

Sujet de stage Master 2^{ème} année (février-juillet 2017) :

Titre : Evaluation de l'activité antiparasitaire de peptides synthétiques sur des ectoparasites de poissons papillons

Maîtres de stage : Nathalie TAPISSIER et Pierre SASAL

Laboratoire : Centre de Recherche et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE de Perpignan et de Moorea)

Contexte :

Les poissons-papillons de la famille des *Chaetodontidae* sont emblématiques du récif corallien. Ils sont plus ou moins infectés par des parasites, les monogènes de la famille des *Dactylogyridae*, qui se fixent sur leurs branchies et vivent aux dépens de leur hôte. Les données épidémiologiques collectées par le CRIOBE à l'échelle du Pacifique ont pu mettre en évidence une particularité écologique dans les **relations hôte/parasite** poisson-papillon/monogène¹. En effet, parmi toutes les espèces de *Chaetodon* étudiées, seule une espèce, *Chaetodon lunulatus*, n'est jamais parasitée, alors que d'autres le sont toujours avec des charges parasitaires dépassant régulièrement plusieurs centaines de parasites.

Un des objectifs de la thèse de doctorat de Miriam Reverter (2013-16) que j'ai co-encadré avec P. Sasal, a été de comprendre la singularité de cette relation parasitaire qui ne pouvait s'expliquer par des facteurs tels que l'habitat, le régime alimentaire, ou la phylogénie². Pour cela nous avons choisi de nous intéresser **au mucus des branchies** de ces *Chaetodons* qui est décrit comme la première barrière immunitaire vis-à-vis des agents pathogènes³ et renferme de nombreux composés jouant un rôle de défense contre les agressions du milieu environnant (antibactériens, antifongiques, antiparasitaires...)⁴.

Nous avons donc émis l'hypothèse que des constituants du mucus pouvaient être impliqués dans la protection de *C. lunulatus*. Ainsi, par une approche **métabolomique non-ciblée**, nous avons mis en évidence la présence de **peptides antimicrobiens (AMP) spécifiques à l'espèce non-parasitée**. Cette famille de molécules considérées comme des effecteurs clés de l'immunité innée⁵ est reconnue pour jouer un rôle biologique fondamental, notamment dans l'élimination de micro-organismes pathogènes tels que les bactéries, les virus, les champignons, mais également les parasites. Par séquençage *de novo* en LC/MS/MS des peptides spécifiques de *C. lunulatus*, nous avons pu obtenir des hypothèses de structures qui indiquent qu'il s'agit de **peptides originaux** de 10 à 30 acides aminés provenant d'une protéine fonctionnelle susceptible d'être surexprimée en cas de stress. Une activité antiparasitaire a d'ailleurs été décrite pour des peptides dérivés de cette protéine⁶. A ce stade, l'implication de ces peptides dans la protection de *C. lunulatus* contre les parasites qui envahissent les branchies de ses congénères apparaît donc comme une hypothèse plausible qu'il nous faut vérifier. La synthèse des 2 peptides isolés du mucus de l'espèce non parasitée de poisson-papillon a été réalisée au CRIOBE en juillet dernier.

✉ Nathalie TAPISSIER-BONTEMPS, USR3278-CRIOBE

58 avenue Paul Alduy, Université de Perpignan Via Domitia, 66860 Perpignan Cedex – France

Tel : (33) 4 68 66 22 33 - mèl : nathalie.tapissier@univ-perp.fr - Site: www.criobe.pf

Objectifs du stage :

Le stage proposé se déroulera en trois étapes :

- du 22 janvier au 15 mars à Perpignan :

le stagiaire devra mettre au point la méthode de purification des peptides de synthèse par HPLC semi-préparative et vérifier les séquences d'acides aminés des peptides purs en LC/HRMS/MS. Les données spectrales seront ensuite comparées à celles des peptides isolés du mucus de *C. lunulatus*. La synthèse d'un peptide supplémentaire de 40 acides aminés, précurseur des 2 précédents et non-spécifique de *C. lunulatus*, devrait également être réalisée. Enfin, la concentration des 3 peptides dans le mucus du poisson papillon non-parasité sera évaluée en effectuant un dosage dans un extrait de mucus avec étalonnage externe par les peptides de synthèse en HLPC/UV.

- du 15 mars au 30 mai à Moorea :

le stagiaire devra réaliser des tests antiparasitaires *in vivo* sur les monogènes de poissons papillon. Pour cela, il capturera dans le lagon de Moorea des poissons papillons de différentes espèces parasitées et les acclimatera dans des aquariums. Il devra ensuite tester l'activité des peptides de synthèse à différentes concentrations dans l'eau des aquariums en prélevant les branchies des poissons et en comparant le nombre de parasites présents sur des poissons contrôles et sur les poissons mis en présence des peptides. Des expériences d'injection de solutions aqueuses de peptides dans le mucus des branchies seront également testées afin d'optimiser leur contact avec les parasites et de reproduire au mieux les conditions naturelles d'activité des constituants du mucus chez *C. lunulatus*.

- du 30 mai au 22 juillet à Perpignan :

la première partie de cette période sera consacrée au traitement statistique des données expérimentales, à la rédaction du rapport de stage et à la préparation de la soutenance orale (fin juin). Ensuite, la gamme des activités ciblées sera élargie en évaluant *in vitro* l'activité anti-parasitaire des peptides sur les schistosomes, parasites vecteurs de la bilharziose et leur activité antibactérienne sur des agents pathogènes de poissons d'élevage.

Références bibliographiques :

1. Reverter, M., Cutmore, S., Bray, R., Cribbs, T., Sasal, P., 2016. Gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) of butterflyfishes from the tropical Indo-West Pacific Islands. *Parasitology*, 143, 1580-1591.
2. Reverter M. Host-parasite interactions in coral reef fish, thèse de doctorat EPHE, 21 octobre 2016.
3. Hansson, G.C., 2012. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 57–62.
4. Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. Biological and ecological importance of external fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish.*, *In revision*.
5. Radek, K., Gallo, R., 2007. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* 29, 27–43.
6. Ullal, A.J., Noga, E.J., 2010. Antiparasitic activity of the antimicrobial peptide HbβP-1, a member of the β-haemoglobin peptide family. *J. Fish Dis.* 33, 657–664.