1_i1	28	281.46	53	90.44	6111.43	140.54	13	58.57	426.38
	PRX4	DN11617_c0_g1_i1	29	55.88	2	10.08	12.40	ND	ND	ND	ND
	PRX5	DN16455_c1_g1_i3	21	169.02	18	59.47	149.47	162.07	18	59.47	1080.04
	PRX6	DN16601_c0_g1_i2	29	258.91	82	81.64	3792.89	224.28	60	79.69	4802.00
	GST	DN17393_c4_g1_i4	25	225.04	40	84.33	4687.56	149.18	14	52.07	770.67
	HSP70	DN19855_c3_g3_i1	96	271.28	48	61.16	767.97	144.1	9	15.11	42.98
	HSC71	DN19063_c5_g1_i1	71	319.81	102	69.34	1329.63	255.69	50	52.85	161.13
	HSP78	DN17831_c5_g2_i1	74	287.58	70	61.3	2876.24	274.07	50	55.87	1417.87
	HSP90	DN18504_c4_g1_i2	83	363.47	191	81.83	10588.07	290.16	73	64.91	1252.74

[a]Score: −log10 *P*-value, NA: nonavailable, ND: not detected, NI: not identified, #Pep: peptide number, iBAQ: intensity-based absolute quantification.

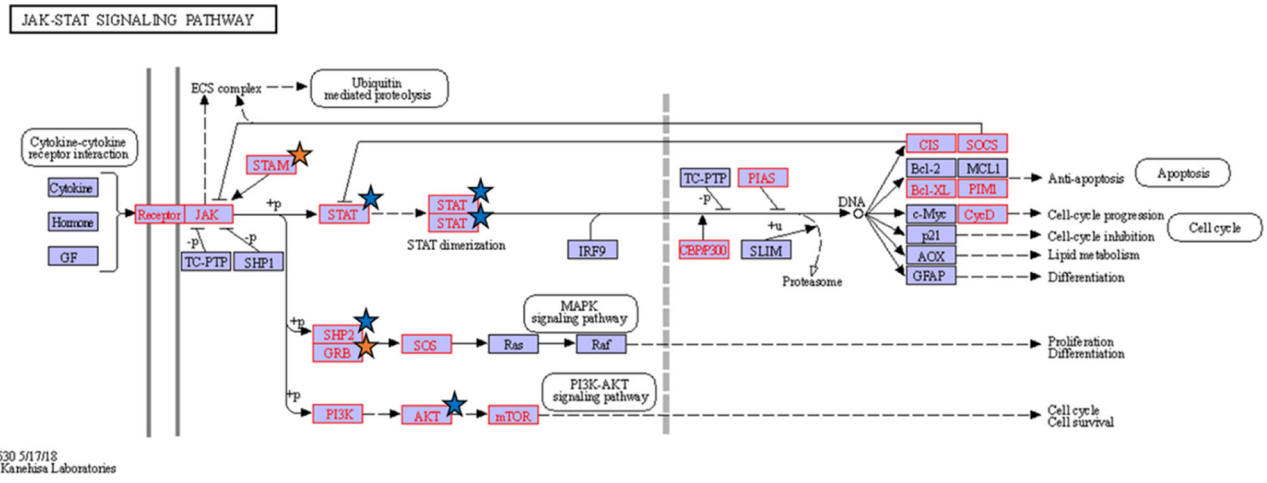


Figure 3. JAK-STAT signaling pathway. Red boxes represent proteins identified in the WB transcriptome, blue stars represent proteins identified in the WB proteome, and orange stars represent proteins identified in both the WB and Hct proteomes.

Nevertheless, a receptor tyrosine-protein kinase erbB-4 homologue involved in the regulation of JAK-STAT signaling in humans was identified in cuttlefish.[87] Considering the low level of annotation, unknown genes may also be involved in JAK-STAT activation but may have slipped through our search, proving the need for further studies. However, a Janus kinase was identified for the first time in a cephalopod species. Moreover, a STAT homologue was identified for the first time in a protein extract from a molluscan species. These results reinforce the involvement of JAK-STAT signaling in the regulation of haematopoiesis in all animal species.

Nineteen members of the Notch signaling pathway, including Notch, Fringe, Delta Deltex, as well as co-activators and co-suppressors of the pathway, were identified in the WB transcriptome by KEGG annotation. Three proteins (Notch, Deltex, and HDAC) were detected by the proteomic approach in cuttlefish WB (Figure S4). The Notch signaling pathway is involved in haematopoiesis in *Drosophila*[88] and mammals,[89,90]

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

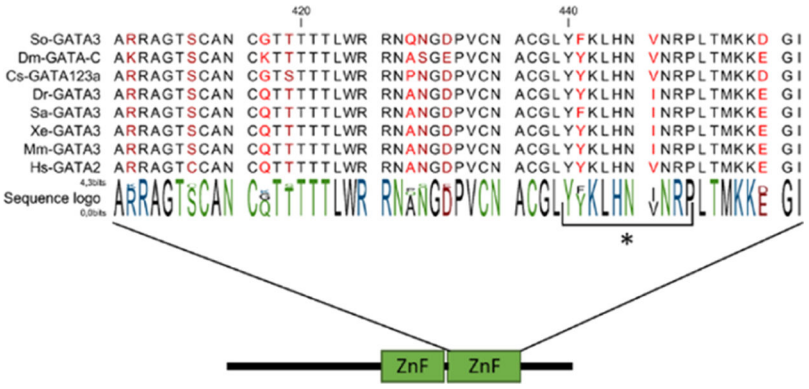


Figure 4. Sequence alignment of GATA transcription factors from various species. *So*-GATA3: GATA-binding factor 3 (*S. officinalis*), Dm-GATA-C: GATA-binding factor C, P91623.1 (*D. melanogaster*), Cs-GATA123a: GATA transcription factor 123a, ADC35037.1 (*Chaetopterus* sp.), Dr-GATA3: Transcription factor GATA-3, Q91428.1 (*Danio rerio*), Sa-GATA3: Partial transcription factor GATA-3, AMD33522.1 (*Sparus aurata*), Xe-GATA3: GATA-binding factor 3, P23773.1 (*Xenopus laevis*), Mm-GATA3: Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3, P23772.1 (*M. musculus*), Hs-GATA2: Endothelial transcription factor GATA-2, P23769.3 (*Homo sapiens*). Asterisk: DNA-binding domain. ZnF_GATA: zinc finger binding to the DNA consensus sequence.

suggesting that this pathway is involved in haematopoiesis in cuttlefish.

Other annotated transcripts corresponding to the potential markers of haematopoietic cells well described in mammals were identified in cuttlefish WB, for example, the myeloid leukaemia factor (MLF), the E3 ubiquitin-protein transferase (MAEA), the erythroblast macrophage protein (Emp), or the thioester-containing protein 1 (CD109) (Table 4). In humans, MLF is expressed in the CD34+ haematopoietic progenitor cells of the bone marrow and plays a role in the early stage of haematopoiesis,[91] it may also contribute to the maintenance of haematopoietic stem cells (HSCs).[92] Emp mediates erythroblast−macrophage interactions and the terminal maturation and enucleation of erythroid cells *in vitro*,[93] and its expression suggests a function in bone marrow haematopoiesis.[94] CD109 identified in cuttlefish, a member of the thioester-containing protein family, possesses sequence identity levels of 30.06% with human CD109 (Q6YHK3.2) and 58.87% with *Euprymna scolopes* thioester-containing protein (AFV94409.1) and differs from the α2-macroglobulin previously identified in PSG extracts.[65] In humans, CD109 is expressed by CD34+ cells[95,96] and during neutrophil and monocyte maturation,[97] making it a putative marker of HSC. A CD109 transcript is also present in *E. tasmanica* WB,[40] suggesting a putative role in Hct production in cephalopods. However, CD109 is involved in immune processes such as those described in human T-cells[98] or in *E. scolopes*.[99] The expression of *Es*-CD109 is down-regulated in the light organ of symbiotic juveniles as compared to aposymbiotic juveniles, suggesting that the cephalopod immune system is modulated in the presence of the bacterial symbionts in the light organ.[99] The identification of these homologues of haematopoiesis markers in the cuttlefish WB confirms the presence of HSC in the WB, previously morphologically described and called "haemocytoblast" by Claes.[37]

Two transcription factors, one partial sequence of the transcriptional activator Myb (Myb) and GATA-binding factor 3 (GATA3) were identified in cuttlefish. Myb is a major regulator of haematopoiesis in mice and is involved in red blood cell and T cell development.[100,101] Moreover, Myb mutation induces a decrease in the number of red blood cells, B cells, and T cells and an increase in haematopoietic cells.[102] In cuttlefish, Myb may be a regulator of Gata3, as described in mice.[103] Gata3 was found mainly expressed in the gills of *C. gigas*[34] and upregulated in gills during secondary challenge with *V. splendidus*.[33] *So*-GATA3 has the DNA-binding domain YxKxHxxxRP described by Shinnakasu and collaborators[104] (Figure 4). In cuttlefish, it may be involved in Hct production and regulated by Myb.

Two proliferation factors—interleukin enhancer-binding factor 2 (NF45) and the myeloid-derived growth factor (MYDGF)—were identified in cuttlefish. In humans, MYDGF promotes endothelial cell proliferation *in vitro*,[105] while NF45 binds to NF90 and stimulates the regulation of gene expression.[106] Disruption of both NF90 and NF45 impaired endothelial stem cell proliferation, suggesting that NF45 and NF90 are involved in the regulation of cell proliferation.[107] A mammalian negative regulator of the cell cycle cytokine receptor-like factor 3 (p48)[108] was identified in cuttlefish, where it may be involved in Hct proliferation and differentiation with MYDGF and NF45. These factors may be involved in Hct proliferation and differentiation in cuttlefish WB and in the maturation process previously proposed by Claes.[37] Moreover, a cytokine macrophage MIF was identified in cuttlefish, as described in two other molluscs.[29,30] In *B. glabrata*, knock down of the MIF gene induced a decrease in the number of Hct, suggesting that it is involved in Hct activation.[29] The cuttlefish MIF homologue may be involved in Hct production and activation.

Finally, signal-transducing adapter molecule 1 (STAM-1) and the STAM-binding protein (or AMSH) were identified in WB protein extracts (Table 4). These two proteins are involved in signal transduction mediated by IL-2,[109−111] while IL-2 is involved in HSC maintenance and normal haematopoiesis in mice.[112] Two other factors putatively involved in haematopoiesis and described in the transcriptome of the *E. tasmanica* WB were identified in *S. officinalis*, that is, partial sequences of subunit 1 of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPFS1) and of the fibroblast growth factor receptor (FGFR).[40] The disruption of the CPFS1 gene induced defective polyadenylation of snrnp70, a splicing factor required for HSC development in *D. rerio*.[113] FGFR2 is the receptor of fibroblast growth factor 2, which is involved in haematopoiesis by enhancing HSC numbers.[114] This way, these factors could be involved in HSC maintenance in *S. officinalis*.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

Table 5. Immune-Related Transcripts Identified in *S. officinalis* WB Extracts[a]

transcript	TR length (bp)	PR length (aa)	name	putative function	TPM
DN12467_c0_g1_i1	2823	833	Toll-like receptor γ (TLRγ)	toll signaling	1.54
DN18158_c7_g2_i3	1385	338	myeloid differentiation factor 88 (MyD88)	toll signaling	15.98
DN18451_c8_g2_i2	955	222	Toll-interacting protein (Tollip)	toll signaling	0
DN17586_c2_g4_i1	1111	319	interleukin-1-receptor-associated kinase-4 (IRAK-4)	NF-κB signaling	0
DN17182_c1_g3_i2	2158	649	interleukin-1-receptor-associated kinase-1 (IRAK-1)	NF-κB signaling	20.45
DN10923_c0_g2_i1	1821	498	TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3)	NF-κB signaling	0.77
DN15884_c0_g1_i1	2990	703	E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7 (TRAF7)	NF-κB signaling	2.65
DN19803_c7_g1_i3	2661	644	inhibitor of nuclear factor κ-B kinase subunit α (IKKα)	NF-κB signaling	0
DN17661_c4_g2_i1	2680	746	inhibitor of nuclear factor κ-B kinase subunit ε (IKKε)	NF-κB signaling	6.86
DN16830_c5_g1_i2	2278	337	NF-κB inhibitor α (IκBα)	NF-κB signaling	10.24
DN17588_c10_g1_i11	3391	546	nuclear factor NF-κB p105 subunit (NF-κB p105)	NF-κB signaling	0.35
DN25378_c0_g1_i1	915	187	calcineurin subunit B type 1 (CnB)	multifunctional protein	2.48
DN18721_c3_g1_i1	2066	537	bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)	bacteria binding	6.51
DN17974_c6_g1_i14	1146	271	peptidoglycan recognition protein 1 (PGRP-1)	bacteria recognition	15.11
DN19986_c8_g1_i3	1209	263	peptidoglycan recognition protein 2 (PGRP-2)	bacteria recognition	3512.24
DN16917_c6_g1_i2	2631	547	galectin-1	glucan recognition	52.79
DN18092_c4_g1_i1	1280	310	galectin-2	glucan recognition	1.24
DN18954_c2_g1_i6	2561	695	interferon-induced GTP-binding protein Mx1 (Mx1)	antiviral activity	4.53
DN19666_c3_g1_i2	2145	624	deleted in malignant brain tumor 1 (partial) (DMBT1)	bacteria binding	9.29
DN3551_c0_g1_i1	1716	408	laccase domain-containing protein	oxidation	0.69
DN19183_c4_g1_i1	407	153	superoxide dismutase Cu/Zn (SOD Cu/Zn)	oxidative stress protection	217.35
DN19447_c0_g1_i1	1076	235	superoxide dismutase Mn (SOD Mn)	oxidative stress protection	91.71
DN12991_c0_g1_i1	1292	251	peroxiredoxin 1 (PRX1)	oxidative stress protection	17.23
DN12443_c0_g1_i1	936	250	peroxiredoxin 2 (PRX2)	oxidative stress protection	16.29
DN11617_c0_g1_i1	842	245	peroxiredoxin 4 (PRX4)	oxidative stress protection	111.41
DN16455_c1_g1_i3	1044	190	peroxiredoxin 5 (PRX5)	oxidative stress protection	103.37
DN16601_c0_g1_i2	1072	256	peroxiredoxin 6 (PRX6)	oxidative stress protection	822.45
DN17393_c4_g1_i4	784	217	glutathione S-transferase (GST)	cellular detoxification	1353.19
DN19855_c3_g3_i1	3837	847	heat shock protein 70 (HSP70)	stress response	15.95
DN19063_c5_g1_i1	3248	649	heat shock cognate 71 (HSC71)	stress response	85.79
DN17831_c5_g2_i1	2822	664	heat shock protein 78 (HSP78)	stress response	12.51
DN18504_c4_g1_i2	2684	721	heat shock protein 90 (HSP90)	stress response	71.39

[a]TR: transcript, bp: base pair, PR: protein, aa: amino acid, TPM: transcript per million.

In addition to the annotation-based search on the WB transcriptome, a manual search for additional factors such as invertebrate drivers or putative previously identified drivers of haematopoiesis, such as astakines from *P. leniusculus*[26,27] or Tal-1/Scl from *C. gigas*,[36] was performed but did not yield relevant results.

Involvement of the WB in Immunity and the Stress Response

In addition to haematopoiesis-related transcripts, several immune-related transcripts were identified in cuttlefish WB (Table 5), as previously reported in other cephalopods.[40,41] KEGG annotation of the WB transcriptome and proteome revealed the presence of 30 and 15 factors involved in the Toll-like receptor signaling pathway, respectively (Figure 5), and 34 and 7 factors involved in the NF-κB signaling pathway (Figure S5).

Among the members of the Toll/NF-κB pathway, we identified the following factors: one Toll-like receptor (*So*-TLR γ), Toll-interacting protein (Tollip), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), interleukin-1-receptor-associated kinases (IRAK-1 and -4), TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3), and the E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7 (TRAF7). Two subunits of the inhibitor of the nuclear factor κ-B kinase (IKKα and IKKε), the NF-κB inhibitor α (IκBα), and the nuclear factor NF-κB p100 subunit were also identified.

Members of the Toll/NF-κB pathway are present in bilaterian species,[115−117] including molluscs.[40,118−122] Five TLRs, as well as MyD88, IRAK4, TRAF 6, TRAF 4, IκB kinase ε, IκB kinase γ, inhibitor of NF-κB, and REL/NF-κB can be found in the cuttlefish accessory nidamental gland (ANG).[120] By contrast, only one TLR was identified in the WB. *So*-TLR γ, previously identified in ANG,[120] contains one signal peptide, eleven LRRs (leucine rich repeats), one transmembrane domain, and the TIR (Toll interleukin-1 resistance) domain. *So*-TLRγ possesses 31% identity with TLR4 of the oyster *Pinctada imbricata*, whose expression was significantly upregulated 6 h after LPS injection.[123] *So*-MyD88 (myeloid differentiation factor 88), previously identified in ANG,[120] possesses both death and TIR domains and displays 97% sequence identity with *Sepiella japonica* MyD88, another cephalopod MyD88 significantly upregulated in the liver 24 h after LPS injection.[124] *So*-Tollip was identified in the WB proteome (Table 4); it possesses 68% sequence identity with *Mizuhopecten yessoensis* Tollip, which was upregulated after bacterial challenge.[125] *So*-Tollip may be involved in TLR4 signaling in cuttlefish, as described in human cells.[126] Finally, the NF-κB p105 subunit was identified in both the WB transcriptome and proteome; it possesses the Rel homology domain (RHD), involved in DNA binding. The *So*-NF-κB p105 subunit possesses 48% homology with the human NF-κB p105 subunit. The NF-κB p105 subunit is part of the Rel/NF-

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

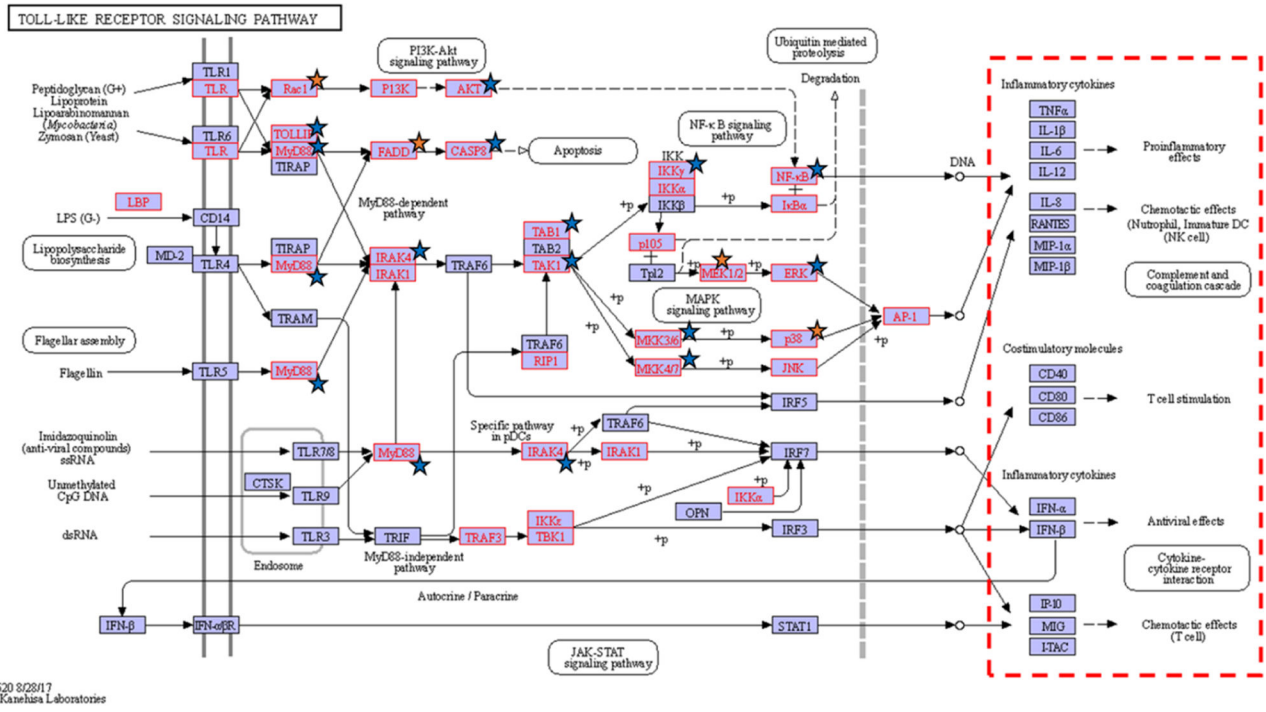


Figure 5. Toll-like receptor signaling pathway. Red boxes represent proteins identified in the WB transcriptome, blue stars represent proteins identified in the WB proteome, and orange stars represent proteins identified in both the WB and Hct proteomes.

κB transcription factor involved in the activation of immune genes in both vertebrate and invertebrate species.[127] Finally, as represented by the dotted rectangle, as shown in Figure 5, all the effectors of the TLR signaling pathway, including inflammatory cytokines and homologues of costimulatory molecules, were not found in the cuttlefish WB transcriptome. As previously discussed, these effectors may have slipped through annotation, confirming the need for further analyses.

In addition to members and regulators of the Toll/NF-κB signaling pathway, other immune factors were identified in the cuttlefish WB transcriptome (Table 5), and the occurrence of several proteins was confirmed by the proteomic approach only in the WB extract (Table 4). The absence of identification of immune response proteins in the Hct extract could be explained by their low abundance in this sample. Using the "match between run" algorithm in PeaksX to compare Hct analyses with WB analyses, we detected 3 of these immune response proteins (tollip, PGRP-2, and galectin-1) in the Hct extract. By comparing several runs, this algorithm can detect peptides with identical m/z, retention times, and ionic mobility even if MS/MS results are unexploitable because the intensity of the signal is too low. As shown in Table 4, the signal for these three proteins was much lower in the Hct extract, so that MS/MS results were unexploitable for identification. These different signals/abundances may reflect the different amounts of the biological material available in an organ or tissue for the WB versus in isolated cells for Hct, as illustrated by the SDS-PAGE gel (Figure S6).

Among proteins associated with immunity, we identified in WB transcriptome calcineurin subunit B (CnB), which possesses 4 EF-hand domains involved in Ca^{2+} binding. The Ca^{2+}-dependent CnB is involved in the innate immune response in the *Drosophila* larvae[128] or Chinese mitten crab.[129] *So*-CnB possesses 96% homology with the oyster *P. fucata* CnB, which mediates the immune response of Hcts through the activation of NF-κB.[130] Besides, *So*-CnB possesses 91% homology with human CnB, where it may act *in vivo* as an immune response regulator *via* the regulation of NF-κB.[131] Finally, calcineurin-B homologous protein (CHP), which possesses 69% homology with mouse CHP, was also identified in the WB transcriptome. In mouse cells, CHP inhibits CnB.[132] This way, *So*-CHP may mediate *So*-CnB action in the regulation of the cuttlefish immune system. We cannot rule out the role of other Ca^{2+}-binding proteins such as *So*-calreticulin or *So*-calmodulin in the immune response either, as described for calreticulin identified in the sea urchin (*Heliocidaris erythogramma*)[133] or for calmodulin in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).[134]

The interferon-induced GTP-binding protein Mx1 was identified in both the WB transcriptome and proteome. Mx proteins are known to be involved in the response to a broad range of viruses.[135] Four transcripts involved in the bacterial response were identified including two PGRPs, one bactericidal/permeability increasing protein (BPI) and a partial sequence of the deleted in malignant brain tumor protein (DMBT1). PGRP2 and DMBT were identified in WB protein extracts, and PGRP2 was one of the 20 most expressed proteins in the WB transcriptome. PGRP and BPI are known to possess antibacterial activity against *Escherichia coli* in two species of bivalves.[136,137] Moreover, in *Drosophila*, PGRPs are involved in the activation of the Toll signaling pathway.[138] Both WB PGRPs possess the conserved peptidoglycan-binding type-2 amidase domain involved in the bacterial peptidoglycan hydrolysis.[139] DBMT1 is a secreted scavenger receptor cysteine-rich protein, which binds bacteria in humans,[140,141] and is involved in the coelomocyte response to the *E. coli* challenge in the blue bat star (*Patiria pectinifera*).[142] As for haematopoietic factors, a manual search of the WB transcriptome was performed to complete the annotation-based search and look for additional immune factors, especially

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

antimicrobial peptides (AMPs). Only two AMPs were identified in a cephalopod during a thorough *in silico* search on transcriptomic data of cuttlefish PSG, reproductive organs, and CNS, revealing the complexity of the manual search and identification of factors from unannotated transcripts.[143] No AMP was identified during our manual search, but two galectins were identified (Table 5), and galectin-1 was identified in the WB proteome (Table 4). Galectin-1 possesses 44% identity with a galectin identified in *Haliotis rufescens* gills, Hcts, and mantle, which is overexpressed in Hcts after challenge with *Vibrio anguillarum*.[144] All these factors may be involved in bacterial recognition by and elimination from the cuttlefish WB.

Among the factors involved in the immune system response, we also detected four heat shock proteins (HSPs) (HSP 70, 71, 78, and 90) (Table 4) in the cuttlefish WB and Hct proteome. Only two were identified in the *E. scolopes* Hct proteome (HSP22 and HSP70)[75] or the *P. canaliculata* Hct proteome (HSP70 and HSP90).[71] Many proteins involved in the oxidative stress response were also found. The occurrence of most of these proteins was confirmed in WB and Hct extracts (Figure 1 and Table 4), such as peroxiredoxin-1 (Prx1) or glutathione S-transferase (GST). These two proteins could act as antioxidants, as described for SmPrx1 in *Sepiella mandroni*[145] and for GST in the bivalve *Thais clavigera*.[146] The Zn/Cu superoxide dismutase (SOD), upregulated during the *Sepiella maindroni* challenge with *Vibrio harveyi*[147] and described as an Hct marker in *C. gigas*,[22,148] was also identified in cuttlefish WB. Most of the proteins involved in the oxidative stress response possessed a high iBAQ in WB extracts coinciding with their expression levels, for example, GST had a TPM value of 1353 and a WB iBAQ of 10,588, peroxiredoxin-6 had a TPM value of 822 and a WB iBAQ of 3792 or Zn/Cu SOD had a TPM value of 217 and a WB iBAQ of 3046 (Tables 4 and 5).

Interestingly, none of the putative effectors of enzyme activities observed in cuttlefish Hct by Le Pabic and collaborators[15] were identified in the WB transcriptome or the WB or Hct proteomes. However, our manual search of the WB transcriptome allowed us to identify a laccase domain-containing protein (Table 5) which possesses a copper oxidase domain (aa 175−405) involved in the oxidation of phenol and non-phenol compounds. Several immune factors involved in the bacterial and viral response, such as PGRP2, Mx1, or Tollip, were identified in the WB proteome but not in the Hct proteome (Table 4). These factors are WB-specific and argue in favor of the involvement of this organ in the immune response, as suggested by Juárez et collabators in fertilized females.[41] It would be interesting to study the WB response to a bacterial challenge to confirm this hypothesis.

CONCLUSIONS

-Omic analyses demonstrated for the first time that the cuttlefish WB is involved in haematopoiesis as well as in the immune and stress responses. For the first time, the JAK-STAT signaling pathway was clearly identified in a mollusc cephalopod by -omic approaches and identified as a potential key regulator of haematopoiesis. Our comparative analysis of the WB and Hct proteomes tended to bring molecular evidence confirming the previous morphological study by Claes[37] indicating that the WB is at the origin of Hct. Besides, the WB harbors intense metabolic activity in line with its haematopoietic function. Considering the low level of annotation, numerous factors involved in these functions may have gone unnoticed. Further analyses will be needed to confirm the involvement of the JAK-STAT pathway in haematopoiesis and the involvement of the WB in the immune response.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.0c00100.

Supporting data regarding proteins identified by SDS-PAGE separation coupled with the fast MALDI MS analysis, protein sequences of relevant factors, and sequences and corresponding BLAST hits against the NCBI nr database of Hct-specific proteins identified by nanoLC coupled with ESI-MS/MS (XLSX)

KEGG pathways with transcripts and proteins identified in the WB transcriptome and WB and Hct proteomes. MAPK signaling pathway, cell cycle, PI3K-AKT signaling pathway, Notch signaling pathway, NF-κB signaling pathway, photograph of the entire SDS-PAGE gel (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Céline Zatylny-Gaudin − *NORMANDIE UNIV, UNICAEN, CNRS, BOREA, 14000 Caen, France; Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Université de Caen-Normandie, MNHN, SU, UA, CNRS, IRD, 14032 Caen Cedex, France;* orcid.org/0000-0001-9258-9876; Email: celine.gaudin@unicaen.fr

Authors

Louis Benoist − *NORMANDIE UNIV, UNICAEN, CNRS, BOREA, 14000 Caen, France; Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Université de Caen-Normandie, MNHN, SU, UA, CNRS, IRD, 14032 Caen Cedex, France*

Erwan Corre − *Plateforme ABiMS, Station Biologique de Roscoff (CNRS-Sorbonne Université), 29688 Roscoff, France*

Benoit Bernay − *Plateforme PROTEOGEN, SF 4206 ICORE, Normandie université, 14032 Caen Cedex, France*

Joel Henry − *NORMANDIE UNIV, UNICAEN, CNRS, BOREA, 14000 Caen, France; Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Université de Caen-Normandie, MNHN, SU, UA, CNRS, IRD, 14032 Caen Cedex, France*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100

Author Contributions

The manuscript was written by L.B, with the following contributions from the other authors: All the authors have given approval to its final version. C.Z.-G. played an important role in designing and performing -omic approaches. J.H. collect cuttlefish and performed the transcriptomic approach with C.Z.-G. E.C. assembled and annotated the WB transcriptome. L.B. performed dissection with C.Z.-G. and prepared all samples for mass spectrometry. B.B. performed mass spectrometry analyses. L.B. analyzed and discussed the results with C.Z.-G, E.C., and B.B.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to the "Région NORMANDIE" for funding this work. We thank Julien Pontin for technical support during MS analysis. We thank Jean-Luc Blaie and François Mével, captains of the professional fishing boats "Père Daniel" and "Clément, Thomas, Elena" and their crews for help in providing cuttlefish. The cuttlefish were bred in the marine station of Luc-sur-Mer (CREC).

■ REFERENCES

(1) Smith, V. J. Immunology of Invertebrates: Cellular. In *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, U.K., 2016; pp 1−13.
(2) Grigorian, M.; Hartenstein, V. Hematopoiesis and Hematopoietic Organs in Arthropods. *Dev. Gene. Evol.* **2013**, *223*, 103−115.
(3) Marmaras, V. J.; Lampropoulou, M. Regulators and Signalling in Insect Haemocyte Immunity. *Cell. Signal.* **2008**, *21*, 186−195.
(4) Söderhäll, I. Crustacean Hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *58*, 129−141.
(5) Matricon-Gondran, M.; Letocart, M. Internal Defenses of the Snail Biomphalaria Glabrata. *J. Invertebr. Pathol.* **1999**, *74*, 235−247.
(6) Martin, G. G.; Oakes, C. T.; Tousignant, H. R.; Crabtree, H.; Yamakawa, R. Structure and Function of Haemocytes in Two Marine Gastropods, Megathura Crenulata and Aplysia Californica. *J. Molluscan Stud.* **2007**, *73*, 355−365.
(7) Ottaviani, E. Haemocytes of the Freshwater Snail Viviparus Ater. *J. Molluscan Stud.* **1989**, *55*, 379−382.
(8) Carballal, M. J.; López, C.; Azevedo, C.; Villalba, A. In Vitro Study of Phagocytic Ability of Mytilus Galloprovincialis Lmk. Haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **1997**, *7*, 403−416.
(9) Ford, S. E.; Ashton-Alcox, K. A.; Kanaley, S. A. Comparative Cytometric and Microscopic Analyses of Oyster Hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* **1994**, *64*, 114−122.
(10) Wootton, E. C.; Pipe, R. K. Structural and Functional Characterisation of the Blood Cells of the Bivalve Mollusc, Scrobicularia Plana. *Fish Shellfish Immunol.* **2003**, *15*, 249−262.
(11) Liu, J.; Zhao, Y. Morphological and Functional Characterization of Clam Ruditapes Philippinarum Haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *82*, 136−146.
(12) Novoa, B.; Tafalla, C.; Guerra, A.; Figueras, A. Cellular Immunological Parameters of the Octopus, Octopus Vulgaris. *J. Shellfish Res.* **2002**, *21*, 243−248.
(13) Castellanos-Martínez, S.; Prado-Alvarez, M.; Lobo-da-Cunha, A.; Azevedo, C.; Gestal, C. Morphologic, Cytometric and Functional Characterization of the Common Octopus (Octopus Vulgaris) Hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, *44*, 50−58.
(14) Rodríguez-Domínguez, H.; Soto-Búa, M.; Iglesias-Blanco, R.; Crespo-González, C.; Arias-Fernández, C.; García-Estévez, J. Preliminary Study on the Phagocytic Ability of Octopus Vulgaris Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) Haemocytes in Vitro. *Aquaculture* **2006**, *254*, 563−570.
(15) Le Pabic, C.; Safi, G.; Serpentini, A.; Lebel, J.-M.; Robin, J.-P.; Koueta, N. Prophenoloxidase System, Lysozyme and Protease Inhibitor Distribution in the Common Cuttlefish Sepia Officinalis. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *172*−*173*, 96−104.
(16) Le Pabic, C.; Goux, D.; Guillamin, M.; Safi, G.; Lebel, J.-M.; Koueta, N.; Serpentini, A. Hemocyte Morphology and Phagocytic Activity in the Common Cuttlefish (Sepia Officinalis). *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *40*, 362−373.
(17) Holz, A. The Two Origins of Hemocytes in Drosophila. *Development* **2003**, *130*, 4955−4962.
(18) Robertson, C. W. The Metamorphosis of Drosophila Melanogaster, Including an Accurately Timed Account of the Principal Morphological Changes. *J. Morphol.* **1936**, *59*, 351−399.
(19) Hillyer, J. F. Insect Immunology and Hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *58*, 102−118.
(20) Jeong, K. H.; Lie, K. J.; Heyneman, D. The Ultrastructure of the Amebocyte-Producing Organ in Biomphalaria Glabrata. *Dev. Comp. Immunol.* **1983**, *7*, 217−228.
(21) Lie, K. J.; Heyneman, D.; Yau, P. The Origin of Amoebocytes in Biomphalaria Glabrata. *J. Parasitol.* **1975**, *61*, 574−586.
(22) Jemaa, M.; Morin, N.; Cavelier, P.; Cau, J.; Strub, J. M.; Delsert, C. Adult Somatic Progenitor Cells and Hematopoiesis in Oysters. *J. Exp. Biol.* **2014**, *217*, 3067−3077.
(23) Evans, C. J.; Hartenstein, V.; Banerjee, U. Thicker Than Blood. *Dev. Cell* **2003**, *5*, 673−690.
(24) Evans, C. J.; Liu, T.; Banerjee, U. Drosophila Hematopoiesis: Markers and Methods for Molecular Genetic Analysis. *Methods* **2014**, *68*, 242−251.
(25) Crozatier, M.; Vincent, A. Drosophila: A Model for Studying Genetic and Molecular Aspects of Haematopoiesis and Associated Leukaemias. *Dis. Models Mech.* **2011**, *4*, 439−445.
(26) Lin, X.; Söderhäll, K.; Söderhäll, I. Invertebrate Hematopoiesis: An Astakine-Dependent Novel Hematopoietic Factor. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 2073−2079.
(27) Söderhäll, I.; Kim, Y.-A.; Jiravanichpaisal, P.; Lee, S.-Y.; Söderhäll, K. An Ancient Role for a Prokineticin Domain in Invertebrate Hematopoiesis. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 6153−6160.
(28) Ottaviani, E.; Franchini, A.; Franceschi, C. Presence of Several Cytokine-like Molecules in Molluscan Hemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195*, 984−988.
(29) Baeza Garcia, A.; Pierce, R. J.; Gourbal, B.; Werkmeister, E.; Colinet, D.; Reichhart, J.-M.; Dissous, C.; Coustau, C. Involvement of the Cytokine MIF in the Snail Host Immune Response to the Parasite Schistosoma Mansoni. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, No. e1001115.
(30) Wang, B.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Zou, Z.; Wang, G.; Wang, S.; Jia, X.; Lin, P. Molecular Cloning and Characterization of Macrophage Migration Inhibitory Factor from Small Abalone Haliotis Diversicolor Supertexta. *Fish Shellfish Immunol.* **2009**, *27*, 57−64.
(31) Zhu, J.; Emerson, S. G. Hematopoietic Cytokines, Transcription Factors and Lineage Commitment. *Oncogene* **2002**, *21*, 3295−3313.
(32) Katsumura, K. R.; Bresnick, E. H. The GATA Factor Revolution in Hematology. *Blood* **2017**, *129*, 2092−2102.
(33) Li, Y.; Song, X.; Wang, W.; Wang, L.; Yi, Q.; Jiang, S.; Jia, Z.; Du, X.; Qiu, L.; Song, L. The Hematopoiesis in Gill and Its Role in the Immune Response of Pacific Oyster Crassostrea Gigas against Secondary Challenge with Vibrio Splendidus. *Dev. Comp. Immunol.* **2017**, *71*, 59−69.
(34) Song, X.; Xin, X.; Dong, M.; Wang, W.; Wang, L.; Song, L. The Ancient Role for GATA2/3 Transcription Factor Homolog in the Hemocyte Production of Oyster. *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *82*, 55−65.
(35) Real, P. J.; Ligero, G.; Ayllon, V.; Ramos-Mejia, V.; Bueno, C.; Gutierrez-Aranda, I.; Navarro-Montero, O.; Lako, M.; Menendez, P. SCL/TAL1 Regulates Hematopoietic Specification from Human Embryonic Stem Cells. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1443−1453.
(36) Song, X.; Wang, H.; Chen, H.; Sun, M.; Liang, Z.; Wang, L.; Song, L. Conserved Hemopoietic Transcription Factor Cg-SCL Delineates Hematopoiesis of Pacific Oyster Crassostrea Gigas. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *51*, 180−188.
(37) Claes, M. F. Functional Morphology of the White Bodies of the Cephalopod Mollusc Sepia Officinalis. *Acta Zool.* **1996**, *77*, 173−190.
(38) Cowden, R. R.; Curtis, S. K. Observations on Living Cells Dissociated from the Leukopoietic Organ of Octopus Briareus. *Exp. Mol. Pathol.* **1973**, *19*, 178−185.
(39) Cowden, R. R. Some Cytological and Cytochemical Observations on the Leucopoietic Organs, the "White Bodies," of Octopus Vulgaris. *J. Invertebr. Pathol.* **1972**, *19*, 113−119.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

(40) Salazar, K. A.; Joffe, N. R.; Dinguirard, N.; Houde, P.; Castillo, M. G. Transcriptome Analysis of the White Body of the Squid Euprymna Tasmanica with Emphasis on Immune and Hematopoietic Gene Discovery. *PLoS One* **2015**, *10*, No. e0119949.
(41) Juárez, O. E.; López-Galindo, L.; Pérez-Carrasco, L.; Lago-Lestón, A.; Rosas, C.; Di Cosmo, A.; Galindo-Sánchez, C. E. Octopus Maya White Body Show Sex-Specific Transcriptomic Profiles during the Reproductive Phase, with High Differentiation in Signaling Pathways. *PLoS One* **2019**, *14*, No. e0216982.
(42) Ward, A. C.; Touw, I.; Yoshimura, A. The Jak-Stat Pathway in Normal and Perturbed Hematopoiesis. *Blood* **2000**, *95*, 19−29.
(43) Levy, D. E.; Darnell, J. E. Stats: Transcriptional Control and Biological Impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 651−662.
(44) Morin-Poulard, I.; Vincent, A.; Crozatier, M. The Drosophila JAK-STAT Pathway in Blood Cell Formation and Immunity. *JAK-STAT* **2013**, *2*, No. e25700.
(45) Robb, L. Cytokine Receptors and Hematopoietic Differentiation. *Oncogene* **2007**, *26*, 6715−6723.
(46) Arbouzova, N. I.; Zeidler, M. P. JAK/STAT Signalling in Drosophila: Insights into Conserved Regulatory and Cellular Functions. *Development* **2006**, *133*, 2605−2616.
(47) Zhang, S.-M.; Coultas, K. A. Identification and Characterization of Five Transcription Factors That Are Associated with Evolutionarily Conserved Immune Signaling Pathways in the Schistosome-Transmitting Snail Biomphalaria Glabrata. *Mol. Immunol.* **2011**, *48*, 1868−1881.
(48) Dai, Y.-J.; Hui, K.-M.; Zhang, Y.-H.; Liu, Y.; Wang, Y.-Q.; Zhao, L.-J.; Lin, L.; Chai, L.-Q.; Wei, S.; Lan, J.-F. Three STATs Are Involved in the Regulation of the Expression of Antimicrobial Peptides in the Triangle Sail Mussel, Hyriopsis Cumingii. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *63*, 181−188.
(49) Huang, X.-D.; Wei, G.-j.; He, M.-x. Cloning and Gene Expression of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Homologue Provide New Insights into the Immune Response and Nucleus Graft of the Pearl Oyster Pinctada Fucata. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *47*, 847−854.
(50) Bathige, S. D. N. K.; Umasuthan, N.; Park, H.-C.; Lee, J. An Invertebrate Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) Ortholog from the Disk Abalone, Haliotis Discus Discus: Genomic Structure, Early Developmental Expression, and Immune Responses to Bacterial and Viral Stresses. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *56*, 46−56.
(51) Cornet, V.; Henry, J.; Goux, D.; Duval, E.; Bernay, B.; Le Corguillé, G.; Corre, E.; Zatylny-Gaudin, C. How Egg Case Proteins Can Protect Cuttlefish Offspring? *PLoS One* **2015**, *10*, No. e0132836.
(52) Bolger, A. M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114−2120.
(53) Grabherr, M. G.; Haas, B. J.; Yassour, M.; Levin, J. Z.; Thompson, D. A.; Amit, I.; Adiconis, X.; Fan, L.; Raychowdhury, R.; Zeng, Q.; Chen, Z.; Mauceli, E.; Hacohen, N.; Gnirke, A.; Rhind, N.; di Palma, F.; Birren, B. W.; Friedman, N.; Regev, A. Trinity: Reconstructing a Full-Length Transcriptome without a Genome from RNA-Seq Data. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 644−652.
(54) Bray, N. L.; Pimentel, H.; Melsted, P.; Pachter, L. Near-Optimal Probabilistic RNA-Seq Quantification. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 888.
(55) Bryant, D. M.; Johnson, K.; DiTommaso, T.; Tickle, T.; Couger, M. B.; Payzin-Dogru, D.; Lee, T. J.; Leigh, N. D.; Kuo, T.-H.; Davis, F. G.; et al. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 762−776.
(56) Petersen, T. N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 785−786.
(57) Krogh, A.; Larsson, B.; Von Heijne, G.; Sonnhammer, E. L. L. Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 567−580.
(58) Finn, R. D.; Bateman, A.; Clements, J.; Coggill, P.; Eberhardt, R. Y.; Eddy, S. R.; Heger, A.; Hetherington, K.; Holm, L.; Mistry, J.; et al. Pfam: The Protein Families Database. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D222−D230.
(59) Zatylny-Gaudin, C.; Cornet, V.; Leduc, A.; Zanuttini, B.; Corre, E.; Le Corguillé, G.; Bernay, B.; Garderes, J.; Kraut, A.; Couté, Y.; et al. Neuropeptidome of the Cephalopod Sepia Officinalis: Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 48−67.
(60) Mitchell, A. L.; Attwood, T. K.; Babbitt, P. C.; Blum, M.; Bork, P.; Bridge, A.; Brown, S. D.; Chang, H.-Y.; El-Gebali, S.; Fraser, M. I.; et al. InterPro in 2019: Improving Coverage, Classification and Access to Protein Sequence Annotations. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D351−D360.
(61) Letunic, I.; Bork, P. 20 Years of the SMART Protein Domain Annotation Resource. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D493−D496.
(62) Moriya, Y.; Itoh, M.; Okuda, S.; Yoshizawa, A. C.; Kanehisa, M. An Automatic Genome Annotation and Pathway Reconstruction Server. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W182−W185.
(63) Kanehisa, M.; Sato, Y.; Morishima, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 726−731.
(64) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76−85.
(65) Cornet, V.; Henry, J.; Corre, E.; Le Corguille, G.; Zanuttini, B.; Zatylny-Gaudin, C. Dual Role of the Cuttlefish Salivary Proteome in Defense and Predation. *J. Proteomics* **2014**, *108*, 209−222.
(66) Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D. J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE Database and Related Tools and Resources in 2019: Improving Support for Quantification Data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442−D450.
(67) Xie, Y.; Shi, X.; Sheng, K.; Han, G.; Li, W.; Zhao, Q.; Jiang, B.; Feng, J.; Li, J.; Gu, Y. PI3K/Akt Signaling Transduction Pathway, Erythropoiesis and Glycolysis in Hypoxia (Review). *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 783−791.
(68) Sun, Y.; Liu, W.-Z.; Liu, T.; Feng, X.; Yang, N.; Zhou, H.-F. Signaling Pathway of MAPK/ERK in Cell Proliferation, Differentiation, Migration, Senescence and Apoptosis. *J. Recept. Signal Transduction* **2015**, *35*, 600−604.
(69) Yu, J. S. L.; Cui, W. Proliferation, Survival and Metabolism: The Role of PI3K/AKT/MTOR Signalling in Pluripotency and Cell Fate Determination. *Development* **2016**, *143*, 3050−3060.
(70) Söderhäll, I.; Junkunlo, K. A Comparative Global Proteomic Analysis of the Hematopoietic Lineages in the Crustacean Pacifastacus Leniusculus. *Dev. Comp. Immunol.* **2019**, *92*, 170−178.
(71) Boraldi, F.; Lofaro, F. D.; Accorsi, A.; Ross, E.; Malagoli, D.; Boraldi, F.; Lofaro, F. D. Towards the Molecular Deciphering of Pomacea Canaliculata Immunity: First Proteomic Analysis of Circulating Hemocytes. *Proteomics* **2018**, *19*, 1800314.
(72) Zhu, L.; Tang, X.; Xing, J.; Sheng, X.; Zhan, W. Differential Proteome of Haemocyte Subpopulations Responded to White Spot Syndrome Virus Infection in Chinese Shrimp Fenneropenaeus Chinensis. *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *84*, 82−93.
(73) Herbinière, J.; Grève, P.; Strub, J.-M.; Thiersé, D.; Raimond, M.; van Dorsselaer, A.; Martin, G.; Braquart-Varnier, C. Protein Profiling of Hemocytes from the Terrestrial Crustacean Armadillidium Vulgare. *Dev. Comp. Immunol.* **2008**, *32*, 875−882.
(74) Castellanos-Martínez, S.; Diz, A. P.; Álvarez-Chaver, P.; Gestal, C. Proteomic Characterization of the Hemolymph of Octopus Vulgaris Infected by the Protozoan Parasite Aggregata Octopiana. *J. Proteomics* **2014**, *105*, 151−163.
(75) Schleicher, T. R.; VerBerkmoes, N. C.; Shah, M.; Nyholm, S. V. Colonization State Influences the Hemocyte Proteome in a Beneficial Squid-Vibrio Symbiosis. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 2673−2686.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

(76) Huang, J.; Li, S.; Liu, Y.; Liu, C.; Xie, L.; Zhang, R. Hemocytes in the Extrapallial Space of Pinctada Fucata Are Involved in Immunity and Biomineralizatio. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4657.
(77) Somboonwiwat, K.; Chaikeeratisak, V.; Wang, H.-C.; Fang Lo, C.; Tassanakajon, A. Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in Penaeus Monodon Hemocytes after Vibrio Harveyi Infection. *Proteome Sci.* **2010**, *8*, 39.
(78) Binari, R.; Perrimon, N. Stripe-Specific Regulation of Pair-Rule Genes by Hopscotch, a Putative Jak Family Tyrosine Kinase in Drosophila. *Genes Dev.* **1994**, *8*, 300−312.
(79) Hou, X. S.; Melnick, M. B.; Perrimon, N. Marelle Acts Downstream of the Drosophila HOP/JAK Kinase and Encodes a Protein Similar to the Mammalian STATs. *Cell* **1996**, *84*, 411−419.
(80) Yan, R.; Small, S.; Desplan, C.; Dearolf, C. R.; Darnell, J. E. Identification of a Stat Gene That Functions in Drosophila Development. *Cell* **1996**, *84*, 421−430.
(81) Brown, S.; Hu, N.; Hombría, J. C.-G. Identification of the First Invertebrate Interleukin JAK/STAT Receptor, the Drosophila Gene Domeless. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1700−1705.
(82) Chen, H.-W.; Chen, X.; Oh, S. W.; Marinissen, M. J.; Silvio Gutkind, J.; Hou, S. X. Mom Identifies a Receptor for the Drosophila JAK/STAT Signal Transduction Pathway and Encodes a Protein Distantly Related to the Mammalian Cytokine Receptor Family. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 388−398.
(83) Harrison, D. A.; McCoon, P. E.; Binari, R.; Gilman, M.; Perrimon, N. Drosophila Unpaired Encodes a Secreted Protein That Activates the JAK Signaling Pathway. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3252−3263.
(84) Agaisse, H.; Petersen, U.-M.; Boutros, M.; Mathey-Prevot, B.; Perrimon, N. Signaling Role of Hemocytes in Drosophila JAK/STAT-Dependent Response to Septic Injury. *Dev. Cell* **2003**, *5*, 441−450.
(85) Gilbert, M. M.; Weaver, B. K.; Gergen, J. P.; Reich, N. C. A Novel Functional Activator of the Drosophila JAK/STAT Pathway, Unpaired2, Is Revealed by an in Vivo Reporter of Pathway Activation. *Mech. Dev.* **2005**, *122*, 939−948.
(86) Hombría, J. C.-G.; Brown, S.; Häder, S.; Zeidler, M. P. Characterisation of Upd2, a Drosophila JAK/STAT Pathway Ligand. *Dev. Biol.* **2005**, *288*, 420−433.
(87) Williams, C. C.; Allison, J. G.; Vidal, G. A.; Burow, M. E.; Beckman, B. S.; Marrero, L.; Jones, F. E. The ERBB4/HER4 Receptor Tyrosine Kinase Regulates Gene Expression by Functioning as a STAT5A Nuclear Chaperone. *J. Cell Biol.* **2004**, *167*, 469−478.
(88) Lebestky, T.; Jung, S. H.; Banerjee, U. A Serrate-Expressing Signaling Center Controls Drosophila Hematopoiesis. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 348−353.
(89) Lampreia, F. P.; Carmelo, J. G.; Anjos-Afonso, F. Notch Signaling in the Regulation of Hematopoietic Stem Cell. *Curr. Stem Cell Rep.* **2017**, *3*, 202−209.
(90) Weber, J. M.; Calvi, L. M. Notch Signaling and the Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche. *Bone* **2010**, *46*, 281−285.
(91) Matsumoto, N.; Yoneda-Kato, N.; Iguchi, T.; Kishimoto, Y.; Kyo, T.; Sawada, H.; Tatsumi, E.; Fukuhara, S. Elevated MLF1 Expression Correlates with Malignant Progression from Myelodysplastic Syndrome. *Leukemia* **2000**, *14*, 1757−1765.
(92) Yoneda-Kato, N.; Tomoda, K.; Umehara, M.; Arata, Y.; Kato, J.-Y. Myeloid Leukemia Factor 1 Regulates P53 by Suppressing COP1 via COP9 Signalosome Subunit 3. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1739−1749.
(93) Hanspal, M.; Smockova, Y.; Uong, Q. Molecular Identification and Functional Characterization of a Novel Protein That Mediates the Attachment of Erythroblasts to Macrophages. *Blood* **1998**, *92*, 2940−2950.
(94) Mao, X.; Shi, X.; Liu, F.; Li, G.; Hu, L. Evaluation of Erythroblast Macrophage Protein Related to Erythroblastic Islands in Patients with Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Eur. J. Med. Res.* **2013**, *18*, 1−9.
(95) Giesert, C.; Marxer, A.; Sutherland, D. R.; Schuh, A. C.; Kanz, L.; Bühring, H.-J. Antibody W7C5 Defines a CD109 Epitope Expressed on CD34 + and CD34 − Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cell Subsets. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2003**, *996*, 227−230.
(96) Giesert, C.; Almeida-Porada, G.; Scheffold, A.; Kanz, L.; Zanjani, E. D.; Bühring, H.-J. The Monoclonal Antibody W7C5 Defines a Novel Surface Antigen on Hematopoietic Stem Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2006**, *938*, 175−183.
(97) Hernández-Campo, P. M.; Almeida, J.; Matarraz, S.; de Santiago, M.; Sánchez, M. L.; Orfao, A. Quantitative Analysis of the Expression of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins during the Maturation of Different Hematopoietic Cell Compartments of Normal Bone Marrow. *Cytometry, Part B* **2007**, *72*, 34−42.
(98) Lin, M.; Sutherland, D. R.; Horsfall, W.; Totty, N.; Yeo, E.; Nayar, R.; Wu, X.-F.; Schuh, A. C. Cell Surface Antigen CD 109 Is a Novel Member of the A2macroglobulin/C3, C4, C5 Family of Thioester-Containing Proteins. *Blood* **2002**, *99*, 1683−1691.
(99) Yazzie, N.; Salazar, K. A.; Castillo, M. G. Identification, Molecular Characterization, and Gene Expression Analysis of a CD109 Molecule in the Hawaiian Bobtail Squid Euprymna Scolopes. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *44*, 342−355.
(100) Bender, T. P.; Kremer, C. S.; Kraus, M.; Buch, T.; Rajewsky, K. Critical Functions for C-Myb at Three Checkpoints during Thymocyte Development. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 721−729.
(101) Mucenski, M. L.; McLain, K.; Kier, A. B.; Swerdlow, S. H.; Schreiner, C. M.; Miller, T. A.; Pietryga, D. W.; Scott, W. J.; Potter, S. S. A Functional C-Myb Gene Is Required for Normal Murine Fetal Hepatic Hematopoiesis. *Cell* **1991**, *65*, 677−689.
(102) Sandberg, M. L.; Sutton, S. E.; Pletcher, M. T.; Wiltshire, T.; Tarantino, L. M.; Hogenesch, J. B.; Cooke, M. P. C-Myb and P300 Regulate Hematopoietic Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Dev. Cell* **2005**, *8*, 153−166.
(103) Maurice, D.; Hooper, J.; Lang, G.; Weston, K. C-Myb Regulates Lineage Choice in Developing Thymocytes via Its Target Gene Gata3. *EMBO J.* **2007**, *26*, 3629−3640.
(104) Shinnakasu, R.; Yamashita, M.; Shinoda, K.; Endo, Y.; Hosokawa, H.; Hasegawa, A.; Ikemizu, S.; Nakayama, T. Critical YxKxHxxxRP Motif in the C-Terminal Region of GATA3 for Its DNA Binding and Function. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 5801−5810.
(105) Korf-Klingebiel, M.; Reboll, M. R.; Klede, S.; Brod, T.; Pich, A.; Polten, F.; Napp, L. C.; Bauersachs, J.; Ganser, A.; Brinkmann, E.; et al. Myeloid-Derived Growth Factor (C19orf10) Mediates Cardiac Repair Following Myocardial Infarction. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 140−149.
(106) Reichman, T. W.; Muñiz, L. C.; Mathews, M. B. The RNA Binding Protein Nuclear Factor 90 Functions as Both a Positive and Negative Regulator of Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 343−356.
(107) Wu, T.-H.; Shi, L.; Adrian, J.; Shi, M.; Nair, R. V.; Snyder, M. P.; Kao, P. N. NF90/ILF3 Is a Transcription Factor That Promotes Proliferation over Differentiation by Hierarchical Regulation in K562 Erythroleukemia Cells. *PLoS One* **2018**, *13*, No. e0193126.
(108) Yang, F.; Xu, Y.-P.; Li, J.; Duan, S.-S.; Fu, Y.-J.; Zhang, Y.; Zhao, Y.; Qiao, W.-T.; Chen, Q.-M.; Geng, Y.-Q.; et al. Cloning and Characterization of a Novel Intracellular Protein P48.2 That Negatively Regulates Cell Cycle Progression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 2240−2250.
(109) Takeshita, T.; Arita, T.; Higuchi, M.; Asao, H.; Endo, K.; Kuroda, H.; Tanaka, N.; Murata, K.; Ishii, N.; Sugamura, K. Signal Transducing Adaptor Molecule, Is Associated with Janus Kinases and Involved in Signaling for Cell Growth and c-Myc Induction. *Immunity* **1997**, *6*, 449−457.
(110) Tanaka, N.; Kaneko, K.; Asao, H.; Kasai, H.; Endo, Y.; Fujita, T.; Takeshita, T.; Sugamura, K. Possible Involvement of a Novel STAM-Associated Molecule "AMSH" in Intracellular Signal Transduction Mediated by Cytokines. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19129−19135.
(111) Takeshita, T.; Arita, T.; Asao, H.; Tanaka, N.; Higuchi, M.; Kuroda, H.; Kaneko, K.; Munakata, H.; Endo, Y.; Fujita, T.; et al. Cloning of a Novel Signal-Transducing Adaptor Molecule Containing an SH3 Domain and ITAM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *225*, 1035−1039.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

(112) Giampaolo, S.; Wójcik, G.; Serfling, E.; Patra, A. K. Interleukin-2-Regulatory T Cell Axis Critically Regulates Maintenance of Hematopoietic Stem Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 29625−29642.
(113) Bolli, N.; Payne, E. M.; Rhodes, J.; Gjini, E.; Johnston, A. B.; Guo, F.; Lee, J.-S.; Stewart, R. A.; Kanki, J. P.; Chen, A. T.; et al. Cpsf1 Is Required for Definitive Hematopoietic Stem Cell Survival in Zebrafish. *Blood* **2011**, *117*, 3996−4007.
(114) Itkin, T.; Ludin, A.; Gradus, B.; Gur-Cohen, S.; Kalinkovich, A.; Schajnovitz, A.; Ovadya, Y.; Kollet, O.; Canaani, J.; Shezen, E.; et al. FGF-2 Expands Murine Hematopoietic Stem and Progenitor Cells via Proliferation of Stromal Cells, c-Kit Activation, and CXCL12 down-Regulation. *Blood* **2012**, *120*, 1843−1855.
(115) Aderem, A.; Ulevitch, R. J. Toll-like Receptors in the Induction of the Innate Immune Response. *Nature* **2000**, *406*, 782−787.
(116) Takeuchi, O.; Akira, S. Toll-like Receptors; Their Physiological Role and Signal Transduction System. *Int. Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 625−635.
(117) Valanne, S.; Wang, J.-H.; Rämet, M. The Drosophila Toll Signaling Pathway. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 649−656.
(118) Goodson, M. S.; Kojadinovic, M.; Troll, J. V.; Scheetz, T. E.; Casavant, T. L.; Soares, M. B.; McFall-Ngai, M. J. Identifying Components of the NF-KB Pathway in the Beneficial Euprymna Scolopes-Vibrio Fischen Light Organ Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6934−6946.
(119) Rauta, P. R.; Samanta, M.; Dash, H. R.; Nayak, B.; Das, S. Toll-like Receptors (TLRs) in Aquatic Animals: Signaling Pathways, Expressions and Immune Responses. *Immunol. Lett.* **2014**, *158*, 14−24.
(120) Cornet, V.; Henry, J.; Corre, E.; Le Corguillé, G.; Zatylny-Gaudin, C. The Toll/NF-KB Pathway in Cuttlefish Symbiotic Accessory Nidamental Gland. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *53*, 42−46.
(121) Humphries, J. E.; Deneckere, L. E. Characterization of a Toll-like Receptor (TLR) Signaling Pathway in Biomphalaria Glabrata and Its Potential Regulation by NF-KappaB. *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *86*, 118−129.
(122) Collins, A. J.; Schleicher, T. R.; Rader, B. A.; Nyholm, S. V. Understanding the Role of Host Hemocytes in a Squid/Vibrio Symbiosis Using Transcriptomics and Proteomics. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 91.
(123) Wu, Y.; Liang, H.; Wang, Z.; Lei, Q.; Xia, L. A Novel Toll-like Receptor from the Pearl Oyster Pinctada Fucata Martensii Is Induced in Response to Stress. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *214*, 19−26.
(124) Huo, L.; Bao, M.; Lv, Z.; Chi, C.; Wang, T.; Liu, H. Identification, Functional Characterization and Expression Pattern of Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) in Sepiella Japonica. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *79*, 112−119.
(125) Zhang, R.; Li, R.; Wang, J.; Wang, S.; Zhang, M.; Hu, X.; Zhang, L.; Wang, S.; Wang, R.; Bao, Z. Identification, Characterization and Expression Profiling of the Tollip Gene in Yesso Scallop (Patinopecten Yessoensis). *Genes Genet. Syst.* **2015**, *90*, 99−108.
(126) Zhang, G.; Ghosh, S. Negative Regulation of Toll-like Receptor-Mediated Signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7059−7065.
(127) Gilmore, T. D.; Wolenski, F. S. NF-KB: Where Did It Come from and Why? *Immunol. Rev.* **2012**, *246*, 14−35.
(128) Dijkers, P. F.; O'Farrell, P. H. Drosophila Calcineurin Promotes Induction of Innate Immune Responses. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 2087−2093.
(129) Li, S.; Jia, Z.; Chen, X.; Geng, X.; Sun, J. Identification and Characterization of the CDNAs Encoding the Two Subunits of Chinese Mitten Crab (Eriocheir Sinensis) Calcineurin: Their Implications in Stress and Immune Response. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *43*, 91−102.
(130) Li, C.; Liang, J.; Ma, Z.; Hu, Y.; Yan, Z.; Li, Q.; Fang, Z.; Wang, H.; Zhang, G.; Xie, L.; et al. Calcineurin Mediates the Immune Response of Hemocytes through NF-KB Signaling Pathway in Pearl Oyster (Pinctada Fucata). *Fish Shellfish Immunol.* **2010**, *28*, 253−260.
(131) Frantz, B.; Nordby, E. C.; Bren, G.; Steffan, N.; Paya, C. V.; Kincaid, R. L.; Tocci, M. J.; O'Keefe, S. J.; O'Neill, E. A. Calcineurin Acts in Synergy with PMA to Inactivate I Kappa B/MAD3, an Inhibitor of NF-Kappa B. *EMBO J.* **1994**, *13*, 861−870.
(132) Lin, X.; Sikkink, R. A.; Rusnak, F.; Barber, D. L. Inhibition of Calcineurin Phosphatase Activity by a Calcineurin B Homologous Protein. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36125−36131.
(133) Dheilly, N. M.; Haynes, P. A.; Bove, U.; Nair, S. V.; Raftos, D. A. Comparative Proteomic Analysis of a Sea Urchin (Heliocidaris Erythrogramma) Antibacterial Response Revealed the Involvement of Apextrin and Calreticulin. *J. Invertebr. Pathol.* **2011**, *106*, 223−229.
(134) Li, S.; Jia, Z.; Li, X.; Geng, X.; Sun, J. Calmodulin Is a Stress and Immune Response Gene in Chinese Mitten Crab Eriocheir Sinensis. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *40*, 120−128.
(135) Verhelst, J.; Hulpiau, P.; Saelens, X. Mx Proteins: Antiviral Gatekeepers That Restrain the Uninvited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77*, 551−566.
(136) Yang, J.; Wang, W.; Wei, X.; Qiu, L.; Wang, L.; Zhang, H.; Song, L. Peptidoglycan Recognition Protein of Chlamys Farreri (CfPGRP-S1) Mediates Immune Defenses against Bacterial Infection. *Dev. Comp. Immunol.* **2010**, *34*, 1300−1307.
(137) Gonzalez, M.; Gueguen, Y.; Destoumieux-Garzon, D.; Romestand, B.; Fievet, J.; Pugniere, M.; Roquet, F.; Escoubas, J.-M.; Vandenbulcke, F.; Levy, O.; et al. Evidence of a Bactericidal Permeability Increasing Protein in an Invertebrate, the Crassostrea Gigas Cg-BPI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 17759−17764.
(138) Michel, T.; Reichhart, J.-M.; Hoffmann, J. A.; Royet, J. Drosophila Toll Is Activated by Gram-Positive Bacteria through a Circulating Peptidoglycan Recognition Protein. *Nature* **2001**, *414*, 756−759.
(139) Dziarski, R.; Gupta, D. The Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs). *Genome Biol.* **2006**, *7*, 232.
(140) Prakobphol, A.; Xu, F.; Hoang, V. M.; Larsson, T.; Bergstrom, J.; Johansson, I.; Frängsmyr, L.; Holmskov, U.; Leffler, H.; Nilsson, C.; et al. Salivary Agglutinin, Which Binds Streptococcus Mutans and Helicobacter Pylori , Is the Lung Scavenger Receptor Cysteine-Rich Protein Gp-340. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39860−39866.
(141) Bikker, F. J.; Ligtenberg, A. J. M.; Nazmi, K.; Veerman, E. C. I.; van't Hof, W.; Bolscher, J. G. M.; Poustka, A.; Amerongen, A. V. N.; Mollenhauer, J. Identification of the Bacteria-Binding Peptide Domain on Salivary Agglutinin (Gp-340/DMBT1), a Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32109−32115.
(142) Furukawa, R.; Matsumoto, M.; Kaneko, H. Characterization of a Scavenger Receptor Cysteine-Rich-Domain-Containing Protein of the Starfish, Asterina Pectinifera: ApSRCR1 Acts as an Opsonin in the Larval and Adult Innate Immune Systems. *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, *36*, 51−61.
(143) Houyvet, B.; Zanuttini, B.; Corre, E.; Le Corguillé, G.; Henry, J.; Zatylny-Gaudin, C. Design of Antimicrobial Peptides from a Cuttlefish Database. *Amino Acids* **2018**, *50*, 1573−1582.
(144) Maldonado-Aguayo, W.; Teneb, J.; Gallardo-Escárate, C. A Galectin with Quadruple-Domain from Red Abalone Haliotis Rufescens Involved in the Immune Innate Response against to Vibrio Anguillarum. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *40*, 1−8.
(145) Song, W.; Mu, C.; Li, R.; Wang, C. Peroxiredoxin 1 from Cuttlefish (Sepiella Maindroni): Molecular Characterization of Development and Its Immune Response against Vibrio Alginolyticus. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *67*, 596−603.
(146) Rhee, J.-S.; Raisuddin, S.; Hwang, D.-S.; Horiguchi, T.; Cho, H.-S.; Lee, J.-S. A Mu-Class Glutathione S-Transferase (GSTM) from the Rock Shell Thais Clavigera. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *148*, 195−203.
(147) He, J.-y.; Chi, C.-f.; Liu, H.-h. Identification and Analysis of an Intracellular Cu/Zn Superoxide Dismutase from Sepiella Maindroni under Stress of Vibrio Harveyi and Cd2+. *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, *47*, 1−5.
(148) Gonzalez, M.; Romestand, B.; Fievet, J.; Huvet, A.; Lebart, M.-C.; Gueguen, Y.; Bachère, E. Evidence in Oyster of a Plasma

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

Extracellular Superoxide Dismutase Which Binds LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 1089−1097.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00100
J. Proteome Res. 2020, 19, 3072−3087

Supporting information

-Omic analysis of *Sepia officinalis* white body: new insights into multifunctionality and haematopoiesis regulation

Louis Benoist[1,2], Erwan Corre[3], Benoit Bernay[4], Joel Henry[1,2], Céline Zatylny-Gaudin[1,2,*]

[1]NORMANDIE UNIV, UNICAEN, CNRS, BOREA, 14000 CAEN, France

[2]Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen-Normandie, MNHN, SU, UA, CNRS, IRD, 14032 Caen Cedex, France

[3]Plateforme ABiMS, Station Biologique de Roscoff (CNRS-Sorbonne Université), 29688 Roscoff, France

[4]Plateforme PROTEOGEN, SF 4206 ICORE, Normandie Université, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France

*Corresponding author: celine.gaudin@unicaen.fr

Supporting experimental section 59

Supplementary figures:

Figure S1: MAPK signalling pathway 60

Figure S2: Cell cycle 61

Figure S3: PI3K-AKT signalling pathway 62

Figure S4: Notch signalling pathway 63

Figure S5: NF-κB signalling pathway 64

Figure S6: Entire SDS-PAGE photography 65

Supplementary table:

Table S1. Supporting data regarding proteins identified by SDS-PAGE separation coupled with fast MALDI MS analysis 66

Supporting experimental section

Detailed quality control and cDNA library preparation protocols

Total RNA was quantified using a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.), and its integrity was assessed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Libraries were generated from 250 ng of total RNA as follows: mRNA enrichment was performed using the NEBNext Poly(A) Magnetic Isolation Module (New England BioLabs). cDNA synthesis was achieved using NEBNext RNA First Strand Synthesis and NEBNext Ultra Directional RNA Second Strand Synthesis Modules (New England BioLabs). The remaining steps of library preparation were performed using NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs). Adapters and PCR primers were purchased from New England BioLabs. Libraries were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies) and the Kapa Illumina GA with Revised Primers-SYBR Fast Universal kit (Kapa Biosystems). Average size fragment was determined using a LabChip GX (PerkinElmer) instrument.

Supplementary figures

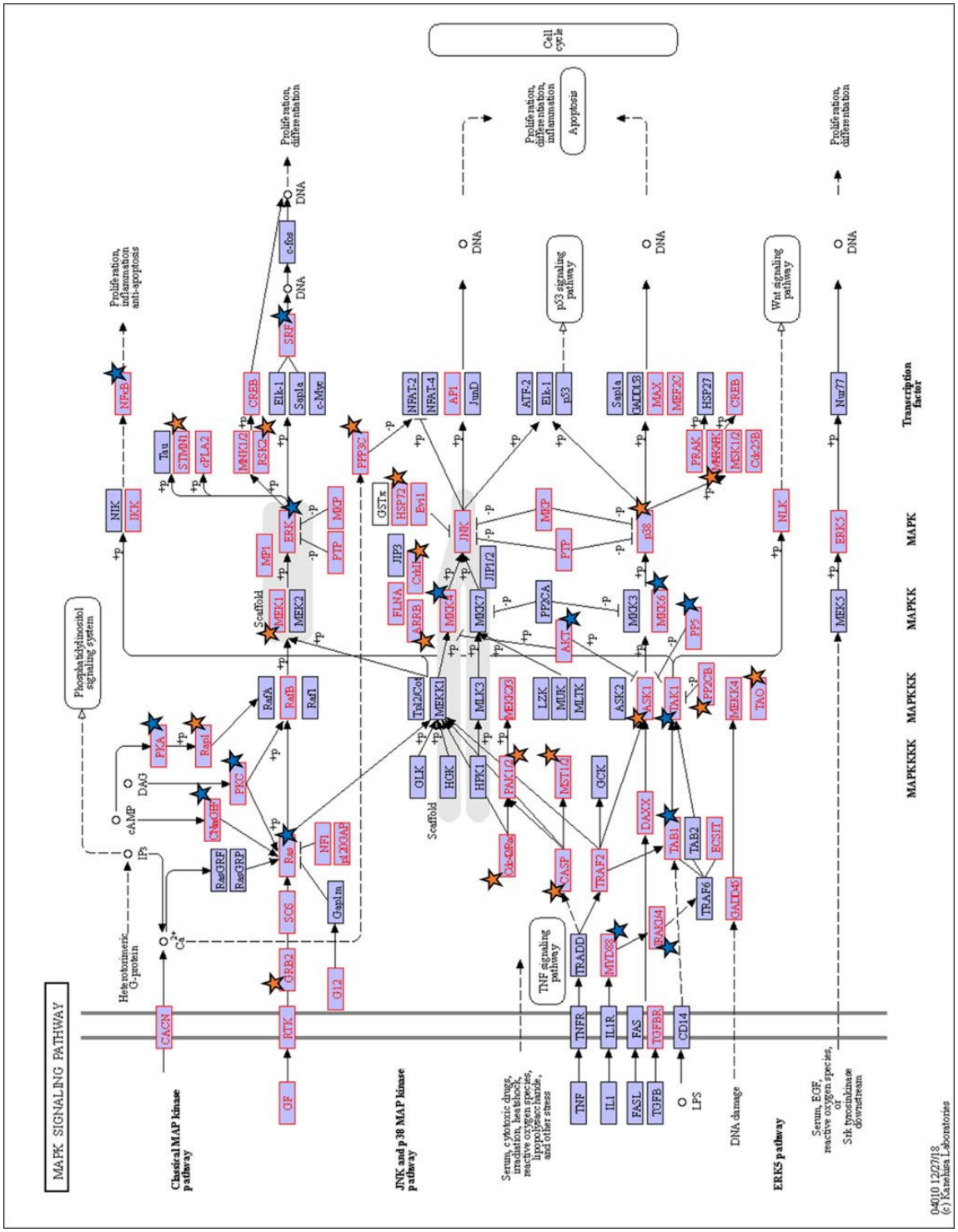


Figure S1: MAPK signalling pathway. Red boxes represent proteins identified in the WB transcriptome, blue stars represent proteins identified in the WB proteome, and orange stars represent proteins identified in both the WB and Hct proteomes.

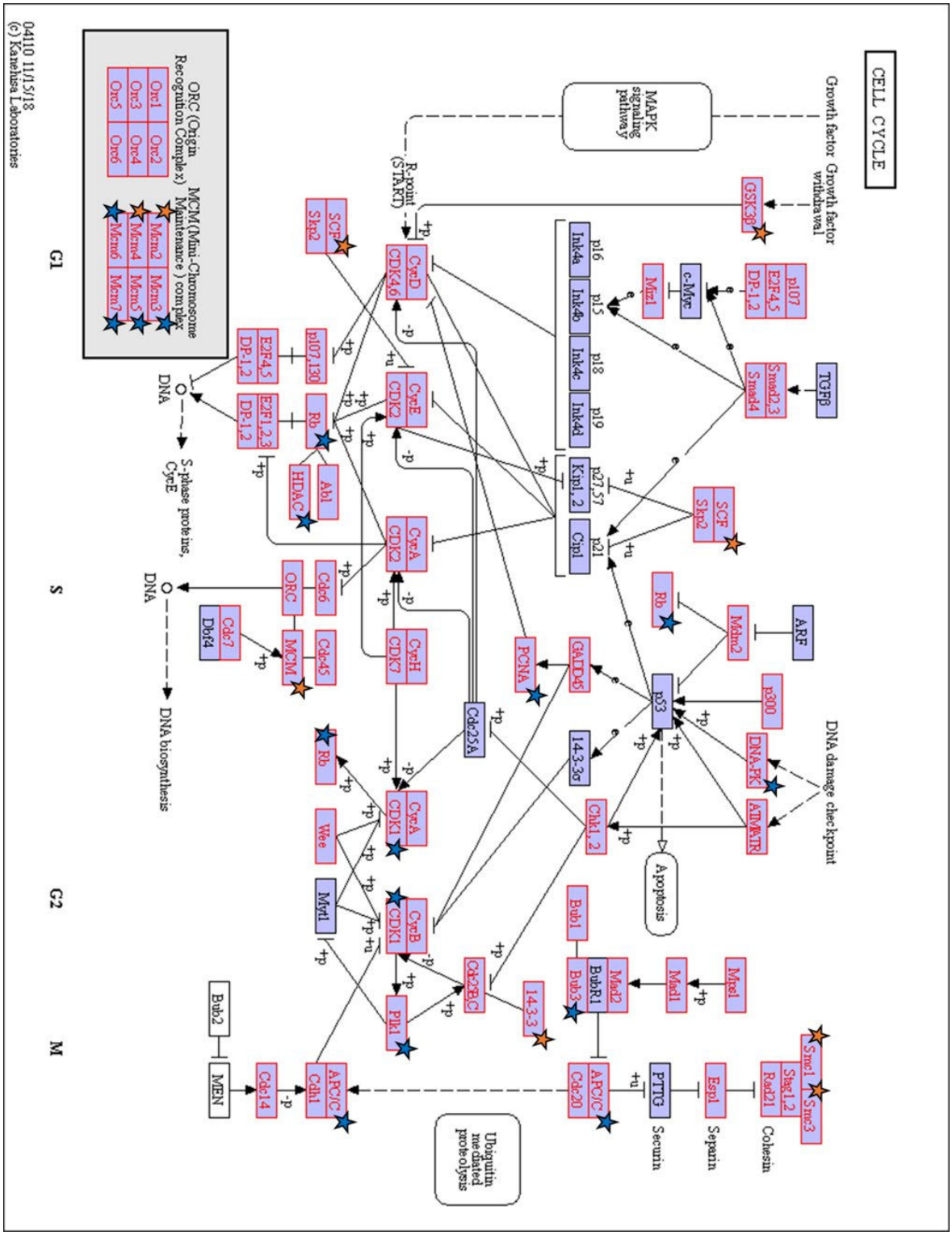


Figure S2: Cell cycle. Red boxes represent proteins identified in the WB transcriptome, blue stars represent proteins identified in the WB proteome, and orange stars represent proteins identified in both the WB and Hct proteomes.

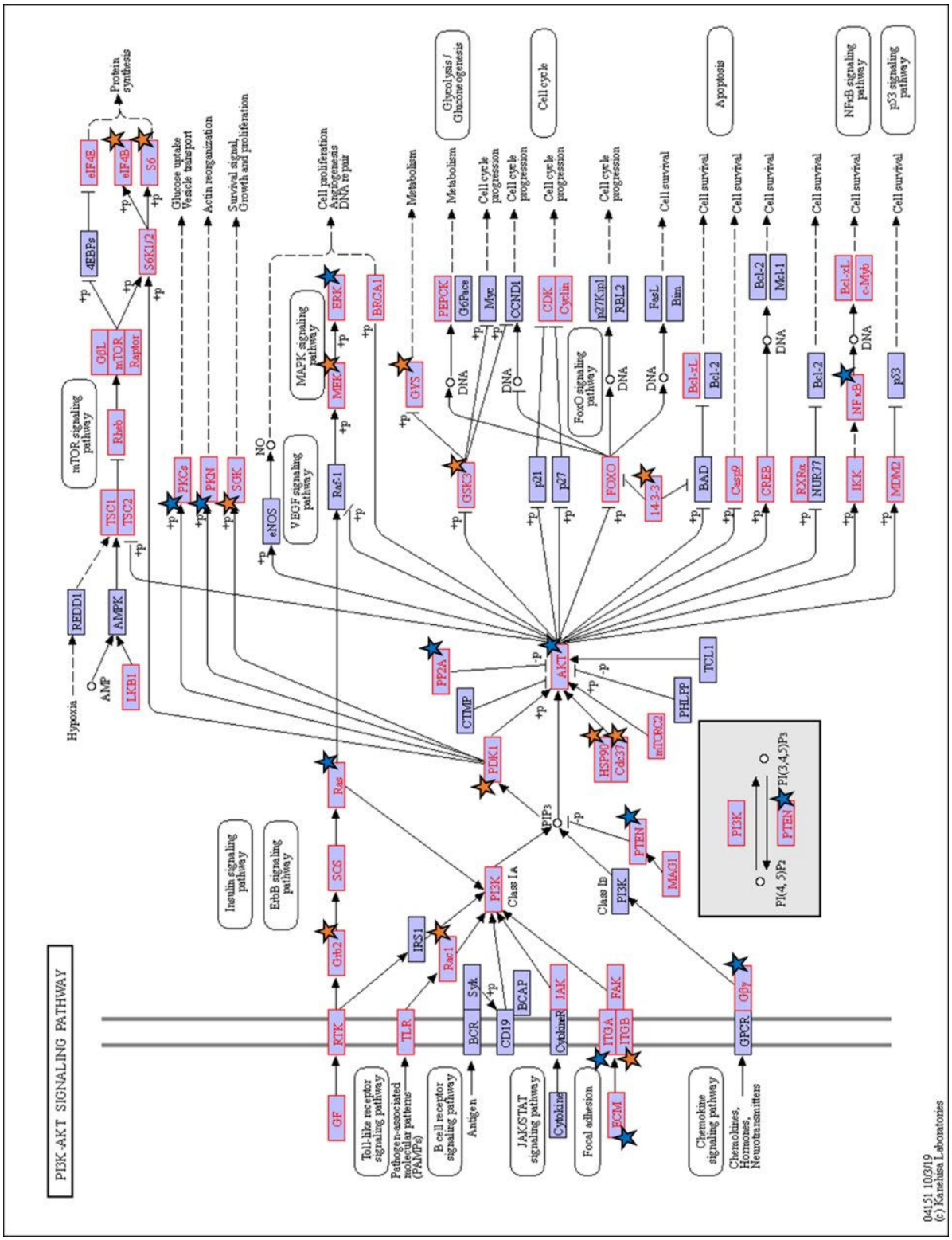


Figure S3: PI3K-AKT signalling pathway. Red boxes represent proteins identified in the WB transcriptome, blue stars represent proteins identified in the WB proteome, and orange stars represent proteins identified in both the WB and Hct proteomes.

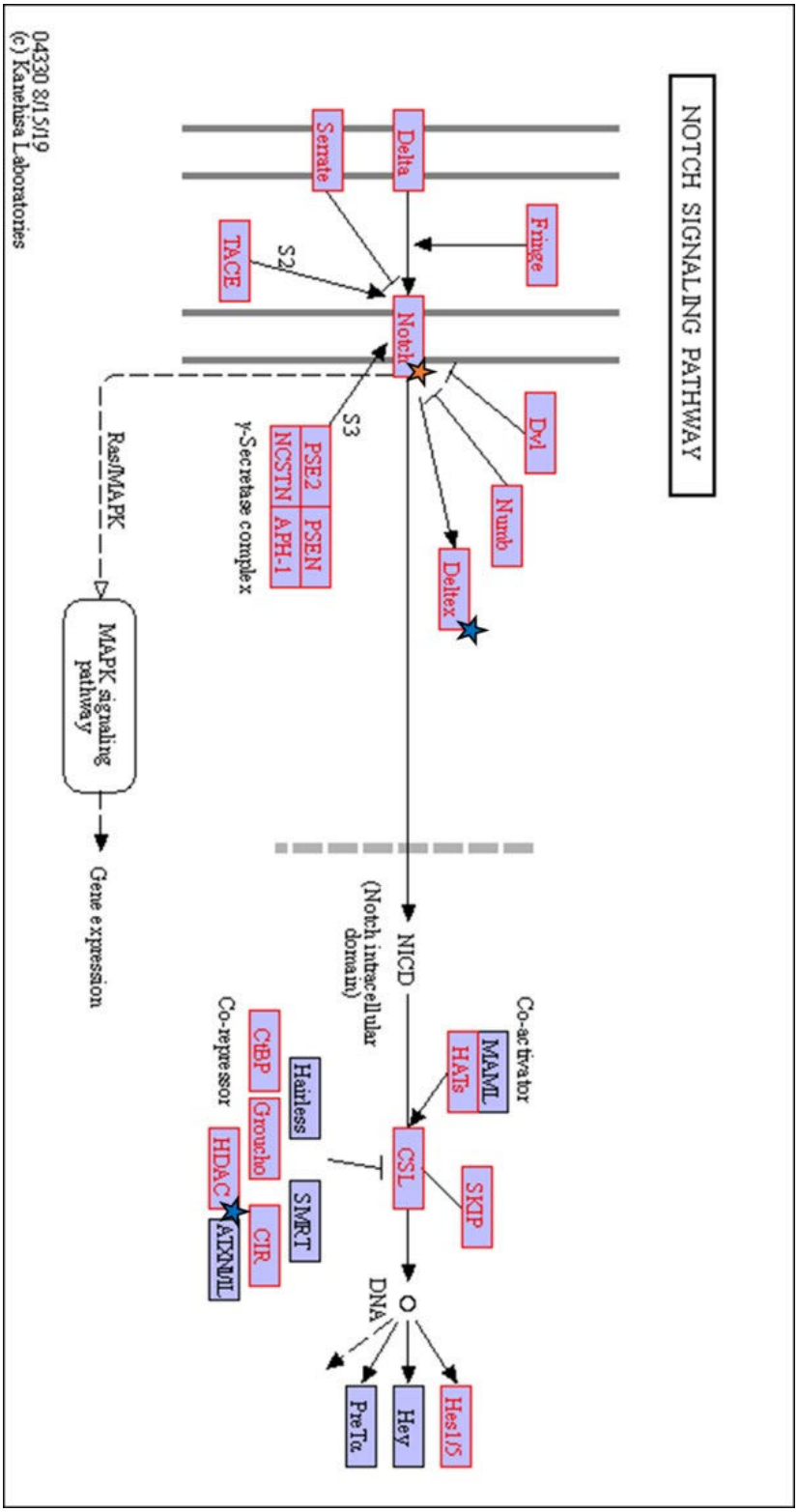


Figure S4: Notch signalling pathway. Red boxes represent proteins identified in the WB transcriptome, blue stars represent proteins identified in the WB proteome, and orange stars represent proteins identified in both the WB and Hct proteomes.

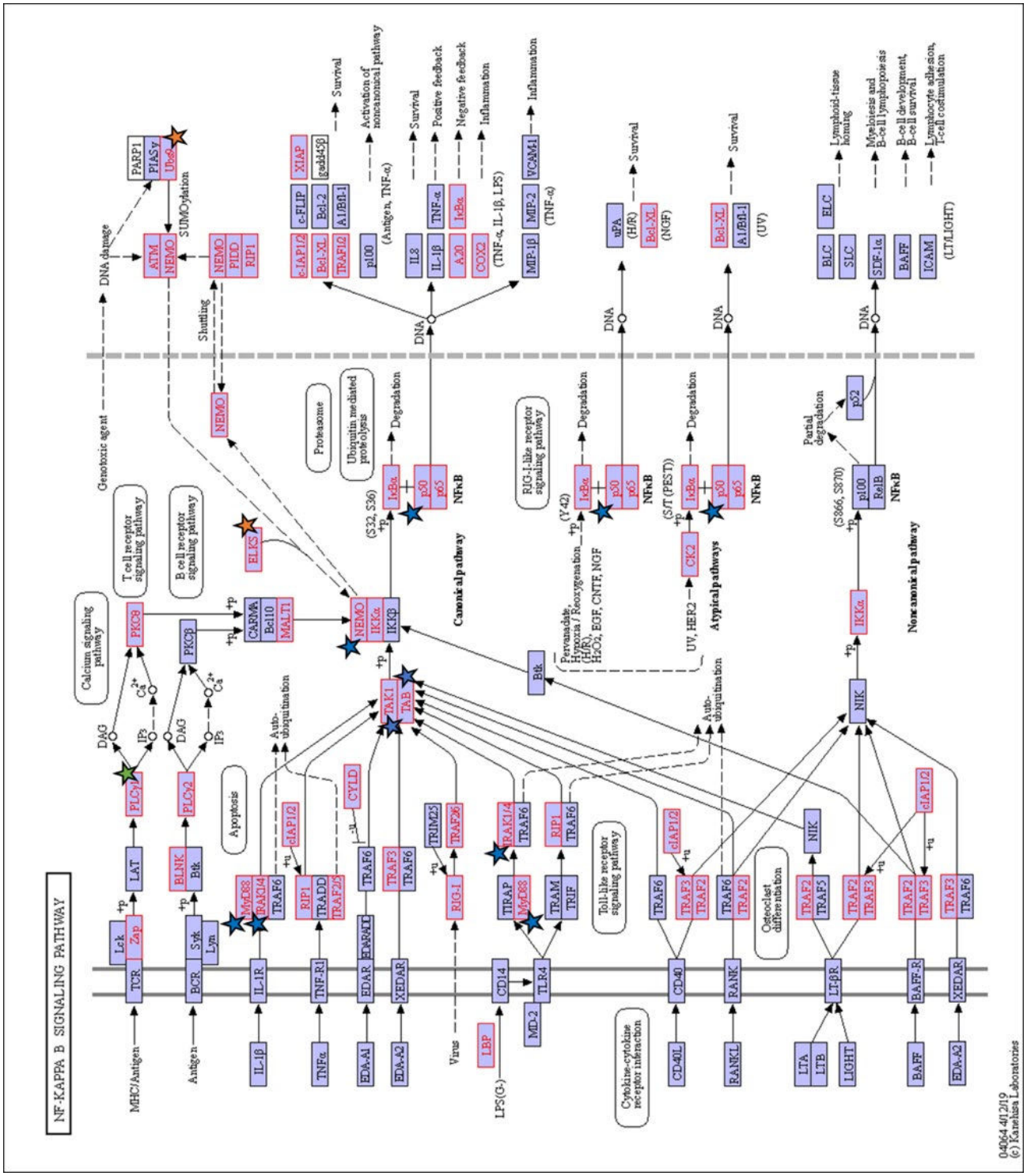


Figure S5: NF-κB signalling pathway. Red boxes represent proteins identified in the WB transcriptome, blue stars represent proteins identified in the WB proteome, green stars represent proteins identified in the Hct proteome, and orange stars represent proteins identified in both the WB and Hct proteomes.

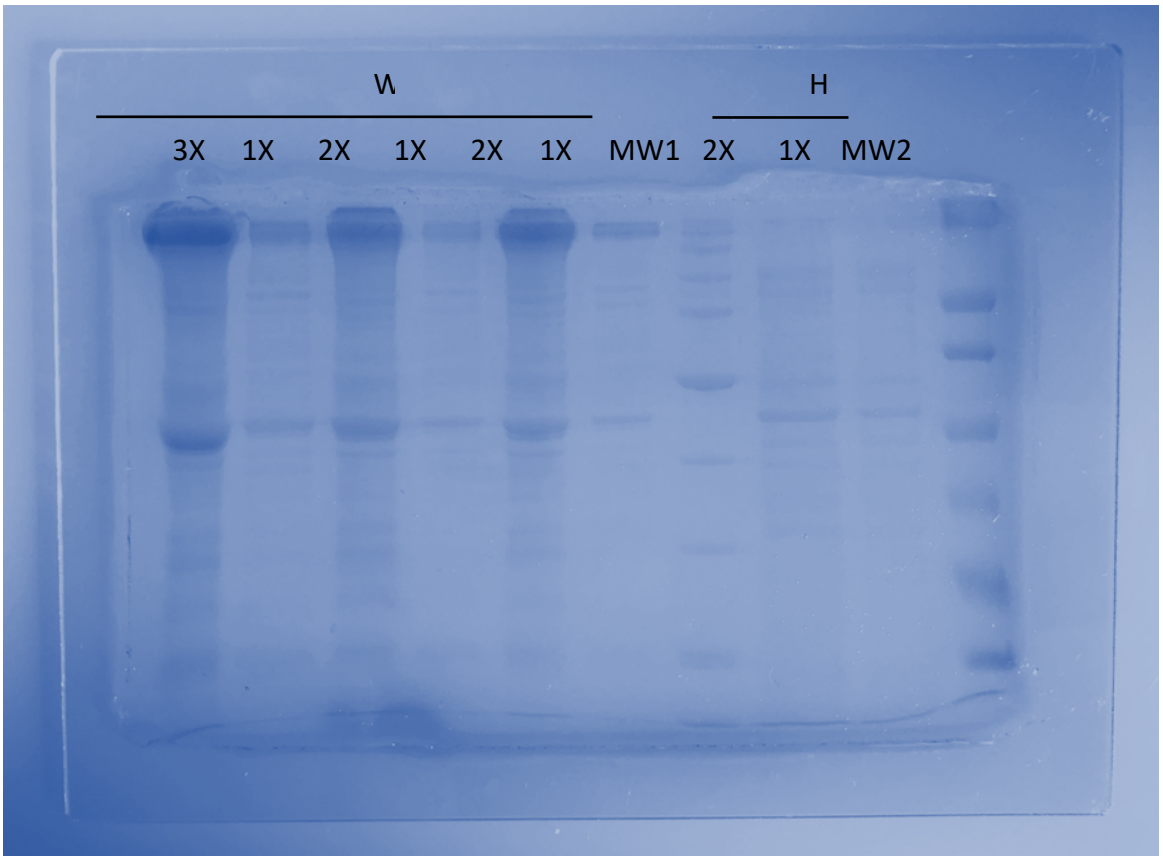


Figure S6: Photograph of the entire SDS-PAGE gel (WB: White Body protein extract; Hct: Haemocyte protein extract; 3X, 2X, 1X: relative concentrations; MW1: broad-range protein molecular weight marker, Promega V8491; MW2: ColorBurstTM electrophoresis marker, Sigma-Aldrich C1992).

Table S1. Supporting data regarding proteins identified by SDS-PAGE separation coupled with fast MALDI MS analysis.

Band#	Protein name	Transcript	Mass (kDa)	Score	#Pep	%Cover
1	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase-like	DN19744_c3_g1_i1	14	238.78	2	12.13
1	Actophorin-like	DN16851_c8_g2_i1	16	169.82	2	3.07
1	Calmodulin	DN16834_c11_g1_i1	16	113.73	1	1.26
2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A2	DN18623_c2_g1_i1	17	217.59	4	11.48
3	Nucleoside diphosphate kinase	DN19493_c8_g1_i2	16	318.69	5	22.46
4	Glutathione S-transferase	DN17393_c4_g1_i4	25	450.59	6	24.44
4	Peroxiredoxin-1	DN12991_c0_g1_i1	28	90.59	2	8.29
5	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	DN19413_c6_g1_i1	23	241.81	4	12.63
5	Proteasome subunit α type-2-like	DN13958_c0_g1_i1	26	208.73	2	7.43
5	Triosephosphate isomerase	DN17305_c1_g5_i1	23	112.6	2	6.49
6	Malate dehydrogenase	DN14514_c0_g1_i1	31	163.56	2	5.34
6	Proteasome subunit α type-1-like	DN17684_c7_g1_i2	31	93.6	2	8.63
7	Gyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	DN17483_c6_g2_i1	35	176.93	3	8.66
8	Protein disulfide isomerase	DN17306_c6_g9_i2	39	138.28	3	9.45
9	Actin II	DN17283_c8_g1_i12	41	766.29	9	22.77
10	Isocitrate dehydrogenase	DN18529_c6_g3_i1	49	58.91	2	3.75
11	Enolase	DN16491_c0_g1_i2	50	117.69	2	7.28
11	Rab GDP dissociation inhibitor beta	DN19760_c5_g1_i15	49	119.87	2	6.3
12	Radixin	DN17013_c6_g4_i5	64	413.26	7	10.61
12	Transketolase	DN17786_c5_g2_i12	68	91.01	2	3.96
13	Heat shock protein 90	DN18504_c4_g1_i2	83	122	2	3.04
14	Elongation factor 2	DN19580_c2_g1_i3	94	290.93	6	8
15	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	DN18680_c3_g1_i1	119	206.63	4	5.22
15	Thioester-containing protein 1 (CD 109)	DN16050_c0_g1_i1	158	37.65	1	0.93

Band#: band number, Score: MASCOT software score, #Pep: peptides number

3. Discussion

L'approche multi-omique menée sur le corps blanc chez *Sepia officinalis* a permis l'identification de nombreux facteurs, comme le facteur de transcription GATA ou le MIF, en lien avec l'hématopoïèse chez d'autres organismes Protostomiens ou Vertébrés. Plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'hématopoïèse chez la drosophile et les Mammifères ont été mises en évidence chez la seiche comme les voies Notch et JAK-STAT. Pour la première fois chez un Mollusque Céphalopode, la majorité des membres de la voie de signalisation JAK-STAT a été identifiée ce qui suggère fortement l'implication de cette voie dans l'évolution des hémocytoblastes chez les Protostomiens. Par ailleurs, l'analyse protéomique a révélé que le CB est un organe au métabolisme intense associé à la fonction hématopoïétique et à l'aspect dynamique évoqué par les observations de Claes (1996). Parmi les protéines bien identifiées, sont retrouvés des facteurs liés au stress oxydatif qui pourraient être associés à l'hématopoïèse. En effet, il a été démontré, notamment chez les Crustacés, que les espèces réactives de l'oxygène pouvaient jouer un rôle important dans l'hématopoïèse comme chez l'écrevisse *P. leniusculus* (Junkunlo *et al.*, 2016) ou le crabe chinois *Eriocheir sinensis* (Jia *et al.*, 2018).

L'hématopoïèse pourrait être régulée également pas des neuropeptides de par la proximité du SNC et l'importante vascularisation mise en évidence par Claes (1996). Cette hypothèse est étayée par le fait que plusieurs récepteurs couplés aux protéines G capables de se lier à des neurofacteurs ont été identifiés au sein de transcriptome de CB comme un récepteur aux NeuroPeptide F ou NeuroPepetide Y (NPF/NPY) et un récepteur à la sérotonine. Celle-ci joue chez l'écrevisse un rôle dans l'hématopoïèse et l'augmentation d'hémocytes dans l'hémolymphe (Noonin, 2018).

Outre son rôle incontestable dans l'hématopoïèse, le CB semble avoir une autre fonction : une fonction immunitaire, notamment par la présence de nombreux facteurs jouant un rôle dans la reconnaissance des pathogènes et dans la mise en place de la réponse immunitaire. Chez la drosophile adulte, il a été démontré la présence d'un « hub » hématopoïétique capable de présenter des activités de phagocytose tout en permettant la prolifération d'hémocytes lors d'une infection (Ghosh *et al.*, 2015). Chez les Céphalopodes, le CB semble jouer également un rôle dans la réponse immunitaire comme cela a été suggéré par l'étude

de Salazar et collaborateurs (2015) chez *E*. *tasmanica* et observé chez *O*. *maya* où des facteurs immunitaires sont sous-exprimés au niveau des CB de femelles fécondées et sur-exprimés au niveau des CB de mâles mâtures (Juárez *et al.*, 2019). Au vu des résultats de l'étude comparative des protéomes du CB et des hémocytes concernant les facteurs immunitaires, il serait intéressant de suivre le CB lors d'une infection de manière à comprendre son rôle dans la réponse immunitaire comme cela a été réalisé notamment chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii.* Chez cette dernière, lors d'une infection virale, l'organe hématopoïétique accroit sa production d'hémocytes et présente des cellules souches immunostimulées (Jariyapong *et al.*, 2019). Certains facteurs immunitaires n'ayant été retrouvés qu'au niveau du CB, il n'est pas exclu que, chez la seiche, l'organe hématopoïétique pourrait assurer également une fonction immunitaire au-delà de sa production d'hémocytes.

Chapitre 2. Les Hémocytes

1. Introduction

Chez les Protostomiens, les cellules circulantes sont communément appelées hémocytes. Le nombre de type cellulaire varie selon les espèces allant d'un type cellulaire chez certains Chélicérates à six types cellulaires chez certains Lépidoptères (Smith, 2016). Dans ce chapitre, l'attention sera portée sur les cellules circulantes retrouvées chez les Mollusques et leurs rôles dans l'immunité.

1.1. Les différent types d'hémocytes chez les mollusques

Les hémocytes ont fait l'objet de nombreuses études, notamment chez les Bivalves. De manière générale, chez les Mollusques, le nombre de types cellulaires varie en fonction des espèces. Deux types majeurs sont répertoriés : les hémocytes à granules ou granulocytes et les hémocytes agranulaires appelés hyalinocytes ou agranulocytes (Pila *et al.*, 2016a).

1.1.1. Chez les Bivalves

Chez les Bivalves, il existe une grande disparité dans le nombre de types hémocytaires décrits au sein d'une espèce (Figure 19). Chez les espèces appartenant à la famille des *Mytilidae*, deux à quatre types d'hémocytes différents ont été observés. Chez *Mytilus californianus*, trois types cellulaires ont été décrits après coloration de Giemsa : hyalinocytes, granulocytes basophiles et granulocytes acidophiles appelés également éosinophiles (Bayne *et al.*, 1979). Chez *Mytilus galloprovincialis*, Carballal et ses collaborateurs (1997) ont mis en évidence en Microscopie Optique (MO) après coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) une population de hyalinocytes et trois populations de granulocytes : acidophiles, basophiles et intermédiaires contenant les deux types de granules. Chez *Mytilus edulis,* trois types d'hémocytes : hyalinocytes, basophiles semi-granulaires et granulocytes acidophiles ont été différenciés après cytométrie en flux et observations en MO après coloration *Hemacolor®*, une variante de la coloration MGG (Le Foll *et al.*, 2010). Chez la moule verte asiatique *Perna viridis*, les deux types cellulaires principaux, hyalinocytes et granulocytes, ont été observés après cytométrie en flux (Wang *et al.*, 2012b). Par ailleurs, plusieurs sous-types ont pu être distingués après observations en MO (coloration MGG) et Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et Transmission (MET) dont les *hemoblast-like cells* (ou *blast-like cells*). Ces dernières joueraient le rôle de cellules souches hématopoïétiques (Wang *et al.*, 2012b). Chez les deux moules d'eau douce *Quadrula quadrula* et *Quadrula pustulosa*, Burkhard et

collaborateurs (2009) ont observé en MO (coloration de Wright–Giemsa) quatre populations d'hémocytes : des granulocytes basophiles et acidophiles et des hyalinocytes de 2 tailles différentes. Chez une autre moule d'eau douce, *Anodonta cygnea*, deux types principaux ont été décrits : granulocytes et agranulocytes. Après coloration de MGG, deux types de granulocytes, acidophiles et basophiles, sont distingués en MO tandis que les agranulocytes sont séparés en hyalinocytes et *hemoblast-like cells* (Salimi *et al.*, 2009). Chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha*, trois types d'hémocytes : *hemoblast-like cells*, hyalinocytes et granulocytes acidophiles ont été décrits en MO après coloration *Hemacolor*® et cytométrie en flux (Evariste *et al.*, 2016).

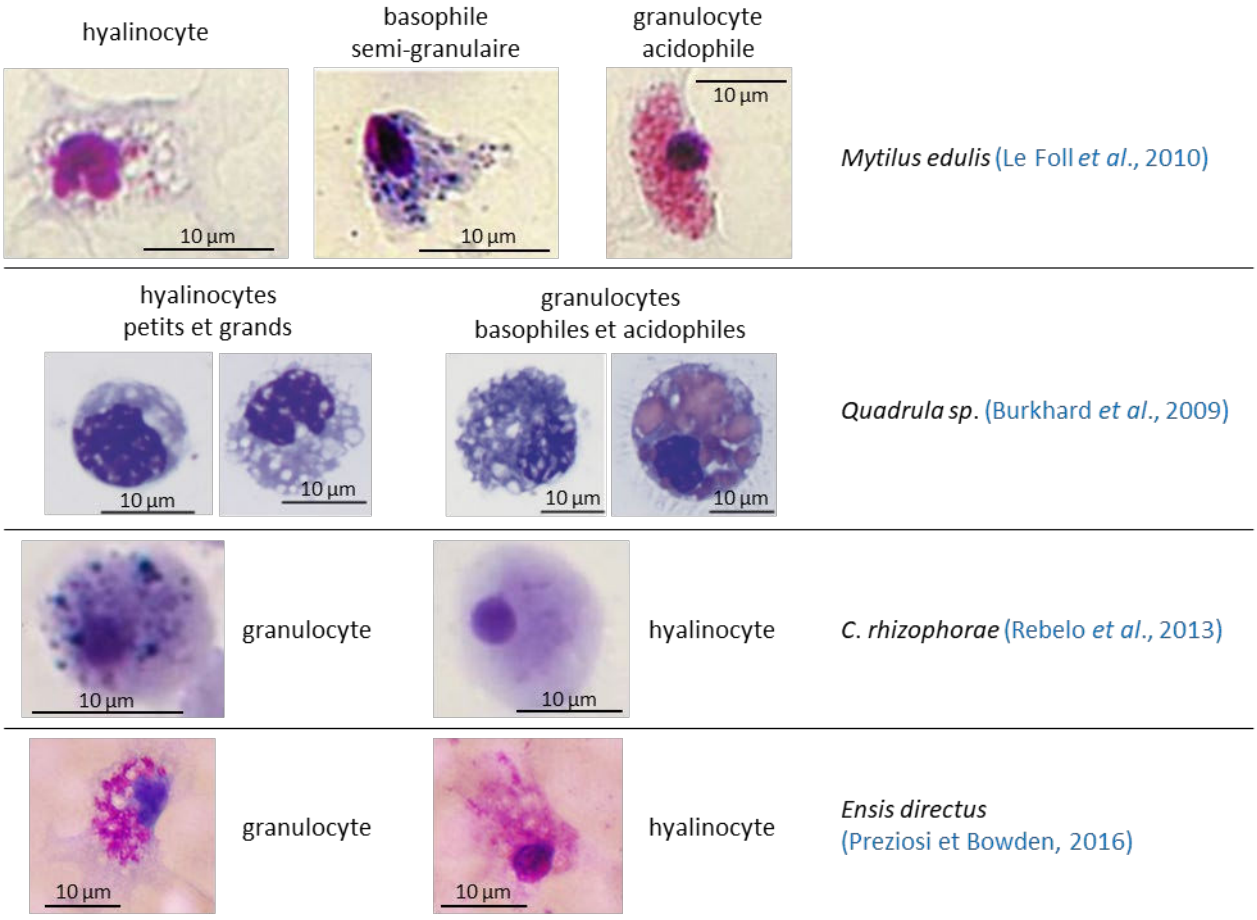


Figure 19. Observations en microscopie optique de différents types d'hémocytes décrits chez les Mollusques Bivalves.

Chez les huitres *Crassostrea gigas et Cassostrea virginica,* trois types cellulaires ont été décrits. Associés aux hyalinocytes, des granulocytes basophiles et acidophiles sont distingués chez *C. gigas* (Ruddell, 1971a, 1971b), alors qu'une différence de taille est observée entre les granulocytes chez *C. virginica*, (Ford *et al.*, 1994). Chez les huitres perlières *Pinctada fucata* (Li *et al.*, 2015) et *Pinctada imbricata* (Kuchel *et al.*, 2010), trois types d'hémocytes ont été

décrits : petits et grands hyalinocytes et granulocytes. Chez *P. imbricata* un type supplémentaire, les cellules séreuses, représentant une faible proportion de la population totale d'hémocytes et potentiellement impliquées dans le stockage ou la séquestration des déchets a été décrit (Kuchel *et al.*, 2010). Chez *Saccostrea glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007), *Crassostrea ariakensis* (Donaghy *et al.*, 2009) et *Crassostrea rhizophorae* (Rebelo *et al.*, 2013), trois types principaux ont été décrits : *hemoblast-like cells*, granulocytes et hyalinocytes. Cependant, après tri en cytométrie en flux, deux populations uniquement distinguables par leur degré de granulation ont été observées chez *Crassostrea rhizophorae* laissant penser aux auteurs que les trois types d'hémocytes décrits correspondraient à plusieurs stades, hémocytes jeunes, hémocytes anciens et hémocytes *post-reactive* avec ou sans granules (Rebelo *et al.*, 2013).

Chez le pétoncle *Nodipecten subnodosus*, aucun hémocyte observé en MET n'a eu l'aspect d'un granulocyte en revanche des hyalinocytes de petite et de grande tailles et des *blast-like cells* ont été décrits (Estrada *et al.*, 2013). Trois types, granulocytes éosinophiles, hyalinocytes et *morula-like cells*, ont été décrits chez le bénitier *Tridacna crocea* en MO après coloration de MGG et MET (Nakayama *et al.*, 1997). Chez le lavignon *Scrobicularia plana* des granulocytes éosinophiles et basophiles ainsi que des hyalinocytes basophiles ont été répertoriés (Wootton et Pipe, 2003). Chez le couteau *Ensis directus*, les hyalinocytes et les granulocytes sont classés en sous-populations en fonction de leur taille, et sont parfois associés à des *vesicular-cells*. Ces cellules nuclées se caractérisent par l'absence d'organelles et la présence de vésicules et pourraient correspondre à des granulocytes dé-granulés (Preziosi et Bowden, 2016). Chez les palourdes *Phreagena okutanii* et *Abyssogena phaseoliformis*, vivant en profondeur et connues pour posséder des cellules circulantes transportant l'oxygène grâce à l'hémoglobine (Zal *et al.*, 2000, Suzuki *et al.*, 2000, Rivera *et al.*, 2008), trois types d'hémocytes ont été mis en évidence : des érythrocytes , des granulocytes basophiles et éosinophiles (Tame *et al.*, 2018). Chez la palourde *Macrocallista nimbosa*, une seule population a été mise en évidence (Jauzein *et al.*, 2013), ce qui la différencie considérablement de la palourde *Ruditapes philippinarum*, où huit types de hyalinocytes basophiles et huit types de granulocytes acidophiles ont été observés après coloration *Hemacolor*® (Liu et Zhao, 2018).

1.1.2. Chez les Gastéropodes

Chez les Gastéropodes, quelques études sont consacrées à la description des hémocytes (Figure 20). Alors que chez *Megathura crenulata* et *Aplysia californica*, un seul type d'hémocytes a été décrit en MET et MEB (Martin *et al.*, 2007), chez d'autres Gastéropodes plusieurs populations hémocytaires sont distinguées. Mahilini et Rajendran (2008) ont étudié les hémocytes chez l'escargot terrestre *Trachea vittata* et les escargots d'eau douce *Pila globosa* et *Indoplanorbis exustus*. Après observations en MO (coloration MGG) et MEB, deux types principaux, hyalinocytes et granulocytes sont décrits, les granulocytes étant séparés en type I : petits basophiles ; type II : grands basophiles ; et type III : grands acidophiles (Mahilini et Rajendran, 2008). Chez l'escargot de mer *Turbo cornutus*, quatre types, *blast-like cells*, hyalinocytes type I et II et granulocytes ont été observés après coloration *Hemacolor*® (Donaghy *et al.*, 2010). Chez l'escargot d'eau douce *Pomacea canaliculata* deux populations sont distinguées : celle des petits hémocytes agranulaires basophiles (groupe I) et celle des grands hémocytes acidophiles (groupe II) (Accorsi *et al.*, 2013).

Chez *Haliotis discus discus*, aucun hémocyte à granules n'est observé en MO après coloration *Hemacolor*®. Les deux populations d'hémocytes présentes sont des *blast-like cells* et des hyalinocytes (Donaghy *et al.*, 2010). Chez *Haliotis tuberculata*, des hyalinocytes et quelques rares granulocytes sont décrits en MO après colorations de Giemsa, MGG et *Hemacolor*®. La cytométrie en flux a permis de différencier deux types de hyalinocytes : les *blast-like cells* de petite taille et les hyalinocytes de grande taille (Travers *et al.*, 2008).

Chez *Biomphalaria tenagophila*, des hyalinocytes et des granulocytes ont été décrits en MO après coloration de Giemsa et MEB (Barracco *et al.*, 1993). Quant aux études les plus récentes réalisées par Cavalcanti et collaborateurs (2012) chez *B. glabrata* et *Biomphalaria straminea*, elles mettent en évidence cinq populations hémocytaires : les *blast-like cells*, trois types de hyalinocytes (type I, II et III) et des granulocytes après MO (coloration de Giemsa) et observations en MET.

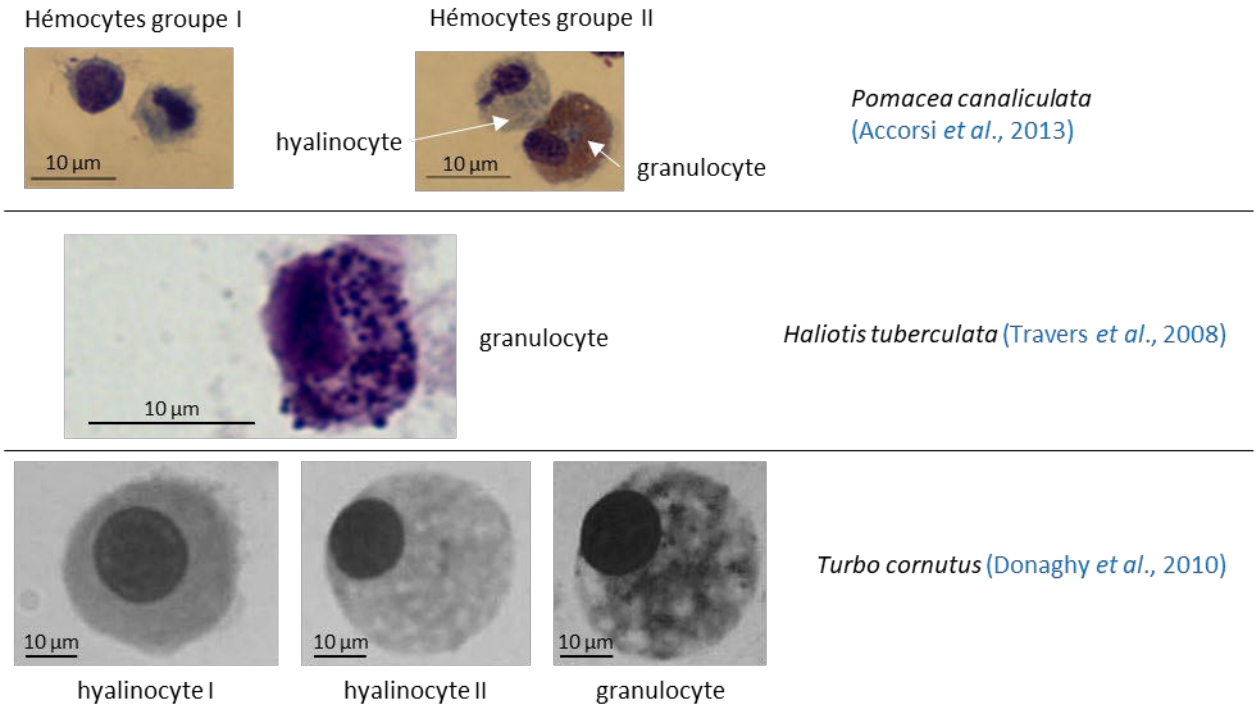


Figure 20. Observations en microscopie optique de différents types d'hémocytes décrits chez les Mollusques Gastéropodes.

1.1.3. Chez les Céphalopodes

Chez les Céphalopodes, seules quelques rares études ont été menées sur la morphologie des hémocytes (Figure 21). Chez *Eledone cirrhosa* (Malham *et al.*, 1997), *Octopus briareus* (Cowden et Curtis, 1973), *Octopus minor* et *Octopus ocellatus* (Kondo *et al.*, 2003) un seul type cellulaire à granules a été décrit à partir d'échantillons d'hémolymphe après observations en MO et ME. Chez *Sepia officinalis*, une seule population de granulocytes a également été mise en évidence après observation en MO (coloration de Wright), en MEB et MET et cytométrie en flux (Le Pabic *et al.*, 2014a). Chez *O. vulgaris*, Castellanos-Martínez et collaborateurs (2014) différencient deux types cellulaires petits et grands granulocytes en MO, ME et cytométrie en flux, tandis que Troncone et collaborateurs (2014) décrivent trois populations cellulaires distinctes :, « *hemoblast-like cells* », hyalinocytes et granulocytes en MO après coloration de MGG et cytométrie en flux.

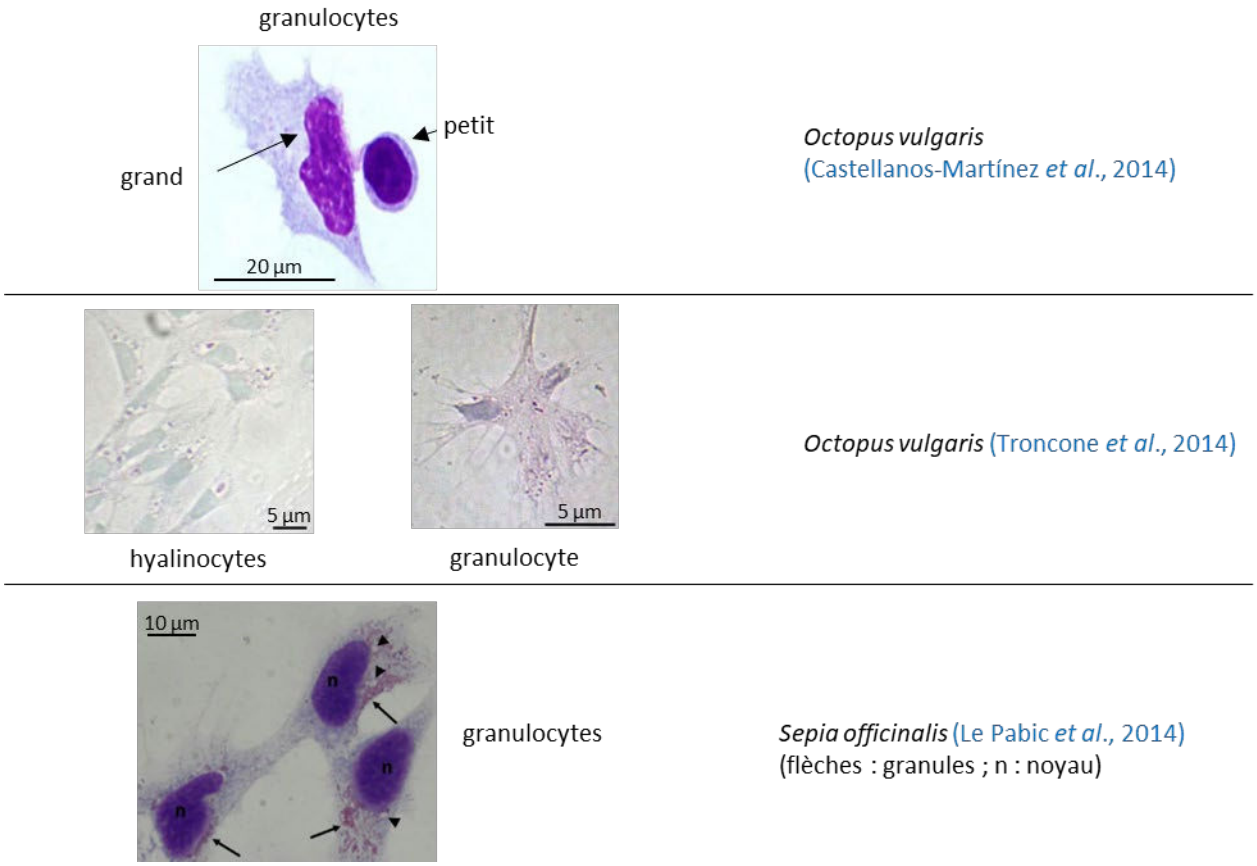


Figure 21. Observations en microscopie optique de différents types d'hémocytes décrits chez les Mollusques Céphalopodes.

1.2. Fonction immunitaire des hémocytes chez les Mollusques

Le rôle immunitaire des hémocytes chez les Mollusques est celui qui a été le plus étudié et documenté (Castillo *et al.*, 2015, Al-Khalaifah et Al-Nasser, 2019). L'immunité chez les Mollusques repose essentiellement sur des mécanismes immunitaires innés au travers des voies cellulaire et humorale. Ces mécanismes s'articulent autour de trois étapes (1) la reconnaissance du pathogène grâce à des motifs moléculaires qui lui sont propres appelés PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) ; (2) la signalisation permettant de transmettre le signal induit par les PAMP jusqu'au noyau induisant (3) la production d'effecteurs immunitaires et/ou de molécules de signalisation (Escoubas *et al.*, 2016) (Figure 22). Les facteurs produits sont ensuite libérés et interviennent dans les réponses cellulaire et/ou humorale. Certains facteurs sécrétés interviennent dans la reconnaissance des PAMP comme les lectines qui interviennent dans des phénomènes tels que l'opsonisation ou l'agglutination, facilitant les processus cellulaires comme la phagocytose ou l'encapsulation

bien décrites chez les Mollusques Bivalves et Gastéropodes (Tasumi et Vasta, 2007, Zheng *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2014a, Yang *et al.*, 2015).

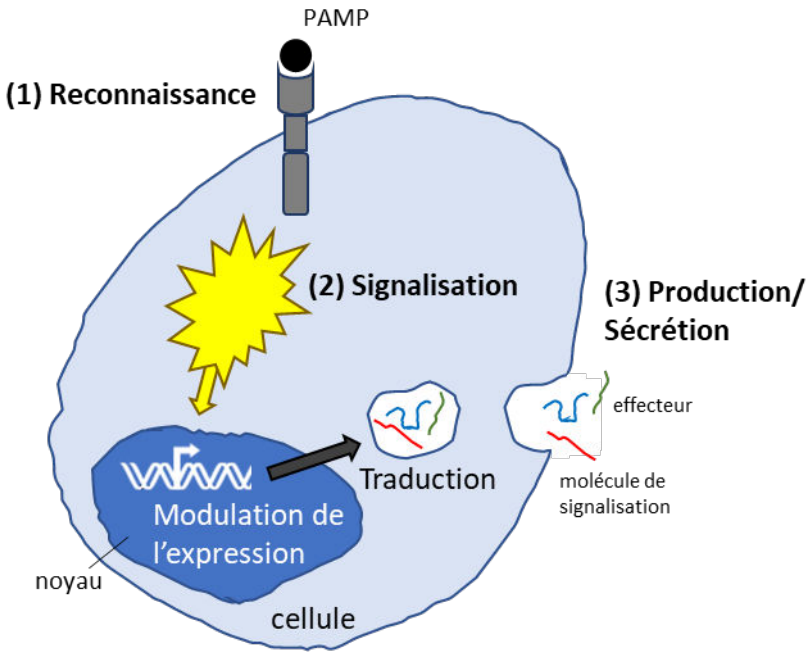


Figure 22. Représentation schématique des trois étapes de la réponse immunitaire innée.

La réponse humorale met en jeu des effecteurs ayant une action cytotoxique comme les Peptides AntiMicrobiens (PAM) (Bachère *et al.*, 2015) ou des molécules issus de cascades protéolytiques comme celle de la prophénoloxydase (Luna-Acosta *et al.*, 2017).

1.2.1. La phagocytose

La phagocytose est employée par la cellule lorsque de petits corps étrangers (inertes ou vivants) sont détectés. Elle nécessite l'émission de pseudopodes venant entourer le corps étranger. Une fois celui-ci totalement internalisé, un phagosome se forme et la digestion commence grâce à des enzymes lytiques provenant de la fusion de lysosomes ou la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) comme l'anion superoxyde (O_2^-) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou d'Espèces Réactives Nitriques (ERN) comme l'oxyde d'azote (NO) (Figure 23). Les hémocytes de Mollusques sont ainsi capables de réaliser la phagocytose de bactéries (Wootton et Pipe, 2003, Estrada *et al.*, 2013), de levures (Aladaileh *et al.*, 2007, Martin *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2018), de zymosan (Carballal *et al.*, 1997a, Novoa *et al.*, 2002,

Castellanos-Martínez *et al.*, 2014a) ou de sphères fluorescentes (Travers *et al.*, 2008, Donaghy *et al.*, 2010, Castellanos-Martínez *et al.*, 2014a, Le Pabic *et al.*, 2014a, Evariste *et al.*, 2016, Tame *et al.*, 2018). Lorsque plusieurs types cellulaires d'hémocytes, hyalinocytes et granulocytes, sont décrits au sein d'une même espèce, il apparait que les granulocytes présentent un taux de phagocytose supérieur comme cela a été observé chez *S. glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007), *C. ariakensis* (Donaghy *et al.*, 2009), *P. fucata* (Huang *et al.*, 2018) ou *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a). Chez *C. virginica* une lectine de la famille des galectines, *Cv*Gal, produite par les hémocytes et sur-exprimée après exposition au parasite *Perkinsus marinus* semble faciliter la phagocytose de ce parasite en s'y liant (Tasumi et Vasta, 2007).

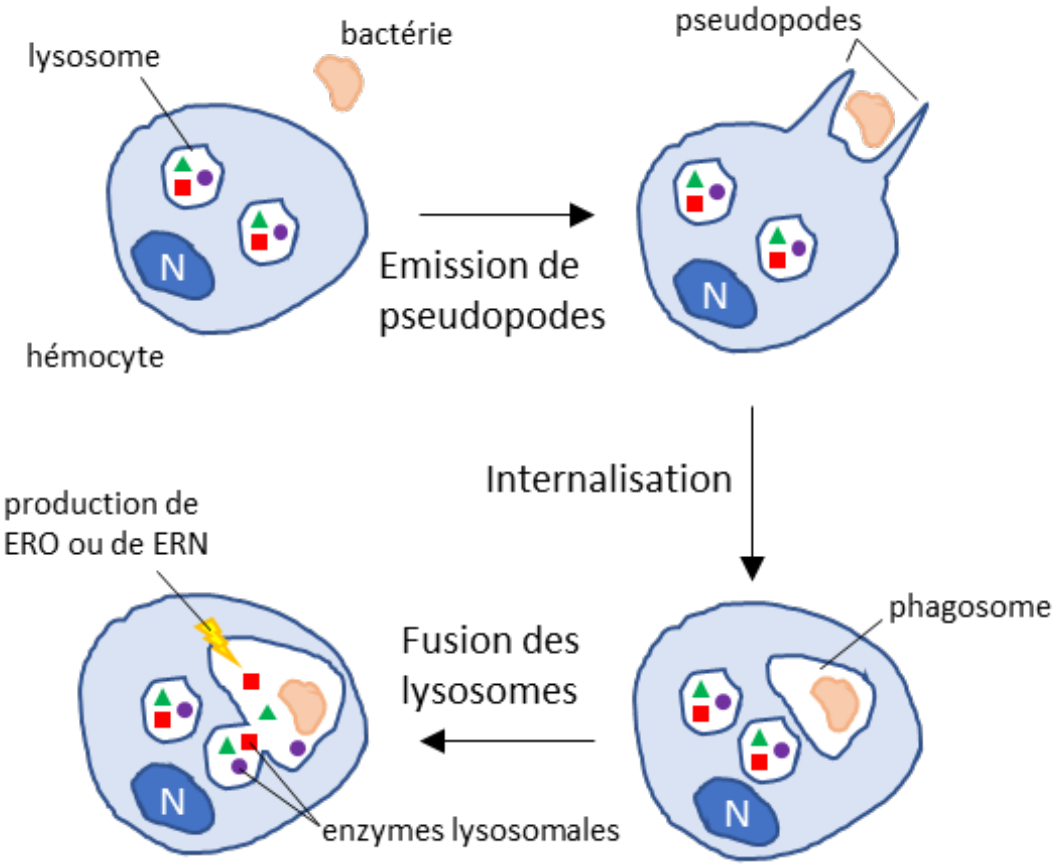


Figure 23. Représentation schématique des étapes de la phagocytose (d'après Bachère *et al.*, 2015).

Chez *Chlamys farreri*, la lectine *Cf*Lec-3, capable de se lier à différents PAMP et sur-exprimée au niveau des hémocytes après stimulations aux LipoPolySaccharides (LPS),

PeptidoGlycaNes (PGN) ou β-glucanes, améliore la phagocytose d'*E. coli* par les hémocytes (Yang *et al.*, 2015).

1.2.2. L'encapsulation

L'encapsulation est observée lorsqu'un corps étranger de taille plus importante, comme un parasite, est détecté. Elle requiert l'intervention de plusieurs hémocytes qui adhèrent au corps étranger, pouvant former plusieurs couches de cellules (Figure 24).

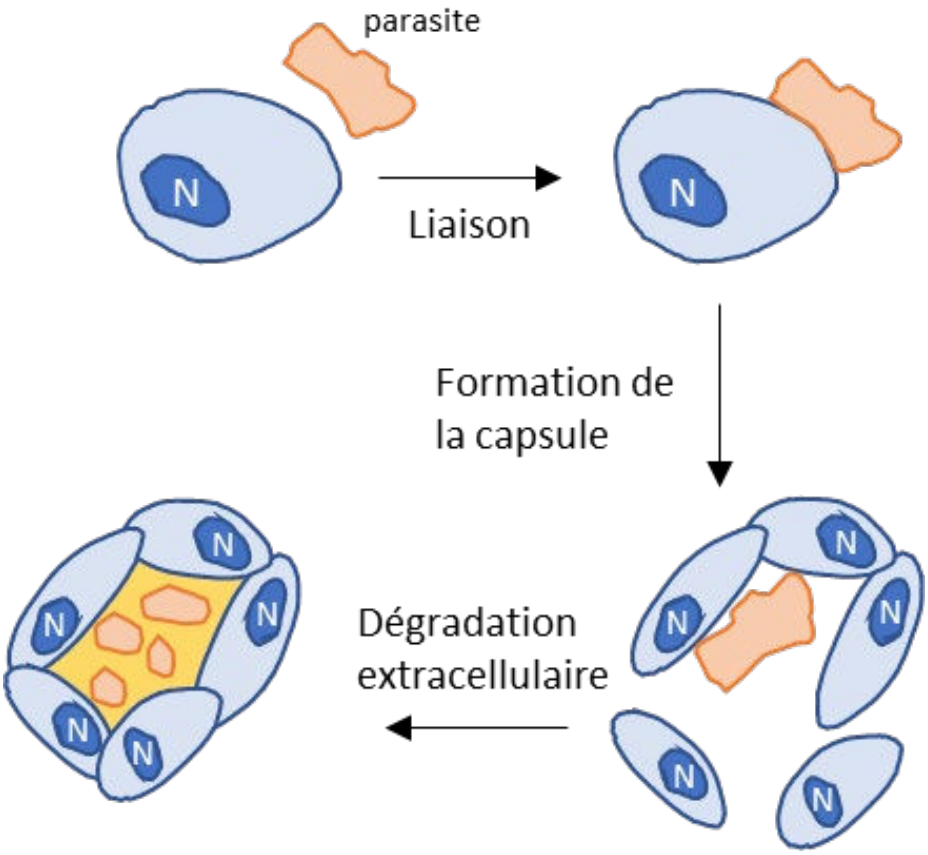


Figure 24. Représentation schématique des étapes de l'encapsulation (d'après Gerdol *et al.*, 2018).

Chez *B. glabrata*, l'encapsulation du parasite *Schistosoma mansoni* par les granulocytes a été observée en MET (Loker *et al.*, 1982). Chez *R. philippinarum*, l'encapsulation des parasites du genre *Perkinsus* par les granulocytes a été observée en MO (Montes *et al.*, 1995). Chez *S. glomerata*, les granulocytes sont capables d'encapsuler des hyphes du champignon *Cordyceps bassiana* (Aladaileh *et al.*, 2007). Il semble donc que seuls les granulocytes sont impliqués dans l'encapsulation. Chez *P. veridis* (Jayaraj *et al.*, 2009) et *Meretrix casta* (Meena *et al.*, 2010), la capacité d'encapsulation par les hémocytes de billes de chromatographie à base d'agarose chargées positivement a été mise en évidence (Jayaraj *et al.*, 2009, Meena *et al.*, 2010). Chez

C. farreri, CfLec-3 améliore l'encapsulation de billes de chromatographie à base d'agarose par les hémocytes (Yang *et al.*, 2015).

1.2.3. Libération de molécules cytotoxiques

La libération extracellulaire de molécules cytotoxiques est également un processus médié par les hémocytes chez les Mollusques. C'est le cas pour le NO, produit par la *Nitric Oxide Synthase* (NOS) et impliqué dans différents mécanismes dont l'élimination des bactéries (Colasanti et Venturini, 1998) ou de parasite comme les sporocystes de *S. mansoni* (Hahn *et al.*, 2001). L'élément déclencheur de l'activité NOS et de la libération de NO varie selon les espèces. Chez *Octopus vulgaris*, les hémocytes sont capables de produire du NO en réponse à une exposition au zymosan mais pas aux LPS (Novoa *et al.*, 2002), tandis que chez l'escargot d'eau douce *Viviparus ater*, la stimulation aux LPS entraine une hausse de l'activité NOS (Conte et Ottaviani, 1995). Chez *Ruditapes decussatus*, les deux stimulations (zymosan et LPS) entrainent une augmentation de la production de NO par les hémocytes (Tafalla *et al.*, 2003).

1.2.4. Production de peptides antimicrobiens

Une autre fonction en lien avec l'immunité est la sécrétion de PAM. Chez les Mollusques, et notamment les Bivalves, les hémocytes sont capables de produire des PAM en réponse ou non à un défi immunitaire.

Les peptides antimicrobiens

Les PAM sont des peptides majoritairement cationiques dont la taille varie entre 10 et 50 acides aminés (Hancock, 2001). Ils ont été identifiés chez de nombreuses espèces animales appartenant aux Protostomiens comme les Insectes ou aux Chordés comme les Mammifères (Jenssen *et al.*, 2006), chez les espèces végétales comme les plantes (Stotz *et al.*, 2013) ou les macroalgues (Shannon et Abu-Ghannam, 2016), les champignons (Mygind *et al.*, 2005) et les microorganismes (Paiva et Breukink, 2013) comme les bactéries (Rince *et al.*, 1994, Drosinos *et al.*, 2006) ou les microalgues (Guzmán *et al.*, 2019). Les PAM proviennent généralement de l'expression, de la traduction et de la maturation d'un précurseur et possèdent une activité ciblée ou non sur les microorganismes comme les virus, les champignons ou les bactéries (Jenssen *et al.*, 2006). Les précurseurs de PAM peuvent être classés en quatre catégories suivant leur organisation (Figure 25).

Aussi, il existe plusieurs types de PAM qui arborent une structure tridimensionnelle complexe comme les PAM riches en cystéines, des PAM qui ne se structurent pas comme les PAM riches en certains acides aminés comme la proline, ou encore des PAM qui se structurent en hélice-α souvent amphipathiques. Chez les Mollusques, sont retrouvés (1) des peptides à cystéines comme les défensines (Gueguen *et al.*, 2006b, Adhya *et al.*, 2012), (2) des peptides linéaires sans cystéine comme les myticalines (Leoni *et al.*, 2017) et (3) des peptides riches en proline (Gueguen *et al.*, 2009) ou en glycine (Herbinière *et al.*, 2005, Verdon *et al.*, 2016). Parfois les PAM peuvent dériver de protéines comme l'haliotisine issue de l'hémocyanine (Zhuang *et al.*, 2015), ou la molluskine provenant d'une histone (Sathyan *et al.*, 2012).

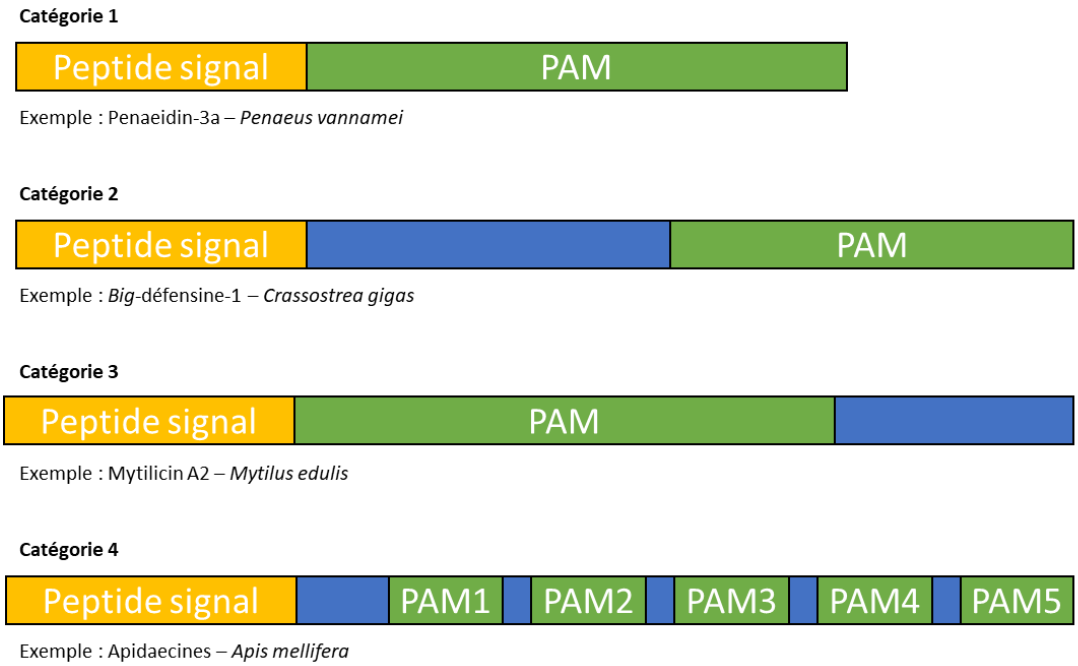


Figure 25. Représentation schématique des différents types de précurseurs de peptides antimicrobiens (PPAM). Tous les PPAM possèdent un peptide signal (jaune) Les PAM matures apparaissent en vert. Les pro-région (catégorie 2), extension C-terminale (catégorie 3) et espaceurs (catégorie 4) apparaissent en bleu.

Les peptides antimicrobiens de Mollusques

Chez les Mollusques, et particulièrement chez les Bivalves plusieurs familles de PAM ont été identifiées, majoritairement à partir d'extraits de plasma (hémolymphe sans hémocytes) (Hubert *et al.*, 1996, Charlet *et al.*, 1996, Mitta *et al.*, 1999, Liao *et al.*, 2013) ou d'hémocytes (Mitta *et al.*, 1999, Gonzalez *et al.*, 2007a, Gueguen *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2012, He *et al.*, 2019). Cependant, ils peuvent également être exprimés par plusieurs organes comme les branchies,

le manteau, le muscle adducteur ou la glande digestive (Gueguen *et al.*, 2006b, Gonzalez *et al.*, 2007a, Li *et al.*, 2012, Liao *et al.*, 2013, He *et al.*, 2019). Chez les Gastéropodes, seuls quelques peptides ou protéines ayant une activité antimicrobienne ont été identifiés à partir de divers tissus comme les organes reproducteurs (Kisugi *et al.*, 1989), la peau (Iijima *et al.*, 2003) ou l'encre violette (Melo *et al.*, 2000) chez l'aplysie. Aucun PAM n'a été caractérisé à partir du plasma ou des hémocytes. Même constat chez les Céphalopodes, trois PAM ont été identifiés : deux à partir de banques de données transcriptomiques issues de différents organes de seiche (organes reproducteurs, SNC, GSP) (Houyvet *et al.*, 2018), le troisième, l'*OctoPartenopin*, à partir d'un extrait de ventouses chez *O. vulgaris* (Maselli *et al.*, 2020).

1.2.5. Le priming immunitaire

Des études récentes menées chez plusieurs Protostomiens, dont deux Mollusques, révèlent la présence de mécanismes de mémoire immunitaire qualifiés de « priming immunitaire » se rapprochant des mécanismes de l'immunité acquise des Vertébrés (Portela *et al.*, 2013, Christofi et Apidianakis, 2013, Zhang *et al.*, 2014b, Lafont *et al.*, 2017, de Melo *et al.*, 2020). Ainsi chez *C. gigas*, une augmentation par quatre du nombre d'hémocytes a été observée après un second challenge contre *Vibrio splendidus* par rapport à des animaux naïfs (Zhang *et al.*, 2014b).

1.3. La cicatrisation

Chez *Lymnaea stagnalis* (Sminia *et al.*, 1973) et *Eledone cirrhosa* (Polglase *et al.*, 1983), la cicatrisation des blessures implique des contractions musculaires et la formation d'un « bouchon » par les hémocytes. Chez *S. officinalis*, après amputation d'un bras, les mêmes phénomènes sont observés et l'accumulation des hémocytes permet de recouvrir complètement la blessure (Féral, 1988). Chez la limace *Limax maximus*, les hémocytes sont impliqués dans des phénomènes de coagulation après blessure, cicatrisation mais également de ré-épithélialisation par l'expression de différentes cytokines et le dépôt de matrice extracellulaire (Franchini et Ottaviani, 2000). Enfin, chez *O. vulgaris*, les hémocytes sont impliqués dans la cicatrisation et la régénération du nerf palléal après lésion (Imperadore *et al.*, 2017).

1.4. Autres fonctions des hémocytes chez les Mollusques

La réponse immunitaire est la principale fonction des hémocytes et celle la plus documentée. Néanmoins, les hémocytes interviennent aussi dans d'autres mécanismes comme la formation de la coquille ou la symbiose.

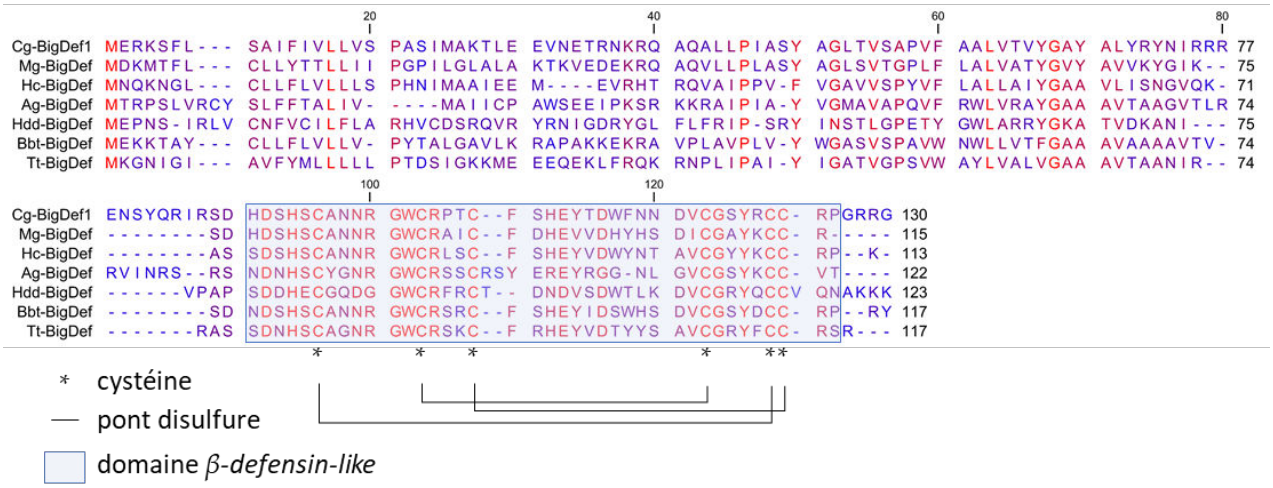
La majorité des espèces de Mollusques possède une coquille. Cette coquille est externe chez tous les Bivalves et Gastéropodes. Chez les Céphalopodes, la coquille est absente chez les *Octobrachia*, interne et plus ou moins réduite chez les *Decabrachia* ou externe chez les *Nautiloidea*. Chez les Bivalves, la formation de la coquille a d'abord été attribuée aux cellules du bord extérieur du manteau (Jodrey, 1953), cependant de récentes études indiquent que les hémocytes participent également à ce processus. Mount et collaborateurs (2004) et Cho et Jeong (2011) ont observé, respectivement chez *C. virginica* et chez *C. gigas*, l'implication des hémocytes dans la reminéralisation après lésion de la coquille. Des résultats similaires ont été observés chez *P. fucata* où les hémocytes sont impliqués dans l'initiation de la minéralisation *via* la production de cristaux de $CaCO_3$, le transport du calcium et le maintien de l'homéostasie dans l'espace exta-palléal (Li *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2018). Quelle que soit l'espèce, le type cellulaire impliqué dans la minéralisation est le granulocyte (Mount *et al.*, 2004, Cho et Jeong, 2011, Li *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2018).

Autre particularité, certains Mollusques présentent au-delà de leur microbiome (Vezzulli *et al.*, 2018, Zhang *et al.*, 2018, Lutz *et al.*, 2019), des symbiontes particuliers indispensables à leur survie comme les bénitiers avec les zooxanthelles (Trench *et al.*, 1981) ou des sépioles qui abritent au niveau de leur organe de lumière *Vibrio fisheri* (Nyholm et McFall-Ngai, 1998). Chez ces espèces, les hémocytes sont impliqués dans la mise en place et le maintien de ces symbiontes. Chez les bénitiers, les *morula-like cells* semblent impliqués dans la mise en place de la symbiose avec les zooxanthelles (Nakayama *et al.*, 1997, 1998). Chez la sépiole *Euprymna scolopes*, les hémocytes jouent un rôle important dans l'établissement et la maintenance de la symbiose avec la bactérie *V. fischeri* au sein de l'organe de lumière. En effet, les hémocytes semblent acquérir une sélectivité, agissant moins sur *V. fischeri* (Nyholm *et al.*, 2009). De plus, il apparait que certains gènes potentiellement impliqués dans l'immunité comme *Es*PGRP5 sont sous-exprimés par les hémocytes d'animaux symbiotiques par rapport à des animaux non symbiotiques (Collins *et al.*, 2012).

2. Recherche de peptides antimicrobiens à partir des hémocytes chez *Sepia officinalis*

Aucun PAM n'ayant été identifié à partir d'hémocytes de Céphalopodes, une étude *in silico* approfondie a été réalisée à partir de deux transcriptomes d'hémocytes, exposés *in vitro* ou non à *Vibrio splendidus*. A partir de ces transcriptomes, nous avons recherché des peptides antimicrobiens possédant des motifs conservés comme C-X$_{(4-14)}$-C-X$_{(3)}$-C-X$_{(13-14)}$-C-X$_{(5-7)}$-C-C observés entre les big-défensines de Mollusques (Loth *et al.*, 2019) (Figure 26A) ou P-R-P pour les peptides riches en proline (Figure 26B).

A



B

Am-Apidaecine	GNNRPVYIPQ**PRP**PHPRL
Dm-Drosocine	GK**PRP**YS**PRP**TSH**PRP**IRV
Ha-Arasdine-1	SRWPSPGR**PRP**FPGRPKPIFR**PRP**C
Pv-Pénaeidine-1	YRGGYTGPI**PRP**PPIGRPPLRLVVCACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK
Cg-PRP	DTGPIRRPK**PRP**R**PRP**EG

Figure 26. Alignements de peptides possédant des motifs conservés. A. Alignement du domaine β-*defensin-like* chez plusieurs espèces d'Invertébrés, les Bivalves *Crassostrea gigas* (*Cg*, AEE92768.1), *Mytilus galloprovincialis* (*Mg*, CCC15007.1), *Hyriopsis cumingii* (*Hc*, AEP26934.1), *Argopecten irradians* (*Ag*, ABC61319.1) ; l'ormeau *Haliotis discus discus* (*Hdd*, GT870909.1) ; l'amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* (*Bbt*, AAO18674.1) et la limule *Tachypleus tridentatus* (*Tt*, P80957) (d'après Loth *et al.*, 2019). B. Alignment de peptides riches en proline chez plusieurs Protostomiens, l'abeille *Apis mellifera* (*Am*, P35581), la drosophile *Drosophila melanogaster* (*Dm*, CAA79936), le crabe *Hyas Araneus* (*Ha*, ABI74601), la crevette *Penaeus vannamei* (*Pv*, P81056) et l'huitre *Crassostrea gigas* (*Cg*, BQ426670).

Ces recherches ont été menées à partir d'un logiciel développé en interne, PepTraq, utilisé pour identifier des neuropeptides (Zatylny-Gaudin *et al.*, 2016) ou des PAM (Houyvet *et al.*, 2018).Cette recherche ciblée n'ayant pas aboutie, nous avons élaboré une nouvelle stratégie visant à cibler les transcrits différentiellement exprimés possédant certaines caractéristiques des PPAM comme la présence d'un peptide signal. Les précurseurs ciblés correspondent à des précurseurs de la catégorie 1 présenté Figure 25. Les PAM issus de ces PPAM possédant un potentiel antimicrobien fort, déterminé par les algorithmes de prédiction de la ressource en ligne CAMP (Waghu *et al.*, 2016) (http://www.camp.bicnirrh.res.in) ont fait l'objet d'une synthèse chimique. Leur spectre d'activités antibactériennes a été évalué sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée « *In-Depth In Silico Search for cuttlefish (*Sepia officinalis*) Antimicrobial Peptides Following Bacterial Challenge of Haemocytes*» et publiée dans *Marine Drugs* pour l'édition spéciale *Marine Antibiotics 2020*.

marine drugs

MDPI

Article

In-Depth In Silico Search for Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Antimicrobial Peptides Following Bacterial Challenge of Haemocytes

Louis Benoist [1,2], Baptiste Houyvet [1,2,3], Joël Henry [1,2], Erwan Corre [4], Bruno Zanuttini [5] and Céline Zatylny-Gaudin [1,2,*]

1 Normandy University, Unicaen, CNRS, BOREA, 14000 CAEN, France; louis.benoist@unicaen.fr (L.B.); baptiste.satmar@orange.fr (B.H.); joel.henry@unicaen.fr (J.H.)
2 Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen-Normandie, MNHN, SU, UA, CNRS, IRD, Esplanade de la Paix, CEDEX, 14032 Caen, France
3 SATMAR, Société ATlantique de MARiculture, Research and Development Department, 50760 Gatteville, France
4 Plateforme ABiMS, Station Biologique de Roscoff (CNRS-Sorbonne Université), 29688 Roscoff, France; corre@sb-roscoff.fr
5 Normandy University, Unicaen, Ensicaen, CNRS, GREYC, 14000 Caen, France; bruno.zanuttini@unicaen.fr
* Correspondence: celine.gaudin@unicaen.fr

Received: 23 July 2020; Accepted: 19 August 2020; Published: 24 August 2020



Abstract: Cuttlefish (*Sepia officinalis*) haemocytes are potential sources of antimicrobial peptides (AMPs). To study the immune response to *Vibrio splendidus* and identify new AMPs, an original approach was developed based on a differential transcriptomic study and an in-depth in silico analysis using multiple tools. Two de novo transcriptomes were retrieved from cuttlefish haemocytes following challenge by *V. splendidus* or not. A first analysis of the annotated transcripts revealed the presence of Toll/NF-κB pathway members, including newly identified factors such as *So*-TLR-h, *So*-IKK-h and *So*-Rel/NF-κB-h. Out of the eight Toll/NF-κB pathway members, seven were found up-regulated following *V. splendidus* challenge. Besides, immune factors involved in the immune response were also identified and up-regulated. However, no AMP was identified based on annotation or conserved pattern searches. We therefore performed an in-depth in silico analysis of unannotated transcripts based on differential expression and sequence characteristics, using several tools available like PepTraq, a homemade software program. Finally, five AMP candidates were synthesized. Among them, NF19, AV19 and GK28 displayed antibacterial activity against Gram-negative bacteria. Each peptide had a different spectrum of activity, notably against *Vibrio* species. GK28—the most active peptide—was not haemolytic, whereas NF19 and AV19 were haemolytic at concentrations between 50 and 100 μM, 5 to 10 times higher than their minimum inhibitory concentration.

Keywords: antimicrobial peptide; haemocyte; *Sepia officinalis*; mollusc; challenge; in vitro; *Vibrio splendidus*

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are small peptides commonly ranging from 10 to 50 amino acids in length and displaying activity against bacteria [1–3], viruses [4,5], fungi [6,7] or protozoan parasites [8,9]. Most of AMPs are cationic, but some anionic peptides have been identified too [10]. They are secreted by various cell types in a wide diversity of animal species [11], plants [12] and microorganisms [13], and derive from a precursor. Three main types of precursors are described: (1) precursors composed of a signal peptide followed by the mature AMP, like cecropins [14] or

penaeidins [15], (2) precursors composed of a propeptide located between the signal peptide and the mature AMP, like cathelicidins [16] or hepcidins [17], or (3) precursors composed of the mature AMP located between the signal peptide and a C-terminal extension, like piscidins [18] or myticalins [19].

Molluscan species only rely on innate immune processes, including secretion of AMPs, to protect themselves against external aggressions [20]. Most of molluscan AMPs have been identified in the haemolymph and/or in the circulating cells—haemocytes (hct)—in bivalve species [1,21–30]. In many cases, AMPs were identified following bacterial challenge, e.g., mytilin A in the mussel *Mytilus edulis* [30], two isoforms of defensin (*Cg*-defh1 and *Cg*-defh2) [21] and a proline-rich AMP (*Cg*-Prp) [22] in the oyster *Crassostrea gigas*, big defensins *Vp*-BD in the clam *Venerupis philippinarum* [31] and *Sb*-BDefd-1 in the ark clam *Scapharca broughtonii* [28], myticusin-1 in *Mytilus coruscus* [29] and *Pm*AMP-1 in the oyster *Pinctada fucata martensii* [26]. In other cases, differential expression of AMPs was observed following bacterial challenge, like overexpression of defensins in *Mytilus galloprovincialis* [23], big defensins in *C. gigas* [24], *Pv*-Def in the mussel *Perna viridis* [25] or downregulation of *Cg*-defh2 in *C. gigas* [21] or of penaeidins 3 and 5 in *Fenneropenaeus chinensis* [32]. In Gastropods, a few AMPs have been identified from the haemolymph and/or hct, including a proline-rich peptide from the marine snail *Repana venosa* [33] and defensin from the disk abalone *Haliotis discus discus*, whose expression in hct increased following bacterial challenge [34]. In Cephalopods, no AMP has been identified using classical approaches such as homology search using in silico analysis or immune challenge response. The only two AMPs described were designed in silico using a cuttlefish (*Sepia officinalis*) transcriptomic database including central nervous system, reproductive tissues and posterior salivary glands extracts, but no hct extract [35].

In this context, we studied the immune response of cuttlefish hct. Considering that cuttlefish belongs to animals subjected to directive 2010/63/EU on animal care and protection, an in vitro challenge was developed. The strain used for the challenge was *Vibrio splendidus*, which belongs to the Splendidus clade. Its members are known pathogens of octopus [36] as well as of shellfish hatcheries [37,38] or fish farms [39,40]. In silico analysis of de novo hct transcriptomes did not reveal any AMP based on homology or conserved patterns, so an in-depth in silico study was conducted on the differentially expressed transcripts of control versus challenged hct and AMP precursor characteristics such as the presence of a peptide signal and sequence length.

2. Results—Discussion

The two transcriptomes of control hct (c-hct) and *V. splendidus*-challenged hct (*Vs*-hct) comprised 96,765 (c-hct) and 107,747 (*Vs*-hct) transcript sequences including isoforms of 88,346 (c-hct) and 98,434 (*Vs*-hct) genes (according to the "gene" definition provided by Trinity assembler), with average lengths of 806.1 (c-hct) and 774.7 (*Vs*-hct) nucleotides, respectively. Based on the presence of a blastx hit against the Uniprot-Swissprot database, 15% and 14% of all transcripts included in the c-hct and *Vs*-hct transcriptomes, respectively, were annotated. These low levels of annotation are striking but commonly observed in such an atypical model, as already reported for the white body (WB) with 20% [41], the central nervous system (CNS) with 28% [42], the accessory nidamental gland (ANG) with 34%, or the posterior salivatory gland (PSG) with 45% [43]. Besides, in another cephalopod species (*Octopus vulgaris*), 18.95% of the hct transcriptome was annotated [44]. These low levels of annotation reflect the lack of available data for cephalopod species and the need for further studies on unannotated transcripts.

Regarding the transcripts per kilobase million (TPM) values obtained during sequencing, the twenty most expressed transcripts (top20) in c-hct corresponded to transferrin, neurofilament, chitin deacetylase, structural polyprotein, polyubiquitin, tropomyosin, filamin-A, dynein light chain, ferritin, matrilin-2 and 3, matrix metalloproteinase, actin, riboflavin kinase, perivitellin, and five unannotated transcripts (Table S1). The top20 in *Vs*-hct corresponded to transferrin, neurofilament, chitin deacetylase, structural polyprotein, filamin-A, polyubiquitin, riboflavin kinase, histone H1, tropomyosin, ferritin, actin, perivitellin, dynein light chain, matrix metalloproteinase, matrilin-3, and five unannotated

transcripts (Table S2). Eighteen of the c-hct top20 also belonged to the *Vs*-hct top20. Unknown 5 and matrilin-2 from the c-hct top20 were not part of the *Vs*-hct top20, while histone H1 and unknown 6 from the *Vs*-hct top20 were not in the c-hct top20. Comparing the global fold changes in TPM values between *Vs*-hct and c-hct, 49% of the transcripts seemed up-regulated (fold change > 1.1), 47% seemed down-regulated (fold change < 0.9) and 4% seemed unaffected by the challenge (0.9 ≤ fold change ≤ 1.1). Several transcripts from both top20s were unaffected by the challenge, such as transferrin and chitin deacetylase whose fold changes were 0.98 and 0.93, respectively. Furthermore, four transcripts from both top20s were up-regulated, namely unknowns 1 and 2, riboflavin kinase and perivitelline, with fold changes of 1.66, 1.35, 1.36 and 1.11, respectively. Twelve transcripts from both top20s were down-regulated, namely neurofilament, structural polyprotein, polyubiquitin, filamin-A, ferritin, tropomyosin, unknowns 3 and 4, matrix metalloproteinase, actin, matrilin-3 and dynein light chain, with fold changes of 0.87, 0.72, 0.69, 0.85, 0.60, 0.81, 0.60, 0.84, 0.56, 0.82, 0.56 and 0.78, respectively. The two transcripts only found in the *Vs*-hct top20—histone H1 and unknown 6—were up-regulated by the bacterial challenge, with fold changes of 2.00 and 1.25, respectively. Besides, the two transcripts only found in the c-hct top20—matrilin-2 and -5—were down-regulated, with fold changes of 0.44 and 0.42, respectively (Tables S1 and S2). Interestingly, all unannotated transcripts of the c-hct and *Vs*-hct top20s seemed affected by the challenge with *V. splendidus,* highlighting the need for further analysis on unannotated sequences. Among the transcripts from both top20s affected by *V. splendidus* exposure, several (polyubiquitin, ferritin, paramyosin and actin) were differentially expressed after bacterial challenge of *Ruditapes decussatus* [45]. Interestingly, actin, which is commonly used as a reference gene, was affected by *V. splendidus* exposure, as previously reported for *R. decussatus* [45] and *Mya arenaria* [46,47]. The transcript annotated as transferrin coded for a partial sequence sharing sequence identity with salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transferrin-like protein (41.16%, P79815.1). Transferrins bind to iron and limit its availability by creating a bacteriostatic environment for iron-dependent bacteria. For example, *Ab*-transferrin was up-regulated upon immune stimulation of *Haliotis discus discus* with *Vibrio parahaemolyticus*, lipopolysaccharides and *Listeria monocytogenes* [48]. Additionally, the transcript coding for a homologue of histone H1 (*So*-H1) was up-regulated after bacterial challenge. Several antibacterial peptides derived from histone H1 have been described in salmon [49] and rainbow trout [50]. *So*-transferrin was highly expressed in both control and challenged conditions, and *So*-H1 expression was two-fold higher after challenge with *V. splendidus.* Therefore, it could be involved in the immune response.

Among the transcripts overexpressed in *Vs*-hct, several were involved in the immune response, such as members of the Toll/NF-κB pathway (Table 1).

A Toll-like receptor (TLR) previously identified in ANG and called *So*-TLRγ [51] was also identified in the two hct transcriptomes during this work, together with another sequence corresponding to a partial sequence of a TLR and called *So*-TLR-h. Partial *So*-TLR-h possessed leucine-rich repeat domains, one leucine-rich repeat C-terminal domain, a transmembrane domain and the Toll-interleukin-1 resistance domain, and shared 40.41% sequence identity with TLR-3 from *M. corruscus* whose expression was significantly higher in hct, digestive gland and adductor muscle than in foot [52]. Regarding TPM values, *So*-TLRγ and *So*-TLR-h were up-regulated after incubation with *V. splendidus,* with fold changes of 1.29 and 15.11, respectively. Several molluscan TLRs were found up-regulated after immune challenge [44,53–56], confirming their function in the immune response. In addition, one inhibitor of NF-κB kinase (*So*-IKK-h) sharing 27.29% sequence identity with *Cyclina sinensis* IKK (ASE55486.1) and one Rel/NF-κB (*So*-Rel/NF-κB-h) sharing 78.57% sequence identity with *Euprymna scolopes* Rel/NF-κB (AAY27981.1) and possessing the Rel identity domain (RHD) were newly identified in the hct transcriptome. The myeloid differentiation primary response protein MyD88, the interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (*So*-IRAK4), the TNF receptor-associated factor 6 (*So*-TRAF6) and the inhibitor of NF-κB (*So*-IκB) previously described in ANG [51] were also identified. All these factors could be involved in signal recognition and transduction leading to activation of immune gene transcription. Except *So*-IκB, all members of the Toll/NF-κB pathway identified in the present study

were up-regulated after incubation with *V. splendidus*. These results are consistent with those obtained in *M. galloprovincialis* where almost all identified members of the Toll/NF-κB pathway were up-regulated after challenge with several bacteria, including *V. splendidus* [56].

Table 1. Immune-related transcripts identified in the hct transcriptomes.

Transcript	Name	Transcript Length (nt)	Protein Length (aa)	Expression (TPM)		Fold Change
				c-hct	*Vs*-hct	
TR5906|c0_g1_i2	TLRγ	2861	833	3.55	**4.58**	1.29
TR31922|c0_g2_i3	TLR-h (partial)	1741	536	0.31	**4.71**	15.11
TR20767|c0_g1_i1	MyD88	1938	338	12.13	**14.50**	1.20
TR42010|c1_g1_i1	IRAK4	1939	319	8.56	**10.63**	1.24
TR37884|c0_g2_i2	TRAF6	2364	547	2.53	**3.05**	1.21
TR17535|c0_g1_i1	IκB	2609	337	233.96	230.08	0.98
TR34670|c0_g1_i1	IKK-h	2724	476	10.64	**12.29**	1.16
TR41212|c6_g1_i2	Rel/NF-κB-h	2614	491	1.85	**2.56**	1.39
TR24628|c0_g1_i1	iNOS-h (partial)	4137	1106	0.00	**0.52**	-
TR41722|c24_g56_i1	PGRP-h1	873	213	254.12	**466.71**	1.84
TR14900|c0_g1_i1	PGRP-h2	956	204	87.28	**154.73**	1.77
TR40338|c3_g2_i1	BPI/LPB	2342	537	134.38	**149.31**	1.11
TR32087|c0_g2_i1	Gal-2 (partial)	817	236	86.15	**120.87**	1.40

aa: amino acid, nt: nucleotide, TPM: transcripts per kilobase million.

Immune factors were also identified, such as two peptidoglycan recognition proteins (*So*-PGRP-h1 and *So*-PGRP-h2), one bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein (*So*-BPI/LBP), one galectin (*So*-Gal-2) and a partial sequence of inducible nitric oxide synthase (*So*-iNOS-h) (Table 1). NOSs are known to produce nitric oxide (NO), which is involved in various physiological functions but could also kill bacteria when produced at high concentrations. *So*-iNOS-h shared 45.40% sequence identity with *C. gigas* NOS (K1QRH7), which was up-regulated in oyster hct after co-stimulation with LPS and TNF-α [57]. Both *So*-PGRP-h1 and *So*-PGRP-h2 identified in the hct transcriptomes possessed the conserved peptidoglycan-binding type-2 amidase domain, characteristic of vertebrate and invertebrate PGRPs. PGRPs are involved in various immune processes such as recognition, signalling and effector function [58]. They were up-regulated in *Argopecten irradians* after exposure to peptidoglycans [59] and in *Chlamys farreri* after exposure to *V. anguillarum* and *Micrococcus lysodeikticus* [60]. *So*-BPI/LBP, previously identified in cuttlefish WB [41], shares 52.58% sequence identity with *E. scolopes* LBP-3 (AEL03862.1) and 30% sequence identity with *C. gigas* LBP/BPI (AAN84552.1), whose recombinant protein possesses antibacterial activity against *Escherichia coli* strains [61]. Finally, partial sequence of *So*-Gal-2 previously identified in cuttlefish WB [41], which shares 46% sequence identity with galectin-2-2 (AJA37869.1) identified in the *Littorina littorea* hct transcriptome [62] was identified in cuttlefish hct. TPM values showed that all these immune-related factors seemed up-regulated with fold change greater than 1.10 (Table 1). Three of them (*So*-Gal-2, *So*-PGRP-h1 and *So*-PGRP-h2) displayed "challenged" TPM values close to or more than 1.5-fold higher than control TPM values. Besides, *So*-iNOS had a TPM value of 0 in the control condition versus 0.52 in the challenged condition, suggesting *V. splendidus*-induced expression. All these data tend to confirm that the in vitro challenge performed in this study triggered the immune response of cuttlefish hct.

Our annotation-based search did not identify any AMP, so we performed an in-depth search based on unannotated transcripts, as described in Figure 1.

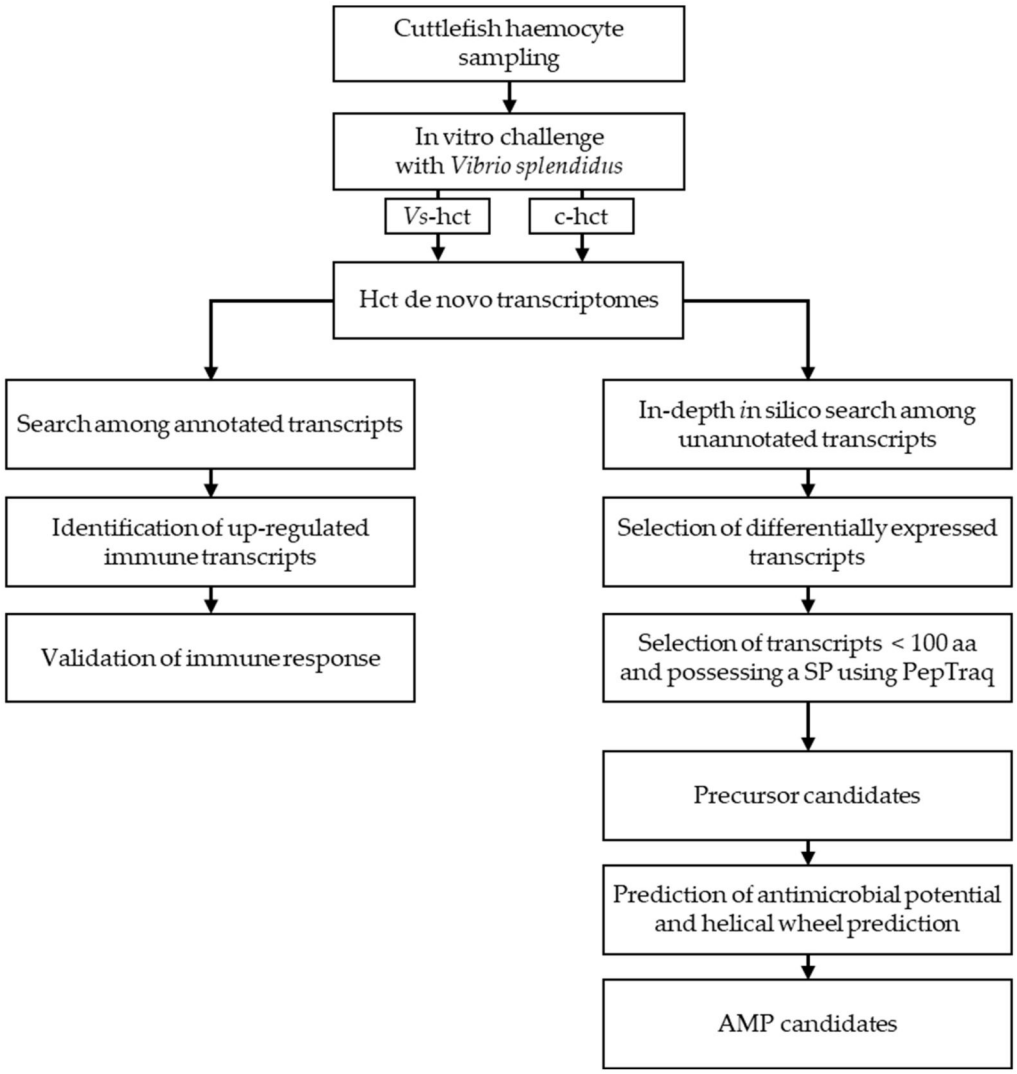


Figure 1. Overview of the methodology used to identify antimicrobial peptides using an in vitro challenge followed by an in-depth in silico search. AMP: antimicrobial peptides.

Among the differentially expressed transcripts between the control and challenged conditions, we selected sequences of less than 100 amino acids presenting a signal peptide, using our homemade PepTraq software program. We applied some of the specific structural AMP criteria previously defined by Houyvet and collaborators [35] and selected five candidates (Table 2).

Table 2. Putative AMP precursors identified in the hct transcriptomes.

Transcript Name	Length (aa)	Expression (TPM)		Fold Change	SP	AMP Name
		c-hct	*Vs*-hct			
TR42258|c1_g1_i1	54	**8.92**	7.57	0.85	Yes	AV19
TR27534|c0_g1_i1	48	17.39	**23.79**	1.37	Yes	GK28
TR36613|c0_g1_i1	47	**20.28**	17.01	0.84	Yes	NF19
TR42563|c7_g3_i1	40	**1.99**	0.78	0.39	Yes	II19
TR5654|c0_g1_i1	45	9.77	**17.33**	1.77	Yes	LV25

aa: amino acid, TPM: transcripts per kilobase million, SP: signal peptide.

Among them, three were down-regulated after *V. splendidus* exposure, with fold changes of 0.39, 0.84 and 0.85. The other two candidates were up-regulated with fold changes of 1.37 and 1.77. Expression values of these transcripts were also obtained for ink sac (male and female), embryo and skin (Table S3). These tissues are known to possess antimicrobial activities, as previously reported in Cephalopods for ink [63] and skin co-products [64,65]. One transcript—TR42563|c7_g3_i1—was almost exclusively expressed in hct. All the other transcripts were expressed in all samples. However, TR27534|c0_g1_i1 was more expressed in hct and skin. The complete sequences of the precursors are presented in Figure 2. The five precursors were between 40 and 54 amino acids in length, and all possessed a signal peptide.

>TR42258|c1_g1_i1
*MRYIVCFVFFLFFFLLFLWLVPART***ASSFLTPRLSSLGKRSWAV**
>TR27534|c0_g1_i1
*MLFKVIIVIWISVCRECTRG***GFCNFMHLKPISRELRRELYGRTRRRRK**
>TR36613|c0_g1_i1
*MKMISRKESLKAPHLSLLISMLHGVGLA***NYWLLVLRRLLITKKVMWF**
>TR42563|c7_g3_i1
*MSLRNFLLIITLLLYSLPTLS***IYFHLFRKINFNLRIYYFI**
>TR5654|c0_g1_i1
*MMTLLRDLITKLVMFYWLLR***LKALKLPKGSTSTEVRRILVLEIRV**

Figure 2. Protein sequences of putative AMP precursors (in italic: predicted signal peptide).

The peptides resulting from the selected precursors were between 19 and 28 amino acids in length, with molecular weights ranging from 2,063.38 to 3,577.25 Da. All peptides were cationic, with net charges ranging between +3 and +8, and hydrophobic ratios ranging between 28% and 63% (Table 3).

Table 3. Peptide characteristics of the selected candidates.

Name	Sequence	Length (aa)	MW	C	HR	α-Helix Prediction and NRH	CAMP Algorithms			
							SVM	RFC	ANN	DAC
AV19	ASSFLTPRLSSLGKRSWAV	19	2063.38	+3	42%	Yes-2	0.75	0.8	AMP	0.91
GK28	GFCNFMHLKPISRELRRELYGRTRRRRK	28	3577.25	+8	28%	No	0.69	0.31	AMP	0.8
NF19	NYWLLVLRRLLITKKVMWF	19	2493.14	+4	63%	Yes-7	0.43	0.71	AMP	0.65
II19	IYFHLFRKINFNLRIYYFI	19	2581.1	+3	52%	Yes-6	0.13	0.65	AMP	0.87
LV25	LKALKLPKGSTSTEVRRILVLEIRV	25	2820.45	+4	44%	Yes-4	0.68	0.88	NAMP	0.84

aa: amino acid, MW: molecular weight (Dalton), C: charge, HR: hydrophobic ratio, NRH: number of residues in the same hydrophobic surface, SVM: Support vector machine classifier, RFC: random forest classifier, ANN: artificial neural network, DAC: discriminant analysis classifier.

Using the Antimicrobial Peptide Database website's predictor (APD3), four of these five peptides were predicted to form an α-helix possessing 2 to 7 residues in the same hydrophobic surface. Helical wheel projection from HeliQuest demonstrating that these four peptides adopted an α-helix conformation and possessed a hydrophobic face (Figure 3).

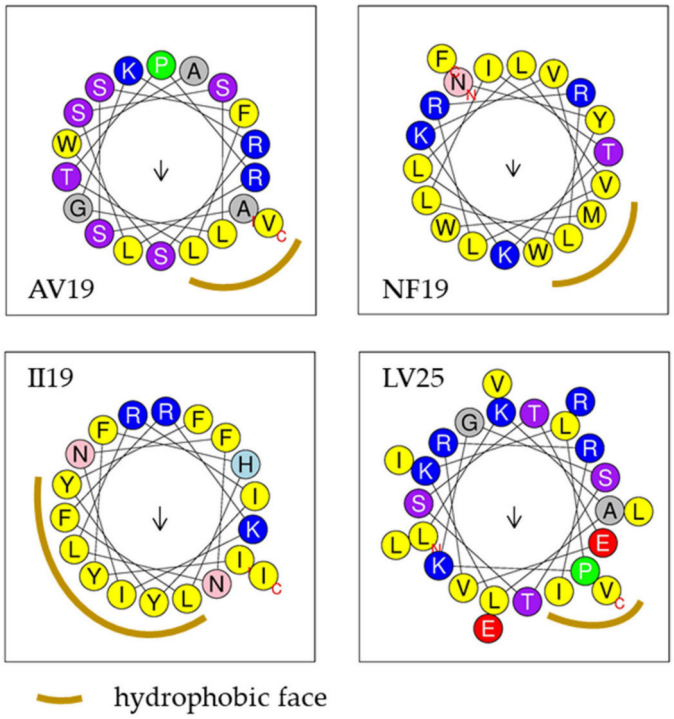


Figure 3. Helical wheel projections of AV19, NF19, II19 and LV25 predicted by the online tool HeliQuest. Yellow: hydrophobic residues; blue: basic residues; green: special residues; red: acidic residues; purple and pink: polar residues; arrow: hydrophobic moment.

The similarity of the five peptides with other known peptides was assayed using APD3 alignment program. AV19 possessed 40% similarity with two frog antibacterial peptides, namely temporin-1Cd from *Rana clamitans* [66] and temporin-1Ola from *R. akaloosae* [67]. GK28 possessed 35.48% similarity with marmelittin from the venom of the scorpion *Mesobuthus eupeus* [68] and a C-terminal end similar to the one of GR21 [35], in addition to the lowest hydrophobic ratio and the highest net charge of the selected peptides. Both NF19 and II19 possessed similarity with AMPs from the bovine rumen microbiome—47.36% with P20 and 41.66% with lynronne-2, respectively [69]. Finally, LV25 possessed 37.93% similarity with human peptide 6 [70].

The antimicrobial potential of the five peptides was assayed on ten bacteria—8 Gram-negative ones and 2 Gram-positive ones—i.e., *V. splendidus*, a cuttlefish pathogen *V. alginolyticus* [71], other aquatic pathogens *V. anguillarum* [72], *Aeromonas salmonicida* [73], *Lactococcus garvieae* [74] and *V. parahaemolyticus* causing human seafood-related illness [75]. Among the five peptides tested, three—AV19, GK28 and NF19—were active against at least one bacterial species (Table 4), whereas II19 and LV25 were not active against any bacterial species. None of the five peptides was active against Gram-positive bacteria. The three active peptides were all active against *V. splendidus*. NF19 inhibited *V. splendidus* growth between 5 and 10 µM and was bactericidal between 10 and 20 µM. While its closest homologue P20 from the rumen microbiome was only semi-active against epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) [69], NF19 was strongly active against *V. splendidus* but did not show any activity against Gram-positive bacteria. AV19 inhibited both *V. splendidus* and *V. parahaemolyticus* between 10 and 20 µM and was bactericidal between 10 and 20 µM and 20 and 50 µM, respectively. Both frog temporins 1-Cd and 1Ola—the closest homologues of AV19—were active against *S. aureus*, and also against *Bacillus subtilis* for temporin-1Ola, but not against *E. coli* [66,76], showing possible Gram-positive selectivity. As for AV19, it seemed active only against some *Vibrio* species.

Table 4. Antimicrobial activity of the synthetic peptides.

Name	Gram Negative																Gram Positive			
	Vibrio alginolyticus		*Vibrio splendidus*		*Vibrio aestueranius*		*Vibrio anguillarum*		*Vibrio parahaemo-lyticus*		*Escherichia coli*		*Halomonas aquamarina*		*Aeromonas salmonicida*		*Enterococcus faecalis*		*Lactococcus garvieae*	
	MIC	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**
AV19	-	-	10–20	10–20	-	-	-	-	10–20	20–50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GK28	≤5	20–50	≤5	≤5	10–20	>50	10–20	20–50	≤5	10–20	≤5	20–50	-	-	-	-	-	-	-	-
NF19	-	-	5–10	10–20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LV25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SYN	10–20	>20	5–10	10–20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ox	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	≤5	>10	-	≤5	≤5	≤5	5–10	≤5	> 10

Only one peptide—GK28—was active against the five *Vibrio* species. GK28 inhibited the growth of *V. alginolyticus*, *V. splendidus* and *V. parahaemolyticus* equally as the positive control oxytetracycline did at concentrations ≤5 µM and was also equally bactericidal against *V. splendidus*. In contrast to marmelittin—its closest homologue active against a broad range of Gram-negative and Gram-positive bacteria [68]—GK28 seemed only active against Gram-negative bacteria. GK28 was the only peptide active against a non-*Vibrio* species, i.e., *E. coli*. None of the five peptides was active against the other two Gram-negative bacteria *Halomonas aquamarina* and *A. salmonicida* (Table 4). The potential synergistic antibacterial activity of the active peptides and of the two up-regulated peptides—GK28 and LV25—was assayed. No synergistic activity was observed between the two most expressed peptides. Neither NF19 nor AV19 improved the antimicrobial activity of GK28. However, while AV19 and NF19 only delayed *V. alginolyticus* growth when tested alone (data not shown), a synergistic activity was observed when they were tested together (Table 4). No synergistic activity of NF19 and AV19 was observed against *V. splendidus*.

To test the toxicity of the newly identified peptides on eukaryotic cells, their haemolytic activity was assayed on human red blood cells (Figure 4).

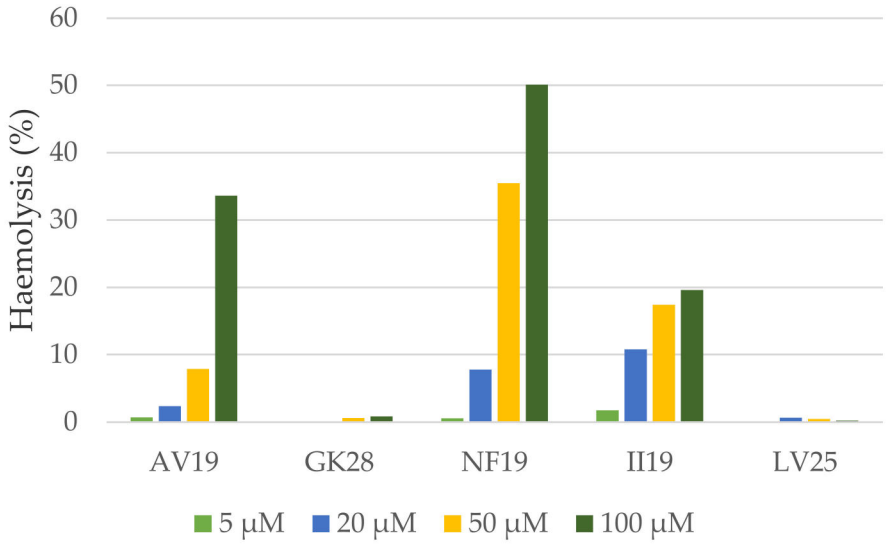


Figure 4. Haemolytic activity of the selected peptides on human red blood cells.

At the lowest concentration tested—5 µM—, no haemolytic activity was observed for any of the five peptides. GK28 and LV25 were not haemolytic at any of the concentrations tested. AV19 was slightly haemolytic at 5, 20 and 50 µM, and induced 33% haemolysis at 100 µM. II19 induced 11%, 17% and 19% haemolysis at 20, 50 and 100 µM, respectively. Finally, NF19 was the most haemolytic peptide: it induced 35 and 50% haemolysis at 50 and 100 µM, respectively. The most active peptide—GK28—was not haemolytic at any concentration whereas its closest homologue marmelittin is highly haemolytic on mouse, bird and lizard erythrocytes [68].

Three peptides possessing antibacterial activity were identified. NF19, AV19 and GK28 seemed to possess a complementary antibacterial activity, as observed with mussel myticalins [19]. Such complementarity may reflect the biological role of these AMPs in the cuttlefish immune response and need to be confirmed by in situ analysis. Out of the three active peptides, two were down-regulated by bacterial challenge and one was up-regulated. AMP down-regulation was previously observed in *C. gigas* hct: *Cg*-defh2 was down-regulated 24 h and 48 h post challenge with a heat-killed mix of *Micrococcus luteus*, *V. splendidus* and *V. anguillarum*, but up-regulated in the mantle and gills [21]. In *M. galloprovincialis*, myticin and mytilin were found down-regulated in hct after injection of heat-killed *V. splendidus*, while defensin was up-regulated. Moreover, after injection of heat-killed *V. anguillarum*, only mytilin was up-regulated while defensin and myticin seemed unaffected [77]. Similar results were

obtained in shrimp in which Pen3 and Pen5 were down-regulated 24 h after injection of heat-killed *V. anguillarum*, while crustin and antilipopolysaccharide factor (ALF) were up-regulated [32]. Again, this may reflect the complementary activity of AMPs in the immune response. Finally, it is also interesting to note that the time lapse between bacterial exposure and the regulation of expression in hct varies greatly according to the AMP. For example, some AMPs are regulated rapidly: *M. galloprovincialis* defensin was up-regulated from 1 h after injection of heat-killed *V. splendidus* [77], *Pinctada martensii* AMP-1 was up-regulated 2 h after injection of a heat-killed mix of *E. coli* and *M. luteus* [26], or *Scapharca broughtonii Sb*-BDef1 was up-regulated 8 h and 16 h after injection of *V. anguillarum* [28]. Other AMPs are up-regulated late: *M. coruscus* myticusin-1 expression peaked 36 h after injection of heat-killed *E. coli* [29], or *C. gigas Cg*-BigDef1 was up-regulated 24 h, 48h and 72 h after injection of *V. splendidus* and *Vibrio tasmaniensis* [24]. It would be interesting to study the time-course of the relative expression of the three AMPs NF19, AV19 and GK28 during bacterial challenge with different bacteria.

3. Materials and Methods

3.1. Animals

Healthy cuttlefish (*Sepia officinalis*) were caught in the Bay of the Seine between January and June 2015. They were maintained in 1000-L outflow tanks with a permanent water supply at the Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC, marine station of the University of Caen, Luc-sur-Mer, France). Water temperature was maintained at 16 °C.

3.2. Ethical Statement

This research followed the guidance given by Directive 2010/63/EU and French regulations regarding the use of animals for experimental procedures. It was approved by the Regional Ethical Committee Cenomexa (Committee agreement number 54; project agreement number 03145.03). The experiment was designed to decrease animal distress by minimising the number of animals. Moreover, the tanks were modified so as to provide hiding places for cuttlefish.

3.3. Haemolymph Collection and Challenge with Heat-Killed Bacteria

Two female cuttlefish were anesthetised with ethanol 3% before tissue collection. Haemolymph was withdrawn from the vena cava and branchial hearts using a 10 mL syringe. *Vibrio splendidus* strain CIP 107,715 was grown under agitation at 20 °C in Marine Broth (Conda, 40.20 g/L) medium for 24 h. The culture was centrifuged (4,000× *g*, 5 min, room temperature), washed twice, and resuspended in sterile sea water to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 1 (1×10^9 CUF/mL).

Haemolymph was diluted in sterile sea water (*v*/*v*) and divided into two batches: 10 mL remained untreated, and 10 mL were challenged with 200µl of boiled bacteria (boiled 15 min at 100 °C). Haemolymph with and without heat-killed bacteria was then incubated at 16 °C at 100 rpm in a MaxQ6000 incubator (ThermoFisher) equipped with an orbital shaker. After 24 h, hct from the two conditions were harvested by centrifugation at 12,000 rpm and resuspended in TriReagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to extract total RNA.

3.4. Illumina Sequencing

RNA extractions were performed as described by Cornet and collaborators [43]. For sequencing, other samples than hct were used, namely ink sac, skin, and embryo. Total RNA concentrations were quantified using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher), and RNA quality was checked using a Bioanalyzer (Agilent Technologies). Library preparation and sequencing was conducted by the McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montréal, Québec, Canada) following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA). The detailed protocol is available in the supporting experimental section.

Raw data are accessible under ENA project PRJEB39162.

3.5. Bioinformatic Analysis

3.5.1. Transcriptome Assembly

Quality checks of raw data from the six libraries were performed with FastQC v. 0.11.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Low quality trimming was performed with Trimmomatic v. 0.36 [78] using the following parameters: leading 3, trailing 3, sliding window 4:15, minlen 30. Reads from all tissues were assembled de novo all together with Trinity v 2.2.0 [79] including the read normalisation step corresponding to the Trinity implementation of the diginorm method. The assembler was run with default parameters. The sequences from each library were aligned with RSEM [80] against de novo assembly.

3.5.2. Transcriptome Annotation

Peptide prediction was performed using Transdecoder 5.2.0 [81]. Similarity search (diamond v0.7.9) [82] of the Transdecoder predicted peptides was performed against the Uniprot-Swissprot databases and UniRef90 (release 2018). Peptide signal prediction was performed using SignalP v4.1 [83]. Transmembrane peptide detection was performed using TMHMM v2.0c [84]. Protein domain search was performed using hmmscan from the hmmer v.3.1b1 suite against the Pfam-A database (release 31.0) [85]. Finally, transcriptome functional annotation was performed using the Trinotate pipeline (http://trinotate.github.io described) [81]. An additional annotation-based search was conducted on the hct transcriptomes (c-hct and *Vs*-hct) searching for relevant immune-related transcripts and AMPs. Specific domains were predicted using the online tool SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) [86].

3.5.3. PepTraq

PepTraq is a homemade software program developed to perform in silico analyses from "-omic" data (https://peptraq.greyc.fr). The search for precursors or peptides through PepTraq can be achieved using several structural criteria, as described by Zatylny-Gaudin and collaborators [42] for neuropeptides or by Houyvet and collaborators [35] for antibacterial peptides. The PepTraq version used for this work included new features with respect to previous ones, in particular (1) the prediction of Sec-dependent signal peptides, using package JSPP [87] and (2) the selection of sequences containing a certain number of occurrences of a given pattern (possibly including a number of unspecified amino acids).

3.5.4. In-Depth In Silico Search

In addition to an annotation-based search, we performed an in-depth in silico search using our homemade software PepTraq to look for AMPs. PepTraq is a useful tool developed to conduct in silico approaches on transcriptomic or proteomic datasets based on specific criteria (e.g., the presence of a signal peptide, sequence length, the occurrence and number of certain amino acids or specific patterns, the occurrence of consensus subsequences, the hydrophobicity degree, the electrical charge of protein sequences). The pipeline of the methodology used during this work is illustrated in Figure 1. We targeted unannotated transcripts differentially expressed between control and challenged conditions as well as the length of the resulting precursors and the presence of signal peptides. Among the selected precursors, we targeted some AMP characteristics, as previously described by Houyvet and collaborators [35]. The antimicrobial potential of the selected peptides was evaluated using the CAMP database website's prediction tool [88] (http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php). We selected the following four algorithms: Support Vector Machine (SVM), Random Forests (RF), Artificial Neural Network (ANN) and Discriminant Analysis (DA). The molecular weight (MW), the net charge, the hydrophobic ratio (HR), α-helix prediction and the number of residues of the same hydrophobic surface of the selected peptides were calculated with the Antimicrobial Peptide Database (APD) website's calculator and predictor (APD3) [89] (http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php). The helical

wheel projection diagrams were predicted using Heliquest website's sequence analysis module [90] (https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py).

3.6. Peptide Synthesis

The five selected peptides were synthesized by GENECUST (Dudelange, Luxembourg) with >95% overall purity.

3.7. Antimicrobial Assay

The minimal growth inhibitory concentrations (MICs) of synthetic peptides (Genecust) were evaluated on *Vibrio alginolyticus* (CIP 109819), *V. splendidus* (CIP 107715), *V. aestuerianus* (CIP 102971), *V. anguillarum* (CIP 64.14), *V. parahaemolyticus* (CIP 73.30), *Halomonas aquamarina* (CIP 105454T), *Escherichia coli* (CIP 54.8T), *Aeromonas salmonicida* (CIP 103209T), *Enteroccocus faecalis* (CIP 76.117) and *Lactococcus garvieae* (CIP 104369) obtained from the "Collection de l'Institut Pasteur". Bacteria were cultured in adapted media: Homemade marine broth (HMB, sea salts 20 g/L, peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L) for *Vibrio* species and *H. aquamarina*; Luria-Bertani (peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L) for *E. faecalis* and *E. coli*; Trypticasein Soy Broth (TSB, Conda, 40 g/L) for *A. salmonicida,* and Brain Heart Infusion (BHI) (Conda, 37 g/L) for *L. garvieae*. MICs were determined in triplicate by liquid growth inhibition assays adapted from Hetru and Bulet [91]. Briefly, 10 µL of peptide solution were incubated in Bioscreen honeycomb-well plates with 90 µl of bacterial suspension at a starting OD_{600} of 0.001 in BHI for *L. garvieae*, poor broth (peptone 10 g/L, NaCl 5 g/L) for *E. faecalis* and E. *coli*, TSB for *A. salmonicida*, HMB for *H. aquamarina* and saline poor broth (peptone 10 g/L, NaCl 15 g/L) for *Vibrio* species. Bacterial growth was monitored for 16 h by measuring OD_{600} values every 5 min (Bioscreen C, Labsystem, Finland). The peptides were tested alone at concentrations of 5 µM, 10 µM, 20 µM and 50 µM. For synergy, peptides pairs were tested at concentrations of 5 µM, 10 µM and 20 µM. Oxytetracycline at 5 µM and 10 µM was used as a positive control, and water was used as a blank. MICs were expressed in µM as an [a]–[b] concentration interval where [a] was the last concentration with bacterial growth and [b] was the first concentration with 100% bacterial growth inhibition. MBCs (minimal bactericidal concentrations) were expressed in µM as an [a]–[b] concentration interval where [a] was the last concentration with bacterial growth and [b] was the first concentration that killed 100% of the bacteria [91].

3.8. Haemolytic Assay

The haemolytic activity of the synthetic peptides was determined in triplicate on human red blood cells (RBCs) as described by Duval and collaborators [92]. Briefly, RBCs were pelleted and washed three times in phosphate-buffered saline (PBS). Then, they were resuspended in PBS to obtain a 1% solution of RBC. Ten microliters of peptide solution were incubated with 90 µL of the RBC 1% solution for 1 h at 37 °C. The peptides were diluted in PBS and tested at different concentrations: 5 µM, 20 µM, 50 µM and 100 µM. Haemolytic activity was determined by measuring the OD at 415 nm. Zero haemolysis and total (100%) haemolysis were determined with PBS and 1% Triton X-100 solutions, respectively.

4. Conclusions

In vitro challenge with *Vibrio splendidus* was sufficient to trigger the immune response and the overexpression of members of the Toll/NF-κB pathway and other immune-related factors in cuttlefish haemocytes. As no annotated AMP was identified, we carried out an in-depth in silico search with PepTraq, based on specific characteristics and expression values between control and challenge conditions. This stringent methodology allowed us to select a small list of candidates, 60% of which displayed antibacterial activity. Three peptides displayed targeted activity against *Vibrio* species, and one of them—GK28—was active at low concentrations and did not induce haemolysis of human red blood cells even at high concentrations. Considering that these three peptides were identified from a

precursor with a signal peptide, it would be interesting to validate their biological function in cuttlefish. The methodology used in this study, based on Houyvet and collaborators [35] as an alternative to classical methods requiring a lot of biological material, was focused on the reduction of animal pain and use, consistent with directive 2010/63/EU on animal care and protection.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/1660-3397/18/9/439/s1, Supporting experimental section. Table S1: Twenty most expressed transcripts in c-hct, Table S2: Twenty most expressed transcripts in Vs-hct. Table S3: Expression patterns of selected transcripts.

Author Contributions: The manuscript was written by L.B., with the following contributions from the other authors: C.Z.-G. played an important role in designing approaches and peptide selection. J.H. collected cuttlefish for the transcriptomic approach. B.H. performed in vitro assays on haemocytes. E.C. assembled and annotated the hct transcriptomes. L.B. performed antimicrobial and haemolytic assays. B.Z. developed a new version of PepTraq in collaboration with J.H. and C.Z.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We thank the "Région Normandie" for funding this work.

Acknowledgments: We thank the EFS (Etablissement Français du sang) for human blood samples. We are grateful to the Institut Français de Bioinformatique (ANR-11-INBS-0013) and the Roscoff Bioinformatics platform ABiMS (http://abims.sb-roscoff.fr) for providing help for computing and storage resources.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mitta, G.; Hubert, F.; Noël, T.; Roch, P. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 71–78. [CrossRef]
2. Birkemo, G.A.; Lüders, T.; Andersen, Ø.; Nes, I.F.; Nissen-Meyer, J. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Biochim. Biophys. Acta BBA Proteins Proteom.* **2003**, *1646*, 207–215. [CrossRef]
3. Gueguen, Y.; Herpin, A.; Aumelas, A.; Garnier, J.; Fievet, J.; Escoubas, J.-M.; Bulet, P.; Gonzalez, M.; Lelong, C.; Favrel, P.; et al. Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 313–323. [CrossRef]
4. Robinson, W.E.; McDougall, B.; Tran, D.; Selsted, M.E. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **1998**, *63*, 94–100. [CrossRef]
5. Vilas Boas, L.C.P.; de Lima, L.M.P.; Migliolo, L.; Mendes, G.D.S.; de Jesus, M.G.; Franco, O.L.; Silva, P.A. Linear antimicrobial peptides with activity against herpes simplex virus 1 and Aichi virus. *Pept. Sci.* **2017**, *108*, e22871. [CrossRef] [PubMed]
6. Fehlbaum, P.; Bulet, P.; Michaut, L.; Lagueux, M.; Broekaert, W.F.; Hetru, C.; Hoffmann, J.A. Insect immunity: Septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 33159–33163. [PubMed]
7. Benincasa, M.; Scocchi, M.; Pacor, S.; Tossi, A.; Nobili, D.; Basaglia, G.; Busetti, M.; Gennaro, R. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 950–959. [CrossRef] [PubMed]
8. Löfgren, S.E.; Miletti, L.C.; Steindel, M.; Bachère, E.; Barracco, M.A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Exp. Parasitol.* **2008**, *118*, 197–202. [CrossRef] [PubMed]
9. Brand, G.D.; Leite, J.R.S.A.; Silva, L.P.; Albuquerque, S.; Prates, M.V.; Azevedo, R.B.; Carregaro, V.; Silva, J.S.; Sá, V.C.L.; Brandão, R.A.; et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49332–49340. [CrossRef]
10. Harris, F.; Dennison, S.; Phoenix, D. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2009**, *10*, 585–606. [CrossRef]
11. Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E.W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 491–511. [CrossRef] [PubMed]
12. Stotz, H.U.; Waller, F.; Wang, K. Innate Immunity in Plants: The Role of Antimicrobial Peptides. In *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*; Springer: Basel, Switzerland, 2013; pp. 29–51. ISBN 9783034805414.

13. Paiva, A.D.; Breukink, E. Antimicrobial Peptides Produced by Microorganisms. In *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*; Springer: Basel, Switzerland, 2013; pp. 53–95. ISBN 9783034805414.
14. Sun, D.; Eccleston, E.D.; Fallon, A.M. Cloning and expression of three cecropin cDNAs from a mosquito cell line. *FEBS Lett.* **1999**, *454*, 147–151. [CrossRef]
15. Destoumieux, D.; Bulet, P.; Loew, D.; Van Dorsselaer, A.; Rodriguez, J.; Bachère, E. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp Penaeus vannamei (Decapoda). *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28398–28406. [CrossRef] [PubMed]
16. Xiao, Y.; Cai, Y.; Bommineni, Y.R.; Fernando, S.C.; Prakash, O.; Gilliland, S.E.; Zhang, G. Identification and Functional Characterization of Three Chicken Cathelicidins with Potent Antimicrobial Activity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2858–2867. [CrossRef]
17. Douglas, S.E.; Gallant, J.W.; Liebscher, R.S.; Dacanay, A.; Tsoi, S.C.M. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev. Comp. Immunol.* **2003**, *27*, 589–601. [CrossRef]
18. Houyvet, B.; Bouchon-Navaro, Y.; Bouchon, C.; Goux, D.; Bernay, B.; Corre, E.; Zatylny-Gaudin, C. Identification of a moronecidin-like antimicrobial peptide in the venomous fish Pterois volitans: Functional and structural study of pteroicidin-α. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *72*, 318–324. [CrossRef]
19. Leoni, G.; De Poli, A.; Mardirossian, M.; Gambato, S.; Florian, F.; Venier, P.; Wilson, D.; Tossi, A.; Pallavicini, A.; Gerdol, M. Myticalins: A Novel Multigenic Family of Linear, Cationic Antimicrobial Peptides from Marine Mussels (*Mytilus* spp.). *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 261. [CrossRef]
20. Gerdol, M.; Gomez-Chiarri, M.; Castillo, M.G.; Figueras, A.; Fiorito, G.; Moreira, R.; Novoa, B.; Pallavicini, A.; Ponte, G.; Roumbedakis, K.; et al. Immunity in Molluscs: Recognition and Effector Mechanisms, with a Focus on Bivalvia. In *Advances in Comparative Immunology*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 225–341, ISBN 9781461490654.
21. Gonzalez, M.; Gueguen, Y.; Desserre, G.; de Lorgeril, J.; Romestand, B.; Bachère, E. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **2007**, *31*, 332–339. [CrossRef]
22. Gueguen, Y.; Bernard, R.; Julie, F.; Paulina, S.; Delphine, D.-G.; Franck, V.; Philippe, B.; Evelyne, B. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Mol. Immunol.* **2009**, *46*, 516–522. [CrossRef]
23. Mitta, G.; Vandenbulcke, F.; Hubert, F.; Roch, P. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 4233–4242.
24. Rosa, R.D.; Santini, A.; Fievet, J.; Bulet, P.; Destoumieux-Garzón, D.; Bachère, E. Big Defensins, a Diverse Family of Antimicrobial Peptides That Follows Different Patterns of Expression in Hemocytes of the Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25594. [CrossRef] [PubMed]
25. Wang, Y.; Zeng, Z.; Zhang, X.; Shi, Q.; Wang, C.; Hu, Z.; Li, H. Identification and characterization of a novel defensin from Asian green mussel *Perna viridis*. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *74*, 242–249. [CrossRef] [PubMed]
26. He, J.; Liang, H.; Zhu, J.; Fang, X. Separation, identification and gene expression analysis of PmAMP-1 from *Pinctada fucata martensii*. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *92*, 728–735. [CrossRef] [PubMed]
27. Yang, D.; Zhang, Q.; Wang, Q.; Chen, L.; Liu, Y.; Cong, M.; Wu, H.; Li, F.; Ji, C.; Zhao, J. A defensin-like antimicrobial peptide from the manila clam *Ruditapes philippinarum*: Investigation of the antibacterial activities and mode of action. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *80*, 274–280. [CrossRef]
28. Li, M.; Zhu, L.; Zhou, C.; Sun, S.; Fan, Y.; Zhuang, Z. Molecular characterization and expression of a novel big defensin (*Sb*-BDef1) from ark shell, *Scapharca broughtonii*. *Fish Shellfish Immunol.* **2012**, *33*, 1167–1173. [CrossRef]
29. Liao, Z.; Wang, X.C.; Liu, H.H.; Fan, M.H.; Sun, J.J.; Shen, W. Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, *34*, 610–616. [CrossRef]
30. Charlet, M.; Chernysh, S.; Philippe, H.; Hetru, C.; Hoffmann, J.A.; Bulet, P. Isolation of Several Cystein-rich Antimicrobial Peptides from the Blood of a Mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21808–21813. [CrossRef]
31. Zhao, J.; Li, C.; Chen, A.; Li, L.; Su, X.; Li, T. Molecular Characterization of a Novel Big Defensin from Clam *Venerupis philippinarum*. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13480. [CrossRef]
32. Wang, D.; Li, F.; Li, S.; Wen, R.; Xiang, J. Expression profiles of antimicrobial peptides (AMPs) and their regulation by Relish. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **2012**, *30*, 611–619. [CrossRef]

33. Dolashka, P.; Moshtanska, V.; Borisova, V.; Dolashki, A.; Stevanovic, S.; Dimanov, T.; Voelter, W. Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. *Peptides* **2011**, *32*, 1477–1483. [CrossRef]
34. De Zoysa, M.; Whang, I.; Lee, Y.; Lee, S.; Lee, J.-S.; Lee, J. Defensin from disk abalone *Haliotis discus discus:* Molecular cloning, sequence characterization and immune response against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* **2010**, *28*, 261–266. [CrossRef] [PubMed]
35. Houyvet, B.; Zanuttini, B.; Corre, E.; Le Corguillé, G.; Henry, J.; Zatylny-Gaudin, C. Design of antimicrobial peptides from a cuttlefish database. *Amino Acids* **2018**, *50*, 1573–1582. [CrossRef] [PubMed]
36. Farto, R.; Armada, S.P.; Montes, M.; Guisande, J.A.; Pérez, M.J.; Nieto, T.P. Vibrio lentus associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Invertebr. Pathol.* **2003**, *83*, 149–156. [CrossRef]
37. Prado, S.; Dubert, J.; da Costa, F.; Martínez-Patiño, D.; Barja, J.L. Vibrios in hatchery cultures of the razor clam, *Solen marginatus* (Pulteney). *J. Fish Dis.* **2014**, *37*, 209–217. [CrossRef]
38. Rojas, R.; Miranda, C.D.; Opazo, R.; Romero, J. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *124*, 61–69. [CrossRef] [PubMed]
39. Pujalte, M.; Sitjà-Bobadilla, A.; Álvarez-Pellitero, P.; Garay, E. Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Dis. Aquat. Organ.* **2003**, *54*, 119–126. [CrossRef]
40. Lasa, A.; Avendaño-Herrera, R.; Estrada, J.M.; Romalde, J.L. Isolation and identification of *Vibrio toranzoniae* associated with diseased red conger eel (*Genypterus chilensis*) farmed in Chile. *Vet. Microbiol.* **2015**, *179*, 327–331. [CrossRef]
41. Benoist, L.; Corre, E.; Bernay, B.; Henry, J.; Zatylny-Gaudin, C. -Omic Analysis of the *Sepia officinalis* White Body: New Insights into Multifunctionality and Haematopoiesis Regulation. *J. Proteome Res.* **2020**, *19*, 3072–3087. [CrossRef]
42. Zatylny-Gaudin, C.; Cornet, V.; Leduc, A.; Zanuttini, B.; Corre, E.; Le Corguillé, G.; Bernay, B.; Garderes, J.; Kraut, A.; Couté, Y.; et al. Neuropeptidome of the Cephalopod *Sepia officinalis*: Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 48–67. [CrossRef]
43. Cornet, V.; Henry, J.; Corre, E.; Le Corguille, G.; Zanuttini, B.; Zatylny-Gaudin, C. Dual role of the cuttlefish salivary proteome in defense and predation. *J. Proteom.* **2014**, *108*, 209–222. [CrossRef]
44. Castellanos-Martínez, S.; Arteta, D.; Catarino, S.; Gestal, C. De novo transcriptome sequencing of the *Octopus vulgaris* hemocytes using illumina RNA-Seq technology: Response to the infection by the gastrointestinal parasite *Aggregata octopiana*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107873. [CrossRef] [PubMed]
45. Gestal, C.; Costa, M.; Figueras, A.; Novoa, B. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides. *Gene* **2007**, *406*, 134–143. [CrossRef] [PubMed]
46. Mateo, D.R.; Greenwood, S.J.; Araya, M.T.; Berthe, F.C.J.; Johnson, G.R.; Siah, A. Differential gene expression of γ-actin, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in *Mya arenaria* haemocytes induced by in vivo infections with two *Vibrio splendidus* strains. *Dev. Comp. Immunol.* **2010**, *34*, 710–714. [CrossRef] [PubMed]
47. Araya, M.T.; Siah, A.; Mateo, D.R.; Markham, F.; McKenna, P.; Johnson, G.R.; Berthe, F.C.J. Morphological and Molecular Effects of *Vibrio splendidus* on Hemocytes of Softshell Clams, *Mya arenaria*. *J. Shellfish Res.* **2009**, *28*, 751–758. [CrossRef]
48. Herath, H.M.L.P.B.; Elvitigala, D.A.S.; Godahewa, G.I.; Whang, I.; Lee, J. Molecular insights into a molluscan transferrin homolog identified from disk abalone (*Haliotis discus discus*) evidencing its detectable role in host antibacterial defense. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *53*, 222–233. [CrossRef]
49. Richards, R.C.; O'Neil, D.B.; Thibault, P.; Ewart, K.V. Histone H1: An Antimicrobial Protein of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *284*, 549–555. [CrossRef]
50. Fernandes, J.M.O.; Molle, G.; Kemp, G.D.; Smith, V.J. Isolation and characterisation of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* **2004**, *28*, 127–138. [CrossRef]
51. Cornet, V.; Henry, J.; Corre, E.; Le Corguillé, G.; Zatylny-Gaudin, C. The Toll/NF-κB pathway in cuttlefish symbiotic accessory nidamental gland. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *53*, 42–46. [CrossRef]

52. Li, Y.-F.; Liu, Y.-Z.; Chen, Y.-W.; Chen, K.; Batista, F.M.; Cardoso, J.C.R.; Chen, Y.-R.; Peng, L.-H.; Zhang, Y.; Zhu, Y.-T.; et al. Two toll-like receptors identified in the mantle of Mytilus coruscus are abundant in haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *90*, 134–140. [CrossRef]
53. Toubiana, M.; Gerdol, M.; Rosani, U.; Pallavicini, A.; Venier, P.; Roch, P. Toll-like receptors and MyD88 adaptors in Mytilus: Complete cds and gene expression levels. *Dev. Comp. Immunol.* **2013**, *40*, 158–166. [CrossRef]
54. Qiu, L.; Song, L.; Xu, W.; Ni, D.; Yu, Y. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**, *22*, 451–466. [CrossRef] [PubMed]
55. Wei, J.; Liu, B.; Fan, S.; Li, H.; Chen, M.; Zhang, B.; Su, J.; Meng, Z.; Yu, D. Differentially expressed immune-related genes in hemocytes of the pearl oyster *Pinctada fucata* against allograft identified by transcriptome analysis. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *62*, 247–256. [CrossRef] [PubMed]
56. Toubiana, M.; Rosani, U.; Giambelluca, S.; Cammarata, M.; Gerdol, M.; Pallavicini, A.; Venier, P.; Roch, P. Toll signal transduction pathway in bivalves: Complete cds of intermediate elements and related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, *45*, 300–312. [CrossRef] [PubMed]
57. Jiang, Q.; Liu, Z.; Zhou, Z.; Wang, L.; Wang, L.; Yue, F.; Wang, J.; Wang, H.; Song, L. Transcriptional activation and translocation of ancient NOS during immune response. *FASEB J.* **2016**, *30*, 3527–3540. [CrossRef]
58. Dziarski, R.; Gupta, D. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* **2006**, *7*, 232. [CrossRef]
59. Ni, D.; Song, L.; Wu, L.; Chang, Y.; Yu, Y.; Qiu, L.; Wang, L. Molecular cloning and mRNA expression of peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene in bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Dev. Comp. Immunol.* **2007**, *31*, 548–558. [CrossRef]
60. Su, J.; Ni, D.; Song, L.; Zhao, J.; Qiu, L. Molecular cloning and characterization of a short type peptidoglycan recognition protein (CfPGRP-S1) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**, *23*, 646–656. [CrossRef]
61. Gonzalez, M.; Gueguen, Y.; Destoumieux-Garzon, D.; Romestand, B.; Fievet, J.; Pugniere, M.; Roquet, F.; Escoubas, J.-M.; Vandenbulcke, F.; Levy, O.; et al. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17759–17764. [CrossRef]
62. Gorbushin, A.M.; Borisova, E.A. Lectin-like molecules in transcriptome of *Littorina littorea* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *48*, 210–220. [CrossRef]
63. Kumar, P.; Kannan, M.; ArunPrasanna, V.; Vaseeharan, B.; Vijayakumar, S. Proteomics analysis of crude squid ink isolated from *Sepia esculenta* for their antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic properties. *Microb. Pathog.* **2018**, *116*, 345–350. [CrossRef]
64. Ezquerra-Brauer, J.M.; Miranda, J.M.; Chan-Higuera, J.E.; Barros-Velázquez, J.; Aubourg, S.P. New icing media for quality enhancement of chilled hake (*Merluccius merluccius*) using a jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 3412–3419. [CrossRef] [PubMed]
65. Abdelmalek, B.E.; Sila, A.; Krichen, F.; Karoud, W.; Martinez-Alvarez, O.; Ellouz-Chaabouni, S.; Ayadi, M.A.; Bougatef, A. Sulfated polysaccharides from *Loligo vulgaris* skin: Potential biological activities and partial purification. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 1143–1151. [CrossRef] [PubMed]
66. Halverson, T.; Basir, Y.J.; Knoop, F.C.; Conlon, J.M. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the North American green frog *Rana clamitans*. *Peptides* **2000**, *21*, 469–476. [CrossRef]
67. Conlon, J.M.; Coquet, L.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Vaudry, H.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Bevier, C.R.; Moler, P.E. Peptidomic analysis of skin secretions from *Rana heckscheri* and *Rana okaloosae* provides insight into phylogenetic relationships among frogs of the *Aquarana* species group. *Regul. Pept.* **2007**, *138*, 87–93. [CrossRef]
68. Gao, B.; Zhu, S. *Mesobuthus* Venom-Derived Antimicrobial Peptides Possess Intrinsic Multifunctionality and Differential Potential as Drugs. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–20. [CrossRef] [PubMed]
69. Oyama, L.B.; Girdwood, S.E.; Cookson, A.R.; Fernandez-Fuentes, N.; Privé, F.; Vallin, H.E.; Wilkinson, T.J.; Golyshin, P.N.; Golyshina, O.V.; Mikut, R.; et al. The rumen microbiome: An underexplored resource for novel antimicrobial discovery. *npj Biofilms Microbiomes* **2017**, *3*, 33. [CrossRef]
70. Azkargorta, M.; Bregón-Villahoz, M.; Escobes, I.; Ibáñez-Pérez, J.; Iloro, I.; Iglesias, M.; Diez-Zapirain, M.; Rabanal, A.; Prieto, B.; Moragues, M.-D.; et al. In-depth proteomics and natural peptidomics analyses reveal antibacterial peptides in human endometrial fluid. *J. Proteom.* **2020**, *216*, 103652. [CrossRef]

71. Sangster, C.R.; Smolowitz, R.M. Description of Vibrio alginolyticus Infection in Cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*. *Biol. Bull.* **2003**, *205*, 233–234. [CrossRef]
72. Frans, I.; Michiels, C.W.; Bossier, P.; Willems, K.A.; Lievens, B.; Rediers, H. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *J. Fish Dis.* **2011**, *34*, 643–661. [CrossRef]
73. Menanteau-Ledouble, S.; Kumar, G.; Saleh, M.; El-Matbouli, M. *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. *Dis. Aquat. Organ.* **2016**, *120*, 49–68. [CrossRef]
74. Fichi, G.; Cardeti, G.; Perrucci, S.; Vanni, A.; Cersini, A.; Lenzi, C.; De Wolf, T.; Fronte, B.; Guarducci, M.; Susini, F. Skin lesion-associated pathogens from *Octopus vulgaris*: First detection of *Photobacterium swingsii*, *Lactococcus garvieae* and betanodavirus. *Dis. Aquat. Organ.* **2015**, *115*, 147–156. [CrossRef] [PubMed]
75. Martinez-Urtaza, J.; Lozano-Leon, A.; DePaola, A.; Ishibashi, M.; Shimada, K.; Nishibuchi, M.; Liebana, E. Characterization of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from Clinical Sources in Spain and Comparison with Asian and North American Pandemic Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4672–4678. [CrossRef] [PubMed]
76. Mishra, B.; Wang, X.; Lushnikova, T.; Zhang, Y.; Golla, R.M.; Narayana, J.L.; Wang, C.; McGuire, T.R.; Wang, G. Antibacterial, antifungal, anticancer activities and structural bioinformatics analysis of six naturally occurring temporins. *Peptides* **2018**, *106*, 9–20. [CrossRef] [PubMed]
77. Cellura, C.; Toubiana, M.; Parrinello, N.; Roch, P. Specific expression of antimicrobial peptide and *HSP70* genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**, *22*, 340–350. [CrossRef]
78. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [CrossRef]
79. Grabherr, M.G.; Haas, B.J.; Yassour, M.; Levin, J.Z.; Thompson, D.A.; Amit, I.; Adiconis, X.; Fan, L.; Raychowdhury, R.; Zeng, Q.; et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 644–652. [CrossRef]
80. Li, B.; Dewey, C.N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform.* **2011**, *12*, 323. [CrossRef]
81. Haas, B.J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Philip, D.; Bowden, J.; Couger, M.B.; Eccles, D.; Li, B.; Macmanes, M.D.; et al. *De novo* transcript sequence recostruction from RNA-Seq: Reference generation and analysis with Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1494–1512. [CrossRef]
82. Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D.H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 59–60. [CrossRef]
83. Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 785–786. [CrossRef]
84. Krogh, A.; Larsson, B.; Von Heijne, G.; Sonnhammer, E.L.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 567–580. [CrossRef] [PubMed]
85. Finn, R.D.; Bateman, A.; Clements, J.; Coggill, P.; Eberhardt, R.Y.; Eddy, S.R.; Heger, A.; Hetherington, K.; Holm, L.; Mistry, J.; et al. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 222–230. [CrossRef] [PubMed]
86. Letunic, I.; Bork, P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D493–D496. [CrossRef] [PubMed]
87. Hiller, K.; Grote, A.; Scheer, M.; Munch, R.; Jahn, D. PrediSi: Prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W375–W379. [CrossRef] [PubMed]
88. Waghu, F.H.; Barai, R.S.; Gurung, P.; Idicula-Thomas, S. CAMP R3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides: Table 1. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1094–D1097. [CrossRef] [PubMed]
89. Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1087–D1093. [CrossRef]
90. Gautier, R.; Douguet, D.; Antonny, B.; Drin, G. HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific -helical properties. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 2101–2102. [CrossRef]

91. Hetru, C.; Bulet, P. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods Mol. Biol.* **1997**, *78*, 35–49. [CrossRef]
92. Duval, E.; Zatylny, C.; Laurencin, M.; Baudy-Floc'h, M.; Henry, J. KKKKPLFGLFFGLF: A cationic peptide designed to exert antibacterial activity. *Peptides* **2009**, *30*, 1608–1612. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Supporting information

In-depth in silico search for cuttlefish (Sepia officinalis) antimicrobial peptides following bacterial challenge of haemocytes.

Louis Benoist[1,2], Baptiste Houyvet[1,2,5], Joël Henry[1,2], Erwan Corre[4], Bruno Zanuttini[3] and Céline Zatylny-Gaudin[1,2,*]

[1] NORMANDIE UNIV, UNICAEN, CNRS, BOREA, 14000 CAEN, France
[2] Laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen-Normandie, MNHN, SU, UA, CNRS, IRD, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France
[3] Normandie Univ., UNICAEN, ENSICAEN, CNRS; GREYC, 14 000 Caen, France
[4] Plateforme ABiMS, Station Biologique de Roscoff (CNRS-Sorbonne Université), 29688 Roscoff, France
[5] SATMAR, Société ATlantique de MARiculture, Research and Development Department, Gatteville, France

*Corresponding author: celine.gaudin@unicaen.fr

Supporting experimental section 107

Supplemental Tables:

Table S1. Twenty most expressed transcripts in c-hct 108

Table S2. Twenty most expressed transcripts in *Vs*-hct 109

Table S3. Expression pattern of selected transcripts 110

Supporting experimental section

Detailed quality control and cDNA library preparation protocols

Total RNA was quantified using a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.), and its integrity was assessed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Libraries were generated from 250 ng of total RNA as follows: mRNA enrichment was performed using the NEBNext Poly(A) Magnetic Isolation Module (New England BioLabs). cDNA synthesis was achieved using NEBNext RNA First Strand Synthesis and NEBNext Ultra Directional RNA Second Strand Synthesis Modules (New England BioLabs). The remaining steps of library preparation were performed using NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs). Adapters and PCR primers were purchased from New England BioLabs. Libraries were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies) and the Kapa Illumina GA with Revised Primers-SYBR Fast Universal kit (Kapa Biosystems). Average size fragment was determined using a LabChip GX (PerkinElmer) instrument.

Supplementary Tables:

Table S1. Twenty most expressed transcripts in c-hct (°: c-hct-specific transcripts)

			Expression (TPM)		
	Name	Transcript	c-hct	*Vs*-hct	Fold change
1	Transferrin	TR90372|c1_g1_i1	28022.57	27562.43	0.98
2	Neurofilament	TR19485|c1_g1_i1	**26823.13**	23315.72	0.87
3	Chitin deacetylase	TR33375|c0_g1_i1	16019.63	14894.69	0.93
4	Structural polyprotein	TR42824|c0_g1_i1	**14678.55**	10635.02	0.72
5	Polyubiquitin	TR38732|c0_g23_i1	**7339.71**	5075.77	0.69
6	Filamin-A	TR33303|c3_g1_i1	**6632.45**	5638.52	0.85
7	Unknown 1	TR41826|c5_g19_i2	6351.18	**10524.84**	1.66
8	Ferritin	TR34156|c1_g1_i1	**5373.48**	3223.95	0.60
9	Unknown 2	TR39529|c1_g1_i1	4465.00	**6042.63**	1.35
10	Tropomyosin	TR38640|c3_g1_i7	**4452.91**	3596.50	0.81
11	Unknown 3	TR42689|c4_g10_i1	**4086.45**	2463.57	0.60
12	Matrix metalloproteinase	TR35643|c1_g1_i1	**3933.39**	2220.67	0.56
13	Matrilin-2°	TR5676|c0_g1_i1	**3770.58**	1647.49	0.44
14	Actin	TR37733|c5_g10_i2	**3672.30**	2996.36	0.82
15	Matrilin-3	TR42669|c4_g1_i1	**3612.10**	2030.77	0.56
16	Riboflavin kinase	TR58606|c1_g1_i1	3441.99	**4689.02**	1.36
17	Dynein light chain	TR42526|c19_g12_i4	**3329.41**	2603.44	0.78
18	Unknown 4	TR36711|c0_g3_i2	**2752.47**	2320.78	0.84
19	Unknown 5°	TR74858|c0_g1_i1	**2630.99**	1100.13	0.42
20	Perivitellin	TR38132|c1_g1_i1	2420.55	**2693.39**	1.11

Table S2. Twenty most expressed transcripts in Vs-hct (*: Vs-hct-specific transcripts)

			Expression (TPM)		
	Name	Transcript	c-hct	*Vs*-hct	Fold change
1	Transferrin	TR90372|c1_g1_i1	28022.57	27562.43	0.98
2	Neurofilament	TR19485|c1_g1_i1	**26823.13**	23315.72	0.87
3	Chitin deacetylase	TR33375|c0_g1_i1	16019.63	14894.69	0.93
4	Structural polyprotein	TR42824|c0_g1_i1	**14678.55**	10635.02	0.72
5	Unknown 1	TR41826|c5_g19_i2	6351.18	**10524.84**	1.66
6	Unknown 2	TR39529|c1_g1_i1	4465.00	**6042.63**	1.35
7	Filamin-A	TR33303|c3_g1_i1	**6632.45**	5638.52	0.85
8	Polyubiquitin	TR38732|c0_g23_i1	**7339.71**	5075.77	0.69
9	Riboflavin kinase	TR58606|c1_g1_i1	3441.99	**4689.02**	1.36
10	Histone H1*	TR41094|c2_g12_i1	2280.01	**4563.54**	2.00
11	Tropomyosin	TR38640|c3_g1_i7	**4452.91**	3596.50	0.81
12	Ferritin	TR34156|c1_g1_i1	**5373.48**	3223.95	0.60
13	Actin	TR37733|c5_g10_i2	**3672.30**	2996.36	0.82
14	Perivitellin	TR38132|c1_g1_i1	2420.55	**2693.39**	1.11
15	Unknown 6*	TR38730|c4_g1_i1	2123.73	**2653.98**	1.25
16	Dynein light chain	TR42526|c19_g12_i4	**3329.41**	2603.44	0.78
17	Unknown 3	TR42689|c4_g10_i1	**4086.45**	2463.57	0.60
18	Unknown 4	TR36711|c0_g3_i2	**2752.47**	2320.78	0.84
19	Matrix metalloproteinase	TR35643|c1_g1_i1	**3933.39**	2220.67	0.56
20	Matrilin-3	TR42669|c4_g1_i1	**3612.10**	2030.77	0.56

Table S3. Expression patterns of selected transcripts. (ED: embryo, ISF: ink sac female, ISM: ink sac male, S: skin).

Transcript ID	Expression (TPM)					
	***Vs*-hct**	**c-hct**	**EB**	**ISF**	**ISM**	**S**
TR42258|c1_g1_i1	7.566	8.928	36.498	4.556	3.755	23.107
TR27534|c0_g1_i1	23.786	17.388	3.984	1.758	1.58	10.381
TR36613|c0_g1_i1	17.011	20.28	19.871	5.199	6.307	20.806
TR42563|c7_g3_i1	0.775	1.992	0	0	0	0.319
TR5654|c0_g1_i1	17.331	9.773	59.912	42.483	30.16	61.859

3. Discussion

L'approche transcriptomique menée sur les hémocytes exposés *in vitro* ou non à *V. splendidus* a permis l'identification de facteurs immunitaires pouvant être exprimés différentiellement en présence ou non de bactéries. Une première analyse basée sur l'annotation et la recherche de motifs conservés au sein d'organismes Protostomiens ou Vertébrés a permis l'identification de membres de la voie de signalisation Toll/NF-κB ainsi que d'effecteurs comme la *Bactericidal Permeability-Increasing protein/Lipopolysaccharide-Binding Protein* (BPI/LBP), des *PeptidoGlycan Recognition Proteins* (PGRP) ou encore la *Nitric Oxide Synthase* inductible (iNOS). Aucun PAM n'ayant été identifié lors de cette première analyse, une deuxième recherche *in silico* approfondie a été menée en utilisant notamment le logiciel PepTraq et en se basant sur une précédente étude (Houyvet *et al.*, 2018). Cette analyse a permis l'identification de cinq candidats dont trois possèdent une activité antimicrobienne ciblée contre les bactéries du genre *Vibrio*.

Chez les Céphalopodes, la recherche de PAM demeure difficile. La recherche de motifs conservés entre les PAM appartenant à des grandes familles comme celle des défensines bien caractérisée chez les Protostomiens ou les Vertébrés reste vaine. Cependant, la recherche à partir de motifs conservés a ses limites, certaines familles de PAM étant spécifiques comme celle des myticines (Mitta *et al.*, 1999) ou des myticalines (Leoni *et al.*, 2017) chez les moules ou des Pénaeidines (Destoumieux *et al.*, 1997, Gueguen *et al.*, 2006a) chez les crevettes du genre *Penaeus*. Ainsi les PAM de Céphalopodes pourraient appartenir à de nouvelles familles spécifiques à cette classe de Mollusques.

Par ailleurs, plusieurs PAM d'hémocytes de Mollusques ont été identifiés après induction *via* l'exposition à des bactéries par injection (Liao *et al.*, 2013, He *et al.*, 2019), balnéation (Gueguen *et al.*, 2009) ou piqûres répétés avec une aiguille contaminée (Charlet *et al.*, 1996) ; ou purification et tests antimicrobiens des différentes fractions (Mitta *et al.*, 1999, Liao *et al.*, 2013, He *et al.*, 2019). Ces techniques sont longues, invasives et nécessitent de grandes quantités de matériel biologique. Or, les Céphalopodes appartiennent aux espèces soumises à réglementation par la directive 2010/63/EU relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Ainsi certaines approches jugées trop invasives sont à limiter et l'utilisation d'un minimum d'animaux est encouragée. De nouvelles approches sont donc à

mettre en place chez les Céphalopodes et ont été initiées par le travail de Houyvet et collaborateurs (2018), basé sur l'analyse *in silico* de banques de données transcriptomiques. L'approche menée sur les hémocytes chez la seiche pour ce chapitre s'inscrit dans cette continuité et a démontré l'efficacité d'une exposition *in vitro* à une bactérie. Toutefois, afin d'étudier la réponse immunitaire face à un large panel de pathogènes et d'explorer davantage la diversité des PAM chez la seiche, il serait intéressant d'analyser la réponse obtenue en présence d'autres espèces bactériennes. En effet, chez *Fenneropenaeus chinensis*, différents profils d'expression sont obtenus pour plusieurs PAM après injection de *Vibrio anguillarum*, une Gram négative ou *Micrococcus lysodeikticus*, une Gram positive (Wang *et al.*, 2012a). Des résultats similaires ont été obtenus chez *Mytilus galloprovincialis* chez qui les profils d'expressions de plusieurs PAM ainsi que de la *Heat Shock Protein* (HSP70) diffèrent après injection de *V. splendidus* ou *V. anguillarum*, mais restent inchangés après injection de *M. lysodeikticus* (Cellura *et al.*, 2007).

Il est également important de noter que la recherche *in silico* n'est pas infaillible. Il est possible qu'il y ait eu des erreurs par rapport à l'analyse des transcrits. Il est donc indispensable de confirmer la présence des peptides chez la seiche par des analyses en spectrométrie de masse. Par ailleurs, l'utilisation des algorithmes de prédictions a également montré ses limites. En effet chez la seiche, un peptide prédit comme non antimicrobien a révélé une activité antimicrobienne (Houyvet *et al.*, 2018). Au niveau des hémocytes, le peptide le plus actif, GK28, possède des scores inférieurs pour deux algorithmes que LV25 qui est pourtant non actif. Certains peptides possédant un score peu élevé ont donc pu être ignorés, il est donc important de croiser plusieurs données comme les valeurs d'expression utilisées dans notre étude.

Chapitre 3. Peau, mucus et microbiome associé

1. Introduction

1.1. La Peau des organismes aquatiques : barrière entre le milieu interne et un environnement extérieur complexe

Les organismes aquatiques se caractérisent par leur contact permanent avec un milieu extérieur riche en microorganismes comprenant des bactéries, des champignons et des virus, dont certains sont pathogènes pour les organismes aquatiques comme les Poissons (Austin, 2011) ou les Protostomiens (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016). La première barrière joue donc un rôle important pour maintenir l'intégrité du milieu interne. Chez de nombreux organismes aquatiques, la première barrière est la peau comme chez les Poissons, les Amphibiens, les Annélides ou les Céphalopodes.

1.1.1. Structure de la peau chez les organismes aquatiques

Chez les Poissons et les Amphibiens, et notamment les Anoures, la peau a fait l'objet de nombreuses études (Rakers *et al.*, 2010, Varga *et al.*, 2019). Chez ces animaux, la peau se structure en deux couches : le derme en profondeur et l'épiderme en surface recouvert d'un mucus (Figure 27). Chez les Poissons, l'épiderme est un épithélium pluristratifié composé d'une majorité de cellules squameuses accompagnées de cellules muqueuses. Le derme, sous l'épiderme, est riche en tissu conjonctif et présente des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. La majorité des cellules du derme sont des fibroblastes (Rakers *et al.*, 2010). D'autres types cellulaires sont également présents au niveau du derme et de l'épiderme comme des cellules impliquées dans la formation des écailles, des cellules pigmentaires (mélanocytes) et des cellules immunitaires (Ángeles Esteban et Cerezuela, 2015). Chez les Anoures, l'épiderme est composé de 5 à 7 couches cellulaires reposant sur une membrane basale. Le derme est composé de tissu conjonctif associé à des fibres nerveuses, des vaisseaux sanguins, des cellules pigmentaires (chromatophores) et des glandes muqueuses et séreuses (Haslam *et al.*, 2014).

Plusieurs types de cellules immunitaires ont été décrits au niveau de la peau chez les Poissons et les Anoures. Les mastocystes, cellules à granules éosinophiles impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire, ont été identifiées au niveau de la peau chez *Xenopus laevis* (Haslam *et al.*, 2014).

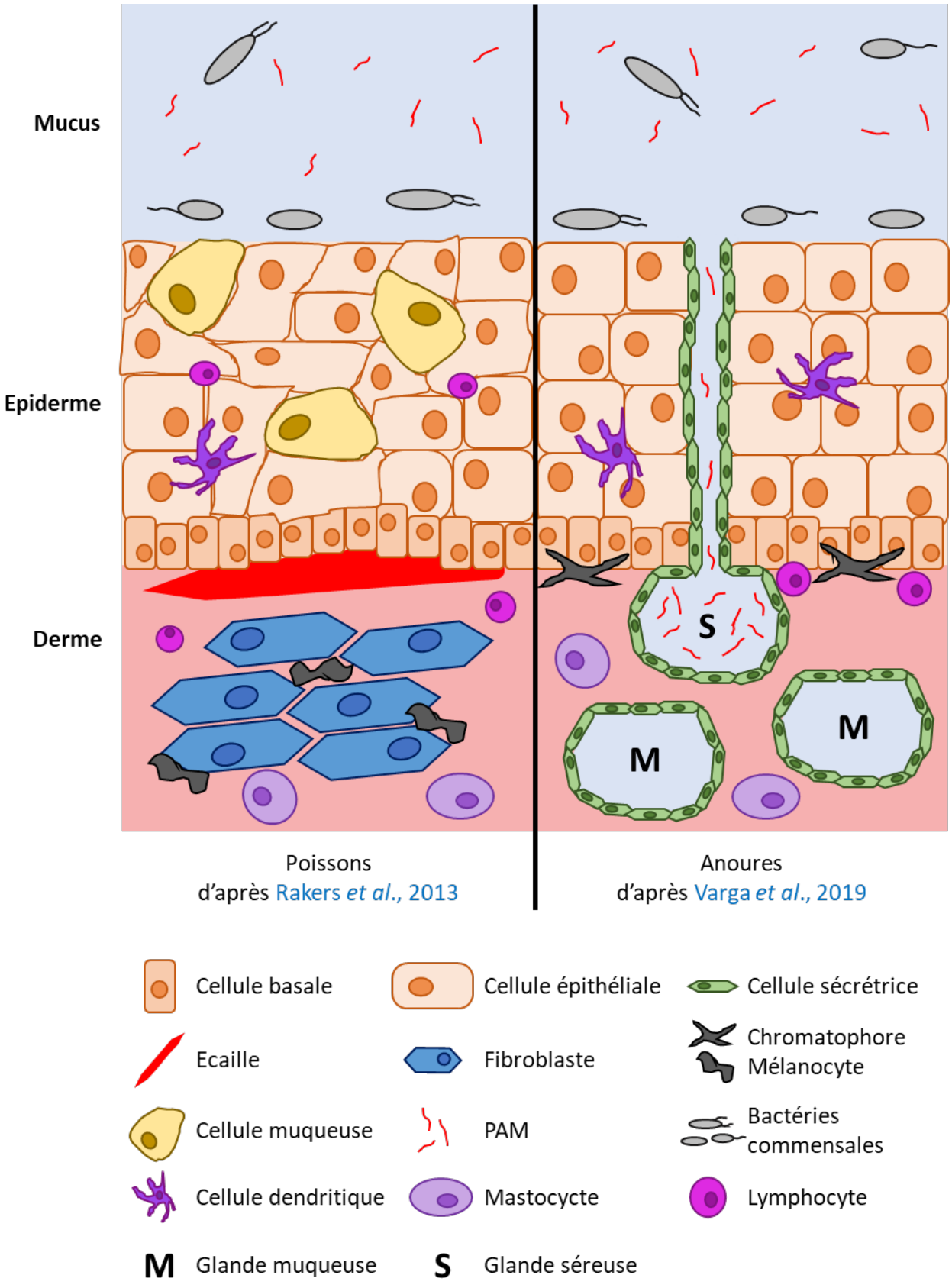


Figure 27. Représentation schématique de la peau chez les Poissons et les Anoures (d'après Rakers *et al.*, 2013 et Varga *et al.*, 2019).

Ils sont à l'origine de la production de Peptides AntiMicrobiens (PAM) chez les Poissons (Silphaduang et Noga, 2001). Des lymphocytes B et T, ont également été décrits au niveau de la peau de Poissons (Grøntvedt et Espelid, 2003) et d'Anoures (Ramanayake *et al.*, 2007). Cependant, ces cellules pourraient ne pas être présentes « naturellement » au niveau de la peau mais être recrutées lors d'une réaction immunitaire ou inflammatoire (Ángeles Esteban, 2012, Varga *et al.*, 2019). Ce recrutement pourrait s'opérer par l'intermédiaire des cellules dendritiques qui agissent comme messagers dans les réponses immunitaires innées et acquises (Banchereau et Steinman, 1998) et qui ont été mises en évidence au niveau de la peau des Poissons (Bassity et Clark, 2012) et des Amphibiens (Castell-Rodríguez *et al.*, 2001).

Chez les Bivalves et les Gastéropodes, qui représentent la majorité des espèces de Mollusques, il n'existe pas de peau à proprement parlé mais un simple épiderme recouvert de mucus, constitué d'une ou plusieurs couches de cellules supportées par une membrane basale (Figure 28). Cet épiderme est retrouvé au niveau de différentes structures internes et externes comme les branchies ou le manteau, et est composé de trois types cellulaires principaux : les cellules épidermiques, sécrétrices et ciliées. Au niveau du manteau, des cellules épithéliales spécialisées sont impliquées dans la formation de la coquille (McDougall et Degnan, 2018). Chez d'autres Protostomiens aquatiques appartenant aux Annélides, un épiderme est également présent, recouvert lui aussi de mucus. Chez ces animaux, l'épiderme est un épithélium pseudostratifié composé de plusieurs types cellulaires et protégé par une cuticule (Mastrodonato *et al.*, 2006, Katz *et al.*, 2010, Rodrigo *et al.*, 2018).

Chez les Céphalopodes, une véritable peau composée d'un épiderme et d'un derme est présente. L'épiderme est majoritairement constitué de cellules glandulaires produisant du mucus. Le derme est quant à lui riche en tissu conjonctif et renferme des chromatophores, des iridophores et des leucophores (Mangold *et al.*, 1989). Ces cellules pigmentaires permettent à la seiche d'adopter des motifs de couleur très variés impliqués dans les relations intra- ou inter-espèces. En effet, chez les Céphalopodes, la peau joue un rôle important dans la protection vis-à-vis des prédateurs et dans la prédation *via* ses capacités de camouflage associant des changements de couleur et d'aspect (Mäthger *et al.*, 2009b). Chez *Sepia officinalis*, les mâles matures sont en compétition lors de la reproduction et adoptent un motif zébré lorsqu'un mâle rival est aperçu (Mäthger *et al.*, 2009a).

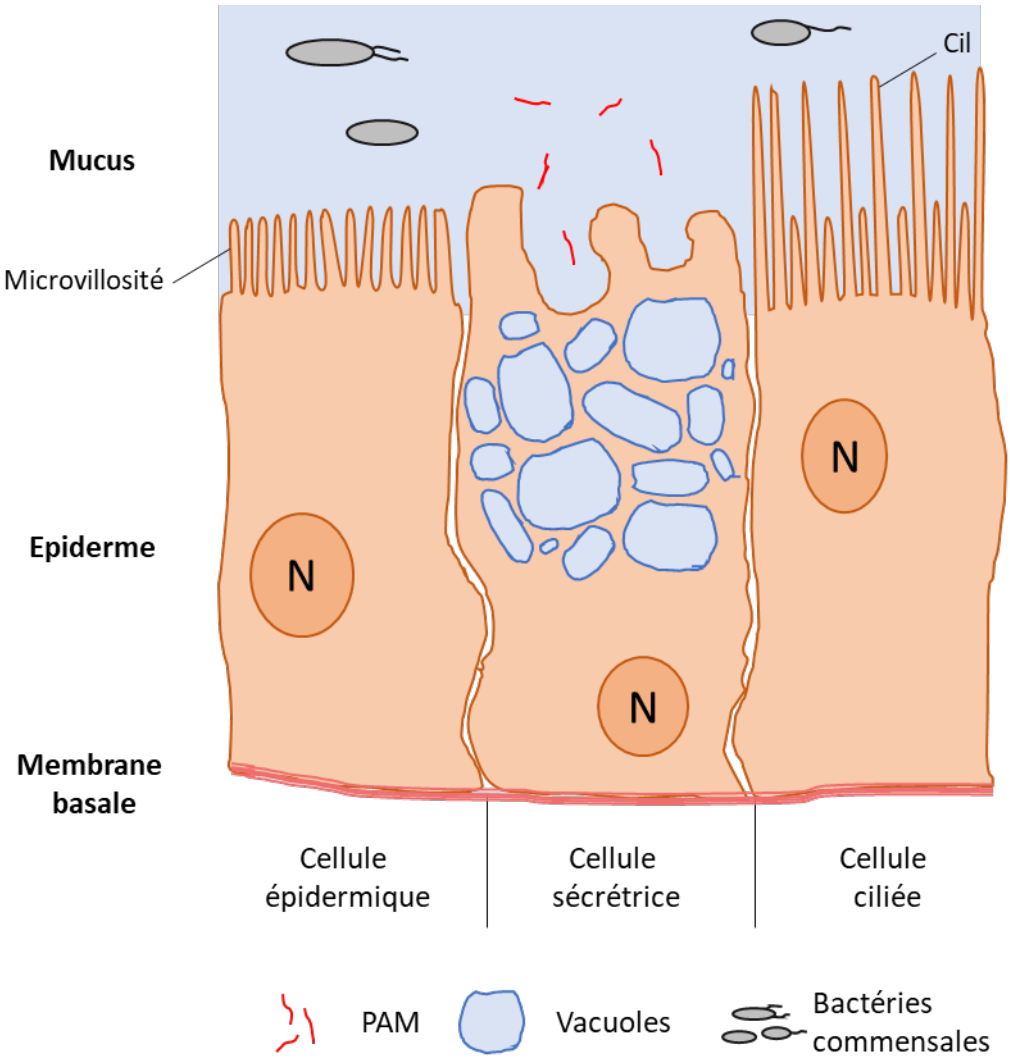


Figure 28. Représentation schématique des types cellulaires de l'épiderme chez les Mollusques (d'après Allam et Espinosa, 2015).

Chez les Mollusques les cellules immunitaires, les hémocytes, peuvent également être observées au niveau de l'épiderme. L'infiltration hémocytaire permet en effet de répondre à un infection ou à une lésion de la barrière épithéliale (Schmitt *et al.*, 2012). Par exemple, chez *Mytilus galloprovincialis*, 6h après injection de la bactérie *Vibrio splendidus* au niveau du muscle adducteur postérieur, de nombreux hémocytes sont recrutés et se sont infiltrés entre les fibres musculaires (Parisi *et al.*, 2019). Chez les Céphalopodes, les hémocytes sont également recrutés lors d'une altération de la peau. En cas de lésion de la peau, de nombreux hémocytes provenant des vaisseaux adjacents sont recrutés et s'accumulent en surface chez *Eledone cirrhosa* (Polglase *et al.*, 1983, Bullock *et al.*, 1987). Lors de pathologies associées à la peau comme la dermatite chez *Loligo paelei*, un important recrutement d'hémocytes est également observé (Leibovitz *et al.*, 1977). Chez la seiche, la biopsie de la peau infectée par

un champignon du genre *Cladosporium* révèle la présence de nombreux hémocytes infiltrés (Harms *et al.*, 2006).

1.1.2. La sécrétion du mucus

La peau possède le rôle de barrière chimique *via* la production et sécrétion du mucus. Chez les Poissons, le mucus est sécrété par des glandes muqueuses unicellulaires présentes au niveau de l'épiderme et appelées *goblet cells* ou *club cells* (Ángeles Esteban, 2012). Chez les Annélides, deux à trois types de glandes unicellulaires sécrétant en majorité des glycoprotéines ont été décrites (Mastrodonato *et al.*, 2006, Katz *et al.*, 2010). Chez les Mollusques plusieurs études s'intéressant à l'épiderme ont permis l'observation de cellules sécrétrices. Chez le gastéropode *Aplysia californica*, un type de cellule à mucus est observé (Anderson *et al.*, 2010). Chez les céphalopodes *Sepia tuberculata* (von Byern *et al.*, 2011), *Sepia esculenta* (Lee *et al.*, 2014) et *Octopus vulgaris* (Accogli *et al.*, 2017), respectivement deux, trois et quatre types sont décrits. Ces cellules sécrètent un mucus positif à la coloration bleu alcian conjugué ou non à l'acide périodique – réactif de Schiff révélant la présence de mucopolysaccharides (von Byern *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2014, Accogli *et al.*, 2017). De façon intéressante, chez *S. esculenta*, la présence de cellules mixtes capables de sécréter des protéines et des mucopolysaccharides est observée (von Byern *et al.*, 2011). Chez les Amphibiens, les structures sécrétrices ne sont pas retrouvées au niveau de l'épiderme mais du derme et correspondent à des glandes pluricellulaires. Deux types de glandes sont décrites, des glandes muqueuses sécrétant des mucopolysaccharides et des glandes séreuses sécrétant des produits de nature protéique (Delfino *et al.*, 2015, Brunetti *et al.*, 2016, Wanninger *et al.*, 2018).

1.1.3. Facteurs immunitaires de la peau

Au-delà de son rôle de barrière physique et chimique, la peau joue le rôle de sentinelle. En effet, de nombreux facteurs de reconnaissance et de signalisation immunitaires ont été identifiés par des approches transcriptomiques au niveau de la peau. Plusieurs voies de signalisation en lien avec l'immunité comme la voie Toll/NF-κB, la voie du complément ou les voies de signalisation des récepteurs des cellules B et T ont ainsi été décrites dans le transcriptome de peau chez plusieurs espèces de Poissons (Long *et al.*, 2013, Hu *et al.*, 2017). Que ce soit chez les Poissons ou les Anoures, de nombreux gènes codant pour différentes

catégories de *Toll-Like Receptors* (TLR) ont été décrits au niveau de la peau (Liu *et al.*, 2016, Hu *et al.*, 2017, Varga *et al.*, 2019, Wu *et al.*, 2019, Zhu *et al.*, 2020).

Certains effecteurs immunitaires ont également été identifiés au niveau de la peau comme des PAM tels que la pteroicidine-α chez *Pterois volitans* (Houyvet *et al.*, 2017) ou des β-défensines chez *Danio rerio* (Zou *et al.*, 2007). Cependant, la fonction immunitaire de la peau est souvent associée aux sécrétions qu'elle produit, ce qui est détaillé dans le paragraphe 1.3.

1.2. Le mucus associé à la peau ou à l'épiderme chez les organismes aquatiques

Le mucus sécrété par les organismes aquatiques est composé d'une diversité de molécules aux effets et fonctions variées. Chez les Mollusques marins, le composant principal du mucus est l'eau à laquelle sont associés des complexes combinant des protéines et des polysaccharides et des sels inorganiques (calcium, sodium, potassium). Chez les Mollusques Bivalves, le mucus est essentiel pour la nutrition, il permet de capter les particules planctoniques. Chez les Gastéropodes, il sert à la locomotion et au repérage des pistes. Les composants de nature protéique impliqués dans ces fonctions autres que protectrices restent inconnus (Davies et Hawkins, 1998). Chez certains Chordés, la peau sécrète des toxines permettant la protection vis-à-vis des prédateurs comme certaines ichthyocrinotoxines chez les Poissons appartenant au genre *Gobiodon* (Schubert *et al.*, 2003, Gratzer *et al.*, 2015) ou la Bv8 et l'anntoxine respectivement chez les Amphibiens du genre *Bombina* (Mollay *et al.*, 1999), et *Hyla annectans* (You *et al.*, 2009).

Des phéromones sont également retrouvées dans le mucus cutané. Chez *Danio rerio*, un glycosaminoglycane, la chondroïtine est impliquée dans les comportements de fuite (Mathuru *et al.*, 2012). Le LASP ou *Leptodactylus Aggression-Stimulating Peptide*, qui stimule les comportements agressifs en lien avec la compétition pour la reproduction, a été identifié chez la grenouille *Leptodactylus fallax* (King *et al.*, 2005). Chez une autre grenouille, *Litoria splendida*, les mâles produisent une phéromone sexuelle, la splendipherine qui attire les femelles (Wabnitz *et al.*, 1999). Chez l'anguille *Anguilla anguilla*, des extraits de mucus cutané possèdent une activité olfactive qui pourrait être impliquée dans la reproduction (Huertas *et al.*, 2007).

Des neuropeptides sont également décrits dans les sécrétions cutanées de plusieurs espèces d'Amphibiens, tels que des peptides apparentés au FMRFamide ou au neuropeptide Y (Xu et Lai, 2015). Chez le discus *Symphysodon aequifasciata*, les mâles et les femelles utilisent le mucus produit au niveau de la peau pour nourrir les alevins. Enfin, l'étude du protéome du mucus chez le discus révèle que certaines protéines sont plus abondantes voire spécifiques aux extraits provenant d'animaux parents par rapport à des animaux non-parents, comme par exemple certaines protéines impliquées dans le métabolisme énergétique (Chong *et al.*, 2006).

De nombreux facteurs en lien avec l'immunité comme les PAM ou les lectines ont été identifiés à partir du mucus d'organismes aquatiques, et indique un rôle essentiel du mucus dans la défense immunitaire.

1.3. Le rôle immunitaire du mucus associé à la peau chez les organismes aquatiques

Au-delà des fonctions associées à la nutrition ou à la locomotion décrite notamment chez les Mollusques Bivalves et Gastéropodes, le mucus évite la dessiccation et joue un rôle dans la protection immunitaire (Davies et Hawkins, 1998). Des molécules comme l'achatine, les lectines ou le lysozyme identifiées chez les Gastéropodes et/ou les Bivalves permettent d'éliminer les pathogènes. Chez les Chordés, les nombreuses études menées chez les Amphibiens ou les Poissons notamment par des approches -omiques, ont permis d'identifier des facteurs immunitaires au niveau du mucus. Certaines études démontrent également la présence de lectines ou de lysozyme. Ainsi chez *Gadus morhua* (Rajan *et al.*, 2011, 2013) et *Anguilla japonica* (Tasumi *et al.*, 2004) des galectines ont été caractérisées à partir des sécrétions de peau, d'autres lectines sont retrouvées chez *Sparus aurata* (Cordero *et al.*, 2016), *Dicentrarchus labrax* (Cordero *et al.*, 2015) et *Cyclopterus lumpus* (Patel et Brinchmann, 2017). Le lysozyme, impliqué dans la destruction des parois bactériennes est présent également dans les sécrétions cutanées chez *G. morhua* (Rajan *et al.*, 2011), *S. aurata* (Cordero *et al.*, 2016) et *D. labrax* (Cordero *et al.*, 2015).

Par ailleurs, chez les Vertébrés aquatiques, de nombreux PAM ont été identifiés au niveau des sécrétions cutanées comme un PAM assimilé à une défensine chez *Theloderma kwangsiensis* (Shen *et al.*, 2016) ou la pseudine-2 chez *Pseudis paradoxa* (Olson *et al.*, 2001).

Au total, plus de 1900 PAM appartenant à une centaine de familles ont été décrits au niveau des sécrétions cutanées chez les Amphibiens (Xu et Lai, 2015). Chez les Poissons plusieurs PAM ont également été identifiés au niveau du mucus associé à la peau (Rakers *et al.*, 2013), comme des peptides issus d'histones chez *Hippoglossus hippoglossus* (Birkemo *et al.*, 2003) ou *Oncorhynchus mykiss* (Fernandes *et al.*, 2002, Fernandes, 2004), mais également la pleurocine chez *Pleuronectes americanus* (Cole *et al.*, 1997).

Plusieurs facteurs associés à la cascade du complément, impliquée dans des processus immunitaires innés et acquis (Ricklin *et al.*, 2010), sont eux aussi présents dans le protéome du mucus chez les Poissons (Cordero *et al.*, 2015, 2016). Enfin, plusieurs facteurs associés à la réponse au stress comme des *Heat Shock Proteins* (HSP) ou au stress oxydatif comme les peroxyrédoxines, la glutathion-S transférase, ou les superoxyde dismutases sont également présents au niveau du mucus (Cordero *et al.*, 2015, Jurado *et al.*, 2015, Patel et Brinchmann, 2017). Viennent s'ajouter à ces facteurs de nombreuses protéases, comme des serine-protéases, cystéine-protéases, aspartate protéases ou métalloprotéases (Dash *et al.*, 2018). Certaines enzymes sont à l'origine de PAM comme la cathepsine D qui est capable de produire la parasine-I à partir de l'histone 2A (Cho *et al.*, 2002).

1.4. Microbiome associé à la peau/mucus chez les organismes marins

Des communautés bactériennes regroupées en microbiome sont décrites au niveau de divers organes comme l'intestin ou la peau au sein du règne animal. Ces microbiomes font l'objet d'un nombre d'études en augmentation grâce aux nouvelles techniques de séquençage, comme la métagénomique, qui permettent d'évaluer la diversité des communautés bactériennes. L'équilibre entre les différentes espèces bactériennes est important et un déséquilibre peut favoriser l'émergence d'espèces pathogènes comme cela a été observé au niveau de l'intestin chez l'Homme (Lynch et Pedersen, 2016). Chez les organismes marins, l'attention se porte sur les espèces possédant un intérêt économique comme les Poissons (Llewellyn *et al.*, 2014, Merrifield et Rodiles, 2015, Egerton *et al.*, 2018). Chez ces espèces, le microbiome associé au tractus digestif est le plus étudié par comparaison à celui associé aux œufs, aux branchies ou à la peau (Merrifield et Rodiles, 2015).

Le microbiome au niveau de la peau chez les Poissons semble plusieurs origines. Il associe des bactéries présentes à la surface des œufs, des bactéries du milieu environnant ainsi que

des bactéries provenant de l'alimentation (Llewellyn *et al.*, 2014). Larsen et collaborateurs (2013) ont étudié la diversité du microbiome associé à la peau chez six espèces de Poissons. Celui-ci est dominé par des bactéries appartenant aux *Proteobacteria*. Il existe cependant certaines différences entre espèces, trois espèces possédant des communautés de cyanobactéries. Lorsque que la répartition des *Proteobacteria* est étudiée, celle-ci est dominée par des γ-*Proteobacteria* sauf chez une espèce chez qui ce sont les α-*Proteobacteria* qui prédominent (Larsen *et al.*, 2013). Des résultats similaires concernant la dominance de *Proteobacteria* ont été observés chez d'autres Poissons comme *Lutjanus campechanus* (Arias *et al.*, 2013), *Salvelinus fontinalis* (Boutin *et al.*, 2014), *D. labrax* et *S. aurata* (Chiarello *et al.*, 2015), *S. salar* (Minniti *et al.*, 2017), et des Poissons retrouvés au niveau de récifs coralliens (Chiarello *et al.*, 2018). Le microbiome associé à la peau a également été étudié chez des espèces de requin (Doane *et al.*, 2017), de Mammifères marins (Apprill *et al.*, 2014, Chiarello *et al.*, 2017) et chez la seiche (Lutz *et al.*, 2019). Chez le requin renard *Alopias vulpinus*, le microbiome cutané est riche en γ-*Proteobacteria* (Doane *et al.*, 2017). Une dominance des *Proteobacteria* est également observée chez des orques et dauphins élevés en captivité (Chiarello *et al.*, 2017) ou des baleines à bosse suivies en milieu naturel (Apprill *et al.*, 2014). Chez la seiche, une étude s'est intéressée aux différents microbiomes présents au niveau de différentes parties du tube digestif, des branchies et de la peau en se focalisant sur certaines espèces bactériennes et en présence ou non d'antibiotique. Au niveau de la peau, une grande proportion de bactéries n'a pas été clairement identifiée. Néanmoins, l'étude révèle qu'en présence d'un traitement antibiotique la proportion de *Flavobacteriaceaea* est plus importante (Lutz *et al.*, 2019).

Le microbiome cutané semble lié à des caractéristiques individuelles. En effet, chez *Salvelinus fontinalis* des différences significatives dans les communautés bactériennes retrouvées chez les mâles et les femelles ont été observées (Boutin *et al.*, 2014). Boutin et collaborateurs (2014) ont également observé la présence de gènes associés à l'abondance de certains genres bactériens connus pour leur production de composés antimicrobiens et suggérant ainsi l'influence du génotype dans la sélection des communautés microbiennes associées à la peau. Chez *D. labrax* et *S. aurata*, Chiarello et collaborateurs (2015) ont observé des variations qualitatives et quantitatives intra et inter-espèces des communautés bactériennes bien que tous les individus aient été élevés dans les mêmes conditions,

suggérant l'importance du génotype dans l'établissement du microbiome. Chez les orques et les dauphins élevés en captivité dans un même parc, des différences intra et inter-espèces sont également observées (Chiarello *et al.*, 2017). Enfin, le mucus cutané peut dans certains cas être impliqué dans l'établissement de certains microbiomes. En effet, chez le discus, chez qui les alevins se nourrissent du mucus cutané parental, le microbiome cutané change au cours de la reproduction (Sylvain et Derome, 2017). Sylvain et Derome (2017) ont également observé que lorsque les alevins commencent à se nourrir du mucus cutané parental, leur microbiome intestinal subit une modification avec une augmentation importante de la proportion de *Bacteroidetes*.

1.5. Objectifs du chapitre

Les objectifs du chapitre sont de comprendre comment la peau est impliquée dans la fonction immunitaire chez la seiche. Pour répondre à cette question, une étude globale de la peau, mais également du mucus qui la recouvre est menée (Figure 29). Deux approches sont mises en place, une approche cellulaire utilisant des techniques d'histologie, de microscopie optique et électronique ainsi que des techniques de microbiologie, et une approche moléculaire par le biais de techniques -omiques. L'approche cellulaire a pour objectifs d'étudier (1) la structure de la peau et (2) la diversité microbienne présence à la surface de la peau. L'approche moléculaire a quant à elle pour objectifs d'étudier (3) le transcriptome de la peau et (4) le protéome et peptidome du mucus afin de rechercher des acteurs moléculaires de l'immunité.

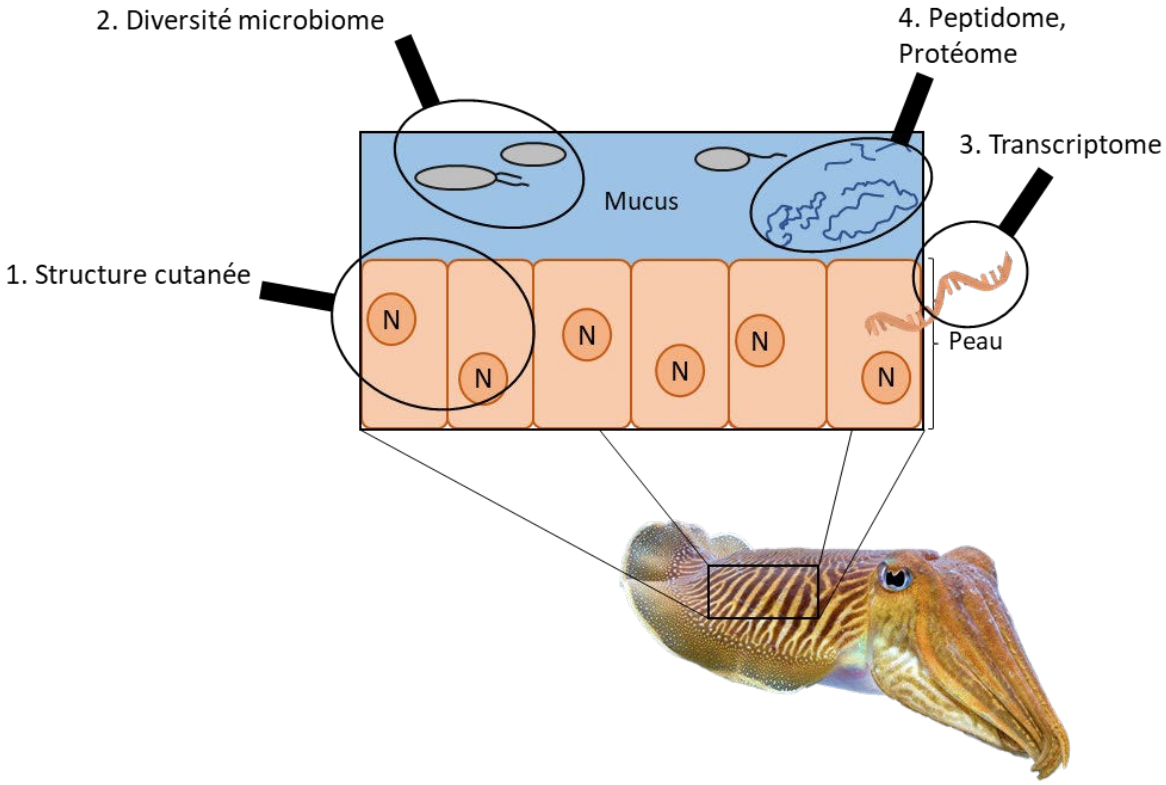


Figure 29. Représentation schématique des différentes approches menées autour de la peau chez la seiche.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Les seiches (*Sepia officinalis*) sont capturées en Baie de Seine et transportées à la station marine du Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC), à Luc-sur-mer. A la station marine, les seiches sont maintenues dans des bassins de 1000 litres alimentés en eau de mer à 16°C en circuit semi-fermé dans une structure d'élevage agrée et nourries *ad libitum*.

Les expérimentations sur la seiche répondent à la Directive 2010/63/EU et la réglementation Française concernant l'utilisation d'animaux pour l'expérimentation. Les expérimentations ont été approuvées par le comité d'éthique régional CENOMEXA N°54, (accord de projet n° 03145.03) et ont été conçues afin de réduire la souffrance et le stress en minimisant le nombre d'animaux. Avant chaque prélèvement, les animaux sont euthanasiés avec de l'éthanol (3%) et vidés de leur hémolymphe.

Pour l'étude histologique, des morceaux de peau prélevés en position dorsale et ventrale ont été placés dans une solution de Davidson pour la microscopie optique. Des morceaux de nageoires sont prélevés et placés dans une solution de cacodylate de sodium/glutaraldéhyde/saccharose pour la microscopie électronique. Pour l'approche microbiologique, le mucus est prélevé sur la peau dorsale avec une spatule métallique stérile et étalé sur milieux gélosés. Pour l'approche transcriptomique, la peau de 5 animaux a été prélevée au niveau dorsal et ventral et stockée à -80°C. Enfin, pour l'approche protéomique et peptidomique, le mucus est prélevé sur la peau dorsale et ventrale et aussitôt extrait.

2.2. Etude histologique

2.2.1. Microscopie optique

Les morceaux de peau sont fixés dans une solution de Davidson (10% eau de mer filtrée, 30% éthanol 95%, 20% formaldéhyde 40%) pendant 72h à 4°C. Après déshydratation, les échantillons sont inclus dans la paraffine. Des coupes de 3µm sont obtenues à l'aide d'un microtome RM2135 (Leica) et déposées sur lame. Après séchage, les lames sont colorées au trichrome de Prenant-Gabe (Gabe, 1968), au bleu de Coomassie (0,2% dans acide acétique 25% – éthanol 75%) (Cawood *et al.*, 1978) ou au bleu alcian (1% dans acide acétique 3%) / acide périodique (0,5%) – réactif de Schiff (modifié d'après Mowry, 1956). Les prise de vue sont réalisées avec une caméra Nikon DS-Ri2 couplée au microscope Nikon Eclipse 80i.

2.2.2. Microcopie électronique

Les morceaux de nageoires sont fixés dans un tampon cacodylate de sodium 0,31M à 3,2% de glutaraldéhyde et en présence de saccharose 0,15M pendant une nuit à 4°C. Après rinçage dans un tampon cacodylate de sodium 0,31M en présence de saccharose 0,15M, les morceaux de nageoires sont déshydratés par des bains progressifs d'éthanol et séchés par la méthode du contournement du point critique avec un CPD030 (Leica). Les échantillons sont ensuite collés sur support avec de la laque d'argent et métallisés au platine avec un JFC 1200 (Jeol). L'observation est effectuée avec le microscope électronique à balayage 7200LV (Jeol) du Laboratoire de CRIstallographie et Sciences des MATériaux (CRISMAT).

2.3. Approche microbiologique

2.3.1. Mise en culture des bactéries présentes dans le mucus

Le mucus prélevé est étalé sur six milieux gélosés. Deux milieux sélectifs pour les bactéries du genre *Vibrio* : TCBS agar (Conda) et *Vibrio ChromoSelect* agar (Sigma) ; un milieu marin maison (IO, sels marins 20g/l, peptone 5g/l, extrait de levures 3g/l, agar 15g/l) ; un milieu marin pour bactéries iridescentes du genre *Cytophaga* (Kientz *et al.*, 2013) (CYT, sels marins 30 g/l, tryptone 1 g/l, extrait de levures 0,5 g/l, $CaCl_2$ 0,5 g/l, $MgSO_4$ 0,5 g/l, agar 15 g/l) ; le milieu columbia (Col, Conda + agar 15g/l) et le milieu cœur-cervelle (BHI, Conda + agar 15g/l). Le mucus est étalé directement sur la gélose à l'aide d'un inoculateur puis la gélose est incubée à 20°C pendant 72h. Après ces 72h, les boites sont conservées à 4°C.

2.3.2. Isolement et identification des espèces bactériennes

Afin d'isoler les souches, une colonie est sélectionnée et cultivée dans un bouillon liquide pendant une nuit à 20°C et sous agitation (culture de nuit). Cette culture de nuit est étalée sur une nouvelle gélose. L'opération est renouvelée deux fois afin de s'assurer de l'isolement complet de la souche. Quand un seul phénotype est observé, une nouvelle culture de nuit est réalisée à partir d'une colonie. L'extraction de l'ADN bactérien est réalisée à partir de cette culture de nuit. L'identification des espèces bactériennes est réalisée grâce au séquençage d'un fragment du gène de l'ADN 16S. Les amorces utilisées sont les suivante, amorce sens 63f : 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' et amorce anti-sens 1387r : 5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'. La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est réalisée comme suit : 1 cycle de 5min à 95°C, 30 cycles de 30s à 95°C suivi de 30s à 55°C et 1,5min à 72°C et 1 cycle de 5min à 72°C avec la

GoTaq® G2 flexi *DNA polymerase* (Promega). Le séquençage est ensuite réalisé par GenoScreen.

2.4. Approche transcriptomique

Après broyage à l'azote liquide, les échantillons de peau sont re-suspendus dans le TriReagent afin d'extraire les ARN totaux en suivant le protocole décrit par Cornet et collaborateurs (2014). Après dosage et contrôle de la qualité des ARN, la préparation des « librairies » et le séquençage Illumina sont réalisés par l'Université McGill et le Centre d'expertise et de services Génome Québec (Montréal, Quebec). L'ensemble des analyses bio-informatiques permettant l'assemblage et l'annotation du transcriptome a été réalisé par la plateforme ABiMS en suivant la procédure décrite précédemment (Benoist *et al.*, 2020b).

2.5. Approche protéomique

Trois extraits protéiques sont réalisés : (1) le mucus est dilué dans une solution de tampon salin (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (P2714, Sigma) ; (2) le mucus est repris dans une solution d'acide heptafluorobutyrique (HFBA) 0,1% et (3) le mucus est repris dans une solution de DiThioThréitol (DTT) à 0,1M et Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle (PMSF) à 1mM. Après 10 minutes de centrifugation à 20000g à 4°C, les surnageants sont récupérés. Les concentrations protéiques sont obtenues après dosage à l'acide bicinchoninique (BCA) (Smith *et al.*, 1985).

Les extraits protéiques sont séparés sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) pendant 3h à 120V dans du tampon de migration Tris-HCl et avec le marqueur de poids moléculaire ColorBurst™ (C1992, Sigma). Les gels sont colorés avec une solution de méthanol 40% - acide acétique 10% contenant 0,1% de bleu de Coomassie. Les gels sont découpés en bandes qui sont ensuite décolorées. Ces bandes subissent un traitement RAT, réduction au DTT 50mM, alkylation à l'iodoacetamide (IAA) 55mM et digestion à la trypsine 0,006µg/µl. Après extraction des peptides trypsiques des bandes de gel, ceux-ci sont analysés en chromatographie liquide nano (nanoLC) couplée à la spectrométrie de masse (ESI-MSMS) comme décrit précédemment (Benoist *et al.*, 2020a). La recherche en banque, pilotée par le logiciel Mascot 2.6.1 (Matrix Science), est réalisée sur la base des fragmentations obtenues en MSMS en utilisant comme base de données le transcriptome de peau, préalablement traduit avec le logiciel PepTraq. Les modifications

sélectionnées pour l'identification sont les suivantes : oxydation et di-oxydation des méthionines, acétylation des lysines et carbaméthylation des cystéines. L'erreur de masse est fixée, pour la MS et la MSMS, à 40 ppm et 0,05 Da respectivement. Les données Mascot ainsi obtenues sont ensuite transférées dans le logiciel de validation Proline (http://www.profiproteomics.fr/proline/) afin d'être filtrées selon un seuil < 0,05 et d'éliminer les redondances protéiques.

2.6. Approche peptidique

Deux extractions peptidiques sont réalisées : (1) Le mucus est dilué dans une solution de Méthanol (90%) – acide ACétique (1%) (MAC) et (2) le mucus est repris dans une solution d'acide acétique à 0,1% et bouilli pendant 5 minutes (AC). Après 20 minutes de centrifugation à 30000g à 4°C, les surnageants sont récupérés, concentrés et dessalés sur colonne SepPak C18 (Waters). Après élution avec 80% d'ACétoNitrile (ACN), les échantillons sont séchés au speedvac et stockés à 4°C.

Chaque extrait est ensuite concentré sur une microcolonne C18 Omix (C18), séché et repris en acide formique 0,1% avant injection en nanoLC-ESI-MSMS. La chromatographie est réalisée sur une chaine nano débit ultra haute pression NanoElute (Bruker Daltonics). Les peptides sont préconcentrés sur une précolonne C18 pepmap 100 (5mm x 300µm i.d., Thermo Scientific) avant d'être séparés sur une colonne de phase inverse Reprosil (25cm x 75µm i.d., 1.6µm C18 Ionopticks) placée à 50°C. Les phases mobiles sont composées de 0,1% acide formique (A) et 0,1% acide formique – 99,9% ACN (v/v) (B). Le débit est réglé à 400nL/min et le gradient appliqué est le suivant : de 2 à 15% B en 60 min, suivi d'une augmentation à 25% B en 30 min puis à 37% en 10 min. Suit une étape de lavage à 95% B avant rééquilibration.

L'analyse en MS est réalisée sur un spectromètre hybride TIMS-TOF pro (Bruker Daltonics) équipé d'une source nano ESI (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). Un voltage de 1400 V avec une température de capillaire de 180°C sont typiquement utilisés pour ioniser. Le système est calibré chaque semaine avec une précision supérieure à 1 ppm. Les spectres sont acquis en mode positif dans une gamme de masse comprise entre 100 et 1700 m/z. Pour cette expérience, l'acquisition est réalisée en mode PASEF (10 cycles de scans en 1,25 secondes), avec inclusion des ions monochargés. La recherche en banque est réalisée de la même façon que pour l'approche protéomique. Le potentiel antimicrobien des peptides identifiés est

déterminé à l'aide du calculateur et prédicteur du site APD (*the Antimicrobial Peptide Databse*) (http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php) (Wang *et al.*, 2016) et des algorithmes de prédictions disponibles sur le site CAMP (*Collection of Anti-Microbial Peptides*) (http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php) (Waghu *et al.*, 2016).

3. Résultats et Discussion

3.1. Approche cellulaire

3.1.1. Etude structurale de la peau

La structure générale de la peau chez la seiche, visualisée en microscopie optique après coloration au trichrome de Prenant-Gabe, se compose d'un épiderme formé d'une couche de cellules épidermiques et sécrétrices (Figure 30, flèches S). Sous l'épiderme, des chromatophores et iridophores sont observés, ceux-ci sont impliqués dans les changements de couleur et le camouflage comme précédemment décrits chez plusieurs Céphalopodes dont *Sepia officinalis* (Allen *et al.*, 2014). La présence de vaisseaux au niveau du derme indique une vascularisation importante de la peau (Figure 31).

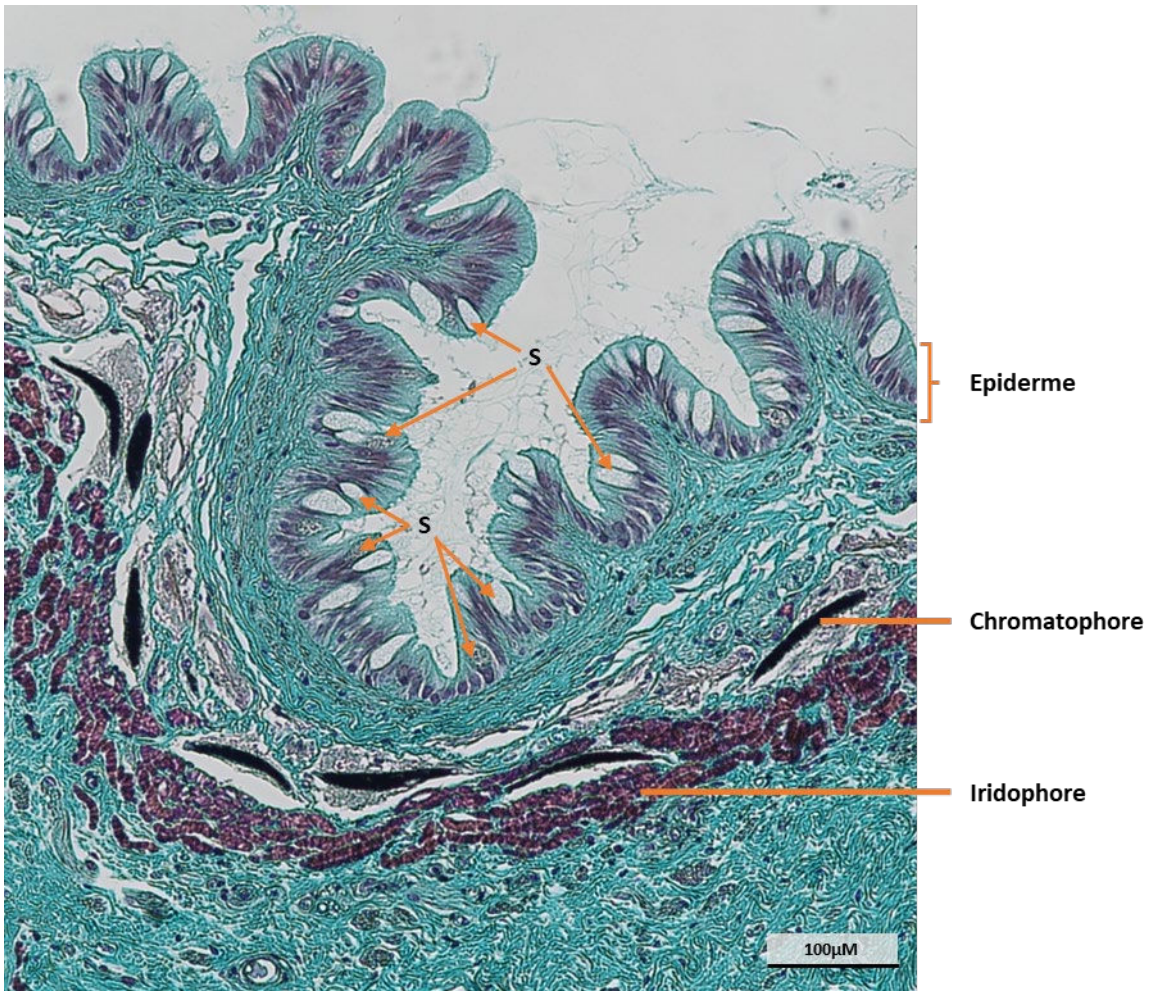


Figure 30. Observation en microscopie optique de la structure générale de la peau chez la seiche, après coloration au trichrome de Prenant-Gabe (Objectif x10).

Ces vaisseaux sont impliqués dans le transport des hémocytes et jouent donc un rôle important dans la réponse aux altérations de la peau lors de blessures ou d'infections nécessitant le recrutement d'hémocytes comme cela a été décrit chez plusieurs Céphalopodes (Polglase *et al.*, 1983, Bullock *et al.*, 1987, Harms *et al.*, 2006).

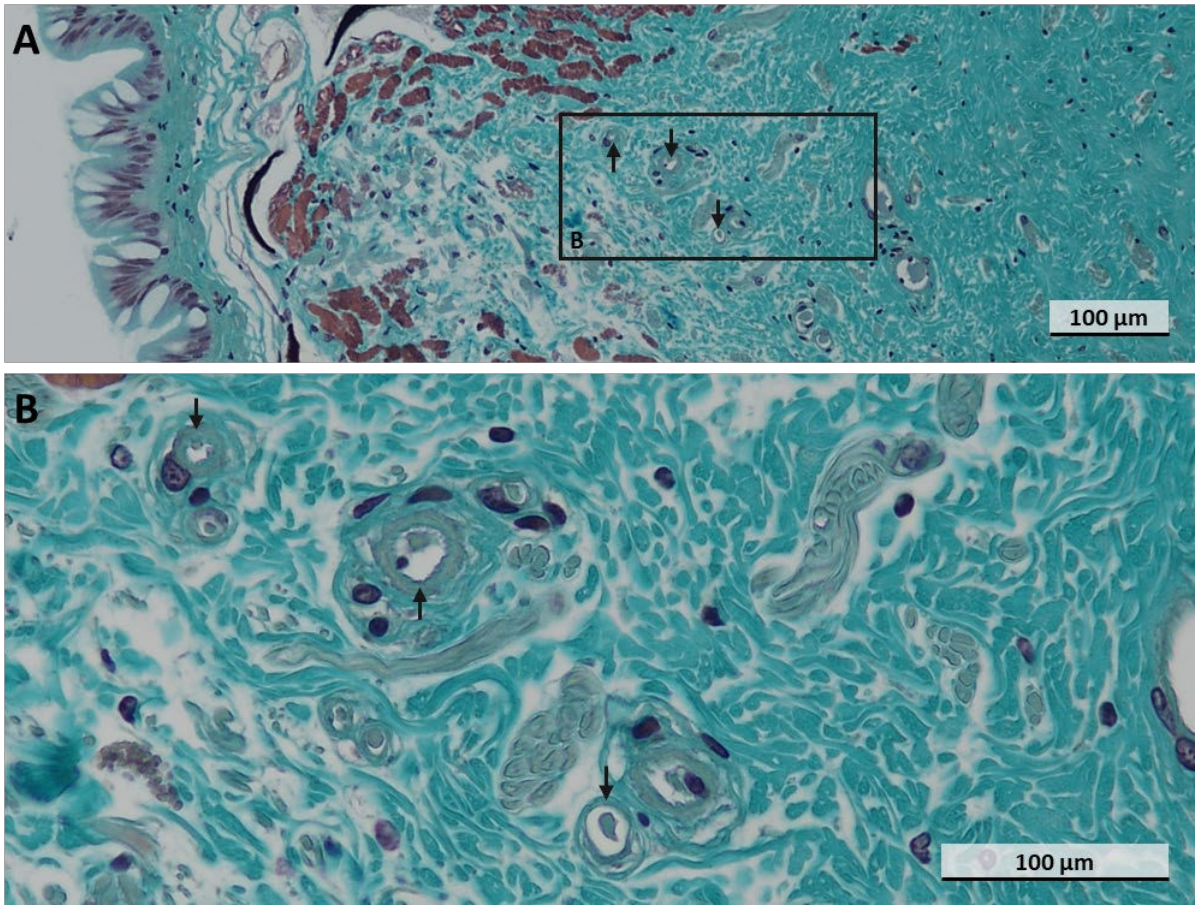


Figure 31. Observations microscopiques des vaisseaux présents au sein du derme chez la seiche. A. Vue générale avec l'épiderme à gauche, la couche de cellules pigmentaires (chromatophores et iridophores) et le derme et son tissu conjonctif riche (Objectif x10). B. Agrandissement d'une partie du derme permettant d'observer des vaisseaux (Objectif x40).

Afin d'étudier la nature des sécrétions présentes, deux colorations spécifiques ont été utilisées. La coloration au Bleu de Coomassie (BC) permet de révéler la présence de produits d'origine protéique tandis que la coloration au Bleu Alcian conjugué à l'Acide Périodique et au réactif de Schiff (BA-APS) permet la mise en évidence les mucopolysaccharides dont les mucines retrouvées au niveau du mucus. Deux types de sécrétions ont été identifiés permettant de distinguer des cellules de type séreux sécrétant des produits de nature

protéique, et des cellules de type muqueux sécrétant des mucines et autres mucopolysaccharides (Figure 32).

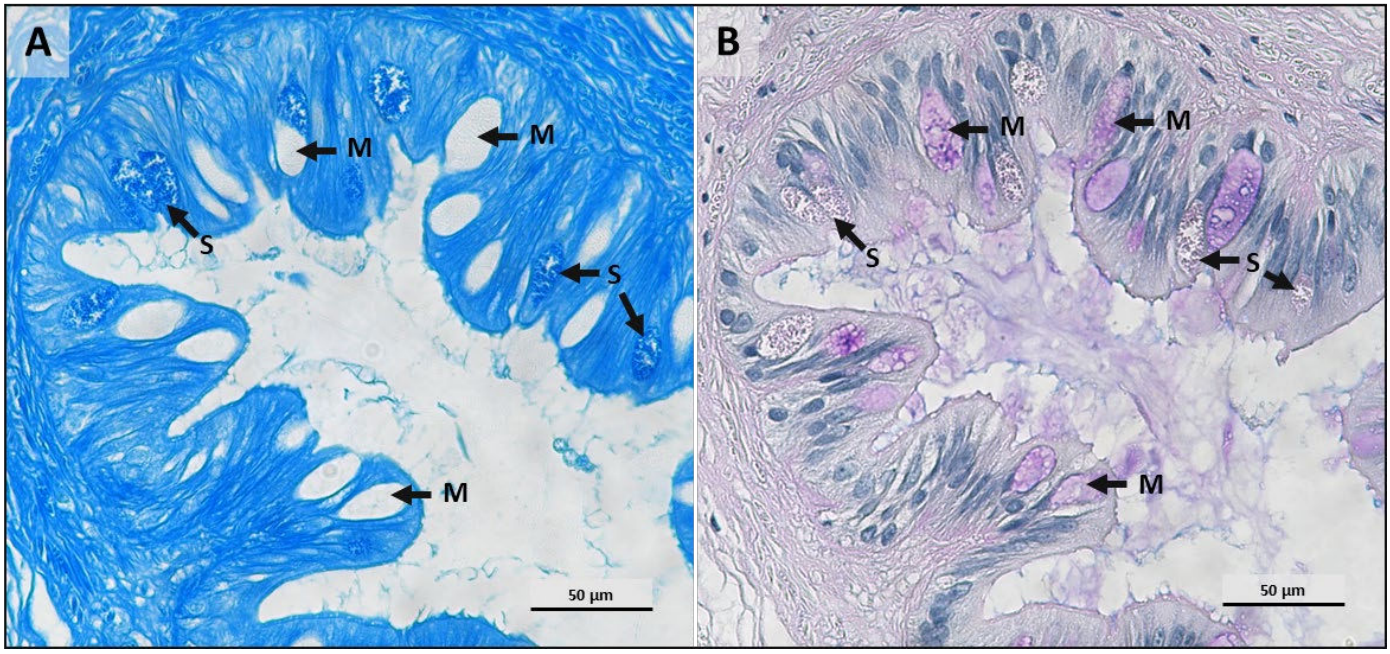


Figure 32. Observations en microscopie optique des structures sécrétrices retrouvées au niveau de la peau chez la seiche. (A : Coloration BC ; B : Coloration BA-APS ; flèches M : cellules muqueuses ; flèches S : cellules séreuses ; Objectif x40).

Les cellules séreuses sont composées d'un cytoplasme rempli de nombreux grains de sécrétion prenant uniquement une teinte bleue après coloration BC révélant ainsi la nature protéique de ces produits (Figure 32, flèches S). Les cellules muqueuses présentent quant à elles un cytoplasme non coloré après coloration BC et coloré en rose – violet après coloration BA-APS, révélant la production de mucines (Figure 32, flèches M). La peau de la seiche est donc constituée de deux types de structures sécrétant du mucus ou des produits de nature protéique comme cela a été décrit chez les Amphibiens (Delfino *et al.*, 2015, Brunetti *et al.*, 2016, Wanninger *et al.*, 2018), se distinguant des Poissons chez qui un seul type de cellules sécrétrices est observé (Saadatfar *et al.*, 2010, Karlsen *et al.*, 2018). Plusieurs études menées sur l'épiderme chez les Mollusques indiquent la présence d'un à quatre types de cellules sécrétrices (Anderson *et al.*, 2010, von Byern *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2014, Allen *et al.*, 2014, Accogli *et al.*, 2017). Cependant, il semble s'agir de plusieurs types de cellules de type muqueux. Seule une étude réalisée chez *Sepia tuberculata*, révèle la présence de cellules mixtes capables de sécréter des mucopolysaccharides et des protéines (von Byern *et al.*,

2011). La Figure 32 permet également d'observer que le mucus libéré par les cellules sécrétrices est riche en mucines et mucopolysaccharides colorés en BA-APS.

La coloration BA-APS permet d'observer trois types de cellules muqueuses selon la nature des mucines sécrétées (Figure 33), en accord avec les précédents résultats observés chez d'autres Céphalopodes chez qui plusieurs types de cellules muqueuses ont été identifiés (Lee *et al.*, 2014, Accogli *et al.*, 2017).

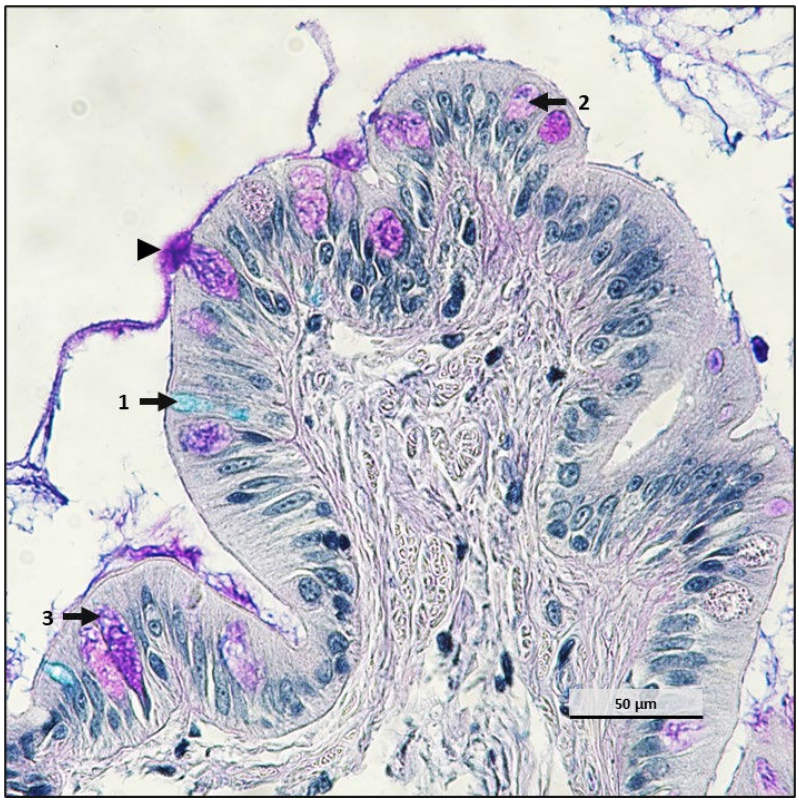


Figure 33. Observation en microscopie optique des différents types de cellules muqueuses retrouvées au sein de la peau chez la seiche (flèche 1 : mucines acides ; flèche 2 : mucines neutres ; flèche 3 : mélange ; pointe de flèche : cellule déchargeant son contenu ; Coloration BA-APS, Objectif x40).

Enfin, une densité différente en cellules muqueuses et séreuses a été observée entre les échantillons de peau sur la face ventrale ou la face dorsale de l'animal. Seules quelques cellules sécrétrices sont observées sur la peau ventrale contrairement à ce qui est observé sur la peau dorsale (Figure 34). Cette organisation diffère de celle observée chez certains Annélides chez qui les cellules sécrétrices sont retrouvées de façon uniforme entre les régions dorsales et ventrales (Mastrodonato *et al.*, 2006, Rodrigo *et al.*, 2018).

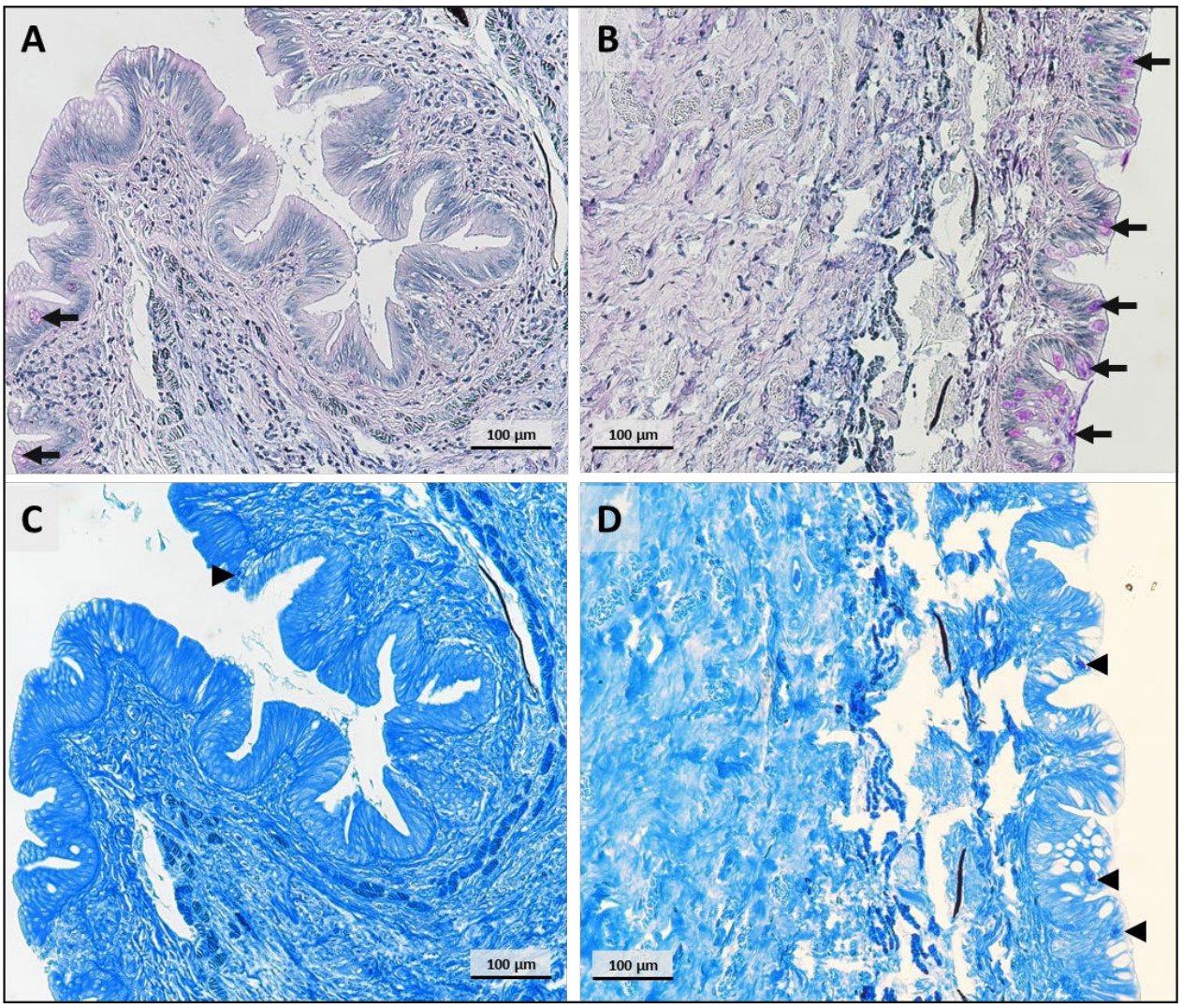


Figure 34. Observations en microscopie optique de coupes de peau ventrale (A, C) et dorsale (B, D). (A, B : coloration BA-APS ; C, D : coloration BC ; flèches : cellules muqueuses ; pointes de flèches : cellules séreuses ; Objectif x10).

Lorsque la peau des nageoires est observée en Microscopie Electronique à Balayage (MEB, Figure 35), des amas de mucus peuvent être distingués (flèche). L'aspect et les délimitations des cellules peuvent également être observés (contours pointillés).

3.1.2. Etude du microbiome cultivable associé à la peau

Présence de bactéries au niveau de la peau

L'analyse en MEB des nageoires révèle également la présence de bactéries à la surface de la peau comme observé chez la baleine à bosse (Apprill *et al.*, 2014). Ces bactéries forment dans certains cas un tapis présentant une forte densité. Les bactéries observées ont une forme

de bâtonnet de taille variable. Celles-ci sont enchevêtrées dans une matrice extracellulaire plus ou moins dense correspondant au mucus (Figure 36).

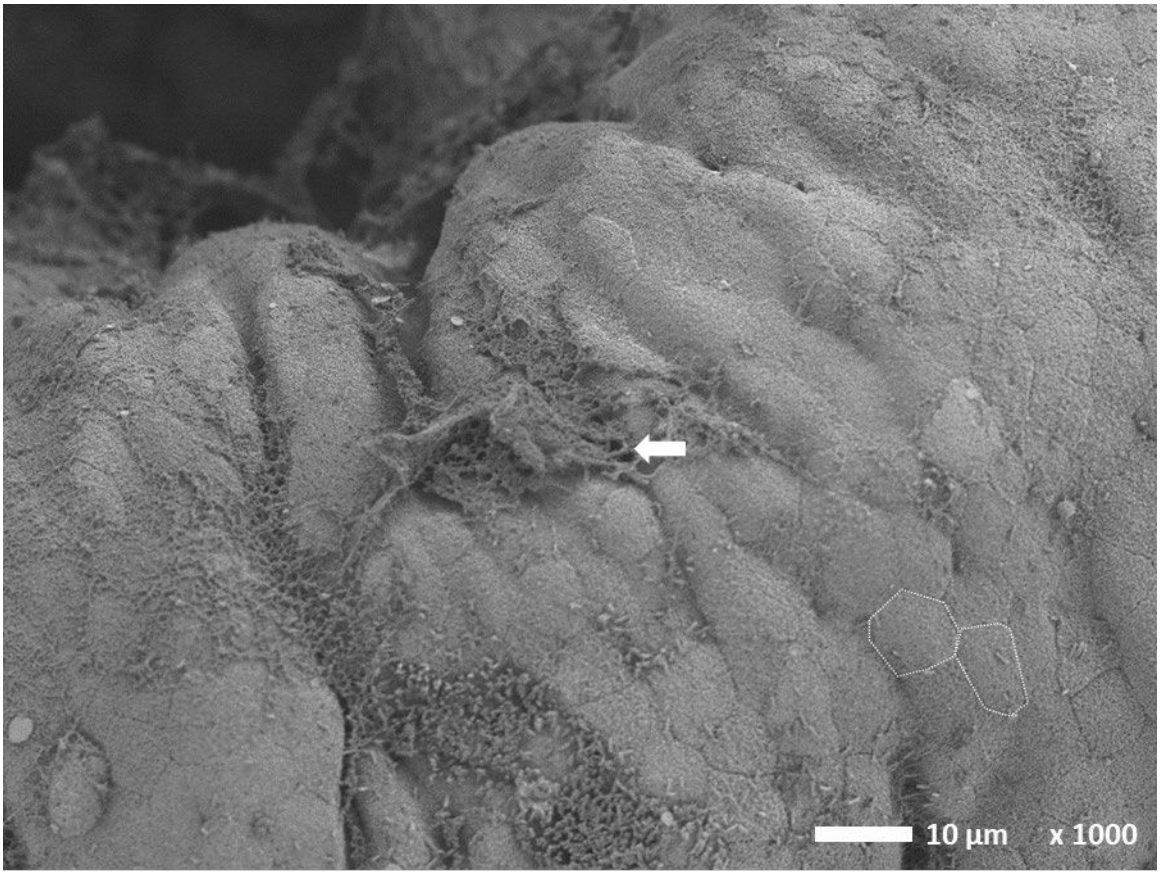


Figure 35. Observation en MEB de l'aspect général de la peau.

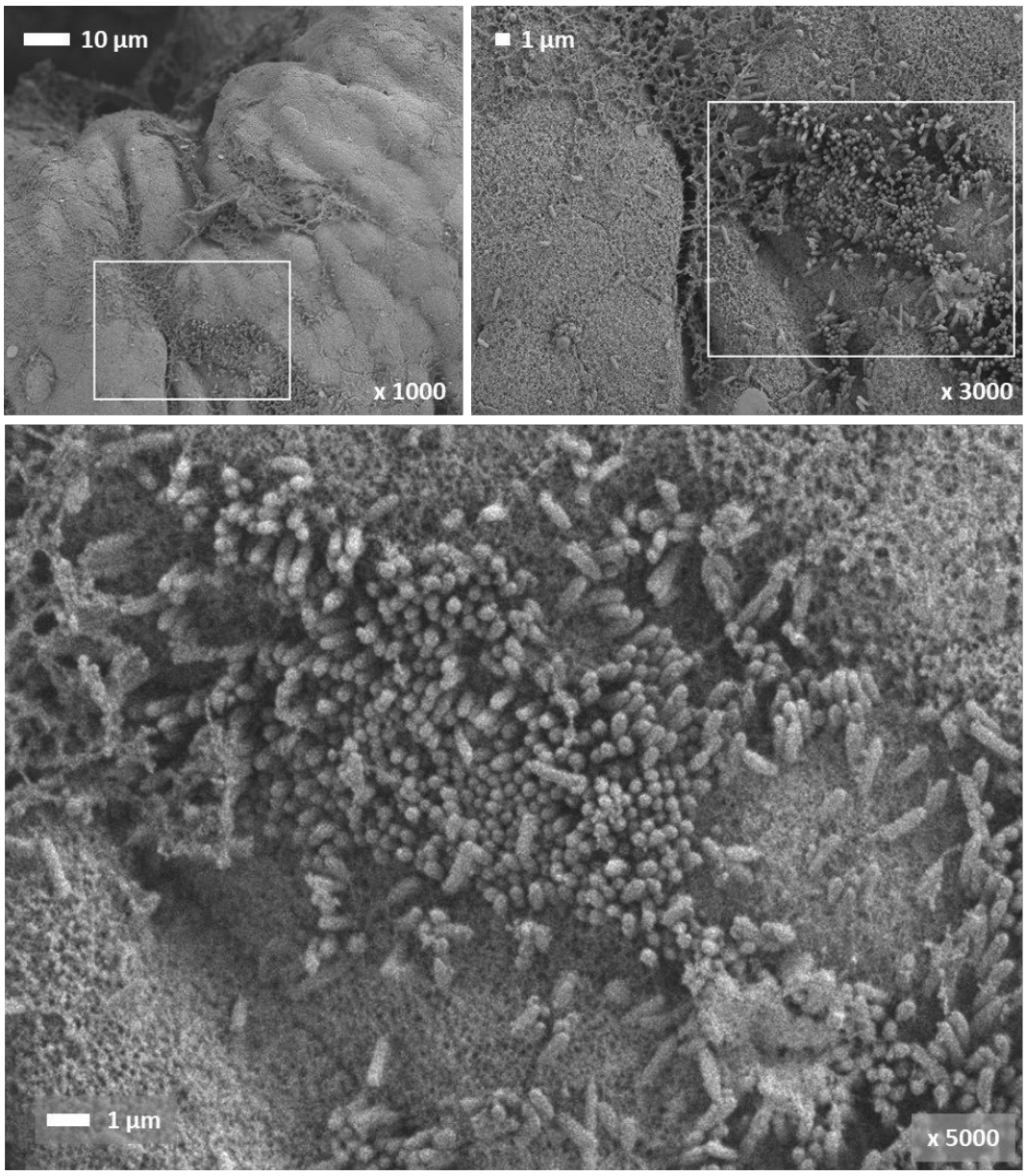


Figure 36. Observations en MEB d'un amas de bactéries au niveau de la surface de la peau des nageoires.

3.1.3. Isolements de bactéries et espèces identifiées

Sur les milieux riches en sels (IO et CYT) plusieurs colonies différentes présentant des formes, des tailles et des couleurs différentes (blanc, jaune, rouge, orange) sont observées (Figure 37) à l'inverse des milieux sélectifs chromogéniques (TCBS et *Vibrio ChromoSelect*) ou des milieux pauvres en sels (Col et BHI) où peu de souches ont pu se développer. Vingt-six souches ont été isolées. Après séquençage du gène de l'ARN 16S, douze espèces différentes ont finalement été identifiées (Tableau 1).

Tableau 1. Bactéries cultivables identifiées dans le mucus de la seiche.

	Espèce	Classe	Ordre	Famille
Gram positif	*Staphylococcus equorum* (1)	*Bacilli*	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*
	Bacillus hwajinpoensis (2)	*Bacilli*	*Bacillales*	*Bacillaceae*
	Bacillus aquimaris (3)	*Bacilli*	*Bacillales*	*Bacillaceae*
Gram négatif	*Tenacibaculum soleae* (4)	*Flavobacteriia*	*Flavobacteriales*	*Flavobacteriaceae*
	Ruegeria (Epibacterium) scottomollicae (5)	*α-Proteobacteria*	*Rhodobacterales*	*Rhodobacteraceae*
	Leisingera methylohalidivorans (6)	*α-Proteobacteria*	*Rhodobacterales*	*Rhodobacteraceae*
	Acinetobacter lwoffii (7)	*γ-Proteobacteria*	*Pseudomonadales*	*Moraxellaceae*
	Psychrobacter sp. (8)	*γ-Proteobacteria*	*Pseudomonadales*	*Moraxellaceae*
	Idiomarina sp. (9)	*γ-Proteobacteria*	*Alteromonadales*	*Idiomarinaceae*
	Vibrio (Aliivibrio) fischeri (10)	*γ-Proteobacteria*	*Vibrionales*	*Vibrionaceae*
	Vibrio sp. (11)	*γ-Proteobacteria*	*Vibrionales*	*Vibrionaceae*
	V*ibrio jasicida* (12)	*γ-Proteobacteria*	*Vibrionales*	*Vibrionaceae*

La grande majorité des bactéries cultivables isolées à partir du mucus cutané chez la seiche sont des espèces appartenant au phylum des *Proteobacteria*. La présence d'une majorité de *Proteobacteria* a déjà été observée en métagénomique chez plusieurs animaux marins comme les Poissons (Chiarello *et al.*, 2015, Lowrey *et al.*, 2015, Lokesh et Kiron, 2016, Minniti *et al.*, 2017, Carda-Diéguez *et al.*, 2017), les Mammifères marins (Apprill *et al.*, 2014, Chiarello *et al.*, 2017), les Copépodes (Gerdts *et al.*, 2013) ou l'huitre perlière (Dubé *et al.*, 2019). Néanmoins la comparaison reste difficile à faire avec ces études réalisées en métagénomique qui permettent d'avoir un aperçu des populations bactériennes contrairement à l'étude du microbiome cultivable qui permet d'identifier plus précisément quelques espèces bactériennes pouvant être cultivées.

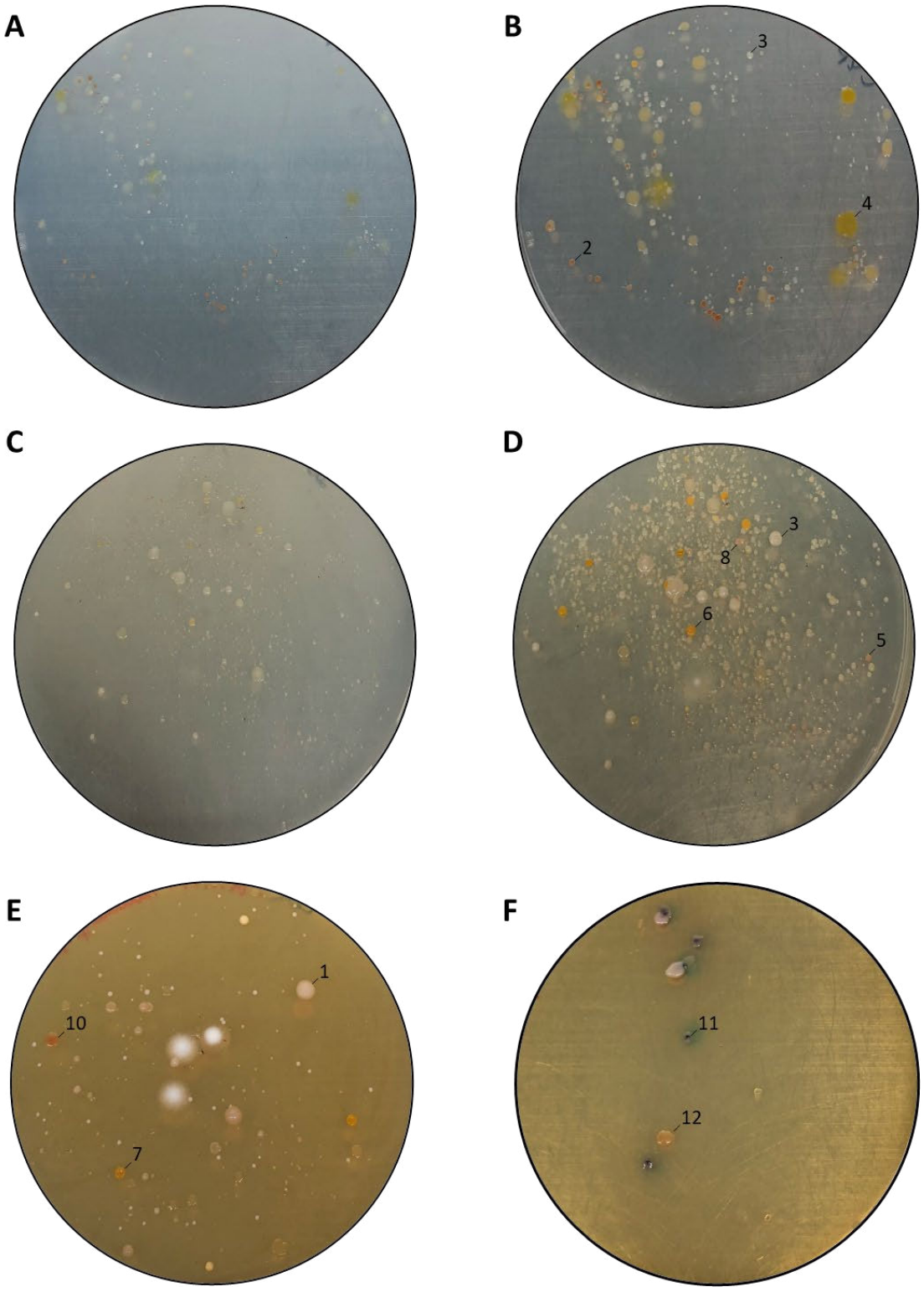


Figure 37. Photographies des boites de pétri ensemencées avec du mucus de seiche (A, B : encensement sur milieu CYT ; C, D : encensement sur milieu IO ; E : ensemencement sur milieu Col ; F : ensemencement sur milieu *Vibrio ChromoSelect* ; A, C : aspect après 72h à 20°C ; B, D, E et F : aspect après 72h à 20°C et 24h à 4°C). Les numéros correspondent aux bactéries identifiées et présentées dans le Tableau 1).

Deux bactéries du genre *Bacillus*, *B. hwajinpoensis* et *B. aquimaris,* ont été isolées. Ces deux souches ont initialement été identifiées dans les eaux de la mer Jaune en Corée (Yoon *et al.*, 2003, 2004) et ont plus récemment été décrites dans des microbiomes d'espèces marines comme des Spongiaires (Li *et al.*, 2011, Phelan *et al.*, 2012, Dupont *et al.*, 2014). La souche de *B. aquimaris* isolée chez la seiche diffère de celle isolée au niveau de l'intestin de *Litopenaeus vannamei*, capable de produire des caroténoïdes qui augmentent l'expression du gène *Rho* et l'activité prophénoloxydase de l'hôte, qui sont associées à la réponse immunitaire innée (Nguyen *et al.*, 2018). Chez la seiche la souche de *B. aquimaris* ne semble néanmoins pas produire de caroténoïdes (Figure 37).

Deux espèces isolées au niveau du mucus cutané chez la seiche, *S. equorum* et *R. scottomellica*, sont présentes chez le spongiaire *Asbestopluma hypogea* (Dupont *et al.*, 2014). La souche *Phychrobacter* sp. identifiée au niveau du mucus cutané de la seiche est très proche de *P. celer*, initialement isolée en mer Jaune en Corée (Yoon et al., 2005) et présente dans le microbiome intestinal chez *Gadus morhua* (Lauzon et al., 2010). Une souche de *Leisingera methylohalidivorans* a également été isolée chez la seiche. Chez le Céphalopode *E. scolopes* plusieurs espèces appartenant au genre *Leisingera* ont été décrites au niveau des glandes nidamentaires accessoires (Collins et al., 2015). Ces glandes sont impliquées dans la formation de l'œuf (Cornet, 2015) et les espèces bactériennes associées pourraient donc être retrouvées au niveau des œufs. Lors de l'éclosion, les bactéries pourraient être transmisses aux seiches fraichement écloses comme cela a été décrit chez les Poissons (Llewellyn *et al.*, 2014).

D'autres espèces bactériennes impliquées dans des pathologies chez certains Poissons comme *Acinetobacter lwoffii* (El-Sayyad *et al.*, 2010, Kozińska *et al.*, 2014, Cao *et al.*, 2018) ou *Tenacibaculum soleae* (Pineiro-Vidal *et al.*, 2008, López *et al.*, 2010) qui a également été identifiée chez *C. gigas* (Burioli *et al.*, 2018), ont été isolées dans le mucus cutané chez la seiche. Le mucus prélevé pour réaliser ces identifications provenaient d'une peau saine. Ces différentes espèces pathogènes chez d'autres espèces ne semble pas avoir d'impact néfaste chez la seiche. Cependant, la culture des bactéries du mucus sélectionne certaines bactéries au détriment d'autres selon leurs capacités de pousse sur les milieux sélectionnés. Ainsi au niveau du microbiome cutané de la seiche ces espèces pathogènes, peut être présentes en proportion insuffisante, pourraient profiter d'un déséquilibre afin d'entrainer l'apparition d'une pathologie comme observé chez les Poissons (Llewellyn *et al.*, 2014). Trois membres du

genre *Vibrio* précédemment décrits chez d'autres animaux aquatiques ont été isolés à partir du mucus de la seiche comme *Vibrio jasicida*, *Vibrio* sp. et *Vibrio* (*Alivibrio*) *fischeri*. *Vibrio jasicida*, appartient au clade Harveyi et a été isolée chez le homard *Jasus verrauxi*, l'ormeau *Haliotis* sp. et le saumon *Salmo salar* (Yoshizawa *et al.*, 2012). *Vibrio fischeri* est une bactérie symbiotique chez *Monocentris japonica* (Ruby et Nealson, 1976) et *E. scolopes* (Nyholm et McFall-Ngai, 1998) et capable de bioluminescence. Ces deux espèces ont également été isolées dans le mucus du ver polychète, *Myxicola infundibulum* (Stabili *et al.*, 2014). Un troisième membre du genre, qui a nécessité l'utilisation du gène de la gyrase et proche de *Vibrio ichthyoenteri*, est également retrouvé dans le mucus cutané de la seiche. *V. ichthyoenteri* a été précédemment isolé dans l'intestin de larves de *Paralichthys olivaceus* et désigné comme responsable de nécroses intestinales (Ishimaru *et al.*, 1996).

3.2. Approche moléculaire

3.2.1. Etude du transcriptome de la peau

L'analyse du transcriptome de peau révèle la présence de 137218 transcrits correspondant à des isoformes de 12460 gènes (d'après la définition de gène par l'assembleur Trinity) ayant une longueur moyenne de 758 nucléotides. Après blastx contre la banque de données Uniprot, 14% seulement des transcrits ont été annotés. Ce faible niveau d'annotation coïncide avec ceux obtenus pour le transcriptome des hémocytes (hct) (Benoist *et al.*, 2020b). D'autres transcriptomes d'organes de seiche possèdent un taux d'annotation faible comme le Corps Blanc (CB), 20% (Benoist *et al.*, 2020a), le système nerveux central, 28% (Zatylny-Gaudin *et al.*, 2016) ou les Glandes Nidamentaires Accessoires (GNA), 34% (Cornet, 2015). Les vingt transcrits les plus exprimés correspondent à quatre séquences partielles codant pour des reflectines, trois ayant déjà été décrites chez la seiche (Andouche *et al.*, 2013), à sept séquences nouvelles (non annotées), aux transcrits codant pour la transferrine, la poly-protéine structurale, le collagène, la poly-protéine non-structurale, la chitine désacétylase, l'actine, la poly-ubiquitine, une protéine *neurofilament-like* et le facteur d'élongation 1-α. Parmi ces derniers, huit d'entre eux, ceux de la transferrine, la poly-protéine structurale, la chitine désacétylase, l'actine, la poly-ubiquitine et les séquences nouvelles 1, 3 et 4, correspondent également aux transcrits les plus exprimés dans les transcriptomes d'hémocytes contrôles et exposés à *V. splendidus* (Benoist *et al.*, 2020b). Le transcrit du facteur d'élongation 1-α et celui codant pour la séquence nouvelle 1 font également partie

des transcrits les plus exprimés au niveau du corps blanc (Benoist *et al.*, 2020a). Les transcrits non annotés retrouvés dans plusieurs transcriptomes différents chez la seiche pourraient coder pour de nouvelles protéines spécifiques à la seiche qu'il pourrait être intéressant d'étudier en fonction de leur expression.

Certains des transcrits les plus exprimés dans le transcriptome de la peau de seiche ont été précédemment décrits dans les transcriptomes de peau de Téléostéens. C'est le cas du collagène chez *Salmo marmoratus* et *Salmo trutta* (Djurdjevič *et al.*, 2019), *Salmo salar* (Micallef *et al.*, 2012) et *Arapaima gigas* (Watanabe *et al.*, 2018). Sont également retrouvés des transcrits de protéines constitutives comme celui du facteur d'élongation 1-α identifié chez *Salmo marmoratus, Salmo trutta* (Djurdjevič *et al.*, 2019) et *Salmo salar* (Micallef *et al.*, 2012), ou l'on retrouve également celui de l'actine. La transferrine fait également partie des transcrits majoritaires au niveau cutané chez les males *Arapaima giga* (Watanabe *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'analyse du transcriptome, basée sur les annotations et certains motifs conservés a permis la mise en évidence d'autres facteurs en lien avec la réponse immunitaire (Tableau 2).

Parmi les facteurs identifiés, plusieurs membres de la voie de signalisation Toll/NF-κB ont été identifiés. Une séquence partielle de *Toll-Like Receptor* (TLR) correspondant au domaine TIR, nommée TLR-p présente 39,02% d'homologie de séquence avec le TLR-2 de *Canis lupus familiaris*. Deux autres TLR précédemment identifiés chez la seiche sont également retrouvés au niveau de la peau : TLR-γ présent également au niveau des GNA (Cornet *et al.*, 2015a), du CB (Benoist *et al.*, 2020a) et des hct (Benoist *et al.*, 2020b) et TLR-h au niveau des hémocytes (Benoist *et al.*, 2020b). Quatre membres de la voie sont nouvellement identifiés, IRAK4-p qui possède 52,63% d'identité avec IRAK-4 chez *Haliotis discus discus*, Tollip-p qui possède 51,79% d'identité avec Tollip chez *Danio rerio*, IKK-p qui possède 36,94% d'identité avec IKK chez *Cyclina sinensis* et NF-κB-p p105 qui possède 49,12% d'identité avec NF-κB p105 chez *Gallus gallus*. D'autres facteurs, précédemment identifiés au niveau des GNA (Cornet *et al.*, 2015a) comme MyD88, IκB ou TRAF6 sont également retrouvés dans le transcriptome de peau.

Tableau 2. Facteurs immunitaires identifiés dans le transcriptome de peau.

ID	Nom	L (pb)	L (aa)	Fonction probable
TR90372|c1_g1_i1	Transferrine (partiel)	1512	313	Liaison au fer
TR5906|c0_g1_i2	*Toll-like receptor* γ (TLRγ)	2861	833	Reconnaissance
TR31922|c0_g2_i3	*Toll-like receptor* hémocytes (TLR-h) (partiel)	1741	536	Reconnaissance
TR41984|c0_g23_i1	*Toll-like receptor* peau (TLR-p) (partiel)	812	162	Reconnaissance
TR20767|c0_g1_i1	*Myeloid differentiation factor* 88 (My88)	1938	338	Signalisation Toll
TR25342|c0_g1_i1	*Toll-interacting protein* (Tollip-p)	1343	279	Signalisation Toll
TR41086|c5_g1_i1	*Interleukin-1-receptor associated kinase*-1 (IRAK-1)	2229	649	Signalisation NF-κB
TR42010|c1_g1_i1	*Interleukin-1-receptor associated kinase*-4 (IRAK-4-p)	1939	445	Signalisation NF-κB
TR37884|c0_g2_i2	*TNF receptor-associated factor*-6 (TRAF6)	2364	547	Signalisation NF-κB
TR34670|c0_g1_i2	*Inhibitor of* NF-κB *kinase* (IKK-p)	3333	693	Signalisation NF-κB
TR17535|c0_g1_i1	NF-κB *inhibitor* (IκB)	2609	337	Signalisation NF-κB
TR35030|c0_g2_i6	*Nuclear factor* NF-κB p105 (NF-κB-p p105)	3390	998	Signalisation NF-κB
TR24628|c0_g1_i2	*Nitric oxide synthase* (iNOS-h)	4162	1106	Inhibition bactérienne
TR38399|c0_g2_i1	*Nitric oxide synthase* (iNOS-p)	3959	1152	Inhibition bactérienne
TR37925|c0_g8_i2	Galectine-1 (CB)	2101	547	Reconnaissance des glucanes
TR32087|c0_g1_i2	Galectine-2 (CB)	1025	237	Reconnaissance des glucanes
TR35275|c0_g1_i1	*Bactericidal-permeability-increasing protein* (BPI-p1)	1563	460	Liaison aux bactéries
TR17321|c0_g1_i1	BPI (GSP)	2545	490	Liaison aux bactéries
TR40338|c3_g2_i1	*Lipopolysaccharide Binding Protein* LBP (CB et hct)	2342	537	Liaison aux bactéries
TR14900|c0_g1_i1	*PeptidoGlycan Recognition Protein* PGRP-h2	956	204	Reconnaissance des bactéries
TR128911|c0_g1_i1	PGRP-p1 (partiel)	463	102	Reconnaissance des bactéries
TR23884|c0_g1_i1	PGRP-p2	992	269	Reconnaissance des bactéries
TR37343|c0_g1_i1	PGRP-p3	1070	229	Reconnaissance des bactéries
TR40655|c7_g1_i2	PGRP-p4	1420	285	Reconnaissance des bactéries
TR41722|c24_g52_i1	PGRP-p5	874	168	Reconnaissance des bactéries

L : longueur ; pb : paire de bases ; aa : acide aminé

L'identification de membres de la voie Toll/NF-κB au niveau de la peau est une première chez un Céphalopode. Chez d'autres Mollusques, notamment Bivalves, chez qui le manteau joue le rôle de première barrière certains membres de la voie ont été identifiés. C'est le cas chez *Mercenaria mercenaria*, chez qui deux membres de la voie, un TLR et TRAF6 sont surexprimés 28 et 48 jours après injection d'une solution contenant le parasite QPX (*quahog parasite unknown*) (Perrigault *et al.*, 2009). Chez les Poissons, et notamment chez *Misgurnus anguillicaudatus* (Long *et al.*, 2013) et *Epinephelus coioides* (Hu *et al.*, 2017) plusieurs voies de signalisation en lien avec l'immunité, dont la voie des TLR ont été identifiées. Chez d'autres espèces, plusieurs TLR ont été identifiés au niveau de la peau et sont surexprimés après défi immunitaire (Dong *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2016, Hu *et al.*, 2017, Wu *et al.*, 2019, Zhu *et al.*,

2020). Enfin chez *Epinephelus coioides*, IRAK-4 est surexprimé 6h, 1 jour et 5 jours après contact avec le parasite *Cryptocaryon irritans* (Li *et al.*, 2014). Chez la seiche, l'ensemble des membres de la voie Toll/NF-κB identifiés sont donc certainement impliqués dans la réponse aux pathogènes, ce qui devra être confirmé après défi bactérien dans de nouvelles expérimentations.

En plus des membres de la voie Toll/NF-κB, d'autres acteurs immunitaires ont été identifiés dont deux *Nitric Oxide Synthase* inductibles (iNOS), deux galectines, trois protéines de liaisons aux lipopolysaccharides et 6 *PeptidoGlycan Recognition Protein* (PGRP) (Tableau 2). La production de molécules cytotoxiques comme le *Nitric Oxide* (NO) est un mécanisme important dans la défense immunitaire. Deux iNOS ont été identifiés au niveau du transcriptome de la peau, iNOS-h, précédemment décrite au niveau des hct (Benoist *et al.*, 2020b) et iNOS-p, nouvellement décrite au niveau de la peau. Celle-ci possède 46,49% d'identité avec NOS1 chez *Nautilus pompilius*. Chez *C. gigas*, *Cg*-NOS est surexprimé après défi immunitaire (Jiang *et al.*, 2016) tandis que l'expression au niveau des hct de *So*-iNOS-h semble induite par le contact avec *Vibrio splendidus* (Benoist *et al.*, 2020b). Les deux galectines identifiées au niveau du CB (Benoist *et al.*, 2020a) sont également identifiées au niveau de la peau. Parmi les PGRP identifiées au niveau de la peau, sont retrouvées PGRP-h2, précédemment observé au niveau des hct (Benoist *et al.*, 2020b) et PGRP-p2 dont la séquence est quasiment identique à celle de PGRP-1 identifiée au niveau du CB (Benoist *et al.*, 2020a), avec une délétion de deux acides aminés (L-A, 90-91) et une substitution d'une alanine par une proline (92). En revanche, aucune PGRP identifiée au niveau des GNA (Cornet, 2015) n'a été identifiée au niveau de la peau. Quatre nouveaux PGRP sont donc présentes au niveau de la peau, dont PGRP-p1 qui correspond à une séquence partielle du domaine *peptidoglycan-binding type-2 amidase* (Ami_2). Toutes les autres PGRP retrouvées au niveau du transcriptome de la peau possèdent le domaine Ami_2 (Figure 38) impliqué dans l'hydrolyse des peptidoglycanes bactériens (Dziarski et Gupta, 2006). Deux types de PGRP ont été identifiés, des PGRP membranaires possédant un ou deux domaines transmembranaires ainsi que des PGRP sécrétées possédant un peptide signal.

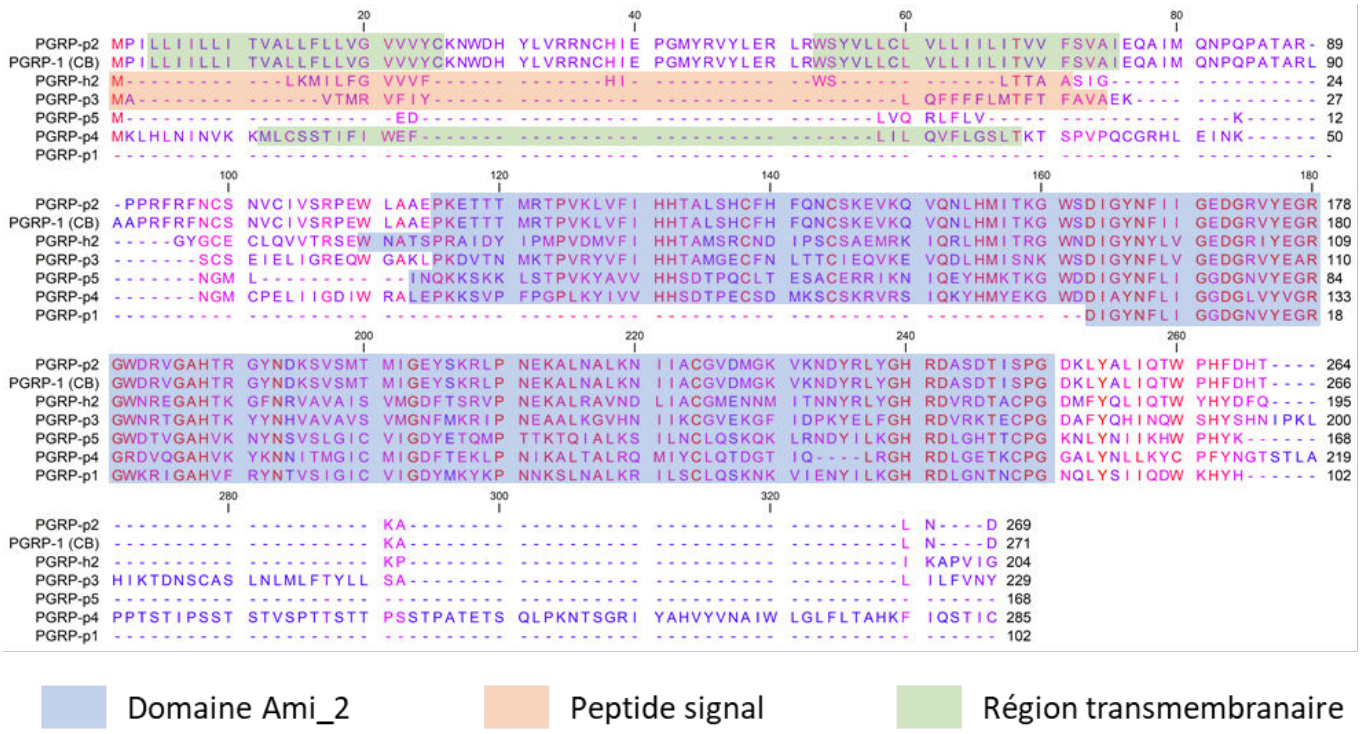


Figure 38. Alignement des six PGRP identifiées dans le transcriptome de peau chez la seiche.

Chez *Euprymna scolopes*, deux PGRP sont impliqués dans la symbiose avec *Vibrio fischeri* au sein de l'organe de lumière (Troll *et al.*, 2009, 2010). Chez la seiche, certains PGRP pourraient jouer un rôle similaire permettant la sélection de certaines bactéries au sein du microbiome cutané. Trois protéines de liaison : BPI et LBP décrites respectivement au niveau des GSP (Cornet *et al.*, 2014) et du CB (Benoist *et al.*, 2020a), et BPI-p nouvellement identifiée, sont présentes au niveau de la peau. Deux galectines précédemment identifiées au niveau du CB (Benoist *et al.*, 2020a) sont retrouvées au niveau de la peau. Chez *C. gigas* une BPI possédant une activité antibactérienne a été identifiée (Gonzalez *et al.*, 2007b) tandis que chez *Haliotis rufescens*, une galectine est surexprimée après contact avec une bactérie pathogène, *Vibrio anguillarum* (Maldonado-Aguayo *et al.*, 2014). Ces molécules pourraient donc être impliquées dans la réponse contre les bactéries pathogènes ou afin de réguler les bactéries présentes au sein du microbiome cutané. Enfin, contrairement aux Poissons ou aux Amphibiens chez qui la peau est source de peptides antimicrobiens (PAM) (Rakers *et al.*, 2013, Varga *et al.*, 2019), aucun PAM n'a été identifié dans le transcriptome après annotation ou recherche de motifs conservés.

3.2.2. Etude du protéome du mucus

L'extraction protéique du mucus, qui est un liquide très visqueux riche en mucopolysaccharides (Figure 32) a nécessité une mise au point. Trois protocoles ont été utilisés : extraction au DTT, extraction au PBS et extraction à l'HFBA. Quinze, 116 et 781 protéines ont été identifiées à partir des extraits au DTT, au PBS et à l'HFBA, respectivement. L'extraction à l'HFBA a donc été la plus efficace, néanmoins les trois extractions sont complémentaires puisque 793 protéines uniques ont été identifiées au total. Parmi ces protéines, 88% sont annotées après blastp contre la banque Uniprot. Les dix protéines possédant les scores les plus élevés en spectrométrie de masse sont la proto-cadhérine, la protéine neurofilament-like, une protéine apparentée à une mucine (mucine-*like*), la zonadhésine, la myosine, la filamine-A, l'actine et deux protéines non annotées. Parmi ces dix protéines, seule deux, l'actine et la protéine *neurofilament-like* sont également présentes dans les transcrits les plus exprimés du transcriptome de peau. Aucune des quatre reflectines présentes dans les vingt transcrits les exprimés au niveau de la peau n'a été identifiée au niveau du mucus ce qui peut s'expliquer par la présence de ces protéines au niveau des iridophores qui sont des cellules retrouvées en profondeur, sous l'épiderme (Figure 30).

Des protéines impliquées dans l'architecture cellulaire comme l'actine ou la tubuline α et β et le métabolisme de l'ADN comme les histones, précédemment décrites dans le mucus cutané chez les Poissons (Rajan *et al.*, 2011, Easy *et al.*, 2012, Cordero *et al.*, 2015, 2016, Jurado *et al.*, 2015, Patel et Brinchmann, 2017) sont également retrouvées chez la seiche. Deux protéines, la calmoduline et la calréticuline, impliquées dans le métabolisme du calcium et identifiées au niveau du CB (Benoist *et al.*, 2020a), ont également été décrites au niveau du mucus cutané de la seiche. Chez plusieurs espèces de Poissons, des protéines du métabolisme du calcium sont présentes au niveau du mucus cutané (Rajan *et al.*, 2011, Cordero *et al.*, 2015, Patel et Brinchmann, 2017). Chez l'amphioxiforme *Branchiostoma japonicum*, la calréticuline produite en système recombinant est capable de se lier à des bactéries à Gram positif et négatif, et augmente *in vitro* les capacités de phagocytose des bactéries par les macrophages de bar (Liu *et al.*, 2013). La calréticuline présente dans le mucus pourrait donc participer à la réponse immunitaire au niveau de la peau chez la seiche.

Ainsi, le mucus de la seiche possède des constituants semblables à ceux identifiés dans le mucus de plusieurs espèces de Poissons confortant son rôle dans la défense immunitaire. En

effet, quatre facteurs potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire et dix facteurs en lien avec la réponse au stress ou au stress oxydatif ont été identifiés (Tableau 3).

Tableau 3. Facteurs en lien avec l'immunité identifiés dans le mucus cutané.

Nom	ID	PM	Score	#Pep
Galectine-1	TR37925|c0_g8_i2	64	67,2	2
Cystatine-B	TR34843|c0_g4_i1	11	85,1	3
Transferrine (partiel)	TR90372|c1_g1_i1	ND	311,7	11
Thioester-containing protein CD109	TR21407|c0_g1_i1	158	578,1	29
Superoxyde dismutase Cu/Zn (SOD Cu/Zn)	TR4461|c0_g1_i1	16	301,5	8
Glutathion S-transférase (GST-p)	TR38787|c0_g1_i2	23	147,6	8
Glutathion S-transférase (GST)	TR36403|c1_g1_i1	25	94,3	4
Peroxyrédoxine-1 (PRX1)	TR23201|c0_g1_i1	23	160,3	12
Peroxyrédoxine-2A (PRX2A-p)	TR40899|c1_g3_i1	34	43,4	2
Peroxyrédoxine-4 (PRX4)	TR8139|c0_g1_i1	27	72,9	4
Peroxyrédoxine-5 (PRX5)	TR26510|c0_g1_i2	17	129,2	7
Peroxyrédoxine-6 (PRX6)	TR20739|c0_g1_i1	24	22	4
Heat shock cognate 71 kDa (HSC71-p)	TR33077|c0_g1_i2	71	462,9	18
Heat shock protein 90 (HSP90)	TR3043|c0_g1_i1	70	231,2	7
Calréticuline	TR3902|c0_g1_i1	48	145,7	8
Histone H4	TR28104|c0_g3_i1	11	155,8	10
Histone H2A	TR42445|c6_g18_i1	13	218,3	9

PM : poids moléculaire (kDa), #Pep : nombre de peptides, ND : non disponible

La galectine-1 identifiée dans le transcriptome de peau est détectée au niveau du mucus. Chez les Poissons, plusieurs galectines sont été retrouvées au niveau du mucus cutané (Tasumi *et al.*, 2004, Rajan *et al.*, 2011, 2013). Un homologue de la cystatine-B, possédant 44,9% d'identité avec la cystatine-B surexprimée au niveau des glandes surrénales chez *Oplegnathus fasciatus* après injection de la bactérie *Edwardsiella tarda* (Premachandra *et al.*, 2012b) a été identifié dans le mucus cutané de la seiche. Plusieurs homologues de la cystatine-B ont été identifiés chez des Protostomiens dont des Mollusques et sont surexprimés après contact avec des bactéries ou des levures (Li *et al.*, 2010, Premachandra *et al.*, 2012a, 2013). Chez les Poissons, des homologues de la cystatine-B sont retrouvées au niveau de protéomes de mucus (Rajan *et al.*, 2011, Patel et Brinchmann, 2017). Une séquence partielle homologue de la transferrine, précédemment décrite au niveau des hct (Benoist *et al.*, 2020b) est également retrouvée au niveau du mucus comme chez plusieurs espèces de Poissons (Easy *et al.*, 2012, Cordero *et al.*, 2015). La *thioester-containing protein* homologue de la CD109, identifiée au niveau du CB (Benoist *et al.*, 2020a) chez la seiche est retrouvée dans le mucus. Cette protéine

est liée à l'hématopoïèse chez les Mammifères (Hernández-Campo *et al.*, 2007) et pourrait également l'être chez les Céphalopodes puisque présente au niveau du CB (Salazar *et al.*, 2015, Benoist *et al.*, 2020a). Cependant, chez *E. scolopes* l'homologue de la CD109 pourrait avoir un rôle dans des processus immunitaires (Yazzie *et al.*, 2015) comme cela a été démontré chez l'Homme (Lin *et al.*, 2002). Ainsi, ces quatre protéines identifiées au niveau du mucus cutané chez la seiche pourraient intervenir dans la réponse immunitaire. A ces protéines s'ajoutent des enzymes comme des serine protéases, une *asparaginyl* endopeptidase, des aminopeptidases, des carboxypeptidases, des cathepsines A, B, C, D, K, L1, une chymotrypsine B. Toutes ces enzymes identifiées dans le secretome cutané de *S. officinalis* sont également retrouvées dans celui des Poissons et sont impliquées dans la dégradation des pathogènes et des protéines étrangères (Dash *et al.*, 2018).

De nombreuses protéines liées au stress et au stress oxydatif ont précédemment été décrites au niveau du CB (Benoist *et al.*, 2020a) et sont retrouvées dans le sécretome cutané comme SOD Cu/Zn, GST, PRX1, 4, 5 et 6 et HSP90. Trois protéines sont nouvellement identifiées au niveau du mucus, GST-p, PRX2A-p et HSC71-p. Chez les Poissons, plusieurs protéines liées au stress oxydatif ont également été décrites au niveau de protéomes de mucus (Cordero *et al.*, 2015, 2016, Jurado *et al.*, 2015, Patel et Brinchmann, 2017). Chez *Ictalurus furcatus*, plusieurs de ces facteurs comme la Glutathion S-Transférase (GST) ou les peroxyrédoxines 1 et 2 sont différentiellement exprimées au niveau du mucus cutané après infection avec *Aeromonas hydrophila* (Li *et al.*, 2013).

3.2.3. Etude du peptidome du mucus

L'analyse du peptidome du mucus cutané après les deux extractions MAC et AC a permis l'identification de 5423 et 2387 peptides, provenant de 571 et 345 précurseurs, respectivement. Les deux analyses permettent l'identification de 6676 peptides uniques provenant de 702 précurseurs. Parmi ces 702 précurseurs, 55% sont annotés après blastp contre la banque Uniprot. De nombreux peptides provenant de protéines structurales telles que la myosine et l'actine ou des protéines impliquées dans des processus métaboliques comme la nucléoside diphosphate kinase ou les histones sont identifiées. Ces peptides proviennent certainement de l'hydrolyse des protéines du mucus par les différentes enzymes mises en évidence dans le protéome. Certains peptides peuvent correspondre à des PAM comme ceux dérivés des histones identifiés chez plusieurs espèces comme la parasine-I chez

Parasilurus asotus (Park *et al.*, 1998), l'hipposine chez *Hippoglossus hippoglossus* (Birkemo *et al.*, 2003), la buforine chez *Bufo bufo gargarizans* (Park *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 1996), l'abhisine chez le mollusque *Haliotis discus discus* (De Zoysa *et al.*, 2009) ou l'histine chez le crustacé *Fenneropenaeus indicus* (Sruthy *et al.*, 2019). Chez la seiche, Houyvet (2018) a identifié plusieurs peptides issus de l'histone H2B et de l'actine dans une fraction active d'extrait peptidique de peau.

L'analyse de certains peptides issus de notre étude avec les outils de prédiction de CAMP révèle la présence de probables PAM issus de l'actine ou de l'histone H2A (Tableau 4). Une deuxième analyse portée sur les peptides issus de précurseurs non annotés et répondant aux critères utilisés pour identifier des PAM au niveau des hct (Benoist *et al.*, 2020b) a été réalisée. Celle-ci a permis d'identifier quatre peptides présentant un potentiel antimicrobien élevé (Tableau 4).

Tableau 4. Peptides possédant un potentiel antimicrobien identifié au niveau du mucus.

Code	Séquence	Précurseur, Résultat au blast	L (aa)	C	Hα - RHS	Algorithmes CAMP			
						SVM	RFC	ANN	DAC
IS18	IGGSILASLSTFQQMWIS	TR37733|c5_g10_i2, actine	18	0	Oui – 6	0,811	0,5805	NAMP	0,595
LA29	LAIRNDEELNKLLSGVTIAQGGVLPNIQA	TR42445|c6_g18_i1, histone H2A	29	-1	Oui – 5	0,915	0,7105	AMP	0,871
II13	IAISESDIVPKII	TR51755|c0_g1_i1, inconnu	13	-1	Oui – 0	0,886	0,605	AMP	0,743
VY16	VPDEILGAFKAIVSAY	TR40617|c1_g5_i1, inconnu	16	-1	Oui – 8	0,566	0,5045	AMP	0,743
AG12	AGGGRFPFQSVG	TR35051|c1_g1_i1, inconnu	12	+1	Non	0,835	0,2715	AMP	0,641
LK10	LVSIVAFLNK	TR25486|c0_g1_i1, inconnu	10	+1	Oui – 4	0,387	0,6165	AMP	0,969

L : longueur, aa : acide aminé, C : charge, Hα : prédiction hélice-α, RHS : Résidus Hydrophobiques sur la même Surface, SVM : *Support Vector Machine*, RFC : *Random Forest Classifier*, ANN : *Artificial Neural Network*, DAC : *Discriminant Analysis classifier*.

Cinq peptides présentent des similitudes de séquences avec des PAM identifiés au niveau de la peau de diverses grenouilles (Figure 39) comme les temporines TP2 (Guo *et al.*, 2014) et SHa (Abbassi *et al.*, 2008), le PG-L apparenté à la bombésine (Simmaco *et al.*, 1990), le peptide VR23 (Suzuki *et al.*, 2007) ou l'alyteserine-2a (Conlon *et al.*, 2009). Le peptide VY16 possède des similitudes avec un peptide modifié de grenouille, la nigrocine HLM (Bao *et al.*, 2018). Il est à noter que tous les PAM de grenouilles sont des peptides cationiques, certains des

peptides du Tableau 4 sont anioniques ou neutre. Ces peptides devront faire l'objet d'une synthèse pour valider leur effet antibactérien.

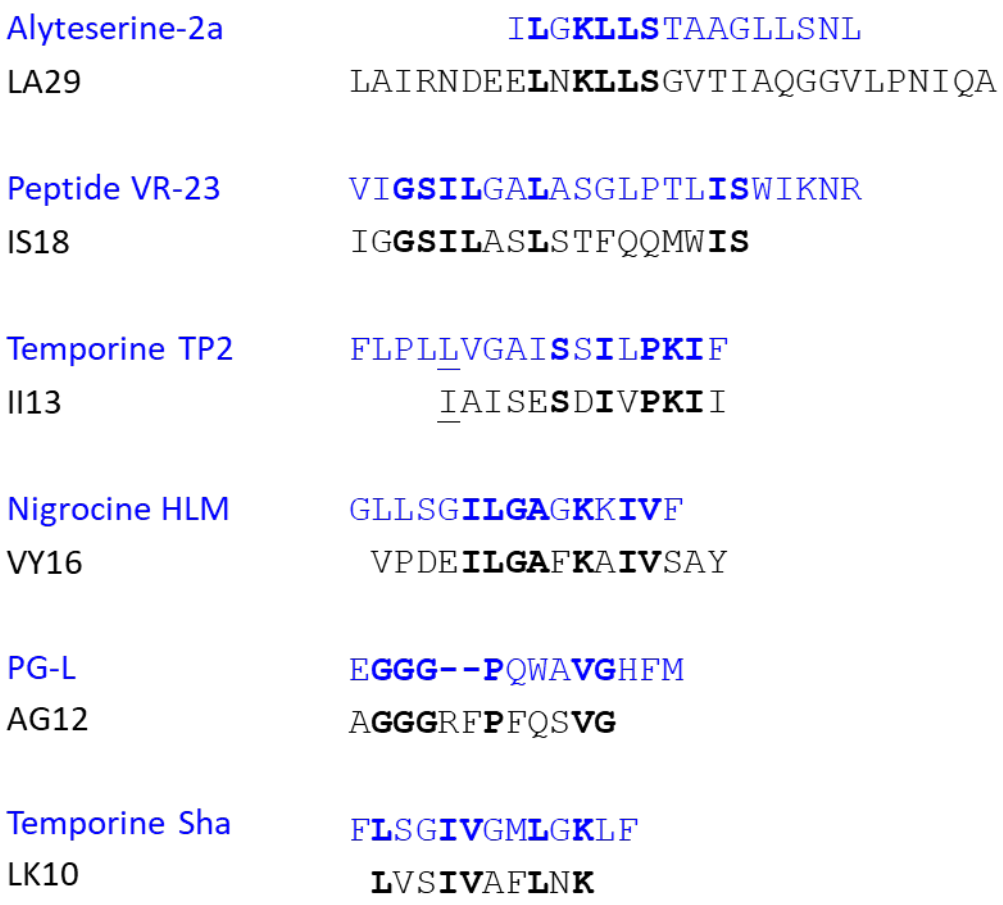


Figure 39. Alignement des PAM potentiels avec des PAMs identifiés chez les grenouilles correspondant aux résultats sur APD.

4. Conclusions

L'étude de l'ensemble peau-mucus-microbiome chez la seiche menée au cours de cette thèse et présentée dans ce chapitre a permis d'acquérir un certain nombre de résultats même si certains d'entre eux restent préliminaires. L'approche histologique a permis d'étudier la structure de la peau. Celle-ci est composée d'un épiderme simple recouvrant un tissu conjonctif dense et riche en cellules pigmentaires. L'épiderme est riche en cellules sécrétrices se regroupant en deux catégories muqueuses et séreuses. L'étude en MEB de la surface de la peau révèle la présence de bactéries qui possèdent dans certains cas une forte densité et qui semblent liées au mucus. Parmi les bactéries cultivables retrouvées dans ce mucus, plusieurs espèces précédemment décrites chez des animaux marins ont été identifiées. Cette étude reste très préliminaire et il serait intéressant de réaliser une analyse en métagénomique afin d'accéder à une plus grande diversité bactérienne. Cette analyse permettra aussi d'avoir des informations concernant la proportion relative des différentes classes, ordres et genres de bactéries présents au sein du mucus cutané.

L'analyse moléculaire de la peau et du mucus ont permis la mise en évidence de nombreuses protéines dont des facteurs impliqués dans la réponse immunitaire et un certain nombre d'enzymes qui peuvent avoir un rôle dans l'élimination des bactéries pathogènes de manières directe ou indirecte. En effet certains facteurs comme ceux de reconnaissance, peuvent stimuler la synthèse et la libération d'effecteurs immunitaires par la peau ou générer des PAM à l'image des enzymes présentes dans le mucus comme cela a été observé pour la cathepsine D (Cho *et al.*, 2002). D'autres peuvent agir sur les bactéries en les tuant comme le NO ou les PAM. Concernant ces facteurs bactéricides ou bactériostatiques, peu de facteurs déjà identifiés ont été caractérisés par les approches omiques. Aucun lysozyme n'a été identifié ni aucun PAM apparenté à des molécules déjà connues. L'analyse peptidomique a mis en évidence de nombreux peptides issus de la dégradation de protéines cutanées, il est possible que certains de ces peptides ait un effet antimicrobien comme cela a été observé pour les PAM dérivés d'histones (Cho *et al.*, 1998, Birkemo *et al.*, 2003). Il est possible également que la présence importante de ces peptides empêche la détection d'autres PAM plus conventionnels ou de neuropeptides comme cela a été mis en évidence chez les Poissons (Rakers *et al.*, 2010). L'analyse de peau lésée pourrait peut-être permettre d'identifier d'autres facteurs immunitaires et davantage de facteurs antimicrobiens.

Discussion générale et Perspectives

1. Discussion générale

L'objectif de ces travaux de thèse était d'appréhender le système immunitaire chez *Sepia officinalis* en étudiant les principales cellules impliquées dans les mécanismes de défense : les hémocytes (hct) ; l'organe à l'origine de ces cellules : le Corps Blanc (CB) ; ainsi que la première ligne de défense : la barrière cutanée associant la peau et le mucus.

L'analyse des transcriptomes du CB, des hct et de la peau a permis d'identifier de nombreux facteurs immunitaires en lien avec la reconnaissance, les voies de signalisation, ou l'élimination des pathogènes. Certains ont été identifiés et donc confirmés par des analyses en spectrométrie de masse au niveau du CB, des hct ou du mucus pour les facteurs identifiés au niveau du transcriptome de la peau (Figure 40). De nouveaux membres de la voie de signalisation Toll/NF-κB ont été caractérisés chez *Sepia officinalis* comme les récepteurs TLR-h ou TLR-p, IRAK-4p et IRAK-1, les inhibiteurs IKK-p, IKK-h et IKK-α, les facteurs TRAF3 et 7 ou les deux protéines Tollip et Tollip-p. Certains de ces facteurs (TRAF7, IRAK-1) ont été identifiés pour la première fois chez un Céphalopode et viennent compléter les travaux ultérieurs ayant fait l'objet d'une revue (Castillo *et al.*, 2015). D'autres membres de la voie de signalisation précédemment identifiés au niveau des Glandes Nidamentaires Accessoires (GNA) (Cornet, 2015, Cornet *et al.*, 2015a) ont également été retrouvés au cours de cette thèse au niveau des hct, du CB et/ou de la peau. L'ensemble des travaux menés chez la seiche permet ainsi de localiser de manière plus précise les acteurs impliqués dans la réponse immunitaire. Par ailleurs, alors que certains acteurs sont retrouvés au niveau des différents tissus ou cellules étudiés comme MyD88 ou IRAK4 ; d'autres apparaissent plus spécifiques comme le TLR-p ou les PGRP-p (Figure 40).

Concernant les facteurs impliqués dans la reconnaissance et/ou la liaison aux bactéries, neuf *PeptidoGlycan Recognition Proteins* (PGRP), une *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP), une *Bactericidal/Permeability Increasing proteins* (BPI) et deux galectines ont été nouvellement identifiés durant ces travaux. Ces résultats complètent les études précédentes de Cornet et collaborateurs ayant décrit au niveau des GNA et des glandes salivaires postérieures (GSP) : trois PGRP, deux LBP et une BPI (Cornet *et al.*, 2014, Cornet, 2015), cette dernière ayant également été retrouvée au niveau de la peau.

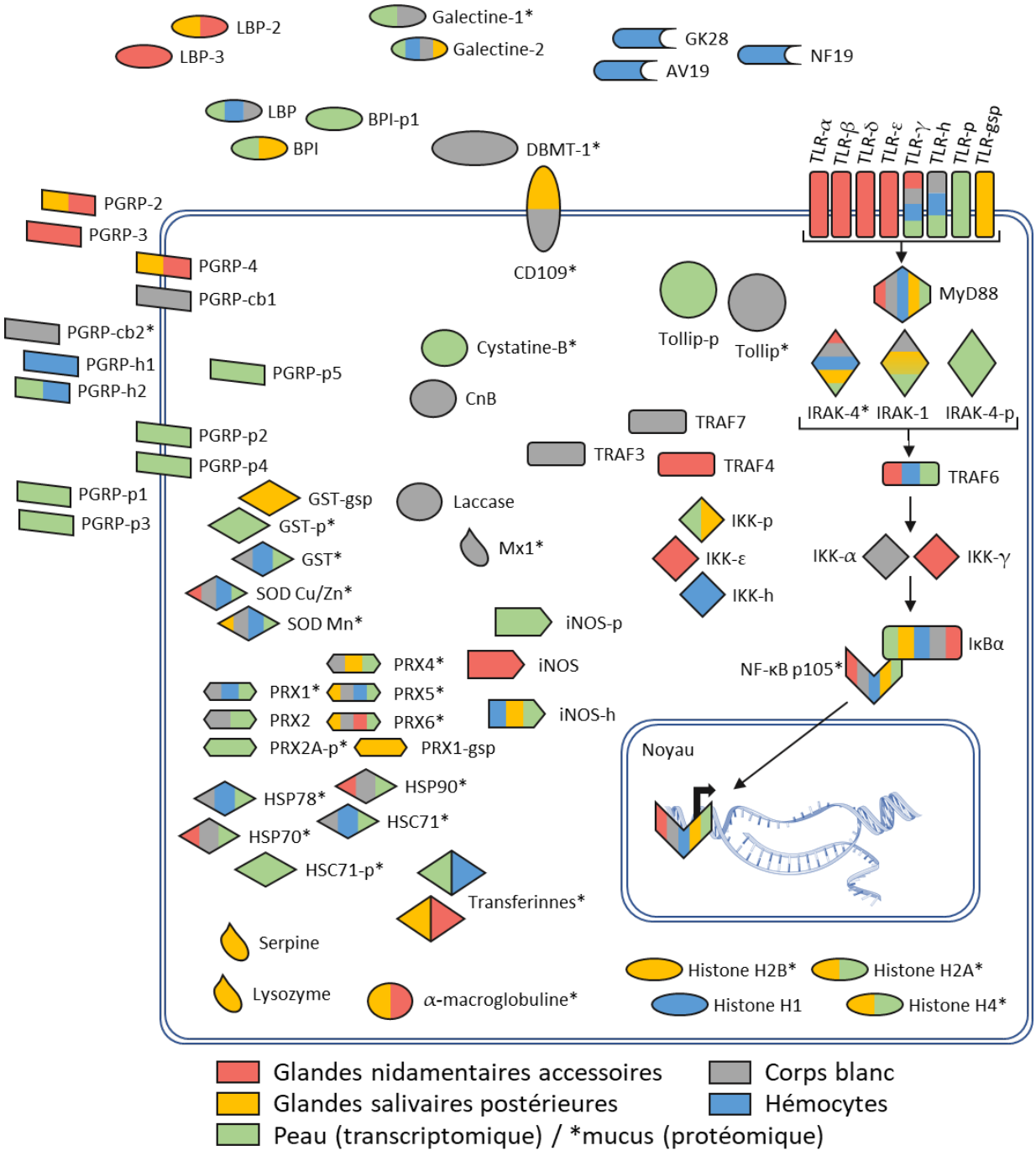


Figure 40. Représentation schématique de l'ensemble des facteurs impliqués dans le système immunitaire chez *Sepia officinalis* (DBMT-1 : *deleted in malignant brain tumor*-1 ; iNOS : *nitric oxide synthase inducible* ; NF-κB p105 : *nuclear factor* κB *subunit* p105 ; IKK : *inhibitor of nuclear factor* κ-B *kinase* ; IκBα : *inhibitor of nuclear factor* κ-B ; TRAF : TNF *receptor-associated factor* ; TRAF7 : E3 *ubiquitin-protein ligase* TRAF7 ; IRAK : ; TLR : Toll-*like receptor* ; MyD88 : myeloid différenciation factor 88 ; Tollip : Toll-*interacting protein* ; CnB : *calcineurin subunit* B type 1 ; PGRP : *peptidoglycan recognition protein* ; LBP : *lipopolysaccharide binding protein* ; BPI : *bactericidal/permeability-increasing protein* ; HSP : *heat shock protein* ; HSC : *heat shock cognate* ; SOD : *superoxide dismuatase* ; PRX : *peroxiredoxin* ; Mx1 : *interferon-induced* GTP-*binding protein* Mx1 ; * : facteurs identifiés en spectrométrie de masse).

Les analyses protéomiques ont permis de confirmer la présence de certains facteurs immunitaires comme la galectine-1, la Mx1 ou le PGRP-cb2 au niveau du corps blanc ou la galectine-1, la transferrine ou la cystatine-B au niveau du mucus. Mais ces analyses ont surtout permis de détecter des nombreux facteurs associés au stress et au stress oxydatif. En effet, à l'exception de la péroxyredoxine-2, tous les membres associés au stress et au stress oxydatif identifiés au cours de l'analyse transcriptomique ont été confirmés lors des analyses en spectrométrie de masse. Parmi tous ces facteurs, une grande majorité ont été nouvellement identifiés chez la seiche comme les péroxyredoxines-1, 2 et 2A-p, la HSC71 ou la HSP78.

Enfin, d'autres facteurs comme les *Nitric Oxide Synthases* iNOS-h et iNOS-p, s'ajoutant à l'iNOS identifiée au niveau des GNA (Cornet *et al.*, 2015a) ; la cystatine-B, le CD109, la sous-unité B type 1 de la calcineurine, la Mx1 ou la transferrine, dont un homologue a été décrit au niveau des GSP et des GNA (Cornet *et al.*, 2014, Cornet, 2015) complètent la liste des facteurs associés à l'immunité nouvellement identifiés chez la seiche. Certains facteurs immunitaires précédemment identifiés au niveau des GSP et des GNA comme la serpine, l'α-macroglobuline ou le lysozyme n'ont pas été décrits au niveau des tissus ou cellules étudiés lors de ces travaux de thèse. L'absence du lysozyme au niveau des hémocytes pose question, une activité lysozyme ayant été décrite au niveau des hémocytes (Le Pabic *et al.*, 2014a), Toutefois, il n'est pas exclu que d'autres protéines puissent avoir une activité lysozyme-*like*. Aussi, l'α-macroglobuline et la CD109 appartenant à la même famille de protéines, il est possible qu'elles aient des actions complémentaires.

La Figure 40, regroupant l'ensemble des données concernant le système immunitaire chez la seiche, permet donc de « cartographier » les différents facteurs impliqués dans la réponse associée aux agressions extérieures ou aux microorganismes. De façon intéressante deux tissus, les GNA et la peau, présentent une grande diversité de facteurs impliqués dans la reconnaissance apparentés aux TLR ou aux PGRP. Les GNA sont des glandes symbiotiques possédant une grande diversité bactérienne décrite par Grigioni et collaborateurs (2000) à l'image de la peau qui renferme au sein de son mucus de nombreuses bactéries dont certaines espèces cultivables ont été identifiées au cours de ces travaux de thèse. L'ensemble des facteurs de reconnaissance identifiés au niveau des GNA et de la peau pourrait donc être impliqué dans la mise en place et le maintien des Procaryotes présents au sein des microbiomes et voir leurs expressions modulées afin de sélectionner des espèces bénéfiques

au détriment des espèces pathogènes, comme observé dans la symbiose entre *Euprymna scolopes* et *Vibrio fischeri* (Heath-Heckman *et al.*, 2014).

Par ailleurs certains facteurs ont été identifiés uniquement au niveau du CB comme TRAF3 et TRAF7 ou la Mx1, ce qui suggère que le CB pourrait avoir une fonction immunitaire spécifique, indépendante de celle des hct qu'il renferme. En effet, à côté des facteurs immunitaires identifiés au niveau du CB, plusieurs facteurs associés à l'hématopoïèse ont été décrits, dont bon nombre le sont pour la première fois chez un Céphalopode (Figure 41). En complément, l'analyse du protéome du CB a été réalisée pour la première fois et a permis de confirmer la présence de certains des facteurs hématopoïétiques tout en mettant en lumière l'activité métabolique intense de cet organe. Ces analyses correspondent à un apport majeur concernant l'hématopoïèse et peuvent permettre d'initier des approches fonctionnelles pour appréhender notamment l'aspect régulation.

Si les approches -omiques mises en œuvre au cours de ces travaux ont permis de faire une avancée considérable au niveau du sytsème immunitire de la seiche, la recherche de Peptides AntiMicrobiens (PAM) à partir des transcriptomes s'est révélée difficile. Aucun PAM n'a pu être identifié sur la base de la recherche de motifs conservés ou de l'annotation de PAM précédemment décrits. Une analyse approfondie, basée sur les travaux de Houyvet et collaborateurs (Houyvet *et al.*, 2018) utilisant divers outils bio-informatiques a permis d'identifier trois PAM : GK28, AV19 et NF19 dont les transcrits sont présents au niveau des hct. Ces trois PAM s'ajoutent donc au GR21 et au KT19, identifiés à partir d'une banque transcriptomique de seiche regroupant des données du système nerveux central, des GSP et des organes associés à la reproduction (Houyvet *et al.*, 2018). Les PAM chez *Sepia officinalis* comme chez les autres Céphalopodes semblent appartenir à de nouvelles familles et des analyses complémentaires sont nécessaires afin de mieux les connaitre et de comprendre leur implication dans la réponse immunitaire. Les PAM issus du clivage de protéines comme les histones devront également être étudiés (Park *et al.*, 1996, 1998, Kim *et al.*, 1996, Birkemo *et al.*, 2003). En effet, chez la seiche plusieurs histones ont été identifiés que ce soit dans les extraits peptidiques de peau de Houyvet (2018), les protéomes des GSP (Cornet *et al.*, 2014), des GNA (Cornet, 2015) ou les extraits peptidiques du mucus réalisés durant ces travaux de thèse. Les histones pourraient donc être une source potentielle de PAM chez la seiche.

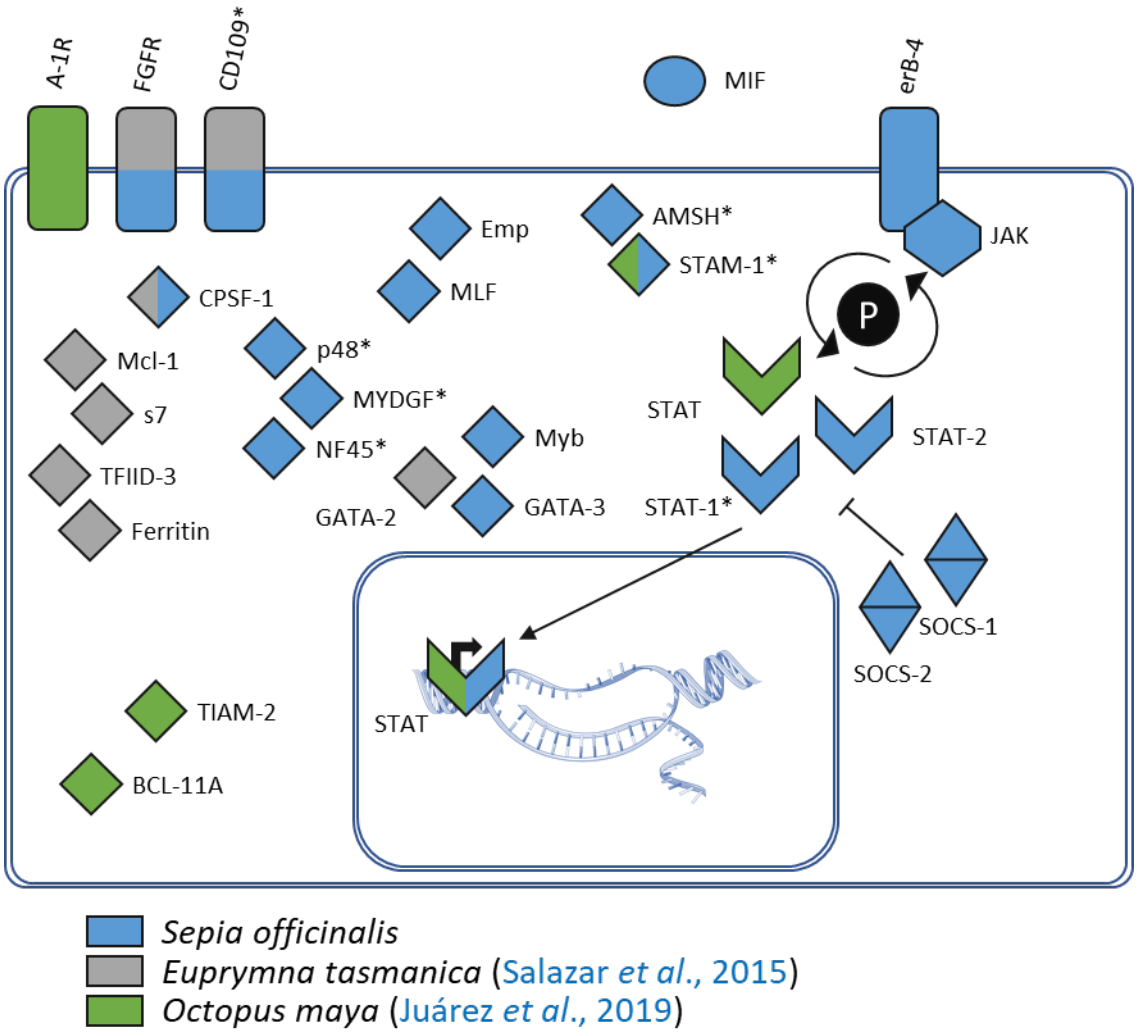


Figure 41. Représentation schématique des facteurs en lien avec l'hématopoïèse identifiés chez les Céphalopodes (erB-4 : *receptor tyrosine-protein kinase* erB-4 ; JAK : Janus *kinase* ; STAT : *signal transducer and activator of transcription* ; SOCS : *suppressor of cytokine signalling* ; STAM-1 : *signal transducing adaptater molecule* 1 ; AMSH : STAM-*binding protein* ; FGFR : *fibroblast growth factor receptor* ; CPSF-1 : *cleavage and polyadenylation specificity factor subunit* 1 ; Mcl-1 : *induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1-like* ; GATA-2 : *transcription factor* GATA-2 ; GATA-3 : *GATA-binding factor* 3 ; Myb : *transcriptional activator* Myb ; s7 : *ribosomal protein* s7 ; CD109 *: thioester- containing protein*/CD109 ; TFIID : *transcription initiation factor* TFIID *subunit* 3 ; MYDGF : *myeloid-derived growth factor* ; NF45 : *interleukin enhancer-binding factor* 2 ; p48 : *cytokine receptor-like factor* 3 ; MIF : *macrophage migration inhibitory factor* ; MLF : *myeloid leukemia factor* ; Emp : E3 *ubiquitin-protein transferase* MAEA ; BCL-11A : *B-cell lymphoma/leukemia* 11A ; A-1R : *angiopoietin*-1 *receptor* ; TIAM-2 : *T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein* 2 ; * : facteurs identifiés dans le protéome du corps blanc chez *Sepia officinalis*).

Les PAM identifiés chez la seiche peuvent représenter de bons candidats pour la valorisation et le transfert vers l'aquaculture. En effet certaines espèces bactériennes entrainent le développement de pathologies chez de nombreuses espèces d'intérêt en aquaculture (Pujalte *et al.*, 2003, Prado *et al.*, 2015, Rojas *et al.*, 2015). Face à ces bactéries pathogènes, l'usage d'antibiotiques en réponse à une infection mais aussi en prophylaxie s'est démocratisé (Cabello, 2006). Cet usage excessif cause de nombreux problèmes pour la santé humaine et pour l'environnement et de plus en plus de bactéries pathogènes deviennent résistantes aux antibiotiques (Cabello, 2006, Watts *et al.*, 2017). Bien que la résistance aux PAM ait été observée après une exposition continue et longue (Perron *et al.*, 2006), leur usage présente plusieurs intérêts majeurs. En effet, les PAM sont peu stables dans le milieu, contrairement aux antibiotiques classiques qui sont très stables, ils combinent plusieurs modes d'action et n'augmentent pas les mutations bactériennes (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016, Chaturvedi *et al.*, 2020). L'usage des PAM en aquaculture semble donc être un bon compromis mais nécessite la réalisation de nombreux travaux afin d'évaluer leur toxicité sur l'espèce aquacole et les organismes associés (microflore, aliments), comme cela a été réalisé pour le peptide *de novo* K4 (Houyvet *et al.*, 2019). Les PAM identifiés chez la seiche présentent des spectres d'activités différents. En effet le GR21 ou le KT19 identifiés par Houyvet et collaborateurs (2018) possèdent un spectre large contre des pathogènes humains comme *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes* mais aussi contre des pathogènes marins comme *Vibrio alginolyticus* ou *Aeromonas salmonicida*. Les PAM issus des hémocytes possèdent eux un spectre moins large mais ciblant les espèces du genre *Vibrio* dont certains sont impliqués dans des pathologies chez des espèces aquacoles. Le GK28, actif contre *Vibrio splendidus*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio aestuerianus*, espèces impliqués dans des mortalités chez l'huitre *Crassostrea gigas* (Garnier *et al.*, 2007), pourrait donc se révéler un bon candidat en écloserie d'huitres.

L'approche multi-omique menée pour ces travaux de thèse a permis de décrire de nombreux acteurs du système immunitaire et ainsi d'en apprendre plus sur les mécanismes immunitaires chez la seiche. L'établissement du transcriptome *de novo* est intéressant car il permet de n'avoir aucun a priori et de pouvoir réaliser une analyse des gènes effectivement transcrits au sein d'un tissu ou de cellules. Couplée à des analyses en spectrométrie de masse (protéomique et peptidomique), la transcriptomique permet de valider la présence de

certains facteurs au sein des tissus ou cellules étudiés mais aussi de confirmer leur traduction et modifications post-traductionnelles. La quantité de données générée par les approches omiques nécessite un long temps d'analyse qui peut être réduit *via* l'utilisation d'outils permettant des analyses globales comme celle des KEGG ou des GO termes. Néanmoins il est important de noter que chez la seiche, comme chez d'autres animaux distants dont les transcriptomes et génomes ont un niveau d'annotation relativement bas, ces analyses globales se basent sur une partie réduite des données. Bien que difficile, la recherche de molécules d'intérêt, ici des PAM, à partir du transcriptome a porté ses fruits. Elle semble donc être une bonne alternative aux analyses classiques basées sur la séparation et la recherche d'activité nécessitant une quantité de matériel biologique importante, contraire aux nouvelles directives visant la réduction du nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale.

Ces travaux de thèse révèlent donc la difficulté d'étudier les transcriptomes d'animaux atypiques. De nombreux facteurs restent non-annotés et il est intéressant de noter que certains sont présents dans les transcrits les plus exprimés, comme cela a pu être observé au niveau du corps blanc, des hémocytes et de la peau. Tous ces transcrits pourraient coder de nouvelles protéines liées à l'immunité chez la seiche comme les SepECP décrites au niveau des œufs (Cornet *et al.*, 2015b). Un transcrit non annoté est commun aux transcrits les plus exprimés au niveau du corps blanc, des hémocytes et de la peau. Considérant l'implication de ces différents tissus dans la réponse immunitaire, il est possible que la protéine codée par ce transcrit soit une nouvelle protéine impliquée dans l'immunité chez la seiche.

2. Perspectives

Les analyses -omiques ont parfois le désavantage d'être éloignées de l'aspect fonctionnel. Il serait donc intéressant de confirmer par des études fonctionnelles l'implication des différents facteurs identifiés dans la réponse immunitaire chez la seiche, et ce dans plusieurs situations. En effet, la seiche possède des capacités de cicatrisation particulièrement efficaces jusqu'en fin de vie. Néanmoins dans certains cas les plaies peuvent s'infecter comme cela a été décrit chez la seiche (Sangster et Smolowitz, 2003, Harms *et al.*, 2006). Le suivi des profils d'expression des facteurs immunitaires au sein des différents tissus, sains, lésées en cours de cicatrisation permettraient donc d'en savoir plus sur le lien existant entre les différents acteurs et leur complémentarité. Une étape importante chez la seiche après la reproduction est la

dégénérescence, au cours de laquelle l'apparition notamment de lésions cutanées est suivie par la fin de vie. Le suivi de l'expression des facteurs immunitaires permettrait de comprendre comment le système immunitaire de la seiche évolue lors de la fin de vie.

L'impact du microbiome cutané sur l'immunité de la seiche n'a pas pu être décrit lors de ces travaux de thèse. Néanmoins, il serait intéressant de suivre l'évolution des populations bactériennes dans les situations précédemment citées. Lors d'une infection ou en fin de vie, l'étude des profils d'expression des facteurs immunitaires, couplée à une analyse permettant d'étudier la diversité bactérienne et son évolution permettrait de mieux comprendre la communication entre la peau et son microbiome. Ces analyses permettraient d'en savoir plus sur l'importance de la relation peau – microbiome dans l'immunité chez la seiche.

Bibliographie

Références bibliographiques

Abbassi, F., **Oury, B.**, **Blasco, T.**, **Sereno, D.**, **Bolbach, G.**, **Nicolas, P.**, **Hani, K.**, **Amiche, M.**, **Ladram, A.**, 2008, « Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African ranid *Pelophylax saharica* », *Peptides*, *29*, 9, p. 1526-1533, doi: 10.1016/j.peptides.2008.05.008.

de Abreu Manso, P.P., **de Brito-Gitirana, L.**, **Pelajo-Machado, M.**, 2009, « Localization of hematopoietic cells in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) », *Cell and Tissue Research*, *337*, 2, p. 301-312, doi: 10.1007/s00441-009-0803-0.

Accogli, G., **Scillitani, G.**, **Mentino, D.**, **Desantis, S.**, 2017, « Characterization of the skin mucus in the common octopus *Octopus vulgaris* (Cuvier) reared paralarvae », *European Journal of Histochemistry*, *61*, day 0, p. 2815, doi: 10.4081/hls.2014.1978.

Accorsi, A., **Bucci, L.**, **de Eguileor, M.**, **Ottaviani, E.**, **Malagoli, D.**, 2013, « Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* », *Fish & Shellfish Immunology*, *34*, 5, p. 1260-1268, doi: 10.1016/j.fsi.2013.02.008.

Adamo, S.A., **Hanlon, R.T.**, 1996, « Do cuttlefish (Cephalopoda) signal their intentions to conspecifics during agonistic encounters? », *Animal Behaviour*, *52*, 1, p. 73-81, doi: 10.1006/anbe.1996.0153.

Adamo, S.A., **Brown, W.M.**, **King, A.J.**, **Mather, D.L.**, **Mather, J.A.**, **Shoemaker, K.L.**, **Wood, J.B.**, 2000, « Agonistic and reproductive behaviours of the cuttlefish *Sepia officianlis* in a semi-natural environment », *Journal of Molluscan Studies*, *66*, 3, p. 417-418, doi: 10.1093/mollus/66.3.417.

Adhya, M., **Jeung, H. Do**, **Kang, H.S.**, **Choi, K.S.**, **Lee, D.S.**, **Cho, M.**, 2012, « Cloning and localization of MCdef, a defensin from Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) », *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *161*, 1, p. 25-31, doi: 10.1016/j.cbpb.2011.09.003.

Agaisse, H., **Petersen, U.-M.**, **Boutros, M.**, **Mathey-Prevot, B.**, **Perrimon, N.**, 2003, « Signaling Role of Hemocytes in Drosophila JAK/STAT-Dependent Response to Septic Injury », *Developmental Cell*, *5*, 3, p. 441-450, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00244-2.

Al-Khalaifah, H., **Al-Nasser, A.**, 2019, « Immune Response of Molluscs », dans *Molluscs*, IntechOpen, p. 116-124, IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.81778.

Aladaileh, S., **Nair, S. V.**, **Birch, D.**, **Raftos, D.A.**, 2007, « Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function », *Journal of Invertebrate Pathology*, *96*, 1, p. 48-63, doi: 10.1016/j.jip.2007.02.011.

Alemany, J., **Rivot, E.**, **Foucher, E.**, **Vigneau, J.**, **Robin, J.-P.**, 2017, « A Bayesian two-stage biomass model for stock assessment of data-limited species: An application to cuttlefish (*Sepia officinalis*) in the English

Channel », *Fisheries Research*, *191*, p. 131-143, doi: 10.1016/j.fishres.2017.03.010.

Alexandrowicz, J.S., 1965, « The neurosecretory system of the vena cava in Cephalopoda II. *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris* », *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *45*, 1, p. 209-228, doi: 10.1017/S0025315400004082.

Allen, J.J., **Bell, G.R.R.**, **Kuzirian, A.M.**, **Velankar, S.S.**, **Hanlon, R.T.**, 2014, « Comparative morphology of changeable skin papillae in octopus and cuttlefish », *Journal of Morphology*, *275*, 4, p. 371-390, doi: 10.1002/jmor.20221.

Anderson, E.T., **Davis, A.S.**, **Law, J.M.**, **Lewbart, G.A.**, **Christian, L.S.**, **Harms, C.A.**, 2010, « Gross and histologic evaluation of 5 suture materials in the skin and subcutaneous tissue of the California sea hare (*Aplysia californica*). », *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, *49*, 1, p. 64-8, Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20122319.

Andouche, A., **Bassaglia, Y.**, **Baratte, S.**, **Bonnaud, L.**, 2013, « Reflectin genes and development of iridophore patterns in *Sepia officinalis* embryos (Mollusca, Cephalopoda) », *Developmental Dynamics*, *242*, 5, p. 560-571, doi: 10.1002/dvdy.23938.

Ángeles Esteban, M., 2012, « An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin », *ISRN Immunology*, *2012*, p. 1-29, doi: 10.5402/2012/853470.

Ángeles Esteban, M., **Cerezuela, R.**, 2015, « Fish mucosal immunity: skin », dans *Mucosal Health in Aquaculture*, Elsevier, p. 67-92, Elsevier, doi: 10.1016/B978-0-12-417186-2.00004-2.

Apitanyasai, K., **Amparyup, P.**, **Charoensapsri, W.**, **Senapin, S.**, **Tassanakajon, A.**, 2015, « Role of *Penaeus monodon* hemocyte homeostasis associated protein (PmHHAP) in regulation of caspase-mediated apoptosis », *Developmental & Comparative Immunology*, *53*, 1, p. 234-243, doi: 10.1016/j.dci.2015.06.004.

Apprill, A., **Robbins, J.**, **Eren, A.M.**, **Pack, A.A.**, **Reveillaud, J.**, **Mattila, D.**, **Moore, M.**, **Niemeyer, M.**, **Moore, K.M.T.**, **Mincer, T.J.**, 2014, « Humpback Whale Populations Share a Core Skin Bacterial Community: Towards a Health Index for Marine Mammals? », *PLoS ONE*, *9*, 3, p. e90785, doi: 10.1371/journal.pone.0090785.

Arias, C.R., **Koenders, K.**, **Larsen, A.M.**, 2013, « Predominant bacteria associated with red snapper from the northern Gulf of Mexico », *Journal of Aquatic Animal Health*, *25*, 4, p. 281-289, doi: 10.1080/08997659.2013.847872.

Arzul, I., **Corbeil, S.**, **Morga, B.**, **Renault, T.**, 2017, « Viruses infecting marine molluscs », *Journal of Invertebrate Pathology*, *147*, p. 118-135, doi: 10.1016/j.jip.2017.01.009.

Austin, B., 2011, « Taxonomy of bacterial fish pathogens », *Veterinary Research*, *42*, 1, p. 20, doi: 10.1186/1297-9716-42-20.

Bachère, E., **Rosa, R.D.**, **Schmitt, P.**, **Poirier, A.C.**, **Merou, N.**, **Charri Ere, G.M.**, **Destoumieux-Garz, D.**, 2015,

« The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view », *Fish and Shellfish Immunology*, *46*, p. 50-64, doi: 10.1016/j.fsi.2015.02.040.

Baeza Garcia, A., **Pierce, R.J.**, **Gourbal, B.**, **Werkmeister, E.**, **Colinet, D.**, **Reichhart, J.-M.**, **Dissous, C.**, **Coustau, C.**, 2010, « Involvement of the Cytokine MIF in the Snail Host Immune Response to the Parasite *Schistosoma mansoni* », *PLoS Pathogens*, *6*, 9, p. e1001115, doi: 10.1371/journal.ppat.1001115.

Baguña, J., 2012, « The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes », *The International Journal of Developmental Biology*, *56*, 1-2-3, p. 19-37, doi: 10.1387/ijdb.113463jb.

Banchereau, J., **Steinman, R.M.**, 1998, « Dendritic cells and the control of immunity », *Nature*, *392*, 6673, p. 245-252, doi: 10.1038/32588.

Banerjee, U., **Girard, J.R.**, **Goins, L.M.**, **Spratford, C.M.**, 2019, « Drosophila as a genetic model for hematopoiesis », *Genetics*, *211*, 2, p. 367-417, doi: 10.1534/genetics.118.300223.

Bao, K., **Yuan, W.**, **Ma, C.**, **Yu, X.**, **Wang, L.**, **Hong, M.**, **Xi, X.**, **Zhou, M.**, **Chen, T.**, 2018, « Modification Targeting the "Rana Box" Motif of a Novel Nigrocin Peptide From *Hylarana latouchii* Enhances and Broadens Its Potency Against Multiple Bacteria », *Frontiers in Microbiology*, *9*, NOV, p. 1-11, doi: 10.3389/fmicb.2018.02846.

Barbosa, L., **Caldeira, R.L.**, **Carvalho, O.S.**, **Vidigal, T.H.D.A.**, **Jannotti-Passos, L.K.**, **Coelho, P.M.Z.**, 2006, « Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila* », *Parasite Immunology*, *28*, 5, p. 209-212, doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00827.x.

Barracco, M.A., **Steil, A.A.**, **Gargioni, R.**, 1993, « Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila* », *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *88*, 1, p. 73-83, doi: 10.1590/S0074-02761993000100012.

Bassity, E., **Clark, T.G.**, 2012, « Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *PLoS ONE*, *7*, 3, p. e33196, doi: 10.1371/journal.pone.0033196.

Bayne, C.J., **Moore, M.N.**, **Carefoot, T.H.**, **Thompson, R.J.**, 1979, « Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: The cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis », *Journal of Invertebrate Pathology*, *34*, 1, p. 1-20, doi: 10.1016/0022-2011(79)90048-X.

Benoist, L., **Corre, E.**, **Bernay, B.**, **Henry, J.**, **Zatylny-Gaudin, C.**, 2020a, « -Omic Analysis of the *Sepia officinalis* White Body: New Insights into Multifunctionality and Haematopoiesis Regulation », *Journal of Proteome Research*, p. acs.jproteome.0c00100, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00100.

Benoist, L., **Houyvet, B.**, **Henry, J.**, **Corre, E.**, **Zanuttini, B.**, **Zatylny-Gaudin, C.**, 2020b, « In-Depth In Silico Search for Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Antimicrobial Peptides Following Bacterial Challenge of Haemocytes », *Marine Drugs*, *18*, 9, p. 439, doi: 10.3390/md18090439.

Bernay, B., **Baudy-Floc'h, M.**, **Zanuttini, B.**, **Gagnon, J.**, **Henry, J.**, 2005, « Identification of SepCRP

analogues in the cuttlefish *Sepia officinalis*: A novel family of ovarian regulatory peptides », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*, 2, p. 1037-1047, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.034.

Bernay, B., **Gagnon, J.**, **Henry, J.**, 2004, « Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis* », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *314*, 1, p. 215-222, doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.085.

Binari, R., **Perrimon, N.**, 1994, « Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in Drosophila. », *Genes & Development*, *8*, 3, p. 300-312, doi: 10.1101/gad.8.3.300.

Birkemo, G.A., **Lüders, T.**, **Andersen, Ø.**, **Nes, I.F.**, **Nissen-Meyer, J.**, 2003, « Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1646*, 1-2, p. 207-215, doi: 10.1016/S1570-9639(03)00018-9.

Bode, H.R., 1996, « The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. », *Journal of cell science*, *109 (Pt 6*, 6, p. 1155-64, Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8799806.

Boismery, J., 1988, *Structure et développement de la glande de l'oviducte de la seiche,* Sepia officinalis *L.*, Thèse de doctorat.

Boletzky, S.V., 1986, « Encapsulation of cephalopod embryos: a search for functional correlations », *American Malacological Bulletin*, *4*, 2, p. 217-227.

Bonizzi, G., **Karin, M.**, 2004, « The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity », *Trends in Immunology*, *25*, 6, p. 280-288, doi: 10.1016/j.it.2004.03.008.

Boucaud-Camou, E., 1973, *Etude de l'appareil digestif de* Sepia officinalis *L. (Mollusque Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs.*, Thèse de doctorat, Université de Caen.

Boucaud-Camou, E., **Boucher-Rodoni, R.**, 1983, « Feeding and digestion in Cephalopods », dans *The Mollusca: Physiology*, Academic P., p. 149-187.

Boucaud-Camou, E., **Koueta, N.**, **Boismery, J.**, **Medhioub, A.**, 1991, « The sexual cycle of *Sepia officinalis* L. from the bay of Seine », dans *La seiche, the cuttlefish*, Centre de., Caen, p. 141-151, Caen.

Boutin, S., **Sauvage, C.**, **Bernatchez, L.**, **Audet, C.**, **Derome, N.**, 2014, « Inter Individual Variations of the Fish Skin Microbiota: Host Genetics Basis of Mutualism? », *PLoS ONE*, *9*, 7, p. e102649, doi: 10.1371/journal.pone.0102649.

Boycott, B.B., 1961, « The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis* », *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *153*, 953, p. 503-534, doi: 10.1098/rspb.1961.0015.

van de Braak, C.B.T., **Botterblom, M.H.A.**, **Liu, W.**, **Taverne, N.**, **van der Knaap, W.P.W.**, **Rombout,**

J.H.W.M., 2002, « The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) », *Fish & Shellfish Immunology*, *12*, 3, p. 253-272, doi: 10.1006/fsim.2001.0369.

Brennan, J.J., **Gilmore, T.D.**, 2018, « Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling », *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 7, p. 1576-1587, doi: 10.1093/molbev/msy050.

Brown, S., **Hu, N.**, **Hombría, J.C.-G.**, 2001, « Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the Drosophila gene domeless », *Current Biology*, *11*, 21, p. 1700-1705, doi: 10.1016/S0960-9822(01)00524-3.

Brunetti, A.E., **Hermida, G.N.**, **Iurman, M.G.**, **Faivovich, J.**, 2016, « Odorous secretions in anurans: Morphological and functional assessment of serous glands as a source of volatile compounds in the skin of the treefrog *Hypsiboas pulchellus* (Amphibia: Anura: Hylidae) », *Journal of Anatomy*, *228*, 3, p. 430-442, doi: 10.1111/joa.12413.

Bullock, A.M., **Polglase, J.L.**, **Phllips, S.E.**, 1987, « The wound healing and haemocyte response in the skin of the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca: Cephalopoda) in the presence of *Vibrio tubiashii* », *Journal of Zoology*, *211*, 2, p. 373-385, doi: 10.1111/j.1469-7998.1987.tb01540.x.

Burioli, E.A.V., **Varello, K.**, **Trancart, S.**, **Bozzetta, E.**, **Gorla, A.**, **Prearo, M.**, **Houssin, M.**, 2018, « First description of a mortality event in adult Pacific oysters in Italy associated with infection by a *Tenacibaculum soleae* strain », *Journal of Fish Diseases*, *41*, 2, p. 215-221, doi: 10.1111/jfd.12698.

Burkhard, M.J., **Leavell, S.**, **Weiss, R.B.**, **Kuehnl, K.**, **Valentine, H.**, **Thomas Watters, G.**, **Wolfe, B.A.**, 2009, « Analysis and cytologic characterization of hemocytes from freshwater mussels (*Quadrula* sp.) », *Veterinary Clinical Pathology*, *38*, 4, p. 426-436, doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00148.x.

von Byern, J., **Scott, R.**, **Griffiths, C.**, **Micossi, A.**, **Grunwald, I.**, **Cyran, N.**, 2011, « Characterization of the adhesive areas in *Sepia tuberculata* (Mollusca, Cephalopoda) », *Journal of Morphology*, *272*, 10, p. 1245-1258, doi: 10.1002/jmor.10980.

Cabello, F.C., 2006, « Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment », *Environmental Microbiology*, *8*, 7, p. 1137-1144, doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x.

Cao, S., **Geng, Y.**, **Yu, Z.**, **Deng, L.**, **Gan, W.**, **Wang, K.**, **Ou, Y.**, **Chen, D.**, **Huang, X.**, **Zuo, Z.**, **He, M.**, **Lai, W.**, 2018, « *Acinetobacter lwoffii*, an emerging pathogen for fish in Schizothorax genus in China », *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*, 6, p. 1816-1822, doi: 10.1111/tbed.12957.

Carballal, M.J., **López, C.**, **Azevedo, C.**, **Villalba, A.**, 1997a, « In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes », *Fish and Shellfish Immunology*, *7*, 6, p. 403-416, doi: 10.1006/fsim.1997.0094.

Carballal, M., **López, M.**, **Azevedo, C.**, **Villalba, A.**, 1997b, « Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis* », *Diseases of Aquatic Organisms*, *29*, 2, p. 127-135, doi: 10.3354/dao029127.

Carda-Diéguez, M., **Ghai, R.**, **Rodríguez-Valera, F.**, **Amaro, C.**, 2017, « Wild eel microbiome reveals that skin mucus of fish could be a natural niche for aquatic mucosal pathogen evolution », *Microbiome*, *5*, 1, p. 162, doi: 10.1186/s40168-017-0376-1.

Cartron, L., **Darmaillacq, A.-S.**, **Dickel, L.**, 2013, « The "prawn-in-the-tube" procedure: What do cuttlefish learn and memorize? », *Behavioural Brain Research*, *240*, p. 29-32, doi: 10.1016/j.bbr.2012.11.010.

Castell-Rodríguez, A.E., **Sampedro-Carrillo, E.A.**, **Herrera-Enriquez, M.A.**, **Rondán-Zárate, A.**, 2001, « Non-specific esterase-positive dendritic cells in epithelia of the frog *Rana pipiens* », *Histochemical Journal*, *33*, 5, p. 311-316, doi: 10.1023/A:1017985209296.

Castellanos-Martínez, S., **Prado-Alvarez, M.**, **Lobo-da-Cunha, A.**, **Azevedo, C.**, **Gestal, C.**, 2014a, « Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes », *Developmental and Comparative Immunology*, *44*, 1, p. 50-58, doi: 10.1016/j.dci.2013.11.013.

Castellanos-Martínez, S., **Arteta, D.**, **Catarino, S.**, **Gestal, C.**, 2014b, « De novo transcriptome sequencing of the *Octopus vulgaris* hemocytes using illumina RNA-Seq technology: Response to the infection by the gastrointestinal parasite Aggregata octopiana », *PLoS ONE*, *9*, 10, p. e107873, doi: 10.1371/journal.pone.0107873.

Castellanos-Martínez, S., **Gestal, C.**, **Pascual, S.**, **Mladineo, I.**, **Azevedo, C.**, 2019, « Protist (Coccidia) and Related Diseases », dans *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*, SpringerOp., p. 143-152.

Castillo, M.G., **Salazar, K.A.**, **Joffe, N.R.**, 2015, « The immune response of cephalopods from head to foot », *Fish & Shellfish Immunology*, *46*, 1, p. 145-160, doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.029.

Cavalcanti, M.G.S., **Filho, F.C.**, **Mendonça, A.M.B.**, **Duarte, G.R.**, **Barbosa, C.C.G.S.**, **De Castro, C.M.M.B.**, **Alves, L.C.**, **Brayner, F.A.**, 2012, « Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* », *Micron*, *43*, 2-3, p. 285-291, doi: 10.1016/j.micron.2011.09.002.

Cawood, A.H., **Potter, U.**, **Dickinson, H.G.**, 1978, « An evaluation of Coomassie Brilliant Blue as a stain for quantitative microdensitometry of protein in section. », *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *26*, 8, p. 645-650, doi: 10.1177/26.8.80420.

Cellura, C., **Toubiana, M.**, **Parrinello, N.**, **Roch, P.**, 2007, « Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels », *Fish and Shellfish Immunology*, *22*, 4, p. 340-350, doi: 10.1016/j.fsi.2006.06.007.

Chaga, O., **Lignell, M.**, **Söderhäll, K.**, 1995, « The haemopoietic cells of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* », *Animal Biology*, *4*, p. 59-70.

Charlet, M., **Chernysh, S.**, **Philippe, H.**, **Hetru, C.**, **Hoffmann, J.A.**, **Bulet, P.**, 1996, « Isolation of Several Cystein-rich Antimicrobial Peptides from the Blood of a Mollusc, *Mytilus edulis* », *Journal of Biological Chemistry*, *271*, 36, p. 21808-21813, doi: 10.1074/jbc.271.36.21808.

Chaturvedi, P., **Bhat, R.A.H.**, **Pande, A.**, 2020, « Antimicrobial peptides of fish: innocuous alternatives to antibiotics », *Reviews in Aquaculture*, *12*, 1, p. 85-106, doi: 10.1111/raq.12306.

Chaves da Silva, P.G., **Benton, J.L.**, **Sandeman, D.C.**, **Beltz, B.S.**, 2013, « Adult Neurogenesis in the Crayfish Brain: The Hematopoietic Anterior Proliferation Center Has Direct Access to the Brain and Stem Cell Niche », *Stem Cells and Development*, *22*, 7, p. 1027-1041, doi: 10.1089/scd.2012.0583.

Chen, H.W., **Chen, X.**, **Oh, S.W.**, **Marinissen, M.J.**, **Silvio Gutkind, J.**, **Hou, S.X.**, 2002, « Mom identifies a receptor for the Drosophila JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family », *Genes and Development*, *16*, 3, p. 388-398, doi: 10.1101/gad.955202.

Chiarello, M., **Villéger, S.**, **Bouvier, C.**, **Auguet, J.C.**, **Bouvier, T.**, 2017, « Captive bottlenose dolphins and killer whales harbor a species-specific skin microbiota that varies among individuals », *Scientific Reports*, *7*, 1, p. 1-12, doi: 10.1038/s41598-017-15220-z.

Chiarello, M., **Auguet, J.C.**, **Bettarel, Y.**, **Bouvier, C.**, **Claverie, T.**, **Graham, N.A.J.**, **Rieuvilleneuve, F.**, **Sucré, E.**, **Bouvier, T.**, **Villéger, S.**, 2018, « Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet », *Microbiome*, *6*, 1, p. 1-14, doi: 10.1186/s40168-018-0530-4.

Chiarello, M., **Villéger, S.**, **Bouvier, C.**, **Bettarel, Y.**, **Bouvier, T.**, 2015, « High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species », *FEMS microbiology ecology*, *91*, 7, p. fiv061, doi: 10.1093/femsec/fiv061.

Cho, J.H., **Park, C.B.**, **Yoon, Y.G.**, **Kim, S.C.**, 1998, « Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: Purification, cDNA cloning and molecular characterization », *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1408*, 1, p. 67-76, doi: 10.1016/S0925-4439(98)00058-1.

Cho, J.H., **Park, I.Y.**, **Kim, H.S.**, **Lee, W.T.**, **Kim, M.S.**, **Kim, S.C.**, 2002, « Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish », *The FASEB Journal*, *16*, 3, p. 429-431, doi: 10.1096/fj.01-0736fje.

Cho, S.-M., **Jeong, W.-G.**, 2011, « Prismatic shell repairs by hemoctyes in the extrapallial fluid of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* », *The Korean Journal of Malacology*, *27*, 3, p. 223-228, doi: 10.9710/kjm.2011.27.3.223.

Chong, K., **Joshi, S.**, **Jin, L.T.**, **Shu-Chien, A.C.**, 2006, « Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior », *Proteomics*, *6*, 7, p. 2251-2258, doi: 10.1002/pmic.200500591.

Christofi, T., **Apidianakis, Y.**, 2013, « Drosophila immune priming against *Pseudomonas aeruginosa* is short-lasting and depends on cellular and humoral immunity », *F1000Research*, *2*, p. 76, doi: 10.12688/f1000research.2-76.v1.

Cima, F., **Matozzo, V.**, **Marin, M.G.**, **Ballarin, L.**, 2000, « Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation », *Fish & Shellfish Immunology*, *10*, 8, p. 677-693, doi: 10.1006/fsim.2000.0282.

Claes, M.F., 1996, « Functional Morphology of the White Bodies of the Cephalopod Mollusc *Sepia officinalis* », *Acfa Zoologica (Stockholm)*, *77*, 2, p. 173-190, doi: 10.1111/j.1463-6395.1996.tb01262.x.

Colasanti, M., **Venturini, G.**, 1998, « Nitric oxide in invertebrates », *Molecular Neurobiology*, *17*, 1-3, p. 157-174, doi: 10.1007/BF02802029.

Cole, A.M., **Weis, P.**, **Diamond, G.**, 1997, « Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder », *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 18, p. 12008-12013, doi: 10.1074/jbc.272.18.12008.

Collins, A.J., **Schleicher, T.R.**, **Rader, B.A.**, **Nyholm, S. V.**, 2012, « Understanding the Role of Host Hemocytes in a Squid/Vibrio Symbiosis Using Transcriptomics and Proteomics », *Frontiers in Immunology*, *3*, MAY, p. 91, doi: 10.3389/fimmu.2012.00091.

Collins, A.J., **Fullmer, M.S.**, **Gogarten, J.P.**, **Nyholm, S. V**, 2015, « Comparative genomics of Roseobacter clade bacteria isolated from the accessory nidamental gland of *Euprymna scolopes* », *Frontiers in Microbiology*, *6*, FEB, doi: 10.3389/fmicb.2015.00123.

Conlon, J.M., **Demandt, A.**, **Nielsen, P.F.**, **Leprince, J.**, **Vaudry, H.**, **Woodhams, D.C.**, 2009, « The alyteserins: Two families of antimicrobial peptides from the skin secretions of the midwife toad *Alytes obstetricans* (Alytidae) », *Peptides*, *30*, 6, p. 1069-1073, doi: 10.1016/j.peptides.2009.03.004.

Conte, A., **Ottaviani, E.**, 1995, « Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes », *FEBS Letters*, *365*, 2-3, p. 120-124, doi: 10.1016/0014-5793(95)00439-G.

Cordero, H., **Brinchmann, M.F.**, **Cuesta, A.**, **Meseguer, J.**, **Esteban, M.A.**, 2015, « Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) », *Proteomics*, *15*, 23-24, p. 4007-4020, doi: 10.1002/pmic.201500120.

Cordero, H., **Morcillo, P.**, **Cuesta, A.**, **Brinchmann, M.F.**, **Esteban, M.A.**, 2016, « Differential proteome profile of skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*) after probiotic intake and/or overcrowding stress », *Journal of Proteomics*, *132*, p. 41-50, doi: 10.1016/j.jprot.2015.11.017.

Cornet, V., 2015, *Caractérisation des glandes impliquées dans la reproduction chez* Sepia officinalis *: Etude de la formation et de la protection des oeufs*, Thèse de doctorat, Université de Caen.

Cornet, V., **Henry, J.**, **Corre, E.**, **Le Corguille, G.**, **Zanuttini, B.**, **Zatylny-Gaudin, C.**, 2014, « Dual role of the cuttlefish salivary proteome in defense and predation », *Journal of Proteomics*, *108*, p. 209-222, doi: 10.1016/j.jprot.2014.05.019.

Cornet, V., **Henry, J.**, **Corre, E.**, **Le Corguillé, G.**, **Zatylny-Gaudin, C.**, 2015a, « The Toll/NF-κB pathway in cuttlefish symbiotic accessory nidamental gland », *Developmental & Comparative Immunology*, *53*, 1, p. 42-46, doi: 10.1016/j.dci.2015.06.016.

Cornet, V., **Henry, J.**, **Goux, D.**, **Duval, E.**, **Bernay, B.**, **Le Corguillé, G.**, **Corre, E.**, **Zatylny-Gaudin, C.**, 2015b, « How Egg Case Proteins Can Protect Cuttlefish Offspring? », *PLOS ONE*, *10*, 7, p. e0132836, doi: 10.1371/journal.pone.0132836.

Cowden, R.R., 1972, « Some cytological and cytochemical observations on the leucopoietic organs, the "white bodies," of *Octopus vulgaris* », *Journal of Invertebrate Pathology*, *19*, 1, p. 113-119, doi: 10.1016/0022-2011(72)90196-6.

Cowden, R.R., **Curtis, S.K.**, 1974, « The Octopus White Body: An Ultrastructural Survey », dans *Contemporary Topics in Immunobiology*, Boston, MA, Springer US, p. 77-90, Springer US, Boston, MA, doi: 10.1007/978-1-4684-3048-6_8.

Cowden, R.R., **Curtis, S.K.**, 1973, « Observations on living cells dissociated from the leukopoietic organ of *Octopus briareus* », *Experimental and Molecular Pathology*, *19*, 2, p. 178-185, doi: 10.1016/0014-4800(73)90077-4.

Crozatier, M., **Vincent, A.**, 2011, « Drosophila: a model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias », *Disease Models & Mechanisms*, *4*, 4, p. 439-445, doi: 10.1242/dmm.007351.

Dales, R.P., 1961, « The Coelomic and Peritoneal Cell Systems of some Sabellid Polychaetes », *Journal of Cell Science*, *s3-102*, 59, p. 327-346.

Dash, S., **Das, S.K.**, **Samal, J.**, **Thatoi, H.N.**, 2018, « Epidermal mucus, a major determinant in fish health: A review », *Iranian Journal of Veterinary Research*, *19*, 2, p. 72-81, doi: 10.22099/ijvr.2018.4849.

Davies, M.S., **Hawkins, S.J.**, 1998, « Mucus from Marine Molluscs », dans *Advances in Marine Biology*, p. 1-71, doi: 10.1016/S0065-2881(08)60210-2.

Delfino, G., **Giachi, F.**, **Malentacchi, C.**, **Nosi, D.**, 2015, « Ultrastructural Evidence of Serous Gland Polymorphism in the Skin of the Tungara Frog *Engystomops pustulosus* (Anura Leptodactylidae) », *The Anatomical Record*, *298*, 9, p. 1659-1667, doi: 10.1002/ar.23189.

Destoumieux-Garzón, D., **Rosa, R.D.**, **Schmitt, P.**, **Barreto, C.**, **Vidal-Dupiol, J.**, **Mitta, G.**, **Gueguen, Y.**, **Bachère, E.**, 2016, « Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease », *Philosophical*

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, *371*, 1695, p. 20150300, doi: 10.1098/rstb.2015.0300.

Destoumieux, D., **Bulet, P.**, **Loew, D.**, **Van Dorsselaer, A.**, **Rodriguez, J.**, **Bachère, E.**, 1997, « Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda) », *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 45, p. 28398-28406, doi: 10.1074/jbc.272.45.28398.

Devauchelle, G., **Vago, C.**, 1971, « Particles of viral asepct in stomach cells of the cuttle-fish *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda) », *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, *272*, 6, p. 894-6, Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4995234.

Dhainaut, A., **Richard, A.**, 1976, « Dhainaut A, Richard A. Vitellogenèse chez les céphalopodes décapodes: Evolution de l'ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale », *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale*, *65*, 3, p. 183-207.

Dickel, L., **Darmaillacq, A.-S.**, **Jozet-Alves, C.**, **Bellanger, C.**, 2013, « Learning, Memory, and Brain Plasticity in Cuttlefish (*Sepia officinalis*) », dans *Handbook of Behavioral Neuroscience*, p. 318-333, doi: 10.1016/B978-0-12-415823-8.00025-3.

Djurdjevič, I., **Furmanek, T.**, **Miyazawa, S.**, **Sušnik Bajec, S.**, 2019, « Comparative transcriptome analysis of trout skin pigment cells », *BMC Genomics*, *20*, 1, p. 359, doi: 10.1186/s12864-019-5714-1.

Doane, M.P., **Haggerty, J.M.**, **Kacev, D.**, **Papudeshi, B.**, **Dinsdale, E.A.**, 2017, « The skin microbiome of the common thresher shark (*Alopias vulpinus*) has low taxonomic and gene function β-diversity », *Environmental Microbiology Reports*, *9*, 4, p. 357-373, doi: 10.1111/1758-2229.12537.

Donaghy, L., **Hong, H.-K.**, **Lambert, C.**, **Park, H.-S.**, **Shim, W.J.**, **Choi, K.-S.**, 2010, « First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus* », *Fish & Shellfish Immunology*, *28*, 1, p. 87-97, doi: 10.1016/j.fsi.2009.10.006.

Donaghy, L., **Kim, B.-K.**, **Hong, H.-K.**, **Park, H.-S.**, **Choi, K.-S.**, 2009, « Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis* », *Fish & Shellfish Immunology*, *27*, 2, p. 296-301, doi: 10.1016/j.fsi.2009.05.010.

Dong, X., **Su, B.**, **Zhou, S.**, **Shang, M.**, **Yan, H.**, **Liu, F.**, **Gao, C.**, **Tan, F.**, **Li, C.**, 2016, « Identification and expression analysis of toll-like receptor genes (TLR8 and TLR9) in mucosal tissues of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge », *Fish and Shellfish Immunology*, *58*, p. 309-317, doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.021.

Drosinos, E.H., **Mataragas, M.**, **Metaxopoulos, J.**, 2006, « Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131 », *Meat Science*, *74*, 4, p. 690-696, doi: 10.1016/j.meatsci.2006.05.022.

Dubé, C.E., **Ky, C.-L.**, **Planes, S.**, 2019, « Microbiome of the Black-Lipped Pearl Oyster *Pinctada*

margaritifera, a Multi-Tissue Description With Functional Profiling », *Frontiers in Microbiology*, *10*, JULY, p. 1-17, doi: 10.3389/fmicb.2019.01548.

Dudek, M., **Adams, J.**, **Swain, M.**, **Hegarty, M.**, **Huws, S.**, **Gallagher, J.**, 2014, « Metaphylogenomic and Potential Functionality of the Limpet *Patella pellucida*'s Gastrointestinal Tract Microbiome », *International Journal of Molecular Sciences*, *15*, 10, p. 18819-18839, doi: 10.3390/ijms151018819.

Dupont, S., **Carre-Mlouka, A.**, **Domart-Coulon, I.**, **Vacelet, J.**, **Bourguet-Kondracki, M.L.**, 2014, « Exploring cultivable Bacteria from the prokaryotic community associated with the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* », *FEMS Microbiology Ecology*, *88*, 1, p. 160-174, doi: 10.1111/1574-6941.12279.

Duval, P., **Chichery, M.P.**, **Chichery, R.**, 1984, « Prey capture by the cuttlefish (*Sepia officinalis* L): An experimental study of two strategies », *Behavioural Processes*, *9*, 1, p. 13-21, doi: 10.1016/0376-6357(84)90004-4.

Dziarski, R., **Gupta, D.**, 2006, « The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). », *Genome biology*, *7*, 8, p. 232, doi: 10.1186/gb-2006-7-8-232.

Easy, R.H., **Trippel, E.A.**, **Burt, M.D.B.**, **Cone, D.K.**, 2012, « Identification of transferrin in Atlantic cod *Gadus morhua* epidermal mucus », *Journal of Fish Biology*, *81*, 6, p. 2059-2063, doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03452.x.

Eckelbarger, K.J., 1976, « Origin and development of the amoebocytes of *Nicolea zostericola* (Polychaeta: Terebellidae) with a discussion of their possible role in oogenesis », *Marine Biology*, *36*, 2, p. 169-182, doi: 10.1007/BF00388440.

Egerton, S., **Culloty, S.**, **Whooley, J.**, **Stanton, C.**, **Ross, R.P.**, 2018, « The Gut Microbiota of Marine Fish », *Frontiers in Microbiology*, *9*, MAY, p. 1-17, doi: 10.3389/fmicb.2018.00873.

El-Sayyad, H.I., **Zaki, V.H.**, **El-Shebly, A.M.**, **El-Badry, D.A.**, 2010, « Studies on the effects of bacterial diseases on skin and gill structure of *Clarias gariepinus* in Dakahlia Provinence, Egypt. », *Annals of Biological Research*, *1*, 4, p. 106-118, Disponible sur: http://scholarsresearchlibrary.com/ABR-vol1-iss4/ABR-2010-1-4-106-118.pdf.

Elston, R., 1980, « Functional morphology of the coelomocytes of the larval oysters (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*) », *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *60*, 4, p. 947-957, doi: 10.1017/S0025315400042004.

Endress, M., **Zatylny-Gaudin, C.**, **Corre, E.**, **Le Corguillé, G.**, **Benoist, L.**, **Leprince, J.**, **Lefranc, B.**, **Bernay, B.**, **Leduc, A.**, **Rangama, J.**, **Lafont, A.-G.**, **Bondon, A.**, **Henry, J.**, 2018, « Crustacean cardioactive peptides: Expression, localization, structure, and a possible involvement in regulation of egg-laying in the cuttlefish *Sepia officinalis* », *General and Comparative Endocrinology*, *260*, p. 67-79, doi: 10.1016/j.ygcen.2017.12.009.

Escoubas, J.-M., **Gourbal, B.**, **Duval, D.**, **Green, T.J.**, **Charrière, G.M.**, **Destoumieux-Garzón, D.**,

Montagnani, C., 2016, « Immunity in Molluscs », dans *Encyclopedia of Immunobiology*, Elsevier, p. 417-436, Elsevier, doi: 10.1016/B978-0-12-374279-7.12004-1.

Estrada, N., **Velázquez, E.**, **Rodríguez-Jaramillo, C.**, **Ascencio, F.**, 2013, « Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* », *Immunobiology*, *218*, 8, p. 1093-1103, doi: 10.1016/j.imbio.2013.03.004.

Evariste, L., **Auffret, M.**, **Audonnet, S.**, **Geffard, A.**, **David, E.**, **Brousseau, P.**, **Fournier, M.**, **Betoulle, S.**, 2016, « Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha* », *Fish and Shellfish Immunology*, *56*, p. 144-154, doi: 10.1016/j.fsi.2016.06.054.

Farley, C., 1978, « Viruses and viruslike lesions in marine mollusks », *Mar Fish Rev*, *40*, 10, p. 18-20.

Farto, R., **Armada, S.P.**, **Montes, M.**, **Guisande, J.A.**, **Pérez, M.J.**, **Nieto, T.P.**, 2003, « *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*) », *Journal of Invertebrate Pathology*, *83*, 2, p. 149-156, doi: 10.1016/S0022-2011(03)00067-3.

Farto, R., **Fichi, G.**, **Gestal, C.**, **Pascual, S.**, **Pérez Nieto, T.**, 2019, « Bacteria-Affecting Cephalopods », dans *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*, SpringerOp., p. 127-142.

Féral, J.P., 1988, « Wound healing after arm amputation in *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Sepioidea) », *Journal of Invertebrate Pathology*, *52*, 3, p. 380-388, doi: 10.1016/0022-2011(88)90049-3.

Fernandes, J., 2004, « Isolation and characterisation of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* », *Developmental & Comparative Immunology*, *28*, 2, p. 127-138, doi: 10.1016/S0145-305X(03)00120-4.

Fernandes, J.M.O., **Kemp, G.D.**, **Molle, G.M.**, **Smith, V.J.**, 2002, « Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* », *Biochemical Journal*, *368*, 2, p. 611-620, doi: 10.1042/BJ20020980.

Fichi, G., **Cardeti, G.**, **Perrucci, S.**, **Vanni, A.**, **Cersini, A.**, **Lenzi, C.**, **De Wolf, T.**, **Fronte, B.**, **Guarducci, M.**, **Susini, F.**, 2015, « Skin lesion-associated pathogens from *Octopus vulgaris*: First detection of *Photobacterium swingsii*, *Lactococcus garvieae* and betanodavirus », *Diseases of Aquatic Organisms*, *115*, 2, p. 147-156, doi: 10.3354/dao02877.

Flemming, H.-C., **Wuertz, S.**, 2019, « Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms », *Nature Reviews Microbiology*, *17*, 4, p. 247-260, doi: 10.1038/s41579-019-0158-9.

Le Foll, F., **Rioult, D.**, **Boussa, S.**, **Pasquier, J.**, **Dagher, Z.**, **Leboulenger, F.**, 2010, « Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging », *Fish & Shellfish Immunology*, *28*, 2, p. 372-386, doi: 10.1016/j.fsi.2009.11.011.

Ford, S.E., **Ashton-Alcox, K.A.**, **Kanaley, S.A.**, 1994, « Comparative cytometric and microscopic analyses of

oyster hemocytes », *Journal of Invertebrate Pathology*, *64*, 2, p. 114-122, doi: 10.1006/jipa.1994.1079.

Franchini, A., **Ottaviani, E.**, 2000, « Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF-β », *Tissue and Cell*, *32*, 4, p. 312-321, doi: 10.1054/tice.2000.0118.

Fry, B.G., **Roelants, K.**, **Norman, J.A.**, 2009, « Tentacles of Venom: Toxic Protein Convergence in the Kingdom Animalia », *Journal of Molecular Evolution*, *68*, 4, p. 311-321, doi: 10.1007/s00239-009-9223-8.

Furuya, H., **Souidenne, D.**, 2019, « Dicyemids », dans *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*, SpringerOp., p. 159-168.

Gabe, M., 1968, *Techniques histologiques*, Masson., Paris, Paris.

Garnier, M., **Labreuche, Y.**, **Garcia, C.**, **Robert, M.**, **Nicolas, J.-L.**, 2007, « Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* », *Microbial Ecology*, *53*, 2, p. 187-196, doi: 10.1007/s00248-006-9061-9.

Gerdol, M., **Gomez-Chiarri, M.**, **Castillo, M.G.**, **Figueras, A.**, **Fiorito, G.**, **Moreira, R.**, **Novoa, B.**, **Pallavicini, A.**, **Ponte, G.**, **Roumbedakis, K.**, **Venier, P.**, **Vasta, G.R.**, 2018, « Immunity in Molluscs: Recognition and Effector Mechanisms, with a Focus on Bivalvia », dans *Advances in Comparative Immunology*, Cham, Springer International Publishing, p. 225-341, Springer International Publishing, Cham, doi: 10.1007/978-3-319-76768-0_11.

Gerdts, G., **Kreisel, K.**, **Boersma, M.**, **Wichels, A.**, **Brandt, P.**, **Schoo, K.L.**, 2013, « The microbiome of North Sea copepods », *Helgoland Marine Research*, *67*, 4, p. 757-773, doi: 10.1007/s10152-013-0361-4.

Gestal, C., **Castellanos-Martínez, S.**, 2015, « Understanding the cephalopod immune system based on functional and molecular evidence », *Fish & Shellfish Immunology*, *46*, 1, p. 120-130, doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.005.

Gestal, C., **Pascual, S.**, **Guerra, Á.**, **Fiorito, G.**, **Vieites, J.M.**, 2019, *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*, SpringerOp., Springer International Publishing, Springer International Publishing, doi: 10.1007/978-3-030-11330-8.

Ghiretti-Magaldi, A., **Milanesi, C.**, **Tognon, G.**, 1977, « Hemopoiesis in crustacea decapoda: origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of *Carcinus maenas* », *Cell Differentiation*, *6*, 3-4, p. 167-186, doi: 10.1016/0045-6039(77)90014-8.

Ghosh, S., **Singh, A.**, **Mandal, S.**, **Mandal, L.**, 2015, « Active Hematopoietic Hubs in Drosophila Adults Generate Hemocytes and Contribute to Immune Response », *Developmental Cell*, *33*, p. 478-488, doi: 10.1016/j.devcel.2015.03.014.

Gilbert, M.M., **Weaver, B.K.**, **Gergen, J.P.**, **Reich, N.C.**, 2005, « A novel functional activator of the Drosophila JAK/STAT pathway, unpaired2, is revealed by an in vivo reporter of pathway activation », *Mechanisms*

of Development, *122*, 7-8, p. 939-948, doi: 10.1016/j.mod.2005.03.004.

Gobet, A., **Mest, L.**, **Perennou, M.**, **Dittami, S.M.**, **Caralp, C.**, **Coulombet, C.**, **Huchette, S.**, **Roussel, S.**, **Michel, G.**, **Leblanc, C.**, 2018, « Seasonal and algal diet-driven patterns of the digestive microbiota of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a generalist marine herbivore », *Microbiome*, *6*, 1, p. 60, doi: 10.1186/s40168-018-0430-7.

Gonzalez, M., **Gueguen, Y.**, **Desserre, G.**, **de Lorgeril, J.**, **Romestand, B.**, **Bachère, E.**, 2007a, « Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas* », *Developmental & Comparative Immunology*, *31*, 4, p. 332-339, doi: 10.1016/j.dci.2006.07.006.

Gonzalez, M., **Gueguen, Y.**, **Destoumieux-Garzon, D.**, **Romestand, B.**, **Fievet, J.**, **Pugniere, M.**, **Roquet, F.**, **Escoubas, J.-M.**, **Vandenbulcke, F.**, **Levy, O.**, **Saune, L.**, **Bulet, P.**, **Bachere, E.**, 2007b, « Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 45, p. 17759-17764, doi: 10.1073/pnas.0702281104.

Goodson, M.S., **Kojadinovic, M.**, **Troll, J. V**, **Scheetz, T.E.**, **Casavant, T.L.**, **Bento Soares, M.**, **McFall-Ngai, M.J.**, 2005, « Identifying components of the NF-κB pathway in the beneficial *Euprymna scolopes*-*Vibrio fischeri* light organ symbiosis », *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 11, p. 6934-6946, doi: 10.1128/AEM.71.11.6934-6946.2005.

Gras, M., **Roel, B.A.**, **Coppin, F.**, **Foucher, E.**, **Robin, J.-P.**, 2014, « A two-stage biomass model to assess the English Channel cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) stock », *ICES Journal of Marine Science*, *71*, 9, p. 2457-2468, doi: 10.1093/icesjms/fsu081.

Gras, M., **Safi, G.**, **Lebredonchel, H.**, **Quinquis, J.**, **Foucher, É.**, **Koueta, N.**, **Robin, J.-P.**, 2016, « Stock structure of the English Channel common cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) during the reproduction period », *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *96*, 1, p. 167-176, doi: 10.1017/S0025315415001162.

Gratzer, B., **Millesi, E.**, **Walzl, M.**, **Herler, J.**, 2015, « Skin toxins in coral-associated Gobiodon species (Teleostei: Gobiidae) affect predator preference and prey survival », *Marine Ecology*, *36*, 1, p. 67-76, doi: 10.1111/maec.12117.

Gregory, C.R., **Latimer, K.S.**, **Pennick, K.E.**, **Benson, K.**, **Moore, T.**, 2006, « Novel iridovirus in a nautilus (*Nautilus* spp.) », *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *18*, 2, p. 208-211, doi: 10.1177/104063870601800213.

Grigioni, S., **Boucher-Rodoni, R.**, **Demarta, A.**, **Tonolla, M.**, **Peduzzi, R.**, 2000, « Phylogenetic characterisation of bacterial symbionts in the accessory nidamental glands of the sepioid *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Decapoda) », *Marine Biology*, *136*, 2, p. 217-222, doi: 10.1007/s002270050679.

Grigorian, M., **Hartenstein, V.**, 2013, « Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods »,

Development Genes and Evolution, *223*, 1-2, p. 103-115, doi: 10.1007/s00427-012-0428-2.

Grøntvedt, R.N., **Espelid, S.**, 2003, « Immunoglobulin producing cells in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): localization in adults and during juvenile development », *Developmental & Comparative Immunology*, *27*, 6-7, p. 569-578, doi: 10.1016/S0145-305X(03)00028-4.

Gueguen, Y., **Garnier, J.**, **Robert, L.**, **Lefranc, M.**, **Mougenot, I.**, **De Lorgeril, J.**, **Janech, M.**, **Gross, P.**, **Warr, G.**, **Cuthberston, B.**, **Barracco, M.A.**, **Bulet, P.**, **Aumelas, A.**, **Yang, Y.**, **Bo, D.**, **Xiang, J.**, **Tassanakajon, A.**, **Piquemal, D.**, **Bachère, E.**, 2006a, « PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature », *Developmental & Comparative Immunology*, *30*, 3, p. 283-288, doi: 10.1016/j.dci.2005.04.003.

Gueguen, Y., **Bernard, R.**, **Julie, F.**, **Paulina, S.**, **Delphine, D.-G.**, **Franck, V.**, **Philippe, B.**, **Evelyne, B.**, 2009, « Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin », *Molecular Immunology*, *46*, 4, p. 516-522, doi: 10.1016/j.molimm.2008.07.021.

Gueguen, Y., **Herpin, A.**, **Aumelas, A.**, **Garnier, J.**, **Fievet, J.**, **Escoubas, J.-M.**, **Bulet, P.**, **Gonzalez, M.**, **Lelong, C.**, **Favrel, P.**, **Bachère, E.**, 2006b, « Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas* », *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 1, p. 313-323, doi: 10.1074/jbc.m510850200.

Guo, C., **Hu, Y.**, **Li, J.**, **Liu, Y.**, **Li, S.**, **Yan, K.**, **Wang, X.**, **Liu, J.**, **Wang, H.**, 2014, « Identification of multiple peptides with antioxidant and antimicrobial activities from skin and its secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis*, and *Amolops granulosus* », *Biochimie*, *105*, p. 192-201, doi: 10.1016/j.biochi.2014.07.013.

Guzmán, **Wong**, **Román**, **Cárdenas**, **Alvárez**, **Schmitt**, **Albericio**, **Rojas**, 2019, « Identification of Antimicrobial Peptides from the Microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher and Bactericidal Activity Improvement », *Marine Drugs*, *17*, 8, p. 453, doi: 10.3390/md17080453.

Hahn, U.K., **Bender, R.C.**, **Bayne, C.J.**, 2001, « Involvement of Nitric Oxide in Killing of *Schistosoma mansoni* Sporocysts by Hemocytes from Resistant *Biomphalaria glabrata* », *The Journal of Parasitology*, *87*, 4, p. 778, doi: 10.2307/3285134.

Hancock, R.E., 2001, « Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials », *The Lancet Infectious Diseases*, *1*, 3, p. 156-164, doi: 10.1016/S1473-3099(01)00092-5.

Hanlon, R.T., **Ament, S.A.**, **Gabr, H.**, 1999, « Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda) », *Marine Biology*, *134*, 4, p. 719-728, doi: 10.1007/s002270050588.

Hanlon, R.T., **Forsythe, J.W.**, **Cooper, K.M.**, **Dinuzzo, A.R.**, **Folse, D.S.**, **Kelly, M.T.**, 1984, « Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses », *Journal of Invertebrate Pathology*, *44*, 1, p. 67-83, doi: 10.1016/0022-2011(84)90047-8.

Harms, C.A., **Lewbart, G.A.**, **McAlarney, R.**, **Christian, L.S.**, **Geissler, K.**, **Lemons, C.**, 2006, « Surgical excision

of mycotic (*Cladosporium* sp.) granulomas from the mantle of a cuttlefish (*Sepia officinalis*) », *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *37*, 4, p. 524-530, doi: 10.1638/06-033.1.

Harrison, D.A., **McCoon, P.E.**, **Binari, R.**, **Gilman, M.**, **Perrimon, N.**, 1998, « Drosophila unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. », *Genes & development*, *12*, 20, p. 3252-63, doi: 10.1101/gad.12.20.3252.

Hartenstein, V., 2006, « The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective », *Journal of Endocrinology*, *190*, 3, p. 555-570, doi: 10.1677/joe.1.06964.

Haslam, I.S., **Roubos, E.W.**, **Mangoni, M.L.**, **Yoshizato, K.**, **Vaudry, H.**, **Kloepper, J.E.**, **Pattwell, D.M.**, **Maderson, P.F.A.**, **Paus, R.**, 2014, « From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology », *Biological Reviews*, *89*, 3, p. 618-655, doi: 10.1111/brv.12072.

Haszprunar, G., **Wanninger, A.**, 2012, « Molluscs », *Current Biology*, *22*, 13, p. R510-R514, doi: 10.1016/j.cub.2012.05.039.

He, J., **Liang, H.**, **Zhu, J.**, **Fang, X.**, 2019, « Separation, identification and gene expression analysis of PmAMP-1 from *Pinctada fucata martensii* », *Fish & Shellfish Immunology*, *92*, July, p. 728-735, doi: 10.1016/j.fsi.2019.07.002.

Heath-Heckman, **Elizabeth A C**, **Gillette, A.A.**, **Augustin, R.**, **Gillette, M.X.**, **Goldman, W.E.**, **Mcfall-Ngai, M.J.**, 2014, « Shaping the microenvironment: Evidence for the influence of a host galaxin on symbiont acquisition and maintenance in the squid-vibrio symbiosis », *Environmental Microbiology*, *16*, 12, p. 3669-3682, doi: 10.1111/1462-2920.12496.

Henry, J., **Zatylny, C.**, **Boucaud-Camou, E.**, 1999, « Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides », *Peptides*, *20*, 9, p. 1061-1070, doi: 10.1016/S0196-9781(99)00102-3.

Henry, J., **Favrel, P.**, **Boucaud-Camou, E.**, 1997, « Isolation and Identification of a Novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-Related Peptide Inhibiting the Motility of the Mature Oviduct in the Cuttlefish, *Sepia officinalis* », *Peptides*, *18*, 10, p. 1469-1474, doi: 10.1016/S0196-9781(97)00241-6.

Herbinière, J., **Braquart-Varnier, C.**, **Grève, P.**, **Strub, J.M.**, **Frère, J.**, **Van Dorsselaer, A.**, **Martin, G.**, 2005, « Armadillidin: A novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean) », *Developmental and Comparative Immunology*, *29*, 6, p. 489-499, doi: 10.1016/j.dci.2004.11.001.

Hernández-Campo, P.M., **Almeida, J.**, **Matarraz, S.**, **de Santiago, M.**, **Sánchez, M.L.**, **Orfao, A.**, 2007, « Quantitative analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins during the maturation of different hematopoietic cell compartments of normal bone marrow », *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *72B*, 1, p. 34-42, doi: 10.1002/cyto.b.20143.

Hetzel, H.R., 1965, « Studies on Holothurian Coelomocytes. II. The Origin of Coelomocytes and the Formation of Brown Bodies », *The Biological Bulletin*, *128*, 1, p. 102-111, doi: 10.2307/1539393.

Hoffmann, J.A., **Zachary, D.**, **Hoffmann, D.**, **Brehélin, M.**, **Porte, A.**, 1979, « Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects », dans *Insect Hemocytes*, Cambridge University Press, p. 29-66, Cambridge University Press, doi: 10.1017/CBO9780511759987.003.

Hoffmann, J.A., 1999, « Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity », *Science*, *284*, 5418, p. 1313-1318, doi: 10.1126/science.284.5418.1313.

Hombría, J.C.-G., **Brown, S.**, **Häder, S.**, **Zeidler, M.P.**, 2005, « Characterisation of Upd2, a Drosophila JAK/STAT pathway ligand », *Developmental Biology*, *288*, 2, p. 420-433, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.040.

Hose, J.E., **Martin, G.G.**, **Gerard, A.S.**, 1990, « A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function », *The Biological Bulletin*, *178*, 1, p. 33-45, doi: 10.2307/1541535.

Hou, X.S., **Melnick, M.B.**, **Perrimon, N.**, 1996, « Marelle acts downstream of the Drosophila HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs », *Cell*, *84*, 3, p. 411-419, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81286-6.

Houyvet, B., **Leduc, A.**, **Cornet, V.**, **Pontin, J.**, **Benoist, L.**, **Bernay, B.**, **Henry, J.**, **Vetois, E.**, **Zatylny-Gaudin, C.**, 2019, « Behavior of Antimicrobial Peptide K4 in a Marine Environment », *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*, 2, p. 676-686, doi: 10.1007/s12602-018-9454-3.

Houyvet, B., 2018, *Identification de peptides antibactériens d'origine marine : Amélioration de la qualité et de la survie du naissain d'huître*, Thèse de doctorat, Caen Normandie.

Houyvet, B., **Bouchon-Navaro, Y.**, **Bouchon, C.**, **Goux, D.**, **Bernay, B.**, **Corre, E.**, **Zatylny-Gaudin, C.,** 2017, « Identification of a moronecidin-like antimicrobial peptide in the venomous fish *Pterois volitans*: Functional and structural study of pteroicidin-α », *Fish and Shellfish Immunology*, *72*, p. 318-324, doi: 10.1016/j.fsi.2017.11.003.

Houyvet, B., **Zanuttini, B.**, **Corre, E.**, **Le Corguillé, G.**, **Henry, J.**, **Zatylny-Gaudin, C.**, 2018, « Design of antimicrobial peptides from a cuttlefish database », *Amino Acids*, *50*, 11, p. 1573-1582, doi: 10.1007/s00726-018-2633-4.

Hsiao, C.-Y., **Song, Y.-L.**, 2010, « A long form of shrimp astakine transcript: Molecular cloning, characterization and functional elucidation in promoting hematopoiesis », *Fish & Shellfish Immunology*, *28*, 1, p. 77-86, doi: 10.1016/j.fsi.2009.10.016.

Hu, Y., **Li, A.**, **Xu, Y.**, **Jiang, B.**, **Lu, G.**, **Luo, X.**, 2017, « Transcriptomic variation of locally-infected skin of *Epinephelus coioides* reveals the mucosal immune mechanism against *Cryptocaryon irritans* », *Fish & Shellfish Immunology*, *66*, p. 398-410, doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.042.

Huang, J., **Li, S.**, **Liu, Y.**, **Liu, C.**, **Xie, L.**, **Zhang, R.**, 2018, « Hemocytes in the extrapallial space of *Pinctada*

fucata are involved in immunity and biomineralizatio », *Scientific Reports*, *8*, 1, p. 1-11, doi: 10.1038/s41598-018-22961-y.

Huang, Z.-B., **Guo, F.**, **Zhao, J.**, **Li, W.-D.**, **Ke, C.-H.**, 2010, « Molecular analysis of the intestinal bacterial flora in cage-cultured adult small abalone, *Haliotis diversicolor* », *Aquaculture Research*, *41*, 11, p. e760-e769, doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02577.x.

Hubert, F., **Noël, T.**, **Roch, P.**, 1996, « A Member of the Arthropod Defensin Family from Edible Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) », *European Journal of Biochemistry*, *240*, 1, p. 302-306, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0302h.x.

Huertas, M., **Hubbard, P.C.**, **Canário, A.V.M.**, **Cerdà, J.**, 2007, « Olfactory sensitivity to conspecific bile fluid and skin mucus in the European eel *Anguilla anguilla* (L.) », *Journal of Fish Biology*, *70*, 6, p. 1907-1920, doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01467.x.

Huo, L., **Bao, M.**, **Lv, Z.**, **Chi, C.**, **Wang, T.**, **Liu, H.**, 2018, « Identification, functional characterization and expression pattern of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in *Sepiella japonica* », *Fish and Shellfish Immunology*, *79*, 1, p. 112-119, doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.065.

Iijima, R., **Kisugi, J.**, **Yamazaki, M.**, 2003, « A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia* », *Developmental and Comparative Immunology*, *27*, 4, p. 305-311, doi: 10.1016/S0145-305X(02)00105-2.

Imperadore, P., **Fiorito, G.**, 2018, « Cephalopod Tissue Regeneration: Consolidating Over a Century of Knowledge », *Frontiers in Physiology*, *9*, MAY, doi: 10.3389/fphys.2018.00593.

Imperadore, P., **Shah, S.B.**, **Makarenkova, H.P.**, **Fiorito, G.**, 2017, « Nerve degeneration and regeneration in the cephalopod mollusc *Octopus vulgaris*: the case of the pallial nerve », *Scientific Reports*, *7*, 1, p. 46564, doi: 10.1038/srep46564.

Ishimaru, K., **Akagawa-Matsushita, M.**, **Muroga, K.**, 1996, « *Vibrio ichthyoenteri* sp. nov., a Pathogen of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Larvae », *International Journal of Systematic Bacteriology*, *46*, 1, p. 155-159, doi: 10.1099/00207713-46-1-155.

Janssens, S., **Beyaert, R.**, 2002, « A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling », *Trends in Biochemical Sciences*, *27*, 9, p. 474-482, doi: 10.1016/S0968-0004(02)02145-X.

Jariyapong, P., **Pudgerd, A.**, **Cheloh, N.**, **Hirono, I.**, **Kondo, H.**, **Vanichviriyakit, R.**, **Weerachatyanukul, W.**, **Chotwiwatthanakun, C.**, 2019, « Hematopoietic tissue of *Macrobrachium rosenbergii* plays dual roles as a source of hemocyte hematopoiesis and as a defensive mechanism against *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection », *Fish & Shellfish Immunology*, *86*, September 2018, p. 756-763, doi: 10.1016/j.fsi.2018.12.021.

Jauzein, C., **Donaghy, L.**, **Volety, A.K.**, 2013, « Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray

venus clam *Macrocallista nimbosa* and influence of salinity variation », *Fish & Shellfish Immunology*, *35*, 3, p. 716-724, doi: 10.1016/j.fsi.2013.06.003.

Jayaraj, S.S., **Thiagarajan, R.**, **Vincent, S.**, 2009, « Encapsulation Response from the Hemocytes of Marine Mussel *Perna viridis* », *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, *4*, 2, p. 138-142.

Jemaà, M., **Morin, N.**, **Cavelier, P.**, **Cau, J.**, **Strub, J.M.**, **Delsert, C.**, 2014, « Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters », *Journal of Experimental Biology*, *217*, 17, p. 3067-3077, doi: 10.1242/jeb.106575.

Jenssen, H., **Hamill, P.**, **Hancock, R.E.W.**, 2006, « Peptide Antimicrobial Agents », *Clinical Microbiology Reviews*, *19*, 3, p. 491-511, doi: 10.1128/CMR.00056-05.

Jeong, K.H., **Lie, K.J.**, **Heyneman, D.**, 1983, « The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* », *Developmental & Comparative Immunology*, *7*, 2, p. 217-228, doi: 10.1016/0145-305X(83)90003-4.

Jia, Z., **Kavungal, S.**, **Jiang, S.**, **Zhao, D.**, **Sun, M.**, **Wang, L.**, **Song, L.**, 2016, « The characterization of hematopoietic tissue in adult Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* », *Developmental & Comparative Immunology*, *60*, p. 12-22, doi: 10.1016/j.dci.2016.02.002.

Jia, Z., **Wang, M.**, **Wang, X.**, **Wang, L.**, **Qiu, L.**, **Song, L.**, 2018, « Transcriptome sequencing reveals the involvement of reactive oxygen species in the hematopoiesis from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* », *Developmental and Comparative Immunology*, *82*, p. 94-103, doi: 10.1016/j.dci.2017.12.030.

Jiang, Q., **Liu, Z.**, **Zhou, Z.**, **Wang, L.**, **Wang, L.**, **Yue, F.**, **Wang, J.**, **Wang, H.**, **Song, L.**, 2016, « Transcriptional activation and translocation of ancient NOS during immune response », *The FASEB Journal*, *30*, 10, p. 3527-3540, doi: 10.1096/fj.201500193RR.

Jodrey, L.H., 1953, « Studies on Shell Formation. III. Measurement of Calcium Deposition in Shell and Calcium Turnover in Mantle Tissue using the Mantle-Shell Preparation and Ca45 », *The Biological Bulletin*, *104*, 3, p. 398-407, doi: 10.2307/1538493.

Jones, H., 1983, « The Circulatory Systems of Gastropods and Bivalves », dans *The mollusca, Volume 5 Physiology ; Part 2*, Academic P., p. 189-238.

Juárez, O.E., **López-Galindo, L.**, **Pérez-Carrasco, L.**, **Lago-Lestón, A.**, **Rosas, C.**, **Cosmo, A. Di**, **Galindo-Sánchez, C.E.**, 2019, « *Octopus maya* white body show sex-specific transcriptomic profiles during the reproductive phase, with high differentiation in signaling pathways », *PLoS ONE*, *14*, 5, p. e0216982, doi: 10.1371/journal.pone.0216982.

Junkunlo, K., **Söderhäll, K.**, **Söderhäll, I.**, **Noonin, C.**, 2016, « Reactive oxygen species affect transglutaminase activity and regulate hematopoiesis in a crustacean », *Journal of Biological Chemistry*, *291*, 34, p. 17593-17601, doi: 10.1074/jbc.M116.741348.

Jurado, J., **Fuentes-Almagro, C.A.**, **Guardiola, F.A.**, **Cuesta, A.**, **Esteban, M.Á.**, **Prieto-Álamo, M.J.**, 2015, « Proteomic profile of the skin mucus of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) », *Journal of Proteomics*, *120*, p. 21-34, doi: 10.1016/j.jprot.2015.02.019.

Karlsen, C., **Ytteborg, E.**, **Timmerhaus, G.**, **Høst, V.**, **Handeland, S.**, **Jørgensen, S.M.**, **Krasnov, A.**, 2018, « Atlantic salmon skin barrier functions gradually enhance after seawater transfer », *Scientific Reports*, *8*, 1, p. 9510, doi: 10.1038/s41598-018-27818-y.

Katz, S., **Klepal, W.**, **Bright, M.**, 2010, « The skin of Osedax (Siboglinidae, Annelida): An ultrastructural investigation of its epidermis », *Journal of Morphology*, *271*, 10, p. 1272-1280, doi: 10.1002/jmor.10873.

Kawai, T., **Akira, S.**, 2007, « Signaling to NF-κB by Toll-like receptors », *Trends in Molecular Medicine*, *13*, 11, p. 460-469, doi: 10.1016/j.molmed.2007.09.002.

Kawasaki, T., **Kawai, T.**, 2014, « Toll-Like Receptor Signaling Pathways », *Frontiers in Immunology*, *5*, SEP, p. 1-8, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.

Kientz, B., **Agogué, H.**, **Lavergne, C.**, **Marié, P.**, **Rosenfeld, E.**, 2013, « Isolation and distribution of iridescent Cellulophaga and other iridescent marine bacteria from the Charente-Maritime coast, French Atlantic », *Systematic and Applied Microbiology*, *36*, 4, p. 244-251, doi: 10.1016/j.syapm.2013.02.004.

Kim, H.S., **Park, C.B.**, **Kim, M.S.M.S.**, **Kim, S.C.**, 1996, « cDNA cloning and characterization of buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *229*, 2, p. 381-387, doi: 10.1006/bbrc.1996.1814.

King, J.D., **Rollins-Smith, L.A.**, **Nielsen, P.F.**, **John, A.**, **Conlon, J.M.**, 2005, « Characterization of a peptide from skin secretions of male specimens of the frog, *Leptodactylus fallax* that stimulates aggression in male frogs », *Peptides*, *26*, 4, p. 597-601, doi: 10.1016/j.peptides.2004.11.004.

Kinoti, G.K., 1971, « Observations on the infection of bulinid snails with *Schistosoma mattheei* », *Parasitology*, *62*, 1, p. 161-170, doi: 10.1017/S0031182000071389.

Kisugi, J., **Yamazaki, M.**, **Ishii, Y.**, **Tansho, S.**, **Muramoto, K.**, **Kamiya, H.**, 1989, « Purification of a novel cytolytic protein from albumen gland of the sea hare, *Dolabella auricularia*. », *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *37*, 10, p. 2773-2776, doi: 10.1248/cpb.37.2773.

Kondo, M., **Tomonaga, S.**, **Takahashi, Y.**, 2003, « Morphology of octopus hemocytes », *Journal of the Shimonoseki University of Fisheries (Japan)*.

Kozińska, A., **Paździor, E.**, **Pękala, A.**, **Niemczuk, W.**, 2014, « *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens », *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, *58*, 2, p. 193-199, doi: 10.2478/bvip-2014-0029.

Krzemień, J., **Dubois, L.**, **Makki, R.**, **Meister, M.**, **Vincent, A.**, **Crozatier, M.**, 2007, « Control of blood cell

homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre », *Nature*, *446*, 7133, p. 325-328, doi: 10.1038/nature05650.

Kuchel, R.P., **Raftos, D.A.**, **Birch, D.**, **Vella, N.**, 2010, « Haemocyte morphology and function in the Akoya Pearl Oyster, *Pinctada imbricata* », *Journal of Invertebrate Pathology*, *105*, 1, p. 36-48, doi: 10.1016/j.jip.2010.04.011.

Lafont, M., **Petton, B.**, **Vergnes, A.**, **Pauletto, M.**, **Segarra, A.**, **Gourbal, B.**, **Montagnani, C.**, 2017, « Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas* », *Scientific Reports*, *7*, 1, p. 1-15, doi: 10.1038/s41598-017-13564-0.

Landman, N.H., **Goolaerts, S.**, **Jagt, J.W.M.**, **Jagt-Yazykova, E.A.**, **Machalski, M.**, 2015, « Ammonites on the Brink of Extinction: Diversity, Abundance, and Ecology of the Order Ammonoidea at the Cretaceous/Paleogene (K/Pg) Boundary », dans *Ammonoid Paleobiology: From macroevolution to paleogeography*, Dordrecht, Springer Netherlands (Topics in Geobiology), p. 497-553, Springer Netherlands, Dordrecht, doi: 10.1007/978-94-017-9633-0_19.

Larsen, A., **Tao, Z.**, **Bullard, S.A.**, **Arias, C.R.**, 2013, « Diversity of the skin microbiota of fishes: Evidence for host species specificity », *FEMS Microbiology Ecology*, *85*, 3, p. 483-494, doi: 10.1111/1574-6941.12136.

Lauzon, H.L., **Gudmundsdottir, S.**, **Petursdottir, S.K.**, **Reynisson, E.**, **Steinarsson, A.**, **Oddgeirsson, M.**, **Bjornsdottir, R.**, **Gudmundsdottir, B.K.**, 2010, « Microbiota of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) rearing systems at pre- and posthatch stages and the effect of different treatments », *Journal of Applied Microbiology*, *109*, 5, p. 1775-1789, doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04806.x.

Lebestky, T., **Jung, S.H.**, **Banerjee, U.**, 2003, « A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis », *Genes and Development*, *17*, 3, p. 348-353, doi: 10.1101/gad.1052803.

Lecointre, G., **Le Guyader, H.**, 2017, *La classification phylogénétique du vivant – Tome 2 – 4e édition*, Belin.

Lee, D.G., **Park, M.W.**, **Kim, B.H.**, **Kim, H.**, **Jeon, M.A.**, **Lee, J.S.**, 2014, « Microanatomy and ultrastructure of outer mantle epidermis of the cuttlefish, *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae) », *Micron*, *58*, p. 38-46, doi: 10.1016/j.micron.2013.11.004.

Leibovitz, L., **Meyers, T.R.**, **Elston, R.**, **Chanley, P.**, 1977, « Necrotic exfoliative dermatitis of captive squid (*Loligo pealei*) », *Journal of Invertebrate Pathology*, *30*, 3, p. 369-376, doi: 10.1016/0022-2011(77)90147-1.

Leoni, G., **De Poli, A.**, **Mardirossian, M.**, **Gambato, S.**, **Florian, F.**, **Venier, P.**, **Wilson, D.**, **Tossi, A.**, **Pallavicini, A.**, **Gerdol, M.**, 2017, « Myticalins: A Novel Multigenic Family of Linear, Cationic Antimicrobial Peptides from Marine Mussels (*Mytilus* spp.) », *Marine Drugs*, *15*, 8, p. 261, doi: 10.3390/md15080261.

Li, C.-Q., **Liu, W.-C.**, **Zhu, P.**, **Yang, J.-L.**, **Cheng, K.-D.**, 2011, « Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Gelliodes carnosa* Collected from the Hainan Island Coastal Waters of the South China

Sea », *Microbial Ecology*, *62*, 4, p. 800, doi: 10.1007/s00248-011-9896-6.

Li, C., **Beck, B.**, **Su, B.**, **Terhune, J.**, **Peatman, E.**, 2013, « Early mucosal responses in blue catfish (*Ictalurus furcatus*) skin to *Aeromonas hydrophila* infection. », *Fish & shellfish immunology*, *34*, 3, p. 920-928, doi: 10.1016/j.fsi.2013.01.002.

Li, F., **Gai, X.**, **Wang, L.**, **Song, L.**, **Zhang, H.**, **Qiu, L.**, **Wang, M.**, **Siva, V.S.**, 2010, « Identification and characterization of a Cystatin gene from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* », *Fish and Shellfish Immunology*, *29*, 3, p. 521-529, doi: 10.1016/j.fsi.2010.05.015.

Li, H., **Wei, X.**, **Yang, J.**, **Zhang, R.**, **Zhang, Q.**, **Yang, J.**, 2019, « The bacteriolytic mechanism of an invertebrate-type lysozyme from mollusk *Octopus ocellatus* », *Fish & Shellfish Immunology*, *93*, April, p. 232-239, doi: 10.1016/j.fsi.2019.07.060.

Li, M., **Zhu, L.**, **Zhou, C.**, **Sun, S.**, **Fan, Y.**, **Zhuang, Z.**, 2012, « Molecular characterization and expression of a novel big defensin (Sb-BDef1) from ark shell, *Scapharca broughtonii* », *Fish & Shellfish Immunology*, *33*, 5, p. 1167-1173, doi: 10.1016/j.fsi.2012.09.008.

Li, S., **Liu, Y.**, **Liu, C.**, **Huang, J.**, **Zheng, G.**, **Xie, L.**, **Zhang, R.**, 2015, « Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming », *Fish & Shellfish Immunology*, *45*, 1, p. 194-202, doi: 10.1016/j.fsi.2015.04.006.

Li, S., **Liu, Y.**, **Liu, C.**, **Huang, J.**, **Zheng, G.**, **Xie, L.**, **Zhang, R.**, 2016, « Hemocytes participate in calcium carbonate crystal formation, transportation and shell regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata* », *Fish & Shellfish Immunology*, *51*, p. 263-270, doi: 10.1016/j.fsi.2016.02.027.

Li, Y.W., **Mo, X.B.**, **Zhou, L.**, **Li, X.**, **Dan, X.M.**, **Luo, X.C.**, **Li, A.X.**, 2014, « Identification of IRAK-4 in grouper (*Epinephelus coioides*) that impairs MyD88-dependent NF-κB activation », *Developmental and Comparative Immunology*, *45*, 1, p. 190-197, doi: 10.1016/j.dci.2014.02.019.

Li, Y., **Jia, Z.**, **Yi, Q.**, **Song, X.**, **Liu, Y.**, **Jia, Y.**, **Wang, L.**, **Song, L.**, 2018, « A novel GATA-like zinc finger transcription factor involving in hematopoiesis of *Eriocheir sinensis* », *Fish & Shellfish Immunology*, *74*, November 2017, p. 363-371, doi: 10.1016/j.fsi.2018.01.007.

Liao, Z., **Wang, X. chao**, **Liu, H. hui**, **Fan, M. hua**, **Sun, J. jing**, **Shen, W.**, 2013, « Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus* », *Fish and Shellfish Immunology*, *34*, 2, p. 610-616, doi: 10.1016/j.fsi.2012.11.030.

Lie, K.J., **Heyneman, D.**, **Yau, P.**, 1975, « The origin of amoebocytes in *Biomphalaria glabrata*. », *Journal of Parasitology*, *63*, 3, p. 574-586, doi: 10.2307/3279358.

Lin, M., **Robert Sutherland, D.**, **Horsfall, W.**, **Totty, N.**, **Yeo, E.**, **Nayar, R.**, **Wu, X.F.**, **Schuh, A.C.**, 2002, « Cell surface antigen CD 109 is a novel member of the α2macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing

proteins », *Blood*, *99*, 5, p. 1683-1691, doi: 10.1182/blood.V99.5.1683.

Lin, X., **Soderhall, K.**, **Soderhall, I.**, 2011, « Invertebrate Hematopoiesis: An Astakine-Dependent Novel Hematopoietic Factor », *The Journal of Immunology*, *186*, 4, p. 2073-2079, doi: 10.4049/jimmunol.1001229.

Liu, F., **Su, B.**, **Gao, C.**, **Zhou, S.**, **Song, L.**, **Tan, F.**, **Dong, X.**, **Ren, Y.**, **Li, C.**, 2016, « Identification and expression analysis of TLR2 in mucosal tissues of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge », *Fish and Shellfish Immunology*, *55*, p. 654-661, doi: 10.1016/j.fsi.2016.06.047.

Liu, H., **Huo, L.**, **Yu, Q.**, **Ge, D.**, **Chi, C.**, **Lv, Z.**, **Wang, T.**, 2019, « Molecular insights of a novel cephalopod toll-like receptor homologue in *Sepiella japonica*, revealing its function under the stress of aquatic pathogenic bacteria », *Fish & Shellfish Immunology*, *90*, 1, p. 297-307, doi: 10.1016/j.fsi.2019.05.004.

Liu, J., **Zhao, Y.**, 2018, « Morphological and functional characterization of clam *Ruditapes philippinarum* haemocytes », *Fish and Shellfish Immunology*, *82*, April, p. 136-146, doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.019.

Liu, X., **Xu, N.**, **Zhang, S.**, 2013, « Calreticulin is a microbial-binding molecule with phagocytosis-enhancing capacity », *Fish & Shellfish Immunology*, *35*, 3, p. 776-784, doi: 10.1016/j.fsi.2013.06.013.

Llewellyn, M.S., **Boutin, S.**, **Hoseinifar, S.H.**, **Derome, N.**, 2014, « Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries », *Frontiers in Microbiology*, *5*, p. 207, doi: 10.3389/fmicb.2014.00207.

Locatello, L., **Fiorito, G.**, **Finos, L.**, **Rasotto, M.B.**, 2013, « Behavioural and immunological responses to an immune challenge in *Octopus vulgaris* », *Physiology and Behavior*, *122*, p. 93-99, doi: 10.1016/j.physbeh.2013.08.029.

Lochhead, J.H., **Lochhead, M.S.**, 1941, « Studies on the blood and related tissues in Artemia (Crustacea Anostraca) », *Journal of Morphology*, *68*, 3, p. 593-632, doi: 10.1002/jmor.1050680309.

Loker, E.S., **Bayne, C.J.**, **Buckley, P.M.**, **Kruse, K.T.**, 1982, « Ultrastructure of Encapsulation of *Schistosoma mansoni* Mother Sporocysts by Hemocytes of Juveniles of the 10-R2 Strain of *Biomphalaria glabrata* », *The Journal of Parasitology*, *68*, 1, p. 84, doi: 10.2307/3281328.

Lokesh, J., **Kiron, V.**, 2016, « Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon », *Scientific Reports*, *6*, June 2015, p. 1-10, doi: 10.1038/srep19707.

Long, Y., **Li, Q.**, **Zhou, B.**, **Song, G.**, **Li, T.**, **Cui, Z.**, 2013, « De Novo Assembly of Mud Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) Skin Transcriptome to Identify Putative Genes Involved in Immunity and Epidermal Mucus Secretion », *PLoS ONE*, *8*, 2, doi: 10.1371/journal.pone.0056998.

López, J.R., **Piñeiro-Vidal, M.**, **García-Lamas, N.**, **de la Herran, R.**, **Navas, J.I.**, **Hachero-Cruzado, I.**, **Santos, Y.**, 2010, « First isolation of *Tenacibaculum soleae* from diseased cultured wedge sole, *Dicologoglossa cuneata* (Moreau), and brill, *Scophthalmus rhombus* (L.) », *Journal of Fish Diseases*, *33*, 3, p. 273-278, doi: 10.1111/j.1365-

2761.2009.01105.x.

Loth, K., **Vergnes, A.**, **Barreto, C.**, **Voisin, S.N.**, **Meudal, H.**, **Da Silva, J.**, **Bressan, A.**, **Belmadi, N.**, **Bachère, E.**, **Aucagne, V.**, **Cazevielle, C.**, **Marchandin, H.**, **Rosa, R.D.**, **Bulet, P.**, **Touqui, L.**, **Delmas, A.F.**, **Destoumieux-Garzón, D.**, 2019, « The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets », *mBio*, *10*, 5, p. 1-15, doi: 10.1128/mBio.01821-19.

Lowrey, L., **Woodhams, D.C.**, **Tacchi, L.**, **Salinas, I.**, 2015, « Topographical Mapping of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Microbiome Reveals a Diverse Bacterial Community with Antifungal Properties in the Skin », *Applied and Environmental Microbiology*, *81*, 19, p. 6915-6925, doi: 10.1128/AEM.01826-15.

Luna-Acosta, A., **Breitwieser, M.**, **Renault, T.**, **Thomas-Guyon, H.**, 2017, « Recent findings on phenoloxidases in bivalves », *Marine Pollution Bulletin*, *122*, 1-2, p. 5-16, doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.031.

Lutz, H.L., **Ramírez-Puebla, S.T.**, **Abbo, L.**, **Durand, A.**, **Schlundt, C.**, **Gottel, N.R.**, **Sjaarda, A.K.**, **Hanlon, R.T.**, **Gilbert, J.A.**, **Mark Welch, J.L.**, 2019, « A Simple Microbiome in the European Common Cuttlefish, *Sepia officinalis* », *mSystems*, *4*, 4, p. 1-15, doi: 10.1128/msystems.00177-19.

Lynch, S. V., **Pedersen, O.**, 2016, « The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease », *New England Journal of Medicine*, *375*, 24, p. 2369-2379, doi: 10.1056/NEJMra1600266.

Mahilini, H.M., **Rajendran, A.**, 2008, « Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Muller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays) », *Journal of Invertebrate Pathology*, *97*, 1, p. 20-26, doi: 10.1016/j.jip.2007.07.007.

Maldonado-Aguayo, W., **Teneb, J.**, **Gallardo-Escárate, C.**, 2014, « A galectin with quadruple-domain from red abalone *Haliotis rufescens* involved in the immune innate response against to *Vibrio anguillarum* », *Fish & Shellfish Immunology*, *40*, 1, p. 1-8, doi: 10.1016/j.fsi.2014.06.013.

Malham, S., **Lacoste, A.**, **Gélébart, F.**, **Cueff, A.**, **Poulet, S.**, 2002, « A first insight into stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa* », *Aquatic Living Resources*, *15*, 3, p. 187-192, doi: 10.1016/S0990-7440(02)01173-7.

Malham, S.K., **Runham, N.W.**, **Secombes, C.J.**, 1998, « Lysozyme and antiprotease activity in the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Lam.) (Cephalopoda) », *Developmental and Comparative Immunology*, *22*, 1, p. 27-37, doi: 10.1016/S0145-305X(97)00045-1.

Malham, S.K., **Runham, N.W.**, **Secombes, C.J.**, 1997, « Phagocytosis by haemocytes from the Lesser Octopus *Eledone cirrhosa* », *Iberus : revista de la Sociedad Española de Malacología.*, *15*, p. 1-11, Disponible sur: https://www.biodiversitylibrary.org/part/98405.

Mandal, L., **Martinez-Agosto, J.A.**, **Evans, C.J.**, **Hartenstein, V.**, **Banerjee, U.**, 2007, « A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains Drosophila haematopoietic precursors », *Nature*, *446*, 7133,

p. 320-324, doi: 10.1038/nature05585.

Mangold, K., 1989, « Organes génitaux », dans *Traité de zoologie, Anatomie Systémique, Biologie des Céphalopodes*, Masson., Caen, p. 459-492, Caen.

Mangold, K.N., **Bidder, A.M.**, **Portmann, A.**, 1989, « Les structures cutanées », dans *Traité de zoologie, Anatomie Systémique, Biologie des Céphalopodes*, Masson., p. 121-162.

Martin, G.G., **Hose, J.E.**, **Choi, M.**, **Provost, R.**, **Omori, G.**, **McKrell, N.**, **Lam, G.**, 1993, « Organization of hematopoietic tissue in the intermolt lobster, *Homarus americanus* », *Journal of Morphology*, *216*, 1, p. 65-78, doi: 10.1002/jmor.1052160108.

Martin, G.G., **Hose, J.E.**, **Kim, J.J.**, 1987, « Structure of hematopoietic nodules in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*: Light and electron microscopic observations », *Journal of Morphology*, *192*, 3, p. 193-204, doi: 10.1002/jmor.1051920302.

Martin, G.G., **Oakes, C.T.**, **Tousignant, H.R.**, **Crabtree, H.**, **Yamakawa, R.**, 2007, « Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica* », *Journal of Molluscan Studies*, *73*, 4, p. 355-365, doi: 10.1093/mollus/eym032.

Maselli, V., **Galdiero, E.**, **Salzano, A.M.**, **Scaloni, A.**, **Maione, A.**, **Falanga, A.**, **Naviglio, D.**, **Guida, M.**, **Di Cosmo, A.**, **Galdiero, S.**, 2020, « OctoPartenopin: Identification and Preliminary Characterization of a Novel Antimicrobial Peptide from the Suckers of *Octopus vulgaris* », *Marine Drugs*, *18*, 8, p. 380, doi: 10.3390/md18080380.

Mastrodonato, M., **Gherardi, M.**, **Todisco, G.**, **Sciscioli, M.**, **Lepore, E.**, 2006, « The epidermis of *Timarete filigera* (Polychaeta, Cirratulidae): Histochemical and ultrastructural analysis of the gland cells », *Tissue and Cell*, *38*, 5, p. 279-284, doi: 10.1016/j.tice.2006.06.003.

Mäthger, L.M., **Shashar, N.**, **Hanlon, R.T.**, 2009a, « Do cephalopods communicate using polarized light reflections from their skin? », *Journal of Experimental Biology*, *212*, 14, p. 2133-2140, doi: 10.1242/jeb.020800.

Mäthger, L.M., **Denton, E.J.**, **Marshall, N.J.**, **Hanlon, R.T.**, 2009b, « Mechanisms and behavioural functions of structural coloration in cephalopods », *Journal of The Royal Society Interface*, *6*, doi: 10.1098/rsif.2008.0366.focus.

Mathuru, A.S., **Kibat, C.**, **Cheong, W.F.**, **Shui, G.**, **Wenk, M.R.**, **Friedrich, R.W.**, **Jesuthasan, S.**, 2012, « Chondroitin Fragments Are Odorants that Trigger Fear Behavior in Fish », *Current Biology*, *22*, 6, p. 538-544, doi: 10.1016/j.cub.2012.01.061.

Matozzo, V., **Marin, M.G.**, **Cima, F.**, **Ballarin, L.**, 2008, « First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum* », *Cell Biology International*, *32*, 7, p. 865-868, doi: 10.1016/j.cellbi.2008.03.008.

McDougall, C., **Degnan, B.M.**, 2018, « The evolution of mollusc shells », *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *7*, 3, p. e313, doi: 10.1002/wdev.313.

McFall-Ngai, M., **Montgomery, M.K.**, 1990, « The Anatomy and Morphology of the Adult Bacterial Light Organ of *Euprymna scolopes* Berry (Cephalopoda:Sepiolidae) », *The Biological Bulletin*, *179*, 3, p. 332-339, doi: 10.2307/1542325.

McGaw, I.J., 2005, « The decapod crustacean circulatory system: A case that is neither open nor closed », *Microscopy and Microanalysis*, *11*, 1, p. 18-36, doi: 10.1017/S1431927605050026.

Meena, B., **Rose, S.**, **Jayaraj, S.S.**, **Vincent, S.**, 2010, « Encapsulation response from the hemocytes of estuarine clam *Meretrix casta* », *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *1*, 3.

de Melo, E.S., **Brayner, F.A.**, **Junior, N.C.P.**, **França, I.R.S.**, **Alves, L.C.**, 2020, « Investigation of defense response and immune priming in *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*, two species with different susceptibility to *Schistosoma mansoni* », *Parasitology Research*, *119*, 1, p. 189-201, doi: 10.1007/s00436-019-06495-4.

Melo, V.M.M., **Duarte, A.B.G.**, **Carvalho, A.F.F.U.**, **Siebra, E.A.**, **Vasconcelos, I.M.**, 2000, « Purification of a novel antibacterial and haemagglutinating protein from the purple gland of the sea hare, *Aplysia dactylomela* Rang, 1828 », *Toxicon*, *38*, 10, p. 1415-1427, doi: 10.1016/S0041-0101(99)00234-2.

Merrifield, D.L., **Rodiles, A.**, 2015, « The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues », dans *Mucosal Health in Aquaculture*, Elsevier, p. 273-295, Elsevier, doi: 10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8.

Messenger, J.B., 1968, « The visual attack of the cuttlefish, *Sepia officinalis* », *Animal Behaviour*, *16*, 2-3, p. 342-357, doi: 10.1016/0003-3472(68)90020-1.

Micallef, G., **Bickerdike, R.**, **Reiff, C.**, **Fernandes, J.M.O.**, **Bowman, A.S.**, **Martin, S.A.M.**, 2012, « Exploring the Transcriptome of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Skin, a Major Defense Organ », *Marine Biotechnology*, *14*, 5, p. 559-569, doi: 10.1007/s10126-012-9447-2.

Minakhina, S., **Tan, W.**, **Steward, R.**, 2011, « JAK/STAT and the GATA factor Pannier control hemocyte maturation and differentiation in Drosophila », *Developmental Biology*, *352*, 2, p. 308-316, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.01.035.

Minniti, G., **Hagen, L.H.**, **Porcellato, D.**, **Jørgensen, S.M.**, **Pope, P.B.**, **Vaaje-Kolstad, G.**, 2017, « The Skin-Mucus Microbial Community of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) », *Frontiers in Microbiology*, *8*, October, p. 1-11, doi: 10.3389/fmicb.2017.02043.

Mitta, G., **Hubert, F.**, **Noël, T.**, **Roch, P.**, 1999, « Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* », *European Journal of Biochemistry*, *265*, 1, p. 71-78, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00654.x.

Mollay, C., **Wechselberger, C.**, **Mignogna, G.**, **Negri, L.**, **Melchiorri, P.**, **Barra, D.**, **Kreil, G.**, 1999, « Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats », *European Journal of Pharmacology*, *374*, 2, p. 189-196, doi: 10.1016/S0014-2999(99)00229-0.

Montes, J.F., **Durfort, M.**, **Garcia-Valero, J.**, 1995, « Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. », *Cell & Tissue Research*, *279*, 3, p. 529-538, doi: 10.1007/BF00318165.

Morrison, S.J., **Scadden, D.T.**, 2014, « The bone marrow niche for haematopoietic stem cells », *Nature*, *505*, 7483, p. 327-334, doi: 10.1038/nature12984.

Mount, A.S., **Wheeler, A.P.**, **Paradkar, R.P.**, **Snider, D.**, 2004, « Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster », *Science*, *304*, 5668, p. 297-300, doi: 10.1126/science.1090506.

Mowry, R.W., 1956, « Alcian Blue Technics for the Histochemical Study ofAcidic Carbohydrates », *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *4*, 4, p. 407.

Müller, W.E.., **Korzhev, M.**, **Le Pennec, G.**, **Müller, I.M.**, **Schröder, H.C.**, 2003, « Origin of metazoan stem cell system in sponges: first approach to establish the model (*Suberites domuncula*) », *Biomolecular Engineering*, *20*, 4-6, p. 369-379, doi: 10.1016/S1389-0344(03)00055-8.

Mygind, P.H., **Fischer, R.L.**, **Schnorr, K.M.**, **Hansen, M.T.**, **Sönksen, C.P.**, **Ludvigsen, S.**, **Raventós, D.**, **Buskov, S.**, **Christensen, B.**, **De Maria, L.**, **Taboureau, O.**, **Yaver, D.**, **Elvig-Jørgensen, S.G.**, **Sørensen, M. V.**, **Christensen, B.E.**, **Kjærulff, S.**, **Frimodt-Moller, N.**, **Lehrer, R.I.**, **Zasloff, M.**, **Kristensen, H.-H.**, 2005, « Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus », *Nature*, *437*, 7061, p. 975-980, doi: 10.1038/nature04051.

Nakayama, K., **Nishijima, M.**, **Maruyama, T.**, 1998, « Morula-Like Cells in Photo-Symbiotic Clams Harboring Zooxanthellae », *Zoological Science*, *15*, 3, p. 339-344, doi: 10.2108/zsj.15.339.

Nakayama, K., **Nomoto, A.M.**, **Nishijima, M.**, **Maruyama, T.**, 1997, « Morphological and Functional Characterization of Hemocytes in the Giant Clam *Tridacna crocea* », *Journal of Invertebrate Pathology*, *69*, 2, p. 105-111, doi: 10.1006/jipa.1996.4626.

Nguyen, H.T., **Nguyen, T.T.**, **Pham, H.T.T.**, **Nguyen, Q.T.N.**, **Tran, M.T.**, **Nguyen, A.H.**, **Phan, T.N.**, **Bui, H.T.V.**, **Dao, H.T.T.**, **Nguyen, A.T. Van**, 2018, « Fate of carotenoid-producing *Bacillus aquimaris* SH6 colour spores in shrimp gut and their dose-dependent probiotic activities », *PLOS ONE*, *13*, 12, p. e0209341, doi: 10.1371/journal.pone.0209341.

Nicoll, P.A., 1954, « The Anatomy and Behavior of the Vascular Systems in *Nereis virens* and *Nereis limbata* », *The Biological Bulletin*, *106*, 1, p. 69-82, doi: 10.2307/1538780.

Noonin, C., 2018, « Involvement of Serotonin in crayfish hematopoiesis », *Developmental & Comparative*

Immunology, *86*, p. 189-195, doi: 10.1016/j.dci.2018.05.006.

Noonin, C., **Lin, X.**, **Jiravanichpaisal, P.**, **Söderhäll, K.**, **Söderhäll, I.**, 2012, « Invertebrate Hematopoiesis: An Anterior Proliferation Center As a Link Between the Hematopoietic Tissue and the Brain », *Stem Cells and Development*, *21*, 17, p. 3173-3186, doi: 10.1089/scd.2012.0077.

Novoa, B., **Tafalla, C.**, **Guerra, A.**, **Figueras, A.**, 2002, « Cellular immunological parameters of the octopus, *Octopus vulgaris* », *Journal of Shellfish Research*, *21*, 1, p. 243-248.

Nyholm, S. V., **McFall-Ngai, M.J.**, 1998, « Sampling the Light-Organ Microenvironment of *Euprymna scolopes*: Description of a Population of Host Cells in Association With the Bacterial Symbiont *Vibrio fischeri* », *The Biological Bulletin*, *195*, 2, p. 89-97, doi: 10.2307/1542815.

Nyholm, S. V, **Stewart, J.J.**, **Ruby, E.G.**, **McFall-Ngai, M.J.**, 2009, « Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes* », *Environmental Microbiology*, *11*, 2, p. 483-493, doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01788.x.

Olson, L., **Soto, A.M.**, **Knoop, F.C.**, **Conlon, J.M.**, 2001, « Pseudin-2: An Antimicrobial Peptide with Low Hemolytic Activity from the Skin of the Paradoxical Frog », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *288*, 4, p. 1001-1005, doi: 10.1006/bbrc.2001.5884.

Ottaviani, E., **Franchini, A.**, **Franceschi, C.**, 1993, « Presence of Several Cytokine-like Molecules in Molluscan Hemocytes », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *195*, 2, p. 984-988, doi: 10.1006/bbrc.1993.2141.

Ottaviani, E., 2006, « Molluscan immunorecognition », *Invertebrate Survival Journal*, *3*, p. 50–63, Disponible sur: http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ117.pdf (Consulté le: 9 novembre 2018).

Le Pabic, C., **Goux, D.**, **Guillamin, M.**, **Safi, G.**, **Lebel, J.-M.**, **Koueta, N.**, **Serpentini, A.**, 2014a, « Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) », *Fish & Shellfish Immunology*, *40*, 2, p. 362-373, doi: 10.1016/j.fsi.2014.07.020.

Le Pabic, C., **Safi, G.**, **Serpentini, A.**, **Lebel, J.-M.**, **Robin, J.-P.**, **Koueta, N.**, 2014b, « Prophenoloxidase system, lysozyme and protease inhibitor distribution in the common cuttlefish *Sepia officinalis* », *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *172-173*, 1, p. 96-104, doi: 10.1016/j.cbpb.2014.04.009.

Packard, A., 1988, « The Skin of Cephalopods (Coleoids): General and Special Adaptations », dans *Form and Function*, Elsevier, p. 37-67, Elsevier, doi: 10.1016/B978-0-12-751411-6.50010-2.

Paiva, A.D., **Breukink, E.**, 2013, « Antimicrobial Peptides Produced by Microorganisms », dans *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*, Basel, Springer Basel, p. 53-95, Springer Basel, Basel, doi: 10.1007/978-3-0348-0541-4_3.

Parisi, M.G., **Maisano, M.**, **Cappello, T.**, **Oliva, S.**, **Mauceri, A.**, **Toubiana, M.**, **Cammarata, M.**, 2019, « Responses of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) after infection with the pathogen *Vibrio splendidus* », *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *221*, March, p. 1-9, doi: 10.1016/j.cbpc.2019.03.005.

Park, C.B.C., **Kim, M.M.S.**, **Kim, S.C.S.**, 1996, « A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans* », *Biochemical and biophysical research*, *218*, 1, p. 408-413, doi: 10.1006/bbrc.1996.0071.

Park, I.Y., **Park, C.B.**, **Kim, M.S.**, **Kim, S.C.**, 1998, « Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus* », *FEBS letters*, *437*, 3, p. 258-262, Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9824303.

Pascual, S., **Abollo, E.**, **Mladineo, I.**, **Gestal, C.**, 2019, « Metazoa and Related Diseases », dans *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*, SpringerOp., p. 169-179.

Patel, D.M., **Brinchmann, M.F.**, 2017, « Skin mucus proteins of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*) », *Biochemistry and Biophysics Reports*, *9*, December 2016, p. 217-225, doi: 10.1016/j.bbrep.2016.12.016.

Perrigault, M., **Tanguy, A.**, **Allam, B.**, 2009, « Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX) », *BMC Genomics*, *10*, 1, p. 377, doi: 10.1186/1471-2164-10-377.

Perron, G.G., **Zasloff, M.**, **Bell, G.**, 2006, « Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide », *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*, 1583, p. 251-256, doi: 10.1098/rspb.2005.3301.

Phelan, R.W., **O'Halloran, J.A.**, **Kennedy, J.**, **Morrissey, J.P.**, **Dobson, A.D.W.**, **O'Gara, F.**, **Barbosa, T.M.**, 2012, « Diversity and bioactive potential of endospore-forming bacteria cultured from the marine sponge *Haliclona simulans* », *Journal of Applied Microbiology*, *112*, 1, p. 65-78, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05173.x.

Pila, E.A., **Sullivan, J.T.**, **Wu, X.Z.**, **Fang, J.**, **Rudko, S.P.**, **Gordy, M.A.**, **Hanington, P.C.**, 2016a, « Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. », *Developmental and Comparative Immunology*, *58*, p. 119-28, doi: 10.1016/j.dci.2015.11.010.

Pila, E.A., **Gordy, M.A.**, **Phillips, V.K.**, **Kabore, A.L.**, **Rudko, S.P.**, **Hanington, P.C.**, 2016b, « Endogenous growth factor stimulation of hemocyte proliferation induces resistance to *Schistosoma mansoni* challenge in the snail host », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*, 19, p. 5305-5310, doi: 10.1073/pnas.1521239113.

Pineiro-Vidal, M., **Carballas, C.G.**, **Gomez-Barreiro, O.**, **Riaza, A.**, **Santos, Y.**, 2008, « *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (Solea senegalensis Kaup) », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*, 4, p. 881-885, doi: 10.1099/ijs.0.65539-0.

Polglase, J.L., **Bullock, A.M.**, **Roberts, R.J.**, 1983, « Wound healing and the haemocyte response in the skin of the Lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca: Cephalopoda) », *Journal of Zoology*, *201*, 2, p. 185-204, doi: 10.1111/j.1469-7998.1983.tb04269.x.

Polglase, J.L., 2019, « Cephalopod Diseases Caused by Fungi and Labyrinthulomycetes », dans *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*, SpringerOp., p. 113-122.

Polglase, J.L., **Dix, N.J.**, **Bullock, A.M.**, 1984, « Infection of skin wounds in the lesser octopus, *Eledone cirrhosa*, by *Cladosporium sphaerospermum* », *Transactions of the British Mycological Society*, *82*, 3, p. 577-580, doi: 10.1016/s0007-1536(84)80033-9.

Portela, J., **Duval, D.**, **Rognon, A.**, **Galinier, R.**, **Boissier, J.**, **Coustau, C.**, **Mitta, G.**, **Théron, A.**, **Gourbal, B.**, 2013, « Evidence for Specific Genotype-Dependent Immune Priming in the Lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* Snail », *Journal of Innate Immunity*, *5*, 3, p. 261-276, doi: 10.1159/000345909.

Prado, S., **Dubert, J.**, **Barja, J.L.**, 2015, « Characterization of pathogenic vibrios isolated from bivalve hatcheries in Galicia, NW Atlantic coast of Spain. Description of *Vibrio tubiashii* subsp. *europaensis* subsp. nov », *Systematic and Applied Microbiology*, *38*, 1, p. 26-29, doi: 10.1016/j.syapm.2014.11.005.

Prapavorarat, A., **Vatanavicharn, T.**, **Söderhäll, K.**, **Tassanakajon, A.**, 2010, « A Novel Viral Responsive Protein Is Involved in Hemocyte Homeostasis in the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* », *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 28, p. 21467-21477, doi: 10.1074/jbc.M110.130526.

Premachandra, H.K.A., **Elvitigala, D.A.S.**, **Whang, I.**, **Kim, E.**, **De Zoysa, M.**, **Lim, B.-S.**, **Yeo, S.-Y.**, **Kim, S.**, **Park, M.-A.**, **Park, H.-C.**, **Lee, J.**, 2013, « Expression profile of cystatin B ortholog from Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in host pathology with respect to its structural and functional properties », *Fish & Shellfish Immunology*, *34*, 6, p. 1505-1513, doi: 10.1016/j.fsi.2013.03.349.

Premachandra, H.K.A., **Wan, Q.**, **Elvitigala, D.A.S.**, **De Zoysa, M.**, **Choi, C.Y.**, **Whang, I.**, **Lee, J.**, 2012a, « Genomic characterization and expression profiles upon bacterial infection of a novel cystatin B homologue from disk abalone (*Haliotis discus discus*) », *Developmental & Comparative Immunology*, *38*, 4, p. 495-504, doi: 10.1016/j.dci.2012.06.010.

Premachandra, H.K.A., **Whang, I.**, **Lee, Y.**, **Lee, S.**, **De Zoysa, M.**, **Oh, M.-J.**, **Jung, S.-J.**, **Lim, B.-S.**, **Noh, J.K.**, **Park, H.-C.**, **Lee, J.**, 2012b, « Cystatin B homolog from rock bream *Oplegnathus fasciatus*: Genomic characterization, transcriptional profiling and protease-inhibitory activity of recombinant protein », *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *163*, 1, p. 138-146, doi: 10.1016/j.cbpb.2012.05.012.

Preziosi, B.M., **Bowden, T.J.**, 2016, « Morphological characterization via light and electron microscopy of Atlantic jackknife clam (*Ensis directus*) hemocytes », *Micron*, *84*, p. 96-106, doi: 10.1016/j.micron.2016.03.003.

Pujalte, M., **Sitjà-Bobadilla, A.**, **Álvarez-Pellitero, P.**, **Garay, E.**, 2003, « Carriage of potentially fish-

pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms », *Diseases of Aquatic Organisms*, *54*, 2, p. 119-126, doi: 10.3354/dao054119.

Rachford, F.W., 1976, « Host-parasite relationship of Angiostrongylus cantonensis in *Lymnaea palustris* », *Experimental Parasitology*, *39*, 3, p. 377-381, doi: 10.1016/0014-4894(76)90041-2.

Rajan, B., **Fernandes, J.M.O.**, **Caipang, C.M.A.**, **Kiron, V.**, **Rombout, J.H.W.M.**, **Brinchmann, M.F.**, 2011, « Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules », *Fish and Shellfish Immunology*, *31*, 2, p. 224-231, doi: 10.1016/j.fsi.2011.05.006.

Rajan, B., **Kiron, V.**, **Fernandes, J.M.O.**, **Brinchmann, M.F.**, 2013, « Localization and functional properties of two galectin-1 proteins in Atlantic cod *(Gadus morhua*) mucosal tissues », *Developmental and Comparative Immunology*, *40*, 2, p. 83-93, doi: 10.1016/j.dci.2013.02.002.

Rakers, S., **Gebert, M.**, **Uppalapati, S.**, **Meyer, W.**, **Maderson, P.**, **Sell, A.F.**, **Kruse, C.**, **Paus, R.**, 2010, « "Fish matters": The relevance of fish skin biology to investigative dermatology », *Experimental Dermatology*, *19*, 4, p. 313-324, doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.01059.x.

Rakers, S., **Niklasson, L.**, **Steinhagen, D.**, **Kruse, C.**, **Schauber, J.J.**, **Sundell, K.**, **Paus, R.**, 2013, « Antimicrobial Peptides (AMPs) from Fish Epidermis: Perspectives for Investigative Dermatology », *Journal of Investigative Dermatology*, *133*, 5, p. 1140-1149, doi: 10.1038/jid.2012.503.

Ramanayake, T., **Simon, D.A.L.**, **Frelinger, J.G.**, **Lord, E.M.**, **Robert, J.**, 2007, « In Vivo Study of T-Cell Responses to Skin Alloantigens in Xenopus Using a Novel Whole-Mount Immunohistology Method », *Transplantation*, *83*, 2, p. 159-166, doi: 10.1097/01.tp.0000250562.35175.06.

Rebelo, M. de F., **Figueiredo, E. de S.**, **Mariante, R.M.**, **Nóbrega, A.**, **de Barros, C.M.**, **Allodi, S.**, 2013, « New Insights from the Oyster *Crassostrea rhizophorae* on Bivalve Circulating Hemocytes », *PLoS ONE*, *8*, 2, p. e57384, doi: 10.1371/journal.pone.0057384.

Richard, A., 1971, *Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de* Sepia officinalis *L. (Mollusque céphalopode)*, Thèse de doctorat, Université de Lille.

Ricklin, D., **Hajishengallis, G.**, **Yang, K.**, **Lambris, J.D.**, 2010, « Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis », *Nature Immunology*, *11*, 9, p. 785-797, doi: 10.1038/ni.1923.

Rince, A., **Dufour, A.**, **Le Pogam, S.**, **Thuault, D.**, **Bourgeois, C.M.**, **Le Pennec, J.P.**, 1994, « Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. », *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 5, p. 1652-1657, doi: 10.1128/AEM.60.5.1652-1657.1994.

Rivera, L., **López-Garriga, J.**, **Cadilla, C.L.**, 2008, « Characterization of the full length mRNA coding for *Lucina pectinata* HbIII revealed an alternative polyadenylation site », *Gene*, *410*, 1, p. 122-128, doi:

10.1016/j.gene.2007.12.005.

Rodrigo, A.P., **Martins, C.**, **Costa, M.H.**, **Alves de Matos, A.P.**, **Costa, P.M.**, 2018, « A morphoanatomical approach to the adaptive features of the epidermis and proboscis of a marine Polychaeta: *Eulalia viridis* (Phyllodocida: Phyllodocidae) », *Journal of Anatomy*, *233*, 5, p. 567-579, doi: 10.1111/joa.12870.

Rojas, R., **Miranda, C.D.**, **Opazo, R.**, **Romero, J.**, 2015, « Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) », *Journal of Invertebrate Pathology*, *124*, p. 61-69, doi: 10.1016/j.jip.2014.10.009.

Roura, Á., **Doyle, S.R.**, **Nande, M.**, **Strugnell, J.M.**, 2017, « You are what you eat: A genomic analysis of the gut microbiome of captive and wild *Octopus vulgaris* Paralarvae and their zooplankton prey », *Frontiers in Physiology*, *8*, MAY, p. 1-14, doi: 10.3389/fphys.2017.00362.

Ruby, E.G., **Nealson, K.H.**, 1976, « Symbiotic association of *Photobacterium fischeri* with the marine luminous fish *Monocentris japonica*; a model of symbiosis based on bacterial studies », *The Biological Bulletin*, *151*, 3, p. 574-586, doi: 10.2307/1540507.

Ruddell, C.L., 1971a, « The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* », *Journal of Invertebrate Pathology*, *18*, 2, p. 269-275, doi: 10.1016/0022-2011(71)90155-8.

Ruddell, C.L., 1971b, « The fine structure of oyster agranular amebocytes from regenerating mantle wounds in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* », *Journal of Invertebrate Pathology*, *18*, 2, p. 260-268, doi: 10.1016/0022-2011(71)90154-6.

Ruder, T., **Ali, S.A.**, **Ormerod, K.**, **Brust, A.**, **Roymanchadi, M.-L.**, **Ventura, S.**, **Undheim, E.A.B.B.**, **Jackson, T.N.W.W.**, **Mercier, A.J.**, **King, G.F.**, **Alewood, P.F.**, **Fry, B.G.**, 2013a, « Functional characterization on invertebrate and vertebrate tissues of tachykinin peptides from octopus venoms », *Peptides*, *47*, p. 71–76, doi: 10.1016/j.peptides.2013.07.002.

Ruder, T., **Sunagar, K.**, **Undheim, E.A.B.**, **Ali, S.A.**, **Wai, T.-C.**, **Low, D.H.W.**, **Jackson, T.N.W.**, **King, G.F.**, **Antunes, A.**, **Fry, B.G.**, **Syed, A.A.**, **Wai, T.-C.**, **Low, D.H.W.**, **Jackson, T.N.W.**, **King, G.F.**, **Antunes, A.**, **Fry, B.G.**, 2013b, « Molecular Phylogeny and Evolution of the Proteins Encoded by Coleoid (Cuttlefish, Octopus, and Squid) Posterior Venom Glands », *Journal of Molecular Evolution*, *76*, 4, p. 192-204, doi: 10.1007/s00239-013-9552-5.

Rungger, D., **Rastelli, M.**, **Braendle, E.**, **Malsberger, R.G.**, 1971, « A viruslike particle associated with lesions in the muscles of *Octopus vulgaris* », *Journal of Invertebrate Pathology*, *17*, 1, p. 72-80, doi: 10.1016/0022-2011(71)90128-5.

Saadatfar, Z., **Shahsavani, D.**, **Fatemi, F.S.**, 2010, « Study of Epidermis Development in Sturgeon (*Acipenser persicus*) Larvae », *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *39*, 5, p. no-no, doi: 10.1111/j.1439-0264.2010.01014.x.

Salazar, K.A., **Joffe, N.R.**, **Dinguirard, N.**, **Houde, P.**, **Castillo, M.G.**, 2015, « Transcriptome Analysis of the White Body of the Squid *Euprymna tasmanica* with Emphasis on Immune and Hematopoietic Gene Discovery », *PLOS ONE*, *10*, 3, p. e0119949, doi: 10.1371/journal.pone.0119949.

Salimi, L., **Jamili, S.**, **Motalebi, A.**, **Eghtesadi-Araghi, P.**, **Rabbani, M.**, **Rostami-Beshman, M.**, 2009, « Morphological characterization and size of hemocytes in *Anodonta cygnea* », *Journal of Invertebrate Pathology*, *101*, 2, p. 81-85, doi: 10.1016/j.jip.2009.03.003.

Sangster, C.R., **Smolowitz, R.M.**, 2003, « Description of *Vibrio alginolyticus* Infection in Cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis* », *The Biological Bulletin*, *205*, 2, p. 233-234, doi: 10.2307/1543270.

Sathyan, N., **Philip, R.**, **Chaithanya, E.R.**, **Anil Kumar, P.R.**, 2012, « Identification and Molecular Characterization of Molluskin, a Histone-H2A-Derived Antimicrobial Peptide from Molluscs », *ISRN Molecular Biology*, *2012*, p. 1-6, doi: 10.5402/2012/219656.

Schipp, R., 1987, « General morphological and functional characteristics of the cephalopod circulatory system. An introduction », *Experientia*, 1987, p. 474-477.

Schleicher, T.R., **Nyholm, S. V.**, 2011, « Characterizing the Host and Symbiont Proteomes in the Association between the Bobtail Squid, *Euprymna scolopes*, and the Bacterium, *Vibrio fischeri* », *PLoS ONE*, *6*, 10, p. e25649, doi: 10.1371/journal.pone.0025649.

Schmitt, P., **Rosa, R.D.**, **Duperthuy, M.**, **de Lorgeril, J.**, **Bachère, E.**, **Destoumieux-Garzón, D.**, 2012, « The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora », *Frontiers in Microbiology*, *3*, MAY, doi: 10.3389/fmicb.2012.00160.

Schubert, M., **Munday, P.L.**, **Caley, M.J.**, **Jones, G.P.**, **Llewellyn, L.E.**, 2003, « The toxicity of skin secretions from coral-dwelling gobies and their potential role as a predator deterrent », *Environmental Biology of Fishes*, *67*, 4, p. 359-367, doi: 10.1023/a:1025826829548.

Shannon, E., **Abu-Ghannam, N.**, 2016, « Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications », *Marine Drugs*, *14*, 4, p. 81, doi: 10.3390/md14040081.

Shen, W., **Chen, Y.**, **Yao, H.**, **Du, C.**, **Luan, N.**, **Yan, X.**, 2016, « A novel defensin-like antimicrobial peptide from the skin secretions of the tree frog, *Theloderma kwangsiensis* », *Gene*, *576*, 1, p. 136-140, doi: 10.1016/j.gene.2015.09.086.

Silphaduang, U., **Noga, E.J.**, 2001, « Peptide antibiotics in mast cells of fish », *Nature*, *414*, 6861, p. 268-269, doi: 10.1038/35104690.

Simmaco, M., **Severini, C.**, **De Biase, D.**, **Barra, D.**, **Bossa, F.**, **Roberts, J.D.**, **Melchiorri, P.**, **Erspamer, V.**, 1990, « Six novel tachykinin- and bombesin-related peptides from the skin of the Australian frog *Pseudophryne*

güntheri », *Peptides*, *11*, 2, p. 299-304, doi: 10.1016/0196-9781(90)90086-K.

Sinenko, S.A., **Mandal, L.**, **Martinez-Agosto, J.A.**, **Banerjee, U.**, 2009, « Dual Role of Wingless Signaling in Stem-like Hematopoietic Precursor Maintenance in Drosophila », *Developmental Cell*, *16*, 5, p. 756-763, doi: 10.1016/j.devcel.2009.03.003.

Sminia, T., **Pietersma, K.**, **Scheerboom, J.E.M.**, 1973, « Histological and ultrastructural observations on wound healing in the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* », *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, *141*, 4, p. 561-573, doi: 10.1007/BF00307125.

Smith, P.K., **Krohn, R.I.**, **Hermanson, G.T.**, **Mallia, A.K.**, **Gartner, F.H.**, **Provenzano, M.D.**, **Fujimoto, E.K.**, **Goeke, N.M.**, **Olson, B.J.**, **Klenk, D.C.**, 1985, « Measurement of protein using bicinchoninic acid », *Analytical Biochemistry*, *150*, 1, p. 76-85, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Smith, V.J., **Accorsi, A.**, **Malagoli, D.**, 2016, « Hematopoiesis and Hemocytes in Pancrustacean and Molluscan Models », dans *The Evolution of the Immune System*, Elsevier, p. 1-28, Elsevier, doi: 10.1016/B978-0-12-801975-7.00001-3.

Smith, V.J., 2016, « Immunology of Invertebrates: Cellular », dans *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester, UK, John Wiley & Sons, Ltd, p. 1-13, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, doi: 10.1002/9780470015902.a0002344.pub3.

Soderhall, I., **Kim, Y.-A.**, **Jiravanichpaisal, P.**, **Lee, S.-Y.**, **Soderhall, K.**, 2005, « An Ancient Role for a Prokineticin Domain in Invertebrate Hematopoiesis », *The Journal of Immunology*, *174*, 10, p. 6153-6160, doi: 10.4049/jimmunol.174.10.6153.

Söderhäll, I., 2016, « Crustacean hematopoiesis », *Developmental and Comparative Immunology*, *58*, p. 129-141, doi: 10.1016/j.dci.2015.12.009.

Söderhäll, I., **Bangyeekhun, E.**, **Mayo, S.**, **Söderhäll, K.**, 2003, « Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus* », *Developmental and Comparative Immunology*, *27*, 8, p. 661-672, doi: 10.1016/S0145-305X(03)00039-9.

Song, X., **Song, Y.**, **Dong, M.**, **Liu, Z.**, **Wang, W.**, **Wang, L.**, **Song, L.**, 2019, « A new member of the runt domain family from Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgRunx) potentially involved in immune response and larvae hematopoiesis », *Fish & Shellfish Immunology*, *89*, March, p. 228-236, doi: 10.1016/j.fsi.2019.03.066.

Song, X., **Wang, H.**, **Chen, H.**, **Sun, M.**, **Liang, Z.**, **Wang, L.**, **Song, L.**, 2016, « Conserved hemopoietic transcription factor Cg-SCL delineates hematopoiesis of Pacific oyster *Crassostrea gigas* », *Fish and Shellfish Immunology*, *51*, p. 180-188, doi: 10.1016/j.fsi.2016.02.023.

Song, X., **Xin, X.**, **Dong, M.**, **Wang, W.**, **Wang, L.**, **Song, L.**, 2018, « The ancient role for GATA2/3 transcription factor homolog in the hemocyte production of oyster », *Developmental and Comparative Immunology*, *82*,

p. 55-65, doi: 10.1016/j.dci.2018.01.001.

Souidenne, D., **Furuya, H.**, 2019, « Protist (Ciliates) and Related Diseases », dans *Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods*, SpringerOp., p. 153-158.

Sperstad, S. V., **Smith, V.J.**, **Stensvåg, K.**, 2010, « Expression of antimicrobial peptides from *Hyas araneus* haemocytes following bacterial challenge in vitro », *Developmental and Comparative Immunology*, *34*, 6, p. 618-624, doi: 10.1016/j.dci.2010.01.005.

Sruthy, K.S., **Nair, A.**, **Antony, S.P.**, **Puthumana, J.**, **Singh, I.S.B.**, **Philip, R.**, 2019, « A histone H2A derived antimicrobial peptide, Fi-Histin from the Indian White shrimp, *Fenneropenaeus indicus*: Molecular and functional characterization », *Fish & Shellfish Immunology*, *92*, January, p. 667-679, doi: 10.1016/j.fsi.2019.06.044.

Stabili, L., **Giangrande, A.**, **Pizzolante, G.**, **Caruso, G.**, **Alifano, P.**, 2014, « Characterization of Vibrios Diversity in the Mucus of the Polychaete *Myxicola infundibulum* (Annellida, Polichaeta) », *Microbial Ecology*, *67*, 1, p. 186-194, doi: 10.1007/s00248-013-0312-2.

Stotz, H.U., **Waller, F.**, **Wang, K.**, 2013, « Innate Immunity in Plants: The Role of Antimicrobial Peptides », dans *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*, Basel, Springer Basel, p. 29-51, Springer Basel, Basel, doi: 10.1007/978-3-0348-0541-4_2.

Sturrock, R.F., 2001, « Schistosomiasis Epidemiology and Control: How Did We Get Here and Where Should We Go? », *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *96*, SUPPL., p. 17-27, doi: 10.1590/s0074-02762001000900003.

Sullivan, J.T., 1988, « Hematopoiesis in Three Species of Gastropods Following Infection with *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) », *Transactions of the American Microscopical Society*, *107*, 4, p. 355, doi: 10.2307/3226330.

Sullivan, J.T., 1990, « Long-Term Survival of Heterotopic Allografts of the Amoebocyte-Producing Organ in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) », *Transactions of the American Microscopical Society*, *109*, 1, p. 52, doi: 10.2307/3226593.

Sutter, D., **Buscema, M.**, 1977, « Isolation of a highly pure archeocyte fraction from the fresh-water sponge *Ephydatia fluviatilis* », *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, *183*, 2, p. 149-153, doi: 10.1007/BF00848784.

Suzuki, H., **Iwamuro, S.**, **Ohnuma, A.**, **Coquet, L.**, **Leprince, J.**, **Jouenne, T.**, **Vaudry, H.**, **Taylor, C.K.**, **Abel, P.W.**, **Conlon, J.M.**, 2007, « Expression of genes encoding antimicrobial and bradykinin-related peptides in skin of the stream brown frog *Rana sakuraii* », *Peptides*, *28*, 3, p. 505-514, doi: 10.1016/j.peptides.2006.10.016.

Suzuki, T., **Kawamichi, H.**, **Ohtsuki, R.**, **Iwai, M.**, **Fujikura, K.**, 2000, « Isolation and cDNA-derived amino acid sequences of hemoglobin and myoglobin from the deep-sea clam *Calyptogena kaikoi* », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1478*, 1, p. 152-158, doi: 10.1016/S0167-

4838(99)00210-1.

Sylvain, F.-É., **Derome, N.**, 2017, « Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny », *Scientific Reports*, *7*, 1, p. 5263, doi: 10.1038/s41598-017-05662-w.

Tafalla, C., **Gómez-León, J.**, **Novoa, B.**, **Figueras, A.**, 2003, « Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes », *Developmental & Comparative Immunology*, *27*, 3, p. 197-205, doi: 10.1016/S0145-305X(02)00098-8.

Tame, A., **Ozawa, G.**, **Maruyama, T.**, **Yoshida, T.**, 2018, « Morphological and functional characterization of hemocytes from two deep-sea vesicomyid clams *Phreagena okutanii* and *Abyssogena phaseoliformis* », *Fish and Shellfish Immunology*, *74*, December 2017, p. 281-294, doi: 10.1016/j.fsi.2017.12.058.

Tasumi, S., **Vasta, G.R.**, 2007, « A Galectin of Unique Domain Organization from Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Is a Receptor for the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* », *The Journal of Immunology*, *179*, 5, p. 3086-3098, doi: 10.4049/jimmunol.179.5.3086.

Tasumi, S., **Yang, W.-J.**, **Usami, T.**, **Tsutsui, S.**, **Ohira, T.**, **Kawazoe, I.**, **Wilder, M.N.**, **Aida, K.**, **Suzuki, Y.**, 2004, « Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica* », *Developmental & Comparative Immunology*, *28*, 4, p. 325-335, doi: 10.1016/j.dci.2003.08.006.

Travers, M.-A., **Boettcher Miller, K.**, **Roque, A.**, **Friedman, C.S.**, 2015, « Bacterial diseases in marine bivalves », *Journal of Invertebrate Pathology*, *131*, p. 11-31, doi: 10.1016/j.jip.2015.07.010.

Travers, M.-A., **Mirella da Silva, P.**, **Le Goïc, N.**, **Marie, D.**, **Donval, A.**, **Huchette, S.**, **Koken, M.**, **Paillard, C.**, 2008, « Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes », *Fish & Shellfish Immunology*, *24*, 4, p. 400-411, doi: 10.1016/j.fsi.2007.10.001.

Trench, R.K., **Wethey, D.S.**, **Porter, J.W.**, 1981, « Observations on the Symbiosis with Zooxanthellae among the Tridacnidae (Mollusca, Bivalvia) », *The Biological Bulletin*, *161*, 1, p. 180-198, doi: 10.2307/1541117.

Troll, J. V., **Adin, D.M.**, **Wier, A.M.**, **Paquette, N.**, **Silverman, N.**, **Goldman, W.E.**, **Stadermann, F.J.**, **Stabb, E. V.**, **Mcfall-Ngai, M.J.**, 2009, « Peptidoglycan induces loss of a nuclear peptidoglycan recognition protein during host tissue development in a beneficial animal-bacterial symbiosis », *Cellular Microbiology*, *11*, 7, p. 1114-1127, doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01315.x.

Troll, J. V, **Bent, E.H.**, **Pacquette, N.**, **Wier, A.M.**, **Goldman, W.E.**, **Silverman, N.**, **McFall-Ngai, M.J.**, 2010, « Taming the symbiont for coexistence: a host PGRP neutralizes a bacterial symbiont toxin », *Environmental Microbiology*, *12*, 8, p. 2190-2203, doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02121.x.

Troncone, L., **De Lisa, E.**, **Bertapelle, C.**, **Porcellini, A.**, **Laccetti, P.**, **Polese, G.**, **Di Cosmo, A.**, 2014, « Morphofunctional characterization and antibacterial activity of haemocytes from *Octopus vulgaris* », *Journal*

of Natural History, *49*, 21-24, p. 1457-1475, doi: 10.1080/00222933.2013.826830.

Varga, J.F.A., **Bui-Marinos, M.P.**, **Katzenback, B.A.**, 2019, « Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens », *Frontiers in Immunology*, *9*, JAN, p. 1-21, doi: 10.3389/fimmu.2018.03128.

Verdon, J., **Coutos-Thevenot, P.**, **Rodier, M.H.**, **Landon, C.**, **Depayras, S.**, **Noel, C.**, **La Camera, S.**, **Moumen, B.**, **Greve, P.**, **Bouchon, D.**, **Berjeaud, J.M.**, **Braquart-Varnier, C.**, 2016, « Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity », *Frontiers in Microbiology*, *7*, SEP, doi: 10.3389/fmicb.2016.01484.

Vezzulli, L., **Stagnaro, L.**, **Grande, C.**, **Tassistro, G.**, **Canesi, L.**, **Pruzzo, C.**, 2018, « Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy) », *Microbial Ecology*, *75*, 2, p. 495-504, doi: 10.1007/s00248-017-1051-6.

Wabnitz, P.A., **Bowie, J.H.**, **Tyler, M.J.**, **Wallace, J.C.**, **Smith, B.P.**, 1999, « Animal behaviour: Aquatic sex pheromone from a male tree frog », *Nature*, *401*, 401, p. 444-445, Disponible sur: www.nature.com.

Waghu, F.H., **Barai, R.S.**, **Gurung, P.**, **Idicula-Thomas, S.**, 2016, « CAMP R3 : a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides: Table 1. », *Nucleic Acids Research*, *44*, D1, p. D1094-D1097, doi: 10.1093/nar/gkv1051.

Wang, B., **Zhang, Z.**, **Wang, Y.**, **Zou, Z.**, **Wang, G.**, **Wang, S.**, **Jia, X.**, **Lin, P.**, 2009, « Molecular cloning and characterization of macrophage migration inhibitory factor from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* », *Fish and Shellfish Immunology*, *27*, 1, p. 57-64, doi: 10.1016/j.fsi.2009.04.004.

Wang, D., **Li, F.**, **Li, S.**, **Wen, R.**, **Xiang, J.**, 2012a, « Expression profiles of antimicrobial peptides (AMPs) and their regulation by Relish », *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, *30*, 4, p. 611-619, doi: 10.1007/s00343-012-1195-7.

Wang, G., **Li, X.**, **Wang, Z.**, 2016, « APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education », *Nucleic Acids Research*, *44*, D1, p. D1087-D1093, doi: 10.1093/nar/gkv1278.

Wang, Y., **Hu, M.**, **Chiang, M.W.L.**, **Shin, P.K.S.**, **Cheung, S.G.**, 2012b, « Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis* », *Fish and Shellfish Immunology*, *32*, 3, p. 381-390, doi: 10.1016/j.fsi.2011.08.024.

Wanninger, M., **Schwaha, T.**, **Heiss, E.**, 2018, « Form and Function of the skin glands in the Himalayan newt *Tylototriton verrucosus* », *Zoological Letters*, *4*, 1, p. 1-10, doi: 10.1186/s40851-018-0095-x.

Watanabe, L., **Gomes, F.**, **Vianez, J.**, **Nunes, M.**, **Cardoso, J.**, **Lima, C.**, **Schneider, H.**, **Sampaio, I.**, 2018, « De novo transcriptome based on next-generation sequencing reveals candidate genes with sex-specific expression in *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), an ancient Amazonian freshwater fish », *PLOS ONE*, *13*, 10, p. e0206379, doi:

10.1371/journal.pone.0206379.

Watts, J., **Schreier, H.**, **Lanska, L.**, **Hale, M.**, 2017, « The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions », *Marine Drugs*, *15*, 6, p. 158, doi: 10.3390/md15060158.

Wei, S.L., **Young, R.E.**, 1989, « Development of symbiotic bacterial bioluminescence in a nearshore cephalopod, *Euprymna scolopes* », *Marine Biology*, *103*, 4, p. 541-546, doi: 10.1007/BF00399586.

Weis, V.M., **Small, A.L.**, **McFall-Ngai, M.J.**, 1996, « A peroxidase related to the mammalian antimicrobial protein myeloperoxidase in the Euprymna-Vibrio mutualism », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*, 24, p. 13683-13688, doi: 10.1073/pnas.93.24.13683.

Wootton, E.C., **Pipe, R.K.**, 2003, « Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana* », *Fish and Shellfish Immunology*, *15*, 3, p. 249-262, doi: 10.1016/S1050-4648(02)00164-X.

Wu, M., **Guo, L.**, **Zhu, K.-C.**, **Guo, H.-Y.**, **Liu, B.-S.**, **Zhang, N.**, **Jiang, S.-G.**, **Zhang, D.-C.**, 2019, « Molecular characterization of toll-like receptor 14 from golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus, 1758) and its expression response to three types of pathogen-associated molecular patterns », *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *232*, September 2018, p. 1-10, doi: 10.1016/j.cbpb.2019.02.010.

Xu, X., **Lai, R.**, 2015, « The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions », *Chemical Reviews*, *115*, 4, p. 1760-1846, doi: 10.1021/cr4006704.

Yan, R., **Small, S.**, **Desplan, C.**, **Dearolf, C.R.**, **Darnell, J.E.**, 1996, « Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development », *Cell*, *84*, 3, p. 421-430, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81287-8.

Yang, J., **Huang, M.**, **Zhang, H.**, **Wang, L.**, **Wang, H.**, **Wang, L.**, **Qiu, L.**, **Song, L.**, 2015, « CfLec-3 from scallop: an entrance to non-self recognition mechanism of invertebrate C-type lectin », *Scientific Reports*, *5*, 1, p. 10068, doi: 10.1038/srep10068.

Yazzie, N., **Salazar, K.A.**, **Castillo, M.G.**, 2015, « Identification, molecular characterization, and gene expression analysis of a CD109 molecule in the Hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes* », *Fish and Shellfish Immunology*, *44*, 1, p. 342-355, doi: 10.1016/j.fsi.2015.02.036.

Yoon, J.-H., **Kim, I.-G.**, **Kang, K.H.**, **Oh, T.-K.**, **Park, Y.-H.**, 2003, « Bacillus marisflavi sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*, 5, p. 1297-1303, doi: 10.1099/ijs.0.02365-0.

Yoon, J.-H., **Kim, I.-G.**, **Kang, K.H.**, **Oh, T.-K.**, **Park, Y.-H.**, 2004, « *Bacillus hwajinpoensis* sp. nov. and an unnamed Bacillus genomospecies, novel members of Bacillus rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*, 3,

p. 803-808, doi: 10.1099/ijs.0.02678-0.

Yoon, J.-H., **Lee, C.-H.**, **Kang, S.-J.**, **Oh, T.-K.**, 2005, « *Psychrobacter celer* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*, 5, p. 1885-1890, doi: 10.1099/ijs.0.63682-0.

Yoshizawa, S., **Tsuruya, Y.**, **Fukui, Y.**, **Sawabe, T.**, **Yokota, A.**, **Kogure, K.**, **Higgins, M.**, **Carson, J.**, **Thompson, F.L.**, 2012, « Vibrio jasicida sp. nov., a member of the Harveyi clade, isolated from marine animals (packhorse lobster, abalone and Atlantic salmon) », *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*, Pt_8, p. 1864-1870, doi: 10.1099/ijs.0.025916-0.

You, D., **Hong, J.**, **Rong, M.**, **Yu, H.**, **Liang, S.**, **Ma, Y.**, **Yang, H.**, **Wu, J.**, **Lin, D.**, **Lai, R.**, 2009, « The First Gene-encoded Amphibian Neurotoxin », *Journal of Biological Chemistry*, *284*, 33, p. 22079-22086, doi: 10.1074/jbc.M109.013276.

Young, J.Z., 1963, « The number and sizes of nerve cells in octopus », *Proceedings of the Zoological Society of London*, *140*, 2, p. 229-254, doi: 10.1111/j.1469-7998.1963.tb01862.x.

Zal, F., **Leize, E.**, **Oros, D.R.**, **Hourdez, S.**, **Dorsselaers, A. V.**, **Childless, J.J.**, 2000, « Haemoglobin sturucture and biochemical characteristic of the sulphide-binding component from the deep-sea clam *Calyyptogena magnifica* », *Cahiers de Biologie Marine*, *41*, 4, p. 413-423.

Zapata, A., 1979, « Ultrastructural study of the teleost fish kidney », *Developmental and Comparative Immunology*, *3*, C, p. 55-65, doi: 10.1016/S0145-305X(79)80006-3.

Zatylny-Gaudin, C., **Cornet, V.**, **Leduc, A.**, **Zanuttini, B.**, **Corre, E.**, **Le Corguillé, G.**, **Bernay, B.**, **Garderes, J.**, **Kraut, A.**, **Couté, Y.**, **Henry, J.**, 2016, « Neuropeptidome of the Cephalopod *Sepia officinalis*: Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying », *Journal of Proteome Research*, *15*, 1, p. 48–67, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00463.

Zatylny-Gaudin, C., **Henry, J.**, 2017, « Egg-Laying in the Cuttlefish *Sepia officinalis* », dans *Biological Resources of Water*, IntechOpen., InTech, p. 13, InTech, doi: 10.5772/intechopen.71915.

Zatylny, C., **Durantou, F.**, **Boucaud-Camou, E.**, **Henry, J.**, 2000a, « Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying », *Molecular Reproduction and Development*, *55*, 2, p. 182-188, doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200002)55:2<182::AID-MRD7>3.0.CO;2-B.

Zatylny, C., **Gagnon, J.**, **Boucaud-Camou, E.**, **Henry, J.**, 2000b, « ILME: A Waterborne Pheromonal Peptide Released by the Eggs of *Sepia officinalis* », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *275*, 1, p. 217-222, doi: 10.1006/bbrc.2000.3286.

Zatylny, C., **Gagnon, J.**, **Boucaud-Camou, E.**, **Henry, J.**, 2000c, « The SepOvotropin: a new ovarian peptide regulating oocyte transport in *Sepia officinalis*. », *Biochemical and biophysical research communications*, *276*, 3, p. 1013-8, doi: 10.1006/bbrc.2000.3595.

Zatylny, C., **Marvin, L.**, **Gagnon, J.**, **Henry, J.**, 2002, « Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *296*, 5, p. 1186-1193, Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12207899.

Zhang, J., **Qiu, R.**, **Hu, Y. hua**, 2014a, « HdhCTL1 is a novel C-type lectin of abalone *Haliotis discus hannai* that agglutinates Gram-negative bacterial pathogens », *Fish and Shellfish Immunology*, *41*, 2, p. 466-472, doi: 10.1016/j.fsi.2014.09.032.

Zhang, T., **Qiu, L.**, **Sun, Z.**, **Wang, L.**, **Zhou, Z.**, **Liu, R.**, **Yue, F.**, **Sun, R.**, **Song, L.**, 2014b, « The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus* », *Developmental & Comparative Immunology*, *45*, 1, p. 141-150, doi: 10.1016/j.dci.2014.02.015.

Zhang, X., **Sun, Z.**, **Zhang, X.**, **Zhang, M.**, **Li, S.**, 2018, « Hemolymph Microbiomes of Three Aquatic Invertebrates as Revealed by a New Cell Extraction Method », *Applied and Environmental Microbiology*, *84*, 8, p. 1-16, doi: 10.1128/AEM.02824-17.

Zhao, J., **Song, L.**, **Li, C.**, **Ni, D.**, **Wu, L.**, **Zhu, L.**, **Wang, H.**, **Xu, W.**, 2007, « Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein », *Molecular Immunology*, *44*, 4, p. 360-368, doi: 10.1016/j.molimm.2006.02.025.

Zheng, P., **Wang, H.**, **Zhao, J.**, **Song, L.**, **Qiu, L.**, **Dong, C.**, **Wang, B.**, **Gai, Y.**, **Mu, C.**, **Li, C.**, **Ni, D.**, **Xing, K.**, 2008, « A lectin (CfLec-2) aggregating *Staphylococcus haemolyticus* from scallop *Chlamys farreri* », *Fish & Shellfish Immunology*, *24*, 3, p. 286-293, doi: 10.1016/j.fsi.2007.11.014.

Zhu, K.-C., **Wu, M.**, **Zhang, D.-C.**, **Guo, H.-Y.**, **Zhang, N.**, **Guo, L.**, **Liu, B.-S.**, **Jiang, S.-G.**, 2020, « Toll-Like Receptor 5 of Golden Pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758): Characterization, Promoter Activity and Functional Analysis », *International Journal of Molecular Sciences*, *21*, 16, p. 5916, doi: 10.3390/ijms21165916.

Zhuang, J., **Coates, C.J.**, **Zhu, H.**, **Zhu, P.**, **Wu, Z.**, **Xie, L.**, 2015, « Identification of candidate antimicrobial peptides derived from abalone hemocyanin », *Developmental and Comparative Immunology*, *49*, 1, p. 96-102, doi: 10.1016/j.dci.2014.11.008.

Zou, J., **Mercier, C.**, **Koussounadis, A.**, **Secombes, C.**, 2007, « Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish », *Molecular Immunology*, *44*, 4, p. 638-647, doi: 10.1016/j.molimm.2006.01.012.

De Zoysa, M., **Nikapitiya, C.**, **Whang, I.**, **Lee, J.-S.**, **Lee, J.**, 2009, « Abhisin: A potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*) », *Fish & Shellfish Immunology*, *27*, 5, p. 639-646, doi: 10.1016/j.fsi.2009.08.007.

Etude du système immunitaire chez la seiche *Sepia officinalis* : un potentiel pour l'aquaculture

Résumé

Les Céphalopodes comme la seiche *Sepia officinalis*, malgré une durée de vie courte, sont retrouvés dans les océans depuis des millions d'années. Chez ces animaux atypiques, peu de pathologies ont été observées révélant la présence d'un système immunitaire efficace mais peu étudié qui repose sur des processus innés. L'étude du système immunitaire de la seiche a été menée au niveau du corps blanc, organe hématopoïétique ; des cellules circulantes, les hémocytes et au niveau de la peau, première barrière avec le milieu extérieur. Au niveau du corps blanc, l'étude transcriptomique et protéomique a mis en évidence la présence de facteurs en lien avec l'hématopoïèse dont des membres de la voie de signalisation JAK-STAT. Des facteurs immunitaires ont également été identifiés révélant une possible multifonctionnalité du corps blanc. La réponse immunitaire face à *Vibrio splendidus* a pu être appréhendées à partir d'une analyse transcriptomique comparative sur les hémocytes. Toutefois cette dernière n'ayant pas permis d'identifier clairement des peptides antimicrobiens, une analyse *in silico* originale a été développée permettant de sélectionner cinq peptides candidats dont trois ont révélé une activité antibactérienne ciblée contre des bactéries du genre *Vibrio*. Enfin, une étude au niveau de la peau et de son mucus a été initiée. Cette étude par des approches -omiques a permis l'identification de facteurs en lien avec la reconnaissance des pathogènes et la réponse immunitaire. Par ailleurs, douze souches ont pu être isolées et identifiées au niveau du microbiome cutané. L'ensemble de ces résultats représente un apport majeur concernant le système immunitaire chez la seiche permettant d'initier des études fonctionnelles lors d'une infection ou en fin de vie. Ces études permettraient de comprendre le mode d'action des facteurs immunitaires identifiés, l'implication de chaque entité dans la réponse immunitaire ou dans la mise en place et la maintenance du microbiome.

Mots clés : Immunité, Hématopoïèse, Hémocytes, Corps blanc, Peau, Mucus, Microbiome, Omique

---

Study of the immune system in the cuttlefish *Sepia officinalis*: potential uses in aquaculture.

Abstract

Cephalopods such as the cuttlefish Sepia officinalis, despite their short lifespan, have been found in the oceans for millions of years. In these atypical animals, few pathologies have been observed, revealing the presence of an effective but little studied immune system based on innate processes. The study of the cuttlefish's immune system has been carried out on the white body, a haematopoietic organ; on the circulating cells, the haemocytes; and on the skin, the first barrier with the external environment. At the white body level, the transcriptomic and proteomic study highlighted the presence of factors linked to haematopoiesis, including members of the JAK-STAT signalling pathway. Immune factors have also been identified, revealing a possible multifunctionality of the white body. The immune response to *Vibrio splendidus* could be apprehended from a comparative transcriptomic analysis of haemocytes. However, as the latter did not allow the clear identification of antimicrobial peptides, an original in silico analysis was developed to select five candidate peptides, three of which revealed a targeted antibacterial activity against bacteria of the Vibrio genus. Finally, a study of the skin and its mucus was initiated. This study using -omic approaches enabled the identification of factors related to pathogen recognition and immune response. In addition, twelve strains were isolated and identified at the level of the skin microbiome. All these results represent a major contribution concerning the immune system in cuttlefish, making it possible to initiate functional studies during an infection or at the end of life. These studies would make it possible to understand the mode of action of the identified immune factors, the involvement of each entity in the immune response or in the establishment and maintenance of the microbiome.

Keywords: Immunity, Haematopoiesis, Haemocytes, White body, Skin, Mucus, Microbiome, Omic