

**UNIVERSITE de CAEN BASSE-NORMANDIE**

**U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée**

**ECOLE DOCTORALE NORMANDE DE BIOLOGIE INTEGRATIVE, SANTE,  
ENVIRONNEMENT**

**THESE**

présentée par

**Laetitia BIGOT**

et soutenue

**le 17 avril 2012**

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT de L'UNIVERSITE DE CAEN BASSE-NORMANDIE**

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Environnement

*(Arrêté du 07 août 2006)*

**Caractérisation de voies impliquées dans la régulation  
neuroendocrine du métabolisme énergétique et de la reproduction  
chez l'huître creuse *Crassostrea gigas***

MEMBRES DU JURY :

<b>Mme Sylvie Dufour</b> , DR CNRS, MNHN Paris	Rapporteur
<b>M. Jean-Yves Toullec</b> , Maître de conférences HDR, Université Paris VI	Rapporteur
<b>Mme Liliane Schoofs</b> , Professeur, Université de Leuven, Belgique	Examinatrice
<b>M. Pascal Sourdain</b> , Professeur, Université de Caen	Examinateur
<b>M. Pierre Boudry</b> , Chercheur HDR, IFREMER Brest	Co-directeur de thèse
<b>M. Pascal Favrel</b> , Professeur, Université de Caen	Directeur de thèse



# *Avant-propos*

Ces travaux de recherche ont été réalisés à l'université de Caen Basse-Normandie, au sein de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée), dans l'Unité de Recherche CNRS-INEE FRE 3484 BiMEA « Biologie des Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés », sous la direction du Professeur Pascal Favrel et du Docteur Pierre Boudry de l'Ifremer de Brest.



Cette thèse a été financée par l'Ifremer et le Conseil Régional de Basse-Normandie.



# Remerciements

*Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de thèse Pascal FAVREL et mon co-directeur de thèse Pierre BOUDRY pour m'avoir encadrée durant cette thèse. Merci pour vos conseils, et l'aide que vous m'avez apportée.*

*J'exprime toute ma gratitude au professeur Michel MATHIEU, ancien directeur du laboratoire de Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, et au professeur Pascal SOURDAINE, son actuel directeur, pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire.*

*Je remercie également Sylvie DUFOUR et Jean-Yves TOULLEC d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon jury de thèse.*

*J'adresse mes remerciements à Liliane SCHOOFS pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à Leuven, m'avoir conseillée et avoir participé à mon jury de thèse, et je remercie également Isabel BEETS pour les nombreuses expériences d'endocrinologie inverse.*

*Je tiens à remercier également les docteurs Christophe LELONG et Guillaume RIVIERE pour leurs conseils toujours si avisés.*

*Je remercie tout particulièrement Marie-Pierre DUBOS et Béatrice ADELINÉ pour leur aide précieuse au quotidien au sein du laboratoire.*

*Je tiens à remercier l'équipe de la plateforme IMOGERE, Pierre BARBEY et Maxime LEMARCHAND, pour m'avoir accueillie et aidée lors de mes débuts en thèse.*

*Un grand merci également aux membres du laboratoire de Physiologie de l'Insecte, et plus particulièrement au Dr David SIAUSSAT, pour m'avoir transmis la passion de la recherche, qui m'a menée jusqu'à cette thèse.*

*Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire BioMEA, qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse, et qui m'ont accueillie très chaleureusement depuis mon arrivée.*

*J'adresse également des remerciements particuliers aux étudiants du labo, doctorants ou stagiaires, que j'ai côtoyés durant ces 3 années de thèse : Jérémy, Christelle, Georges, Martin, Pauline, Maxime... Je souhaite remercier plus particulièrement tous les membres du bureau SC258, anciens ou nouveaux, que j'ai pu croiser lors de ma thèse. Je pense notamment à Hervé, Alban, Amine, Alex, Marie, Valérie...*

*Un remerciement tout particulier à Jéhane, pour notre complicité et nos fous-rire, et à Margot pour ta générosité, ta bonne humeur et pour tous les mercredis Tia-Tia avec Seb.*

*Je remercie du fond du cœur également Adrien, tu as été un ami, un soutien et un confident durant ces années, merci d'avoir répondu présent à chaque fois que j'en ai eu besoin, et de m'avoir tellement soutenue.*

*Enfin, je n'ai pas assez de mots pour te remercier, Aude... Merci de m'avoir aidée à tous les niveaux, de la paillasse jusqu'à la rédaction de ce manuscrit, mais également pour ces soirées passées ensemble, et surtout ces moments musicaux si intenses (!! ) que nous seules savons apprécier à leur juste valeur. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites, sur le plan personnel et professionnel.*

*Un merci tout spécial à l'équipe des Miss qui a si bien organisé mon pot de thèse : Aude, Jéhane, Maxime, Mélanie, Adrien... Vous avez été parfaits !*

*Merci à tous ceux qui m'ont encouragée, de près comme de loin : Richard, Vahram, Romain, Marianne, Edouard...*

*Merci également aux membres de l'ASEFT pour votre bonne humeur et votre enthousiasme, et plus particulièrement aux membres de l'ASEF (Martich, Sam, Fab, JP, Mathilde, Laeti, Marie, Philou, Cara... sans oublier Omar !!). Une pensée spéciale pour Fabrice, qui m'a encouragée et soutenue durant la rédaction de ce manuscrit et qui a su rester à mes côtés, il y a un peu de toi dans ces « quelques » pages...*

*Je tiens à remercier chaleureusement Bap, Fanou et Céc pour tous les bons moments partagés ensemble.*

*Enfin, j'adresse tous mes remerciements à Marion, ma meilleure amie depuis si longtemps, qui a toujours su me redonner le sourire et la force de continuer. Merci d'avoir été là, j'espère que tu trouveras tout le bonheur que tu mérites tellement.*

*Je tiens enfin à remercier plus que tout ma famille, qui est toujours là pour moi, qui m'entoure, me soutient et m'encourage depuis le début. Merci à mon papa pour ses conseils sages et avisés.*

*Un grand merci à Nanie, qui m'a toujours soutenue quoi que je fasse. Merci d'avoir veillé sur moi en toute circonstance, dans les bons moments comme dans les mauvais. Je pense également à Daddy, qui aurait été encore plus fier de moi que jamais, en ce jour si spécial.*

*Je remercie également du fond du cœur ma grande sœur Rébecca et Clément, pour votre écoute et vos conseils si précieux, et surtout pour la petite Julianne.*

*Mon plus grand remerciement revient naturellement à ma maman, qui m'a donné plus d'amour qu'il n'est possible d'en recevoir. Merci de me rendre exceptionnelle à tes yeux, c'est le plus beau cadeau que l'on puisse offrir.*

*A Croquette, tu vas nous manquer...*



# Sommaire :

## *Introduction générale*

<b>1. La reproduction et sa régulation endocrine.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Présentation du modèle biologique .....</b>	<b>5</b>
A) Classification du modèle d'étude.....	7
B) Anatomie de l'huître creuse .....	7
C) Développement de l'huître et mise en place de la gonade.....	8
D) Cycles de reproduction et de mise en réserve chez <i>C. gigas</i> .....	10
<b>3. Neuroendocrinologie des invertébrés .....</b>	<b>17</b>
A) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).....	17
B) Régulation hormonale de la reproduction et du métabolisme énergétique .....	26
1. La régulation paracrine .....	27
• <i>La voie des TGF<math>\beta</math></i> .....	27
2. La régulation endocrine .....	30
• <i>Les stéroïdes et ecdystéroïdes</i> .....	30
• <i>La famille des insulin-like</i> .....	31
3. La régulation neuroendocrine .....	33
• <i>Les neuropeptides de la famille des RFamides</i> .....	33
• <i>La famille de la GnRH</i> .....	35
• <i>Le cas particulier de la leptine</i> .....	36
• <i>Autres neuropeptides influant sur le métabolisme énergétique ou la reproduction</i> ....	38
<b>4. Présentation des objectifs de thèse.....</b>	<b>40</b>

## ***Chapitre I : Identification et caractérisation des récepteurs potentiels au neuropeptide Y***

<b>Introduction .....</b>	<b>43</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>52</b>
A) Animaux et conditionnement trophique .....	52
B) Analyses bio-informatiques.....	52
C) Macroarray .....	53
D) Extraction des ARN totaux, rétro-transcription et PCR quantitative .....	56
E) Extraction peptidique et spectrométrie de masse .....	59
<b>Résultats .....</b>	<b>60</b>
A) Identification et analyse bio-informatique des récepteurs couplés aux protéines G dans la banque de données génomiques de <i>C. gigas</i> .....	60
B) Détermination de l'implication potentielle des récepteurs dans les fonctions de reproduction et/ou de mise en réserve énergétique .....	62
C) Sélection des récepteurs d'intérêt et étude de leur expression par PCR quantitative en temps réel .....	65
D) Etude phylogénétique des cinq récepteurs apparentés aux récepteurs NPY/F.....	87
<b>Discussion .....</b>	<b>90</b>

## ***Chapitre II : Recherche des ligands endogènes des récepteurs potentiels au neuropeptide Y et des récepteurs orthologues des récepteurs à la GnRH***

<b>Introduction .....</b>	<b>101</b>
A) L'endocrinologie inverse .....	101

1. Les différents systèmes d'expression hétérologue .....	101
2. Utilisation des lignées de Mammifères, implication de la protéine Gα16 .....	103
3. Nature et origine des ligands testés .....	107
4. Limites de la méthode .....	108
B) Stratégie adoptée pour la recherche de ligands chez <i>C. gigas</i> .....	110
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>112</b>
A) Amplification des séquences de récepteurs potentiels au NPY/F .....	112
B) Clonage des récepteurs en vecteur d'expression pcDNA3.1 .....	112
C) Tests d'endocrinologie inverse .....	113
<b>Résultats</b> .....	<b>118</b>
<b>Article</b> : Functional characterization of an LFRFamide receptor and its ligand in the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> .....	<b>123</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>143</b>

### ***Chapitre III : Identification et caractérisation de la GnRH et de son précurseur chez l'huître creuse***

<b>Introduction</b> .....	<b>147</b>
A) Les neurohormones de la famille des GnRHs/AKHs .....	147
1. La Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) .....	147
2. La GnRH chez les invertébrés .....	148
3. Le cas des Ecdysozoaires : l'AKH .....	151
B) La GnRH chez <i>C. gigas</i> .....	153
<b>Article</b> : Characterization of GnRH-related peptides in the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> .....	<b>155</b>
<b>Détermination des ligands des récepteurs orthologues aux récepteurs GnRH</b> .....	<b>163</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>166</b>

## ***Discussion générale***

<b>1. Le NPY/F et ses récepteurs potentiels chez <i>C. gigas</i> .....</b>	<b>175</b>
<b>2. Identification d'une voie LFRFamide chez l'huître creuse .....</b>	<b>181</b>
<b>3. Caractérisation de la voie de signalisation GnRH de <i>C. gigas</i> .....</b>	<b>183</b>
<b>4. Régulation neuro-endocrine de la reproduction et du métabolisme énergétique chez <i>C. gigas</i> .....</b>	<b>186</b>

<b><i>Annexes</i>.....</b>	<b>189</b>
----------------------------	------------

<b><i>Bibliographie</i> .....</b>	<b>203</b>
-----------------------------------	------------

# Répertoire des figures et tableaux

## Introduction générale :

<b>Figure 1</b> : Phylogénie simplifiée des Bilatériens.....	5
<b>Figure 2</b> : Anatomie succincte de l'huitre creuse <i>C. gigas</i> .....	7
<b>Figure 3</b> : Schéma du développement de la lignée germinale chez <i>C. gigas</i> .....	8
<b>Figure 4</b> : Coupes histologiques d'aire gonadique d'individus mâles et femelles aux différents stades de gamétogenèse et mise en réserve .....	12
<b>Figure 5</b> : Evolution des tubules gonadiques et du tissu de réserve en fonction du cycle de reproduction.....	13
<b>Figure 6</b> : Schéma représentant la balance physiologique entre les cycles annuels de mise en réserve et de gamétogenèse dans l'aire gonadique.....	13
<b>Figure 7</b> : Schéma simplifié de la structure bidimensionnelle d'un récepteur couplé aux protéines G .....	17
<b>Figure 8</b> : Cycle d'activation/inactivation des protéines G hétérotrimériques.....	18
<b>Figure 9</b> : Schéma de la signalisation cellulaire induite par les différents sous-types de protéines G .....	20
<b>Figure 10</b> : Classification GRAFS de la phylogénie des RCPGs humains .....	24
<b>Figure 11</b> : Régulation du vieillissement de l'appareil reproducteur chez <i>C. elegans</i> par les TGF $\beta$ .....	27
<b>Figure 12</b> : Intégration des signaux métaboliques permettant la régulation neuroendocrine de la reproduction et du métabolisme chez les Vertébrés .....	36

## Chapitre 1 :

<b>Figure 13</b> : Alignement des séquences protéiques des précurseurs de neuropeptides Y/F de vertébrés et d'invertébrés .....	42
<b>Figure 14</b> : Alignement des séquences protéiques des précurseurs de sNPF d'insectes.....	43
<b>Figure 15</b> : Alignement des peptides de type NPY, NPF et sNPF .....	44

<b>Figure 16</b> : Représentation schématique des rôles connus et supposés du NPY de la Limnée, comparés aux rôles connus de ce peptide chez les Mammifères .....	<b>48</b>
<b>Figure 17</b> : Représentation de la technique de macroarray .....	<b>53</b>
<u>Tableau 1</u> : Séquences et températures de fusion (T <sub>m</sub> ) des différents couples d'amorces utilisés en PCR quantitative en temps réel .....	<b>55</b>
<b>Figure 18</b> : Schéma de principe de l'amplification des extrémités 5' et 3' d'une séquence codante, par RACE-PCR.....	<b>57</b>
<b>Figure 19</b> : Résultats de la recherche dans la banque d'ESTs de <i>C. gigas</i> Gigas Database, selon différentes annotations .....	<b>58</b>
<b>Figure 20</b> : Représentation schématique des recherches effectuées dans la banque d'EST de <i>C. gigas</i> , et des résultats obtenus après analyse bio-informatique .....	<b>59</b>
<b>Figure 21</b> : Membrane contenant les clones bactériens sélectionnés à partir de la banque d'EST de <i>C. gigas</i> , et hybridée avec une sonde radioactive d'ADNc d'aire gonadique provenant d'individus en stade II .....	<b>60</b>
<u>Tableau 2</u> : Résultats de l'hybridation des sondes radioactives d'ADNc d'aire gonadique de <i>C. gigas</i> aux stades 0, I, II et III sur les clones codant pour les RCPGs de la banque d'EST .....	<b>61</b>
<b>Figure 22</b> : Alignement des séquences de précurseurs de NPY/F de mollusques.....	<b>63</b>
<b>Figure 23</b> : Spectre MS (Mass Spectrometry des différents peptides présents dans les ganglions viscéraux de <i>C. gigas</i> et fragmentation par spectrométrie de masse (MS/MS) du neuropeptide F/Y tronqué.....	<b>65</b>
<b>Figure 24</b> : Expression du gène codant le précurseur de NPY/F de <i>C. gigas</i> mesurée par PCR quantitative en temps réel.....	<b>67</b>
<b>Figure 25</b> : Alignement du récepteur A4 de <i>C. gigas</i> avec le récepteur au neuropeptide FF de type 2 d' <i>H. sapiens</i> .....	<b>69</b>
<b>Figure 26</b> : Expression du gène du récepteur A4 de <i>C. gigas</i> mesurée par PCR quantitative en temps réel .....	<b>71</b>
<b>Figure 27</b> : Alignement du récepteur D1 de <i>C. gigas</i> avec le récepteur au neuropeptide Y/F d' <i>Haliotis discus</i> .....	<b>72</b>
<b>Figure 28</b> : Expression du gène du récepteur D1 de <i>C. gigas</i> mesurée par PCR quantitative en temps réel .....	<b>74</b>
<b>Figure 29</b> : Alignement du récepteur F3 de <i>C. gigas</i> avec le récepteur du sNPF d' <i>Anopheles gambiae</i> .....	<b>75</b>
<b>Figure 30</b> : Expression du gène du récepteur F3 de <i>C. gigas</i> mesurée par PCR quantitative en temps réel .....	<b>77</b>

<b>Figure 31 :</b> Alignement du récepteur H4 de <i>C. gigas</i> avec le récepteur à l'allatotropine d' <i>Aedes aegypti</i> .....	<b>79</b>
<b>Figure 32 :</b> Expression du gène du récepteur H4 de <i>C. gigas</i> mesurée par PCR quantitative en temps réel .....	<b>81</b>
<b>Figure 33 :</b> Alignement du récepteur F1 de <i>C. gigas</i> avec le récepteur à l'adénosine de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	<b>83</b>
<b>Figure 34 :</b> Expression du gène du récepteur F1 de <i>C. gigas</i> mesurée par PCR quantitative en temps réel .....	<b>84</b>
<b>Tableau 3 :</b> Récapitulatif de l'expression des gènes codant pour le NPY/F et ses récepteurs potentiels .....	<b>85</b>
<b>Figure 35 :</b> Arbre phylogénétique des récepteurs de différents facteurs endocrines contenant les cinq récepteurs potentiels au neuropeptide Y/F de <i>C. gigas</i> .....	<b>87</b>
<b>Figure 36 :</b> Rôle potentiel du neuropeptide Y/F de <i>C. gigas</i> sur la régulation balance physiologique entre la mise en réserve et la reproduction .....	<b>94</b>

## **Chapitre 2 :**

<b>Figure 37 :</b> Photos de méduses <i>Aequora</i> et de leurs organes luminescents .....	<b>104</b>
<b>Figure 38 :</b> Représentation schématique du mode d'action moléculaire de l'aequorine .....	<b>104</b>
<b>Figure 39 :</b> Cascade moléculaire induite par la fixation d'un ligand au RCPG testé entraînant le recrutement de la protéine G $\alpha$ 16 .....	<b>106</b>
<b>Figure 40 :</b> Schématisation des différents dimérisations RCPGs.....	<b>109</b>
<b>Figure 41 :</b> Schéma de principe du protocole utilisé en endocrinologie inverse pour déterminer le(s) ligand(s) endogène(s) d'un récepteur couplé aux protéines G.....	<b>114</b>
<b>Figure 42 :</b> Exemple de résultat de test d'endocrinologie inverse par transfection d'une lignée CHO et détection du calcium intracellulaire par luminescence .....	<b>116</b>
<b>Tableau 4 :</b> Liste des différents peptides testés sur les récepteurs apparentés aux récepteurs NPY/F de <i>C. gigas</i> .....	<b>118</b>
<b>Figure 43 :</b> Exemple de résultats de dosage calcique à l'aide du système aequorine, avec double injection.....	<b>119</b>
<b>Tableau 5 :</b> Récapitulatif des peptides ayant activé chacun des cinq RCPGs de <i>C. gigas</i> étudiés.....	<b>120</b>

### **Chapitre 3 :**

**Figure 44 :** Structure commune aux précurseurs de différents neuropeptides : AKH, GnRH, RCPH, HrTH et Corazonine..... **152**

**Tableau 5 :** Liste des différents peptides testés sur les récepteurs orthologues des récepteurs GnRH chez *C. gigas*..... **164**

**Tableau 6 :** Récapitulatif des peptides ayant activé les deux RCPGs orthologues aux récepteurs GnRH étudiés..... **164**

**Figure 45 :** Arbre phylogénétique des relations existant entre les séquences des récepteurs à la corazonine, à la GnRH et à l'AKH..... **169**

**Figure 46 :** Schéma récapitulatif de l'hypothèse d'apparition des neuro-hormones GnRH, AKH et corazonine au sein des des Bilatériens..... **171**

### **Discussion générale :**

**Figure 47 :** Schématisation des différentes interventions possibles sur le système NPY chez l'Homme..... **178**

**Figure 48 :** Schématisation de l'influence possible des peptides de type RFamides caractérisés chez l'huître creuse sur la balance physiologique régulant l'équilibre entre mise en réserve énergétiques et fonctions liées à la reproduction ..... **183**

**Figure 49 :** Expression différentielle des différents facteurs neuroendocrines en fonction de la disponibilité en nourriture dans le milieu..... **187**

**Figure 50 :** Schéma de la régulation neuroendocrine de la balance physiologique régulant la mise en réserve et la reproduction lors d'un stress trophique ..... **188**

# *Liste des abréviations*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
AKH : AdipoKinetic Hormone  
AMP : Adenosine MonoPhosphate  
ARN : Acide RiboNucléique  
ATP : Adenosine TriPhosphate  
CHO : Chinese Hamster Ovary  
DAG : DiAcyl Glycerol  
EF1 : Elongation Factor 1  
EST : Expressed Sequence Tag  
FSH : Follicle Stimulating Hormone  
GDP : Guanosine DiPhosphate  
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone  
GTP : Guanosine TriPhosphate  
HEK : Human Embryonic Kidney  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
IP3 : Inositol-1-4-5-triPhosphate  
LH : Luteinizing Hormone  
MS : Mass Spectrometry  
NPY : NeuroPeptide Y  
NPY/F : NeuroPeptide Y/F  
PIP2 : PhosphatidyInositol diPhosphate  
PLC : PosphoLipase C  
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G



*Introduction*  
*générale*



## ***1) La reproduction et sa régulation endocrine***

La reproduction est une fonction essentielle chez tous les êtres vivants, pour assurer le maintien des espèces. Il existe plusieurs modes différents de reproduction, selon les espèces considérées ou les conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent. On retrouve principalement deux grands modes de reproduction, la reproduction asexuée et la reproduction sexuée.

La première, également appelée multiplication asexuée, consiste en une division d'un organisme en deux organismes distincts, par multiplications cellulaires (mitoses). Elle aboutit à la formation d'un nouvel organisme qui sera un clone parfait de l'organisme de départ. Ce mode de reproduction est utilisé essentiellement chez les protistes (bactéries et levures), mais également dans certaines formes de vie des Cnidaires (formes polype), ainsi que chez les plantes, pour lesquelles on parle généralement de multiplication végétative.

Le second mode de reproduction, la reproduction sexuée, est un phénomène bien plus complexe, puisqu'il fait intervenir deux individus distincts de la même espèce et de sexes différents. Dans ce type de reproduction, des cellules sexuelles sont produites par chacun des partenaires par mitoses puis méioses, ce qui aboutit à la formation de gamètes haploïdes. Ces gamètes vont se féconder lors de la reproduction, formant ainsi une cellule-œuf diploïde contenant un matériel génétique unique, issu d'une partie du matériel de chacun des deux organismes parents. Cette reproduction entraîne donc la formation de nouveaux organismes différents de leurs parents, et donc génétiquement uniques, permettant ainsi un brassage des gènes entre chaque génération. Un tel brassage donne un avantage sélectif sur les organismes qui en bénéficient, permettant ainsi une plus grande variabilité des espèces, notamment en réponse aux variations du milieu environnant. Ce type de reproduction est utilisé par la plupart des organismes pluricellulaires, des plantes aux animaux Vertébrés et Invertébrés.

La reproduction sexuée, contrairement à la multiplication asexuée, fait donc intervenir des cellules particulières, les gamètes, produites à partir d'un type cellulaire dédié (la lignée germinale), et qui doivent être émis en coordination entre les deux partenaires sexuels, afin que la fécondation puisse se réaliser correctement. De plus, cette reproduction met également en jeu des comportements particuliers, notamment pour la recherche de partenaires,

l'accouplement ou la ponte. Ainsi, la reproduction sexuée nécessite l'activation et la coordination de multiples cascades moléculaires et cellulaires permettant la mise en place et la fonctionnalité de cellules voire d'organes sexuels. Des régulations très fines de toutes ces cascades sont donc essentielles au bon fonctionnement de cette reproduction. Ces régulations doivent se faire aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier, afin de coordonner les divers comportements associés. Elles sont assurées par les hormones, qui agissent via deux modes d'action distincts :

- La régulation paracrine, qui fait intervenir des facteurs produits par des cellules voisines et qui n'agissent que localement.
- La régulation endocrine, médiée par des peptides ou protéines secrétés dans l'organisme, et dont certains sont produits au niveau du système nerveux central, les neurohormones, ou neuropeptides. Les Invertébrés, tout comme les Vertébrés, présentent également de nombreuses familles de neurohormones régulant la reproduction, et les phénomènes qui lui sont associés, tels que le métabolisme énergétique, le comportement reproducteur, la ponte...

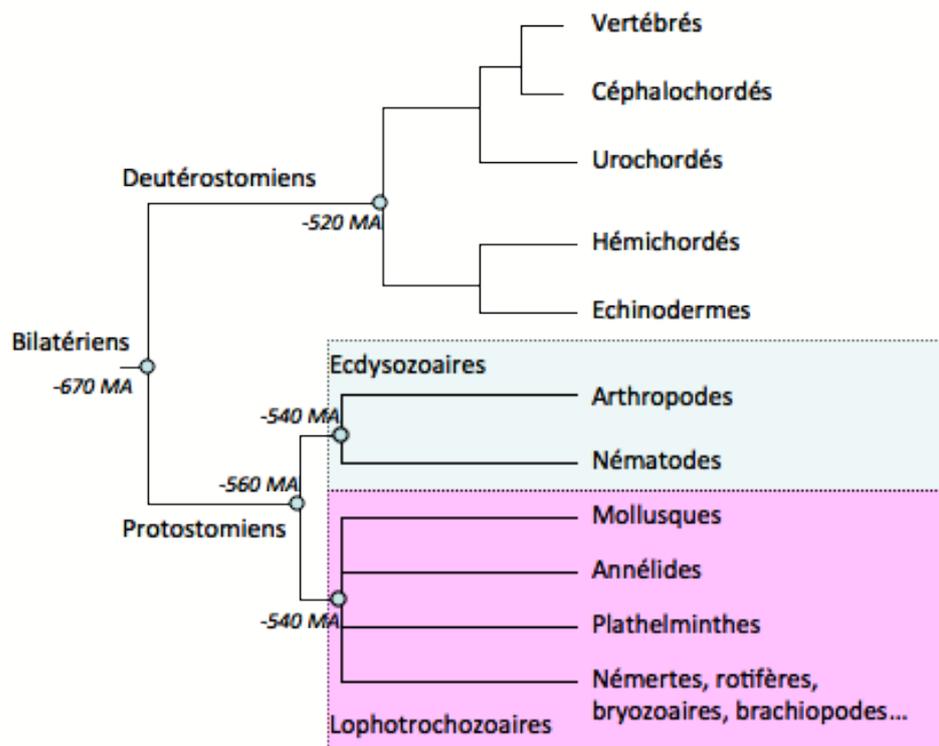
Malgré l'identification et la caractérisation de ces facteurs paracrines ou endocrines chez certains Lophotrochozoaires, la régulation hormonale de la reproduction reste mal connue chez les Mollusques, qui représentent cependant un groupe de fort intérêt économique et phylogénétique. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, lors de ce travail de thèse, à la régulation (neuro)endocrine de la mise en réserve et de la reproduction chez une des espèces aquacoles les plus importantes en France, l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

## ***2) Présentation du modèle***

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est un modèle de fort intérêt économique, puisqu'il représente la principale ressource aquacole française. Elle est l'espèce d'huître la plus cultivée en France (98%, contre 2% d'huîtres plates *Ostrea edulis*). La production ostréicole française est d'environ 130 000 tonnes par an, ce qui en fait le premier pays européen producteur d'huîtres. Depuis quelques décennies, on assiste à une forte émergence des écloséries qui sont responsables désormais de l'apport le plus important en naissains sur les parcs ostréicoles. Or, ces dernières années, des vagues de mortalités estivales de plus en plus importantes qui compromettent l'approvisionnement en naissains sur ces parcs. Ces mortalités seraient dues à plusieurs facteurs environnementaux (température, pluviométrie, présence de pathogènes opportunistes) et physiologiques (effort de reproduction, épuisement des réserves énergétiques). Les réserves accumulées durant l'année par *C. gigas* sont consommées en été pour permettre la maturation des gamètes et la ponte, ce qui fragilise l'huître, la rendant ainsi plus sensible aux changements environnementaux et aux pathogènes.

Dans ce contexte de fortes mortalités, il paraît donc important de mieux comprendre la balance physiologique qui contrôle la mise en réserve et la reproduction de ce modèle. Cette balance est régulée par des facteurs endocrines comme les insulino-like (Jouaux, 2010), mais on retrouve également d'autres neuropeptides qui sont de bons candidats potentiels de cette régulation.

En plus de son intérêt économique, *C. gigas* est également un modèle d'étude intéressant compte tenu de sa position phylogénétique, dans le groupe des Lophotrochozoaires (figure 1).



**Figure 1** : Phylogénie simplifiée des Bilatériens, d'après Adoutte *et al.*, 2000

Après l'explosion de la vie pendant le Cambrien, les bilatériens se sont divisés en deux groupes : les deutérostomiens et les protostomiens, il y a environ 670 millions d'années (Adoutte *et al.*, 2000). Ils se différencient essentiellement par le devenir du blastopore pendant la phase embryonnaire : en effet, chez les deutérostomiens, le blastopore donnera l'anus, et la bouche apparaîtra secondairement, alors que pour les protostomiens le blastopore deviendra la bouche, et l'apparition de l'anus sera plus tardive. Les deutérostomiens représentent un groupe très étudié, puisqu'ils incluent les Vertébrés. Dans les protostomiens, on distingue deux grands groupes : les Ecdysozoaires, qui comprennent les arthropodes et les nématodes, et qui sont relativement bien étudiés également, puisque l'on y retrouve plusieurs espèces modèles, comme *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*. En revanche, on possède bien moins de données sur le deuxième groupe des protostomiens, les Lophotrochozoaires. Les Lophotrochozoaires regroupent les animaux présentant une larve de type trochophore (Eutrochozoaires) et les animaux possédant un lophophore (Lophophorates). Ce groupe est composé essentiellement des Annélides, des Plathelminthes et des Mollusques (Figure 1).

## A) Classification du modèle d'étude

Embranchement : Mollusques

Classe : Bivalves

Sous classe : Ptériomorphes

Ordre : Ostroïdés

Famille : Ostréidés

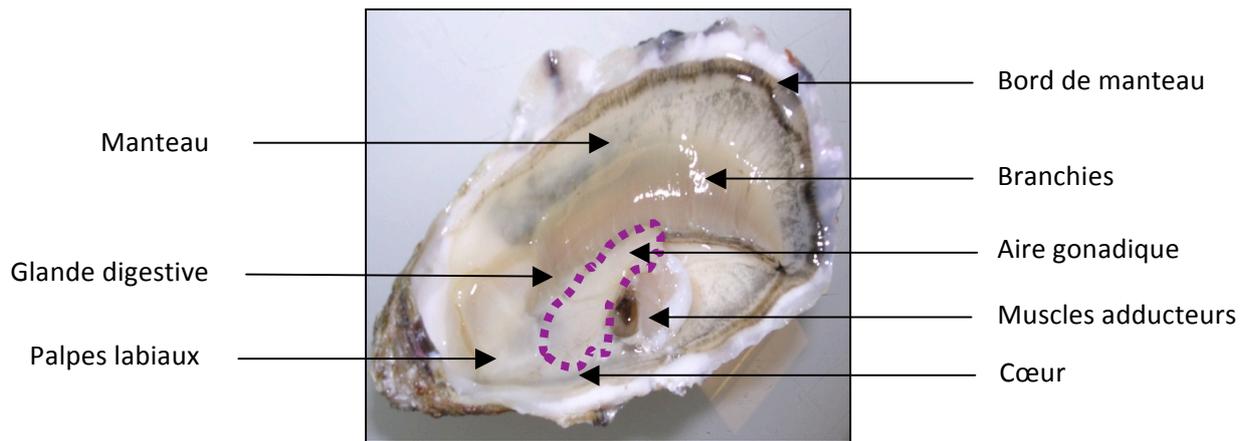
Genre : *Crassostrea*

Espèce : *gigas*

## B) Anatomie de l'huître creuse

L'huître creuse est un mollusque bivalve possédant une coquille en deux parties (valves) reliées par la charnière ainsi que par les deux muscles adducteurs antérieur et postérieur qui permettent l'ouverture et la fermeture de la coquille. Celle-ci est secrétée par le bord de manteau sous forme de carbonates de calcium. La partie charnue de l'animal est contenue dans la valve postérieure creuse, et est composée de plusieurs organes. L'eau de mer arrive tout d'abord par les branchies, apportant avec elle les particules qui serviront à la nutrition de l'huître, puisque c'est un animal filtreur. Ces particules seront ensuite triées au niveau des palpes labiaux qui assurent également une partie de la mise en réserve énergétique, puis orientées vers le tube digestif et la glande digestive (voir figure 2).

C'est autour de cette glande digestive que se situe l'aire gonadique, composée des tubules gonadiques contenant les gamètes, et de tissu de réserve qui permet le stockage du glycogène. Cette aire gonadique, ainsi que le reste des organes, est innervée par des axones partant du système nerveux central représenté par les ganglions viscéraux, situés sur les muscles, et les ganglions cérébroïdes, très régressés, en région antérieure, proche des palpes labiaux. La masse viscérale est entourée du manteau, qui constitue également un tissu de réserve pour l'organisme.



**Figure 2 :** Anatomie succincte d'un individu adulte d'huître creuse *Crassostrea gigas* ouverte.

### C) Développement de l'huître et mise en place de la gonade

Cette aire gonadique est mise en place très tôt au cours du développement de l'huître creuse, puisque les premiers déterminants de la lignée germinale sont présents dans l'embryon quelques heures seulement après fécondation.

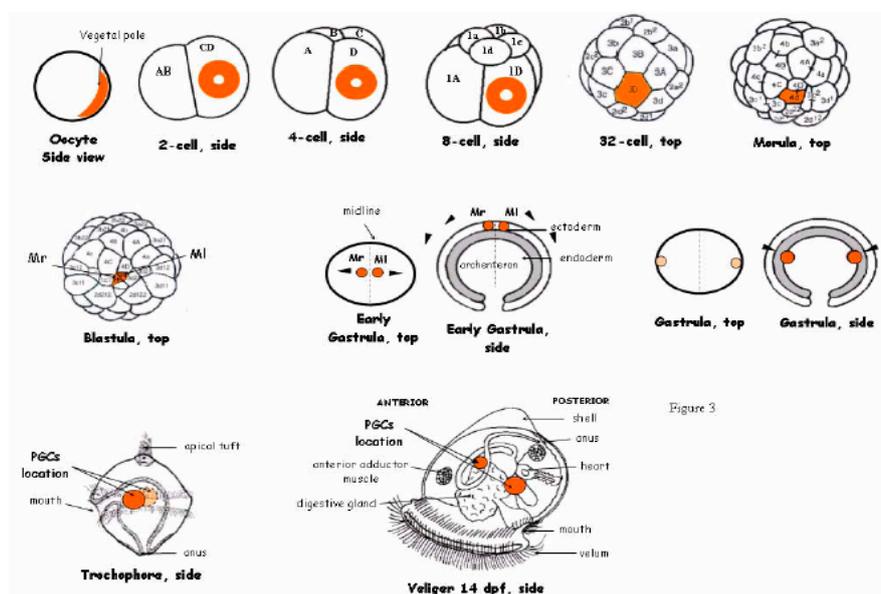
La lignée de cellules germinales se forme à partir des cellules germinales primordiales (PGC), situées dans l'ovocyte au niveau du pôle végétatif. Cette localisation est permise par l'étude de l'expression du gène *vasa oyvgl*, marqueur de la lignée germinale de l'huître creuse (Fabioux *et al.*, 2004). Les ARN de ce gène sont retrouvés chez les ovocytes, ce qui met en évidence leur origine maternelle. Chez *Crassostrea gigas*, la rencontre entre les gamètes a lieu dans l'eau de mer (milieu environnant), elle est suivie de la fécondation, puis d'une segmentation qui consiste en une succession de clivages de l'œuf passant les stades 2 et 4 cellules (figure 3) pendant lesquels le signal de *vasa* montre une répartition asymétrique dans un seul blastomère de la future lignée germinale. Lors des stades morula, blastula puis gastrula (4 à 6 heures), on retrouve la présence de transcrits et de protéine *vasa*. Les premières PGC commencent alors à proliférer et migrent en deux groupes de cellules dans la larve trochophore.

Ce stade trochophore (40 à 50µm) est caractérisé par son organe de nage composé de deux couronnes de cils et par une touffe de cils présente à l'extrémité antérieure qui correspond à l'organe sensoriel de la larve. La glande de la coquille va se mettre en place petit à petit pour former deux valves qui vont entourer la larve. La larve trochophore va évoluer en larve véligère (10 à 13 jours), chez laquelle les deux regroupements de PGC migrent

symétriquement de part et d'autre de la larve. L'organe de nage se transforme alors en velum et va acquérir une fonction alimentaire. L'étape suivante est la larve pédivéligère (13 à 24 jours) avec mise en place d'un pied cilié qui permettra l'accroche de la larve à son substrat, qui marquera la fin de la vie planctonique et ainsi d'avoir un mode de vie sessile correspondant au mode de vie des huîtres adultes. D'autres tissus comme les branchies et le système nerveux vont alors commencer à se réorganiser.

Enfin la métamorphose va entraîner la dégénérescence ou la résorption de certains organes larvaires comme le pied tandis que d'autres se réorganiseront ou serviront à l'ébauche des organes adultes comme les ganglions cérébroïdes qui vont fusionner ou le vélum qui va servir à la mise en place des palpes labiaux.

Ce gène *vasa*, marqueur de la ligne germinale durant le développement, mais également tout au long de la vie adulte de *C. gigas* (Fabioux *et al.*, 2004) joue un rôle primordial dans la mise en place de la gonade, puisque son invalidation par interférence à l'ARN (RNAi) entraîne une réduction très importante des tubules gonadiques (Fabioux *et al.*, 2009).



**Figure 3 :** Schéma du développement de la lignée germinale chez *C. gigas*, de l'ovocyte non fécondé à la larve métamorphosée. Les zones orange représentent des régions du cytoplasme contenant les déterminants de la lignée germinale, de l'ovocyte au stade blastula, et les cellules germinales primordiales à partir du stade gastrula. Les flèches représentent le sens de migration des cellules. D'après Fabioux *et al.*, 2004.

## D) Cycles de reproduction et de mise en réserve chez *C. gigas*

La gonade ainsi mise en place est un organe dit « non-permanent » puisqu'il varie fortement au cours du cycle de reproduction ; en effet, l'huître creuse présente un cycle annuel de reproduction avec une maturation sexuelle qui commence en hiver et aboutit en été à l'émission des gamètes dans l'eau de mer. Entre deux cycles de reproduction, cette espèce peut changer de sexe, de manière irrégulière, avec souvent des mâles pour les individus les plus jeunes, faisant de cette espèce un hermaphrodite alternatif à tendance protandre. On retrouve rarement des individus hermaphrodites simultanés, présentant des tubules gonadiques avec des gamètes mâles et femelles. Le déterminisme du sexe est encore peu connu chez cette espèce, mais il dépendrait à la fois de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux (Guo *et al.*, 1998). Pour mieux comprendre ce déterminisme chez *C. gigas*, des marqueurs de la différenciation gonadique ont été caractérisés chez l'huître creuse : un homologue du facteur DMRT1 a été identifié par Naimi *et al.* (2009a). Ce facteur, connu pour être impliqué dans la différenciation sexuelle des mâles chez *D. melanogaster* et *C. elegans*, est conservé chez *C. gigas*, et ne présente pas de régulations transcriptionnelles majeures au cours de la gamétogenèse, bien qu'un pic de transcrits ait été mis en évidence au cours du développement, suggérant un rôle de *Cg-DMI* dans la mise en place de la première gonade (Naimi *et al.*, 2009a). Un autre facteur de différenciation gonadique a également été mis en évidence, *CgFoxl2*, et il montre une nette diminution d'expression après la métamorphose, contrairement à *CgDMI* (Naimi *et al.*, 2009b). L'expression *CgFoxl2* est croissante dans l'aire gonadique femelle, suggérant une implication dans la détermination de la voie femelle.

Chez *C. gigas*, la gamétogenèse s'effectue dans l'aire gonadique, un organe non permanent qui régresse fortement après chaque cycle annuel, pour se reconstruire ensuite (voir figure 4). Elle peut être divisée en quatre stades distincts (Berthelin *et al.*, 2000) :

- Le stade 0, de repos sexuel, pendant lequel les gonies sont encore indifférenciées et très peu nombreuses dans l'aire gonadique, le sexe des individus ne peut donc pas encore être déterminé. L'aire gonadique est alors très réduite dans l'organisme.
- Le stade 1, de divisions cellulaires, pendant lequel ces gonies se multiplient pour former peu à peu les tubules gonadiques, et où l'on commence à pouvoir différencier les mâles des femelles par analyse de coupes histologiques.

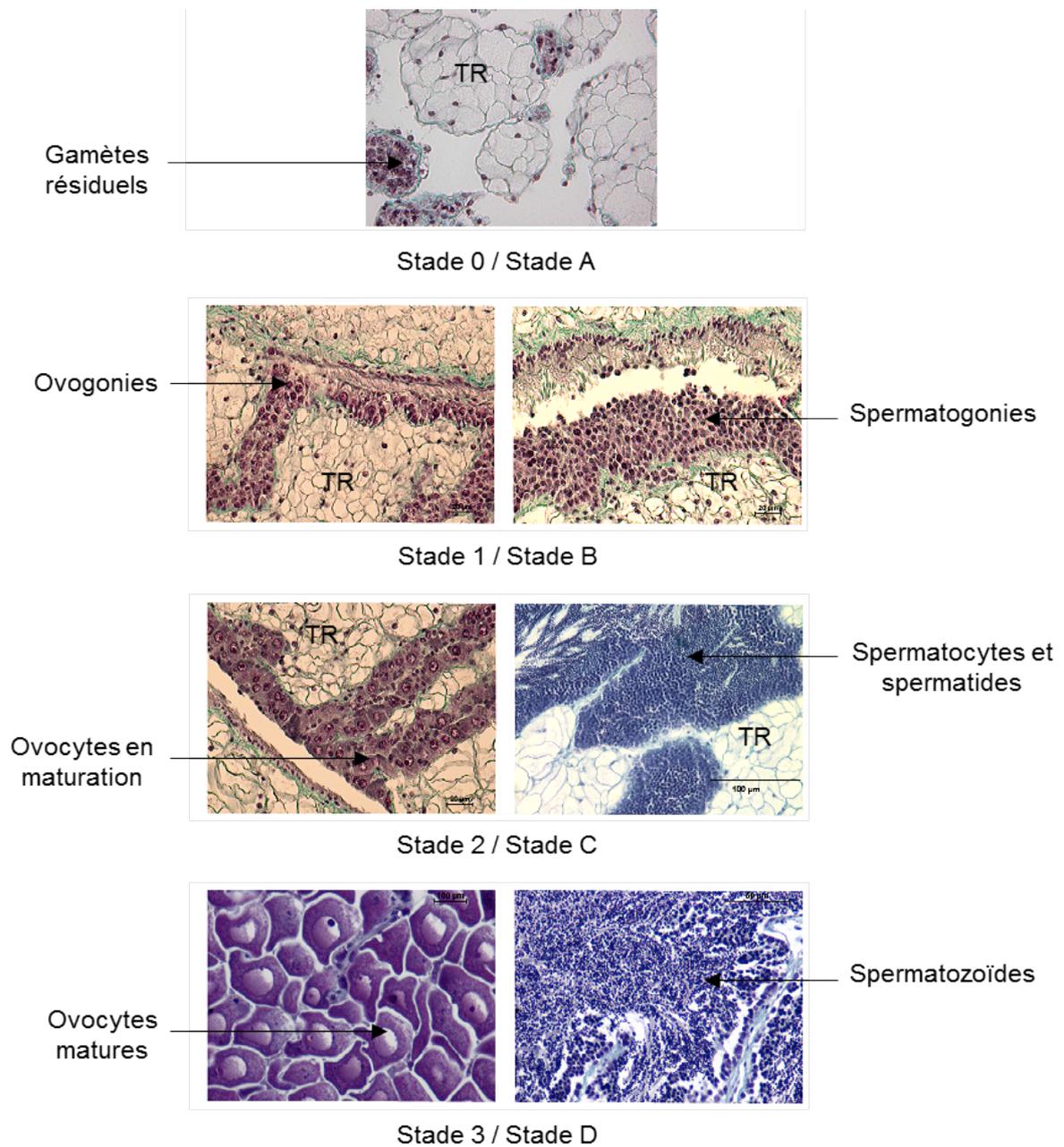
- Le stade 2, de différenciation cellulaire, pendant lequel les gamètes se différencient et occupent progressivement la majorité du volume de l'aire gonadique.
- Le stade 3, de maturité sexuelle, pendant lequel on trouve des gamètes totalement différenciés, en spermatozoïdes ou en ovocytes, et qui s'achève par la ponte de ces gamètes. Lors de cette maturité sexuelle, l'aire gonadique devient un organe prépondérant chez l'huître, qui occupe une grande proportion de la masse viscérale.

Chez l'huître, les tubules gonadiques sont délimités par une matrice acellulaire entourée d'une couche unique de cellules myoépithéliales. Un marqueur de prolifération cellulaire, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), a été utilisé pour identifier les processus de proliférations cellulaires impliqués dans ce cycle gamétogénétique (Franco *et al.*, 2009). L'expression de ce marqueur est maximale au stade 2 chez les mâles et au stade 3 chez les femelles, dans l'aire gonadique totale. Après microdissection laser, il s'avère que ce facteur n'est pas exprimé dans le tissu de réserve, mais que son expression est très forte dans les tubules gonadiques mâles aux stades 1, 2 et 3, et plus modérée et croissante chez les femelles, du stade 1 au stade 3. Au début de la gamétogenèse, on retrouve la protéine PCNA dans les tubules gonadiques au niveau des cellules myoépithéliales. Puis le marquage disparaît, pour apparaître dans les spermatogonies et spermatocytes chez les mâles, alors que chez les femelles, le marquage des ovogonies et ovocytes perdure tout au long du cycle, suggérant des proliférations continues jusqu'à la ponte. L'aire gonadique est composée de ces tubules gonadiques, mais également de cellules vésiculeuses stockant l'énergie sous forme de glycogène, qui va servir à supporter la gamétogenèse (voir figure 4). Ce tissu de réserve suit aussi un cycle annuel, décomposé en quatre stades, calés sur les stades de gamétogenèse (voir figure 5):

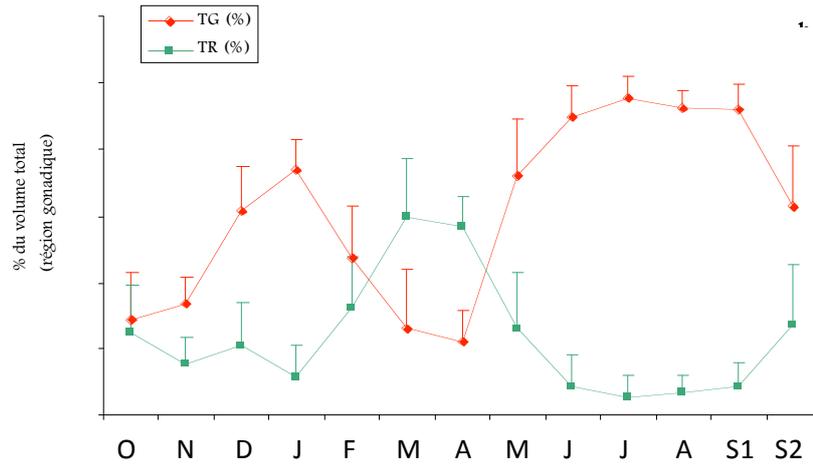
- Le stade A, simultané au stade 0 de repos sexuel, qui correspond à la reconstruction du tissu de réserve, et donc à la multiplication des cellules stockant le glycogène.
- Le stade B, correspondant au stade 1 gamétogénétique, pendant lequel le tissu de réserve est à son développement maximal et donc largement majoritaire dans l'aire gonadique.
- Le stade C, qui se déroule pendant le stade 2 de gamétogenèse, et qui correspond à une forte régression du tissu de réserve, due à la consommation du glycogène stocké.

- Le stade D, simultané au stade 3 de maturité sexuelle, pendant lequel le tissu de réserve est réduit au minimum, laissant place aux tubules gonadiques largement majoritaires.

On retrouve le facteur PCNA au niveau des cellules du tissu de réserve, lors de sa reconstruction (stades A et B), ce qui est concordant avec les mitoses nécessaires à une telle reconstruction, et le marquage disparaît ensuite durant les stades C et D (Franco/Jouaux *et al.*, 2009). Dans les stades précoces de gamétogenèse, le développement des tubules gonadiques est permis par les proliférations des cellules péritubulaires, puis les cellules goniales prolifèrent tout au long du cycle.



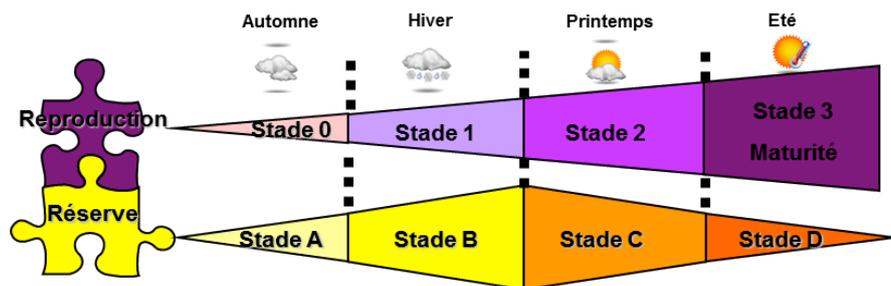
**Figure 4 :** Coupes histologiques d'aire gonadique colorées au trichrome de Prenant-Gabe de *C. gigas* adultes. Les tubules gonadiques sont colorés en violet, et le tissu de réserve en beige. Les individus sont triés selon leur sexe et leur stade de gamétogenèse (0 à 3) et de mise en réserve (A à D). TR = tissu de réserve. Les photos de gauche représentent des coupes d'aire gonadique femelle, et celles de droite des coupes d'aire gonadique de mâles.



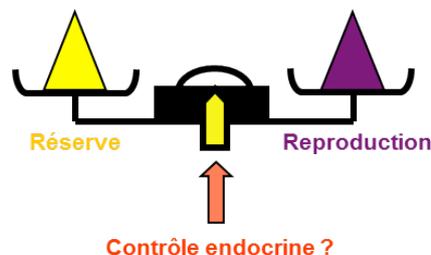
**Figure 5 :** Evolution des tubules gonadiques et du tissu de réserve en fonction du cycle de reproduction, en fonction des mois de l'année. TG=tubules gonadiques, TR=tissu de réserve (d'après Berthelin, 2000).

Sur ces coupes histologiques, les proportions de tubules gonadiques et de tissu de réserve alternent selon le stade du cycle, soulèvent l'hypothèse d'une balance physiologique qui régulerait ces deux cycles (figure 6). En effet, lorsque les gonies sont peu nombreuses, en stade 0, le tissu de réserve se reconstruit, afin d'appuyer énergétiquement le déroulement de la gamétogenèse lors des stades 1 et 2. En fin de cycle, toutes ces réserves de glycogène ont été consommées, pour laisser place à des tubules gonadiques prédominants et gorgés de gamètes matures, ovocytes ou spermatozoïdes.

Cycles annuels de gamétogenèse et de mise en réserve énergétique :



Balance physiologique régulant la reproduction et la mise en réserve :



**Figure 6 :** Schéma représentant la balance physiologique entre les cycles annuels de réserve en glycogène et de gamétogenèse, dans l'aire gonadique de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Cette balance physiologique, très importante pour la régulation de la reproduction et de la mise en réserve de glycogène, est impliquée également dans les phénomènes de mortalités estivales subies par l'huître creuse. En effet, depuis les années 1960 des mortalités sont rapportées, notamment au Japon et aux Etats-Unis. Ces dernières années, les populations de *C. gigas* cultivées le long des côtes françaises connaissent à leur tour de fortes vagues de mortalité, pouvant atteindre 70 à 80% des individus chaque année. Elles se produisent pendant la période estivale, lorsque la température de l'eau atteint environ 19°C, et au moment de la maturité sexuelle des animaux. D'après les rapports du défi MOREST (MORTalités ESTivales) mené de 2001 à 2005, ces mortalités seraient dues à la combinaison de plusieurs facteurs internes et environnementaux. D'un point de vue physiologique, les huîtres présentant un fort effort de reproduction, c'est-à-dire dont les tubules gonadiques occupent un large volume dans la masse viscérale, ont été prouvées comme étant plus sensibles à ces mortalités. En effet, ces individus consomment plus de réserve énergétique, ce qui les rend plus sensibles aux différents stress provoqués par l'augmentation de la température, et de l'abondance de pathogènes. Lors de fortes températures, les bactéries du genre *Vibrio* et les virus pathogènes de l'huître se développent plus facilement, et peuvent être responsables de fortes mortalités chez *C. gigas* (Renault *et al.*, 1995 ; Lacoste *et al.*, 2001 ; Waechter *et al.*, 2002 ; Samain et McCombie, 2007). De plus, d'après les banques de données soustractives construites entre des lignées d'individus résistants et sensibles à ces mortalités, plusieurs familles de gènes sont différentiellement exprimées, selon le degré de sensibilité aux mortalités (Huvet *et al.*, 2004). Parmi ces gènes, de nombreux sont impliqués dans le métabolisme énergétique, comme le transporteur de glucose SGLT, qui permet de subvenir aux besoins énergétiques des cellules. Ainsi, il semble y avoir une relation étroite entre la mise en réserve énergétique, la gamétogenèse et la sensibilité à ces mortalités estivales, ce qui renforce l'intérêt de l'étude des régulations qui s'opèrent dans le tissu gonadique.

Le déroulement de ces deux cycles simultanés (gamétogenèse et mise en réserve) nécessite une communication accrue entre les deux types de tissu constituant l'aire gonadique, et donc l'intervention de facteurs internes permettant cette communication. La première famille de facteurs impliqués dans cette régulation, identifiée par Jouaux *et al.*, (2011), est celle de la voie insuline. En effet, les auteurs ont mis en évidence l'existence de nombreux messagers de cette voie cellulaire, ainsi que leur implication dans la régulation de la reproduction et de la mise en réserve, suite à un conditionnement trophique. Chez les Vertébrés, cette voie de signalisation cellulaire interagit avec d'autres voies, permettant une

régulation fine de différentes fonctions physiologiques, et notamment avec des neuropeptides, comme le neuropeptide Y.

Cependant, malgré toutes ces données existantes pour l'huître creuse, ces régulations sont encore très peu connues. Afin de mieux connaître les processus physiologiques de régulation de notre modèle, des données génomiques ont été accumulées ces dernières années. Tout d'abord, de nombreuses banques d'ADNc (ADN complémentaire) de développement de l'huître ont été séquencées récemment, et les 40 845 EST (Expressed Sequence Tag) obtenues ont été contiguées, pour donner 29 745 séquences uniques présentes dans la banque (Fleury *et al.*, 2009). Des nouveaux séquençages ont été entrepris depuis, et la banque compte actuellement 82 312 séquences contiguées (« Gigas Database », disponible à partir du site [http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/index.html](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html)). A partir de ces séquences, partielles pour la plupart des gènes, il est ainsi possible de prédire de quel gène il s'agit, voire d'obtenir expérimentalement la séquence complète pour en confirmer l'annotation. Ces nouvelles données génomiques ont donc permis des avancées sur le plan moléculaire, et la découverte de nouveaux gènes, qu'il faut ensuite caractériser du point de vue physiologique.

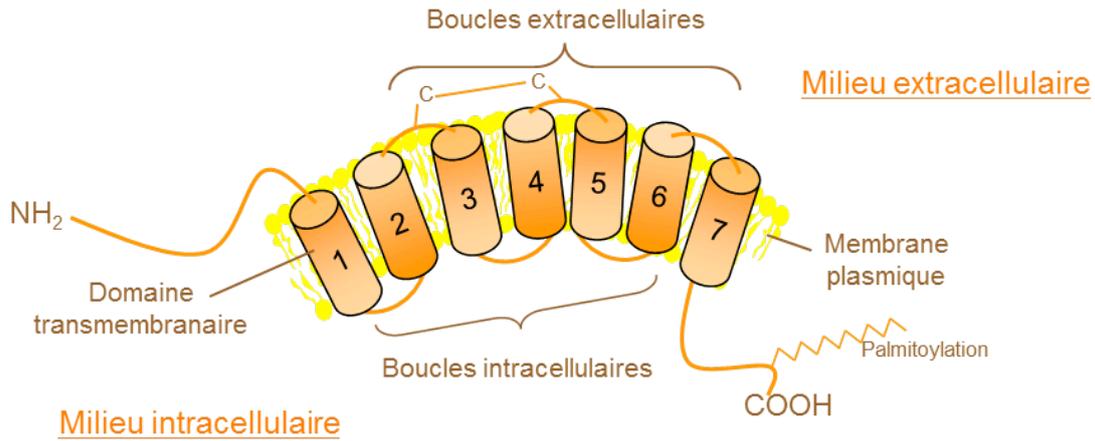
### ***3) Neuroendocrinologie des Invertébrés***

Chez les Invertébrés, comme chez les Vertébrés, la fonction de reproduction est contrôlée par des régulations (neuro)endocrines qui intègrent aussi bien les paramètres environnementaux que les paramètres physiologiques de l'individu. Ceci permet une régulation fine des différents processus de la reproduction, notamment de la gamétogenèse et de la ponte. Ce contrôle neuroendocrine est effectué par des neurohormones. Ces neurohormones sont généralement de nature peptidique, une des plus connues chez les Vertébrés étant la GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) qui contrôle l'axe hypothalamo-hypophysaire régulant la stéroïdogenèse et la gamétogenèse.

La plupart de ces neuropeptides ont la particularité de se lier à un même type de récepteur, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) autrement appelés récepteurs à 7 domaines transmembranaires, ou encore récepteurs « serpent-like ».

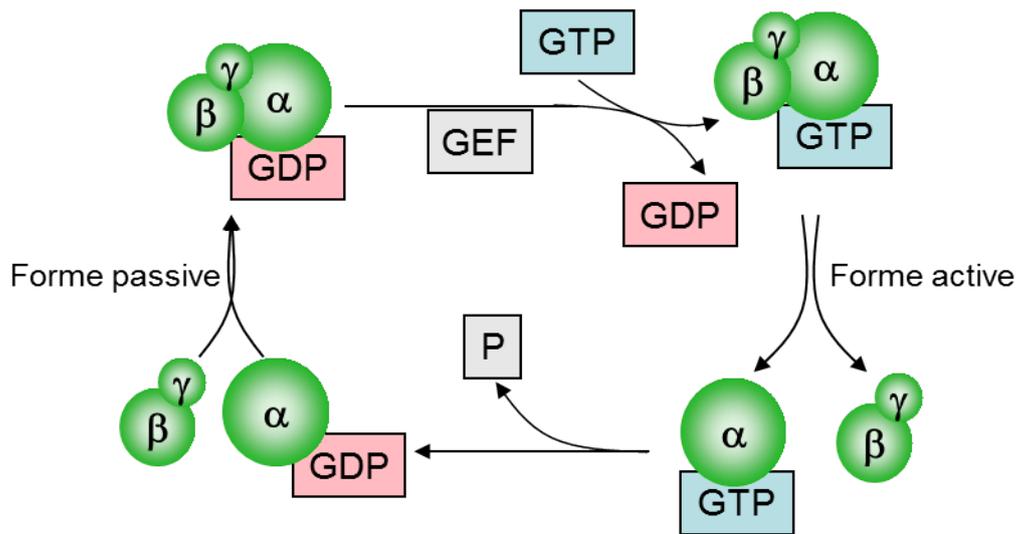
#### **A) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)**

Les RCPGs sont présents à la fois chez les Vertébrés et les Invertébrés, et ils constituent la plus grande catégorie de protéines codée par le génome animal (4% du génome codant chez l'Homme). Cette famille est également la cible thérapeutique de nombreuses molécules pharmacologiques, du fait de l'implication de ces récepteurs dans la régulation de la plupart des grandes fonctions physiologiques. Leurs ligands sont de nature très variée : peptides, amines biogènes, lipides, nucléotides, ions, molécules odorantes, lumière (Broeck, 2001), et il est estimé qu'environ 80% des hormones et neurotransmetteurs connus agissent via des RCPGs (Birnbaumer *et al.*, 1990). L'importance de cette famille se situe donc aussi bien sur le plan quantitatif que sur le plan fonctionnel. De plus, leur présence dans l'ensemble des eucaryotes (à la fois chez les protozoaires et les métazoaires) confirme le rôle primordial de cette superfamille de récepteurs. Ces récepteurs membranaires ont une structure bidimensionnelle très conservée : entre le domaine N-terminal extracellulaire et l'extrémité C-terminale intracellulaire, se situent 7 domaines transmembranaires composés d'environ 25-30 acides aminés relativement hydrophobes qui forment une hélice  $\alpha$  traversant la membrane plasmique de manière anti-horaire (figure 7).



**Figure 7 :** Schéma simplifié de la structure d'un récepteur couplé aux protéines G, possédant 7 segments transmembranaires séparés par 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires, pouvant être liées par un pont disulfure entre deux résidus cystéine (C-C). L'extrémité N-terminale (NH<sub>2</sub>) est extracellulaire et l'extrémité C-terminale (COOH) est intracellulaire, et peut subir des transformations post-traductionnelles telles que la palmitoylation.

Selon sa nature, le ligand peut se fixer à différents sites de ces récepteurs : au niveau du domaine N-terminal extracellulaire, aux premières boucles extracellulaires, ou encore sur les domaines transmembranaires. Les RCPGs permettent ainsi la transduction de signaux externes en réponse physiologique, via l'activation de protéines G hétérotrimériques. Ces protéines G sont composées de 3 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), et possèdent deux conformations possibles : la forme inactive, liée au GDP et une forme active liée au GTP (figure 8). Lorsque la protéine est liée au GTP, la sous-unité  $\alpha$ -GTP se dissocie du complexe  $\beta\gamma$ , et peut activer différentes voies de signalisation cellulaire, selon sa nature. Le GTP est ensuite hydrolysé en GDP, ce qui provoque la réassociation des 3 sous-unités, pour former la protéine G inactive. Lors de la liaison à un récepteur couplé aux protéines G, et grâce à une protéine appelée facteur d'échange de nucléotides guanydiliques (GEF), le GDP est relâché, pour permettre la fixation de GTP et l'activation de la protéine G (figure 8).



**Figure 8 :** Cycle d'activation/d'inactivation des protéines G hétérotrimériques. La forme active de la protéine G est liée au GTP (Guanosine TriPhosphate), ce qui provoque la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  et des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Le GTP est alors hydrolysé en GDP (Guanosine DiPhosphate) par perte d'un groupement phosphate, et les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  se réassocient pour former une protéine G inactive, liée au GDP. Grâce au facteur GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), cette protéine G va alors perdre son GDP pour fixer du GTP et permettre la réactivation de la protéine G.

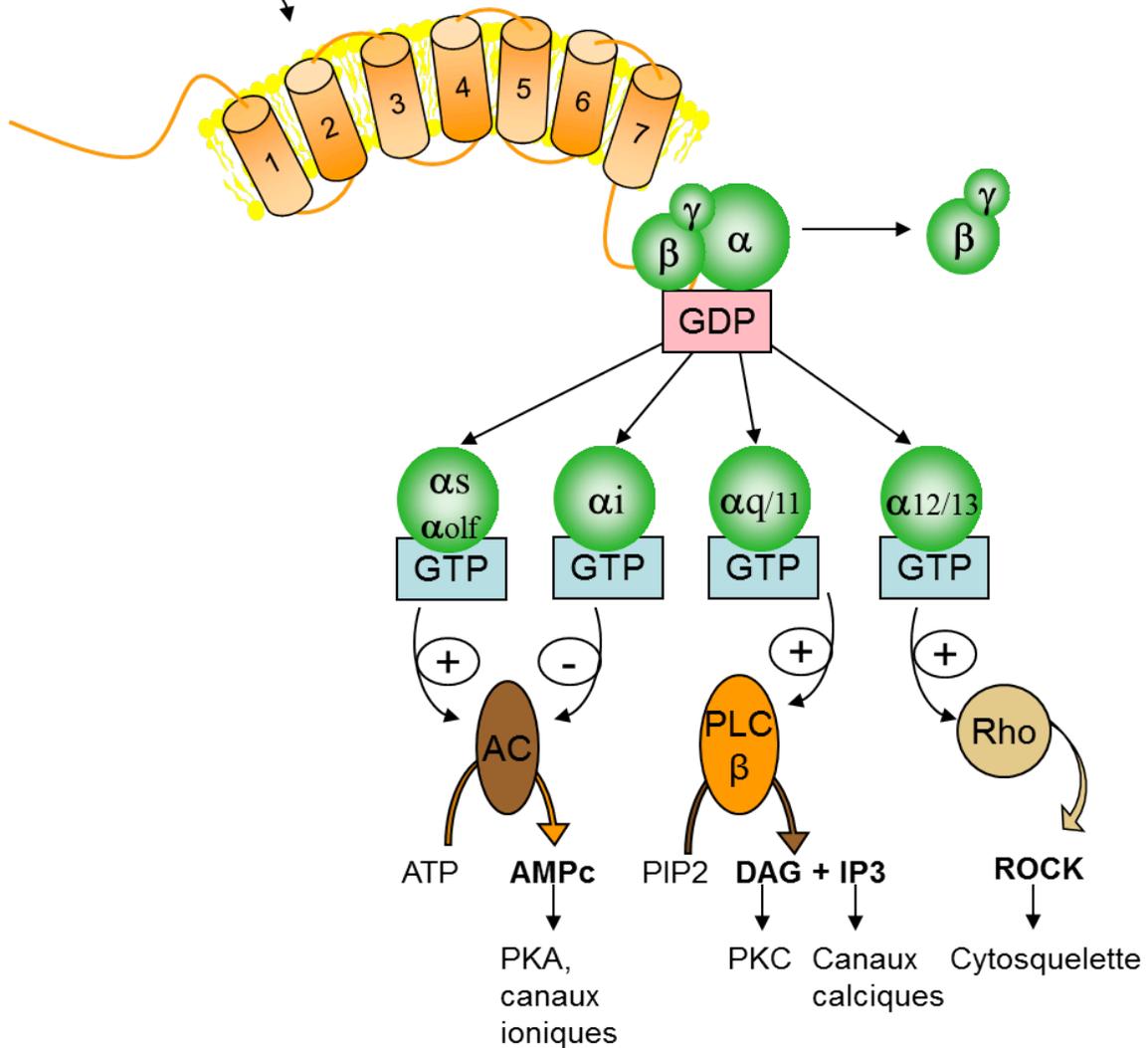
Les protéines G sont en effet classées selon la nature de leur sous-unité  $\alpha$ , qui détermine la voie cellulaire activée par cette protéine (figure 9). Il existe 6 types différents de sous-unité  $\alpha$ , donc de protéines G :

- **Gas**, qui activent l'adénylate cyclase, conduisant alors à la conversion d'ATP en AMP cyclique (AMPC), qui va activer la protéine kinase A (PKA) sérine/thréonine spécifique et modifier notamment l'activité de certains canaux ioniques.
- **Gai**, qui ont une action inverse sur l'adénylate cycle, diminuant ainsi la conversion de l'ATP en AMPC.
- **G $\alpha_{q/11}$** , qui activent la phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ), conduisant à l'hydrolyse du phosphatidyl 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). Le DAG active la protéine kinase C, alors que l'IP3 permet l'activation des canaux calciques IP3-dépendants du réticulum endoplasmique, entraînant alors la libération de calcium, et donc l'augmentation transitoire du taux de calcium intracellulaire. Ce calcium peut également conduire à l'activation de protéines kinases Ca<sup>2+</sup> dépendantes et de la calmoduline, impliquée notamment dans la glycogénolyse.

- ***Gα12/13***, activant de petites GTPases cytosoliques, les Rho. Elles contrôlent le remodelage du cytosquelette, via l'activation de kinases Rock, jouant ainsi un rôle important dans la motilité et les migrations cellulaires (Riento et Ridley, 2003).
- ***Golf***, qui sont associées aux récepteurs olfactifs et qui stimulent l'adénylate cyclase, tout comme les protéines *Gαs*.
- ***Gat***, ou transducine, qui sont des protéines G particulières, puisqu'elles sont activées uniquement par la rhodospine. Elles permettent l'activation de la phosphodiesterase, engendrant ainsi une baisse du taux de GMP cyclique, la fermeture de canaux sodiques GMPC-dépendants, et ainsi une hyperpolarisation de la membrane.

En parallèle de l'action de la sous-unité  $\alpha$ , le complexe  $\beta\gamma$  libéré lors de l'échange GDP-GTP est également capable d'activer d'autres messagers secondaires, ou de commander des canaux ioniques.

**Ligands** : Amines biogènes, acides aminés, ions, peptides, protéines, lipides, molécules odorantes, lumière, phéromones...



**Figure 9** : Schéma de la signalisation cellulaire induite par les différentes protéines G recrutées par des récepteurs couplés aux protéines G. Les protéines Gas et Gαolf activent l'adénylate cyclase (AC), alors que les protéines Gαi l'inhibent. L'AC conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA) et de canaux ioniques. Les protéines Gαq/11 conduisent à l'activation de la phospholipase C β (PLCβ) qui conduit à l'activation de la protéine kinase C (PKC) et à l'activation de canaux calciques IP3-dépendants. Les protéines Gα12/13 activent des Rho GTPases, qui activent les kinases Rock (Rho Kinase), qui ont pour cible l'actine et la tubuline, modifiant ainsi le cytosquelette.

Les récepteurs couplés à ces protéines G sont également classés selon des critères physiologiques et structuraux. Il existe 2 types de classification différents : la classification en 6 familles (de A à F) établie par Attwood et Findlay (1994) et Kolakowski (1994), et la classification GRAFS établie par Fredriksson *et al.* (2003). Selon la classification GRAFS, les RCPGs se répartissent en 5 groupes principaux : Glutamate, Rhodopsine, Adhésion,

Frizzled/Taste et Sécétrine (figure 10). Ces deux classifications se rejoignent pour la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, mais diffèrent principalement pour les groupes minoritaires de RCPGs.

- **La famille A ou famille Rhodopsine** est la plus vaste et la plus étudiée. Son nom de rhodopsin-like est dû au premier RCPG à avoir été cloné, la rhodopsine bovine (Nathans et Hogness, 1983). Ce récepteur est particulier, puisqu'il est composé d'une protéine à 7 domaines transmembranaires, l'opsine, associée à un groupement prosthétique, le rétinol, et est activé par un changement de conformation induit par des photons. Il est également le seul RCPG dont la structure tridimensionnelle ait été établie par cristallographie (Palczewski *et al.*, 2000). Cette famille inclut les récepteurs pouvant lier les amines biogènes, des peptides, des protéines, des molécules olfactives, des acides gras et des nucléotides. La longueur de ces récepteurs est très variable (de 290 à 951 acides aminés), bien que la plupart en possèdent entre 310 et 470 (Mirzadegan *et al.*, 2003). Leur structure primaire est faiblement conservée, mais ils présentent toutefois des caractéristiques qui prouvent qu'ils descendent bien d'un ancêtre commun : le motif NsxxNPxxY sur le 7<sup>ème</sup> domaine transmembranaire ainsi que le motif DRY au début de la deuxième boucle intracellulaire (Fredriksson *et al.*, 2003). Leur domaine N-terminal extracellulaire est en général plus court que pour les autres RCPG, c'est pourquoi les sites de liaison au ligand ne se situent pas sur cette extrémité pour la plupart de ces récepteurs, mais plus probablement sur des cavités entre les domaines transmembranaires (Schiöth et Fredriksson, 2005), voire sur les boucles extracellulaires, pour la plupart des récepteurs aux peptides (Gether, 2000 ; Kristiansen, 2004). Seules les hormones glycoprotéiques (LH, FSH, TSH, LG) se lient exclusivement sur ce domaine N-terminal, plus long que celui des autres récepteurs de type Rhodopsine, grâce à des motifs riches en leucine (Schiöth et Fredriksson, 2005). Ce groupe étant très étendu, une sous-classification basée sur des études phylogénétiques a été établie, elle comprend 4 sous-groupes principaux :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  (figure). Le groupe  $\alpha$  inclut les récepteurs aux amines, et quelques récepteurs aux peptides et aux prostaglandines. Les récepteurs  $\beta$  lient uniquement des peptides, le groupe des  $\gamma$  regroupe divers récepteurs, notamment aux peptides et neuropeptides (somatostatine, galanine, opioïdes...), alors que le groupe  $\delta$  englobe les récepteurs olfactifs et les récepteurs aux glycoprotéines (Fredriksson *et al.*, 2003).

- **Les récepteurs de type Sécétrine** peuvent lier des peptides comme la calcitonine, l'hormone parathyroïde, le peptide intestinal vasoactif et le glucagon. Leur domaine N-

terminal est spécifiquement long, environ 100 acides aminés, dont de nombreuses cystéines, ce qui suggère l'existence de ponts disulfures. Ils possèdent également quelques résidus conservés dans leurs domaines transmembranaires, et, tout comme les représentants de la famille A, ils présentent un pont disulfure entre les deuxième et troisième boucles extracellulaires (Gether, 2000). Ils ont un long site de liaison à l'hormone au niveau de la queue N-terminale extracellulaire, et la liaison du ligand impliquerait, en plus de ce domaine, les trois boucles extracellulaires ainsi que les domaines transmembranaires.

- **La famille Adhesion** a été séparée des récepteurs Sécétine par Fredriksson *et al.* (2003). Sous la classification de Kolakowski (1994), une partie des récepteurs de cette famille était liée aux récepteurs Sécétine sous le nom de famille B, mais des études ont montré des différences phylogénétiques avérées. Les récepteurs de type Adhesion possèdent un domaine N-terminal long et riche en résidus sérine et thréonine, ce qui suppose une forte glycosylation de ce domaine. Ce domaine présente plusieurs motifs fonctionnels également retrouvés dans les tyrosine-kinases, les intégrines et les cadhérines. Le domaine N-terminal est très bien conservé au sein des RCPGs de type Adhesion, contrairement à leurs segments transmembranaires qui présentent peu de conservation de séquence (Bjarnadottir *et al.*, 2004). Leurs gènes montrent une organisation complexe avec de nombreux introns et des épissages alternatifs (Bjarnadottir *et al.*, 2006).

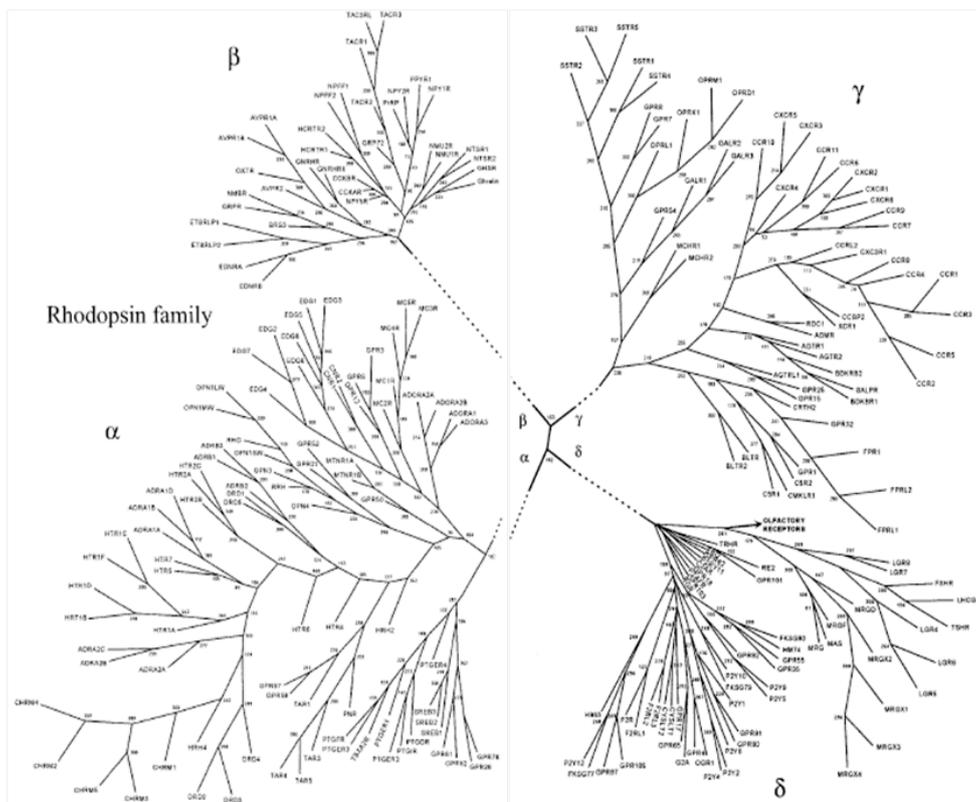
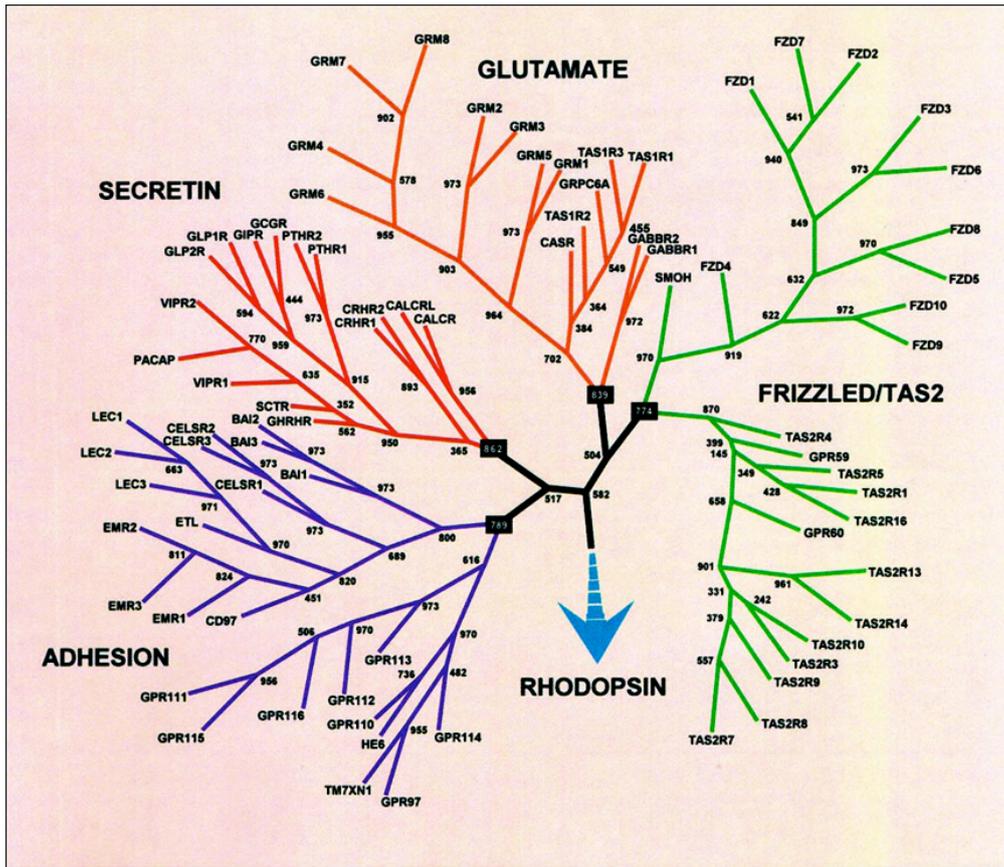
- **La famille des récepteurs de type glutamate**, ou famille C, regroupe les récepteurs aux neurotransmetteurs métabotropiques et aux phéromones. Elle inclut les récepteurs au glutamate, au GABA, au calcium, les récepteurs voméronasaux, gustatifs, et les récepteurs mammaliens aux phéromones. Ils possèdent tous un très long domaine extracellulaire, de 500 à 600 résidus, qui représente le site de liaison au ligand, et une troisième boucle intracellulaire très courte. Ils présentent également des acides aminés conservés, au niveau de certaines boucles ou certains domaines transmembranaires, ainsi qu'un pont disulfure entre les deuxième et troisième boucles extracellulaires, comme les familles A et B. Le long domaine extracellulaire possède une structure particulière, le « Venus flytrap module » (VFM), et la liaison au ligand se ferait donc dans le creux formé entre les deux lobes de ce VFM, entraînant alors un changement de conformation qui emprisonnerait le ligand et provoquerait une interaction entre le VFM et les boucles extracellulaires (Schiöth et Fredriksson, 2005).

- **La famille Frizzled** est une famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires dont le couplage aux protéines Gi/o n'a été prouvé que récemment (Koval *et al.*, 2011). Ils

jouent de nombreux rôles au cours du développement, mais également chez l'adulte, dans la polarité cellulaire ou la migration neuronale (Huang et Klein, 2004). Ces récepteurs lient les ligands glycoprotéiques de type Wnt. Ils possèdent également un long domaine N-terminal d'environ 200 acides aminés avec des cystéines conservées qui semblent jouer un rôle dans la liaison au ligand. Ce type de récepteur semble phylogénétiquement lié aux récepteurs « taste 2 » qui ont un rôle gustatif, c'est pourquoi ce groupe de récepteur a été nommé Frizzled/taste 2 (Schiöth et Fredriksson, 2005), bien qu'un doute subsiste sur leur éventuel ancêtre commun.

Les 3 autres familles du classement selon Kolakowski (D, E et F) représentent une minorité des RCPG, à savoir des récepteurs aux phéromones A et P, aux facteurs  $\alpha$  et M de Levure, et des récepteurs à l'AMPc.

Ces RCPGs constituent la plus grande catégorie de protéines codées par un génome animal, avec par exemple 6% du protéome du nématode *C. elegans* (Robertson, 2001), ce qui représente 1100 récepteurs, dont 1000 seraient des chémorécepteurs et 60 des récepteurs aux neuropeptides et neurotransmetteurs (Meeusen *et al.*, 2003, Keating *et al.*, 2003). La structure tertiaire de ces récepteurs a été élucidée grâce à la modélisation de la rhodopsine par résolution atomique, elle peut s'étendre à l'ensemble des récepteurs de la famille A. Les sept domaines transmembranaires forment sept hélices  $\alpha$  composées de 20 à 30 acides aminés hydrophobes et présentant des déviations locales liées à l'introduction de vrilles au niveau des résidus proline (Palczewski *et al.*, 2000, Filipek *et al.*, 2003), ces déviations sont probablement présentes sur de nombreux autres récepteurs possédant également des prolines à des positions conservées. Ces vrilles, et les orientations qu'elles induisent au niveau des segments transmembranaires, seraient responsables des différences fonctionnelles et pharmacologiques observées entre RCPGs (Visiers *et al.*, 2002). Ces segments sont organisés dans la membrane lipidique en une « botte » qui forme une poche hydrophile entourée de l'environnement hydrophobe de la membrane.



**Figure 10 :** Classification GRAFS des relations phylogénétiques entre les RCPGs du génome humain, du 1<sup>er</sup> au 7<sup>ème</sup> domaine transmembranaire. Ces arbres ont été construits par la méthode de parcimonie maximale. D'après Fredriksson *et al.*, 2003

L'activation d'un RCPG par son ligand induit non seulement le déclenchement de voies de signalisation mais aussi une régulation négative de l'activité du récepteur qui permet d'éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur. Cette régulation passe par la phosphorylation du récepteur sur les résidus sérine/thréonine de son extrémité C-terminale (Bouvier *et al.*, 1988; Hausdorff *et al.*, 1989; Lohse *et al.*, 1990), par les protéines kinases A ou C activées par les seconds messagers et les kinases spécifiques des RCPGs (G protein Receptor Kinases ou GRK). Elles permettent le découplage du récepteur de la protéine G, et le récepteur est alors internalisé par endocytose, grâce au recrutement de  $\beta$ -arrestine et de clathrine, puis dirigé soit vers des endosomes de recyclage, soit vers le compartiment lysosomal (Dery *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1996). Le récepteur reprend alors sa conformation de repos, est déphosphorylé par des phosphatases et recyclé à la membrane plasmique : on parle de resensibilisation (Oakley *et al.*, 2000). En revanche, d'autres récepteurs sont dirigés vers les lysosomes où ils sont dégradés par des protéases après internalisation (Trejo and Coughlin, 1999), certains sont également dégradés par le protéasome après ubiquitination, comme les récepteurs  $\beta$ 2 adrénergiques (Shenoy *et al.*, 2001). Ce mécanisme favoriserait une transmission extrêmement transitoire du signal cellulaire.

Ainsi, les récepteurs couplés aux protéines G représentent la plus grande famille de protéines codées par le génome des Vertébrés, ce qui souligne son importance à la fois évolutive et fonctionnelle. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, notamment dans la reproduction et les fonctions qui lui sont associées, puisque ce sont les principaux récepteurs de (neuro)hormones.

En effet, la reproduction, ainsi que la mise en réserve énergétique qui lui est corrélée, sont régulées essentiellement par des hormones, dont certaines sont produites par le système nerveux et appelées neurohormones. Ces régulations peuvent se faire à un niveau local (régulations paracrines) ou via la dissémination de ces hormones dans l'organisme (régulations endocrines) par le système circulatoire.

## B) Régulation endocrine de la reproduction et du métabolisme énergétique

Les (neuro)hormones sont responsables chez toutes les espèces animales en grande partie de la régulation de la gamétogenèse, et d'autres phénomènes liés à la reproduction, tels que la ponte, le comportement copulateur, mais également la gestion des réserves

énergétiques. En effet, comme supposé pour l'huître creuse, le métabolisme énergétique et la reproduction sont deux fonctions intimement liées ; sachant que la reproduction dans son ensemble nécessite de forts apports en énergie, de fines régulations sont nécessaires pour chacune de ces fonctions, mais aussi entre les tissus de réserve et les tissus gamétogènes. Il existe ainsi différents niveaux de régulation, pouvant influencer sur la reproduction et/ou le métabolisme énergétique.

### 1. La régulation paracrine

#### La voie des TGF $\beta$ :

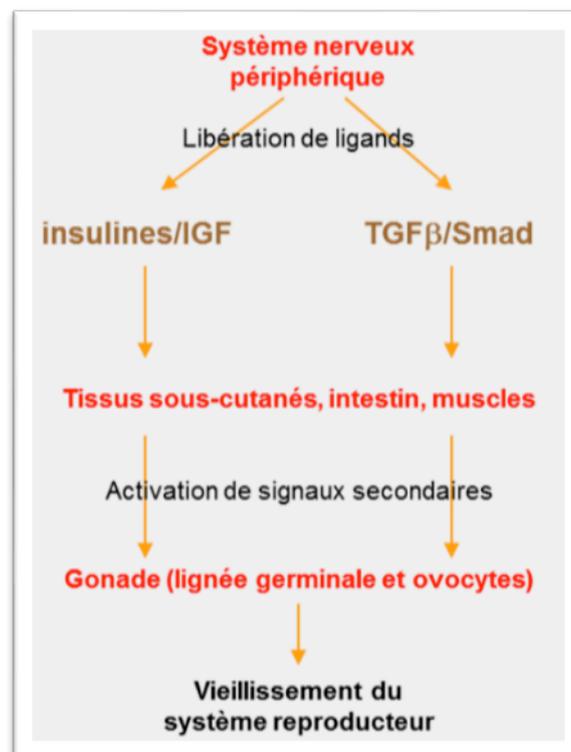
Les facteurs paracrines qui sont capables de réguler la reproduction appartiennent pour la plupart à la famille des TGF $\beta$ . Les TGF $\beta$ , ou Transforming Growth Factor  $\beta$ , représentent une superfamille bien connue pour son rôle dans le développement, la reproduction, les réponses immunitaires ou encore la neurogenèse.

Cette superfamille regroupe plusieurs types de ligands différentes : le TGF $\beta$  *sensu stricto*, les activines et le BMP, Bone Morphogenetic Protein (Heldin *et al.*, 1997). Ces ligands sont des protéines secrétées qui se dimérisent, sous forme d'homodimères le plus souvent, pour former la protéine active. Leurs récepteurs sont divisés en deux types (type I et type II), ils possèdent un domaine à activité sérine/thréonine kinase (ten Dijke *et al.*, 1996). Ces récepteurs, après fixation du ligand, activent des effecteurs intracellulaires, les Smads. Les Smads sont recrutés par les récepteurs de type I, et peuvent être classés en trois familles différentes : les Smad récepteurs, les Smad communs (facteurs de transcription) et les Smads inhibiteurs, qui inhibent les voies de signalisation TGF $\beta$  (Herpin *et al.*, 2004, pour revue).

La famille des TGF $\beta$  est présente dans l'ensemble du règne animal, depuis les spongiaires jusqu'aux bilatériens, et montre un fort degré de conservation structurale, mais surtout fonctionnelle. Ces fonctions passent généralement par la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires par les facteurs de la famille des TGF $\beta$ . Ces rôles sont donc conservés chez les Invertébrés :

- **Chez *C. elegans***, il existe deux voies des TGF $\beta$  : la TGF $\beta$  Dauer et la TGF $\beta$  Sma/Mab. La première régule la longévité via la voie des insulines mais a peu d'effet sur la durée de reproduction (Luo *et al.*, 2009), elle doit son nom au stade de diapause que peuvent

emprunter les larves de *C. elegans*, appelé « dauer ». Ce stade correspond à une quiescence, pendant laquelle la larve va développer des processus de survie à long terme, en diminuant son métabolisme et en favorisant le stockage énergétique. La prolifération des cellules germinales est également inhibée durant cette phase (Narbonne et Roy, 2006). La formation de larves dauer serait contrôlée par 3 voies parallèles : les TGF $\beta$ , les «insulin-like » et la voie du GMP cyclique (Narbonne et Roy, 2006). En revanche, les mutants pour la seconde voie montrent une période de reproduction très surélevée (parfois plus que doublée), indépendamment de la durée de vie et des régulateurs connus de ces voies (signalisation insuline). Ces TGF $\beta$  agissent notamment dans le vieillissement reproducteur, en régulant la maintenance et la qualité des ovocytes et des lignées germinales (figure 11). D'après Luo *et al.* (2010), les voies des TGF $\beta$ , et de l'insuline, permettent de moduler divers aspects de la reproduction comme l'intégrité de l'embryon, la qualité des ovocytes, la ségrégation chromosomale, la résistance aux dommages de l'ADN, et la morphologie des ovocytes et des cellules germinales. Les TGF $\beta$  plus particulièrement seraient impliqués dans la durée de la reproduction et la qualité des gamètes. De plus, il a été montré que les gènes de réponse aux dommages de l'ADN, le cycle cellulaire et la ségrégation des chromosomes étaient accrus dans des ovocytes mutants pour le TGF $\beta$  (Luo *et al.*, 2010).



**Figure 11** : Régulation neuroendocrinienne du vieillissement du système reproducteur chez *C. elegans*, par les voies des TGF $\beta$  et de l'insuline. D'après Luo *et al.*, 2010.

- **Chez la drosophile *D. melanogaster***, deux gènes apparentés à la BMP, *dpp* et *gbb*, sont exprimées dans les cellules somatiques proches des cellules souches germinales. Dans l’ovaire et le testis, la voie Dpp/Gpp agit via la signalisation BMP pour inhiber les gènes responsables de la différenciation des cellules souches germinales, et ainsi les maintenir en état d’auto-renouvellement (Xie, 2008). Cette signalisation BMP est nécessaire et suffisante pour contrôler l’auto-renouvellement des CSG de l’ovaire, alors que sa surexpression ne permet pas d’inhiber complètement la différenciation des CSG dans le testis (Schulz *et al.*, 2004).

- La caractérisation de la voie des TGF $\beta$  **chez *C. gigas*** a été entreprise depuis quelques années : un ligand proche des BMP, un apparenté au TGF $\beta$ , un autre proche de DPP, ainsi qu’un ligand plus divergent TGF $\beta$  -like ont été identifiés (Lelong *et al.*, 2000 ; Lelong *et al.*, 2007 ; Fleury *et al.*, 2008). Des protéines de type BMP, activine et TGF $\beta$  ont également été identifiées, chez *C. gigas*, ce qui suggère que la superfamille des TGF $\beta$  représenterait la plus ancienne famille de cytokines, à la fois chez les Vertébrés et les non-vertébrés (Herpin *et al.*, 2004). De même, quelques effecteurs de type Smad ont été mis en évidence. Dans le contexte des mortalités estivales mises en évidence chez l’huître creuse, des études de profils d’expression du génome ont permis de sélectionner deux lignées différentes : les lignées R (résistante aux mortalités) et S (sensible aux mortalités). Parmi les 34 ESTs différenciellement exprimés dans ces lignées, un gène correspondant au TGF $\beta$  gonadique (og-TGF $\beta$ ) a été identifié (Fleury *et al.*, 2008). Ce TGF $\beta$  est le seul membre de la super famille à montrer une expression exclusivement gonadique chez *C. gigas*. De plus, cette expression varie au cours du cycle de reproduction : og-TGF $\beta$  est peu exprimé au début du cycle, chez les mâles comme chez les femelles, et montre une expression maximale en fin de gamétogenèse, et des études d’hybridation *in situ* ont montré la présence du transcrit dans les cellules somatiques entourant les ovocytes et les spermatocytes. Ce ligand TGF $\beta$  pourrait donc jouer un rôle dans la prolifération et/ou la maturation des cellules germinales, au cours de la gamétogenèse (Fleury *et al.*, 2008). Ainsi, des études fonctionnelles ont été menées sur ce ligand par Corporeau *et al.* (2011), et il a été montré que l’injection d’un anticorps anti-TGF $\beta$  dans l’aire gonadique des huîtres entraîne une diminution de l’effort de reproduction, mise en évidence par la diminution du pourcentage de surface occupée par l’aire gonadique chez les animaux injectés. Les composants de la voie de signalisation TGF $\beta$  semblent donc conservés chez les Lophotrochozoaires, ainsi que leur rôle sur la prolifération et la différenciation cellulaires, et leur implication dans les processus de reproduction. Pour confirmer ce rôle fonctionnel, des

expériences d'ARN interférence (RNAi) ont été menées afin d'inhiber l'expression du gène codant le ligand TGF $\beta$  chez *C. gigas*. Cette inhibition conduit à une baisse de prolifération des cellules germinales ainsi qu'une diminution de la vitellogenèse chez les femelles, confirmant le rôle activateur du TGF $\beta$  sur la reproduction, et plus particulièrement sur la gamétogenèse (Huvet *et al.*, 2011).

## 2. La régulation endocrine

### Les stéroïdes et ecdystéroïdes :

Chez les Vertébrés, les stéroïdes sont bien connus pour leur rôle régulateur sur les processus liés à la reproduction. En effet, les stéroïdes sexuels sont des facteurs clés dans la gamétogenèse, mais également dans la différenciation phénotypique des sexes. Ils sont classés en différentes familles : les corticoïdes (impliqués principalement dans les processus inflammatoires), les androgènes, oestrogènes et progestogènes (impliqués dans la reproduction).

Chez les Arthropodes, on retrouve des hormones stéroïdiennes appelées ecdystéroïdes. Ces hormones sont également appelées hormones de mue, puisqu'elles sont impliquées, avec les hormones juvéniles, dans la mue et la métamorphose des Arthropodes. Elles sont produites par les glandes prothoraciques des insectes et par les organes Y des Crustacés. Chez les insectes, il a été clairement établi que ces hormones contrôlent la reproduction chez les femelles, puisque la vitellogenèse dépend du taux d'ecdystéroïdes, alors que chez les Crustacés, ces mêmes fonctions demeurent hypothétiques. Le mode d'action des ecdystéroïdes dans les processus de développement et de reproduction est relativement bien connu chez les insectes et se réalise principalement par le biais de récepteurs nucléaires qui se fixent sur des domaines HRE (Hormone Response Element) de l'ADN pour réguler rapidement une cascade de gènes cibles. Chez les insectes, la forme la plus active des ecdystéroïdes est la 20-hydroxyecdysone ou 20E, dont le récepteur nucléaire, EcR, interagit avec un récepteur partenaire, Ultraspiracle (USP) (Billas et Moras, 2005). Chez les mollusques et les annélides, aucune preuve tangible de biosynthèse d'ecdystéroïdes n'existe ; bien que ces hormones aient été détectées chez quelques espèces, elles pourraient provenir de la nourriture et non d'une synthèse *de novo*, puisqu'aucune enzyme responsable de leur biosynthèse n'a été identifiée (Lafont et Mathieu, 2007, pour revue). Des homologues de

récepteurs à l'ecdysone sont codés par le génome de certains mollusques, comme *Lottia gigantea* et *Aplysia californica*, mais également chez les sangsues *H. robusta* et *H. medicinalis*, ainsi que pour le ver polychète *C. teleta* (Laguerre and Veenstra, 2010). La fonctionnalité de ces récepteurs et la nature des ligands qu'ils lient n'ont cependant pas été mises en évidence.

Des hormones stéroïdes sexuelles proches de celles de Vertébrés ont été identifiées dans la plupart des phyla d'Invertébrés, dont les mollusques. On y retrouve de la testostérone, des androgènes et des oestrogènes (Janer et Porte, 2007, pour revue), ainsi que la plupart des enzymes nécessaires à leur biosynthèse, pour les mollusques et les échinodermes (Lafont et Mathieu, 2007). Chez les bivalves, des oestrogènes ont été identifiés chez les deux espèces de moules *Mytilus galloprovincialis* (Morcillo *et al.*, 1999) et *Mytilus edulis* (Reis-Henriques *et al.*, 1990). Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des travaux plus anciens avaient déjà montré que la 17 $\beta$ -oestradiol pouvait provoquer l'induction de la maturation gonadique des individus femelles, ainsi qu'une réversion sexuelle des mâles en femelles (Mori *et al.*, 1969). L'oestradiol-17 $\beta$  (ou E2) a ensuite été détecté dans les ovaires, et son taux augmente au cours de la gamétogenèse, ce qui suggérerait un rôle des stéroïdes dans les événements reproducteurs (Matsumoto *et al.*, 1997). Un traitement par l'E2 *in vivo*, ou sur des cultures de tissu ovarien est capable de stimuler la vitellogenèse chez les huîtres femelles (Li *et al.*, 1998), démontrant la fonctionnalité de cette hormone stéroïde. De plus, une activité aromatase de type 17- $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase a également été mise en évidence chez cette espèce, ainsi que la présence de plusieurs androgènes différents : estrone, oestradiol, testostérone et androsténédione (Le Curieux-Belfond *et al.*, 2001). Enfin, un récepteur apparenté aux récepteurs à l'oestradiol a été cloné chez *C. gigas*, il semble être un vrai orthologue des récepteurs de l'E2 de mollusques (Matsumoto *et al.*, 2007). Il est exprimé dans divers tissus, dont l'aire gonadique, mais ne semble cependant pas répondre à l'oestradiol.

### **La famille des insulín-like :**

L'insuline est une hormone peptidique sécrétée chez les Vertébrés par les cellules  $\beta$  du pancréas. Elle a un rôle majeur dans la régulation des substrats énergétiques, et plus particulièrement du glucose et des acides gras. Chez les Mammifères, notamment chez l'Homme, elle est principalement connue pour son effet hypoglycémiant, particulièrement lors d'un fort apport énergétique, comme après un repas.

La superfamille des insulin-like regroupe à la fois les ligands de type insuline, les ligands IGF (Insulin-like Growth Factor) et les relaxines. Les ligands insuline et IGF lient des récepteurs membranaires de type tyrosine kinase, alors que les récepteurs à la relaxine appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Chez les Vertébrés, on retrouve des récepteurs distincts pour les IGF et les insulines, ce qui n'est pas le cas chez les Invertébrés.

Les relaxines présentent la même structure en 3 domaines du pré-pro-polypeptide, aboutissant après clivage à un peptide mature et circulant en 2 domaines reliés par des ponts disulfures (Ivell *et al.*, 2011, Chan *et al.*, 2011). Elles ont été mises en évidence chez les Vertébrés, il en existe chez l'Homme 7 familles différentes : relaxines 1 à 3, et peptides « insulin-like » 3, 4, 5 et 6, mais jusqu'à maintenant, aucune « vraie » relaxine n'a été isolée chez les Invertébrés, bien que des homologues de récepteurs à la relaxine aient été identifiés (Wilkinson *et al.*, 2005 ; Wilkinson et Bathgate, 2007). Ces peptides jouent un rôle primordial dans la reproduction chez les mammifères, notamment en régulant la fonction utérine pendant la grossesse (Ivell and Einspanier, 2002), mais également par son rôle anti-apoptotique sur les cellules germinales de l'appareil génital mâle (Ivell *et al.*, 2011). Dernièrement, des peptides apparentés à ces relaxines ont été mis en évidence chez certains Invertébrés, notamment chez le tunicier *C. intestinalis* (Olinski *et al.*, 2006 ; Kawada *et al.*, 2010). Chez l'étoile de mer *Asterina pectinifera*, une hormone peptidique appelée GSS (Gonad-stimulating substance) responsable de la maturation des gamètes et de l'ovulation a également été identifiée comme un peptide « relaxin-like », de par sa structure, sa séquence et sa fonction (Mita *et al.*, 2009). Chez la drosophile, 7 familles de peptides apparentés aux insulines (DILP) ont été identifiées, et l'une d'elle (DILP-7) semble être un homologue des relaxines de Vertébrés : en effet, les neurones *ILP-7* de Drosophile innervent le tractus génital femelle et sont impliqués dans la régulation de la ponte (Yang *et al.*, 2008, Grönke *et al.*, 2010).

Les « insulin-like » sont largement répandus dans le règne animal, chez les protostomiens comme les deutérostomiens. Chez les Vertébrés, il existe dans cette famille un ligand insuline se liant à un unique récepteur pour chaque espèce, alors que les Invertébrés présentent plusieurs ligands de ce type pour un seul récepteur. La fixation de ces ligands au récepteur entraîne l'activation de 2 voies de signalisation cellulaire possibles : la voie des MAP kinases, responsable des effets prolifératifs, ou la voie de la PI3K, responsable des effets métaboliques.

Chez les Crustacés, une hormone de type « insulin-like » a été mise en évidence, elle est sécrétée par la glande androgénique, et sa fonctionnalité a été étudiée grâce à des expériences d'interférence d'ARN (Ventura *et al.*, 2011, pour revue). Ces études ont démontré l'implication de cette « insulin-like » dans la différenciation sexuelle chez les mâles, mais également dans le changement de sexe, puisque l'inhibition de l'expression de ce gène engendre non seulement une régression de l'appareil génital mâle et de la spermatogenèse, mais également une stimulation de la vitellogenèse (Rosen *et al.*, 2010). Cette inhibition provoquée peut même engendrer une réversion des caractères sexuels extérieurs de mâle en femelle chez certaines espèces (Ventura *et al.*, 2011).

Chez l'huître creuse, plusieurs éléments de la voie des insulin-like ont été identifiés : un premier ligand de type ILP (Insulin-Like Peptide) a été mis en évidence par Hamano *et al.* (2005), il présente une séquence conservée avec les autres MIP (Molluscan Insulin-like Peptide) et est exprimé un groupe de neurones restreint dans les ganglions viscéraux, avec une augmentation du nombre de transcrits au cours du cycle annuel. Un récepteur CIR (*Crassostrea* Insulin-related peptide Receptor) a également été identifié par Gricourt *et al.* (2003), et plusieurs facteurs de la voie de signalisation (Ras, Pten, et p70S6K) mis en évidence par (Jouaux, 2010). Ce récepteur CIR et le facteur CgRas sont impliqués dans la reconstruction du tissu de réserve et dans la vitellogenèse. De plus, ce système insuline semble impliqué dans l'intégration des paramètres environnementaux, puisque la privation de nourriture induit une augmentation de l'expression du récepteur et des effecteurs de la voie insuline (Jouaux, 2010), comme démontré chez *D. melanogaster* ou *C. elegans* (Baumeister *et al.*, 2006).

### 3. La régulation neuroendocrine

#### Les neuropeptides de la famille des RFamides

##### - Le FMRFamide et ses peptides apparentés :

La famille des RFamides regroupe de nombreux neuropeptides, dont la caractéristique commune est de posséder en partie C-terminale le motif RFamide dans leur séquence protéique. Un premier RFamide, le FMRFamide, a été découvert en premier lieu dans le système nerveux du mollusque bivalve *Macrocallista nimbosa*, en tant que peptide

cardioexcitateur (Price et Greenberg, 1977). De manière générale, de nombreux RFamides ont une extrémité C-ter qui présente le motif FMRFamide ou un motif approchant, on les appelle alors FaRP (FMRFamide Related Peptides). Les FaRPs ont tout d'abord été caractérisés chez des espèces de mollusques, avant d'être identifiés chez l'ensemble des Invertébrés, puis chez un premier vertébré (Dockray *et al.*, 1983). Les précurseurs de ces peptides présentent une structure conservée, avec un peptide signal, puis une séquence codant pour plusieurs FaRPs différents, séparés par des sites de clivage di- ou tribasiques, comme chez l'Aplysie ou la Limnée (Schaefer *et al.*, 1985 ; Linacre *et al.*, 1990). Chez la moule *Mytilus edulis*, un ADNc de précurseur de type FMRFamide a été cloné, il code pour un NFLRFamide, un FLRFamide, un décapeptide ALAGDHFFRFamide, et 16 copies de FMRFamide (Favrel *et al.*, 1998). Il présente, comme tous les précurseurs de ce type, de courtes séquences acides entre les différents FMRFamides, et est exprimé dans les 3 différents types de ganglions du système nerveux de ce modèle (ganglions cérébroïdes, pédieux et viscéraux).

Chez la limnée *L. stagnalis*, des peptides apparentés au FMRFamide ont été détectés dans le pénis et provoquent des contractions très rapides des muscles rétracteurs du pénis (van Golen *et al.*, 1995). Chez le Criquet, les peptides de type FLRFamide, produits par le même précurseur que le FMRFamide, jouent un rôle de myosuppresseurs, en inhibant les contractions spontanées du cœur et de l'oviducte (Clynen et Schoofs, 2009).

Ces FMRFamides et peptides associés sont fortement impliqués dans la régulation du comportement alimentaire et/ou du métabolisme énergétique chez les Vertébrés, et régulent également la balance énergétique chez les Protostomiens (Bechtold et Luckman, 2007).

D'après Henry *et al.* (1999), chez la seiche *S. officinalis*, le FMRFamide et le FLRFamide, deux peptides appartenant à la famille des FaRPs, seraient capables d'augmenter le tonus, la fréquence et l'amplitude des contractions musculaires de l'oviducte, alors que les FIRFamide et ALSGDAFLRFamide diminuent ces caractéristiques de contractions. De plus, des peptides apparentés au FMRFamide ont été détectés par immunocytochimie dans les lobes optiques et dans les tissus musculaires et conjonctifs entourant les glandes sexuelles accessoires. Enfin, ces peptides seraient capables de moduler les contractions de la glande nidamentale principale, et donc de modifier le processus de revêtement des ovocytes. Ils seraient également impliqués dans la libération dans le lumen des sécrétions des glandes sexuelles accessoires. Ainsi, chez la seiche, les FaRPs sont impliqués dans la régulation des mécanismes physiologiques liés à la ponte. La régulation en parallèle de l'activité des glandes

nidamentales et de l'oviducte suggère une synchronisation probable entre l'ovulation et l'encapsulation de l'ovocyte. L'activité cyclique de l'oviducte est donc régulée par un cocktail de neuropeptides.

- Les autres peptides de type RFamide :

Les RFamides sont répartis dans l'ensemble du règne animal et sont associés à de nombreuses fonctions physiologiques, dont le comportement alimentaire et la reproduction.

Chez les Vertébrés, deux représentants de cette famille sont essentiellement impliqués dans la régulation de la reproduction : la kisspeptine et la GnIH (Gonadotropin Inhibitory Hormone). En effet, la kisspeptine joue un rôle stimulateur sur la reproduction, en activant directement les neurones à GnRH, alors que la GnIH les réprime (Kriegsfeld, 2006).

D'autres RFamides sont connus pour jouer un rôle sur la prise alimentaire, comme le neuropeptide F (ou NPF), qui est l'homologue du NPY de Vertébrés, un stimulant de l'appétit. De manière intéressante, ce NPY/F est également connu pour avoir un rôle répressif sur le comportement de reproduction chez beaucoup d'espèces de Vertébrés et d'Invertébrés. Un peptide très proche de celui-ci, le neuropeptide FF (ou NPPF), injecté sur des rats, inhibe la prise alimentaire, certainement par son interaction avec la voie des opioïdes (Dockray, 2004, pour revue). Une autre sous-famille de RFamides influe sur le comportement alimentaire, il s'agit des PrRP (Prolactin Releasing Peptides), qui inhibent la prise de nourriture et le métabolisme énergétique chez les Vertébrés (Lawrence *et al.*, 2000 ; Takayanagi et Onaka, 2010).

### **La famille de la GnRH :**

La GnRH est une hormone clé dans la régulation de la reproduction, elle agit chez les Vertébrés sur l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade, en stimulant la sécrétion de LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle Stimulating Hormone), ce qui va avoir un effet positif sur la gamétogenèse et la production des stéroïdes sexuels.

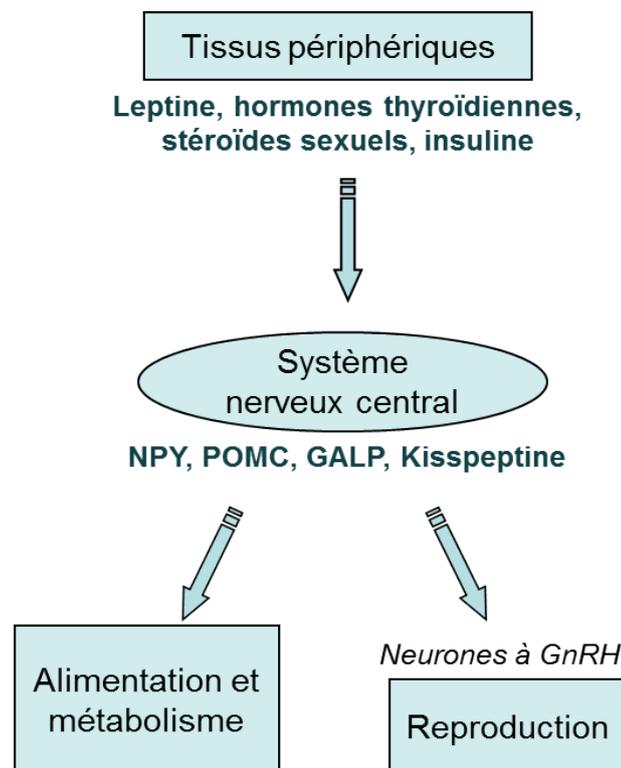
Un peptide apparenté à la GnRH ainsi que son précurseur ont été identifiés chez le poulpe *O. vulgaris* (Iwakoshi *et al.*, 2002). Des précurseurs de peptides apparentés à la GnRH de Vertébrés ont été mis en évidence également chez l'Aplysie (Zhang *et al.*, 2008) et le céphalopode *Loligo edulis* (Onitsuka *et al.*, 2009). Chez les non-vertébrés, la GnRH peut

également moduler la reproduction et les processus physiologiques qui lui sont liés, en provoquant la ponte (Young *et al.*, 1997) ou la libération de stéroïdes sexuels (Di Fiore *et al.*, 2000). Toutefois, la GnRH semble n'être présente chez les protostomiens qu'au niveau des Lophotrochozoaires ; en effet, aucun peptide semblable n'a été identifié chez les Ecdysozoaires. Cependant, des récepteurs proches des récepteurs à la GnRH y ont été identifiés, et ils lient l'AKH (Adipokinetic Hormone) de manière spécifique (Staubli *et al.*, 2002). Compte tenu de leur liaison à ces récepteurs, les AKHs sont considérées comme des peptides apparentés à la GnRH, ce qui illustre la divergence des peptides homologues entre Lophotrochozoaires et Ecdysozoaires. Chez les Insectes, les AKHs sont impliquées dans la mobilisation des réserves énergétiques, notamment lipidiques, en cas d'effort soutenu, particulièrement lors du vol (Veenstra *et al.*, 2009). Chez les Crustacés, on retrouve une autre famille de peptides, comparable par leur structure et leur fonction à l'AKH, ce sont les RCPH (Red Pigment-Concentrating Hormone) (Gade *et al.*, 2009). De plus, certains récepteurs activés par l'AKH répondent également à un autre peptide, la corazonine (Park *et al.*, 2002), qui est un neuropeptide spécifique des insectes et des crustacés. Les récepteurs à l'AKH et les récepteurs à la corazonine seraient ainsi issus d'un même ancêtre commun, rassemblant ces deux familles de peptides dans la superfamille de la GnRH (Kaufmann *et al.*, 2009 ; Roch *et al.*, 2011). Les AKHs ont été identifiées jusqu'à présent uniquement chez les Arthropodes, mais chez les Lophotrochozoaires, on retrouve des tétrapeptides très proches de leur partie C-terminale, les APGWamides. L'APGWamide a été identifié en premier chez le mollusque prosobranche *Fusinus ferrugineus* (Kuroki *et al.* 1990), puis plusieurs précurseurs ont été mis en évidence chez les mollusques suivants : la Limnée (Smit *et al.*, 1992), la Moule (Favrel *et al.*, 1996) et l'Aplysie (Fan *et al.*, 1997). Ces peptides auraient également un rôle dans le comportement de reproduction, notamment chez la Limnée (Li *et al.*, 1992).

### **Le cas particulier de la leptine :**

Chez les Vertébrés, la leptine est une hormone dérivée des adipocytes, qui agit sur l'alimentation, la thermogenèse, le métabolisme du glucose et des lipides, ainsi que sur l'activité physique (Crown *et al.*, 2007). Elle ne fait donc pas partie de la famille des neurohormones, ou neuropeptides, mais intervient dans les voies de signalisation de nombreux neuropeptides. Elle diminue la prise alimentaire en se fixant au niveau de l'hypothalamus, elle contrôle la libération de plusieurs neuropeptides : elle inhibe la sécrétion

de NPY et stimule l'expression de la propiomélanocortine (POMC). Elle est capable de diminuer également la sécrétion d'insuline, d'induire une lipolyse, tout en inhibant la lipogenèse et la néoglucogenèse. Mais cette leptine a également un rôle régulateur sur le système reproducteur, puisqu'elle est considérée comme un signal métabolique pour la puberté (Cheung *et al.*, 2000), et elle augmente la sécrétion de LH et FSH chez les animaux sous-alimentés à long terme (Henry *et al.*, 2001). La leptine semble être, chez les Vertébrés, le signal métabolique primaire et fait partie de la boucle de régulation tissu adipeux/hypothalamus de l'appétit, l'homéostasie énergétique et la sécrétion de LH (Luteinizing Hormone). De plus, une absence de leptine ou de son récepteur empêche une maturation sexuelle normale, et l'administration de leptine stimule la sécrétion de GnRH. L'organisme interpréterait donc le taux de leptine circulante comme un indicateur de l'état métabolique, qui contrôlerait l'activité de l'axe reproducteur. Ses effets sur l'axe GnRH/LH sont médiés par le NPY et la kisspeptine (figure 12). Ainsi, la leptine apparaît comme un lien important entre l'état métabolique et l'axe neuroendocrine de régulation de la reproduction pour les Vertébrés (Barb *et al.*, 2008).



**Figure 12 :** Intégration des signaux métaboliques permettant de réguler la reproduction, qui n'a lieu seulement que lorsque l'état métabolique de l'organisme est favorable, chez les Vertébrés. Les neurones à neuropeptides (NPY, POMC, GALP, Kisspeptine) sont la cible des hormones métaboliques telles que la leptine, les hormones thyroïdiennes, les stéroïdes et l'insuline, et régulent l'alimentation, le métabolisme et la reproduction. NPY = neuropeptide Y, POMC = propiomélanocortine, GALP = galanine-like peptide. D'après Crown *et al.*, 2007.

Chez les non-vertébrés, l'existence d'un peptide apparenté à la leptine, le *Lymnaea Storage Feedback Factor* (LySFF), a été proposée chez la Limnée, il serait produit par les cellules de stockage de glycogène et inhiberait de manière significative la consommation de nourriture chez *L. stagnalis* (De Jong-Brink *et al.*, 2001). Il est supposé que les neurones à NPY chez cette espèce pourraient exprimer le récepteur au LySFF, ce qui entra

inerait une régulation de l'activité de ces neurones en fonction de la quantité d'énergie stockée. Toutefois, à ce jour, aucun peptide homologue à la leptine n'a été isolé chez la Limnée ou aucun autre invertébré, bien qu'un récepteur apparenté aux récepteurs de leptine ait été identifié chez le crabe chinois *Eriocheir sinensis* (Jiang *et al.*, 2010). Ce récepteur présente de fortes homologues de séquence avec les récepteurs de leptine de Vertébrés, et est principalement exprimé dans l'intestin, les glandes thoraciques, la gonade et la gonade accessoire, avec des niveaux différents selon la maturité des crabes ; ce récepteur serait ainsi impliqué à la fois dans le métabolisme nutritif et la régulation de la maturation sexuelle.

#### **Autres neuropeptides influant sur le métabolisme énergétique ou la reproduction :**

- Hormones de ponte :

Les hormones de ponte (ELHs) sont bien caractérisées chez l'Aplysie (Chiu *et al.*, 1979 ; McAllister *et al.*, 1983) et la Limnée (Ebberink *et al.*, 1985 ; Vreugdenhil *et al.*, 1988 ; Li *et al.*, 1992). Les précurseurs de ces hormones génèrent des peptides impliqués dans le comportement de ponte et d'émission de gamètes (Bernheim et Mayeri, 1995). La banque de données de l'huître « Gigas Database » montre l'existence de deux ESTs codant une hormone homologue chez *C. gigas*.

- FFamide :

Li *et al.* ont mis en évidence en 1995 la structure du FFamide de *L. stagnalis* : GLTPNMNSLFFa, on retrouve chez *L. gigantea* un gène FFamide codant pour deux peptides : GINPDMSSLFFa et NIDLNYNQVPVANPLLFFa. Chez la Limnée, ce peptide module les contractions de la vas deferens du mâle, c'est-à-dire la structure qui va de la glande prostatique au pénis, et qui est impliquée dans l'éjaculation. Le FFamide augmente à la fois l'amplitude et la fréquence des contractions péristaltiques permettant cette éjaculation, et semble donc impliqué dans le comportement reproducteur mâle (Li *et al.*, 1995). Des gènes

homologues ont été trouvés dans les ESTs de plusieurs mollusques dont *C. gigas* (CU998024).

- Neuromédine U

La neuromédine U est un neuropeptide qui a été isolé à partir de moelle épinière porcine, elle doit son nom à son action contractile sur l'utérus, d'où le suffixe U (Minamino, 1985). Elle est fortement impliquée, entre autres rôles, dans la régulation de l'homéostasie énergétique et du comportement alimentaire (Budhiraja et Chugh, 2009, pour revue). En effet, l'injection de neuromédine U inhibe la prise alimentaire, réduit le poids corporel et augmente les dépenses énergétiques, alors que les souris déficientes en neuromédine U développent de l'obésité (Peier *et al.*, 2011). Ce peptide a pour l'instant été caractérisé uniquement au sein des Vertébrés, mais il existe chez *C. elegans* un homologue des récepteurs à la neuromédine U de Vertébrés, qui est impliqué dans l'influence de la source alimentaire sur l'espérance de vie des individus (Maier *et al.*, 2010). De plus, on retrouve chez la drosophile les gènes *hugin* et *capa* qui pourraient être des homologues de la neuromédine U (Melcher, 2006), et qui codent pour des peptides de type pyrokinine.

- Les pyrokinines

Les pyrokinines sont une famille de neuropeptides présente dans divers ordres d'insectes et chez les crustacés. Elles sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques comme l'activité myotrope de l'intestin chez le cafard et le criquet, la contraction de l'oviducte du criquet et la stimulation de la biosynthèse de phéromones sexuelles chez les femelles de papillons de nuit (Raina et Klun 1984, Gazit 1992). Les pyrokinines montrent une grande conservation chez les arthropodes, mais n'ont encore jamais été isolées chez les lophotrochozoaires. Les récepteurs des pyrokinines identifiés chez la drosophile sont très proches des récepteurs de neuromédine U de Vertébrés, de plus la pyrokinine 2 et la neuromédine U sont toutes deux impliquées dans la myomodulation et le comportement alimentaire, ce qui pourrait suggérer que ces deux familles de neuropeptides aient un ancêtre commun. Jusqu'à présent, aucun précurseur de type neuromédine U ou pyrokinine n'a pu être mis en évidence dans les banques de données génomiques de *C. gigas*.

## 4) *Présentation des objectifs de thèse*

Afin de caractériser au mieux la régulation neuroendocrine de la reproduction chez notre modèle d'intérêt, *C. gigas*, nous nous sommes intéressés tout d'abord aux récepteurs couplés aux protéines pouvant potentiellement lier des neuropeptides, et plus particulièrement les récepteurs potentiels du NPY d'huître. Une fois ces récepteurs identifiés et caractérisés, leurs ligands endogènes ont été recherchés pour permettre de confirmer la nature de ceux-ci. En parallèle, les travaux initiés par Franck Rodet lors de sa thèse (2005) et concernant les récepteurs à la GnRH de *C. gigas* ont été poursuivis grâce à l'identification et à la caractérisation de leur ligand potentiel, la GnRH, chez notre modèle.

Ainsi, ces travaux de thèse s'articulent autour de 3 parties principales :

- ✚ Le premier chapitre détaille la sélection des récepteurs d'intérêt à partir de séquences identifiées dans la banque d'EST et traitées par bio-informatique. Cinq récepteurs potentiels au NPY ont été sélectionnés puis séquencés et leur expression a été étudiée dans divers tissus, et sous diverses conditions, afin de mettre en évidence une éventuelle régulation de la production d'ARN messagers, qui donnerait de premiers indices sur leur rôle physiologique.
- ✚ Le deuxième chapitre concerne l'identification des ligands endogènes de ces récepteurs par pharmacologie/endocrinologie inverse. Afin de caractériser au mieux ces récepteurs, divers neuropeptides appartenant à la famille des RFamides, dont le neuropeptide Y de *C. gigas*, ont été testés sur les cinq récepteurs.
- ✚ Le troisième chapitre rapporte l'identification de la GnRH, ainsi que de son précurseur. La présence de ce neuropeptide a été mise en évidence par spectrométrie de masse dans les divers tissus de l'huître adulte, et l'expression de son précurseur a été également étudiée pour déterminer son éventuelle régulation, selon le tissu ou l'état physiologique étudié.

*Chapitre I :*  
*Identification et caractérisation*  
*des récepteurs potentiels du*  
*neuropeptide  $\gamma$*



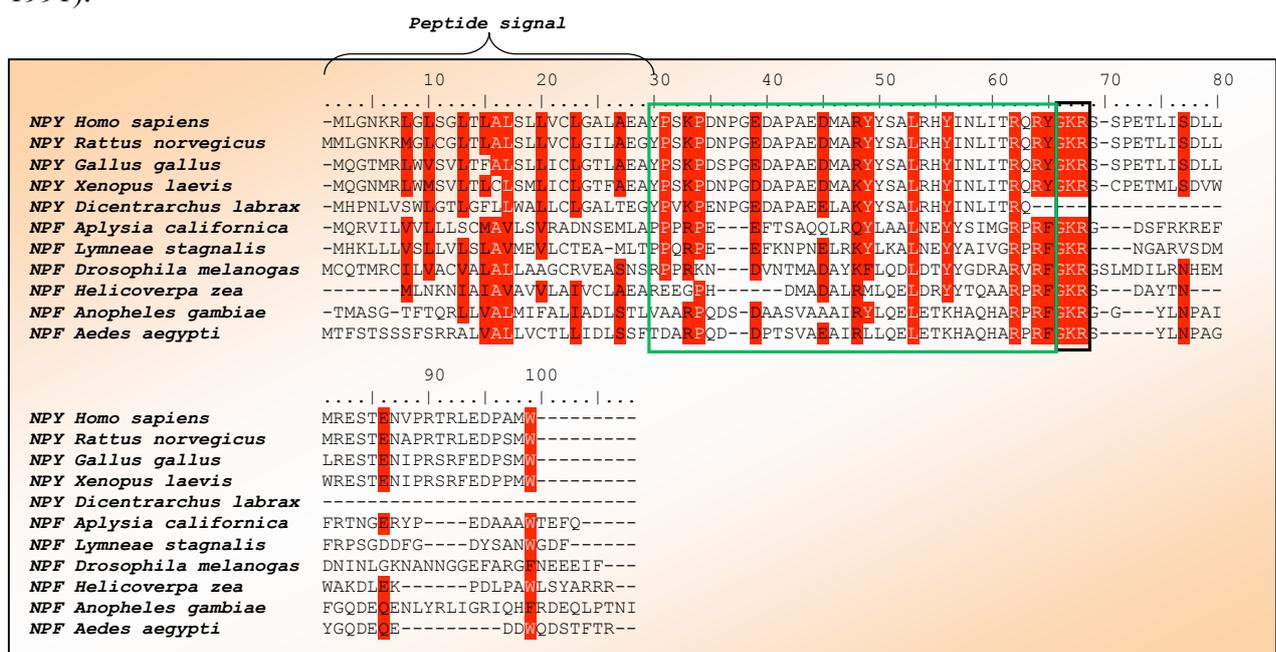
## ***Introduction :***

Afin de comprendre les mécanismes de régulation de la reproduction chez l'huître creuse *C. gigas*, nous avons entrepris dans un premier temps de rechercher les voies neuro-endocrines présentes chez ce modèle à partir des séquences de la banque d'ESTs Gigas Database. Or, les précurseurs de neuropeptides ne sont pas aisés à identifier dans de telles banques de données génomiques, du fait de leurs nombreux motifs répétés, de la faible taille de ces peptides et de leur conservation relative au cours de l'évolution. En revanche, les récepteurs aux neuropeptides possèdent tous une structure en 7 domaines transmembranaires, qui impliquent une bonne conservation des résidus formant ces domaines transmembranaires, d'un récepteur à l'autre. Ainsi, ces 7 domaines spécifiques d'une vingtaine d'acides aminés, en hélices  $\alpha$ , les récepteurs couplés aux protéines G ont des séquences nucléotidiques et protéiques facilement identifiables dans les banques de données. C'est pourquoi nous nous sommes attachés dans un premier temps à identifier parmi les ESTs séquencés chez *C. gigas* les séquences correspondant à des RCPGs. Parmi ces récepteurs, par analogie de séquences, il est facile de démarquer les séquences de récepteurs susceptibles de lier des neuropeptides des autres récepteurs, permettant ainsi de cibler les récepteurs à étudier. Afin d'étudier plus spécifiquement la régulation des cycles de reproduction et de mise en réserve énergétique, nous nous sommes penchés dans un premier temps sur les récepteurs susceptibles de lier des neuropeptides ou neurohormones assurant ces fonctions. Ainsi, un bon candidat pour ces régulations est le neuropeptide Y, ou son homologue, le neuropeptide F d'Invertébrés, connu pour ses effets physiologiques à la fois sur le métabolisme énergétique et sur les processus liés à la reproduction.

Le neuropeptide Y appartient à la famille des peptides apparentés au FMRFamide que l'on retrouve dans les systèmes nerveux à la fois des Vertébrés et des Invertébrés. Il a été découvert par Tatemoto (1982) à partir d'extraits de cerveau porcin. Le neuropeptide Y est un des peptides les plus répandus dans le système nerveux central de Vertébrés, c'est un neuromodulateur de 36 acides aminés impliqué dans les rythmes circadiens, la consommation de nourriture, la reproduction, l'apprentissage, la mémoire, la douleur, l'homéostasie énergétique, l'anxiété et la sécrétion d'hormones pituitaires telles que la LH ou la GH (Flood *et al.*, 1987 ; Widerlov *et al.*, 1988 ; Hua *et al.*, 1991 ; Frankish *et al.*, 1995 ; Hill *et al.*, 2002). La famille du NPY de Vertébrés comprend le NPY, le peptide YY et le polypeptide

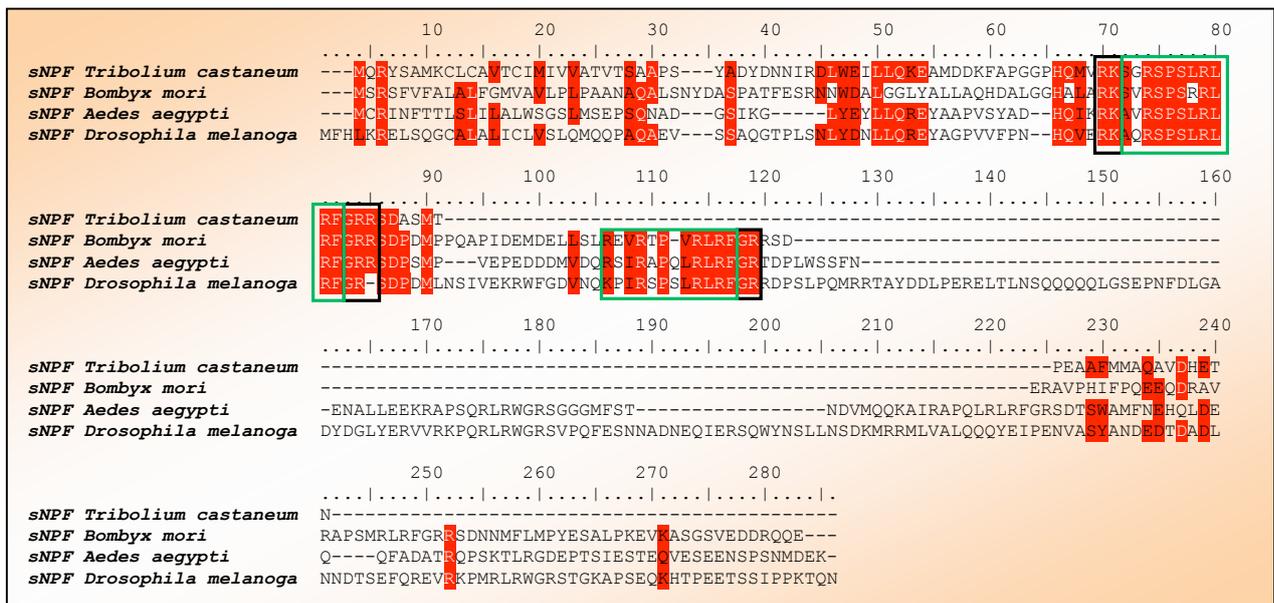
pancréatique (Larhammar, 1996). Les neurones NPY sont activés par le jeûn et stimulent l'appétit, le comportement de recherche de nourriture et régulent la thermogenèse, la sécrétion périphérique d'insuline et la libération de glucose hépatique (Barb *et al.*, 2008). La diminution de NPY entraîne une réduction de la prise alimentaire et une diminution de poids, ce qui est cohérent avec le rôle orexigène du NPY. L'expression de NPY est inhibée par la leptine, qui a un rôle direct sur celui-ci puisque les neurones à NPY expriment le récepteur à la leptine. L'activité de ces neurones NPY est aussi régulée par l'insuline qui, comme la leptine, diminue l'expression de NPY. De plus, l'insuline annule l'augmentation de NPY due au jeûn. Le NPY est donc un important relais pour la régulation de l'alimentation et du métabolisme. L'administration centrale de NPY stimule la sécrétion de GnRH et de LH, alors que l'administration chronique de NPY cause des retards de maturité sexuelle et des perturbations de cycle œstral chez des espèces comme le mouton. Le NPY a essentiellement un effet négatif sur la fonction reproductive. Les souris NPY KO répondent de manière moins évidente à la GnRH, et ont un comportement reproducteur réduit, bien qu'elles restent fertiles. Les neurones à NPY semblent donc être des intégrateurs centraux du métabolisme et de la reproduction.

Alors que les NPYs de Vertébrés possèdent une tyrosine (Y) amidée en C-terminal, leurs homologues d'Invertébrés présentent un résidu phénylalanine (F) amidé, et sont donc appelés neuropeptides F ou NPFs (figure 13). Le premier NPF a été identifié chez le plathelminthe parasite *Moniezia expansa*, comme peptide apparenté au PP (Maule *et al.*, 1991).



**Figure 13** : Alignement des séquences protéiques des précurseurs de neuropeptides Y/F de Vertébrés et d’Invertébrés. Numéros d’accession GenBank : *Homo sapiens* : AAA59944.1, *Rattus norvegicus* : AAA41723.1, *Gallus gallus* : AAA48991.1, *Xenopus laevis* : NP\_001161232.1, *Dicentrarchus labrax* : CAB64935.1, *Crassostrea gigas* : CU983945.1, *Aplysia californica* : AAA27772.1, *Lymnaea stagnalis* : CAB63265.1, *Drosophila melanogaster* : AAF55339.1, *Helicoverpa zea* : ADK66276.1, *Anopheles gambiae* : AAT81601.1, *Aedes aegypti* : AAM74026.1. L’alignement a été réalisé à l’aide du logiciel BioEdit, par ClustalW. Le motif d’amidation et de clivage (GKR) est encadré en noir, les peptides signal sont signalés par des accolades, et les neuropeptides Y et F sont encadrés en vert

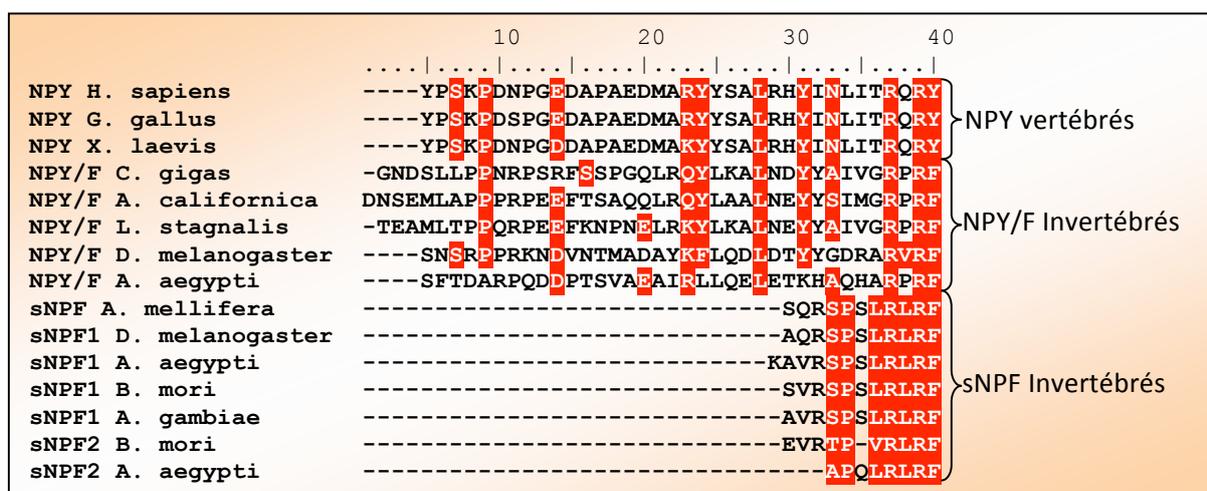
À côté de ces longs neuropeptides de 36 à 40 acides aminés, il existe des formes plus courtes, de 6 à 11 acides aminés, caractérisés à ce jour uniquement chez les Arthropodes et appelés NPFs courts ou sNPFs. Les sNPFs dérivent d’un précurseur unique qui code pour 4 à 5 sNPFs (figure 14), ce qui diffère des précurseurs de longs NPFs qui semblent coder pour un seul peptide (figure 13), ces deux types de précurseurs étant bien distincts, et relativement éloignés ; le sNPF semble être plus éloigné du NPY de Vertébrés que ne l’est le NPF. D’après les deux alignements (figures 13 et 14), on voit en effet que les précurseurs de sNPF sont environ deux fois plus longs que ceux du NPY/F, ce qui est dû à la multiplicité des peptides pour lesquels ils codent.



**Figure 14** : Alignement des séquences protéiques des précurseurs de sNPF d’insectes. Numéros d’accession GenBank : *Tribolium castaneum* : EEZ97763.1, *Bombyx mori* : ADW08938.1, *Aedes aegypti* : ABE72968.1, *Drosophila melanogaster* : AAU87571.1. L’alignement a été réalisé à l’aide du logiciel BioEdit, par ClustalW. Les sites d’amidation et de clivage sont encadrés en noir, et les sNPFs en vert.

Ce qui les rapproche le plus est leur récepteur, appartenant à la famille des récepteurs « NPY-like ». Il existe également des similarités fonctionnelles entre le NPY/F et le sNPF. Les NPFs de Mollusques sont caractérisés par un pentapeptide GRPRFamide à l’extrémité C-

terminale de leur séquence protéique et sont longs de 36 à 39 acides aminés (figure 15). Les sNPFs ne comportent que 8 à 10 résidus, et sont pourvus d'un motif R(L/P)RFamide en C-terminal (figure 15). Ce ne sont pas des formes plus courtes C-terminales des NPFs, mais bien des peptides différents provenant de précurseurs distincts de ceux des NPFs (Nässel et Wegener, 2011, pour revue). Cette dénomination peut être ambiguë, puisqu'il existe également des formes tronquées NPFs, générées par clivage de ces peptides en partie C-terminale, et provenant donc bien du même précurseur que les NPFs longs. Le premier sNPF a été identifié chez le scarabée *Leptinotarsa decemlineata*, à partir d'extraits de cerveau (Spittaels *et al.*, 1996).



**Figure 15 :** Aligment des peptides de type NPY, NPF et sNPF. Numéros d'accésion GenBank : *Homo sapiens* : AAA59944.1, *Gallus gallus* : AAA48991.1, *Xenopus laevis* : NP\_001161232.1, *Crassostrea gigas* : CU983945.1, *Aplysia californica* : AAA27772.1, *Lymnaea stagnalis* : CAB63265.1, *Drosophila melanogaster* NPY/F : AAF55339.1, *Aedes aegypti* NPY/F : AAM74026.1, *Bombyx mori* sNPF : ADW08938.1, *Aedes aegypti* sNPF : ABE72968.1, *Drosophila melanogaster* sNPF : AAU87571.1. L'aligment a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit, par ClustalW.

Chez *Drosophila melanogaster*, un NPF long, appelé DmNPF, a été mis en évidence et est présent dans les cellules du système nerveux central ainsi que dans le tube digestif, comme prouvé par hybridation *in situ* et immunomarquage (Brown *et al.*, 1999). Ce neuropeptide régule le comportement alimentaire des larves (Wu *et al.*, 2003). Les neurones à NPF du cerveau chez cette espèce sont tous des interneurons, notamment au niveau des neurones circadiens dorsaux (Johard *et al.*, 2009) chez le mâle, suggérant un rôle de ce neuropeptide dans le comportement dimorphique sexuel régulé par le temps. Un précurseur codant pour des sNPFs a ensuite été cloné (Lee *et al.*, 2004), et, bien qu'il ne soit pas retrouvé dans le tube digestif, ces sNPFs contrôlent également la prise alimentaire et la taille corporelle. En effet, la manipulation du gène codant pour ce précurseur affecte la consommation de nourriture chez les larves et les adultes, en augmentant la prise alimentaire

chez les mutants « gain de fonction » *sNPF* et en la diminuant chez les mutants perte de fonction *sNPF* (Garczinsky *et al.*, 2006). Ces *sNPF* de *Drosophila* sont capables d'activer la voie cellulaire ERK-insuline et donc de réguler la taille corporelle (Lee *et al.*, 2008). Le *sNPF* et le *NPF* activent des récepteurs différents. Chez la *Drosophila*, les deux types de récepteurs ont été clonés et caractérisés, celui qui lie le *NPF* long est exprimé dans le système nerveux central et l'intestin des larves (Garczinski *et al.*, 2002), alors que le récepteur au *sNPF*, caractérisé par Mertens *et al.* (2002), est exprimé dans le cerveau, le tube digestif, les tubes de Malpighi, les ovaires et le corps gras. Le *sNPF* pourrait également avoir un rôle dans la libération d'autres hormones, de par son expression dans les neurones protocérébraux, responsables de la production de corazonine (Nässel *et al.*, 2008), qui régulerait elle-même la libération d'AKH (Choi *et al.*, 2008).

Le moustique *Aedes aegypti* présente également un *NPF* long qui a été isolé à partir d'extraits d'abdomens (Stanek *et al.*, 2002). Par immunocytochimie à l'aide d'un antisérum anti-DmNPF, le peptide a été détecté dans le ganglion suboesophagien, le cerveau et le tube digestif du moustique, aux stades larvaire et adulte. De plus, par dosage radioimmunologique, Stanek *et al.* (2002) ont mis en évidence dans l'hémolymphe des femelles des variations dans le taux de *NPF* après un repas de sang et au cours du cycle de reproduction. Il semble avoir un effet inhibiteur sur la reproduction, puisque les plus forts taux circulants de *NPF* sont détectés avant le repas de sang chez la femelle, c'est-à-dire pendant l'interruption de l'ovogenèse, et 24h après le repas, soit quelques heures avant la fin de production des protéines du vitellus. Des injections de *sNPF* accélèrent le développement des œufs et la croissance ovarienne, chez le criquet *Locusta migratoria* (Cerstiaens *et al.*, 1999). Par la suite, quatre différents *NPFs* ont été identifiés chez les criquets *S. gregaria* et *L. migratoria* : une forme longue (Clynen *et al.*, 2006), une forme tronquée de ce peptide (YSQVARPRFamide) qui accélère la maturation ovarienne des femelles et révèle un nouveau site de clivage, entre deux résidus tyrosine. Deux *sNPFs* (SNRSPSXRXRamide et SPSXRXRamide, X représentant les acides aminés qui varient d'une espèce à l'autre) ont été également mis en évidence et sont parmi les neuropeptides les plus répandus du système neuroendocrine de ces deux espèces de criquet (Clynen *et al.*, 2009).

Récemment, 4 isoformes de peptides apparentés au neuropeptide PP ont été isolés et caractérisés chez la crevette pénéide *Penaeus semisulcatus*, chacun de ces peptides partageant 4 à 7 acides aminés avec le *NPF* du calmar *L. edulis*, et des *NPFs* d'autres Invertébrés, et peuvent donc être rapprochés de cette famille également (Sithigorngul *et al.*, 2002). Chez *M.*

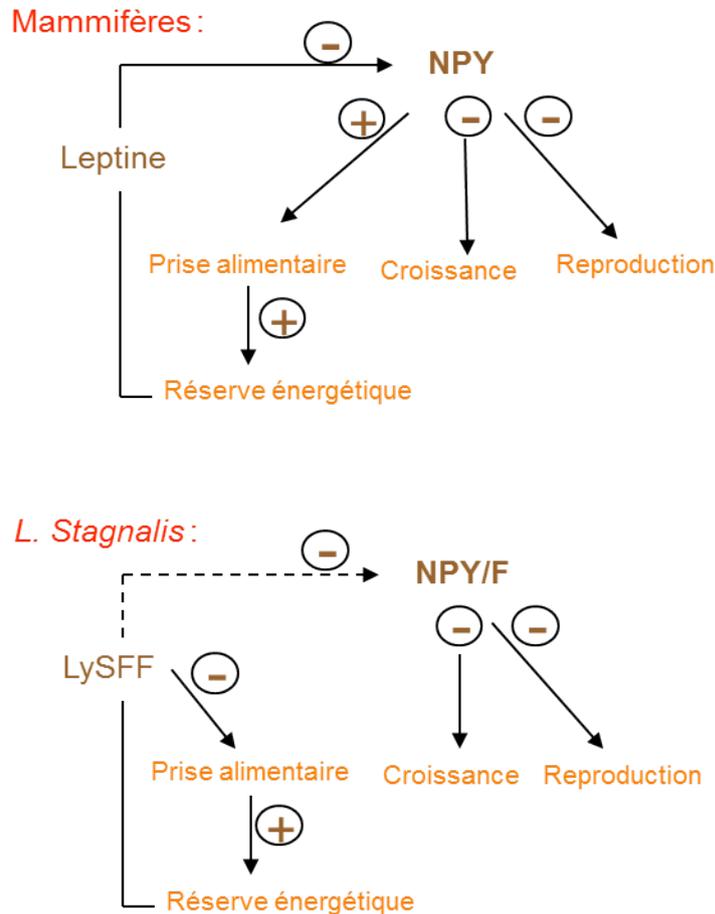
*japonicus*, l'injection intramusculaire de NPY augmente la prise alimentaire durant les premières 24 heures, puis l'effet diminue (Kiris *et al.*, 2004). L'injection de NPY augmente également le taux de croissance et l'efficacité de conversion des nutriments chez *P. semisulcatus*, à une dose de 0.5µg de NPY par gramme de nourriture. Les deux modes d'administration (injection et ingestion) de NPY augmentent donc la prise alimentaire et la croissance de manière dose-dépendante chez les crevettes pénéides (Kiris *et al.*, 2004). Ces résultats similaires à ceux obtenus chez les Vertébrés suggèrent donc que le NPY régulerait les mêmes processus physiologiques. Comme chez les crevettes *P. semisulcatus*, l'administration orale de NPY par la nourriture chez le tilapia *O. niloticus* a conduit à une augmentation de la prise alimentaire de 39% et de la croissance de 16% à une dose de 0.5µg de NPY par gramme de nourriture.

Des homologues du neuropeptide F/Y ont également été isolés dans le groupe des mollusques, comme chez l'escargot *Helix aspersa* (Leung *et al.*, 1992), ou chez l'aplysie *Aplysia californica*, où sa présence, associée à celle de l'hormone de ponte (ELH), dans les cellules « sacs » abdominales suggère un rôle de ce NPF dans la reproduction (Rajpara *et al.*, 1992). Il est également présent dans de nombreux autres neurones du système nerveux central, impliqués notamment dans la fonction alimentaire (Jing *et al.*, 2007). Des injections de cet apNPF réduit la prise alimentaire et diminue le taux d'ingestion chez ce mollusque. Le système NPF jouerait ainsi un rôle dans la transition progressive de la faim vers l'état de satiété, en augmentant l'activité d'interneurones stimulateurs de la déjection tout en diminuant l'activité des interneurones stimulateurs d'ingestion. Ces résultats suggèrent que le NPF de l'Aplysie serait plus proche du peptide YY, peptide de la même famille que le NPY et qui participe également à l'effet de satiété chez les Vertébrés, que du NPY hypothalamique qui stimule la prise alimentaire. Jing *et al.* (2007) soulignent que le NPF de la Drosophile semble, lui, plus proche du NPY puisqu'il a un rôle activateur sur la prise de nourriture.

Chez *Lymnea stagnalis*, des expériences de « désorphanisation » de récepteur ont été réalisées à partir de la séquence d'un RCPG présentant une forte homologie de séquence avec les récepteurs au NPY de Vertébrés. Un extrait peptidique de cerveau a montré une capacité à réduire le taux d'AMPc stimulé par la forskoline, sur des cellules CHO exprimant ce récepteur (Tensen *et al.*, 1998). À partir de cet extrait, un neuropeptide de 39 acides aminés a été isolé, il présente une forte homologie avec les neuropeptides F et Y, et semble pouvoir adopter la même structure tertiaire, par la conservation de certains résidus clés. Ce NPF est exprimé dans les neurones des ganglions cérébraux innervant les cellules caudo-dorsales qui,

tout comme les cellules « sacs » abdominales de l'Aplysie, régulent l'ovulation et la ponte via la libération d'hormone d'ovulation et des peptides associés. Il est également colocalisé avec l'APGWamide dans les neurones du lobe antérieur qui projettent des axones au muscle rétracteur du pénis (De Lange *et al.*, 1997). Ce peptide a été caractérisé par de Jong-Brink *et al.*, en étudiant le mode d'action du parasite *Trichobalarzia ocellata*, qui est capable d'interférer avec les mécanismes neuroendocrines régulant la reproduction et la croissance chez son hôte, la Limnée. Un des gènes dont l'expression est augmentée par ce parasite est celui qui code pour le précurseur du neuropeptide F de *L. stagnalis* (LyNPF). Cette augmentation coïncide avec le stade de grande production et de libération de parasites, qui nécessite beaucoup d'énergie. Pendant ce stade des changements apparaissent également chez l'hôte, tels que l'inhibition de la reproduction et l'augmentation de la croissance. Un ADNc codant pour un précurseur de neuropeptide F a été cloné chez *L. stagnalis*, et l'effet de ce peptide a été testé sur le système nerveux central de la Limnée, par des injections à court et long terme (de Jong-Brink *et al.*, 1999). Ces injections ont pour effet une inhibition importante de la ponte des œufs et entraînent une suppression de la croissance, bien que ce LyNPF n'ait pas d'effet sur la prise alimentaire (figure 16. Le rôle du NPF de l'Aplysie toucherait donc à la régulation centrale des processus métaboliques et endocrines par le biais de cellules neuroendocrines régulant la reproduction, l'ovulation, la ponte et la croissance. Ces effets du NPF peuvent expliquer la raison pour laquelle le parasite provoque une expression accrue du gène codant pour ce neuropeptide, lui permettant un important gain énergétique. Cependant, le NPF de Limnée ne semble pas réguler le comportement alimentaire, contrairement aux NPYs de Vertébrés, bien qu'un facteur dont le rôle s'apparente à celui de la leptine ait récemment été mis en évidence, le LySFF (Lymnaea storage feedback factor) (De Jong-Brink *et al.*, 2001). Les neurones à NPF pourraient posséder des récepteurs au SFF, ce qui permettrait de réguler l'activité de ces neurones en fonction de la quantité de réserve énergétique, stockée sous forme de glycogène dans le bord de manteau. De plus, par la similarité entre les précurseurs de NPY de Vertébrés et de Mollusques, le LyNPY peut être considéré comme un vrai homologue de NPY, ce qui a permis d'identifier le récepteur NPY de Limnée comme un sous-type Y1, en se basant sur des approches pharmacologiques. Ceci expliquerait que le LyNPY n'ait pas d'effet sur la prise alimentaire puisque cette régulation, chez les Vertébrés, passe par la liaison à un récepteur de sous-type Y5.

En raison de la forte similarité entre les neuropeptides Y de Vertébrés et les neuropeptides F, et des différentes appellations utilisées dans la littérature, les homologues de ce neuropeptide chez les non-vertébrés seront appelés par la suite NPY/F.



**Figure 16** : Représentation schématique des rôles connus et supposés du NPY de la Limnée, comparés aux rôles connus de ce peptide chez les Mammifères. Les - indiquent un rôle inhibiteur, tandis que les + représentent un rôle activateur. D'après De Jong-Brink *et al.*, 2001.

Il semblerait finalement que les neuropeptides Y/F d'Invertébrés pourraient être impliqués dans la régulation de la reproduction, la croissance, la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique. De plus, chez la Limnée comme chez la Drosophile, les voies du neuropeptide F et des insulines semblent liées, ce qui pourrait donc également être le cas pour *C. gigas*. Les sNPF ont été étudiées principalement chez la Drosophile, et réguleraient la prise alimentaire, la croissance et la modulation du signal insuline. Les fonctions supposées de ces peptides seraient donc similaires à celles suggérées pour le NPY de Vertébrés, ce qui serait dû à leur expression dans un grand nombre de neurones, innervant une grande partie du CNS de Drosophile, donc potentiellement à leur implication dans un grand nombre de fonctions physiologiques. De plus, Lingo *et al.* (2007) ont démontré que le système NPY/F de la

Drosophile semble être un médiateur central de la résistance à divers stress par la modulation de la faim. En effet, un stress par le froid provoque une inhibition de la prise alimentaire sur les larves nourries, mais non sur les larves à jeun. Cette résistance des larves à jeun nécessite une coordination entre une régulation négative par le système insulin-like et une régulation positive par le système NPY/F (Lingo *et al.*, 2007). Ces deux systèmes semblent donc indispensables à la résistance aux stress environnementaux suscités par la faim.

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, dans Gigas Database (Fleury *et al.*, 2009), une séquence correspondant à un précurseur de neuropeptide Y/F a déjà été mise en évidence (figure 12), ce qui suggère fortement l'existence d'une voie du neuropeptide F. De plus, des expériences de microarray ont permis l'identification de gènes différentiellement exprimés dans les différents tissus adultes (Dheilly *et al.*, 2011). Parmi ces gènes se trouve celui codant pour le précurseur du NPY/F, qui est largement plus exprimé dans les ganglions viscéraux que dans le reste des tissus, et semble sous-exprimé dans l'aire gonadique femelle et les branchies. De manière intéressante, les auteurs ont également noté un profil d'expression tissulaire identique pour ce précurseur NPY/F et pour les différents gènes de type insuline. Or, le système insulin-like est impliqué dans l'adaptation aux conditions trophiques chez l'huître creuse *C. gigas* (Jouaux, 2010). Enfin, un récepteur présentant des homologies avec les récepteurs du neuropeptide Y/F a été mis en évidence et semble plus exprimé dans les lignées d'huîtres résistantes aux mortalités, comparativement aux lignées qui y sont plus sensibles (Fleury *et al.*, 2010)

Compte tenu de ces résultats préliminaires, il était donc logique d'explorer la voie du neuropeptide Y/F chez cette espèce, dans la problématique de la régulation de la reproduction et de la mise en réserve. Comme les récepteurs du NPY/F appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, nous avons identifié dans un premier temps les ESTs présentant des motifs de cette famille de récepteurs. Leur expression dans l'aire gonadique au cours du cycle annuel de reproduction a été étudiée par macroarray, afin d'avoir une première vue générale sur l'implication de ce type de récepteurs dans la gamétogenèse. Dans un second temps, sur la base d'homologies de séquence, nous avons entrepris d'identifier des récepteurs potentiels au neuropeptide Y/F dans cette banque de données génomiques. Cette identification permettra ainsi de caractériser plus précisément chacun de ces récepteurs pour identifier ceux qui seraient impliqués dans les processus physiologiques de la reproduction ou du métabolisme énergétique.

## ***Matériel et méthodes :***

### **A) Animaux et conditionnement trophique :**

Des individus adultes d'huîtres *Crassostrea gigas* âgées de 2 ans, en élevage dans une exploitation locale, en Normandie, sont utilisés pour les extractions d'ARN et les extractions peptidiques. Les stades de reproduction ont été déterminés par analyse histologique de sections gonadiques, comme décrit par Rodet *et al.* (2005). Pour étudier l'influence des conditions trophiques, des adultes d'un an ont été placés dans des cuves d'eau en absence de nourriture ou en présence de micro-algues, à hauteur de 12% du poids sec d'huîtres, en conditions expérimentales contrôlées, pendant 3 semaines.

### **B) Analyses bio-informatiques :**

Afin d'accroître les données génomiques existantes pour *Crassostrea gigas*, une banque d'EST (Expressed Sequenced Tags) appelée « Gigas Database » a été créée, à partir du regroupement de 3 grands projets de séquençage, pour obtenir une large banque de données publique (Fleury *et al.*, 2009). Cette banque a été construite à partir de 40 845 ESTs qui, après contigage, correspondent à 29 745 séquences uniques. Ces séquences uniques peuvent être retrouvées et triées en fonction de leur annotation, de leur référence dans la banque d'EST, de leur numéro d'accèsion GeneBank, ou de leur expression spatio-temporelle.

Les séquences nucléotidiques sélectionnées dans la banque Gigas Database (version 1) sont ensuite traitées par informatique. Tout d'abord, pour chaque séquence, l'annotation est vérifiée en effectuant un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), qui compare la séquence d'intérêt avec une banque de séquences, comme sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. L'annotation retenue correspond à la séquence avec laquelle le contig présente le plus d'homologies.

Pour les séquences correspondant à des récepteurs couplés aux protéines G, afin d'évaluer la part de séquence manquante dans le contig pour avoir le gène entier, une première approche consiste à déterminer le nombre de segments transmembranaires présents

dans la séquence. Cette détermination nécessite d'avoir une séquence protéique du contig, et non une séquence nucléotidique. Les contigs sélectionnés ont donc été traduits selon les 6 cadres de lecture possibles sur le site <http://expasy.org/tools/dna.html>, pour déterminer la séquence protéique la plus probable pour chaque contig. Le nombre de domaines transmembranaires présents dans ces séquences protéiques a ensuite été déterminé grâce au site internet <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>, permettant donc une évaluation de la part de séquence connue dans le gène.

Afin de confirmer les parties manquantes de séquences, et pour toutes les analyses suivantes, chaque séquence a été enregistrée dans le logiciel BioEdit. Ce logiciel a permis de faire des alignements de séquences entre les contigs et les séquences entières de récepteurs avec lesquels ils avaient le plus d'homologies, afin de confirmer les parties présentes et manquantes de chaque récepteur identifié dans la banque d'EST.

### C) Macroarray

La technique de macroarray consiste à étudier l'expression de gènes, dont l'ADN est spotté sur une membrane, dans une sonde d'ADNc marquée (ici par radioactivité) et hybridée à cette membrane (figure 17).

#### 1) **Fabrication de la sonde d'ADNc radioactive :**

Les ARN messagers ont été extraits de l'aire gonadique d'individus en stade 0, 1, 2 et 3. Ces ARN sont alors rétro-transcrits afin d'obtenir l'ADN complémentaire (ou ADNc) correspondant. Après cette rétro-transcription, la radioactivité est incorporée dans l'ADNc néo-formé, grâce à l'ajout d'un nucléotide marqué radioactivement par du phosphore 32 dans le milieu réactionnel, le [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP. L'ADNc obtenu à partir des ARN d'aire gonadique est dénaturé en présence de 750ng d'amorces aléatoires (Random primers) pendant 10 min à 95°C. Sont alors ajoutés les dNTP (0,5mM de concentration finale pour les dCTP, dGTP, dTTP et 10 $\mu\text{M}$  de dATP), le nucléotide marqué [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP à 6000Ci/mmol (0,5mM) et 4U d'enzyme Klenow (Roche®). Ce mélange est incubé 45 min à 37°C au bain-marie, afin de permettre à l'enzyme de synthétiser le brin complémentaire de chaque fragment d'ADN simple brin, en incorporant le  $\alpha^{32}\text{P}$ , synthétisant ainsi l'ADN double brin radioactif. Enfin,

20 $\mu$ M d'EDTA à pH8 sont ajoutés pour stopper la réaction. La sonde d'ADNc radioactive est alors purifiée sur une colonne de Sephadex, pour être ensuite hybridée.

## **2) Préparation de la membrane :**

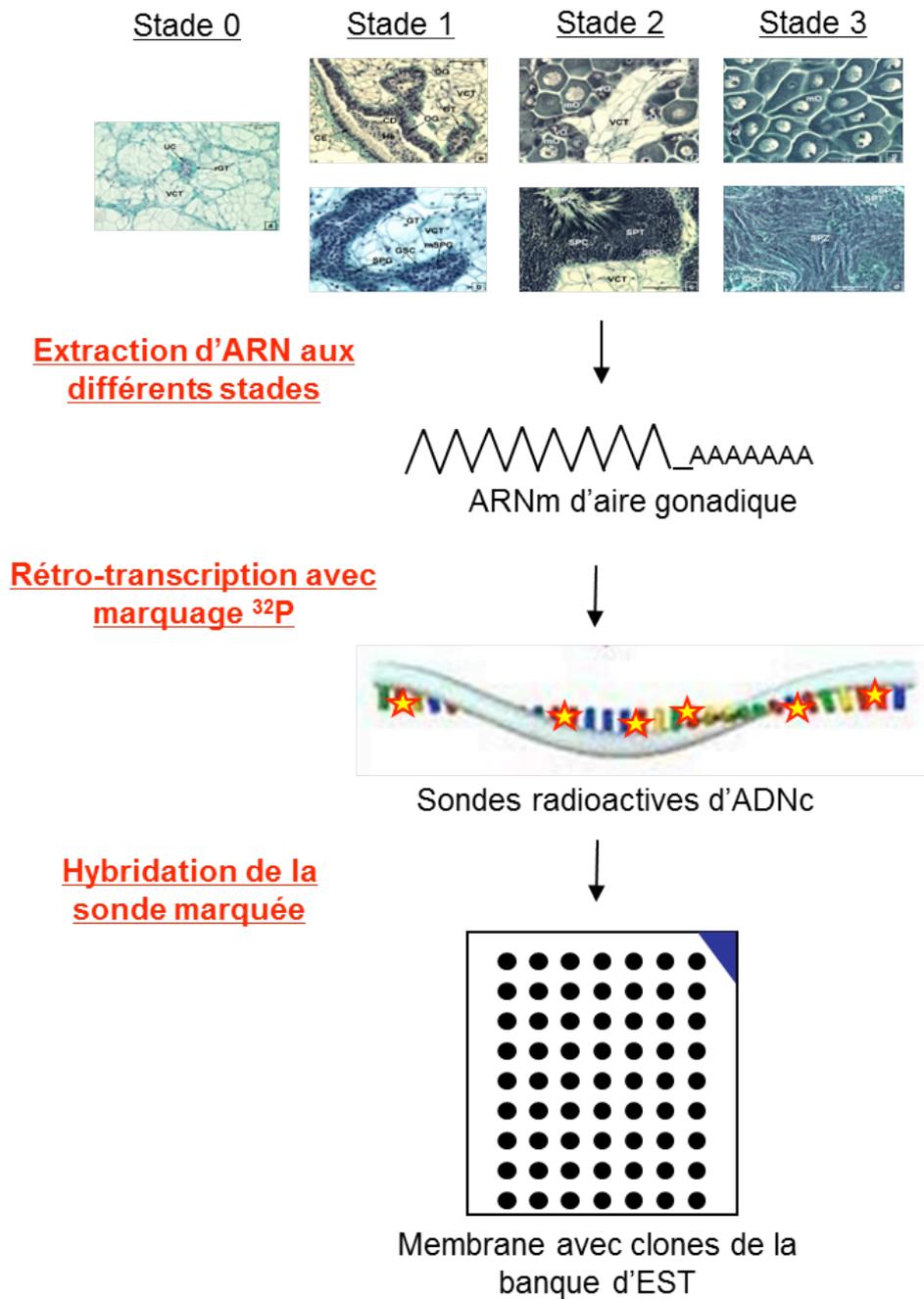
Les 80 clones bactériens correspondant aux séquences de récepteurs sélectionnés dans la banque d'EST ont été repiqués dans 150 $\mu$ L de milieu LB (Lysogeny Broth) + ampicilline liquide, déposés sur une plaque 96 puits, ensuite incubés pendant une nuit à 37°C. 2 $\mu$ L de chaque puits sont alors déposés sur une membrane de nylon qui est ensuite disposée sur une boîte de LB Agar + ampicilline, et incubée 3h à 37°C. Après une étape de dénaturation 5 min. dans une solution 1,5M NaCl et 0,5M NaOH, les membranes subissent une étape de neutralisation dans une solution de 1,5M NaCl, Tris-HCl pH 8 puis deux étapes de rinçage dans une solution 2 SSC (0,3 M NaCl, 30 mM de citrate de sodium pH 7) avant d'être séchées pendant deux heures à 80°C.

## **3) Lavages et hybridation de la sonde sur la membrane :**

La membrane est tout d'abord lavée dans 15mL de SSC 6X (Saline-Sodium Citrate, composé de 900 mM de NaCl et de 90 mM de trisodium de citrate, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) pendant 30 min à 50°C en agitation. Puis elle est incubée 1h à 65°C dans une solution de préhybridation composée de SSC 6X, de solution Denhardt's 5X (0,1% de Ficoll, 0,1% de polyvinylpyrrolidone et 0,1% de bovine serum albumine), SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) à 0,5%, et d'ARN Torula (Sigma ®) à 1 mg/L. La sonde d'ADNc radioactif est alors dénaturée par une incubation à 95°C pendant 5 min avant d'être ajoutée à 2,5mL de solution de préhybridation chauffée à 65°C, puis la membrane est incubée en présence de cette solution pendant une nuit à 65°C avec agitation. La membrane est lavée, avec 25 mL de solution de lavage 1 (SSC 2X, SDS 0,1%) pendant 5 min à température ambiante, deux fois de suite, puis avec 25 mL de solution de lavage 2 (SSC 0,5X, SDS 0,1%) préchauffée à 65°C pendant 15 min à 65°C, deux fois de suite également.

## **4) Révélation du marquage radioactif :**

La membrane ainsi lavée est alors placée dans une cassette, avec un film radiographique, dans le noir pendant 3 heures. Le marquage est alors révélé à l'aide d'une station de lecteur d'écrans phosphore Cyclone (Perkin Elmer®), et les images des membranes sont traitées grâce au logiciel OptiQuant™ fourni avec la station.



**Figure 17** : Représentation schématique de la technique de macroarray utilisée pour détecter le niveau d'expression des séquences de la banque Gigas Database codant pour des RCPGs, dans l'aire gonadique de *C. gigas* aux différents stades de gamétogenèse, mâles et femelles confondus.

## D) Extraction des ARN totaux, rétro-transcription et PCR quantitative

### **1) Extraction des ARN totaux**

Chaque échantillon traité ici correspond à un animal de sexe et de stade identifié de façon précise d'après les coupes paraffines colorées au Trichrome de Prenant Gabes. Environ 80mg de tissus congelés dans l'azote liquide sont finement broyés au mortier dans l'azote liquide puis repris dans 1ml de solution d'extraction Trireagent (Sigma®). Le contenu des tubes est homogénéisé à la seringue (aiguilles 18G puis 23G) puis maintenu 5 minutes à température ambiante. Dans chaque tube sont ajoutés 100µl de Bromo-Chloro-Propane (BCP), puis les tubes sont agités vigoureusement (vortex) pendant 15 secondes pour avoir une émulsion homogène. Les tubes sont ensuite maintenus 10 à 15 minutes à température ambiante puis centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les ARN sont alors extraits à l'aide du kit Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel®), selon les instructions du fournisseur. Une quantification est réalisée au Nanodrop, à partir d'1µl d'ARN extraits, par mesure de l'absorption, à 260, 280 et 320 nm (1 unité de DO à 260 correspond à 40µg/mL d'ARN). Le rapport DO260/DO280 permet d'évaluer la qualité des extractions. Les éventuelles dégradations sont contrôlées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%.

### **2) Traitement DNase et rétro-transcription**

Après l'extraction des ARN totaux, sont ajoutés à chacun des tubes une unité de DNase (Promega® 1U/µL) ainsi que 1,1µL de tampon DNase 10X, les tubes sont alors incubés pendant 30 minutes à 37°C dans le thermocycleur My Cycler™ Bio-Rad. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1,25µL de solution Stop (Promega®) puis une incubation à 70°C en thermocycleur (Bio-Rad) pendant 10 minutes. Cette étape permet d'éliminer les éventuelles contaminations d'ADN génomique, afin de n'obtenir, après rétro-transcription, que l'ADN correspondant aux gènes effectivement exprimés.

Les ADNc sont obtenus à partir de 250ng d'ARN totaux des différents tissus dont le volume est ajusté à 11,5 µL avec de l'eau traitée au DEPC. Une fois traités, les ARN sont rétro-transcrits dans un mix de 25 µL contenant : 40 µM d'oligodT, 400 µM de dNTP et 1X de tampon MMLV-RT (Promega®). Après homogénéisation et centrifugation rapide, les tubes sont incubés durant 5 minutes à 65°C. Le mélange est alors complété avec 15 U de

RNAsine (Promega®) et 200 U d'enzyme MMLV-RT (Promega®). Les tubes sont incubés pendant un cycle de 1h30 à 37°C suivi d'un cycle de 5 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C.

### 3) PCR quantitative en temps réel

#### Choix des amorces

Une analyse prédictive de type « Folding » est réalisée pour visionner les structures secondaires susceptibles de se former dans la séquence d'intérêt dans les conditions de la PCR en temps réel (60°C, 50mM NaCl et 6mM MgCl<sub>2</sub>), en utilisant le logiciel en ligne [www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna](http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna). L'utilisation du logiciel Primer 3 [http://frodo.wi.mit.edu/cgi\\_bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi_bin/primer3/primer3_www.cgi) permet de dessiner des couples amorces de 20 bases de Tm 60°C permettant l'amplification d'un fragment de 100 paires de bases approximativement dans les conditions de PCR utilisées, NaCl 50mM et MgCl<sub>2</sub> 6mM (voir tableau 1 pour les couples d'amorces utilisés).

**Tableau 1** : Séquences et températures de fusion (Tm) des différents couples d'amorces utilisés lors de cette thèse en PCR quantitative en temps réel. Les séquences ont été générées grâce au logiciel Primer 3.

Nom de l'amorce	Séquence	Tm
A4 sens	5'-TGG-TTC-TAA-CCG-CCT-TCA-TC-3'	60°C
A4 antisens	5'-ACG-GAA-CCT-CTT-TTT-GTT-CG-3'	58°C
D1 sens	5'-ATC-GTG-ACC-CCA-GTA-TCC-AT-3'	60°C
D1 antisens	5'-CCG-CAA-TAA-CGA-CCA-GAA-TAA-3'	60°C
F1 sens	5'-AGT-GTG-GAT-TTA-GCC-GGA-TG-3'	60°C
F1 antisens	5'-GAA-ATC-CGA-ATG-GAC-GAC-AT-3'	58°C
F3 sens	5'-GCT-TAC-TCG-TCA-TTG-TGT-CAA-3'	62°C
F3 antisens	5'-CAT-TCT-TCA-GCG-CAC-CTG-T-3'	58°C
H4 sens	5'-CAC-GAA-AGC-ACG-ATT-TCA-GA-3'	58°C
H4 antisens	5'-GAA-CGT-CTT-TCC-GAA-TGA-CA-3'	58°C
NPY sens	5'-CTT-TTG-GCC-GTG-TTA-CTG-GT-3'	60°C
NPY antisens	5'-CTG-AAG-CGA-GAG-GGT-CTG-TT-3'	62°C
EF1 sens	5'-ACC-ACC-CTG-GTG-AGA-TCA-AG-3'	60°C
EF1 antisens	5'-ACG-ACG-ATC-GCA-TTT-CTC-TT-3'	60°C

#### La PCR quantitative en temps réel

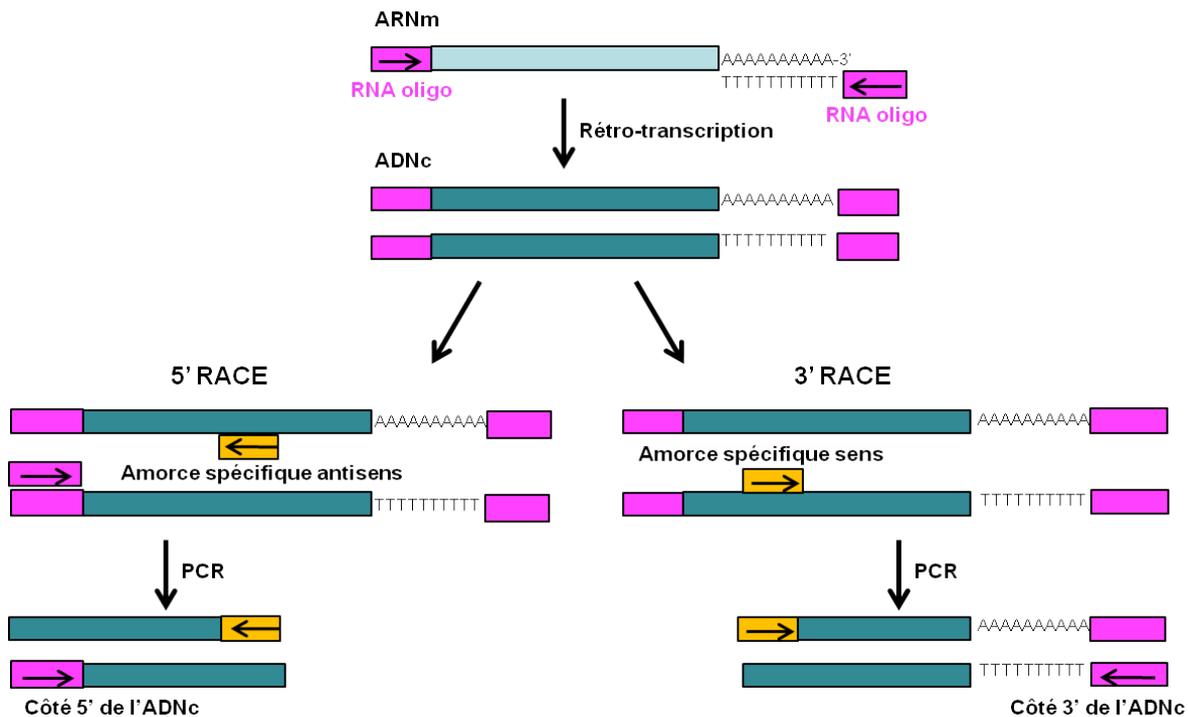
Pour chaque échantillon d'ADNc, l'expression des gènes d'intérêt étudiés est mesurée par la technique de PCR en temps réel, qui permet de visualiser la quantité relative des ARN messagers du gène étudié. La quantité de transcrits est calculée par rapport à l'expression de

gènes de référence par exemple à la quantité d'ARN messagers du facteur d'élongation EF1 pris comme standard de référence.

L'amplification est réalisée dans les puits d'une plaque de 96 puits (ABgene) dans le système iCycler (Bio-Rad). Chaque puits contient : 7,5 µL de Mix contenant du SYBR green Thermo fisher scientific (ABgene) contenant l'enzyme d'amplification, les dNTP et le tampon, 1,9 µL d'eau autoclavée, 5ng d'ADNc matrice, 0,45 µM d'amorce sens et 0,45 µM d'amorce anti sens. L'amplification commence par l'activation de l'enzyme avec un cycle à 95°C pendant 15 minutes, puis consiste en 1 cycle de 13 minutes 30 secondes à 95°C et 45 cycles de 15 secondes à 95°C puis de 45 secondes à 60°C. Elle est suivie d'une série de cycles permettant d'établir une courbe de fusion : 80 cycles de 10 secondes sont réalisés pour passer de 55°C à 95°C en augmentant la température de 0,5°C à chaque cycle. Les résultats sont visualisés puis analysés à partir du logiciel iCycler (Bio-Rad).

#### **4) 5'/3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) PCR**

La technique de 5'/3' RACE permet d'amplifier les extrémités 5' et 3' d'un fragment d'ADNc (figure 18). La première étape de cette technique consiste en une rétro-transcription (RT) durant laquelle est ajoutée une séquence nucléotidique spécifique (RNA oligo) à l'extrémité 5' des ARN messagers grâce à une ligase et au niveau de la queue poly-A de l'extrémité 3' grâce à l'hybridation d'oligo-dT complémentaires (Kit GeneRacer Core, Invitrogen), suivant les instructions du fournisseur. La seconde étape est une amplification par PCR avec une amorce antisens spécifique pour la 5' RACE ou une amorce sens spécifique pour la 3' RACE et en présence d'une amorce universelle correspondant à la séquence du RNA oligo incorporée lors de la RT (figure 18). Les produits de PCR sont purifiés sur colonne (kit Nucleospin Extract II, Macherey Nagel), clonés puis séquencés. La séquence entière de l'ADNc est obtenue en fusionnant les séquences chevauchantes des extrémités 5' et 3' RACE amplifiées.



**Figure 18** : Schéma de principe de l'amplification des extrémités 5' et 3' d'une séquence codante, par RACE-PCR. Les « RNA oligo » représentent les séquences reconnues par les amorces fournies dans le kit. Elles sont fixées à l'ADNc pendant la rétro-transcription, par une ligase pour l'extrémité 5', et grâce à une queue oligo-dT qui s'hybride à la queue poly-A de l'ARNm pour l'extrémité 3'. L'amplification de chaque extrémité de la séquence codante est réalisée par PCR classique, à l'aide d'un couple d'amorces spécifique et d'amorces du kit.

## E) Caractérisation de peptides

### **Extraction peptidique :**

Pour extraire les neuropeptides produits par le système nerveux central, les ganglions viscéraux de *C. gigas* adultes, mâles et femelles confondus, sont disséqués et placés immédiatement dans un bain bouillant à 0,1% d'acide acétique. Après 3 min d'incubation, et refroidissement sur glace, les ganglions sont broyés dans le même bain à l'aide d'un piston, puis les débris cellulaires sont éliminés à l'aide d'une centrifugation 5 min à 10 000 rpm et à 4°C. Les peptides contenus dans le surnageant sont alors purifiés et concentrés à l'aide d'une colonne Sep-Pak C18 (Waters®). Ces échantillons sont alors évaporés en attendant d'être analysés en spectrométrie de masse. Cette extraction à chaud permet l'isolation des peptides de faible poids moléculaire. Pour les peptides plus longs (20-30 acides aminés), les tissus disséqués sont broyés dans une solution à 0,1% d'acide acétique à 4°C.

### **Purification en HPLC :**

Les analyses sont effectuées sur une chaîne VARIAN composée d'une pompe à gradient VARIAN-9012 et d'un détecteur UV-VIS VARIAN-9050. L'acquisition est gérée par le logiciel Star (VARIAN). La liaison peptidique est détectée à 214nm. Les fractions correspondant au gradient sont collectées automatiquement par un collecteur Gilson 206.

Deux éluants filtrés sont utilisés afin de réaliser cette étape de séparation :

- Eluant A : Acide acétique 0,1%
- Eluant B : Acétonitrile 80%, acide acétique 0,1%

La séparation est réalisée sur une colonne Nucleodur C8 (Macherey Nagel, 250 x 4, 5µm) avec un gradient linéaire de 60 min d'acétonitrile, de 100% d'éluant A à 80% d'éluant B/20% d'éluant A, soit 1.33% par minute. Chaque fraction riche en peptides a alors été évaporée pour les analyses en spectrométrie de masse.

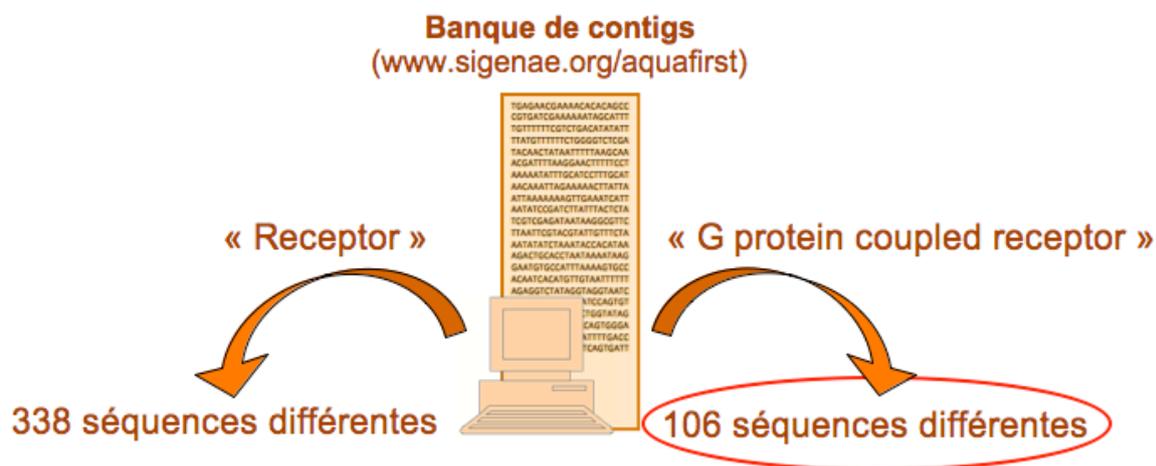
### **Spectrométrie de masse :**

Les analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées sur un analyseur protéomique AB Sciex 5800 équipé d'optiques ioniques TOF TOF et d'une irradiation laser OptiBeam™ avec un taux de répétition de 100 Hz. 0,8µL de chaque fraction d'HPLC est mélangé à 1,6µL de matrice CHCA préparée dans un solvant composé de 50% d'acétonitrile et 0,1% de TFA. Le mélange est alors spotted sur une plaque Opti-TOF™ à 384 cibles, évaporé, puis passé au spectromètre de masse. L'ionisation est réalisée à un laser d'intensité 3000, les spectres de masse sont acquis entre 600 et 4000 Da, et les spectres MS/MS ont été réalisés à l'aide d'une intensité de laser de 3900. Le profil de fragmentation est utilisé pour déterminer la séquence peptidique. Le spectre MS/MS du peptide est criblé par le logiciel Mascott 2.3.02 utilisant la dernière version de la base de données « Gigas Database » incluant 1 013 570 entrées ([http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/index.html](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html)). L'exactitude de masse a été configurée à 100 ppm et 0,6 Da pour la MS et la MS/MS, respectivement.

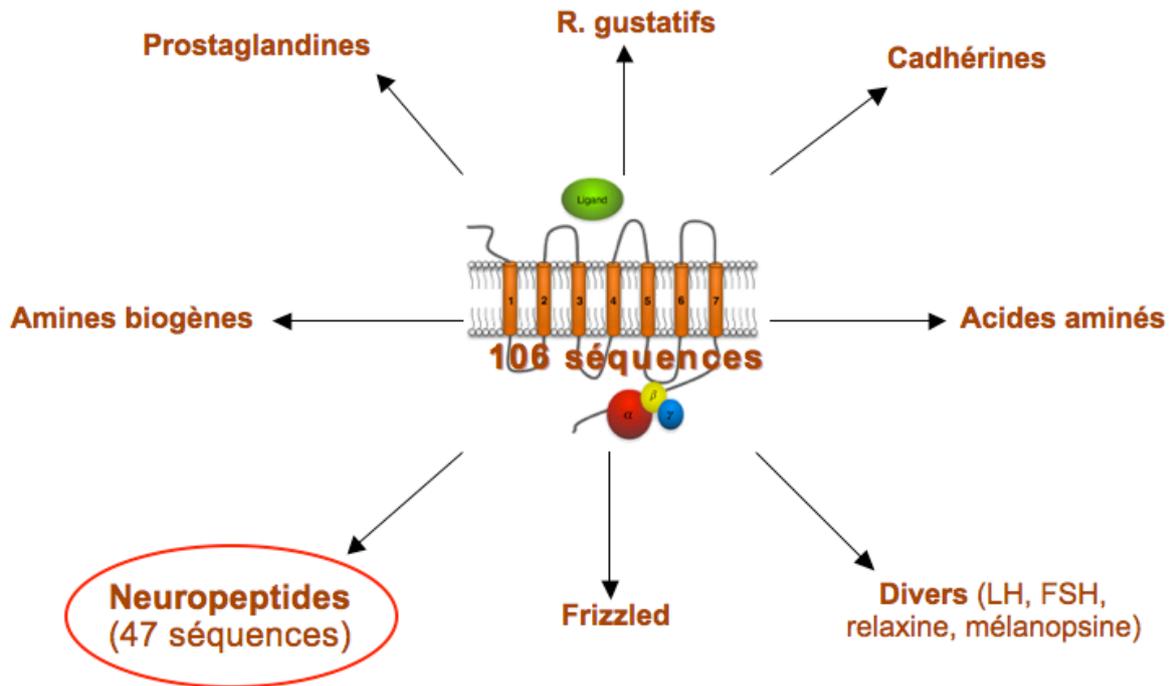
## Résultats :

### A) Identification et analyse bio-informatique des récepteurs couplés aux protéines G dans la banque de données génomiques de *C. gigas*

Par les recherches dans la banque Gigas Database (version 3) de *C. gigas*, 106 séquences uniques présentant des motifs de récepteurs couplés aux protéines G ont pu être identifiées (figure 19). Leur annotation a ensuite été vérifiée par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), par comparaison de leur séquence nucléotidique traduite à la banque de séquences protéiques répertoriées sur le site internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Pour la plupart des RCPGs, les comparaisons de séquences ont permis d'identifier la nature du ligand supposé, et donc de mettre en évidence les récepteurs susceptibles de lier des neuropeptides, qui représentent 47 séquences uniques de la banque (Figure 20). Pour les autres récepteurs, cette analyse n'a pas permis d'établir de ligands potentiels, parce qu'ils ne présentaient que peu d'homologies avec des RCPGs connus ; ils ont donc été éliminés pour les tests suivants. Après ce premier tri, seules 80 séquences nucléotidiques de RCPGs ont été retenues pour la suite des analyses bio-informatiques.



**Figure 19 :** Résultats de la recherche dans la banque d'ESTs de *C. gigas* Gigas Database, selon différentes annotations des séquences : « receptor », et « G protein-coupled receptor ».

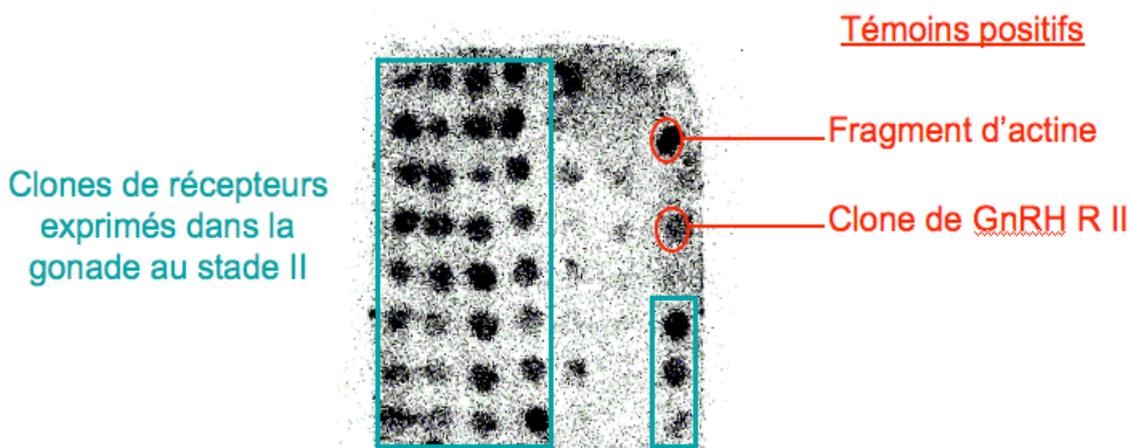


**Figure 20** : Représentation schématique des recherches effectuées dans la banque d'EST de *C. gigas*, et des résultats obtenus après analyse bio-informatique, sélection des séquences de RCPG d'intérêt.

Afin de déterminer la longueur des séquences à disposition, le nombre de domaines transmembranaires dans chaque séquence a été identifié. La majorité des séquences présentes dans la banque semblent partielles, puisque pour la plupart des récepteurs, nous ne disposons que de 4 à 5 domaines transmembranaires par séquence, sachant que cette famille de récepteurs présente 7 domaines transmembranaires.

## B) Détermination de l'implication potentielle des récepteurs dans les fonctions de reproduction et/ou de mise en réserve énergétique

La première démarche pour déterminer quel récepteur parmi les 80 sélectionnés peut être impliqué dans la régulation de la reproduction a été de réaliser des « macroarrays » à l'aide des clones bactériens constituant la banque d'ESTs. Ainsi, chaque clone codant pour un récepteur couplé aux protéines G identifié par BLAST a été testé à l'aide de sondes radioactives réalisées à partir des ARNm d'aire gonadique d'individus prélevés à différents stades. Le marquage radioactif obtenu avec chacune des 4 sondes (stade 0, stade I, stade II et stade III) a ensuite été analysé pour les différents clones de la banque hybridés sur membrane (figure 21).



**Figure 21** : Membrane contenant les clones bactériens sélectionnés à partir de la banque d'EST de *C. gigas*, et hybridée avec une sonde radioactive d'ADNc d'aire gonadique provenant d'individus adultes en stade II de gamétogenèse (mâles et femelles confondus). Tous les spots encadrés en bleu correspondent à des clones sur lesquels la sonde s'est hybridée, dont le « contig » est exprimé pendant le stade correspondant. Des témoins préalablement établis comme positifs ont également été déposés : un fragment d'ADNc d'actine et un clone bactérien exprimant le récepteur à la GnRH de type II de *C. gigas*.

Toutes les familles de RCPGs semblent exprimées dans l'aire gonadique, sauf les récepteurs aux prostaglandines qui sont peu ou pas exprimés dans ce tissu (tableau 2). Les RCPGs sont globalement exprimés tout au long du cycle de reproduction dans l'aire gonadique, mais parfois avec des intensités différentes. Toutefois, il est impossible de rapporter l'intensité de marquage à une quantité exacte de transcrits dans l'aire gonadique, puisque la quantité exacte de bactéries déposées pour chaque clone est inconnue. Cependant, par la comparaison de marquage pour l'actine, des différences importantes d'expression ont pu être mises en évidence, et sont répertoriées dans le tableau suivant.

**Tableau 2 :** Résultats de l'hybridation des sondes radioactives d'ADNc d'aire gonadique de *C. gigas* aux stades 0, I, II et III de gamétogenèse sur les clones codant pour les RCPGs de la banque d'EST. Les différences d'intensité pour chaque récepteur sont représentées par un nombre variable de « + », lorsque le clone n'est pas visible à l'autoradiographie, l'absence d'expression est représentée par « 0 ». Les références de chaque clone dans la banque d'EST sont répertoriées, ainsi que leur annotation, c'est-à-dire les récepteurs avec lesquels ils ont le plus d'homologie de séquence. Les cinq récepteurs potentiels au neuropeptide Y sélectionnés pour la suite des expériences sont en rouge, et leur nom provisoire est noté à côté de leur numéro de clone bactérien. Les 3 récepteurs caractérisés de *C. gigas* (CTR, GnRHRI et GnRHRII) servant de témoins positifs, puisqu'ils sont exprimés dans l'aire gonadique (Dubos *et al.*, 2003, Rodet *et al.*, 2005, 2008).

N° de clone	Annotation	E value	Stade 0	Stade I	Stade II	Stade III
aaa 14d11	5-HT-R	2e-24	++	+	++	+
cdn21 1j08 (=F1)	Adénosine/NPY-R	6e-06	+	0	0	0
aba 8i14	Angiotensine II-R	0.084	0	0	0	0
aaa 18h13	Calcitonine-R	2e-26	+	+	++	+
aba 28m14	Calcitonine-R	3.9	0	0	0	0
cdn37 17j02	Calcitonine-R	1e-14	+++	+++	++	+++
cdn37 18d23	Calcitonine-R	3e-11	+	0	0	0
aaa 21e18	CRF-R	5e-13	++	+	++	+
aba 34b11	CRF-R	1e-28	0	0	0	0
aaa 1c21	Dopamine-R	5e-55	++	+	++	++
aaa 10f01	FMRFamide-R	7e-34	+	+	+	+
aba 4p24	Frizzled	2e-43	0	0	0	0
cdn20 3b23	Frizzled	1e-09	++	++	+	++
cdn37 12i12	Frizzled	8e-109	++	+	+	++
cdn37 31i02	Frizzled	3e-17	+++	+++	++	+++
aaa 1f01	Galanine-R	4e-06	+	0	+	+
aaa 7p20	Galanine-R	3e-06	++	+	++	+
aaa 19e18	Galanine-R	0.15	++	+	++	+
cdn37 7h04	Galanine-R	1e-11	+	+	+	+
aba 32f22	Galanine/NPY-R	2e-06	0	0	0	0
cdn19 3c13	GH secretagogue-R	1e-27	+	0	0	0
aaa 10k06	Glutamate-R	3e-18	+	+	+	+
aaa 33p09	Glutamate-R	1e-11	++	+	++	+
cdn37 5c13	Glutamate-R	1e-73	0	0	+	0
cdn37 4g16	H parathyroïde-R	3e-40	+	0	+	+
aaa 41o13	Horm. diurétique-R	6e-05	+	+	++	+
aba 24f24	κ opioïde-R	5e-08	0	0	0	0
cdn21 3d10	Latrophiline 2-R	6e-09	+++	+++	+++	+++
cdn37 21i18	Latrophiline 2-R	3e-28	++	++	+	++
aaa 38i08	Melanocortine-R	0.001	++	0	++	+
cdn19 3f03	Mélatonine-R	4e-17	+	0	+	+
aaa 6i10	Myosuppressine-R	3e-30	++	+	++	+
aaa 2j17	Neuromedine K-R	3e-33	++	+	++	+
cdn37 10a05	Neuromedine U-R	3e-09	+	+	+	+
aaa 36p18	NPFF-R	3e-23	++	0	++	+
aaa 18c07	NPFF-R	4e-41	+	+	++	+
aaa 11f16	NPFF/NPS-R	6e-04	+	+	+	+
aaa 13f06	NPS-R	7e-10	++	+	++	+
cdn37 35p03	NPS/NPY-R	1e-09	+	0	+	+
aaa 4m18 (=D1)	NPS/NPY-R	3e-11	+	+	++	+
aaa 41j21 (=H4)	NPS/NPY-R	8e-09	++	+	0	+

aaa 36h18 (=A4)	NPY-R	1e-10	0	+	++	+
cdn19 3o04	NPY-R	5e-07	+	0	+	+
aaa 20p05	NPY/NPFF-R	0.006	+	+	+	+
aaa 41e20	NPY/opioïde-R	1e-05	+	0	+	+
aaa 24g08	NPY/orexine-R	5e-19	++	+	++	+
aaa 28i21 (=F3)	NPY/sNPF-R	2e-92	++	+	++	+
aaa 6f23	Orexine-R	6e-15	+	+	++	+
aaa 38g08	Proctoline-R	3e-05	+	0	++	+
aba 2i14	Prostaglandine-R	3e-11	++	0	0	0
aba 7c15	Prostaglandine-R	4e-19	0	0	0	0
aba 12b03	Prostaglandine-R	1e-10	0	0	0	0
aba 14i04	Prostaglandine-R	7e-12	0	0	+	0
aba 16g23	Prostaglandine-R	1e-13	0	0	0	0
aba 31f24	Prostaglandine-R	8e-10	0	0	0	0
aba 42m24	Prostaglandine-R	8e-11	0	0	0	0
cdn21 3b03	Prostaglandine-R	8e-23	0	0	0	0
cdn21 4j22	Prostaglandine-R	2e-10	0	0	0	+
cdn37 23o16	Prostaglandine-R	3e-05	+	0	+	+
cdn19 3b14	Secrétine-R	2e-26	0	0	+	+
aba 12j03	Secrétine-R	6e-08	0	0	0	0
aaa 7g21	Somatostatine-R	8e-10	0	+	++	+
aba 28j23	Tachykinine-R	8e-15	0	0	0	0
aaa 14g20	Tréhalose-R	7e-26	+	+	++	+
cdn37 7n16	VIP-R	0.52	++	++	++	++
	Cg-CTR		0	++	0	+
	Cg-GnRHRI		+	0	++	+
	Cg-GnRHRII		++	+++	++	++
	<b>Actine</b>		<b>OK</b>	<b>OK</b>	<b>OK</b>	<b>Faible</b>

### C) Sélection des récepteurs d'intérêt et étude de leur expression par PCR quantitative en temps réel

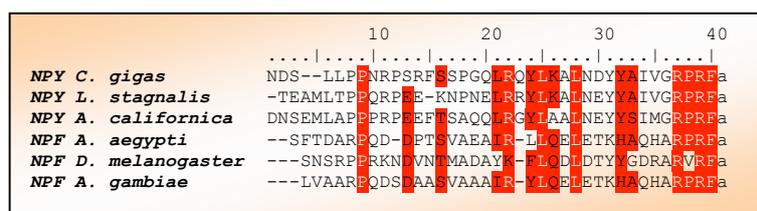
D'après les résultats présentés dans le tableau 1, de nombreux RCPGs, y compris des récepteurs probables de neuropeptides, sont exprimés dans l'aire gonadique de l'huître. Après vérification des BLASTs, cinq récepteurs ont été sélectionnés du fait de leurs fortes homologues ( $E < 10^{-6}$ ) avec les récepteurs du neuropeptide Y/F, et sont répertoriés en rouge dans le tableau.

#### 1) **Etude du neuropeptide Y/F**

L'ADN complémentaire codant le précurseur de ce neuropeptide est présent dans la banque de données Gigas Database disponible pour *C. gigas* (GenBank: CU983945.1). Il comporte 648 paires de bases codant pour un cadre ouvert de lecture (ORF) de 99 acides aminés, entre la première méthionine et le premier codon STOP (annexe I).

Cette séquence contient un peptide signal probable de 37 acides aminés (résidus 1 à 37), selon le logiciel SignalP3.0 disponible sur le site <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>. Le neuropeptide Y/F déduit de cette séquence est composé de 39 résidus, sa séquence est la suivante : NDSLLPPNRPSRFSSPGQLRQYLKALNDYYAIVGRPRFamide. Un site de clivage dibasique est reconnaissable en position 76 et 77, et est composé des résidus K et R, précédé d'un résidu Glycine (position 75) qui marque l'amidation du peptide à l'extrémité C-terminale.

Ce neuropeptide semble bien conservé au sein des mollusques, puisque le neuropeptide, comme le précurseur en général, montre une faible variabilité entre les 3 espèces de mollusques considérées, *L. stagnalis*, *A. californica* et *C. gigas* (figure 22).

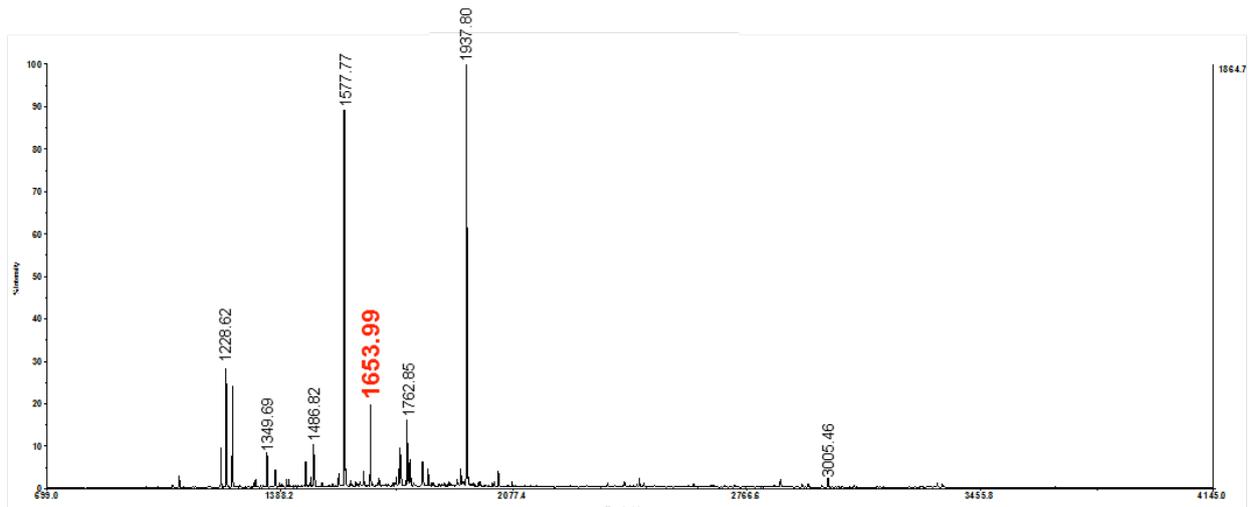


**Figure 22** : Alignement des séquences protéiques des précurseurs de NPY/F de mollusques. Numéros d'accèsion GenBank : *Crassostrea gigas* : CU983945.1, *Aplysia californica* : AAA27772.1, *Lymnaea stagnalis* : CAB63265.1. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit, par ClustalW.

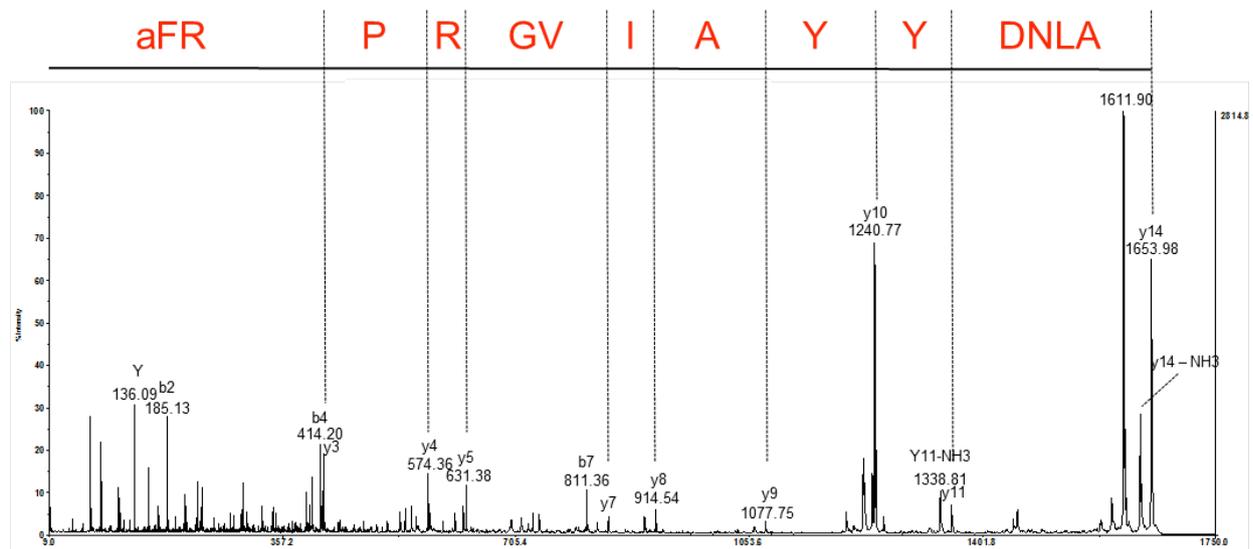
A partir de la séquence nucléotidique du précurseur, des amorces de PCR quantitatives ont pu être dessinées, afin d'étudier l'expression de celui-ci au sein des différents tissus de l'huître adulte. Le neuropeptide Y/F présente ainsi une expression localisée exclusivement dans les ganglions viscéraux, qui, représentant le siège du système nerveux central, sont donc logiquement le lieu de synthèse de ce neuropeptide (figure 24A). On remarque de plus une expression relativement forte du précurseur du NPY/F au sein de ces ganglions, puisqu'il est seulement 10 fois moins exprimé que le gène de ménage, EF1.

Pour confirmer la présence de ce peptide mature au sein des ganglions viscéraux, une détection par spectrométrie de masse sur un extrait peptidique de ganglions viscéraux d'huîtres a été entreprise. Malheureusement, nos techniques d'extraction et de détection n'ont pas permis de le mettre en évidence, mais une forme tronquée de ce neuropeptide a pu être identifiée dans les ganglions viscéraux. Ce NPY/F tronqué a pour séquence ALNDYYAIVGRPRFamide (figure 23).

## MS



## MS/MS

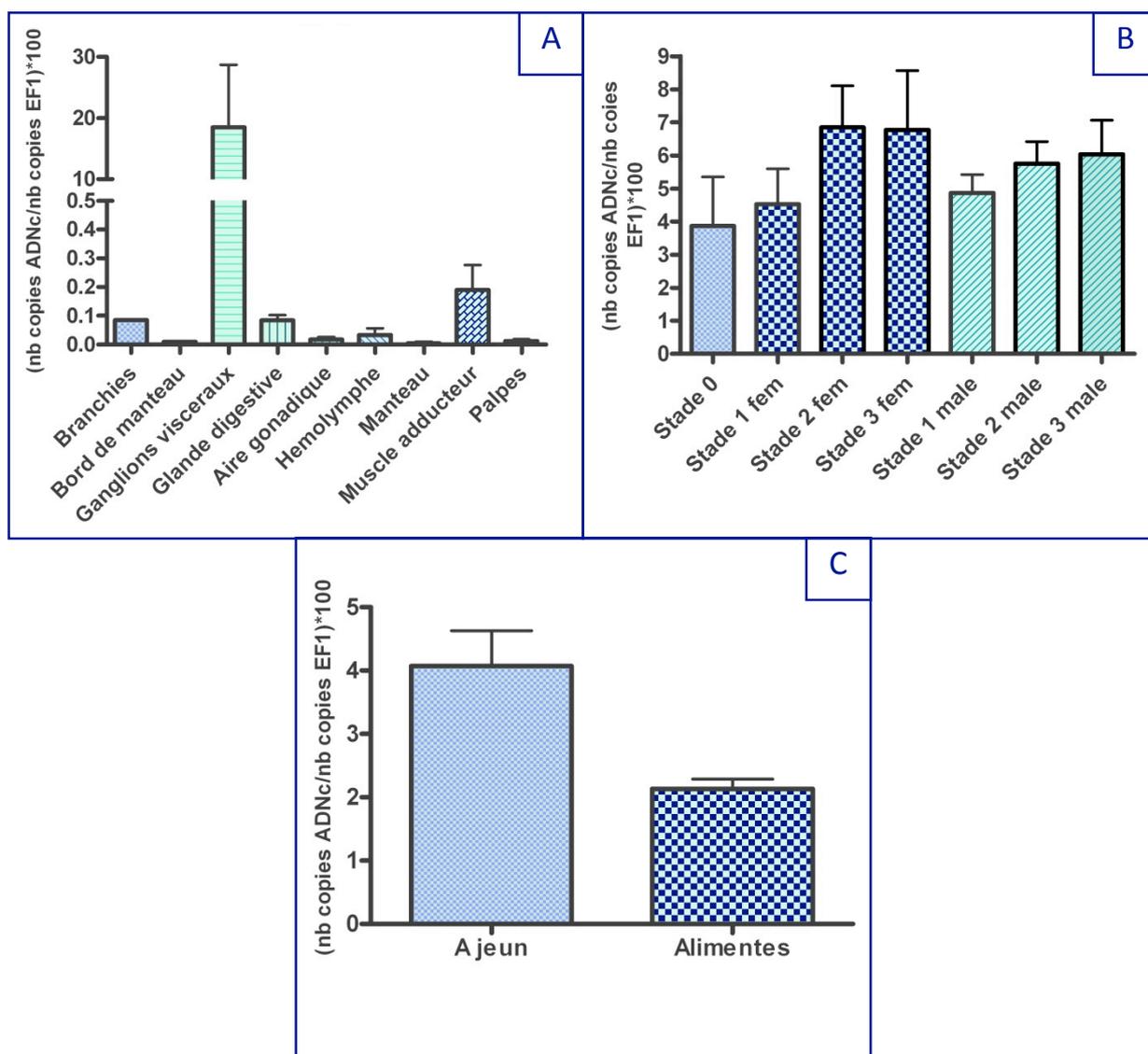


**Figure 23 :** Spectre MS (Mass Spectrometry) représentant la diversité des peptides retrouvés dans les ganglions viscéraux de *C. gigas*, avec le pic correspondant au NPY/F tronqué à une masse de 1653.99, identifié en rouge. Fragmentation par spectrométrie de masse (MS/MS) du neuropeptide F/Y tronqué, chaque pic détecté correspondant à un résidu d'acide aminé (noté en rouge au-dessus), séquence déduite : ALNDYYAIVGRPRFamide.

Afin d'identifier d'éventuelles modulations de la transcription du précurseur, et donc de la production du NPY/F tronqué ou non, son expression a été étudiée ensuite dans les ganglions selon différentes conditions. Tout d'abord, chez des individus triés selon leur sexe et leur stade de reproduction, afin d'obtenir un aperçu de la présence d'ARNm de NPY/F au cours du cycle de gamétogenèse, dans le système nerveux central. Les transcrits semblent présents en même proportion chez les individus mâles et les individus femelles, toutefois il apparaît que cette expression augmente progressivement avec l'avancement de la

gamétogenèse. En effet, chez les mâles comme chez les femelles, les individus en stade 0 et 1 présentent une expression de NPY/F plus faible que les individus en stade 2 et 3 (figure 24B).

Enfin, compte tenu des rôles tenus par le neuropeptide Y chez les Vertébrés, nous nous sommes intéressés à l'expression de ces récepteurs, ainsi que du NPY/F, lors de différentes conditions trophiques. Pour cela, des individus adultes de *C. gigas* ont été placés dans deux bassins différents : l'un contenant 15 animaux alimentés régulièrement en microalgues, et l'autre contenant 15 animaux laissés à jeun. Après ce conditionnement de 3 jours, les ganglions viscéraux ont été prélevés, puisqu'ils représentent le lieu de plus forte expression des récepteurs et du peptide. L'expression de ces 6 gènes a donc été mesurée dans chaque ganglion individuellement, puis regroupée pour chaque condition. Toujours mesurée dans les ganglions viscéraux, seul organe où sont présents les transcrits de NPY/F, cette expression varie de manière importante entre les deux catégories d'individus (figure 24C). Les individus placés à jeun présentent une forte surexpression du précurseur de NPY/F, entraînant vraisemblablement une production accrue du neuropeptide.



**Figure 24** : Expression du gène codant le précurseur de NPY/F de *C. gigas* mesurée par PCR quantitative en temps réel dans les différents tissus adultes (A), dans les ganglions viscéraux au cours du cycle de reproduction (B), pour 4 à 5 pools de 6 individus par stade et par sexe, et lors d'un conditionnement trophique (C), pour 15 individus placés à jeun (-) et 15 individus nourris (+). Le nombre de copies d'ADNc est exprimé en fonction du nombre de copies d'EF1, le gène de référence.

## 2) Etude des cinq récepteurs potentiels au neuropeptide F/Y

Pour les cinq récepteurs étudiés, leur séquence complète a tout d'abord été déterminée, soit par le « contigage » des différents ESTs correspondants dans la banque Gigas Database, soit par amplification et séquençage des extrémités 5' et 3' à partir d'un fragment de séquence, par la technique de RACE-PCR. La quantité relative de transcrits de chacun d'entre eux a ensuite été mesurée par PCR quantitative en temps réel dans les différents tissus adultes

et sous différentes conditions. Bien que les ESTs codant pour ces récepteurs aient été sélectionnées pour leur forte homologie avec des récepteurs au NPY/F, les séquences entières obtenues par RACE-PCR (annexes II à VI) présentent, pour certaines, des similitudes avec d'autres récepteurs de neuropeptide. Les récepteurs présentés restent néanmoins proches des récepteurs au neuropeptide Y/F, et ont été étudiés plus particulièrement.

- Le récepteur A4

La séquence de ce récepteur est composée d'un ORF de 353 acides aminés, contenant 7 domaines transmembranaires, comme tous les récepteurs couplés aux protéines G (annexe II).

Cette séquence entière a ensuite été comparée à une banque de données protéiques, à l'aide du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, et il s'avère qu'elle présente de fortes similarités avec la séquence du récepteur de type 2 au neuropeptide FF de l'humain, avec 33% d'identité et une E value de  $10^{-40}$  (figure 25). Ce neuropeptide FF est impliqué dans diverses fonctions neuroendocrines, il possède notamment des propriétés anti-opioïdes, ces derniers étant impliqués dans le contrôle de la douleur (Moulédous *et al.*, 2010). Les récepteurs au neuropeptide FF identifiés par Lamah *et al.* (2010) ont, quant à eux, des effets divers sur la nociception. Ce neuropeptide étant très proche du neuropeptide Y/F, leurs récepteurs sont également similaires, donc le rapprochement du récepteur A4 avec un récepteur NPFF est vraisemblable. D'après l'alignement ci-dessus, il semblerait que la différence majeure entre ces deux récepteurs se situe au niveau de la partie C-terminale intracellulaire, qui est beaucoup plus longue sur le récepteur NPFF d'humain que sur le récepteur A4 de *C. gigas*.

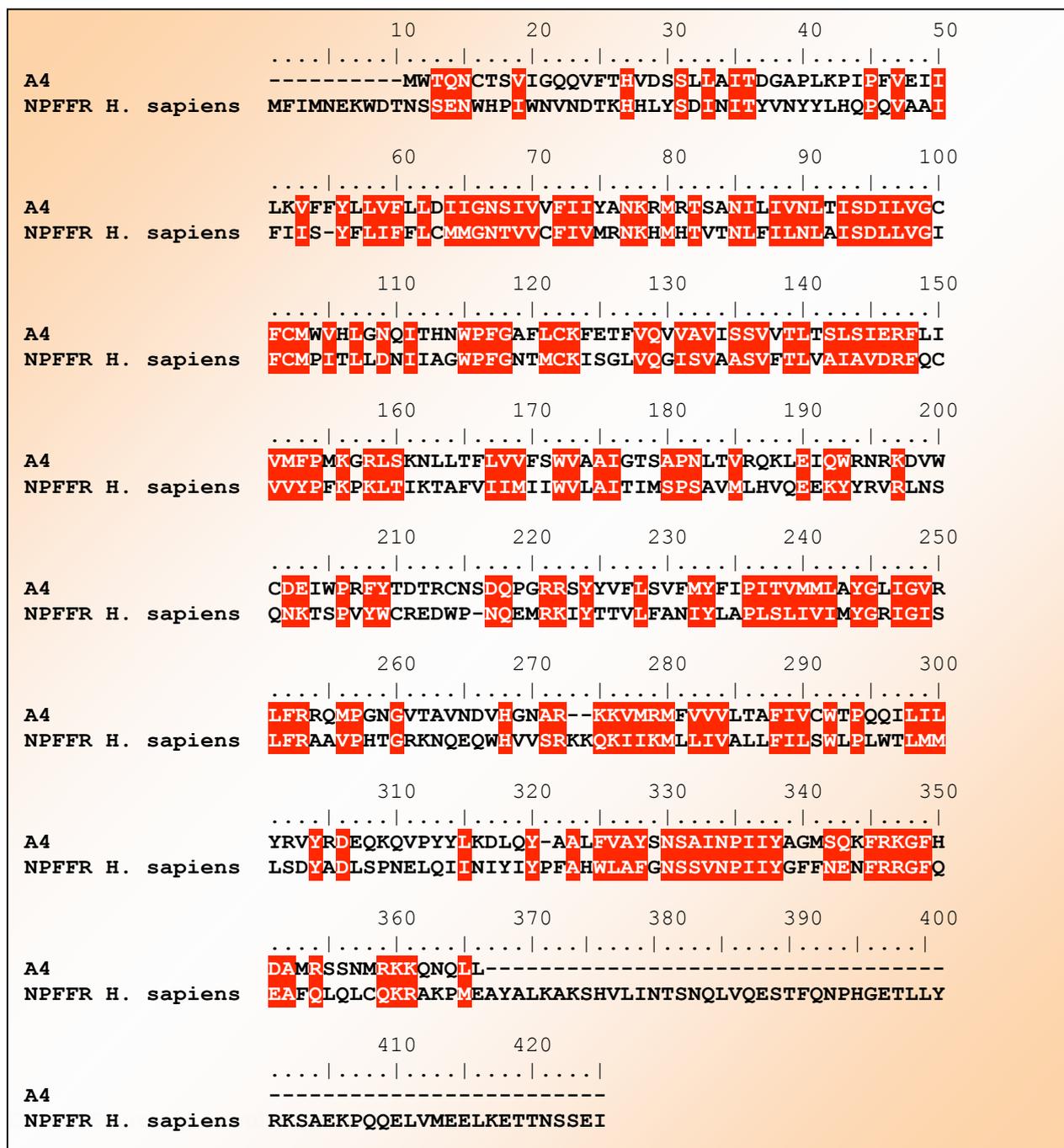
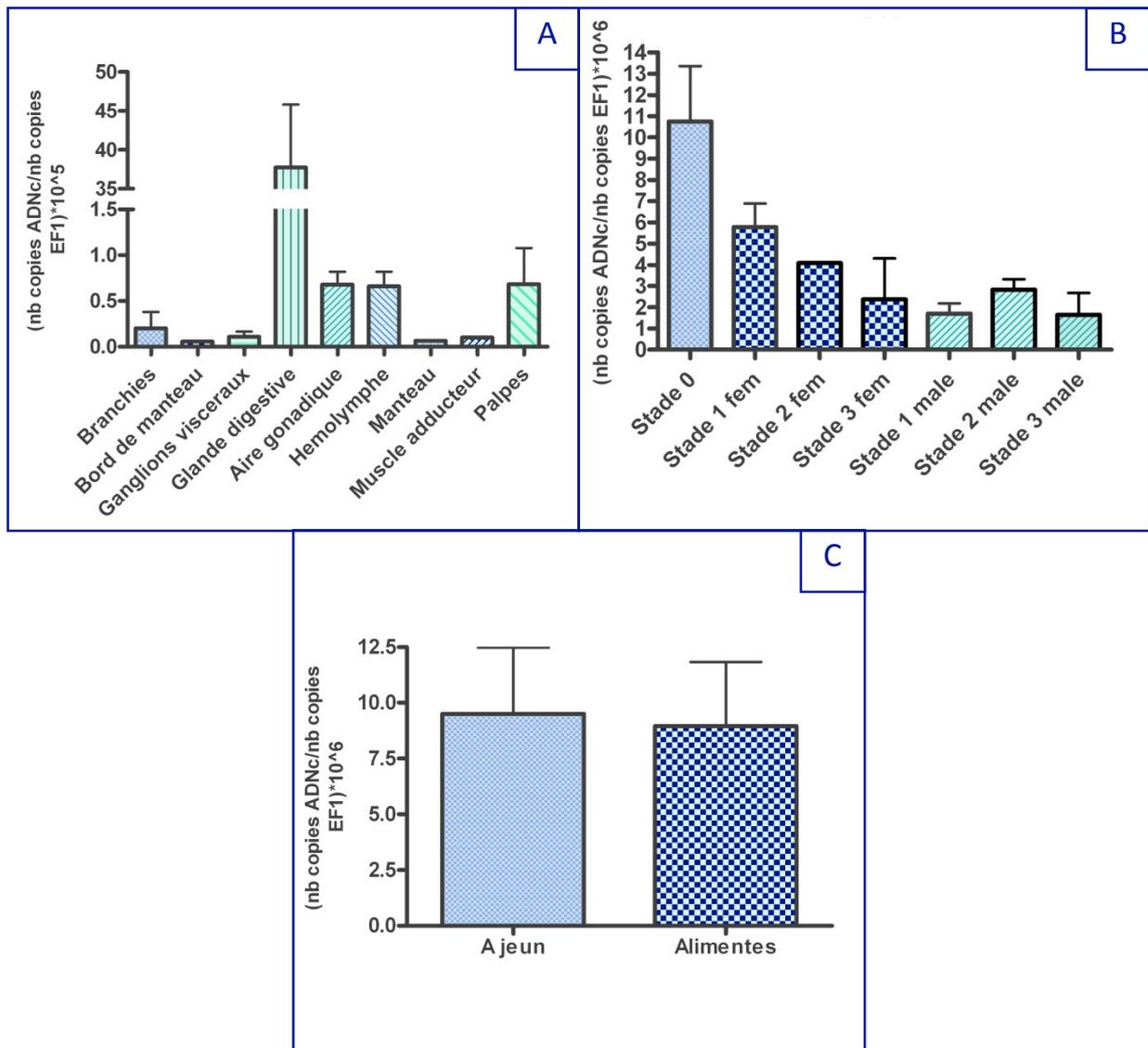


Figure 25 : Alignement du récepteur A4 de *C. gigas* avec le récepteur au neuropeptide FF de type 2 d'*H. sapiens*, numéros d'accèsion GenBank : AAI01637.1. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit, par ClustalW.

A l'aide des amorces de PCR quantitative dessinées sur cette séquence, l'expression du gène codant pour ce récepteur a été quantifiée sur les mêmes échantillons que pour le précurseur du NPY/F. Ainsi, ce récepteur, contrairement au neuropeptide, est très peu exprimé au niveau des ganglions viscéraux, puisqu'il est presque exclusivement présent dans la glande digestive (figure 26A). Une faible expression est toutefois détectable dans l'aire

gonadique, qui représente un mix d'échantillons de tissu à différents stades gamétogénétiques, et n'est donc pas représentative de l'expression aux différents stades. Afin de déterminer si cette faible expression est due à des variations d'expression au cours de la gamétogenèse, la quantité de transcrits a été mesurée dans des échantillons d'aire gonadique prélevés aux différents stades de reproduction. L'expression du récepteur A4 diminue durant le cycle de reproduction. En effet, les individus en stade 0 présentent une expression du récepteur A4 3 à 4 fois supérieure à celle des individus en stade 2 ou 3, mâles et femelles confondus (figure 26B). De telles expériences n'ont pas pu être menées sur les ganglions viscéraux au cours de la gamétogenèse, compte tenu de sa très faible expression. En revanche, sur les 30 individus ayant subi le conditionnement trophique, un nombre statistiquement suffisant présentait une expression du gène A4 quantifiable en PCR quantitative. Ainsi, les analyses ont montré que ce récepteur ne semblait pas différentiellement exprimé selon la condition alimentée ou à jeun des individus (figure 26C).



**Figure 26 :** Expression du gène du récepteur A4 de *C. gigas* mesurée par PCR quantitative en temps réel dans les différents tissus adultes (A), dans l'aire gonadique au cours du cycle de reproduction (B), pour 4 à 5 pools de 6 individus par stade et par sexe, et dans les ganglions viscéraux lors d'un contionnement trophique (C), pour 15 individus placés à jeun (-) et 15 individus nourris (+). Le nombre de copies d'ADNc est exprimé en fonction du nombre de copies d'EF1 (Elongation Factor 1), le gène de référence.

- Le récepteur D1

L'ORF complet du gène codant pour ce récepteur contient 385 acides aminés, de la première méthionine au codon stop et présente également 7 domaines transmembranaires.

Par alignement de séquences protéiques, ce récepteur présente de fortes homologies avec le récepteur annoté de type NPY/F du mollusque gastéropode *Haliothis discus*, avec 25% d'identité et une E value de  $10^{-19}$  (figure 27). On peut remarquer une grande similarité de

séquence, ce qui confirme l'appartenance du récepteur D1 à la famille des récepteurs aux neuropeptides. De plus, les deux séquences ont quasiment la même longueur, bien que le récepteur de *C. gigas* soit un peu plus long que celui d'*H. discus*.

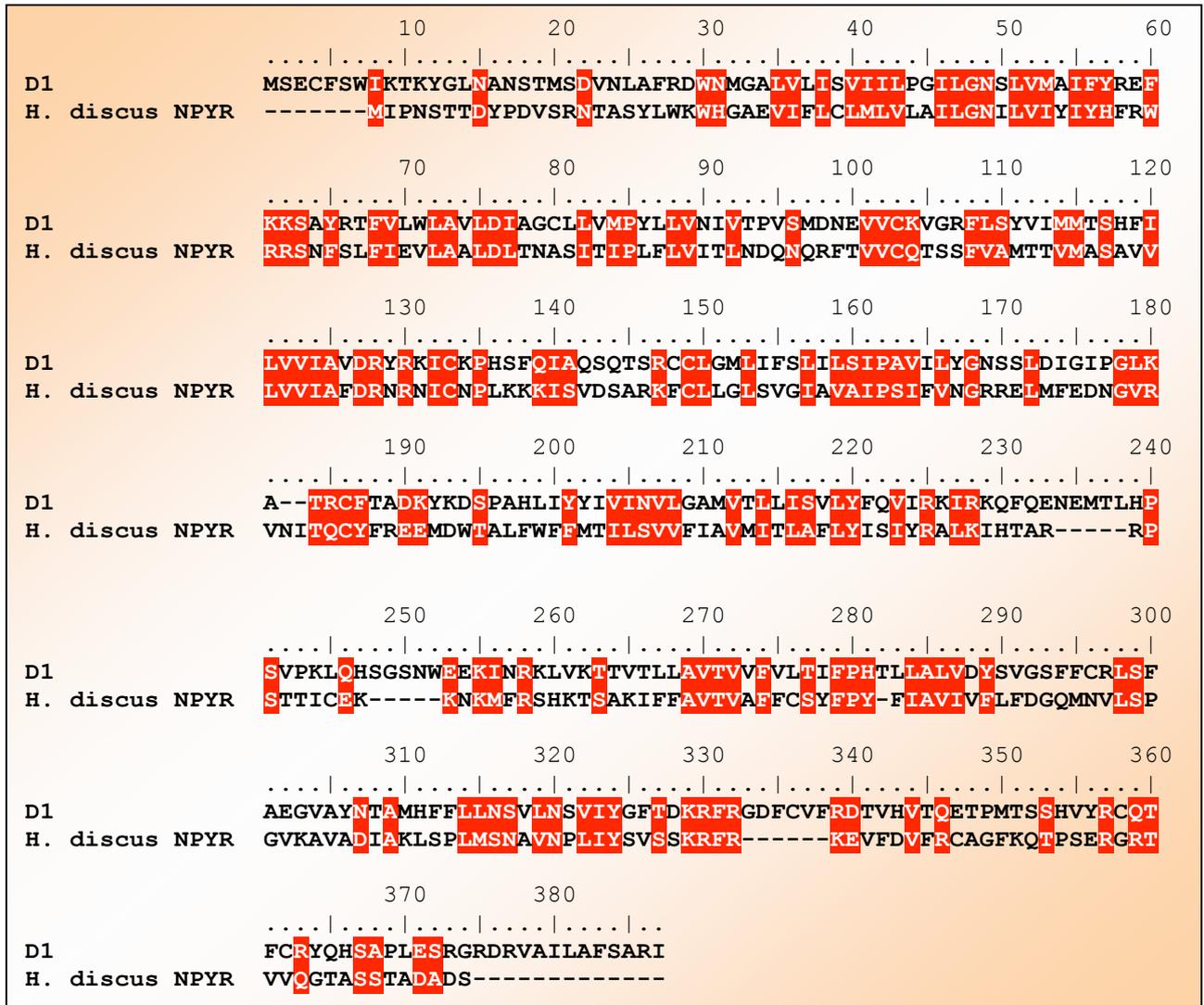
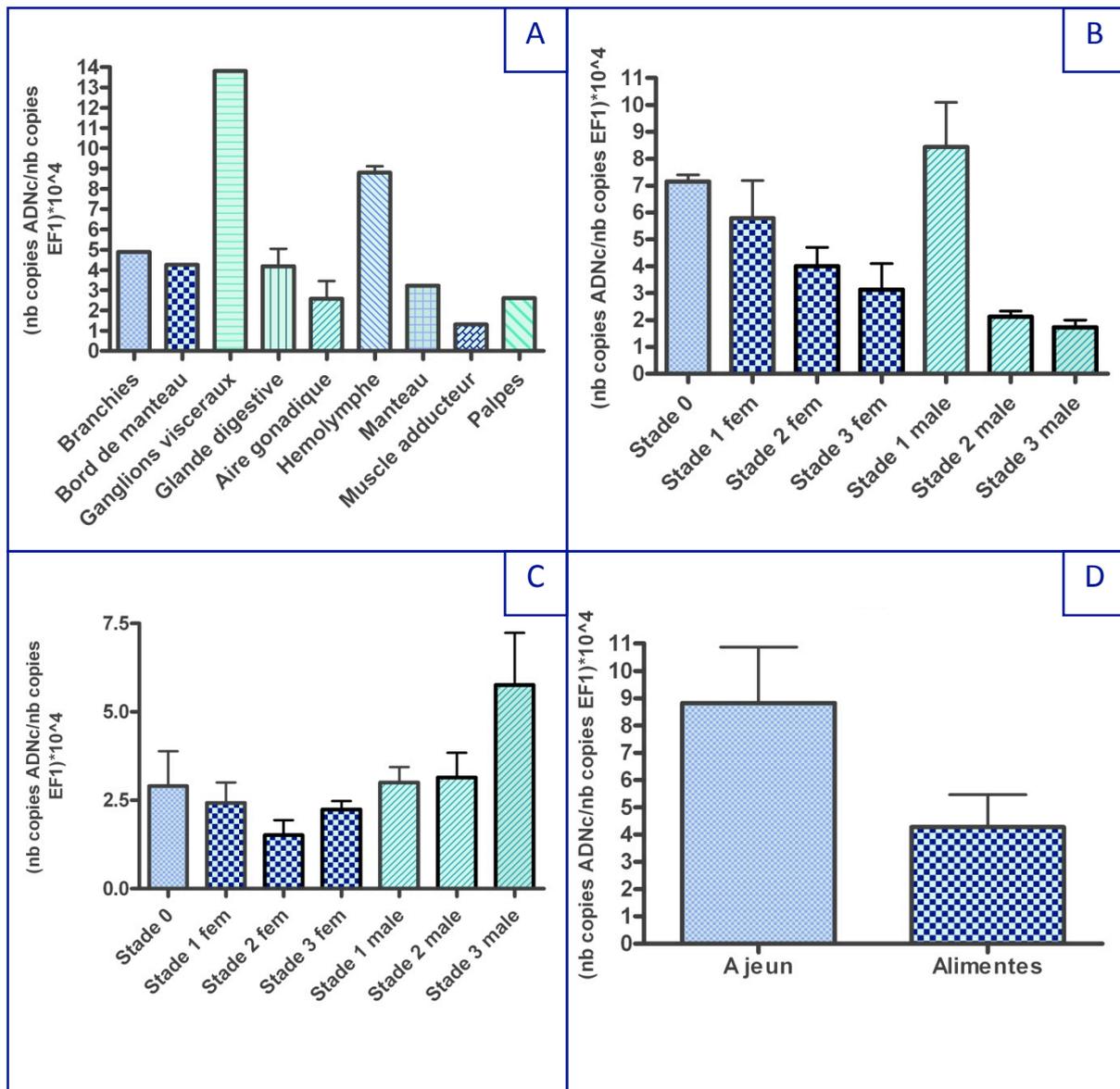


Figure 27 : Alignement du récepteur D1 de *C. gigas* avec le récepteur au neuropeptide Y/F d'*Haliotis discus*, numéros d'accèsion GenBank : ABH10673.1. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit, par ClustalW.

A partir de cette séquence, des amorces de PCR quantitative ont été dessinées, et ont permis de déterminer la quantité de transcrits sous différentes conditions. L'étude de la présence de transcrits de ce récepteur dans les différents tissus de l'adulte n'a pas mis en évidence d'expression exclusive dans un tissu, cependant il semble que D1 soit majoritairement exprimé dans les ganglions viscéraux et dans les hémocytes, bien que son expression dans les autres tissus (branchies, bord de manteau, glande digestive, aire gonadique, manteau, muscles, palpes) ne soit pas négligeable (figure 28A). Ainsi, son

expression a pu être suivie au cours de la gamétogenèse dans l'aire gonadique mais également au sein des ganglions viscéraux. Dans l'aire gonadique, il semble que cette expression diminue au cours du cycle, les individus de stades 0 et 1 présentant une plus forte expression que les individus en stades 2 et 3, mâles et femelles, ce qui rappelle le profil d'expression du récepteur A4 (figure 28B). Toutefois, ce profil n'est pas identique dans les ganglions viscéraux, puisque son expression semble être à peu près stable au cours du cycle dans le système nerveux central chez les femelles, alors que le nombre de transcrits de D1 augmente chez les mâles au cours de la gamétogenèse, notamment au stade 3 (figure 28C). Tout comme pour le neuropeptide Y/F, l'expression de ce récepteur est modulée en fonction de l'apport en nourriture, puisqu'on observe une augmentation du nombre de transcrits de D1 chez des individus placés à jeun, comparé à des animaux alimentés (figure 28D). Cette expression est doublée en l'absence de nourriture, ce qui montre bien l'influence du conditionnement trophique sur la synthèse du récepteur D1.



**Figure 28 :** Expression du gène du récepteur D1 de *C. gigas* mesurée par PCR quantitative en temps réel dans les différents tissus adultes (A), dans l'aire gonadique (B) et dans les ganglions viscéraux (C) au cours du cycle de reproduction, pour 4 à 5 pools de 6 individus par stade et par sexe, et dans les ganglions viscéraux lors d'un conditionnement trophique (D), pour 15 individus placés à jeun (-) et 15 individus nourris (+). Le nombre de copies d'ADNc est exprimé en fonction du nombre de copies d'EF1 (Elongation Factor 1), le gène de référence.

- Le récepteur F3

La séquence de ce récepteur traduite montre un cadre ouvert de lecture de 404 acides aminés, de la première méthionine au premier codon stop (annexe IV).

Cette séquence, proche des récepteurs au NPY/F comme les 4 autres, présente plus d'homologies encore avec le récepteur du sNPF d'*Anopheles gambiae*, avec 46% d'identité, pour une E value de  $10^{-92}$  (figure 29).

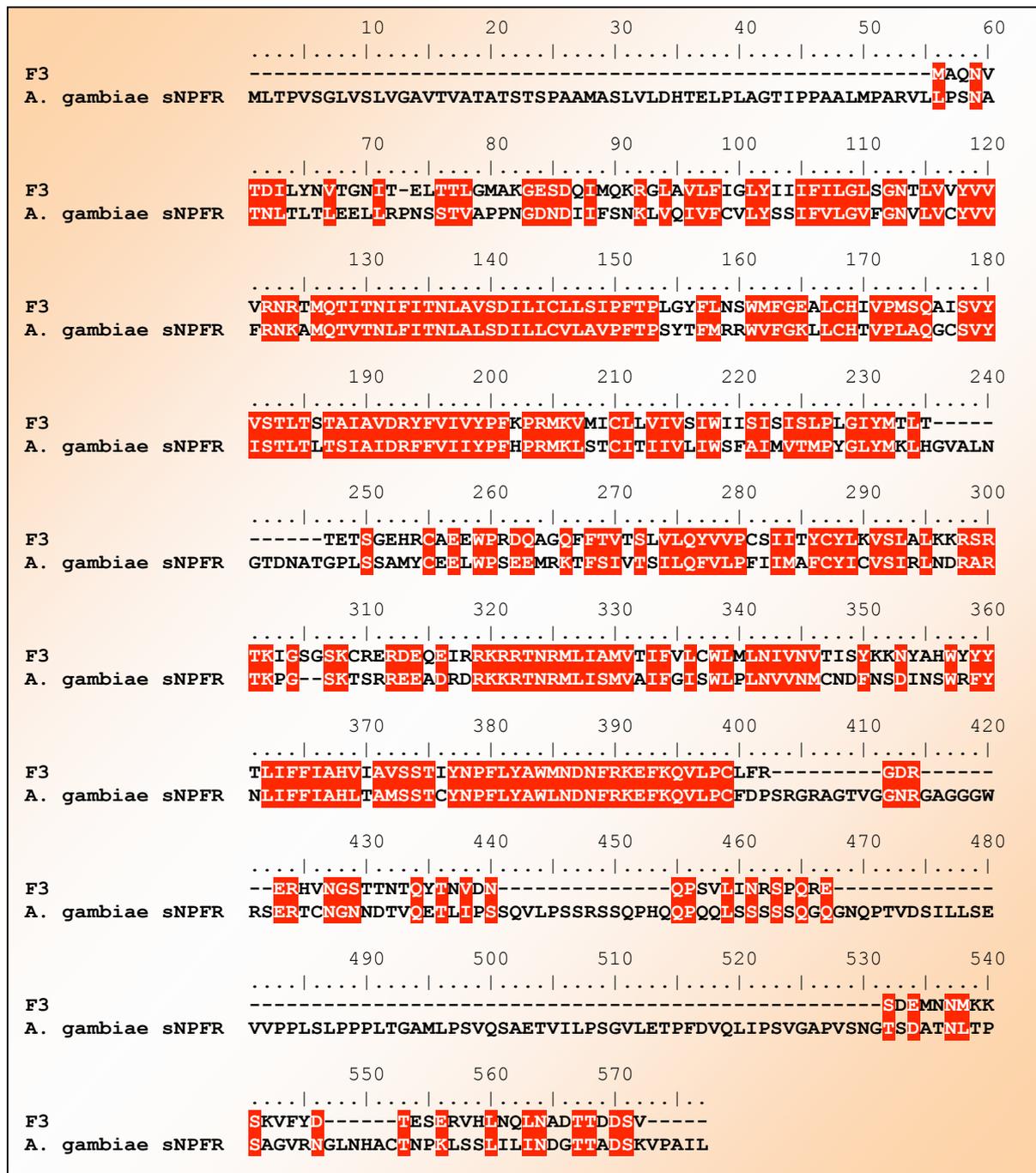
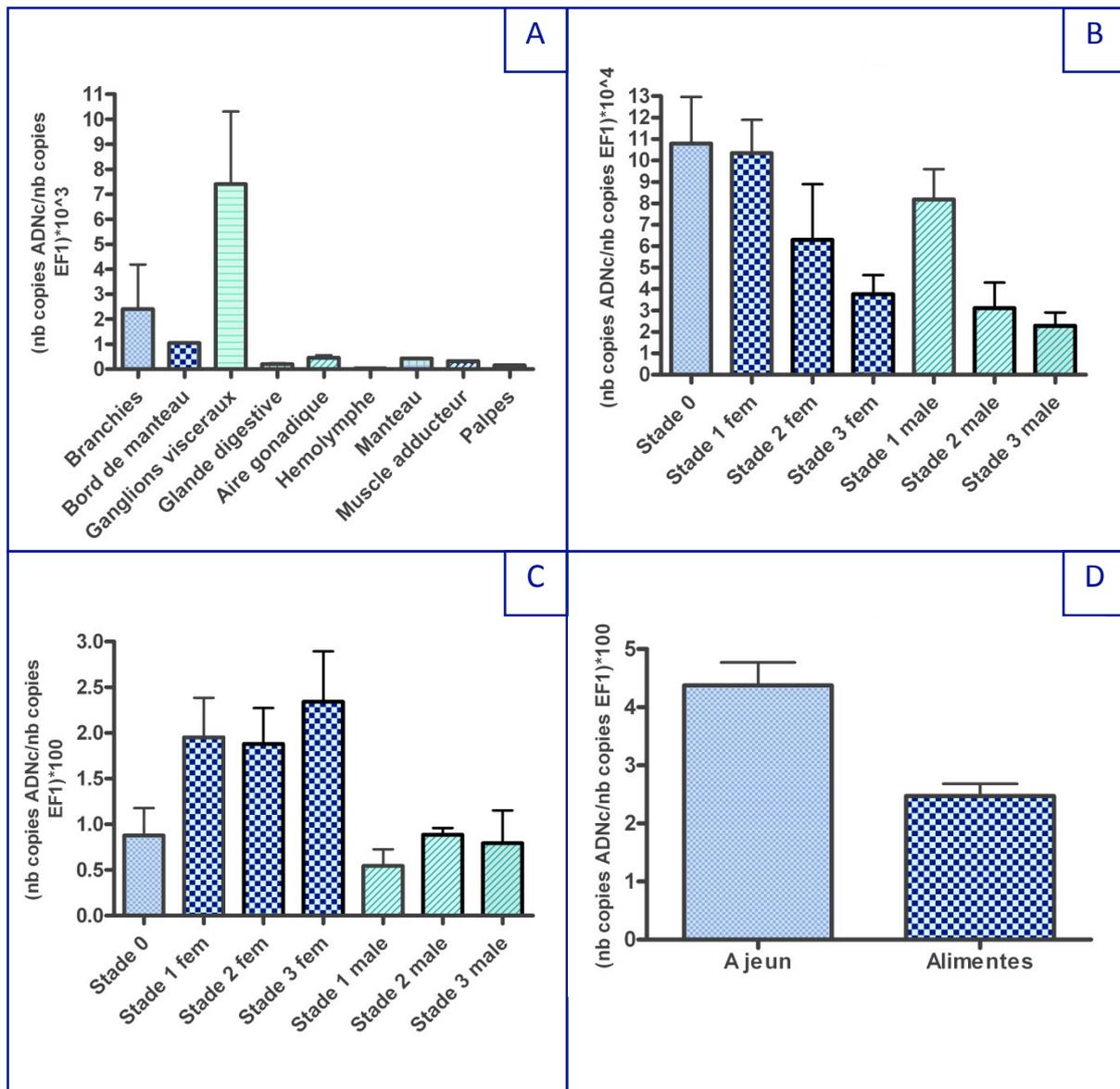


Figure 29 : Alignement du récepteur F3 de *C. gigas* avec le récepteur du sNPF d'*Anopheles gambiae*, numéro d'accèsion GenBank : ABD96049.1. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit, par ClustalW.

Bien que ce récepteur sNPF présente une extrémité N-terminale un peu plus longue que le récepteur F3, ces deux récepteurs présentent un nombre important de motifs protéiques

entièrement similaires, ce qui semble confirmer l'appartenance de ce récepteur à la famille des récepteurs du (s)NPY/F.

L'expression de ce récepteur a été étudiée dans les mêmes conditions que pour les autres gènes étudiés. Tout comme le ligand NPY/F, ce récepteur est exprimé essentiellement dans les ganglions viscéraux, siège du système nerveux central et lieu de production des neuropeptides. On observe toutefois une expression non négligeable dans les branchies et le bord de manteau. Il est également exprimé de manière plus faible dans la plupart des autres tissus (figure 30A). La présence de ce récepteur dans les différents tissus adultes permet ainsi d'étudier les régulations de la transcription de F3 lors de la gamétogenèse dans l'aire gonadique ainsi que dans les ganglions viscéraux. Dans le tissu reproducteur, tout comme pour les autres récepteurs et le NPY/F, on peut observer une diminution de l'expression du récepteur avec l'avancement du cycle de reproduction, qui se traduit par un nombre de transcrits de F3 plus faible aux stades 2 et 3, comparé aux stades 0 et 1 (figure 30B). Cependant, dans les ganglions viscéraux, les variations d'expression du récepteur semblent différentes. En effet, le récepteur F3 semble exprimé de manière bien plus importante chez les femelles que chez les mâles, ce qui est visible sur les stades 1 à 3, puisque les sexes ne sont pas différenciables par analyses histologiques au stade 0 (figure 30C). Enfin, lors de conditionnement trophique, on observe la même régulation transcriptionnelle que pour le ligand NPY/F et pour le récepteur D1, puisque F3 est visiblement surexprimé chez des animaux placés à jeun, comparativement à des individus alimentés (figure 30D).



**Figure 30 :** Expression du gène du récepteur F3 de *C. gigas* mesurée par PCR quantitative en temps réel dans les différents tissus adultes (A), dans l'aire gonadique (B) et dans les ganglions viscéraux (C) au cours du cycle de reproduction, pour 4 à 5 pools de 6 individus par stade et par sexe, et dans les ganglions viscéraux lors d'un conditionnement trophique (D), pour 15 individus placés à jeun et 15 individus nourris. Le nombre de copies d'ADNc est exprimé en fonction du nombre de copies d'EF1 (Elongation Factor 1), le gène de référence.

#### 1) Le récepteur H4

La séquence du récepteur H4 contient un ORF de 361 acides aminés, et 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires (annexe V).

Cette séquence du récepteur H4 est ressemblante à celles de récepteurs au neuropeptide Y/F ; cependant, la séquence avec laquelle elle présente le plus de similarités est

celle du récepteur à l'allatotropine du moustique *A. aegypti*, avec 22% d'identité et une E value de  $10^{-10}$  (figure 31). L'allatotropine, tout comme l'allatostatine, sont deux peptides très étudiés chez les insectes pour leur rôle modulateur sur la biosynthèse d'hormone juvénile par les *corpora allata* (Hoffman *et al.*, 1999, pour revue). Cependant, des peptides apparentés à cette famille ont été identifiés chez les Mollusques également. Un tel peptide a été mis en évidence chez la Limnée *L. stagnalis* et il est impliqué dans la motilité de l'œsophage (Li *et al.*, 1993). Chez l'Aplysie, un peptide de type ATRP (Allatotropin-Related Peptide) a également été isolé et est présent dans les principaux ganglions composant le système nerveux central (Jing *et al.*, 2010). Ce peptide est lié à la régulation centrale du contrôle de l'homéostasie énergétique, notamment pendant la prise de nourriture. Chez le gastéropode *Lottia gigantea*, un gène codant pour le précurseur d'un peptide de type allatotropine a été mis en évidence dans le génome par Veenstra (2010). Il semblerait donc que cette famille de peptides soit impliquée, chez les Mollusques, dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique. Dans la banque de données Gigas Database, il existe une EST présentant des similarités de séquence avec le précurseur de l'allatotropine de la Limnée. Cependant, contrairement aux deux allatotropines identifiées chez la Limnée et l'Aplysie, le peptide codé par le précurseur de *C. gigas* présenterait un motif C-terminal de type GFamide, et non GYamide, que l'on retrouve sur les peptides allatotropines d'insectes.

Malgré les homologies existant entre les séquences de récepteurs de type allatotropine et du récepteur H4, il présente également de fortes similarités de séquence avec des récepteurs du neuropeptide Y/F, et a donc été retenu comme récepteur potentiel du NPY/F de *C. gigas*.

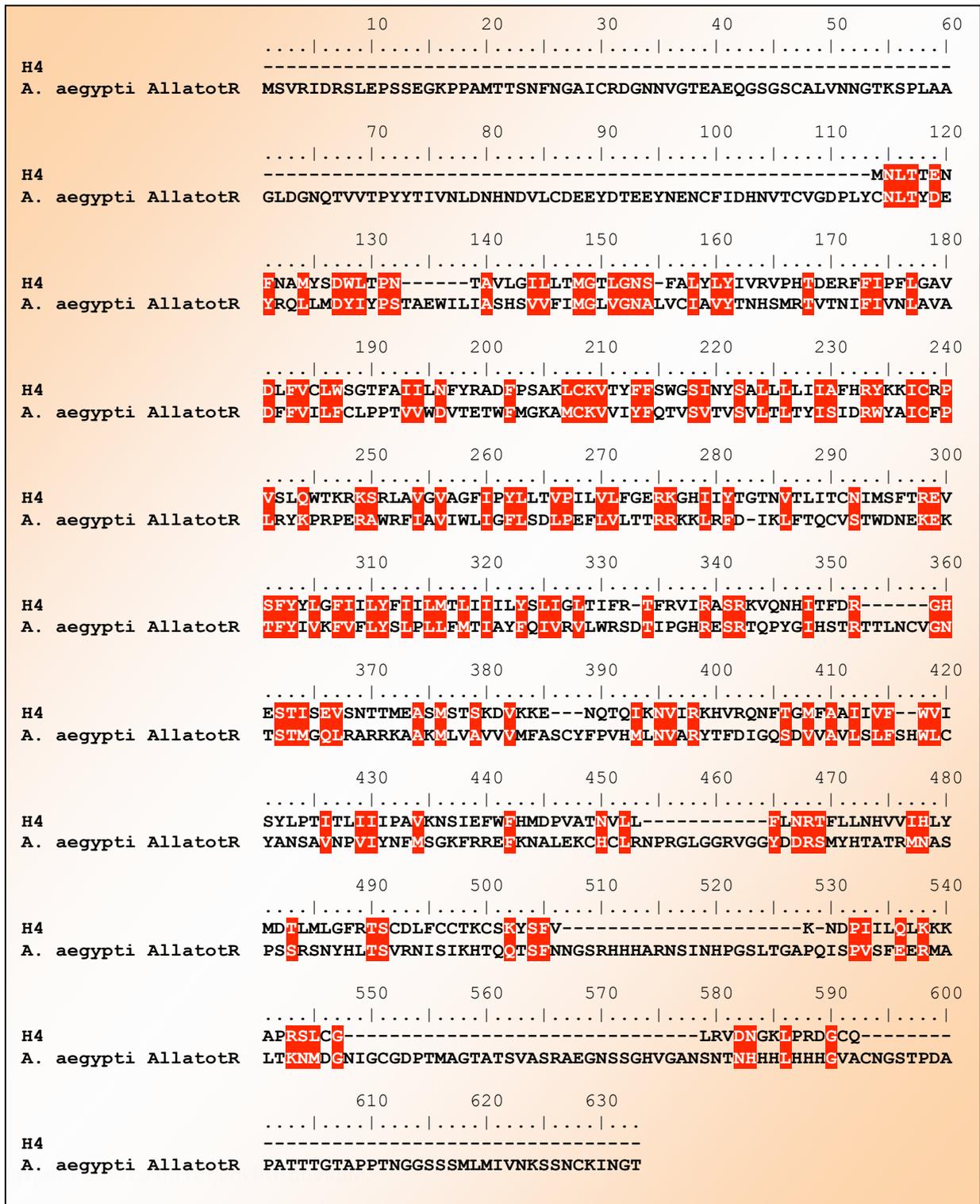
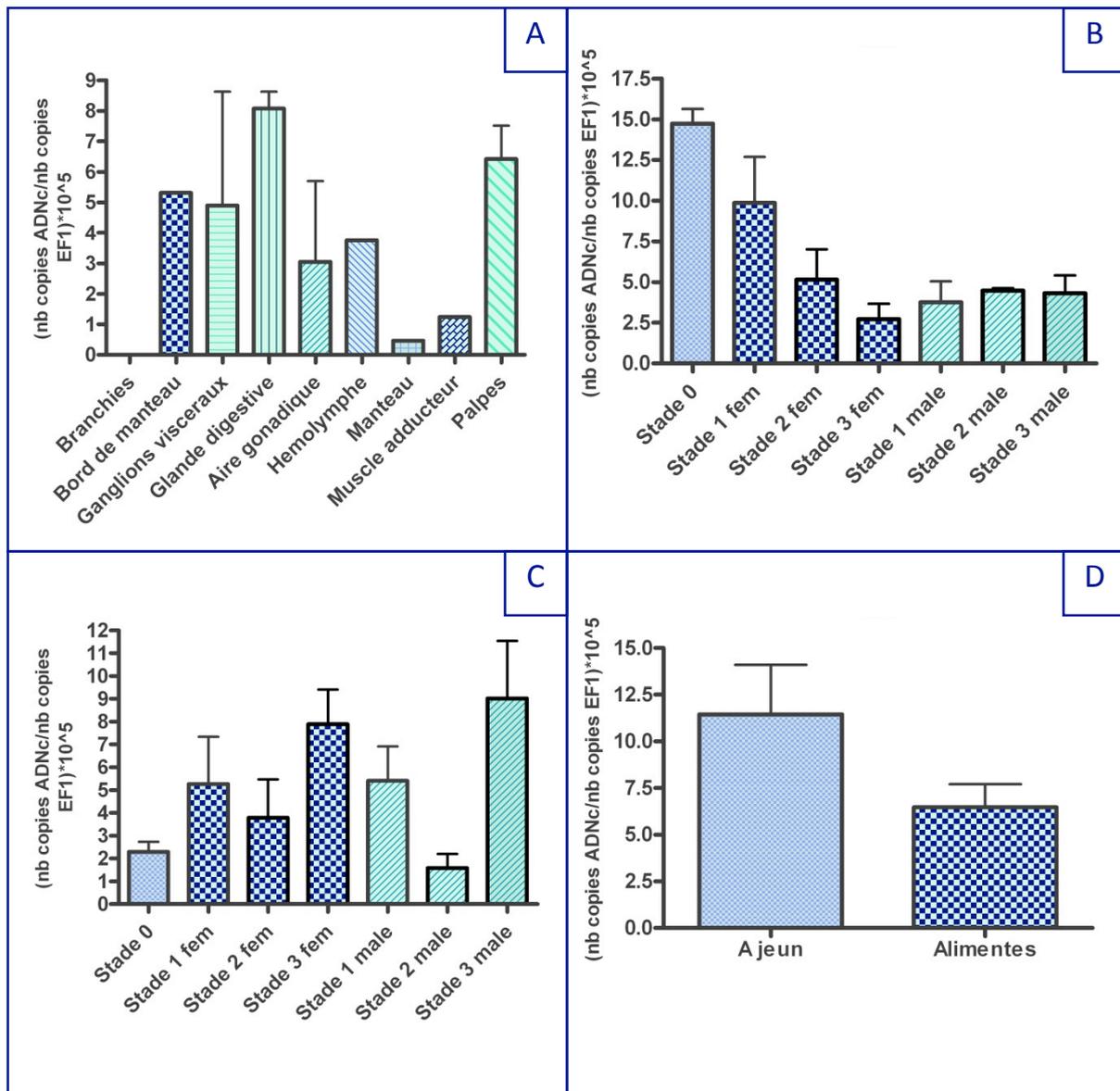


Figure 31 : Alignement du récepteur H4 de *C. gigas* avec le récepteur à l'allatotropine d'*Aedes aegypti*, numéro d'accèsion GenBank : AEN03789.1. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit, par ClustalW.

Les amorces dessinées à l'aide de la séquence nucléotidique de ce récepteur ont permis d'en étudier l'expression, il semble être exprimé dans tous les tissus adultes, sauf les

branchies, et en particulier dans les ganglions viscéraux, les palpes labiaux et la glande digestive (figure 32A). Au cours du cycle de reproduction, cette expression diminue dans l'aire gonadique (figure 32B) : en effet, au stade 0, on observe une grande quantité de transcrits dans l'aire gonadique, ce qui se maintient jusqu'au stade 1 pour les femelles, mais pas chez les mâles qui voient cette expression diminuer fortement dès le stade 1. Chez les femelles, cette diminution a lieu plus tard, à partir du stade 2. Le profil d'expression est assez différent dans les ganglions viscéraux, puisque chez les mâles comme chez les femelles, les plus faibles quantités de transcrits sont observées au stade 2, alors que les individus de stade 3 présentent une expression maximale (figure 32C). Pour ce récepteur également, lors d'un conditionnement trophique, on observe une expression presque doublée du gène codant pour H4 dans les ganglions viscéraux chez des individus placés à jeun, en comparaison à des animaux nourris (figure 32D).



**Figure 32 :** Expression du gène du récepteur H4 de *C. gigas* mesurée par PCR quantitative en temps réel dans les différents tissus adultes (A), dans l'aire gonadique (B) et dans les ganglions viscéraux (C) au cours du cycle de reproduction, pour 4 à 5 pools de 6 individus par stade et par sexe, et dans les ganglions viscéraux lors d'un contionnement trophique (D), pour 15 individus placés à jeun (-) et 15 individus nourris (+). Le nombre de copies d'ADNc est exprimé en fonction du nombre de copies d'EF1 (Elongation Factor 1), le gène de référence.

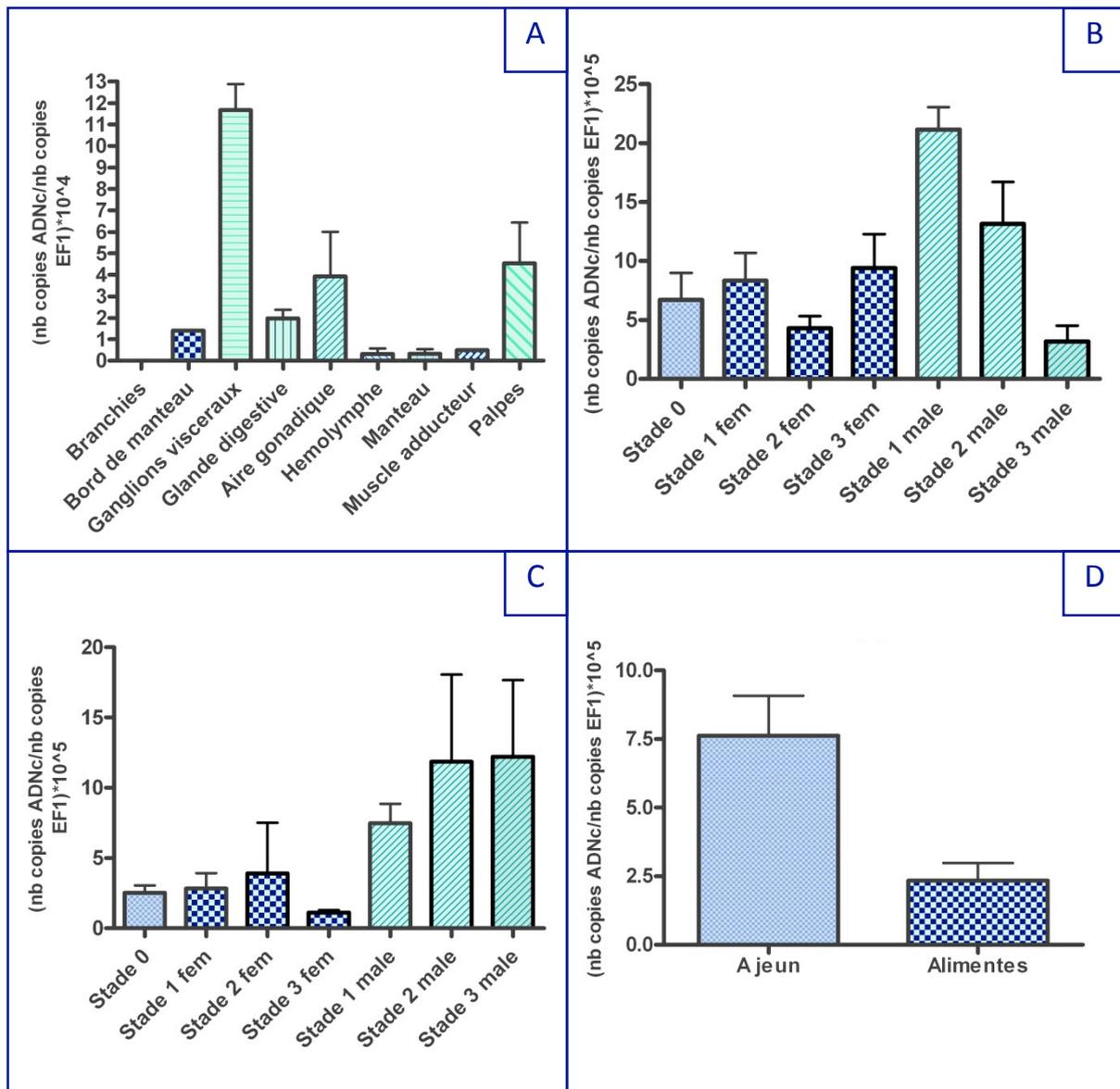
## 2) Le récepteur F1

La séquence nucléotidique de ce récepteur génère un ORF de 368 acides aminés, présentant 7 domaines transmembranaires, facilement reconnaissables par leur structure en hélices  $\alpha$  composées d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes.

La séquence du récepteur F1 est fortement similaire à celle du récepteur à l'adénosine de *D. melanogaster*, avec 31% d'identité et une E value de  $10^{-6}$  (figure 33). L'adénosine, en plus de son rôle dans la construction des molécules d'ADN et ARN et de son implication dans les processus énergétiques de la cellule, via l'ATP, est un neurotransmetteur qui influe sur diverses fonctions physiologiques via 4 récepteurs différents, appartenant tous aux RCPGs. Deux d'entre eux (A1 et A2A) jouent un rôle sur la fonction cardiaque et le cerveau, notamment en modulant la libération de dopamine et de glutamate (Fuxe *et al.*, 2007), alors que les deux autres (A2B et A3) sont impliqués dans les processus d'inflammation et de réponse immunitaire (Gessi *et al.*, 2011).

Ce récepteur F1 présente également des homologies avec des récepteurs au neuropeptide Y/F, ce qui démontre une fois de plus que l'annotation première d'un récepteur n'est pas toujours fiable, et qu'il est pour cela indispensable d'obtenir les séquences codantes entières pour mener des études phylogénétiques. A partir de cette séquence, des amorces de PCR quantitative ont été dessinées, et ont permis d'étudier l'expression de ce récepteur F1. Il est exprimé chez l'adulte, principalement dans les ganglions viscéraux, mais également, dans une moindre mesure, dans les palpes labiaux, l'aire gonadique et la glande digestive (figure 34A). Cette expression dans l'aire gonadique est variable au cours de la gamétogenèse : chez les femelles, l'expression est plus faible que chez les mâles, et elle est peu variable, alors que les mâles voient l'expression du récepteur F1 diminuer au cours du cycle de reproduction (figure 34B). Dans les ganglions viscéraux également, ce récepteur est plus exprimé chez les mâles que chez les femelles, mais cette expression ne semble pas varier de manière significative (figure 34C). Ce récepteur, comme la plupart des autres récepteurs étudiés, est exprimé différemment chez des animaux soumis à des conditions trophiques différentes. En effet, l'expression du récepteur F1 est fortement augmentée chez des individus placés à jeun (figure 34D).





**Figure 34 :** Expression du gène du récepteur F1 de *C. gigas* mesurée par PCR quantitative en temps réel dans les différents tissus adultes (A), dans l'aire gonadique (B) et dans les ganglions viscéraux (C) au cours du cycle de reproduction, pour 4 à 5 pools de 6 individus par stade et par sexe, et dans les ganglions viscéraux lors d'un contionnement trophique (D), pour 15 individus placés à jeun (-) et 15 individus nourris (+).Le nombre de copies d'ADNc est exprimé en fonction du nombre de copies d'EF1 (Elongation Factor 1), le gène de référence.

### **Récapitulatif des résultats obtenus en PCR quantitative :**

Alors que le ligand NPY/F n'est produit qu'au niveau des ganglions viscéraux, les récepteurs étudiés sont plus largement répartis au sein de l'organisme. Globalement, ces récepteurs sont exprimés en premier lieu dans les ganglions viscéraux, mais également dans la

glande digestive, les palpes labiaux ou encore l'aire gonadique (tableau 3). On observe des diminutions de cette expression au cours de la gamétogenèse dans l'aire gonadique, alors que les quantités de transcrits varient peu dans les ganglions viscéraux. Le résultat le plus flagrant est la surexpression du précurseur au NPY et de 4 des 5 récepteurs chez les animaux placés à jeun, en comparaison avec des animaux nourris.

**Tableau 3 :** Récapitulatif de l'expression des gènes codant pour le NPY/F et ses récepteurs potentiels étudiée en PCR quantitative en temps réel sous diverses conditions.

Gène étudié	Tissus adultes	Gamétogenèse		Conditionnement trophique
		Aire gonadique	Ganglions viscéraux	Ganglions viscéraux
NPY/F	Ganglions viscéraux		F : 	à jeun > alimentés
			M : 	
A4	Glande digestive	F : 		à jeun = alimentés
		M : =		
D1	Ganglions viscéraux, hémolymphe	F : 	F : =	à jeun > alimentés
		M : 	M : =	
F3	Ganglions viscéraux	F : 	F : =	à jeun > alimentés
		M : 	M : =	
H4	Ganglions viscéraux, glande digestive, palpes labiaux	F : 	F : variable	à jeun > alimentés
		M : =	M : variable	
F1	Ganglions viscéraux, aire gonadique, palpes	F : variable	F : =	à jeun > alimentés
		M : 	M : =	

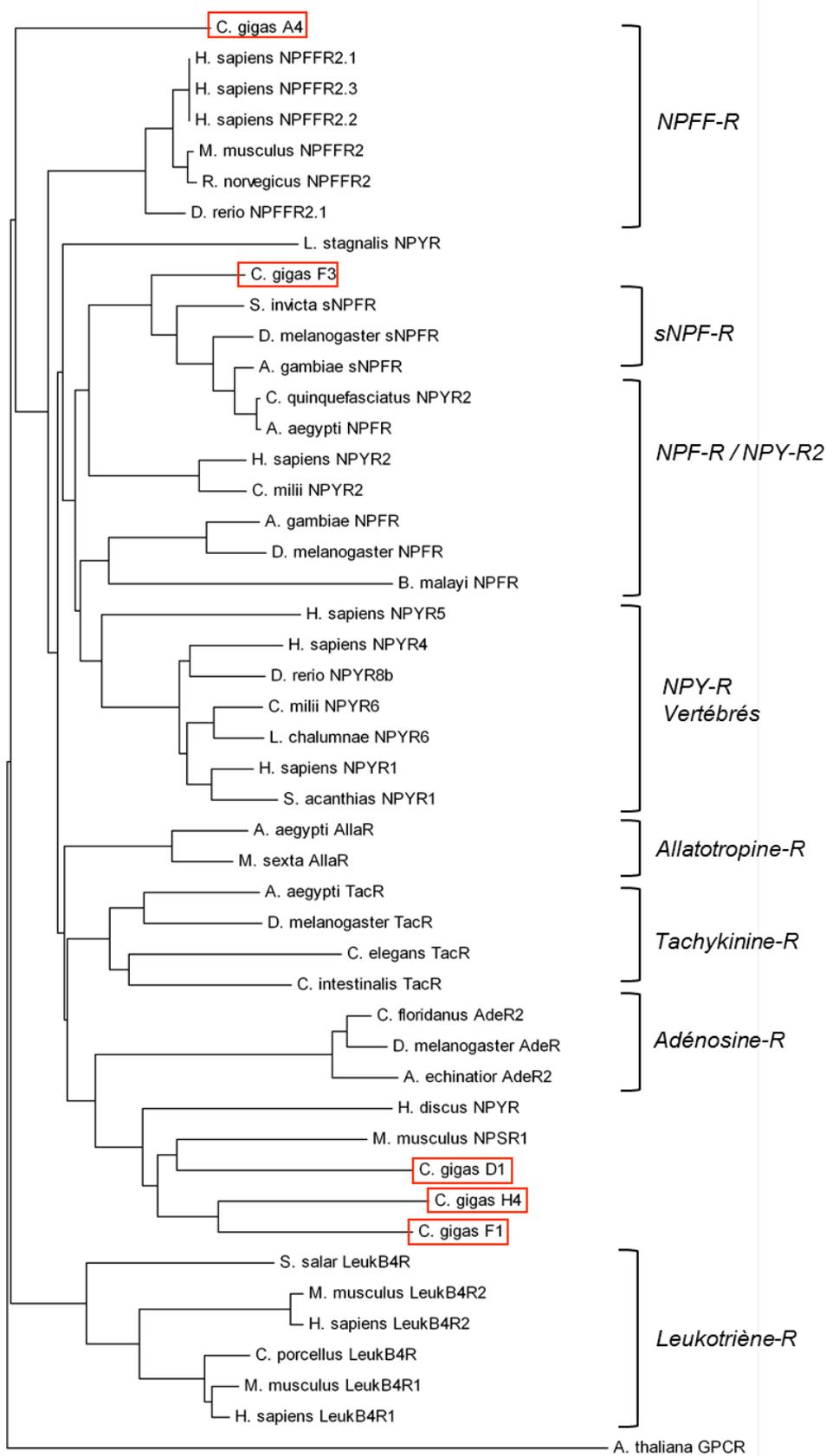
#### D) Etude phylogénétique des 5 récepteurs apparentés aux récepteurs NPY/F

Bien que ces cinq récepteurs présentent des séquences proches de celles des récepteurs au NPY/F, certains d'entre eux ont ainsi montré des homologies avec d'autres RCPGs, pouvant lier des ligands divers (neuropeptide FF, adénosine, allatotropine...). Pour étudier plus précisément leur lien avec la famille des récepteurs au neuropeptide Y/F, une étude phylogénétique a été menée, incluant les diverses familles de récepteurs avec lesquelles ces récepteurs ont des similitudes de séquence.

Pour cela, un arbre phylogénétique a été construit, à partir des séquences entières de nombreux RCPGs de Vertébrés et d’Invertébrés, par la méthode de « neighbor-joining » (figure 35). D’après cet arbre, on constate que 3 des 5 récepteurs de *C. gigas* (F1, H4, et D1) semblent relativement éloignés de la famille des récepteurs au neuropeptide Y/F. En effet, ces 3 récepteurs forment un groupe frère du groupe des récepteurs à l’adénosine, ce qui les éloignerait donc des récepteurs de neuropeptides. Néanmoins, le groupe constitué par ces récepteurs inclut également deux récepteurs de neuropeptides: le RCPG du gastéropode *Haliotis discus* identifié comme récepteur de type récepteur au NPY (résultat non publié), et le récepteur au neuropeptide S de la souris *Mus musculus*. Ce neuropeptide S est un peptide retrouvé dans le système nerveux central des Mammifères (Xu *et al.*, 2007). Principalement étudié pour son effet anti-anxiolytique, il diminue l’anxiété et l’appétit, alors qu’il stimule l’activité, notamment l’activité sexuelle (Reinscheid, 2008, pour revue).

Le récepteur A4, qui montrait également des homologies avec un récepteur au neuropeptide FF, semble effectivement plus proche de cette famille de récepteurs que de celle des récepteurs au neuropeptide Y/F. Cependant, il ne semble pas non plus appartenir au groupe formé par cette famille de récepteurs. On peut donc supposer qu’il s’agit bien d’un récepteur de neuropeptides, sans pouvoir affirmer la nature exacte de son ou ses ligand(s).

Enfin, le 5<sup>ème</sup> récepteur de type récepteur au NPY/F (F3) semble phylogénétiquement lié aux récepteurs NPY/F, mais également aux récepteurs au sNPF. Il semble même plus proche de cette dernière famille que de celle des récepteurs aux « longs » neuropeptides, bien qu’il semble lié également au récepteur NPY/F de Limnée, le seul récepteur de ce type dont le ligand ait été identifié expérimentalement, chez les Mollusques (Tensen *et al.*, 1998 ; de Jong-Brink *et al.*, 2001). Ainsi, le récepteur F3 semble le meilleur candidat comme orthologue de récepteur au NPY/F parmi les cinq récepteurs de *C. gigas* étudiés.



**Figure 35 :** Arbre phylogénétique contenant les cinq séquences entières des récepteurs potentiels au neuropeptide Y de *C. gigas*, ainsi que les séquences de récepteurs homologues, chez les Invertébrés et Vertébrés. Cet arbre a été construit selon la technique de neighbor-joining grâce au logiciel MEGA5.

## ***Discussion :***

Afin de déterminer les voies de signalisation neuroendocrine intervenant dans la régulation de la reproduction et de la mise en réserve chez l'huître creuse, les récepteurs potentiels aux neuropeptides, et plus particulièrement au neuropeptide Y/F, ont été recherchés et étudiés. La banque d'ADN complémentaire Gigas Database de *C. gigas* présente de nombreuses séquences correspondant à des récepteurs couplés aux protéines G, parmi lesquelles une grande partie est susceptible de lier des neuropeptides, puisqu'elles présentent des homologies avec divers récepteurs aux neuropeptides. La multitude de ces récepteurs présage donc de nombreuses voies neuroendocrines présentes chez l'huître creuse, intervenant dans la régulation des principales fonctions physiologiques. Ces voies sont encore très peu connues, mais tendent à être mises en évidence, au vu des nombreuses recherches génomiques en cours sur ce modèle (Fleury *et al.*, 2009 ; Dheilly *et al.*, 2011). Par ailleurs, le génome entier de *Crassostrea gigas* est actuellement en cours d'assemblage. Ces gènes découverts régulièrement ouvriront de nouvelles pistes, notamment dans la compréhension des fonctions mises en cause dans les mortalités estivales et les mortalités virales.

Ainsi, 106 séquences de la banque Gigas Database présentent des motifs de récepteurs couplés aux protéines G, et presque la moitié est fortement susceptible de lier des neuropeptides. Parmi ces récepteurs, nous avons pu déterminer par une technique de microarray lesquels sont présents dans l'aire gonadique aux différents stades de gamétogenèse, afin d'obtenir une première indication sur leur implication dans la balance réserve/reproduction. Globalement, la plupart des RCPGs semblent exprimés dans l'aire gonadique, aux différents stades de la gamétogenèse, mais souvent avec des intensités différentes, bien que cette technique ne permette pas de quantification précise du marquage. A l'exception de quelques-uns, la majorité des récepteurs sont exprimés dans ce tissu. Les récepteurs peuvent se regrouper en plusieurs familles distinctes. Cependant, les annotations présentées dans ce classement ne sont pas nécessairement représentatives des ligands endogènes liés par ces récepteurs. En effet, elles ne correspondent qu'à des similarités de séquence, plus ou moins importantes, quantifiées par leur « E value ». Cette valeur comptabilise le nombre d'alignements différents avec des scores équivalents ou meilleurs que ceux attendus lors d'une recherche aléatoire dans une banque de données ; plus elle est faible, plus l'annotation est significative. De plus, beaucoup de ces annotations proviennent de

ressemblances avec des séquences de récepteurs de Vertébrés, car ils représentent une large majorité des RCPGs caractérisés sur le plan fonctionnel. Or, les séquences de récepteurs de Mollusques peuvent être très proches des protéines d'Ecdysozoaires, mais sont généralement assez éloignés phylogénétiquement des récepteurs de Vertébrés. Ainsi, les annotations de ces contigs d'ESTs peuvent facilement être remises en question, et ne sont que des indications sur la nature du ligand potentiel de ces récepteurs.

Parmi les RCPGs ainsi étudiés dans la banque de données de *C. gigas*, de nombreux récepteurs susceptibles de lier des neuropeptides ont été isolés, dont des récepteurs présentant de fortes homologies avec les récepteurs du neuropeptide Y/F. Au vu de l'implication du NPY/F dans le métabolisme énergétique et dans les processus liés à la reproduction, ses récepteurs potentiels ont été étudiés plus précisément, afin de caractériser la voie du neuropeptide F chez l'huître creuse. En effet, il a été reconnu que les aspects physiologiques régulés par ce neuropeptide étaient primordiaux dans la mise en place de la fenêtre de sensibilité aux pathogènes mortels pour l'huître, notamment la régulation du métabolisme énergétique (Bacca *et al.*, 2005 ; Patrick *et al.*, 2006). En outre, il apparaît nécessaire, pour des raisons aquacoles évidentes, de connaître plus précisément les paramètres de régulation du cycle de reproduction de *C. gigas*, afin de pouvoir maîtriser plus facilement la culture de cette espèce.

Ainsi, après analyses bioinformatiques, cinq séquences ont été retenues, du fait des homologies qu'elles présentaient avec les récepteurs au neuropeptide Y/F. Ces récepteurs ont ensuite été clonés et séquencés, afin d'obtenir leur séquence complète, pour permettre leur caractérisation, mais également dans le but de réaliser une étude phylogénétique, et de mettre en évidence leur éventuel lien avec la famille des récepteurs au NPY/F. Malgré leurs ressemblances, ces études phylogénétiques montrent que seulement deux d'entre eux semblent vraiment liés à des récepteurs aux neuropeptides (sNPF, NPY/F). Il paraissait intéressant toutefois de poursuivre l'étude sur ces cinq récepteurs, compte tenu des similitudes qu'ils ont avec les récepteurs au NPY/F.

En premier lieu, les études ont porté sur le NPY/F de *C. gigas* et son précurseur. Ce précurseur présente des motifs classiques, tels que la présence d'un peptide signal avant la séquence du neuropeptide. Le prépropeptide code pour une seule copie du neuropeptide, comme tous les précurseurs de NPY/F (Nässel et Wegener, 2011). Le NPY/F déduit de la séquence est composé de 39 acides aminés, dont l'extrémité C-terminale est composée de

GRPRFamide, caractéristique des NPY/Fs de Mollusques (Nässel et Wegener, 2011), et qui confirme son appartenance à la famille des RFamides. Plus généralement le motif caractéristique des NPY/Fs, de Lophotrochozoaires ou d'Ecdysozoaires, est le suivant : RxRFamide, x étant un acide aminé variable, généralement une proline, mais parfois aussi une valine. Cependant, on retrouve rarement chez les Invertébrés un motif C-terminal en RYamide, qui rappelle le neuropeptide Y de Vertébrés. On retrouve en extrémité de ce peptide un site de clivage très commun dans les précurseurs de neuropeptides, ce sont les sites de clivage di- ou tribasiques, composés généralement des résidus K ou R (von Eggelkraut-Gottanka et Beck-Sickinger, 2004). Bien que sa séquence soit connue grâce aux ESTs séquencés, ce neuropeptide n'a pas pu être détecté en spectrométrie de masse, dans les ganglions viscéraux où son précurseur est principalement exprimé. Ce résultat peut être dû à des problèmes d'expérimentation : le NPY/F est relativement long, il est ainsi possible qu'il soit plus difficile de l'extraire des tissus nerveux, même en appliquant un protocole expérimental différent du protocole d'extraction peptidique classique (extraction à froid au lieu d'une extraction à chaud, comme pour les peptides plus courts). Toutefois, il est également possible que le peptide mature soit uniquement la forme tronquée, et que la forme longue ne soit qu'une transition entre le propeptide et le peptide fonctionnel final, ce qui expliquerait qu'il ne soit pas détecté en spectrométrie de masse.

Cette forme tronquée du peptide provient du clivage entre deux résidus, lysine et alanine, et présente la séquence suivante : ALNDYYAIVGRPRFamide. Or, la lysine fait partie des acides aminés basiques impliqués dans le clivage de nombreux pro-peptides. Des formes tronquées de NPY/F ont été mises en évidence chez de nombreuses autres espèces, principalement des insectes (Nässel et Wegener, 2011), mais également des mollusques tels que le calamar *Loligo edulis*, chez qui cette forme tronquée contient seulement 9 acides aminés et a pour séquence YAIVARPRFamide (Smart *et al.*, 1992). Généralement, les formes tronquées de NPY/F détectées sont plus courtes que celle mise en évidence chez *C. gigas*, et qui est composée de 14 acides aminés. Les formes tronquées de 9 acides aminés, avec un clivage entre les deux résidus tyrosine, étant les plus fréquemment rencontrées (Nässel et Wegener, 2011), un tel peptide a également été recherché dans les extraits peptidiques de *C. gigas*, mais sans succès.

Quant aux récepteurs potentiels au neuropeptide Y/F identifiés, leur séquence est composée de 353 à 404 acides aminés et de 7 domaines transmembranaires. D'après la longueur de ces séquences et le positionnement des hélices transmembranaires, ces récepteurs

présentent des extrémités N-terminale extracellulaire et C-terminale intracellulaire relativement courtes, en comparaison aux autres familles de RCPGs existantes. Bien que tous ces récepteurs présentent de fortes homologues de séquences avec des récepteurs du NPY ou du NPY/F, leurs séquences nucléotidiques et protéiques montrent peu de similarité entre elles.

Pour caractériser plus précisément ces récepteurs, il était donc important de savoir dans quel tissu ils étaient exprimés, afin de pouvoir déterminer les tissus cibles de leur ligand. Globalement, ils sont exprimés dans les ganglions viscéraux, siège du système nerveux central chez *C. gigas*, sauf pour le récepteur A4 qui semble quasi-spécifique de la glande digestive. Mais on retrouve aussi des récepteurs « NPF-like » dans la glande digestive, l'aire gonadique et les palpes labiaux. Ces tissus représentent donc des cibles potentielles des neuropeptides que ces récepteurs sont capables de lier. Ces profils d'expression semblent ainsi appuyer l'hypothèse de l'implication des récepteurs, donc de leur ligand, dans la régulation de la reproduction et/ou de la mise en réserve, au regard de la présence de leur transcrite dans les tissus liés à ces deux fonctions. Cependant, peu de données existent concernant l'expression d'autres récepteurs au NPY/F identifiés chez d'autres modèles, en PCR quantitative. Chez *A. gambiae*, le récepteur au NPY/F est cependant exprimé dans la tête et l'abdomen des adultes (mâles et femelles), mais pas dans le thorax (Garczynski *et al.*, 2005), ce qui peut laisser supposer également une expression dans le système nerveux central et le système digestif. Ce récepteur est également fortement exprimé durant les stades de développement, ce qui n'est pas le cas chez l'huître creuse, puisque les 5 récepteurs testés étaient trop faiblement exprimés au cours du développement pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Chez *D. melanogaster*, le récepteur au NPY/F est exprimé dans tous les tissus larvaires, mais semble exprimé chez l'adulte principalement au niveau des ovaires, et dans une bien moindre mesure dans la tête et le tube digestif (Mertens *et al.*, 2002). Ces résultats sont toutefois à prendre avec du recul, puisqu'il s'agit d'expériences de PCR classique et non de PCR quantitative, et ne permettent donc pas de quantifier de manière exacte l'expression dans chacun des tissus. Un autre récepteur apparenté aux récepteurs NPY/F a été caractérisé chez la Drosophile, il est appelé NPRF76F, et son ARN a été détecté par « Northern blotting » dans la tête et les membres/antennes chez l'adulte, mais pas dans le reste de l'organisme ; de plus, son expression dans les systèmes nerveux central et périphérique a été mise en évidence par hybridation *in situ* (Feng *et al.*, 2003). Ainsi, les récepteurs identifiés chez *C. gigas* présentent un profil d'expression ressemblant, puisque 4 d'entre eux sont principalement exprimés dans le système nerveux central, mais on retrouve également les transcrits de certains d'entre eux

dans le système digestif ou l'appareil reproducteur. Ces expressions appuient ainsi l'hypothèse qu'ils pourraient lier le NPY/F, et réguler ainsi la reproduction et/ou le métabolisme énergétique de l'huître creuse.

Afin d'en avoir une idée plus précise, l'expression de ces récepteurs a été suivie dans l'aire gonadique et/ou les ganglions viscéraux au cours d'un cycle de gamétogenèse, pour mettre en évidence une éventuelle régulation transcriptionnelle. Dans l'aire gonadique, on remarque que les récepteurs sont exprimés de manière générale plus fortement lors des premiers stades de gamétogenèse (stades 0 et 1) que lors des stades plus tardifs (stades 2 et 3), aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Or, l'aire gonadique subit tout au long de l'année deux cycles simultanés : celui de la gamétogenèse, avec l'évolution des tubules gonadiques du stade 0 au stade 3, et celui de la mise en réserve énergétique, du stade A au stade D. Juste après la ponte des gamètes, lors des stades précoces de gamétogenèse, le tissu de réserve se reconstruit pour devenir majoritaire au sein de l'aire gonadique, aux stades 0 (tardif) et 1. La proportion de ce tissu de réserve diminue ensuite au profit des tubules gonadiques, lorsque commencent les mitoses goniales au stade 2 (Berthelin *et al.*, 2000). Ainsi, il est tout à fait envisageable que ces récepteurs soient globalement exprimés dans les cellules de réserve plutôt que dans les cellules germinales. Pour vérifier cette hypothèse, des solutions techniques ont été envisagées : l'hybridation *in situ* sur des coupes d'aire gonadique, à l'aide de sondes d'ARNm marqué de chaque récepteur, ou la PCR quantitative sur du tissu gonadique découpé par micro-dissection laser. Au regard du faible taux d'expression de chacun des récepteurs dans l'aire gonadique, l'hybridation *in situ* semblait une technique trop peu sensible, alors que la PCR quantitative permet de détecter de très petites quantités de transcrits. Ainsi, l'expression des cinq récepteurs a été mesurée dans des échantillons de tubules gonadiques séparés par micro-dissection du tissu de réserve gonadique. Malheureusement, l'expression de ces récepteurs était trop faible, même pour cette technique, et n'a donc pu être détectée dans aucun échantillon. Il faudrait donc renouveler les expériences de micro-dissection laser, afin d'obtenir davantage de tissu de réserve et de tubules gonadiques séparés, afin d'être en mesure d'y détecter l'expression de nos récepteurs. En attendant, on peut émettre l'hypothèse que ces récepteurs soient davantage exprimés dans le tissu de réserve que dans les tubules gonadiques, et réguleraient ainsi la mise en réserve de glycogène servant à fournir l'énergie nécessaire à la gamétogenèse annuelle de l'huître creuse. A l'exception du récepteur A4, l'expression de ces récepteurs au cours de la gamétogenèse a pu être mesurée dans les ganglions viscéraux. Cette expression varie peu au cours du cycle

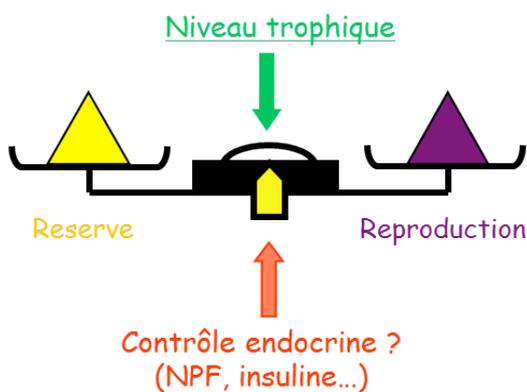
annuel, ou de manière différente du profil observé dans l'aire gonadique, bien que certains de ces récepteurs soient plus exprimés dans les ganglions mâles ou les ganglions femelles.

Bien qu'aucun effet sur la reproduction en elle-même n'ait pu être mis en évidence jusqu'à présent chez *C. gigas*, le rôle inhibiteur de ce neuropeptide sur les fonctions associées à la reproduction semble conservé des Vertébrés aux Insectes (Stanek *et al.*, 2002) et aux Mollusques (De Jong-Brink *et al.*, 1999). Il semble donc fort probable que le NPY/F de l'huître ait conservé ce rôle inhibiteur, ce qui en ferait un véritable régulateur de la balance physiologique réserve/reproduction, favorisant la mise en réserve énergétique, au détriment de la reproduction. Or, les résultats obtenus lors du défi MOREST montrent que les huîtres produisant un fort effort de reproduction consommaient ainsi toute leur réserve énergétique, conduisant alors à une plus grande sensibilité aux pathogènes qui prolifèrent lors de la période estivale. Compte tenu de ces résultats, il s'avère que ce neuropeptide Y/F pourrait ainsi être un peptide clé dans la résistance physiologique aux mortalités estivales. Il serait donc intéressant de définir le rôle précis de ce neuropeptide dans la régulation de la reproduction, et confirmer l'implication du NPY/F dans le phénomène de mise en réserve énergétique par des expériences fonctionnelles sur cette voie.

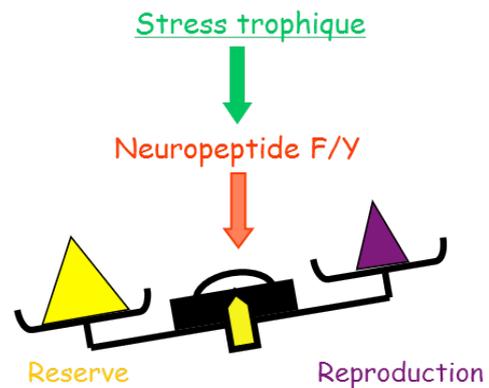
Afin de mettre en évidence un éventuel rôle régulateur sur la mise en réserve, ou plus généralement sur le métabolisme énergétique, il semblait donc intéressant d'étudier l'expression de ces récepteurs sur des animaux ayant subi un conditionnement trophique. Pour ce faire, des animaux ont été placés soit à jeun, soit dans un bassin alimenté en micro algues, et les ganglions viscéraux ont ensuite été disséqués. L'étude de l'expression n'a été menée que sur ce tissu, car c'est celui qui présente la plus grande quantité de transcrits, pour presque tous les récepteurs et pour le ligand NPY/F, assurant ainsi des résultats exploitables en PCR quantitative. De manière intéressante, mis à part le récepteur A4, tous les gènes ont montré des différences d'expression selon la disponibilité en nourriture des individus pendant les jours précédant la dissection. Et, de manière encore plus surprenante, ces différences vont toutes dans le même sens : les récepteurs ainsi que le NPY/F sont surexprimés chez des animaux placés à jeun, en comparaison aux animaux alimentés régulièrement. Ceci renforce encore l'hypothèse qu'un ou plusieurs de ces récepteurs puissent lier le NPY/F, compte tenu des similarités dans leurs profils d'expression. De plus, ce profil permet d'établir une première hypothèse sur le rôle fonctionnel de cette voie neuroendocrine. Cela signifierait donc qu'en cas de stress trophique, par manque de nourriture, les récepteurs NPY/F-like et le NPY/F sont surexprimés. D'après la bibliographie, le neuropeptide Y aurait un rôle activateur

sur la prise alimentaire chez les modèles Vertébrés, on peut donc supposer que, de la même façon, en cas de stress trophique le neuropeptide Y/F serait surexprimé chez l'huître creuse afin d'augmenter la prise alimentaire et/ou la mise en réserve énergétique. Ce phénomène permettrait donc d'amoindrir les conséquences du manque de nourriture, et donc de ne pas ralentir le métabolisme de l'organisme lors de périodes pendant lesquelles la nourriture serait moins abondante. Ainsi, le NPFY/F aurait un rôle régulateur de la balance physiologique reproduction - mise en réserve existante chez *C. gigas*, en faisant pencher cette balance vers le côté « mise en réserve énergétique », au détriment de la reproduction (figure 36).

Hypothèse de la régulation générale de la balance réserve/reproduction



Hypothèse de la régulation de la balance réserve/reproduction par le NPF/Y



**Figure 36** : Rôle potentiel du neuropeptide Y/F de *C. gigas* sur la régulation balance physiologique entre la mise en réserve et la reproduction, lors d'un stress trophique, dans l'aire gonadique.

Pour confirmer cette hypothèse, il serait pertinent de mener des études fonctionnelles sur ce neuropeptide, en suivant l'évolution de la gamétogenèse chez des individus dont la voie NPY/F serait perturbée. On peut ainsi envisager des injections de neuropeptide Y/F synthétique chez des individus adultes, dont les fonctions physiologiques principales seraient ensuite suivies. Les suivis de tels individus peuvent concerner la gamétogenèse, par prélèvement d'aire gonadique et détermination du stade gamétogénétique, via des coupes histologiques. La prise alimentaire peut également être mesurée, par suivi de la quantité de microalgues filtrées, ou par mesure de l'incorporation de glucose par les cellules vésiculeuses des palpes labiaux, à l'aide de glucose radioactif [U-<sup>14</sup>C], comme décrit par Berthelin *et al.*

(2000). Cette même technique a déjà permis de mettre en évidence la régulation saisonnière de l'incorporation de glucose, donc de la formation de glycogène, dans les palpes labiaux, en fonction de l'avancement de la gamétogenèse et de la disponibilité en micro-algues dans le milieu (Faury *et al.*, 2001). Les auteurs ont également pu démontrer la relation entre mise en réserve énergétique et mortalités estivales, puisque les animaux ayant la plus grande capacité à incorporer le glucose présentent une sensibilité plus importante à ces mortalités. Les récepteurs, quant à eux, semblent donc également impliqués dans la réponse au stress trophique, dans le même sens que le neuropeptide, ce qui appuie l'hypothèse d'une implication dans les mêmes voies de signalisation. Afin de confirmer le rôle fonctionnel de ces récepteurs, une inhibition de l'expression de ceux-ci par RNAi, comme il a été mené pour le gène *vasa* (Fabioux *et al.*, 2009), pourrait permettre de mettre en évidence des éventuelles conséquences phénotypiques (suivi de la gamétogenèse, incorporation du glucose...). Disposant de récepteurs potentiels au NPY/F et de la séquence du neuropeptide Y/F d'huître, il devient alors indispensable d'étudier la relation fonctionnelle possible en mettant en œuvre des expériences de pharmacologie/endocrinologie inverse.

*Chapitre II :*  
*Recherche des ligands endogènes*  
*des récepteurs potentiels au*  
*NPY*



## ***Introduction :***

### **A) L'endocrinologie inverse**

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires, ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme énergétique, le comportement alimentaire, la réponse immunitaire, la reproduction... C'est pourquoi ils constituent la cible majeure de l'industrie pharmaceutique : en 1996, sur environ 500 molécules ciblées par l'ensemble des thérapies médicamenteuses, les récepteurs membranaires, donc essentiellement les RCPGs, représentent 45% des cibles existantes, soit la plus grande famille de molécules visées (Drews *et al.*, 2000). Ainsi, de nombreuses techniques de caractérisation post-génomique ont été élaborées sur cette famille de récepteurs, notamment pour identifier les ligands des récepteurs dits « orphelins », c'est-à-dire dont le ligand endogène est encore inconnu. En effet, les similarités de séquences entre récepteurs ne permettent pas de déterminer de manière précise le ligand qu'ils peuvent lier, même si ces séquences peuvent donner des indices sur la nature de ce ligand. Or, pour mettre au point de nouvelles molécules thérapeutiques, il s'est avéré nécessaire de pouvoir déterminer de manière fiable les ligands de ces RCPGs. Une nouvelle technique a donc été développée depuis deux décennies pour identifier les ligands des RCPGs, l'endocrinologie ou pharmacologie inverse (Libert *et al.*, 1991). Le principe de celle-ci repose sur l'expression de ces récepteurs en système hétérologue. Plusieurs types d'approches existent pour identifier les ligands de ces récepteurs, et sont répertoriés par Wise *et al.* (2004). Ces systèmes hétérologues peuvent être la levure *Saccharomyces cerevisiae*, des lignées cellulaires de Mammifères immortalisées ou encore des mélanophores ou des ovocytes de Xénope.

#### **1. Les différents systèmes d'expression hétérologue**

Cette dernière technique a été décrite de manière exhaustive par Chen *et al.* (2002), et consiste à surexprimer le récepteur en cellules mélanophores de Xénope, afin d'obtenir une activité constitutive de celui-ci. En effet, un RCPG surexprimé peut adopter spontanément une forme active et ainsi recruter et activer la protéine G concernée. Lorsque ces récepteurs

sont constitutivement activés, leur liaison à un ligand entraîne une redistribution des différentes formes (activées ou non) de ces récepteurs, ce qui se traduit par une augmentation ou une diminution de l'activité de ces récepteurs. Ces changements d'état d'activation se traduisent dans les mélanophores de *Xénope* par une dispersion ou un regroupement des mélanosomes contenant la mélanine, puisqu'un faible taux d'AMPc entraîne une agrégation des mélanosomes et un éclaircissement des mélanophores, alors qu'un taux élevé d'AMPc conduit à une dispersion de ces mélanosomes et à un assombrissement des cellules (Wilson *et al.*, 1998). Ainsi, dans ce système, la fixation d'un ligand à son RCPG est mesurable par son effet sur le taux d'AMPc et donc sur la répartition de la mélanine. Les points positifs de cette méthode sont sa sensibilité de détection des réponses aux protéines Gs et Gi, ainsi que la possibilité de suivre la réponse des mélanosomes en temps réel. Un inconvénient majeur de ce système est la variabilité des transfections transitoires utilisées, ce qui entraîne une activation constitutive différentielle des récepteurs. Un autre désavantage est la présence probable d'un récepteur endogène liant le ligand testé dans les mélanophores de *Xénope*, ce qui entraînerait une réponse positive, même sans liaison au récepteur transfecté.

Pour pallier ce problème, un autre système d'expression utilisé est celui de la Levure, qui peut être génétiquement modifiée, afin d'inactiver l'expression du RCPG endogène, et donc de permettre une réponse cellulaire plus spécifique. Ces tests ont été mis au point de telle façon que la voie de signalisation des RCPGs conduise à la surexpression du gène rapporteur  $\beta$ -galactosidase, qui peut se mesurer par des tests colorimétriques, luminescents ou fluorescents (Wise *et al.*, 2002). Pour faciliter le couplage du RCPG avec la protéine G, des protéines G synthétiques ont été conçues et sont exprimées de manière stable dans les cellules de Levure.

Une troisième méthode d'identification de ligands pour les RCPGs consiste à les exprimer dans des ovocytes de *Xénope*, par injection des ARNm codant ces récepteurs. Pour les RCPGs qui recrutent les protéines de type G $\alpha_q$ , la voie calcique sera alors activée, conduisant à l'ouverture de canaux chlorure calcium-dépendants. Pour les autres récepteurs, des canaux potassiques couplés aux protéines G (GIRKs) peuvent être exprimés de manière hétérologue, et activés suite au recrutement d'une protéine G par un RCPG (Hansen et Braüner-Osborne, 2009). Les courants engendrés par l'ouverture de ces canaux ioniques sont alors facilement mesurables par voltage-clamp (Papke et Smith-Maxwell, 2009).

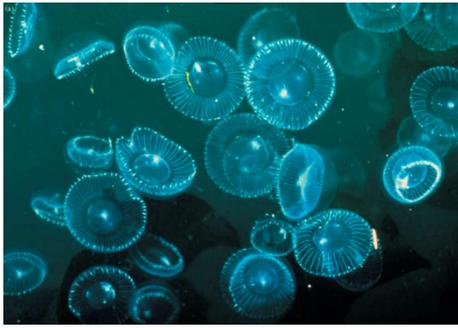
La méthode la plus courante actuellement consiste à exprimer les récepteurs couplés

aux protéines G dans des cellules de Mammifères. Les cellules de Mammifères utilisées sont la plupart du temps des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ou des lignées HEK (Human Embryonic Kidney).

## 2. Utilisation des lignées de Mammifères, implication de la protéine $G\alpha 16$

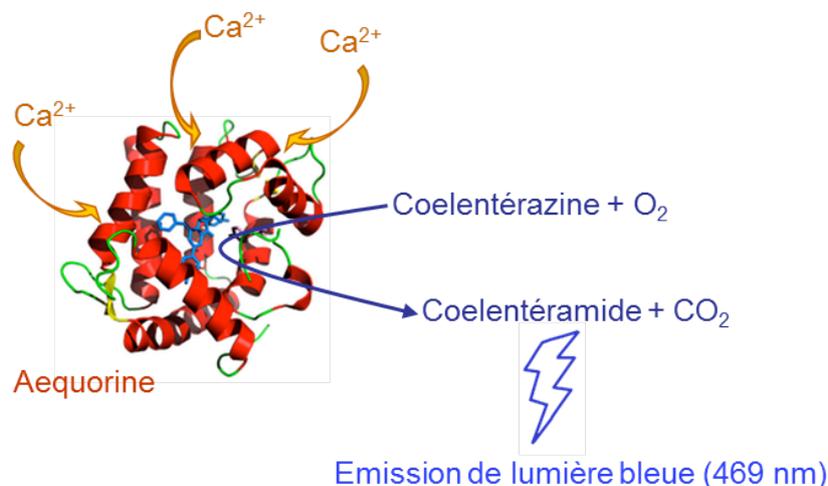
A partir de la seule séquence protéique, on ne peut pas prévoir de manière certaine quel sous-type de protéine G sera recruté par le récepteur. Seules les protéines  $G\alpha q$  activent de manière endogène la phospholipase C, et provoquent donc une augmentation de calcium intracellulaire. Ainsi, si le RCPG recrute naturellement une protéine  $G\alpha s$  ou  $G\alpha i$ , seul le taux d'AMP cyclique variera en cas d'activation par un ligand, mais pas la concentration calcique. Pour s'affranchir de cette inconnue, l'approche la plus fréquente consiste à utiliser la protéine  $G\alpha 16$ . La sous-unité  $\alpha 16$  de protéine G a été découverte par Amatruda *et al.* (1991) à partir de cellules hématopoïétiques humaines. Cette protéine G est capable de lier 80% des récepteurs couplés aux protéines G, quel que soit le sous-type de protéine recruté par le RCPG de manière endogène (Offermanns et Simon, 1995).

Une fois recrutée par un RCPG, cette protéine  $G\alpha 16$  active la phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) qui clive le phosphoinositol diphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> va alors activer les canaux calciques IP<sub>3</sub>-dépendants situés sur la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui va conduire à la sortie de calcium du réticulum, et donc à une augmentation transitoire du taux de calcium cytosolique. Cette augmentation du taux de Ca<sup>2+</sup> peut alors être mesurée grâce à l'activité d'une enzyme, l'aequorine, qui, par hydrolyse de son substrat, conduit à la production de luminescence. Cette protéine a été extraite et purifiée par Shimomura *et al.* (1962) à partir d'une méduse luminescente, *Aequorea victoria* (figure 37).



**Figure 37 :** Photos de méduses *Aequora* et de leurs organes luminescents, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Shimomura, 2005).

L'aequorine est un complexe moléculaire formé d'une protéine de 21 kDa ou apo-aequorine possédant trois sites de haute affinité pour le calcium, d'oxygène moléculaire et d'un chromophore, la coelenterazine (Shimomura, 2005). En présence de calcium, la coelenterazine est oxydée en coelenteramide, ce qui conduit à la libération de  $\text{CO}_2$  et de luminescence bleue (figure 38).

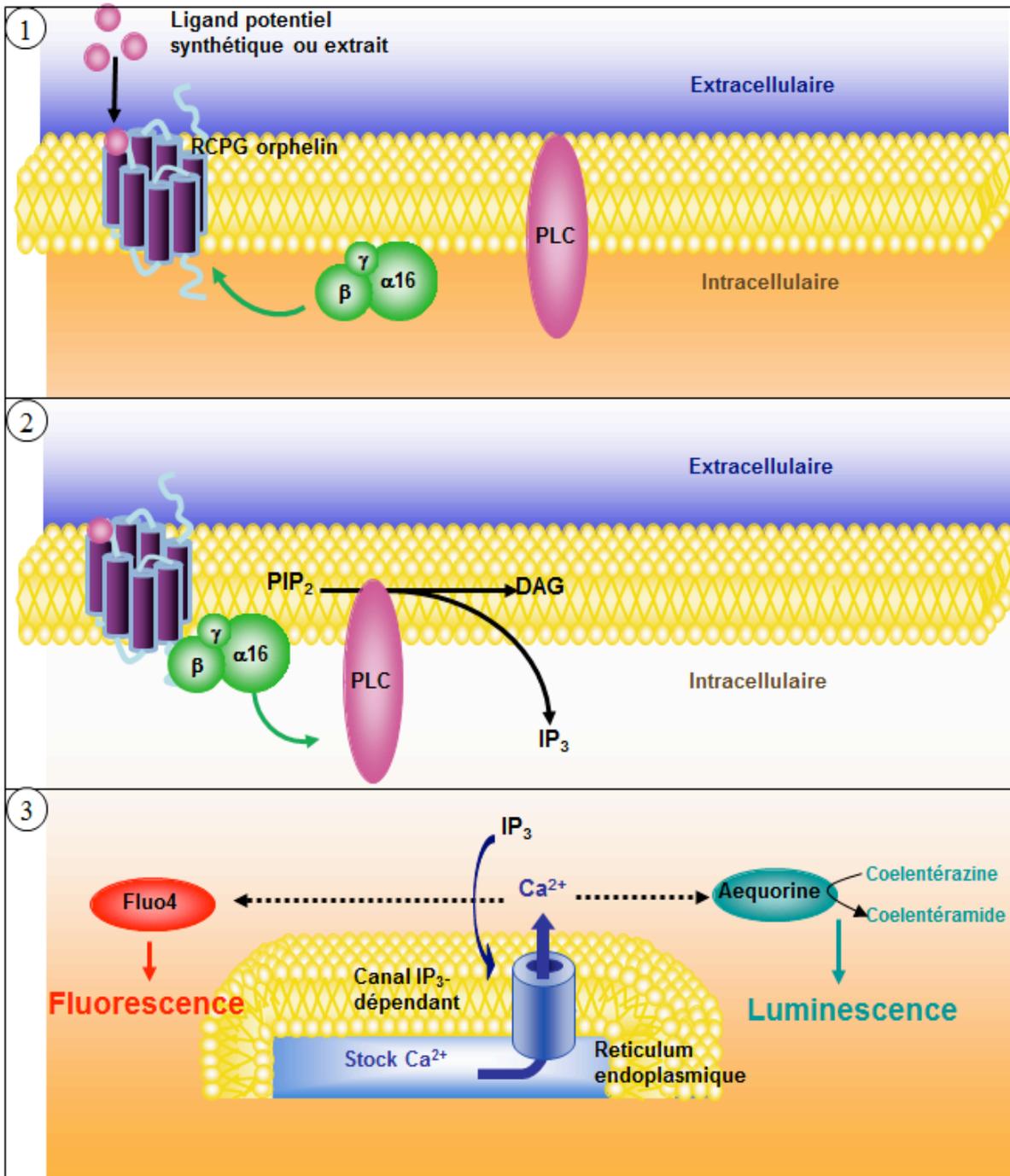


**Figure 38 :** Représentation schématique du mode d'action moléculaire de l'aequorine. Une fois les ions calciques fixés aux domaines « EF hand » de l'aequorine, celle-ci oxyde la coelentérazine en coelentéramide qui émet à 469 nm, c'est-à-dire dans le bleu.

Pour tester les RCPGs, des lignées de cellules CHO sont transfectées de manière stable avec des constructions contenant le gène de la protéine  $\text{G}\alpha_{16}$  et celui de l'apo-aequorine (Stables *et al.* 1997; Le Poul *et al.* 2002). Ces cellules sont ensuite transfectées de manière transitoire avec un vecteur d'expression contenant la séquence complète du RCPG étudié, qui

sera alors exprimé dans ces cellules, pour un adressage du RCPG à la membrane plasmique. Les cellules sont alors incubées en présence de coelenterazine, avant d'être mises en contact avec le ligand à tester. Si le ligand se fixe de manière spécifique sur le RCPG, la cascade moléculaire induite par la protéine  $G\alpha_{16}$  va conduire à la production transitoire de lumière, détectable à l'aide d'un luminomètre (figure 39).

Une autre technique consiste à révéler l'augmentation transitoire de calcium cytosolique par fluorescence, et non par luminescence. Dans ce cas, les cellules transfectées avec la construction  $G\alpha_{16}$  et le vecteur contenant le récepteur d'intérêt sont incubées en présence d'un fluorophore calcique (Fluo4) avant d'être mises en contact avec les ligands potentiels. Si un ligand active le récepteur, l'augmentation de calcium cytosolique va conduire à un pic de fluorescence détectable grâce à un fluorimètre (figure 39).



**Figure 39 :** Cascade moléculaire induite par la fixation d'un ligand au RCPG testé entraînant le recrutement de la protéine  $G\alpha_{16}$  (1), qui active la phospholipase C clivant le phosphoinositol diphosphate en diacylglycérol et inositol triphosphate (2). Cet  $IP_3$  active les canaux calciques  $IP_3$ -dépendants du réticulum endoplasmique, induisant la libération de calcium intracellulaire, détecté par fluorescence ou luminescence (3). D'après Parmentier et Detheux, 2006.

Ainsi, cette technique d'endocrinologie inverse, développée depuis deux décennies maintenant, a permis la caractérisation de nombreux RCPGs orphelins : en excluant les récepteurs olfactifs et gustatifs, 350 RCPGs ont été clonés à ce jour en cellules de Mammifères, et le ligand endogène a été découvert pour 250 d'entre eux (Parmentier et Detheux, 2006).

### 3. Nature et origine des ligands testés

Les ligands potentiels testés sur ces système hétérologues peuvent être de nature très diverse : lipidique, peptidique ou encore protéique. Ils peuvent provenir de deux voies différentes, selon le but de l'expérimentation et les données existantes sur les ligands. Pour les tests avec des ligands potentiels de nature et de composition connues, ceux-ci sont synthétisés et testés un à un sur le RCPG étudié. Mais il n'est pas toujours possible d'utiliser des ligands synthétiques, par exemple, lorsque les ligands potentiels n'ont pas encore été caractérisés pour l'espèce étudiée. Ainsi, les tests d'endocrinologie inverse peuvent aussi être menés à partir d'extraits purifiés de tissu, ce qui permet de déterminer le ligand endogène d'un récepteur, même si celui-ci n'est pas disponible sous la forme synthétique.

Ainsi elle peut également être utilisée pour identifier de nouveaux ligands, grâce à leur liaison à des RCPGs. Pour le cas d'un récepteur de peptide, à partir d'un extrait peptidique fractionné par HPLC, chaque fraction est testée sur le RCPG étudié, et les fractions provoquant une activation du récepteur sont ensuite analysées par spectrométrie de masse. Les différents peptides qui les composent sont alors testés un à un, afin de déterminer lequel est capable de lier le récepteur.

De nouvelles molécules ont ainsi été découvertes par leur activité biologique sur les cellules transfectées avec des RCPGs orphelins, comme la nociceptine, les orexines, la prokinéticine, la ghréline, l'urotensine II, la neuromédine U ou le neuropeptide S. (Civelli *et al.*, 2006 ; Parmentier et Detheux, 2006 ; Chung *et al.*, 2007). Ces nouvelles techniques permettent donc de découvrir de nouvelles formes de peptides et de protéines, ainsi que des modifications post-traductionnelles et des conformations jusque-là inconnues. Ces découvertes restent probablement le point le plus intéressant de cette nouvelle méthode, par leur apport à la compréhension de la physiologie de l'organisme. Par exemple, trois familles de neuropeptides découvertes par ce biais ont permis de grandes avancées dans la compréhension de la régulation centrale de la prise alimentaire : les orexines A et B, la MCH (Melanin Concentrating Hormone) et la ghréline (Chung *et al.*, 2007). En effet, les orexines centralisent l'information concernant l'état métabolique de l'organisme afin d'augmenter la recherche de nourriture et la prise alimentaire (Sakurai *et al.*, 1998 ; Yamanaka *et al.*, 2003), alors que la MCH régule l'homéostasie énergétique au niveau central, mais peut également influencer sur la libération de leptine ou d'insuline, via son récepteur (Pissios et Maratos-Flier *et al.*, 2003). La ghréline, quant à elle, est un neuropeptide orexigène produit par l'estomac et

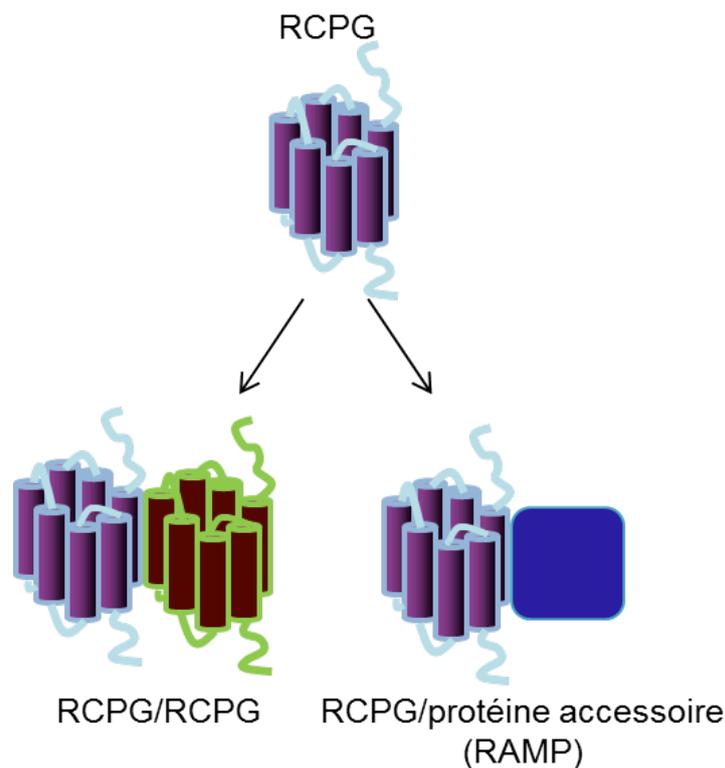
qui est capable d'inhiber l'action de la leptine. Elle se fixe au récepteur à l'hormone de croissance secrétagogue (GHS-R) et augmente ainsi l'excitabilité des neurones GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone), contribuant donc au contrôle de la sécrétion d'hormone de croissance (Feng *et al.*, 2011). Ainsi, avec la découverte de ces trois familles, la régulation complexe du comportement alimentaire a pu être mieux caractérisée, et tous ces neuropeptides sont également utilisés actuellement en pharmacologie pour soigner des troubles du métabolisme énergétique (Chung *et al.*, 2007).

#### 4. Limites de la méthode

Cette méthode présente cependant quelques limites, notamment des problèmes techniques qui empêchent encore l'identification des ligands endogènes d'un grand nombre de récepteurs. Tout d'abord, il existe des problèmes inhérents à l'expression en système hétérologue, comme par exemple des différences de modifications post-traductionnelles, conduisant à des configurations tridimensionnelles non fonctionnelles. Ces problèmes peuvent être cumulés au fait que le récepteur présente une activité constitutive qui masque la bonne détection du signal de liaison du ligand à ce récepteur. Cette activité constitutive est très fréquente, plus particulièrement lorsque l'expression des récepteurs est forte, comme c'est le cas lors d'expression en système hétérologue. De plus, la protéine  $G\alpha_{16}$  n'est pas à proprement parler universelle, puisque certains récepteurs se couplant naturellement à la protéine  $G_{\alpha s}$  ne peuvent pas lier  $G\alpha_{16}$  (Parmentier et Detheux, 2006). On estime seulement à environ 80% la proportion de récepteurs couplés aux protéines G pouvant recruter la protéine  $G\alpha_{16}$  ; pour les 20% restants, il est donc essentiel de trouver d'autres techniques pour mettre en évidence leur capacité ou non à lier un ligand potentiel.

De plus, il a été mis en évidence récemment les nombreuses relations entre RCPGs, notamment l'activité de certains en tant qu'homo- ou hétérodimères (Bulenger *et al.*, 2005). En effet, beaucoup de RCPGs existent en tant qu'hétérodimères, ce qui a été prouvé pour la première fois avec le récepteur  $GABA_B$  (Marshall *et al.*, 1999), puis a été accepté largement par la communauté scientifique (figure 40). Ces dimères de récepteurs peuvent à la fois être nécessaires à leur activité et à leur maturation, par exemple à leur adressage à la membrane (Bulenger *et al.*, 2005). Lors d'expression en système hétérologue, il apparaît évident que le récepteur transfecté ne pourra pas être fonctionnel en cas d'hétérodimérisation

obligatoire. D'autre part, il existe des protéines de natures différentes qui peuvent former des oligomères avec les RCPGs, c'est le cas des RAMP (Receptor Activity-Modifying Proteins). Elles ont été identifiées par McLatchie *et al.* (1998), pour leur rôle dans l'adressage du récepteur à la calcitonine à la membrane plasmique (figure 40). Ces RAMPs s'associent avec des récepteurs appartenant à la famille Secrétine, d'après la classification GRAFS des RCPGs (Christopoulos *et al.*, 2003). Il s'agit d'une famille de 3 protéines accessoires (RAMP1 à 3), qui peuvent moduler la fonctionnalité des récepteurs qu'elles lient. La protéine RAMP2, par exemple, se dimérise avec la signalisation du récepteur VPAC1 (vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating peptide), ce qui conduit à une inhibition du rôle phénotypique de ce récepteur (Christopoulos *et al.*, 2003). Certains récepteurs de type Secrétine nécessitent ainsi des protéines RAMP pour un bon adressage ou une bonne fonctionnalité, ce qui peut également constituer une limite lorsque l'on travaille en système hétérologue.



**Figure 40 :** Schématisation des différents dimérisations RCPGs : Les RCPGs peuvent former des dimères avec d'autres RCPGs de même nature (homodimérisation) ou de nature différente (hétérodimérisation), ou peuvent également s'associer à des protéines accessoires, comme les RAMP (Receptor Activity Modifying Proteins). D'après Gilchrist, 2010.

Lorsqu'un récepteur exprimé en cellules de Mammifères ne répond pas à un ligand potentiel, il est difficile de déterminer si le ligand n'est pas le bon, ou si le récepteur n'est simplement pas fonctionnel dans ces cellules. Plusieurs techniques existent pour vérifier si le récepteur transfecté semble fonctionnel : tout d'abord, les vecteurs d'expression contiennent des étiquettes qui se greffent à la séquence du RCPG et sont reconnues par des anticorps spécifiques, ce qui permet, une fois la transfection effectuée, de contrôler le bon adressage à la membrane du récepteur. En outre, il est également possible de transfecter des vecteurs contenant des séquences fusion RCPG-GFP (Green Fluorescent Protein), afin de visualiser le signal GFP, qui atteste de la bonne traduction du récepteur dans le système hétérologue, mais qui peut également renseigner sur l'adressage final de la protéine.

Par ailleurs, il est possible de se passer de la protéine  $G\alpha 16$ , si le récepteur ne peut pas la recruter, puisque les cellules de Mammifères utilisées expriment les autres types de protéines G. Pour les récepteurs se couplant biologiquement aux protéines  $G\alpha q$ , la protéine  $G\alpha 16$  n'est pas nécessaire, puisque ces RCPGs sont capables d'induire naturellement une augmentation de calcium intracellulaire par l'intermédiaire de la protéine  $G\alpha q$ . Toutefois, pour les récepteurs liant les protéines  $G\alpha s$  et  $G\alpha i$ , une méthode de détection des variations de l'AMP cyclique a été mise au point, pour pallier les problèmes de recrutement de la protéine  $G\alpha 16$  par le RCPG étudié. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein), qui est activé par phosphorylation, via la PKA, elle-même activée par l'AMP cyclique (Zhuang et Matsunami, 2008). Une fois activé, le facteur CREB induit l'expression du gène de la luciférase qui est directement quantifiable par luminométrie. La mesure de la variation d'AMPc peut également être réalisée par électrophysiologie, puisque ce messenger permet l'ouverture de canaux ioniques AMPc-dépendants. Enfin, la mesure du taux d'AMP cyclique peut être effectuée après les tests de liaison, grâce à des mesures de radio-immunologie (RIA), à partir d'extraits de cellules transfectées.

## B) Stratégie adoptée pour l'huître creuse *C. gigas*

Les récepteurs sélectionnés à partir de la banque d'EST de *Crassostrea gigas* ont été choisis pour leur homologie avec les récepteurs au neuropeptide F/Y. Or, leurs séquences présentent également des ressemblances avec les récepteurs d'autres peptides de la famille des

RFamides. Ainsi, pour optimiser les chances de déterminer le ligand endogène de chacun d'entre eux, plusieurs peptides ont été testés : tout d'abord, le neuropeptide Y de *C. gigas*, mais également tous les peptides de type RFamide déduits de la banque d'EST. Les précurseurs de neuropeptides présents dans la banque ont été identifiés grâce aux motifs d'amidation (résidu Gly) et de clivage qu'ils présentent. En effet, les précurseurs de neuropeptides présentent une organisation commune : les peptides sont clivés grâce à des sites de clivage dibasiques ou tribasiques, composés de résidus Lys et Arg, facilement repérables sur la séquence protéique.

Ainsi, les ligands peptidiques de type RFamide ont pu être testés sur les 5 récepteurs apparentés aux récepteurs au NPY/F par endocrinologie inverse.

## ***Matériel et méthodes :***

### **A) Amplification des récepteurs potentiels au NPY**

Pour amplifier les séquences entières des récepteurs, une *pfu* polymérase (Promega®) a été utilisée, pour son activité 3'-5' exonucléase, c'est-à-dire sa capacité de « relecture » qui lui permet d'amplifier de manière très fidèle l'ADNc matrice.

Les ARN messagers extraits à partir de tissus d'huîtres adultes sont rétro-transcrits (voir Matériel et Méthodes chapitre 1). L'ADNc obtenu est dénaturé en présence des amorces sens et anti-sens à une concentration de 400µM pendant 2 min à 95°C. Puis cet ADN est amplifié par la *pfu* polymérase dans 50µL de milieu réactionnel suivant : 1,25 unité de *pfu*, tampon *pfu* 1X (20mM Tris-HCl, 10mM KCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, Triton® 1X et 0,1mg/mL de BSA nuclease-free), 20µM de chaque dNTP, l'ADNc dénaturé, 400µM d'amorces sens et anti-sens. La température d'hybridation choisie pour les amorces est de 72°C (5 cycles), 65°C (5 cycles) puis 59°C (40 cycles), et les brins d'ADN néo-formés sont allongés à 73°C pendant 4 min à chaque cycle. L'ADN ainsi amplifié subit ensuite une phase d'élongation de 5 min à 73°C.

Une fois la séquence complète ainsi amplifiée, elle est purifiée sur gel pour ensuite être sous-clonée dans un vecteur d'expression pcDNA3.1 (Invitrogen®).

### **B) Clonage des récepteurs en vecteur d'expression pcDNA3.1**

La ligation de la séquence du RCPG dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 (Invitrogen®) est réalisée selon les instructions du fournisseur. Le produit de ligation est ensuite dessalé sur des colonnes à 1% d'agarose et 20mM de glucose pour la transformation des bactéries électrocompétentes *E. coli*.

Un aliquot de bactéries compétentes *E. coli* est décongelé lentement sur glace, avant de les électroporer en présence d'1µl d'ADN à transférer, à 1,8kV. 500µl de milieu LB liquide glucosé à 20mM sont immédiatement ajoutés et le mélange est incubé pendant 1h à

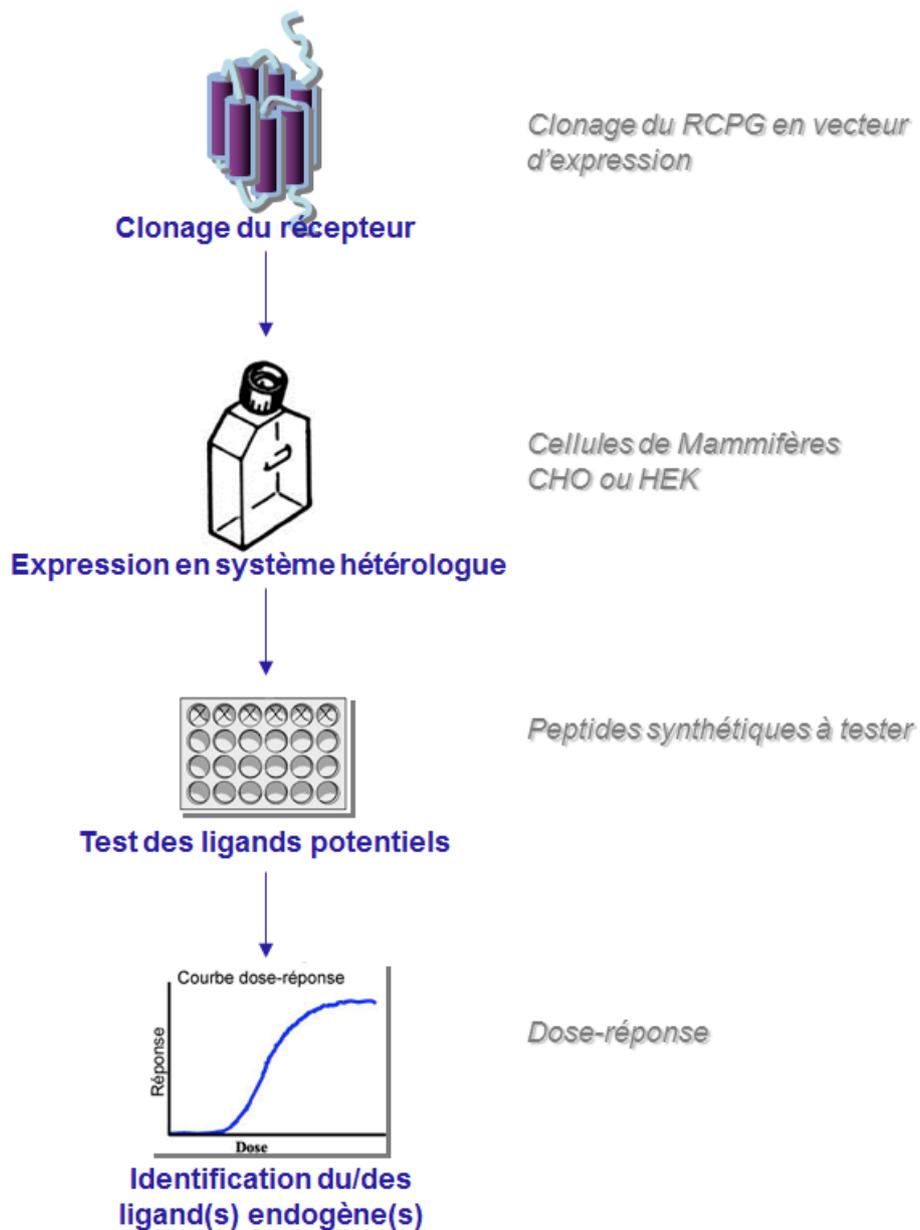
37°C avec une légère agitation. Après l'incubation, ce mélange est étalé sur boîte de LB Agar + Ampicilline, et placé à 37°C pendant une nuit. Les colonies bactériennes formées sont alors repiquées dans un milieu LB liquide + Ampicilline puis à nouveau incubées une nuit à 37°C avec agitation. L'ADN alors cloné est purifié après centrifugation des bactéries, grâce au kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega®), selon les instructions du fournisseur.

### C) Tests d'endocrinologie inverse

Etant donné les fréquents problèmes d'expression ou d'adressage des RCPGs transfectés, et afin d'optimiser les chances d'avoir une transfection efficace, chaque récepteur a été transfecté dans trois lignées cellulaires distinctes : deux lignées de cellules CHO (Chinese Ovary Hamster) et une lignée de cellules HEK (Human Embryonic Kidney), la lignée HEK293T. Les lignées de CHO utilisées sont la lignée WTA11, qui exprime de manière stable l'aéuorine et la protéine  $G\alpha 16$ , et la lignée PAM28 qui exprime seulement l'aéuorine. Pour les CHO, des tests de luminescence ont été menés grâce au système aéuorine, et pour les HEK, le calcium a été révélé par fluorimétrie.

Ainsi, tous les tests effectués ont été réalisés dans chacun des 3 types cellulaires cités, avec et sans co-expression de la protéine  $G\alpha 16$  avec le récepteur étudié, pour les deux lignées ne l'exprimant pas de manière stable (CHO PAM28 et HEK293T).

Pour chaque récepteur, la séquence complète du RCPG est clonée et exprimée en cellules de Mammifères. Ces cellules sont alors mises en contact avec les différents ligands peptidiques à tester, et si le récepteur est activé par l'un d'eux, une courbe dose-réponse est réalisée pour déterminer la spécificité de la liaison et l'affinité du récepteur pour ce ligand (figure 41).



**Figure 41 :** Schéma de principe du protocole utilisé en endocrinologie inverse pour déterminer le(s) ligand(s) endogène(s) d'un récepteur couplé aux protéines G, par le biais de l'expression de ce récepteur en cellules de Mammifères.

### Préparation des cellules :

Les cellules CHO sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium) - Ham (Sigma®) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen®), 100 IU/mL pénicilline-streptomycine (Sigma®), 250 µg/mL Zéocine (Invitrogen®) et 2,5 µg/mL Fungizone (Amphotérine B; Invitrogen). Les cellules sont

cultivées dans 5mL de ce milieu dans des flasques de culture de 25cm<sup>2</sup> puis incubées une nuit à 37°C, afin qu'elles atteignent environ 80% de confluence.

### **Transfection :**

Dans un tube en polystyrène, 15,6µl de Fu-Gene (Roche®) sont ajoutés à 234,4µL de milieu sans sérum. Après 5 min d'incubation à température ambiante, 2,6µg d'ADN, c'est-à-dire de vecteur d'expression contenant la séquence du récepteur d'intérêt, sont ajoutés puis le mélange est incubé 40 min à température ambiante. Les cellules sont décollées de la flasque par trypsinisation, avant d'être reprises dans 1,5mL de milieu DMEM-HAM dans une nouvelle flasque de culture. Le mélange de transfection est alors ajouté à ces 1,5mL de milieu, et la flasque est placée une nuit à 37°C.

Après avoir ajouté 7mL de milieu, les cellules transfectées sont replacées à 37°C pendant une nuit.

Les peptides sont repris dans du milieu BSA (Bovine Serum Albumine)-DMEM-F12 (sans phénol, pour éviter que la coloration n'interfère avec les tests de luminescence), filtré à 22µm, à une concentration finale de 10µM.

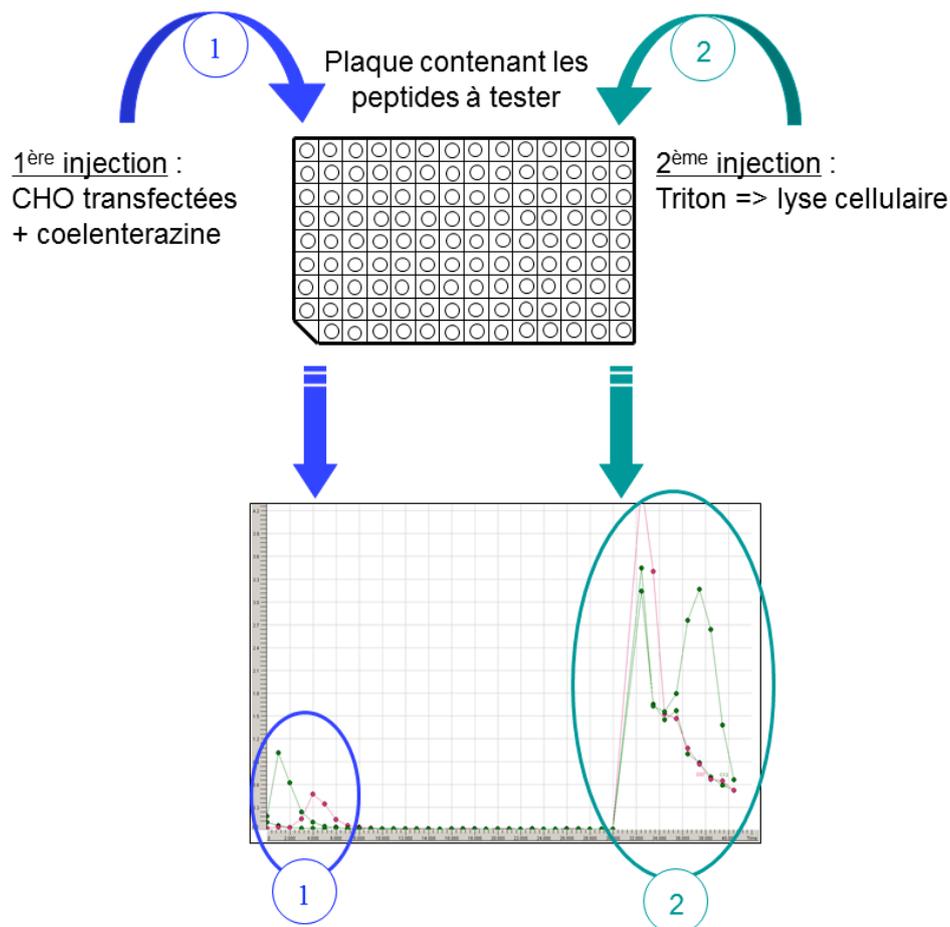
Les cellules sont collectées, comptées et reprises dans le milieu BSA-DMEM-F12 à une concentration finale de  $5 \cdot 10^{-6}$  cellules/mL. Après ajout de coelenterazine (Invitrogen®) à une concentration finale de 5µM, le mélange est incubé 4 heures à température ambiante avec agitation. Avant les tests, la suspension cellulaire est diluée au 1/100ème avec le milieu BSA-DMEM-F12, puis incubée 30 min supplémentaires.

Les solutions suivantes sont alors injectées dans chaque puits de la microplaque contenant les peptides à tester :

- 1) La solution BSA-DMEM contenant les cellules transfectées
- 2) Une solution de Triton, qui sera injectée après les cellules, pour les lyser et ainsi libérer tout le calcium intracellulaire. Cette étape permet pour chaque test de vérifier que l'injection des cellules a bien eu lieu, et que la détection du calcium par le système coelenterazine/aequorine se fait correctement.

La luminescence est alors mesurée dans chaque puits pendant 30sec. Pour chaque récepteur ainsi testé, un puits de la plaque de peptides est rempli avec de l'ATP à 3 $\mu$ M, qui constitue un contrôle positif, puisque l'ATP est capable d'activer des canaux calciques ATP-dépendants, provoquant ainsi un pic de calcium intracellulaire.

Lors des tests avec les cellules CHO et le système aequorine, la luminescence est mesurée pendant 30 secondes à compter de l'injection des cellules transfectées avec le RCPG étudié sur le puits contenant un peptide. Chaque puits, donc chaque ligand potentiel, est ainsi testé un à un. Suite à l'injection des cellules, en fin de lecture de luminescence, une seconde injection ajoute du triton au mélange cellules transfectées - peptide, afin de lyser les cellules et de libérer tout le calcium intracellulaire. Ainsi, pour chaque puits, un profil de luminescence est établi, avec un pic final proportionnel à la quantité de cellules injectées (figure 42).



**Figure 42 :** Exemple de résultat de test d'endocrinologie inverse par transfection d'une lignée CHO et détection du calcium intracellulaire par luminescence. Les premiers pics font suite à l'injection des cellules transfectées sur les peptides testés, les seconds pics sont consécutifs à l'ajout de Triton dans le mélange cellules - peptides, provoquant la lyse des cellules et la libération de tout le calcium intracellulaire.

Le protocole utilisant la lignée cellulaire HEK est détaillé dans la publication ci-jointe, avec une détection du calcium par fluorescence, plus communément utilisée pour établir des courbes de dose-réponse.

Pour chaque récepteur, en plus des ligands potentiels, deux puits témoins sont testés :

✚ Un témoin négatif, dans un puits contenant seulement le milieu sans phénol + BSA, servant à reprendre les peptides

✚ Un témoin positif, dans un puits contenant de l'ATP à 3 $\mu$ M repris dans ce même milieu avec BSA. L'ATP permet d'activer des canaux calciques ATP-dépendants qui engendrent la libération du calcium dans le cytosol, augmentant donc transitoirement le taux de calcium intracellulaire.

## Résultats :

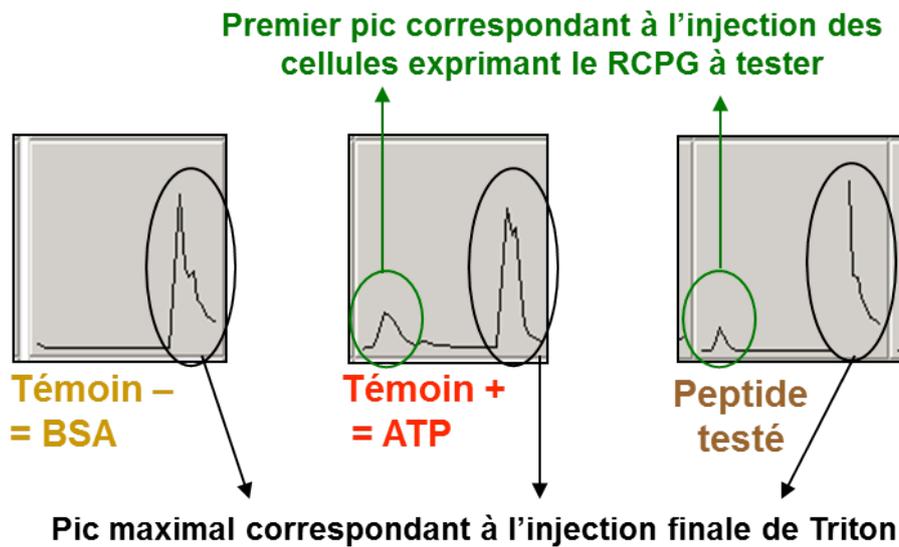
D'après la banque d'ESTs Gigas Database, plusieurs séquences uniques correspondant à des précurseurs de neuropeptides ont été isolées. Ces séquences, une fois traduites, ont permis de prédire l'existence de plusieurs peptides de type RFamide, ainsi que des peptides apparentés (LRamides, MRamides) (tableau 4). Ces peptides ont donc été considérés comme ligands potentiels des 5 récepteurs identifiés comme apparentés aux récepteurs au NPF/Y, avec le NPF/Y de *C. gigas*, sa forme courte détectée en spectrométrie de masse, ainsi qu'une seconde forme courte, déduite d'après le clivage mis en évidence sur plusieurs NPFs entre les deux résidus Y (Nässel et Wegener, 2011).

**Tableau 4 :** Liste des différents peptides testés sur les récepteurs apparentés aux récepteurs NPY/F de *C. gigas*. Les peptides de *C. gigas* ont été déduits des séquences de précurseurs présents dans la banque d'EST, les peptides apparentés aux FMRFamides de *Drosophila* proviennent d'une librairie de peptides disponible pour ce modèle, et les 3 autres GnRH ont été synthétisés à partir de séquences connues. Les peptides de type GnRH, AKH et A/R/K/VPGWamide ont servi aux tests sur les deux orthologues de récepteurs au GnRH. Les autres peptides (RFamides et apparentés) ont été testés sur les cinq récepteurs apparentés au récepteurs NPF/Y.

Cg = *Crassostrea gigas*, Lm = *Locusta migratoria*.

Nom du peptide	Séquence peptidique
<b>Peptides de <i>C. gigas</i></b>	
CgNPY/F	NDSLPPNRSRFSPPGQLRQYLKALNDYYAIVGRPRFamide
CgNPY/F1	ALNDYYAIVGRPRFamide
CgNPY/F2	YAIVGRPRFamide
FMRFa	FMRFamide
FLRFa	FLRFamide
GF6	GALFRFamide
GF6-1	GSLFRFamide
AF10	ALSGDHYIRFamide
AR7	ARFFGLRamide
FR7-1	FRFTALRamide
FR7	FGFAPMRamide
<b>Peptides de <i>D. melanogaster</i></b>	
FMRFa-1	DPKQDFMRamide
FMRFa-2	TPAEDFMRFamide
FMRFa-3	SDNFMRFamide
FMRFa-4	SPKQDFMRamide
FMRFa-5	SVQDNFMHFamide
FMRFa-6	MDSNFIRFamide
FMRFa-7	SAPQDFVRSamide
FMRFa-9	PDNFMRFamide
<b>Autre peptide</b>	
Lm sNPF	YSQVARPRFamide

Chacun de ces peptides a donc été déposé dans un puits de microplaque, afin d'y injecter les cellules exprimant chacun des cinq récepteurs à étudier. La luminescence est alors mesurée dans chacun de ces puits. Les profils de luminescence obtenus pour chaque puits reflètent l'activation ou non du récepteur exprimé par les cellules (1<sup>er</sup> pic) et la quantité de cellules injectées (2<sup>ème</sup> pic) (figure 43).



**Figure 43 :** Exemple de résultats de dosage calcique à l'aide du système aequorine, avec double injection : la première avec les cellules exprimant le récepteur H4, et la deuxième avec le Triton. Profils de luminescence dans un puits contenant : un témoin négatif (BSA), donc sans premier pic, d'un témoin positif (ATP), avec deux pics, à chaque injection, et du FMRFa9 de drosophile qui a engendré une réponse du récepteur, puisque le profil présente également deux pics (à l'injection des cellules et à l'injection du Triton).

Les résultats les plus probants ont été obtenus en cellules CHO PAM28, avec ou sans expression de la protéine Ga16, selon les cas. Excepté pour le récepteur F3, qui a répondu à des peptides endogènes d'huître dans tous les modèles cellulaires étudiés (voir publication jointe), les cellules CHO WTA11 et les cellules HEK n'ont pas permis d'obtenir des résultats fiables et reproductibles.

Les cinq récepteurs apparentés aux récepteurs NPY ont donc été testés avec tous les peptides listés, avec et sans Ga16. Lorsque le récepteur est activé également avec et sans protéine Ga16, c'est qu'il active naturellement la voie des inositols triphosphate qui conduit à la libération de calcium intracellulaire (protéine Gαq endogène). Si la protéine Ga16 est nécessaire pour avoir une réponse calcique, c'est que la voie cellulaire activée par le récepteur influence le taux d'un autre second messager, l'AMP cyclique (protéine Gαs ou Gαi endogène).

Pour la plupart des récepteurs, des résultats ont été obtenus avec la technique d'endocrinologie inverse, en transfectant des cellules CHO PAM28, avec ou sans la nécessité d'une co-expression avec la protéine Ga16, selon le récepteur (tableau 5).

**Tableau 5 :** Récapitulatif des peptides ayant activé chacun des cinq RCPGs de *C. gigas* étudiés, transfectés en cellules CHO PAM28 exprimant de manière stable l'aéuorine, mais pas la protéine Ga16. Cette protéine Ga16 est nécessairement co-exprimée pour deux d'entre eux (A4 et H4), mais les autres récepteurs n'en ont pas besoin pour induire une augmentation de calcium, ce qui indique la(les) protéine(s) G recrutée(s) par ces récepteurs.

<b>Récepteur transfecté</b>	<b>Peptide(s) activateur(s)</b>	<b>Ga16 co-transfectée ?</b>	<b>Protéine(s) G probablement associée(s) au RCPG</b>
<b>A4</b>	<b>CgNPY/F2 (YAIVGRPRFa)</b>	<b>Oui</b>	<b>Gas ou Gai</b>
<b>D1</b>	<b>Lm sNPF (YSQVARPRFa) FMRFa9 (PDNFMRFa)</b>	<b>Non</b>	<b>Gaq</b>
<b>F3</b>	<b>GF6 (GALFRFa) GF6-1 (GSLFRFa)</b>	<b>Non</b>	<b>Gaq</b>
<b>H4</b>	<b>FMRFa3 (SDNFMRFa) FMRFa9 (PDNFMRFa)</b>	<b>Oui</b>	<b>Gas ou Gai</b>
<b>F1</b>	<b>FMRFa9 (PDNFMRFa)</b>	<b>Non</b>	<b>Gaq</b>

Aucune réponse avec des ligands synthétiques testés de la banque Gigas Database n'a été obtenue pour les récepteurs H4 et F1, mais ceux-ci ont été activés par des peptides apparentés au FMRFamide de *D. melanogaster*. H4 a montré une activation lors des tests avec les deux peptides FMRFa3 et FMRFa9 qui présentent une structure très similaire puisqu'ils ne diffèrent que d'un seul acide aminé. Le récepteur F1, quant à lui, n'a engendré une réponse calcique qu'en présence du peptide FMRFa9. Ces ligands étant exogènes, aucune conclusion ne peut être formulée quant au(x) ligand(s) endogène(s) de ces récepteurs. Ils lient certainement des peptides apparentés au FMRFamide, mais qui n'ont pas encore été identifiés chez *C. gigas*. Cependant ces deux RCPGs sont de natures différentes, puisque seul H4 nécessite une co-transfection avec le vecteur codant la protéine Ga16 pour être activé. Ce dernier n'augmente donc pas le taux de calcium intracellulaire de manière endogène, et recruterait ainsi des protéines Gas ou Gai, qui modulent le taux d'AMPc, alors que le récepteur F1 est capable de moduler la concentration calcique en absence de Ga16, ce qui signifie qu'il recrute la protéine endogène Gaq.

Lors des premiers tests en cellules CHO, le récepteur D1 avait engendré un signal luminescent, en présence de la forme courte du NPY/F du criquet *Locusta migratoria*. Or cette forme courte (correspondant aux 9 résidus C-terminaux du NPY/F long) est fortement semblable à l'extrémité C-terminale du NPY/F de *C. gigas*. De plus, de tels sites de clivage, entre deux résidus tyrosine, ont été rapportés dans la littérature pour plusieurs neuropeptides Y/F (Nässel et Wegener, 2011). Nous avons donc testé cette forme courte synthétique, CgNPY2, bien qu'elle n'ait jamais été détectée en spectrométrie de masse. Malheureusement, ce récepteur D1 n'a pas été activé par le peptide tronqué CgNPY/F2 ; de plus, la réponse du récepteur au NPY/F court de *L. migratoria* n'a pas été révélée lors des tests suivants, ou dans les autres lignées cellulaires. Ce même récepteur a également été activé par le FMRFa9 de *D. melanogaster*, renforçant l'hypothèse qu'il s'agit bien d'un récepteur aux peptides de type RFamide, mais sans information sur la nature exacte de son ligand.

Le récepteur A4, quant à lui, a engendré une réponse calcique en présence de cette même forme tronquée synthétique du NPY/F de *C. gigas*, lors de deux tests successifs en cellules CHO PAM28. Ce résultat est tout à fait intéressant, puisqu'il pourrait révéler l'existence d'un nouveau récepteur à la forme courte de NPY/F. Cependant, ce résultat n'a pas pu être obtenu dans les autres lignées cellulaires (HEK ou CHO WTA11), et nous n'avons pas été en mesure d'effectuer des courbes de dose réponse, à cause du signal luminescent faible et du manque de reproductibilité de ce signal. Ainsi, la liaison d'un neuropeptide Y/F tronqué au récepteur A4 ne reste qu'une hypothèse qui reste à être confirmée par des tests supplémentaires. Néanmoins, cette hypothèse est très probable, puisqu'il est connu que les récepteurs de NPY/F courts font également partie de la famille des récepteurs apparentés aux récepteurs NPY (Mertens *et al.*, 2002). Ce récepteur nécessitant la co-expression de la protéine Ga16 pour être activé, il recrute donc de manière endogène la protéine Gas ou Gai, et est ainsi capable d'augmenter ou diminuer le taux d'AMP cyclique intracellulaire. Pour confirmer la liaison de CgNPY/F2, des tests de mesure du taux d'AMP cyclique par luminescence ont été également effectués. En effet, il a déjà été prouvé que de tels récepteurs sont capables chez d'autres espèces de diminuer le taux d'AMPc, notamment chez la Limnée, et qu'ils recruteraient donc la protéine Gai (Tensen *et al.*, 1998). Ainsi, pour mettre en évidence une régulation négative du taux d'AMPc, le récepteur est transfecté dans des cellules CHO K1. Afin de visualiser une éventuelle diminution du taux d'AMPc, celui-ci est maximisé par l'ajout de forskoline, activateur de l'adénylate cyclase, dans le milieu. En comparant le taux d'AMPc dans les cellules transfectées (incubées en présence ou en l'absence de

forskoline) aux cellules non transfectées, l'inhibition d'augmentation d'AMPc par la forskoline peut être mise en évidence. Malheureusement, aucun résultat significatif n'a été obtenu avec le récepteur A4 pour le moment avec le neuropeptide Y/F tronqué.

Cependant, parmi tous ces peptides, seuls les peptides de type LFRFamide ont été reconnus comme véritable ligands d'un récepteur, F3, puisqu'ils lient ce récepteur de manière reproductible et dose-dépendante (voir publication ci-jointe).

## Functional characterizations of a LFRFamide receptor and its ligands in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*\*

### Abstract.

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* shows an annual cycle of reproduction with alternating storage and mobilization of energetic reserves. The regulation of this cycle requires the integration of multiple environmental signals leading to the secretion of (neuro)hormones such as potentially the Neuropeptide Y/F (NPY/F). Indeed, this widespread family of neuropeptides is known to be involved in the coordination of energy flows in relation with food intake and reproduction in many animal models.

Like most neuropeptide hormones, NPY binds receptors of the G protein-coupled receptor (GPCR) family. *In silico* screening of the “GigasDatabase”, a specific databank currently containing up to 80,000 independent sequences from *C. gigas* resulted in the identification of Cg-NPY/F-like receptor but phylogenetically closer to insect sNPF receptors.

To identify the cognate ligand of Cg-NPY/F-like receptor, a reverse endocrinology approach was undertaken. Although Cg-NPY/F and its N-terminal truncated forms did not activate the receptor at any concentration tested, two –RFamide family of peptides both derived from the same precursor, i.e. GSLFRFamide and GALFRFamide, specifically activated the receptor in a dose-dependent manner, with respective EC50 values of 245nM and 487nM. In contrast FM/LRFamide peptides were inactive.

We found that both the Cg-NPY/F-like receptor and LFRFamide encoding transcripts were expressed in the central nervous system and in other tissues as well, albeit at lower levels. In contrast, LFRFamide peptides were found to be widely distributed in various tissues, according to mass spectrometry results.

The receptor was more abundantly expressed in female ganglia compared to male ganglia, and was up-regulated in starved animals. In the gonad area, highest receptor gene expression was found at the start of gametogenesis, when storage activity is maximal.

We suggest that the LFRFamide signalling pathway could play a role in the coordination of nutrition, energy storage metabolism in *C. gigas*, possibly by promoting storage at the expense of reproduction.

\* This work was performed in collaboration with Isabel Beets<sup>1</sup>, Liliane Schoofs<sup>1</sup>, Pierre Boudry<sup>2</sup> and Pascal Favrel<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>- Laboratory for Developmental Physiology and Molecular Biology, University Leuven

<sup>2</sup>- Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins Ifremer Centre de Brest.

<sup>3</sup>- BioMEA FRE 3484 CNRS INEE, Université de Caen Basse-Normandie

## 1. Introduction

In the pacific oyster *Crassostrea gigas*, both gametogenesis and glycogen storage metabolism occur in the gonadic area and exhibit annual cycles. Energy storage is consumed during stages of mitosis and meiosis, and then storage tissue is restored after spawning, demonstrating the physiological balance existing between reproduction and energy storage and metabolism (Berthelin et al., 2000). In most animals, the neuropeptide Y/F (NPY/F) family including the vertebrate neuropeptide Y (NPY) and its non-vertebrate counterpart NPF, plays a crucial role in the regulation of this physiological balance (Hill et al., 2002 ; Crown et al., 2007). Indeed NPY, one of the most abundant peptide in the central nervous system of vertebrates, is implicated in the regulation of a variety of physiological processes such as food intake, reproduction, energy homeostasis, circadian rhythm, learning and memory (Minth et al., 1984). Similarly, both in insects and molluscs, NPY/Fs mediate feeding behaviour, energy metabolism and reproduction (Stanek et al., 2002; Wu et al., 2003; De Jong-Birnk et al., 2001; Jing et al., 2007). Although post-translational truncated NPY/F forms exist in various species (Clynen et al., 2009; Huang et al., 2011), a new group of short NPFs (sNPF) displaying NPY/F C-terminal sequence similarity but encoded by a separate gene were independently identified in insects (see Nässel and Wegener, 2011, for review). Interestingly, insect sNPFs also play key roles in the regulation of feeding behaviour (Lee et al., 2004; Brown et al., 1994; Brockmann et al., 2009) and the control of reproduction (Cerstiaens et al., 1999; De Loof et al., 2001). These distinct sets of peptides specifically bind separate G Protein-coupled receptors (GPCRs) that display significant relatedness (Mertens et al., 2002, Feng et al., 2003). Except in bivalves, both NPY/F neuropeptides and/or their cognate receptor have been characterized in different classes of molluscs (Smart et al., 1992; Rajpara et al, 1992; Tensen et al, 1998). In contrast, sNPF neuropeptides do not seem to occur in molluscs. In oyster, control of energy balance in relation with reproduction and nutrition appears to involve a variety of signals (Jouaux et al., 2012, Bigot et al., 2012). To gain further insight into the neuroendocrine control of these intricate functions in oysters, sequence encoding NPY/F and its cognate receptor were searched in “GigasDatabase”, a specific databank currently containing up to 80,000 independent sequences from *C. gigas* (Fleury et al., 2009).

In this study we identified from oyster expressed sequences, a NPY/F-related receptor with structural features and an expression pattern expected for a genuine NPY/F receptor. Pharmacological investigations demonstrated that this receptor does not bind the endogenous

oyster Cg-NPY/F but instead a distinct family of -RFamide-related peptides with potential involvement in the control of feeding, energy metabolism and reproduction.

## 2. Material and methods

### 2.1 Animals

Two years old adult oysters *Crassostrea gigas* purchased from a local oyster farm (Normandie, France) were used for peptide characterization, transcription analyses and immunohistochemistry. Stages of reproduction (Stage 0: resting undifferentiated stage, Stage I: gonial multiplication stage, Stage II: maturation stage, Stage III: sexual maturity) were determined by histological analysis of gonad sections. To study the influence of trophic conditions, one year old adult oysters were reared in water tanks either in absence of food or with a 12% diet (12% of oyster dry weight in algal (mixture containing *Isochysis galbana* (clone T-ISO), *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*) dry weight per day) in controlled experimental conditions during 3 weeks. Adult mussels were obtained from commercial mussel farms from west Cotentin (Normandy, France).

### 2.2 Reverse endocrinology

#### Molecular Cloning of the Cg-NPY/F-R like receptor and Transfection in Mammalian Cells :

*In silico* screening of GigasDatabase resulted in the identification of a partial cDNA encoding a Cg-NPY/F-R-like receptor (CU993362). Full-length cDNA was generated with cDNA corresponding to visceral ganglia mRNA by 5'- and 3'- RACE using GeneRacer kit (Invitrogen®). The ORF of Cg-NPY/F-R-like receptor gene was amplified by means of PCR (pfu DNA polymerase, Promega®) using specific sense (5'-CACCATGGCTCAGAACGT-3') and antisense (5'-TCACACGGAATCGTCGGTGGTATCAG-3') primers and performed on the cDNA (MMLV Reverse Transcriptase, Promega®), synthesized from mRNA (RNA Nucleospin II, Macherey Nagel®) extracted from *C. gigas* visceral ganglia. The resulting PCR product was directionally cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen) and sequenced. Human embryonic kidney (HEK293T) cells were transiently transfected with the Cg-NPY/F-R like receptor/pcDNA3.1 and (eventually)  $G\alpha_{16}$ /pcDNA3.1 (encoding the promiscuous  $G\alpha_{16}$  protein) expression constructs using FuGene 6 (Roche®).

### Fluorescence Assay:

The transfected HEK293T cells were loaded with Fluo-4-AM (Molecular Probes) for 1 hour. Excitation of the fluorophore was done at 488 nm. The Ca<sup>2+</sup> response was measured for 2 min at 525 nm using a FLEXstation (Molecular Devices®) at 37°C. Data were analyzed using Softmax Pro (Molecular Devices®).

### *2.3 Reverse transcription and quantitative PCR*

Real time RT-qPCR analysis was performed using the iCycler iQ© apparatus (Bio-Rad). Total RNA was isolated from adult tissues using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Recovered RNA was then further purified on Nucleospin RNAII columns (Macherey-Nagel). After treatment during 20 min at 37°C with 1 U of DNase I (Sigma) to prevent genomic DNA contamination, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using 1 µg of random hexanucleotidic primers (Promega), 0.5 mM dNTPs and 200 U MMuLV Reverse Transcriptase (Promega) at 37°C for 1 h in the appropriate buffer. The reaction was stopped by incubation at 70 C for 10 min. iQ™ SYBR Green Supermix PCR kit (Biorad) was used for real time monitoring of amplification (5 ng of cDNA template, 40 cycles: 95°C/15 s, 60 C/15 s) with the following primers: Qs-Cg-NPY/F-R like receptor 5'-GCTTACTCGTCATTGTGTCAA-3' and Qa-Cg-NPY/F-R like receptor 5'-CATTCTTCAGCGCACCTGT-3' as sense and antisense primers for Cg-NPY/F-Rlike receptor cDNA, and Qs-Cg-LFRFa 5'-CAGGTTTGGGAAACGTATGG-3' and Qa-Cg-LFRFa 5'AAACCGGAAAAGGCTTCCT-3' as sense and antisens primers for Cg-LFRFamide cDNA. Accurate amplification of the target amplicon was checked by performing a melting curve. Using Qs-Cg-EF1α (5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3') and Qa-Cg-EF1α (5'-ACGACGATCGCATTTCTCTT-3') primers, a parallel amplification of oyster Elongation Factor 1α (EF1α) transcript (BAD15289) was carried out to normalize the expression data of each transcript. The relative level of each gene expression was calculated for one copy of the reference elongation factor 1α gene according to the following formula:

$$N = 2^{(Ct_{EF1} - Ct_{Oyster\ cDNA})}$$

### *2.4 Extraction of tissues for peptide analysis*

Twenty animal equivalents of each organ studied (visceral ganglia, gonadic area, labial palps, digestive gland, mantle, mantle edge, muscles, gills) were extracted in 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) at 4°C and centrifuged for 30 minutes at 35,000 x g at 4°C. The supernatants were concentrated on Chromafix C18 solid phase extraction cartridges (Macherey-Nagel). Samples were evaporated for nano LC or HPLC purification.

### *2.5 Mass spectrometry analysis*

MS analysis were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF TOF ion optics and an OptiBeam™ on-axis laser irradiation with 1000 Hz repetition rate. The system was calibrated immediately before analysis with a mixture of des-Arg-Bradykinin, Angiotenin I, Glu1-Fibrinopeptide B, ACTH (18-39), ACTH (7-38) and mass precision was above 50 ppm. A 0.8µL volume of the HPLC fraction was mixed with 1.6µL volume of a suspension of CHCA matrix prepared in 50% ACN / 0.1% TFA solvent. The mixture was spotted on a stainless steel Opti-TOF™ 384 targets; the droplet was allowed to evaporate before introducing the target into the mass spectrometer. All acquisitions were taken in automatic mode. A laser intensity of 3000 was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing 1000 single spectra (5 × 200) in the mass range from 600 to 4000 Da. MS/MS spectra were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2500 single spectra (10 × 250) with a laser intensity of 3900. For the tandem MS experiments, the acceleration voltage applied was 1 kV and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings. The fragmentation pattern was used to determine the sequence of the peptide. Database searching was performed using the Mascot 2.3.02 program (Matrix Science) from the latest version of *C. gigas* “GigasDatabase” (Fleury et al., 2009) (including 1,013,570 entries) [http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/index.html](http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html). The variable modifications allowed were as follows: C-terminal amidation, N-terminal pyroglutamate, N-terminal acetylation, methionine oxidation and dioxidation. Mass accuracy was set to 100 ppm and 0.6 Da for MS and MS/MS mode respectively.

### *2.6 Mapping of LFRFamide peptides by HPLC analysis*

HPLC analysis was performed with the software LC-STAR VARIAN connected to a

VARIAN 9012 solvent delivery system and a VARIAN 9050 wave length UV-VIS detector set at 214 nm. Tissue extracts were resuspended in 0.1% acetic acid and fractionated by HPLC onto a nucleodur C8 column (Macherey Nagel, 250 x 4, 5 $\mu$ m) with a 45-min acetonitrile linear gradient of 1.33% per minute in 0.1% acetic acid. HPLC fractions co-eluting with synthetic GALFRFamide and GSLFRFamide (GL Biochem, China) were evaporated for mass spectrometry analysis.

### 3. Results

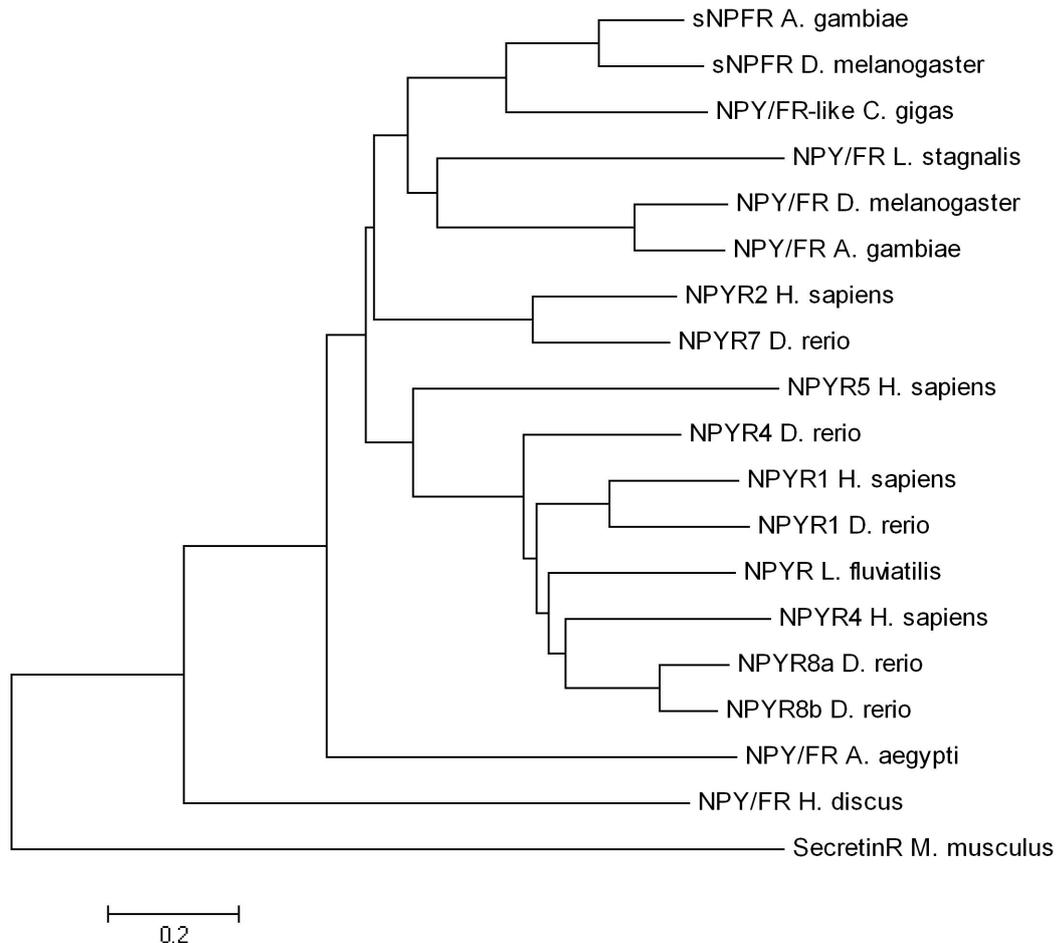
#### 1) Characterization of Cg-NPY/F-R-like receptor

Blast search in GigasDatabase using *Lymnaea stagnalis* NPY/F receptor sequence (Tensen et al., 1998) led to the identification of an EST (CU993362) encoding a partial GPCR. Full length cDNA (1312 bp) generated by RACE codes for a 404 amino acid protein exhibiting the hallmarks of a peptide GPCR with seven putative membrane spanning domains and a short extracellular domain. A search in the EMBL/Genbank databank revealed maximum identity of this oyster GPCR with *A. gambiae* short neuropeptide F receptor (46%), and significant identity with the gastropod mollusc *L. stagnalis* NPY/F receptor (36%) and with both insects (*Drosophila*: 24%; *A. gambiae* 27,6%) and vertebrate NPY/F type 2 receptors (24,9% with Human receptor). Maximum homology between these GPCRs essentially concerns the regions encompassing the transmembrane domains (TM), though an almost strictly conserved cluster of amino acids (A/GWM/LNDNFRKEF) of unknown function can be noticed in the cytosolic domain close to TM 7 (Fig. 1).

A phylogenetic analysis shows that Cg-NPY/F-R-like receptor clusters with insect sNPF receptors and in a separate branch from biochemically characterized insect and *Lymnaea* NPY/F receptors. Although distantly related, human type 2 receptor also clusters with all these receptors (Fig. 2).



**Figure 1:** Local alignment of complete cDNA translation of the *Cg*-NPY/F-R-like receptor and the complete amino acid sequence of other related receptors. Accession numbers in GenBank : Neuropeptide F receptor (NPY/F-R) *D. melanogaster*, AAF51909.3; NPY/F-R *A. gambiae*, AAT81602.1; NPY/F-R *L. stagnalis*, CAA57620.1; sNPF-R *A. gambiae*, ABD96049.1; NPY-R2 *H. sapiens*, CCDS3791.1. Transmembrane domains of each receptor are framed. \* Potential sites of N-glycosylation.

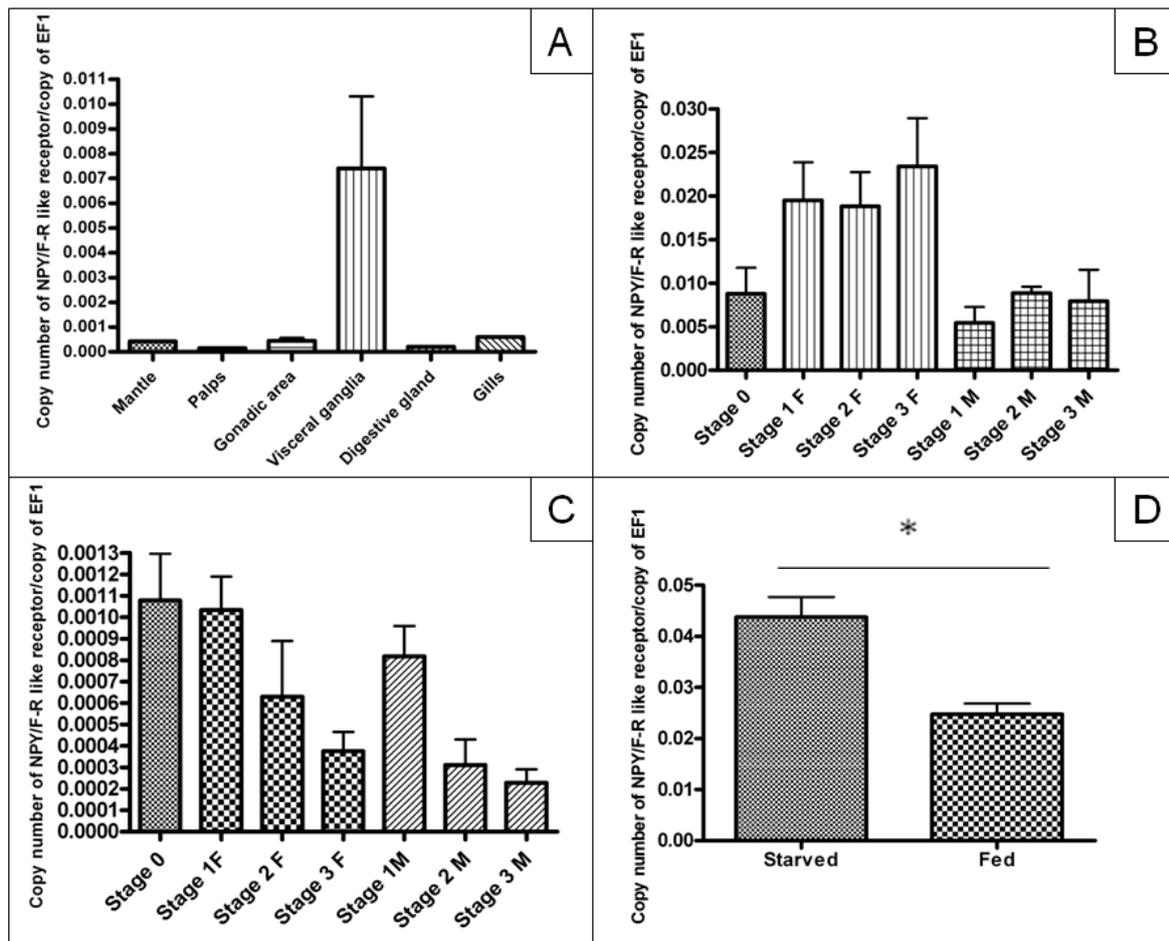


**Figure 2 :** Phylogenetic representation of the relationship between *C. gigas* NPY/F-R-like receptor and NPY/F and sNPF receptors. The tree was generated by neighbor-joining method with Mega4 software. The mouse secretin receptor has been chosen as outer group. Accession numbers in GenBank : Neuropeptide Y/F receptor (NPY/F-R) *D. melanogaster*, AAF51909.3; NPY/F-R *A. gambiae*, AAT81602.1; NPY/F-R *L. stagnalis*, CAA57620.1; NPY/F-R *A. aegypti*, AAY46405.1; NPY/F-R *H. discus*, ABH10673.1; sNPF-R *A. gambiae*, ABD96049.1; sNPF-R *D. melanogaster*, AAF49074.2; NPYR1 *H. sapiens*, NP\_000900.1; NPYR2 *H. sapiens*, CCDS3791.1; NPYR4 *H. sapiens*, NP\_005963.3; NPYR1 *D. rerio*, NP\_001095861.1; NPYR4 *D. rerio*, NP\_571515.1; NPYR7 *D. rerio*, AAI63330.1; NPYR8a *D. rerio*, NP\_571512.1; NPYR8b *D. rerio*, NP\_571511.1; NPYR *L. fluviatilis*, AAL66410.1; Secretin receptor *M. musculus* : NP\_001012322.2.

## 2) Differential expression of Cg-NPY/F-R-like receptor encoding gene.

Spatial distribution of Cg-NPY/F-R-like receptor transcripts (Fig. 3A) was investigated by RT-qPCR using RNA samples from adult tissues. Cg-NPY/F-R-like receptor was mostly expressed in the visceral ganglia. Lower but significant expression was measured also in all other tested adult tissues (mantle, labial palps, digestive gland, gills and gonadic area) (Fig. 3A).

In the visceral ganglia Cg-NPY/F-R-like receptor transcripts show a stable expression along the reproductive cycle but appear more expressed in females than in males (Fig. 3B). In the gonadic area, expression of Cg-NPY/F-R-like receptor transcript is maximal in both males and females at the first stages of gametogenesis, when energy storage is maximal (stages 0 and 1) and declines as gametogenesis proceeds and storage tissue regresses (stages 2 to 3) (Fig. 3C). Because the feeding status of the animal impacts the efficiency of gametogenesis in oyster, expression of Cg-NPY/F-R-like receptor transcript was monitored in the visceral ganglia of fed and starved animals. Interestingly, transcript levels were significantly higher in three weeks starved animals compared to fed animals (Fig. 3D).



**Figure 3:** Expression of the Cg-NPY/F-R-like receptor monitored by real time quantitative PCR. **(A)** Expression in adult tissue samples. **(B)** Expression in visceral ganglia and **(C)** in gonadic area of adults of *C. gigas* collected at different stages of gametogenesis. Expression levels were calculated as the number of copies of Cg-NPY/F-R-like receptor transcript per copy of elongation factor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) mRNA. Each value is the mean + S.E. of 5 pools of tissues each from 6 individuals. Stage 0: sexual resting stage, Stage 1: gonial multiplication stage, stage 2: tubule development and maturation stage, stage 3: sexual maturity stage. **(D)** Expression in the visceral ganglia of starved and fed animals (n=15), student's t-test: \* p<0.05

### 3) Identification of the Endogenous ligands of Cg-NPY/F-R-like receptor

A calcium mobilization assay was used to identify the endogenous ligands of Cg-NPY/F-R-like receptor (Beets et al, 2011). Transiently transfected HEK293T cells with the plasmid construct encoding oyster receptor and with or without that encoding G $\alpha_{16}$  were challenged with a series of *C. gigas* synthetic peptides whose sequence was retrieved from a *C. gigas* peptidome database yielded by mass spectrometry and data mining (unpublished results). Because Cg-NPY/F-R-like receptor displays homology with NPY/F-R, *C. gigas* NPY/F [CU983945], some of its truncated forms identified by mass spectrometry (data not shown) as well as a set of -RFamide neuropeptides (Table I) were tested at 10<sup>-5</sup> M. Only LFRFamide-

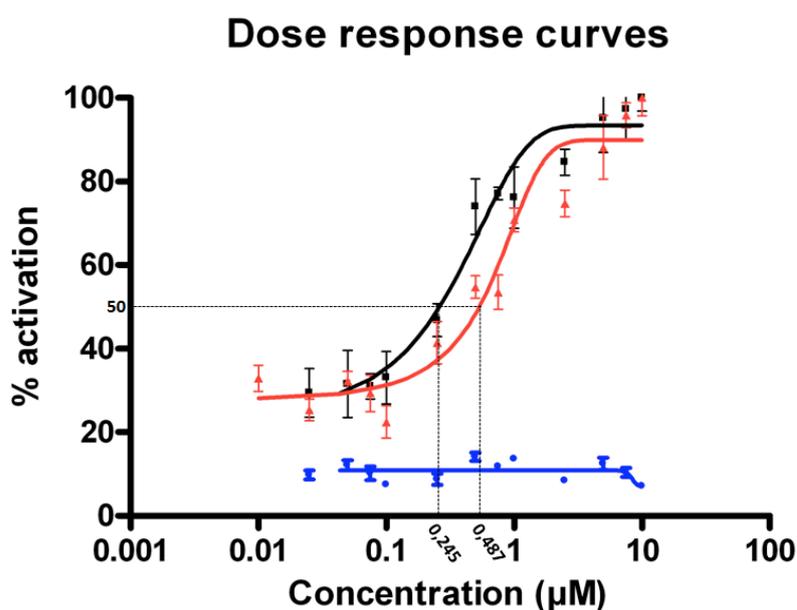
related peptides were able to activate the receptor and induce intracellular calcium mobilization independently of the expression of  $G\alpha_{16}$ . Specificity of binding was assessed by performing dose-response curves. LFRFamide family members activated the receptor in a dose dependent manner though with different potencies (Fig. 4). Calculated  $EC_{50}$  values were 245 nM and 487 nM for GSLFRFamide and GALFRFamide respectively.

**Table 1:** Potency of *C. gigas* peptides to activate Cg-NPY/F-R-like receptor

Peptides	Receptor activation
NDSLPPNRPSPRFSSPGQLRQYLKALNDYYAIVGRPRFamide (NPY/F)	-
ALNDYYAIVGRPRFamide (sNPY/F2)	-
YAIVGRPRFamide (sNPY/F1)	-
FLRFamide*	-
FMRFamide*	-
ALSGDHYIRFamide *	-
GALFRFamide	+
GSLFRFamide	+

+: activation, - no activation. Peptide concentration:  $10^{-5}$ M,

\* deduced from *C. gigas* FMRFamide precursor [Hs246379]



**Figure 4:** Concentration-dependent calcium responses obtained by a fluorescence assay for peptides GSLFRFamide and GALFRFamide on Cg-NPY/F-R-like receptor expressed in HEK293T. Dose responses are represented by squares for GSLFRFamide ( $EC_{50} = 245$  nM), by triangles for GALFRFamide ( $EC_{50} = 487$  nM) and by rounds for pcDNA as negative control. These are the collected data from 3 independent measurements. The vertical bars

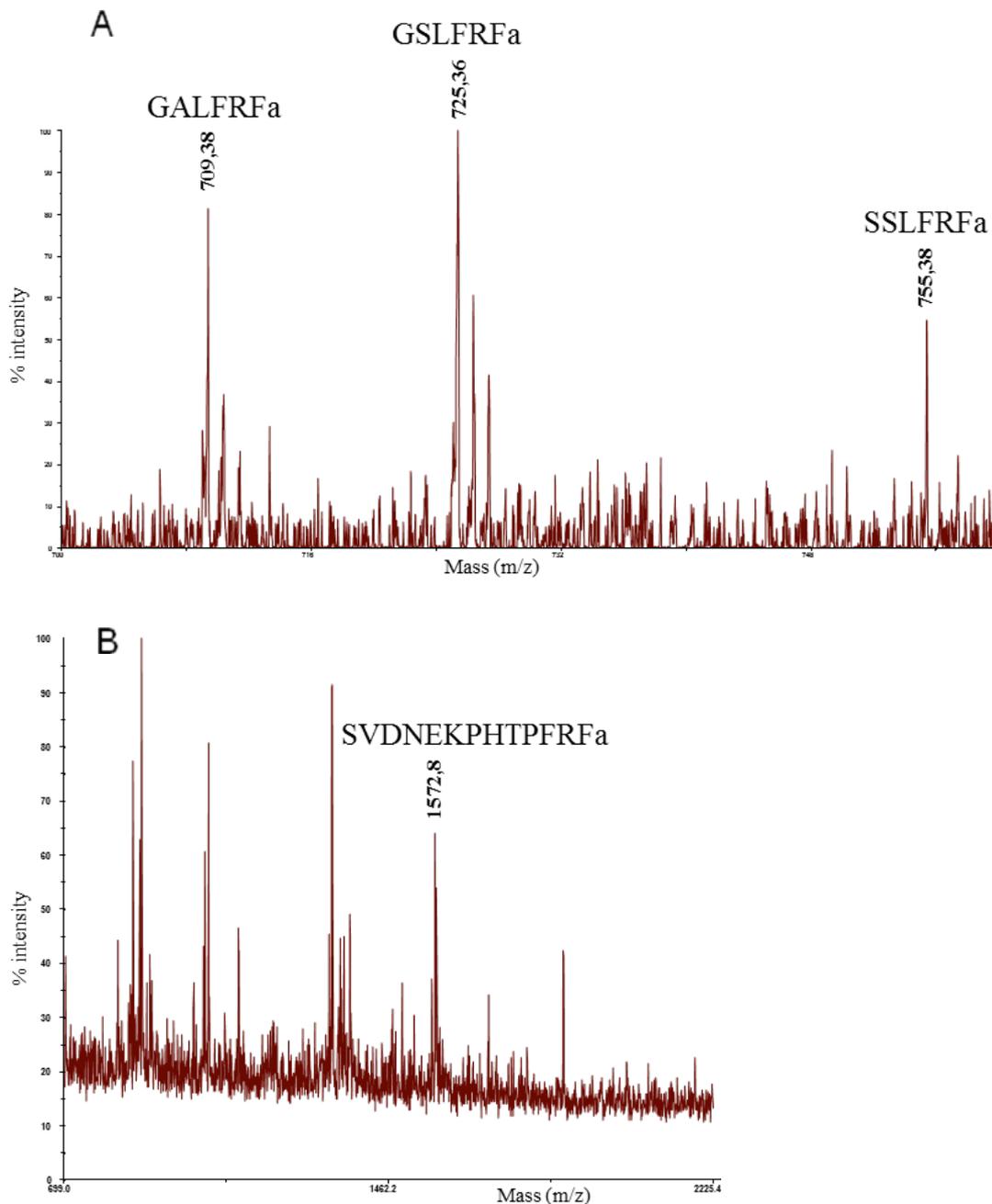
represent standard deviations. Data were processed using GraphPad Prism software.

#### 4 Characterisation and expression of LFRFamide peptides and their encoding transcript.

ORF sequence encoding LFRFamide precursor was obtained from GigasDatabase (CU994925) and from BGI (Beijing Genomics Institute). The predicted precursor protein is 159 amino-acids in length starting with a 23 amino-acid signal peptide and followed by a protein harbouring 9 predicted endoproteolytic cleavage sites. Fully processed precursor would generate 4 probably amidated distinct peptides due to the presence of a C-terminal Glycine, 3 LFRFamide hexapeptides (GSLFRFamide, GALFRFamide, and SSLFRFamide) and a FRFamide tridecapeptide (SVDNEKPHTPFRFamide) (Fig. 5). Occurrence of all these peptides was demonstrated in visceral ganglia peptidic extracts by direct mass spectrometric analyses (Fig. 6) and their sequence was confirmed by MS/MS (data not shown).

1	ATG	GAG	ACA	AAA	ACG	TTA	CTT	ATC	TGG	GTT	TTT	GCA	GCA	TTC	CTG	45
1	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>T</i>	<i>K</i>	<i>T</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>I</i>	<i>W</i>	<i>V</i>	<i>F</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>L</i>	15
46	GCC	TTC	ATT	GAA	GTA	TCC	ACA	GCT	TCC	AAA	GAA	TCA	AAA	CTA	AAT	90
16	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>L</i>	<i>N</i>	30
91	CAT	GAA	GAA	TCG	GAA	GTG	AAG	TCA	TTA	AAA	AGG	CGG	TCG	AAT	CCA	135
31	<i>H</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>V</i>	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>L</i>	<i>K</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	45
136	ATG	GAT	GAC	GTC	ACA	GAC	ACG	TAT	GAT	TTT	TCG	GAC	GAA	GAT	TTA	180
46	<i>M</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>V</i>	<i>T</i>	<i>D</i>	<i>T</i>	<i>Y</i>	<i>D</i>	<i>F</i>	<i>S</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	60
181	AAT	GAA	CTT	ATG	AAA	AGA	GGT	TCA	CTT	TTC	CGG	TTT	GGA	AAA	CGG	225
61	<i>N</i>	<i>E</i>	<i>L</i>	<i>M</i>	<b><i>K</i></b>	<b><i>R</i></b>	<b><i>G</i></b>	<b><i>S</i></b>	<b><i>L</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>R</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>G</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>R</i></b>	75
226	GGA	GCA	TTG	TTC	CGA	TTC	GGC	AAA	AGA	AGC	GAA	GAA	GAT	AAG	CGT	270
76	<b><i>G</i></b>	<b><i>A</i></b>	<b><i>L</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>R</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>G</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>R</i></b>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<b><i>K</i></b>	<b><i>R</i></b>	90
271	GGA	TCT	CTT	TTC	AGG	TTT	GGG	AAA	CGT	ATG	GAC	GGT	TAT	TAT	GTA	315
91	<b><i>G</i></b>	<b><i>S</i></b>	<b><i>L</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>R</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>G</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>R</i></b>	<i>M</i>	<i>D</i>	<i>G</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>V</i>	105
316	TCA	CCA	TAT	GCA	AGT	AGT	GAA	AAT	TTT	CCG	GAA	AAA	GAT	GAT	AAA	360
106	<i>S</i>	<i>P</i>	<i>Y</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<b><i>K</i></b>	120
361	AGA	GGA	AGC	CTT	TTC	CGG	TTT	GGA	AAG	CGA	TCC	TCG	TTG	TTC	CGA	405
121	<b><i>R</i></b>	<b><i>G</i></b>	<b><i>S</i></b>	<b><i>L</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>R</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>G</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>R</i></b>	<b><i>S</i></b>	<b><i>S</i></b>	<b><i>L</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>R</i></b>	135
406	TTT	GGA	AGA	AGT	GTC	GAT	AAT	GAA	AAA	CCC	CAT	ACG	CCA	TTT	CGT	450
136	<b><i>F</i></b>	<b><i>G</i></b>	<b><i>R</i></b>	<b><i>S</i></b>	<b><i>V</i></b>	<b><i>D</i></b>	<b><i>N</i></b>	<b><i>E</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>P</i></b>	<b><i>H</i></b>	<b><i>T</i></b>	<b><i>P</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>R</i></b>	150
451	TTT	GGA	CGT	GAG	GAG	GAA	GAT	GAA	ATA	TAA					480	
151	<b><i>F</i></b>	<b><i>G</i></b>	<b><i>R</i></b>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	*						

**Figure 5:** Nucleotide sequence of ORF encoding a LRFamide precursor in *C. gigas* and the deduced amino acid sequence. Putative signal peptide is indicated in italics. Potential proteolytic processing sites are highlighted in grey. C-terminal glycine for amidation is in boldface. The various predicted biologically active peptides are underlined.



**Figure 6:** Mass analyses of the 4 peptides predicted from *C. gigas* LRFamide precursor, from a visceral ganglia peptidic extract. MS spectrum of 3 LRFamide peptides: GALFRFa, GSLFRFa and SSLFRFa (A) and MS spectrum of the fourth tridecapeptide: SVDNEKPHTPFRFa (B). MS/MS spectra confirm the identity of the four predicted peptides in *C. gigas* (data not shown).

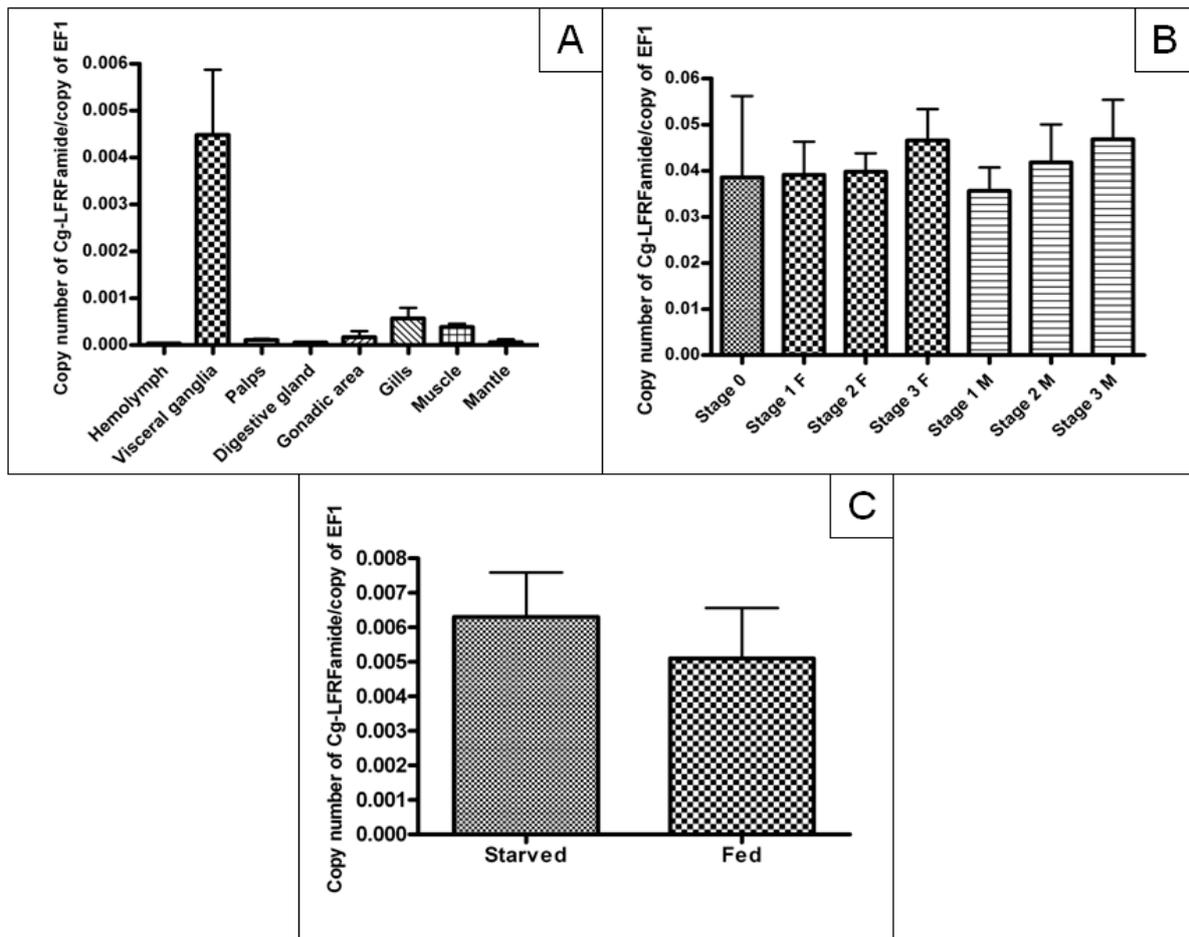
To determine the potential role of these peptides in the oyster *C. gigas*, tissue distribution of the transcripts encoding LFRFamide precursor was studied by real-time quantitative PCR.

LFRFamide transcripts were expressed at relatively high levels in the visceral ganglia and to basal levels in all other adult tissues (Fig.7A). No significant variation was measured along the reproductive cycle in both male and female visceral ganglia (Fig 7B). In contrast, as for its cognate receptor gene, LFRFamide encoding gene was more expressed in starved animals as compared to fed oysters (Fig. 7C). The processing of a neuropeptide precursor usually results in end products being transported to the nerve terminals. Thus it was interesting to compare the tissue distribution of LFRFamide transcripts with that of LFRFamide peptides. To this end, HPLC fractions of different tissue extracts co-eluting with the various synthetic LFRFamide peptides were analyzed by MALDI MS. All predicted amidated peptides were unambiguously detected in the visceral ganglia fractions though only the hexapeptides were detected in almost all adult tissues (Table II)

**Table II** : Tissue distribution of FLRFamide peptides

	<b>GALFRFamide</b>	<b>GSLFRFamide</b>	<b>SSLFRFamide</b>	<b>SVDNEKPHTPFRFa</b>
<b>Visceral ganglia</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Gonadic area</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>
<b>Digestive gland</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>nd</b>
<b>Labial palps</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>
<b>Mantle</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>nd</b>
<b>Mantle edge</b>	<b>nd</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>nd</b>
<b>Muscles</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>nd</b>
<b>Gills</b>	<b>nd</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>nd</b>

X: presence of peptide, nd: not detected.



**Figure 7:** Expression of the LFRFamide precursor measured by real time quantitative PCR **(A)** Expression in adult tissue samples. **(B)** Expression in visceral ganglia of adults of *C. gigas* collected at different stages of gametogenesis. Expression levels were calculated as the number of copies of LFRFamide transcript per copy of elongation factor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) mRNA. Each value is the mean + S.E. of 5 pools of tissues each from 6 individuals. Stage 0: sexual resting stage, Stage 1: gonial multiplication stage, stage 2: tubule development and maturation stage, stage 3: sexual maturity stage. **(C)** Expression in the visceral ganglia of starved and fed animals (n=15).

#### 4. Discussion

To gain insight into the physiological regulation of reproduction and energy metabolism, neuropeptide Y/F signalling components were sought in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by screening GigasDatabase (Fleury et al., 2009). While a sequence encoding a Cg-NPY/F peptide precursor was clearly identified, the GPCR of highest homology with vertebrate Y2 type and non vertebrate NPY/F receptors turned-out to be more related to insect sNPF receptors (Mertens et al., 2002) than to any vertebrate and invertebrate NPY/F-Rs including *Lymnaea* genuine NPY/F receptor (Tensen et al., 1998). Co-evolution of peptide-receptor pair theory (Park et al., 2002) would suggest the occurrence of sNPF-related peptides in molluscs though sNPF distribution up till now appears strictly restricted to arthropods (Nässel and Wegener, 2011). Both invertebrate NPY/F and insect sNPF share the RXRFamide C-terminal signature which among the FaRPs identified in molluscs is only found in NPY/F and its N-terminally truncated forms (Walker et al., 2009). Since Cg-NPY/F synthetic peptide did not activate Cg-NPY/F-R-like receptor and because vertebrate Y2 type NPY/F receptors can be activated by carboxy terminal fragments of NPY/F (Gerald et al., 1995) it was therefore rational to anticipate the binding of the Cg-NPY/F truncated forms that were characterized in *C. gigas*. As neither long Cg-NPY/F nor truncated forms activate Cg-NPY/F-R-like receptor, one or two additional NPY/F-related receptors remain to be identified within *C. gigas* genomic resources. On a structural point of view, it was pretty unexpected to discover that LFRFamide peptides specifically activate Cg-NPY/F-R-like receptor [LFRFamide receptor], because despites the crucial –RFamide motif usually important for receptor activation (Kulathila et al., 1999), they do not exhibit any homology to either NPY/F or insect sNPF peptides. This activation involves the coupling to  $G_{\alpha q}$  transduction pathway because the calcium response was observed independently of the presence of the promiscuous G-protein  $G_{\alpha 16}$ . On a functional point of view, NPY/F, sNPFs as well as a great diversity of –RFamide peptides appear to be involved in the regulation of feeding behaviour and energy balance through evolution (Bechtold and Luckman, 2007, Nässel and Wegener, 2011). Interestingly, in all mollusc species investigated LFRFamide peptides also appear to regulate these physiological processes. The first peptide (GSLFRFamide) was discovered in the prosobranch mollusc *Fusinus ferrugineus* (Kuroki et al., 1993) but functional characterization of this family of peptides was initially investigated in the marine mollusc *Aplysia californica*. In this species, FLRFamide peptides expressed in buccal neurons decrease the size of accessory radula closer muscle via a combination of presynaptic and post-synaptic commands (Cropper et al., 1994). Similar inhibitory effects were also shown on central neurons in the snail *Helix*

*aspersa* (Chen et al., 1995). In the snail *Lymnaea stagnalis*, LFRFamide encoding gene was strongly up-regulated upon parasitic infection by *T. ocellata*, a biological event known to disturb host growth, energy metabolism and reproduction processes (Hoek et al., 1997). Alteration of these functions in *Lymnaea* was suggested to result from the inhibitory activity exerted by the LFRFamide peptides on *Lymnaea* Caudo-Dorsal Cells and the Light Green Cells, two cell clusters that regulate female reproduction and growth and metabolism respectively (Hoek et al., 2005). More recently a new LFRFamide peptide with a potent activity on the contraction of the rectum was identified in the cephalopod *Sepia officinalis* (Zatylny-Gaudin et al., 2010). Identification in *Lottia gigantea* genome of a gene encoding a LFRFamide peptide precursor (Veenstra et al., 2010) confirms the presence of this family of peptides among the phylum of molluscs. High expression of oyster LFRFamide peptides and receptor in the visceral ganglia supports a role as neuroregulator / neurotransmitter. Furthermore, their differential expression along the reproduction cycle or according to the feeding status suggests that within oyster CNS, LFRFamide pathways control neural networks involved in the regulation of reproduction and feeding. This situation is reminiscent of that described in other species (Cropper et al., 1994; Chen et al., 1995; Hoek et al., 2005). Except in *S. officinalis* (Zatylny-Gaudin et al., 2010), peripheral activity of this family of peptides had not been investigated. Though the tridecapeptide was only detected in the CNS and probably works as neurotransmitter, presence of significant amounts of all other oyster LFRFamide peptides in a majority of peripheral tissues argues a for local release by nerve terminals. In such a situation, a rather high concentration of peptide can be expected *in vivo* at the vicinity of the receptors. This hypothesis is consistent with the relatively high ED<sub>50</sub> values characterizing oyster LFRFamide receptor/ligand activity. In addition, the concentrations required to elicit 50% activation of the LFRFamide cognate receptor were fully reliable with those applied to induce specific current responses in *Lymnaea* neurons (Hoek et al., 2005) or *Aplysia* muscle fibers (Cropper et al., 1994). Wide distribution of peptides and receptors in peripheral tissues suggests that LFRFamide peptides play as functional regulators of a diversity of organs. Of particular interest was the finding of a sex dimorphic expression of oyster LFRFamide receptors in the CNS and a higher expression of the receptors in the gonadic area when storage is maximal. Interestingly, kinetic of decline in receptor expression singularly paralleled the regression of storage tissues in the gonad (Berthelin et al., 2000). This observation clearly suggests that LFRFamide receptors are likely expressed in the glycogen storage cells of the gonad and control their activity. Discrepancies between males and females might reflect sex differences in energy requirements for completing

gametogenesis. However, it remains to be further investigated whether LFRFamide signaling favors storage or regulates other metabolic pathways in these cells. Increased expression of LFRFamide receptor and its ligands in the CNS of starved animals stresses a possible role as nutrient sensors to allow a balanced nutrient content in the animal. Interestingly, in the cockroach, sNPF contents were increased as the result of starvation. In this species sNPFs appear to work as nutrient sensor and seem to negatively control the activity of digestive enzymes (Mikani et al., 2011). In *Drosophila*, gain of function sNPF mutants promote food intake and regulate body size (Lee et al, 2004). sNPF signalling in *Drosophila* apparently affects growth and carbohydrate levels by controlling insulin signalling (Lee et al., 2008). Given the recent findings that in *C. gigas* gonad, insulin signalling responds according to the nutrient level (Jouaux et al., 2012), together with the demonstration that the insulin producing cells are controlled by LFRFamide peptides in *Lymnaea* (Hoek et al., 2005), it is conceivable to consider that mollusc LFRFamide peptides would represent mollusc functional analogues of insect sNPFs.

Fine control of energy allocation is particularly crucial in a sessile species subjected to large and fluctuating environmental parameters. This is especially true during Gametogenesis, a period of negative energy budget (Soletchnik et al., 1997) that appears to be correlated with summer mortality phenomenon (Worrall and Widdows, 1984) one of the current major burden of oyster aquaculture. To cope with these constraints, a variety of neuroendocrine signalling pathways of which some have already been identified in oyster (Bigot et al, 2012; Jouaux et al, 2012) seems to operate.

Our results provide important advances to identify additional neuropeptide-receptor pairs in oyster, a key step toward the elucidation of neuroendocrine pathways regulating important physiological functions in one of the most important aquaculture resource worldwide. These issues should greatly benefit from a current peptidomic survey and the forthcoming complete characterization of the oyster genome

#### Acknowledgments:

The authors thank Prof. X. Guo (Beijing Genomics Institute, China) for providing the full ORF sequence encoding oyster LFRFamide precursor and the staff of the experimental hatchery of Argenton (France) for the trophic conditioning of the oysters. Mass spectrometric analyses were performed at the technical platform “Proteogene” of SFR ICORE of the University of Caen Basse-Normandie (Dr B. Bernay). This work was financially supported by the ANR project “Gametogenes” (ANR-08-GENM-041) and a Tournesol FL project (22744 UB). L. Bigot was funded by Ifremer and a Région Basse-Normandie doctoral grant.



## ***Discussion :***

Pour la première fois, des tests de pharmacologie inverse ont été menés sur des récepteurs couplés aux protéines G de *C. gigas*. Cette méthode semble fonctionnelle chez cette espèce, ce qui ouvre de nouvelles perspectives de recherche en physiologie. En effet, au vu des résultats obtenus lors des tests de ligands sur cellules HEK et CHO, cette technique pourrait permettre, à l'avenir, de faciliter l'étude fonctionnelle de la physiologie de *C. gigas*, ainsi que la découverte de nouvelles voies de signalisation (neuro)endocrines. Cette méthode est d'autant plus utile que l'huître creuse se prête mal à des investigations fonctionnelles, du fait des difficultés rencontrées avec les cultures de cellules d'huître, et donc de l'impossibilité de tests fonctionnels *in vitro*.

Cependant, pour parvenir à de telles expérimentations, il semble que la technique nécessite quelques mises au point. En effet, malgré les nombreux ligands testés sur chaque récepteur, des ligands endogènes n'ont pu être identifiés que pour un récepteur (voir publication ci-jointe). Bien que des résultats encourageants aient été obtenus sur quelques autres récepteurs, il s'avère que ceux-ci ne sont pas forcément reproductibles, ce qui est probablement dû à des problèmes de transfection ou d'expression des récepteurs dans les cellules de Mammifères. Le récepteur A4, par exemple, semble d'après les études phylogénétiques être un bon candidat comme récepteur au NPF, ou au sNPF, et a été activé lors d'un des tests par une forme courte du NPF de *Crassostrea gigas*, mais, dans les mêmes conditions, ce résultat n'a pas été retrouvé, ni même avec d'autres lignées cellulaires.

Afin d'identifier d'où viennent ces problèmes de reproductibilité, plusieurs tests techniques sont possibles. Tout d'abord, afin de vérifier si le récepteur exprimé est bien adressé à la membrane, il existe sur les vecteurs d'expression des « étiquettes », qui correspondent à des séquences se fixant au bout de la séquence du récepteur, et pouvant être reconnues par des anticorps spécifiques. Ainsi, après transfection, il est possible de localiser le récepteur par immunocytochimie, grâce à ces séquences étiquettes. Ceci permettrait alors de vérifier que le vecteur a bien été traduit par la cellule, mais également que le récepteur est bien exprimé à la membrane. D'autre part, la technique de transfection peut sûrement être améliorée, afin d'obtenir un meilleur taux de vecteurs transfectés dans les cellules, en changeant la quantité ou la nature du transfectant, ou encore en modifiant la quantité de plasmides transfectés.

D'autre part, certains récepteurs n'ont répondu à aucun peptide synthétique prédit d'après la banque de données de *C. gigas*. C'est le cas pour les récepteurs D1, H4 et F1. Etant donné qu'ils ont pu être activés à une ou deux reprises par des peptides de criquet (pour D1) ou de drosophile (pour H4 et F1), la construction vectorielle semble être fonctionnelle. Toutefois, la banque de peptides de type RFamide que nous avons constituée pour l'huître creuse n'est pas exhaustive, puisque nous n'avons pas encore accès au génome entier de cet organisme. Il est ainsi fort probable que des précurseurs de neuropeptides n'aient pas encore été mis à jour, et que ces récepteurs puissent lier des peptides encore non découverts chez l'huître. Ainsi, il est important de compléter cette banque de peptides au fur et à mesure que des nouveaux séquençages sont entrepris, afin d'identifier les ligands d'un plus grand nombre de récepteurs. En outre, d'après les études phylogénétiques, il semble que 3 des 5 récepteurs sélectionnés (D1, H4 et F1) divergent fortement des familles de récepteurs aux peptides de type RFamide. Il est donc possible que, malgré leurs similitudes de séquence avec des récepteurs NPY/Y, ces récepteurs ne lient pas des peptides de cette famille. En effet, le récepteur F3 qui était le meilleur candidat comme récepteur au (s)NPY/F, s'avère être en fait un récepteur aux LRFamides, il est donc possible que d'autres de ces récepteurs aient des ligands tout à fait différents des récepteurs avec lesquels ils présentent le plus d'homologie. De plus, une banque de peptides plus élargie permettrait également de pouvoir déterminer les ligands endogènes de nombreux autres récepteurs couplés aux protéines G de *C. gigas*.

Ainsi, nous avons pu initier une technique de génomique fonctionnelle qui semble pouvoir donner des résultats probants chez notre modèle, *Crassostrea gigas*. Malgré quelques mises au point à faire, cette technique est très prometteuse, aussi bien dans la thématique qui nous intéresse que dans d'autres domaines de recherche en rapport avec la physiologie de cet animal.

## Chapitre III :

*Identification et caractérisation  
d'un peptide de type GnRH  
chez C. gigas*



## ***Introduction :***

### **A) Les neurohormones de la famille des GnRHs/AKHs**

#### **1. La Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)**

La GnRH est une hormone hypothalamique clé dans la régulation de la reproduction (Guillemin 1977). Ce décapeptide a tout d'abord été isolé à partir d'hypothalami de Mammifères (Schally 1971). La GnRH est produite au niveau de neurones spécialisés à partir d'un polypeptide précurseur (Seeburg 1987), et se lie à son récepteur au niveau des cellules gonadotropes pour permettre la synthèse et la libération de LH et de FSH qui seront transportées aux gonades pour stimuler la stéroïdogénèse et la gamétogénèse (Lee *et al.*, 2008). Les stéroïdes produits (testostérone chez les mâles, et oestrogènes et progestérone chez les femelles) exercent un rétro-contrôle négatif sur la sécrétion de LH et FSH pendant la phase lutéale, et un rétro-contrôle positif sur la libération de GnRH pendant la phase folliculaire. La première séquence de GnRH isolée est très bien conservée chez tous les Vertébrés, bien que d'autres formes de GnRH aient ensuite été mises en évidence. Pendant longtemps après sa découverte, le GnRH a semblé avoir une séquence invariante, puisque tous les peptides de Mammifères identifiés étaient identiques. Ce n'est qu'avec l'identification de GnRHs non-mammaliennes que des séquences différentes ont été mises en évidence et classées en 4 types distincts, selon des critères structuraux.

Les GnRHs de Vertébrés possèdent des caractéristiques structurales telles qu'un pyroglutamate N-terminal, et une forte conservation des quatre premiers, deux derniers acides aminés et de l'amidation C-terminale. La GnRH est un décapeptide dont le précurseur code pour une prohormone composée de la GnRH et d'un GAP (GnRH Associated Peptide), et précédée d'un peptide signal. Jusqu'à présent, 24 variants différents de GnRH ont été identifiés chez les Vertébrés, et sont répartis en 3 formes de GnRH : les GnRHs 1, 2 et 3 (Kah *et al.*, 2007). Le plus souvent, chaque espèce de Vertébrés exprime 2 formes différentes de GnRH, les formes GnRH1 et GnRH2. En plus de ces formes, certains téléostéens expriment une troisième forme différente, la GnRH3. Actuellement, il existe 9 formes différentes de GnRH1, alors que les GnRH2 et 3 présentent une séquence protéique bien mieux conservée au sein de Vertébrés. La forme GnRH1 est responsable des effets directs sur la reproduction, tels que la synthèse et la libération des gonadotropines (LH et FSH), et probablement d'autres hormones hypophysaires (Kah *et al.*, 2007 ; Okubo et Nakahama, 2008). Chez l'humain, les

formes 1 et 2 de GnRH, ainsi que leurs récepteurs, sont présentes dans les ovaires, elles influencent la stéroïdogenèse, inhibent la prolifération, et induisent l'apoptose des cellules ovariennes (Metallinou *et al.*, 2007). La GnRH2 représente la forme la plus ubiquitaire de GnRH, elle est parfaitement identique des poissons osseux primitifs jusqu'à l'homme. Elle est présente dans l'ensemble du système nerveux, central et périphérique, et est plus fortement exprimée dans la moelle osseuse et la prostate chez l'humain (White *et al.*, 1998).

Cependant, les GnRHs 1 et 2 ont également des effets sur les fonctions non-reproductives, notamment sur la croissance, la progression et la dissémination des tumeurs (Cheung et Wong, 2008). En effet, la GnRH, ainsi que ses analogues possède des propriétés antiprolifératives qui permettent l'inhibition de la croissance des tumeurs (Limonta *et al.*, 2003 ; Millar *et al.*, 2008), mais elles peuvent également influencer l'activité d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire. Ces différents effets sont permis par le grand nombre de voies cellulaires qui peuvent être activées par les récepteurs à la GnRH (Cheung et Wong, 2008).

Cette hormone est conservée chez les deutérostomiens non-vertébrés, puis les protochordés tuniciers présentent 9 séquences de GnRH différentes qui ont déjà été analysées, et qui présentent une conservation structurale avec les GnRH de Vertébrés (Adams *et al.*, 2003). Ces GnRHs sont exprimées principalement dans le système nerveux central, chez les adultes (Kavanaugh *et al.*, 2005), comme chez les larves (Hamada *et al.*, 2011). Elles sont capables d'induire la libération des gamètes des tuniciers, ce qui démontre une conservation du rôle régulateur de l'hormone sur la reproduction (Roch *et al.*, 2011).

## **2. La GnRH chez les Prostostomiens**

Une immunoréactivité à la GnRH a été mise en évidence chez de nombreuses autres espèces de lophotrochozoaires, comme le gastéropode *Helisoma trivolvis*. Chez ce modèle, une activité apparentée à celle de la GnRH a également été mise en évidence : des extraits de ganglions viscéraux (siège du système nerveux central) d'*H. trivolvis* sont capables d'induire la libération des gonadotropines sur des cellules hypophysaires de poisson rouge en culture (Goldberg *et al.*, 1993). De plus, des injections de GnRH synthétique de Mammifères provoquent des réponses électrophysiologiques au niveau des ganglions viscéraux de ce Mollusque gastéropode et stoppent la croissance de ses neurites. Chez la limnée *L. stagnalis*

et le mollusque opisthobranch *Aplysia californica*, des cellules immunoréactives à la GnRH ont également été mises en évidence (Young *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2000), confirmant la conservation d'une voie de signalisation apparentée à celle de la GnRH chez les Mollusques. Un traitement à la GnRH de vertébré provoque une altération neurale chez l'aplysie, démontrant l'existence d'une voie de signalisation de type GnRH chez ce Mollusque également (Zhang *et al.*, 2000).

La première GnRH de Protostomien a été isolée chez la pieuvre *Octopus vulgaris* (Iwakoshi *et al.*, 2002) : un peptide de 12 acides aminés proche de la GnRH et un ADNc codant pour son précurseur ont été identifiés chez ce modèle, et compte tenu de son action stimulatrice sur la libération de LH chez la caille *C. coturnix*, ce peptide a été nommé oct-GnRH. L'activité de la glande optique, considérée comme l'équivalent de l'hypophyse pour la fonction de reproduction (Bundelmann *et al.*, 1997), serait contrôlée par des neurones peptidergiques inhibiteurs comme ceux du FMRFamide, et des neurones peptidergiques excitateurs, comme ceux de la GnRH. L'analyse de l'expression de cette oct-GnRH par RT-PCR et par Southern blot confirme la présence de ce peptide dans la glande optique, le lobe subpédonculaire et le tractus optique, ce qui signifie que l'oct-GnRH est produite et sécrétée par des cellules glandulaires, en tant qu'hormone endocrine. (Iwakoshi *et al.*, 2002). À l'aide d'un antisérum contre l'oct-GnRH, et par hybridation *in situ*, il a été montré que ce peptide était présent dans l'axe lobe subpédonculé et/ou lobe olfactif supérieur – glande optique – gonade, qui équivaldrait d'un point de vue fonctionnel à l'axe hypothalamo-hypophyse-gonade des Vertébrés, impliqué dans la régulation de la reproduction (Iwakoshi-Ukena, 2004). La GnRH d'*Octopus vulgaris* montre une large distribution dans le cerveau de ce modèle, suggérant une implication du peptide dans la neurotransmission et/ou la neuromodulation dans les lobes du système nerveux central contrôlant la prise alimentaire, les systèmes de mémoire tactile et visuelle, etc (Iwakoshi-Ukena, 2004). La GnRH d'*Octopus* est capable d'induire une élévation du taux de synthèse de testostérone, progestérone et oestradiol, comme chez les Vertébrés. La GnRH régulerait donc la stéroïdogénèse, pas seulement par ses effets sur la gonade (comme hormone endocrine), mais également sur les cellules avoisinant la glande optique (comme hormone paracrine et/ou autocrine) (Minakata *et al.*, 2009). De plus, cette GnRH augmente l'activité rythmique des muscles lisses de l'oviducte, et semble induire la maturation des gonades ainsi que l'oviposition en régulant à la fois la stéroïdogénèse et les comportements de ponte, via le récepteur GnRH. En effet, le récepteur de l'oct-GnRH, cloné à partir du cerveau d'*Octopus vulgaris* (Kanda *et al.*, 2006),

est largement exprimé dans le cerveau (dont la glande optique), les gonades, et des tissus périphériques tels que l'oviducte et la glande de l'oviducte. Ainsi, l'oct-GnRH jouerait un rôle dans les fonctions reproductives périphériques, comme c'est le cas pour les tuniciers (Terakado, 2001).

Chez l'aplysie, un précurseur de la GnRH a également été récemment cloné, il est fortement homologue à la prépro-oct-GnRH : il est composé également d'un peptide signal, d'un peptide GnRH de 12 acides aminés, d'un site de clivage puis d'un peptide associé au GnRH (Zhang *et al.*, 2008). La séquence de l'ap-GnRH déduite en acides aminés ne diffère de l'oct-GnRH que par 2 résidus. Le transcrit de ce précurseur est présent dans le système nerveux central, l'ovotestis et la glande atriale, une glande exocrine.

A ce jour, aucun peptide apparenté à la GnRH n'a été identifié chez les Mollusques bivalves tels que l'huître creuse, bien que certaines données suggèrent l'existence d'un tel peptide dans ce groupe. Tout d'abord, Pazos et Mathieu (1999) ont montré que les GnRHs de Vertébrés étaient capables d'induire la synthèse d'ADN dans les cellules goniales de *C. gigas*, ainsi que des effets mitogènes dans le manteau de la moule *M. edulis*. De plus, les ganglions cérébroïdes et pédieux de *M. edulis* présentent une immunoréactivité à la GnRH (Pazos et Mathieu, 1999). Chez le bivalve *Patinopecten yessoensis*, des neurones immunoréactifs à la GnRH ont été identifiés dans les ganglions cérébroïdes et pédieux, et des extraits de ces ganglions génèrent, comme la GnRH de Mammifères, une prolifération des spermatogonies dans du tissu testiculaire cultivé *in vitro* (Nakamura *et al.*, 2007). De manière intéressante, un gène codant pour un récepteur orthologue aux récepteurs à la GnRH a été identifié chez *C. gigas* (Rodet *et al.*, 2005). Celui-ci génère deux sous-types de récepteurs, par épissage alternatif : le premier est exprimé spécifiquement dans la gonade et semble donc impliqué dans la régulation de la reproduction, alors que le second sous-type, exprimé dans les autres tissus, est moins susceptible d'être un régulateur de la reproduction (Rodet *et al.*, 2008).

Les GnRHs d'Invertébrés forment un groupe unique de peptides composés de 11 à 12 acides aminés, qui diffèrent des GnRHs de Vertébrés par l'insertion de 2 acides aminés après la position 1, et par une variation du résidu proline en position 9. Les GnRHs de mollusques sont des orthologues des GnRHs de Vertébrés, d'après Tsai et Zhang (2008), puisqu'ils seraient issus d'un même ancêtre commun, au regard de la conservation des différents motifs peptidiques et de l'arrangement des introns/exons sur le gène codant pour le précurseur. Le fait que la GnRH d'*Octopus* lie un récepteur couplé aux protéines G activant la même voie

cellulaire (la voie des phosphoinositols) que les récepteurs de Vertébrés appuie cette hypothèse, d'après la théorie de la co-évolution ligand – récepteur. Ce peptide serait ancestralement un neuromodulateur généraliste, et il se serait hautement spécialisé dans la régulation de la reproduction uniquement chez les chordés (Tsai et Zhang, 2008).

### 3. Le cas des Ecdysozoaires, l'AKH

Chez les Ecdysozoaires, aucun peptide de type GnRH n'a pu être identifié, bien qu'il existe des récepteurs apparentés du point de vue structural et évolutif aux récepteurs de la GnRH de Vertébrés. Staubli *et al.* (2002) ont identifié en premier les ligands de ces récepteurs chez la drosophile *D. melanogaster* et le ver à soie *B. mori*, et démontré qu'il s'agissait en fait de récepteurs à l'AKH (Adipokinetic Hormone). De la même façon, chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, un récepteur orthologue des récepteurs de la GnRH a été identifié, et est exprimé spécifiquement dans la lignée germinale, l'intestin et le pharynx, suggérant un rôle probable de ce récepteur dans le couplage prise alimentaire/reproduction (Vadakkadath *et al.*, 2006). Ce récepteur est capable de lier un peptide apparenté à l'AKH, dont le précurseur présente des similitudes à la fois avec les précurseurs d'AKH et les précurseurs de GnRH de Vertébrés (Lindemans *et al.*, 2009). Les hormones adipokinétiques sont des neuropeptides fortement impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique, régulant la mobilisation des substrats énergétiques du corps gras des insectes (Gäde *et al.*, 1994). Elles ont été découvertes à partir d'expériences menées sur des extraits de corpora cardiaca d'insectes. Les séquences de ces neurohormones ont été déterminées tout d'abord chez la blatte *Periplaneta americana* et chez différentes espèces de criquet (Stone *et al.*, 1976, Scarborough *et al.*, 1984, Witten *et al.*, 1984, Siegert *et al.*, 1985, Gäde *et al.*, 1986). Elles ont par la suite été retrouvées chez de nombreux insectes, à tous les stades de vie, stockées et secrétées des corpora cardiaca vers l'hémolymphe (Veelaert *et al.*, 1998). Ce sont des peptides de 8 à 10 acides aminés qui possèdent un pyroglutamate en N-terminal et sont amidés en C-terminal, comme la GnRH. Ces AKH appartiennent à la famille des peptides cardioaccélérateurs et des RCPH (Red Pigment Concentrating Hormone) de Crustacés (Scarborough *et al.*, 1984 ; Veenstra, 1989). Chez *C. elegans*, la voie de signalisation AKH-GnRH est impliquée dans la reproduction, puisqu'une inhibition de l'expression du récepteur et/ou du précurseur du neuropeptide conduit à un retard de ponte (Lindemans *et al.*, 2009).

La caractérisation récente de nombreux récepteurs de neuropeptides couplés aux protéines G chez la *Drosophila* a permis d'identifier deux groupes de récepteurs distincts : les récepteurs apparentés aux récepteurs de neuromédine U de Vertébrés, et les récepteurs apparentés aux récepteurs de type arginine/vasopressine de Vertébrés (Park *et al.*, 2002). Ce dernier groupe rassemble 3 RCPGs, le récepteur du CCAP (Crustacean Cardioactive Peptide), le récepteur de l'AKH et le récepteur de la corazonine. Cependant, chez le ver à soie *Bombyx mori*, Shi *et al.* (2011) ont montré l'existence de deux nouveaux récepteurs qui lient les différentes formes d'AKH, mais pas la corazonine. Inversement, le récepteur de la corazonine de cet insecte ne lie aucune forme d'AKH, montrant ainsi une divergence certaine des deux voies, et une co-évolution ligand-récepteur. La corazonine est un peptide cardioaccélérateur, ubiquitaire chez les Arthropodes, capable également de provoquer la métamorphose chez certains papillons de nuit. Veenstra (2009) suggère que ce peptide pourrait être libéré en cas de stress trophique, expliquant ainsi ses effets physiologiques divers selon les espèces d'insectes considérées. Chez le criquet *Locusta migratoria*, 4 gènes AKH ont été identifiés, dont trois codent pour des AKH classiques, et un pour une hormone hypertréhalosémique (HrTH) (Siegert, 1999). De plus, chez le moustique *A. gambiae*, un neuropeptide proche à la fois de la corazonine et de l'AKH a été découvert par Hansen *et al.* (2010), et a été nommé ACP (AKH/corazonin-related peptide). Les précurseurs de ces familles de peptides possèdent une organisation très conservée, identique également à celle des précurseurs de GnRH, composée d'un peptide signal, suivi directement de la séquence codant pour une copie unique du neuropeptide, séparé d'un peptide associé par un site de clivage dibasique ou tribasique (figure 44). Cette similitude de structure appuie l'hypothèse d'une même origine phylogénétique de ces différents neuropeptides.



**Figure 44 :** Structure commune aux précurseurs de différents neuropeptides : AKH (Adipokinetic Hormone), GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), RCPH (Red Pigment Concentrating Hormone), HrTH (Hypertrehalosemic Hormone), ou Corazonine. Le précurseur code pour un peptide signal, suivi du neuropeptide, d'un site de clivage di- ou tri-basique et d'un peptide associé au neuropeptide.

Cette famille de peptides n'a pas été identifiée chez les Lophotrochozoaires, bien qu'une famille de térapeptides présentant des similarités avec la partie C-terminale de l'AKH ait été mise en évidence, la famille des APGWamides. L'APGWamide est connu chez les

Mollusques pour son rôle de modulateur de l'activité musculaire, et de neuromédiateur central et périphérique, notamment dans le contrôle de la reproduction chez les limnées mâles (Croll, 1990). Ces neuropeptides ont été identifiés exclusivement chez les mollusques, et peuvent présenter au sein du même précurseur une grande variabilité sur le premier acide aminé. Par exemple, un tel précurseur a été identifié chez *Mytilus edulis*, et code pour l'APGWamide, mais également pour un RPGWamide, un KPGWamide et un TPGWamide, et il est largement distribué dans les ganglions nerveux de la moule (Favrel *et al.*, 1996). Or, le TPGWamide est un parfait homologue de la partie C-terminale de l'AKH de *Pseudagrion inconspicuum*, et pourrait ainsi correspondre à sa forme tronquée, ce qui constitue un processus conventionnel d'inactivation de neuropeptides.

### B) La GnRH chez *Crassostrea gigas*

Chez l'huître creuse *C. gigas*, peu d'informations sont disponibles quant à la régulation neuroendocrine de la reproduction, plus particulièrement par des peptides de type GnRH. Cependant, des études récentes semblent montrer que cette voie existe également pour notre modèle, puisqu'une séquence nucléotidique orthologue des récepteurs à la GnRH a été clonée à l'aide d'amorces consensus (Rodet *et al.*, 2005). Ce RCPG présente des similarités de séquence avec les récepteurs à la GnRH de Vertébrés mais aussi des récepteurs à l'AKH. Il est exprimé spécifiquement dans l'aire gonadique mâle et femelle au cours du cycle de reproduction.

Des études plus approfondies ont montré que la séquence codant ce récepteur peut générer différents ARNs messagers par épissage alternatif (Rodet *et al.*, 2008). Ces ARNs conduisent à la synthèse de 2 sous-types de récepteurs différents : Cg-GnRH-R et Cg-GnRH-RII, le sous-type RII comporte deux formes, une forme longue (Cg-GnRH-RII-L) et une forme courte (Cg-GnRH-RII-S). Une forme tronquée, Cg-GnRH-RTF, existe également, mais elle ne comporte que 6 domaines transmembranaires et ne serait donc probablement pas fonctionnelle. D'après les profils d'expression de ces différentes formes, il semblerait que le sous-type Cg-GnRH-R soit impliqué dans la gamétogenèse de l'huître creuse, puisque son expression est spécifique de la gonade (Rodet *et al.*, 2005), alors que les formes Cg-GnRH-RII-L et Cg-GnRH-RII-S sont exprimées dans différents tissus adultes. De plus, l'expression de Cg-GnRH-R varie au cours de la gamétogenèse, dans l'aire gonadique, ce qui appuie

l'hypothèse de son implication dans la régulation de la reproduction, alors que les formes RII sont exprimées de manière quasi-constante dans ce tissu. Les 3 ARNs différents sont présents en plus grande quantité dans la gonade mâle, comparée à la gonade femelle, suggérant une implication plus forte dans la régulation de la spermatogenèse que dans la maturation ovocytaire. Au vu des différences structurales et d'expression des deux sous-types considérés, Rodet *et al.* ont supposé qu'ils pouvaient probablement lier des ligands de natures différentes. La forme Cg-GnRH-R présente un profil typique de récepteur à la GnRH, alors que la forme RII semble avoir un rôle périphérique. Sachant que les peptides AKH, RCPH et APGWamide dériveraient d'un même ancêtre commun, et que leurs récepteurs sont intimement liés (Martinez-Perez *et al.*, 2002), il a été supposé que cette forme RII pourrait lier un homologue de l'un de ces peptides. Chez les Mollusques, les neurones à APGWamide innervent de nombreux tissus périphériques chez la palourde (Smith *et al.*, 1997), tissus qui présenteraient également une expression de la forme RII chez *C. gigas*, présentant ce récepteur comme un candidat potentiel de récepteur à l'APGWamide, dont le précurseur est présent dans la banque d'ESTs de *C. gigas*.

Ainsi, un peptide de type GnRH a été recherché chez l'huître creuse, afin d'étudier son impact sur la régulation de la reproduction, mais également afin de confirmer la nature des deux sous-types de récepteurs. Par des techniques d'immunohistochimie, un peptide proche de la GnRH d'*O. vulgaris* a été détecté chez la moule *M. edulis* et chez *C. gigas* (Rodet, 2008). Nous avons donc entrepris la mise en évidence et la caractérisation d'un tel peptide chez notre modèle par une approche protéomique qui consiste à analyser les différents peptides dans un extrait peptidique de ganglions viscéraux *C. gigas* par spectrométrie de masse. Ces peptides sont alors comparés à deux types de banques différentes pour mettre en évidence un homologue de GnRH : tout d'abord, ces peptides sont comparés aux séquences présentes dans la banque d'ESTs Gigas Database, et d'un autre côté, à une banque de GnRHs potentiels et aléatoires réalisée à partir de motifs conservés dans les GnRHs de Mollusques. La première approche ayant été fructueuse, nous avons pu caractériser à la fois le peptide, en déterminant sa séquence protéique, et sa présence dans les différents tissus adultes, et le précurseur, qui nous a permis d'étudier son expression dans ces tissus, et à différents stades de reproduction et différentes conditions trophiques.

Tous ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Peptides ci-jointe.



## Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Laetitia Bigot<sup>a,b</sup>, Céline Zatylny-Gaudin<sup>a,b</sup>, Franck Rodet<sup>c</sup>, Benoit Bernay<sup>a</sup>, Pierre Boudry<sup>d</sup>, Pascal Favrel<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Caen Basse-Normandie, IBFA, Biologie des Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés (BioMEA), 14032 Caen Cedex, France

<sup>b</sup> CNRS INEE FRE 3484, BioMEA, France

<sup>c</sup> Université de Lille 1, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée, EA4550, IFR 147, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>d</sup> Ifremer, Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, BP 70, 29280 Plouzané, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 December 2011

Received in revised form 20 January 2012

Accepted 20 January 2012

Available online 28 January 2012

#### Keywords:

Mollusk

Bivalve

Oyster

Neuroendocrinology

Reproduction

GnRH

### ABSTRACT

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), a key neuropeptide regulating reproduction in vertebrates has now been characterized in a number of non-vertebrate species. Despite the demonstration of its ancestral origin, the structure and the function of this family of peptides remain poorly known in species as distant as lophotrochozoans. In this study, two GnRH-related peptides (Cg-GnRH-a and Cg-GnRH-G) were characterized by mass spectrometry from extracts of the visceral ganglia of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. These peptides showed a high degree of sequence identity with GnRHs of other mollusks and annelids and to a lesser extent with those of vertebrates or with AKH and corazonins of insects. Both the mature peptides and the transcript encoding the precursor protein were exclusively expressed in the visceral ganglia. Significant differences in transcriptional activity of Cg-GnRH encoding gene were recorded in the ganglia along the reproductive cycle and according to trophic conditions with a higher level in fed animals compared to starved animals. This suggests the involvement of Cg-GnRHs as synchronizers of nutritional status with energy requirements during reproduction in oyster. Evidence for a role of Cg-GnRHs as neuroregulators and as neuroendocrine factors in bivalve is discussed.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a hypothalamic neuropeptide that plays a key role in the regulation of reproduction in vertebrates [11]. This neurohormone induces the release of the pituitary gonadotropins LH and FSH that stimulate gonad steroidogenesis and promote gametogenesis. With the identification of more than fourteen structural variants and three different forms of GnRH across various species of protochordates and vertebrates, it has become clear that GnRH peptides regulate various functions with neuroendocrine, paracrine, autocrine and neurotransmitter/neuromodulatory activities [27]. This wide distribution in the chordate lineage suggests that GnRH peptides and signaling pathways with conserved reproductive functions probably arose before the divergence between Deuterostoma and Protostoma [16] (for review). This early evolutionary origin was formerly proposed after

the finding that yeast  $\alpha$ -mating factor shows some structural and functional similarity to GnRH [19].

Although the ancestral origin of GnRH-like peptides was clearly suggested by immunochemical and biological studies carried-out essentially in mollusks and cnidarians [10,25,35,37], evidence came with the isolation and structural characterization of the first proto-stomian GnRH-like peptide from the cephalopod mollusk *Octopus vulgaris* [15]. This oct-GnRH is a dodecapeptide that deviates from the decapeptide motif possessed by all chordate GnRHs but displays the features characteristic to all GnRH molecules [34]. More recently, cDNAs encoding GnRH-like peptides were identified from the gastropod mollusks *Aplysia californica* [38] and *Lottia gigantea* as well as from the annelid *Capitella* [36]. Firm identification of GnRH-like peptides from lophotrochozoa stresses the singular lack of GnRH peptides in Ecdysozoa, the second large clade of Protostoma including arthropods and nematodes, two phyla with considerable accessible genomic resources. The likelihood that GnRH would have been lost in Ecdysozoa was thus logically put forward [34]. Interestingly, a *Caenorhabditis elegans* peptide related to insect adipokinetic hormone (AKH) whose precursor displays similarities at the structural level with the AKH prepropeptides of arthropods and with the GnRH precursors of vertebrates [18] was found. Like its insect

\* Corresponding author at: Université de Caen Basse-Normandie, IBFA, Biologie des Mollusques marins et Ecosystèmes associés (BioMEA), Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France. Tel.: +33 231565361; fax: +33 231565346.

E-mail address: [pascal.favrel@unicaen.fr](mailto:pascal.favrel@unicaen.fr) (P. Favrel).

counterparts [31] this AKH-GnRH peptide binds a GnRH receptor ortholog. Interestingly, silencing of the genes encoding this peptide or its receptor induces a delay in the egg laying process in *C. elegans* [18]. This significant result supports the view of a role of the GnRH signaling system in the physiological control of reproduction in Protostoma, a point which remains a matter of debate [34].

Management of fertility is of crucial economical relevance for aquacultural species [26]. This is especially the case for the oyster *Crassostrea gigas* whose reproductive process has a major impact on several physiological functions, generating phenotypic and genetic trade-offs with growth and survival [7,12]. In this species, alternative splicing of a single gene generates multiple forms of gonadotropin-releasing hormone receptor orthologs expressed either specifically in the gonad or in a variety of tissues [29,30]. In line with the demonstration of co-evolution of ligand-receptor pairs [24]; one would expect some of these receptors to bind a GnRH-like peptide. Due to the recent development of genomic resources in *C. gigas* [8], we have identified two forms of GnRH-like neuropeptides (Cg-GnRH) from visceral ganglia of this bivalve mollusk using mass spectrometry. In addition, pattern of expression of Cg-GnRH neuropeptides and their transcript was investigated using mass spectrometry or immunocytochemistry and RT-qPCR respectively.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Two years old adult oysters *C. gigas* purchased from a local oyster farm (Normandie, France) were used for peptide characterization, transcription analyses and immunohistochemistry. Stages of reproduction (stage 0: resting undifferentiated stage, stage I: gonial multiplication stage, stage II: maturation stage, stage III: sexual maturity) were determined by histological analysis of gonad sections as described in [29]. To study the influence of trophic conditions, one-year-old adult oysters were reared in water tanks either in the absence of food or with a 12% diet (12% of oyster dry weight in algal (mixture containing *Isochysis galbana* (clone T-ISO), *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*) dry weight per day) in controlled experimental conditions during 3 weeks. Adult mussels were obtained from commercial mussel farms from west Cotentin (Normandie, France).

### 2.2. Extraction of tissues for peptide analysis

Twenty animal equivalents of each organ studied (visceral ganglia, gonadic area, labial palps, digestive gland, mantle, mantle edge, muscles, gills) were extracted in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) at 4 °C and centrifuged for 30 min at 35,000 × *g* at 4 °C. The supernatants were concentrated on Chromafix C18 solid phase extraction cartridges (Macherey-Nagel). Samples were evaporated for nano LC or HPLC purification.

### 2.3. Nano-LC purification of visceral ganglia extract

The chromatography step was performed on a nano-LC system (Prominence, Shimadzu). Peptides were concentrated on a Zorbax 5 mm × 0.3 mm C18 pre-column (Agilent) and separated onto a ACE 50 mm × 0.5 mm C18 column (AIT, France). Mobile phases consisted of 0.1% acetic acid, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% acetic acid, 20% water in 79.9% ACN (v/v/v) (B). The nanoflow rate was set at 800 nL/min, and the gradient profile was as follows: constant 5% B for 5 min, from 5 to 100% B in 75 min, constant 100% B for 20 min, and return to 10% B. The 800 nL/min volume of the

peptide solution was mixed with 1.6 μL/min volume of a mix of 5 mg/mL CHCA matrix prepared in a diluting solution of 50% ACN with 0.1% TFA. Fifteen second fractions were spotted by an Accuspot spotter (Shimadzu) on a stainless steel Opti-TOF™ 384 targets. MS experiments were realized on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer.

### 2.4. Mass spectrometry analysis

MS analysis were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF-TOF ion optics and an OptiBeam™ on-axis laser irradiation with 1000 Hz repetition rate. The system was calibrated immediately before analysis with a mixture of des-Arg-Bradykinin, Angiotenin I, Glu1-Fibrinopeptide B, ACTH (18-39), ACTH (7-38) and mass precision was above 50 ppm. A 0.8 μL volume of the HPLC fraction was mixed with 1.6 μL volume of a suspension of CHCA matrix prepared in 50% ACN/0.1% TFA solvent. The mixture was spotted on a stainless steel Opti-TOF™ 384 targets; the droplet was allowed to evaporate before introducing the target into the mass spectrometer.

All acquisitions were taken in automatic mode. A laser intensity of 3000 was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing 1000 single spectra (5 × 200) in the mass range from 600 to 4000 Da. MS/MS spectra were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2500 single spectra (10 × 250) with a laser intensity of 3900. For the tandem MS experiments, the acceleration voltage applied was 1 kV and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings. The fragmentation pattern was used to determine the sequence of the peptide. Database searching was performed using the Mascot 2.3.02 program (Matrix Science) from a GnRH database elaborated with the software Aaseq 5-2 (Zanuttini and Henry, <http://zanutti.perso.info.unicaen.fr/aaseq/>). This GnRH random library is built on the basis of the tags identified from lophotrochozoan GnRH alignment (N-terminal pyroglutamate, amidation, consensus sequence S<sub>7</sub>-N-G-W). The MS/MS spectrum of the peptide is then screened by Mascot using the focused sequence database. The results were confirmed by screening the latest version of *C. gigas* "GigasDatabase" [8] (including 1,013,570 entries) [http://publiccontigbrowser.siggenae.org:9090/Crassostrea\\_gigas/index.html](http://publiccontigbrowser.siggenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html). The variable modifications allowed were as follows: C-terminal amidation, N-terminal pyroglutamate, N-terminal acetylation, methionine oxidation and dioxidation. Mass accuracy was set to 100 ppm and 0.6 Da for MS and MS/MS mode respectively.

### 2.5. Mapping of GnRH by HPLC analysis

HPLC analysis was performed with the software LC-STAR VARIAN connected to a VARIAN 9012 solvent delivery system and a VARIAN 9050 wave length UV-VIS detector set at 214 nm. Tissue extracts were resuspended in 0.1% acetic acid and fractionated by HPLC onto a nucleodur C8 column (Macherey Nagel, 250 × 4.5 μm) with a 45-min acetonitrile linear gradient of 1.33% per minute in 0.1% acetic acid. HPLC fractions co-eluting with synthetic Cg-GnRH (GL Biochem, China) were evaporated for mass spectrometry analysis.

### 2.6. Reverse transcription and quantitative PCR

Real time RT-qPCR analysis was performed using the iCycler iQ® apparatus (Bio-Rad). Total RNA was isolated from adult tissues using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Recovered RNA was then further purified on Nucleospin RNAII columns (Macherey-Nagel). After treatment during

20 min at 37 °C with 1 U of DNase I (Sigma) to prevent genomic DNA contamination, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using 1 µg of random hexanucleotidic primers (Promega), 0.5 mM dNTPs and 200 U MMuLV Reverse Transcriptase (Promega) at 37 °C for 1 h in the appropriate buffer. The reaction was stopped by incubation at 70 °C for 10 min. iQ™ SYBR Green Supermix PCR kit (Biorad) was used for real time monitoring of amplification (5 ng of cDNA template, 40 cycles: 95 °C/15 s, 60 C/15 s) with the following primers: Qs-Cg-GnRH 5'-AGCGTATTCTGGCCGTACA-3' and Qa-Cg-GnRH 5'-CCATGCCCAAATTACCACT-3' as sense and antisense primers respectively. Accurate amplification of the target amplicon was checked by performing a melting curve. Using Qs-Cg-EF (5'-ACCACCTGGTGAATCAAG-3') and Qa-Cg-EF (5'-ACGACGATCGCATTCTCT-3') primers, a parallel amplification of oyster Elongation Factor 1α (EF1α) transcript (BAD15289) was carried out to normalize the expression data of Cg-GnRH transcript. The relative level of Cg-GnRH gene expression was calculated for one copy of the reference elongation factor 1α gene according to the following formula:  $N = 2^{(Ct_{EF1\alpha} - Ct_{Cg-GnRH})}$ .

### 2.7. Immunohistochemistry

Following dissection, nervous ganglia were fixed in Davidson's fixative during 24 h. Fixed tissues were dehydrated, embedded in paraffin wax and sectioned at 5 µm. Deparaffinized sections were incubated during 1 h at room temperature in buffer 1 consisting of 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5% skimmed milk. Sections were then carefully drained before overnight incubation with anti-oct-GnRH antiserum (kind gift of Pr. H. Minakata) diluted 1:800 in the buffer 2 (50 mM TRIS pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% skimmed milk, 0.05% Tween 20) in a moist chamber at 4 °C. Sections were washed twice (10 min each) in buffer 2, incubated for 1 h at room temperature with the horseradish peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-rabbit IgG (Sigma–Aldrich) diluted 1:500 in buffer 2, and then rinsed twice (10 min each) in buffer 2. Peroxidase activity was visualized, after a 10-min incubation in 200 µL DAB (FastDAB, Sigma–Aldrich), as a brown precipitate. Sections were counterstained with light green, mounted in resin, and examined on a Nikon Eclipse 80i microscope coupled to a Nikon DXM1200-C camera. Controls were carried-out using preabsorbed antibodies in the presence of excess of oct-GnRH synthetic peptide (GeneCust, Luxemburg), or without primary or secondary antibodies. Potency of anti-oct-GnRH antiserum to specifically react with Cg-GnRH peptides was tested by immunodotting of HPLC fractions of whole non-mature oyster extracts.

## 3. Results

### 3.1. Identification of a GnRH-related peptides and their precursor

Peptidic extract of visceral ganglia fractionated by nano-LC was analyzed by mass spectrometry (MS). From MS/MS spectra, the amino acid sequences of two Cg-GnRH peptides of respective mass number 1359.63 [M+H]<sup>+</sup> and 1417.64 [M+H]<sup>+</sup> were determined (Fig. 1). The deduced sequences pQNYHFNSNGWQP-NH<sub>2</sub> (Cg-GnRH-a) and pQNYHFNSNGWQPG (Cg-GnRH-G) were confirmed via the screening of both GnRH random library and GigasDatabase that led to the identification of the matching transcript (FUGOSJA01DBKYH). This full length transcript spans 453 bp including a 80 nucleotide leader sequence, a 273 bp ORF followed by a 100 nucleotide trailer and a poly(A) tail starting 20 bp downstream to a (aataaa) consensus polyadenylation sequence. The cDNA encodes a precursor protein starting with an N-terminal hydrophobic signal peptide, probably cleaved C-terminally to Ala<sup>24</sup> followed by a 11 amino acid Cg-GnRH peptide separated from a

GnRH-associated peptide (GAP) by a GKR sequence serving as combined amidation and prohormone convertase proteolytic signals (Fig. 2A). Mature Cg-GnRHs exhibit a high degree of identity with other lophotrochozoan GnRHs as well as some relatedness with vertebrate GnRHs, ecdysozoan adipokinetic hormones and corazonin (Fig. 2B). In contrast oyster GAP showed only 20.9% and 19.2% identity with those previously described in *Octopus* and *Aplysia* respectively (Fig. 2C).

### 3.2. Expression pattern of Cg-GnRH transcript and Cg-GnRH peptide in adult tissues

Spatial distribution of Cg-GnRH transcripts (Fig. 3A) was determined by RT-qPCR using RNA samples from adult tissues. Cg-GnRH transcripts were expressed almost exclusively at relatively high levels in the visceral ganglia. No significant expression of Cg-GnRH transcript was detected in any of the other tissues. To investigate whether Cg-GnRH transcripts were expressed differentially during the reproductive cycle, RT-qPCR was performed with RNA extracted from visceral ganglia collected from individuals at different stages of reproduction in both male and females (Fig. 3B). Although no significant statistical variation was measured along the reproductive cycle, expression pattern appeared slightly different between males and females with a lower expression during vitellogenesis (stage 2) in females and, in contrast, a higher expression in males at this specific stage. Because the feeding status of the animal notably impacts the efficiency of gametogenesis in oyster [4], expression of Cg-GnRH transcripts was monitored in the visceral ganglia of fed and starved animals. Interestingly, Cg-GnRH transcript levels were higher in fed animals though this increased expression was not statistically significant (Fig. 4).

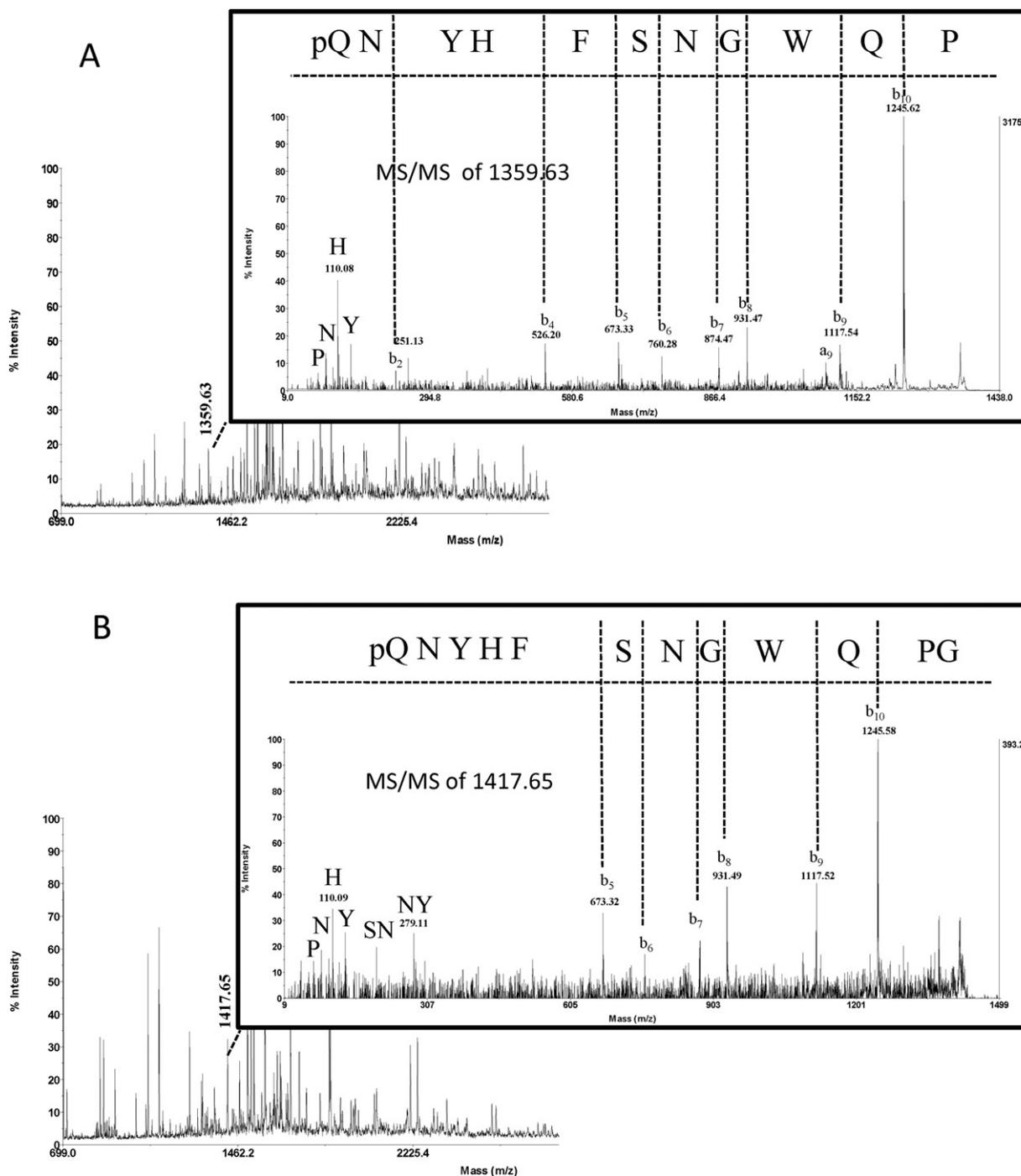
The processing of a neuropeptide precursor usually results in end products being transported to the nerve terminals. Thus it was interesting to compare the tissue distribution of Cg-GnRH transcripts with that of Cg-GnRH peptides. To this end, HPLC fractions of different tissue extracts co-eluting with the synthetic Cg-GnRH peptides were analyzed by MALDI MS. Cg-GnRH peptides were unambiguously detected in the visceral ganglia fractions. In contrast, no specific Cg-GnRH signal could be identified in any of the other studied tissue fractions.

### 3.3. Immunohistochemical distribution of GnRH like peptides in the nervous system of *C. gigas* and *Mytilus edulis*

Antibodies raised against octopus GnRH-like molecule (oct-GnRH), specifically labeled two HPLC fractions of whole non-mature oyster extracts, with retention times corresponding to those of Cg-GnRH peptides. By immunocytochemistry, anti-oct-GnRH antiserum labeled scattered neurons within the visceral ganglia (Fig. 5A). In contrast to other bivalve mollusks, the central nervous system (CNS) of oysters which consists of only a pair of very tiny cerebral ganglia and a pair of coalesced visceral ganglia has been poorly studied. To gain an insight into the distribution of GnRH-like peptides in the CNS of bivalves, a parallel investigation was carried out using sections of the ganglia of the mussel *M. edulis*. Both cerebral and pedal ganglia displayed a strong signal in pyriform neurons within the cortex or at the vicinity of the neuropile (Fig. 5B and C). These cells display the features of type a1 neurosecretory cells described previously [13]. In addition, axon fibers were also strongly immunoreactive.

## 4. Discussion

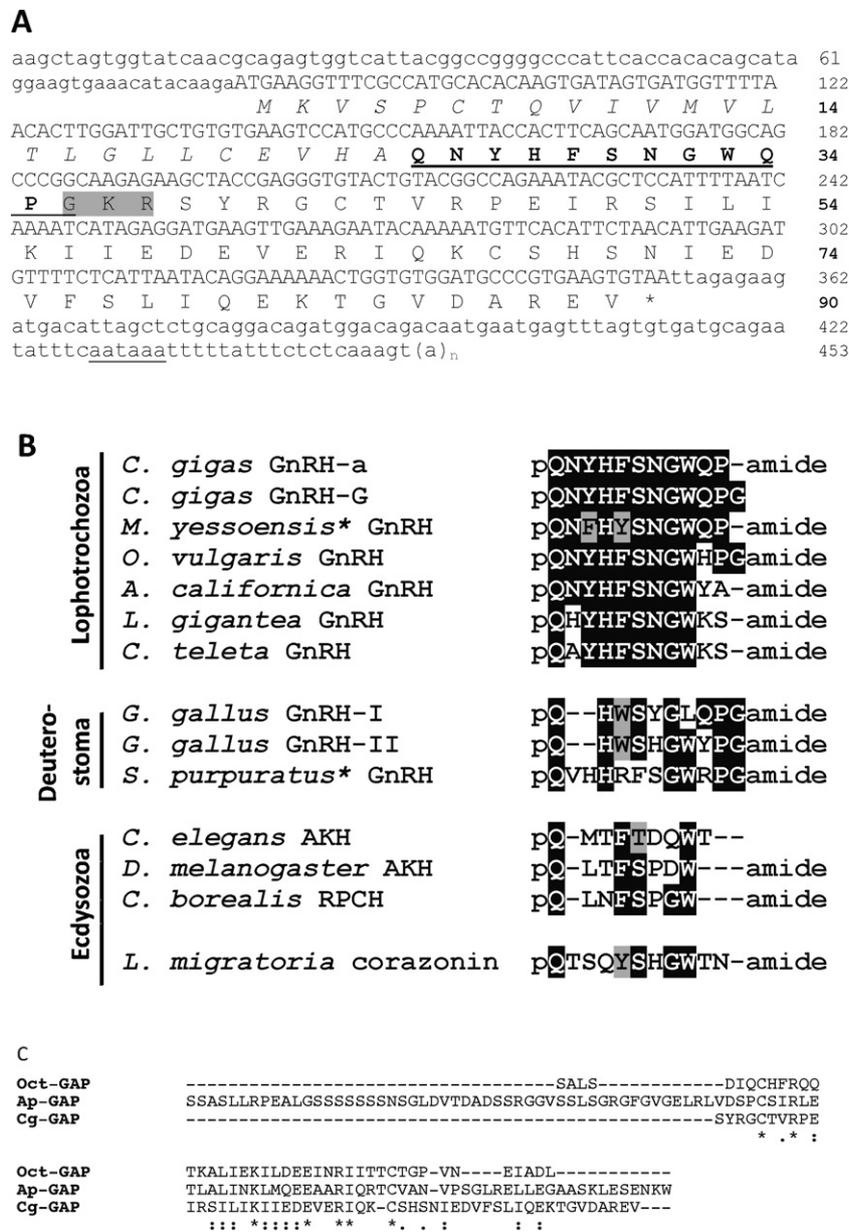
For more than a decade, the occurrence of functionally active GnRH-related peptides was strongly suggested in bivalve



**Fig. 1.** Mass analyses of Cg-GnRH peptides. MS and MS–MS spectra of pQNYHFSNGWQPa (A) and pQNYHFSNGWQPG (B) peptides. Mass and Mascot identification from MS–MS spectra confirm the sequences and the existence of an N-terminal pyroglutamate (A and B) and a C-terminal amide (A).

mollusks [25]. The present study describes for the first time the molecular identification of GnRH-related peptides and its peptide precursor from the Pacific oyster *C. gigas*. Oyster GnRH precursor exhibits the typical architecture of all identified vertebrate and mollusk GnRH precursors consisting of a signal peptide, a single GnRH sequence separated from GnRH-associated peptide by cleavage at a dibasic processing site. This cleavage yields two GnRH forms; Cg-GnRH-G, a non-amidated dodecapeptide with the C-terminal “Pro-Gly” motif and Cg-GnRH-a, the corresponding amidated peptide whose terminal glycine catalyzed by a peptidyl glycine- $\alpha$ -amidating mono-oxygenase provides the amide

group. The newly discovered peptides appear highly conserved in the mollusk phylum (Fig. 2B). All the mollusk peptides, including the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*) new peptide retrieved from EST databases, exhibit the typical extra dipeptide insertion after the N-terminal pyro-glutamate residue of all lophotrochozoan GnRHs. This extra “Asn-Tyr” dipeptide in oct-GnRH was found requisite for activity and receptor binding and explained the weak or no activity of most vertebrate GnRHs in octopus [17]. Precisely, this key dipeptide insertion shows subtle sequence variability among lophotrochozoan peptides and might support species specific activity discrimination. The core sequence

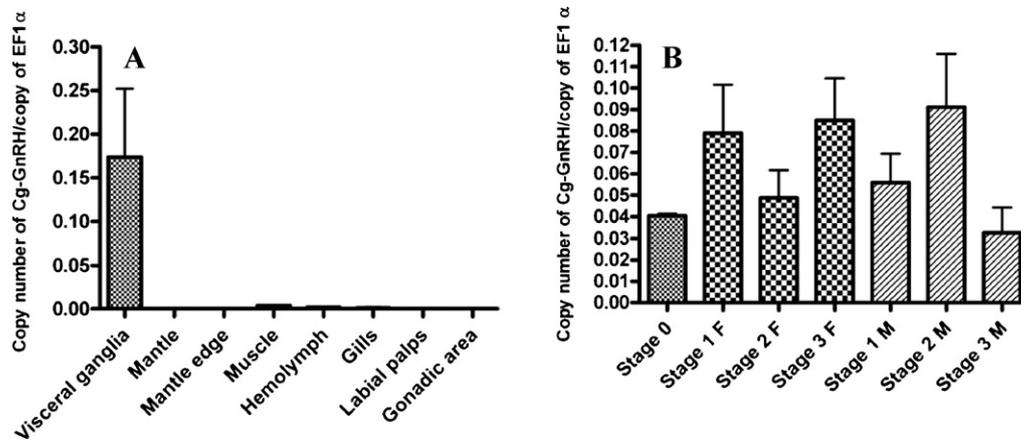


**Fig. 2.** (A) Nucleotide sequence of the cDNA encoding a Cg-GnRH precursor in *Crassostrea gigas* and the deduced amino acid sequence. Putative signal peptide is indicated in italics. Potential combined amidation/peptidolytic processing site is shaded in gray. The predicted mature peptides are underlined and shown in boldface. The consensus polyadenylation sequence is underlined. (B) Alignment of GnRH, AKH and corazonin peptide family members. Sequences are compared to Cg-GnRH-a, identical residues are shaded in black, and similar residues in gray. Peptide sequences are deduced from the cDNA sequences of *Crassostrea gigas* (FQ666028, FU60SJA01DBKYH), *Mizuhopecten yessoensis* (BAH47639.1) (\*new sequence), *Aplysia californica* (ABW82703.1), *Octopus vulgaris* (AB037165), *Lottia gigantea* (FC805607 and FC796606), *Strongylocentrotus purpuratus* (XP.800179), AKH sequences from *Caenorhabditis elegans* (AAC26928), *Drosophila melanogaster* (P61855), red pigment concentrating hormone (RPCH) from *Carcinus maenas* (Q26324) and corazonin (Crz) sequence from *Drosophila melanogaster* (AJ851893). (C) Alignment of GnRH-associated peptides (GAP) deduced from *Crassostrea*, *Octopus* and *Aplysia* GnRH precursors.

is strictly conserved among lophotrochozoan GnRHs and displays uneven degree of identity with deuterostome GnRHs, adipokinetic hormones (AKHs) and corazonin, two ecdysozoan peptide families known to signal via GnRH receptor orthologs [3,18,31]. This stresses the likely shared ancestry of these peptide families and co-evolution with their receptors [28]. Though critical for receptor binding, the highly conserved C-terminal (Pro-Gly-amide) motif of vertebrate GnRHs [21] was only found in oct-GnRH and in the non-amidated form of Cg-GnRH-G. Presence of this motif probably explains the gonadotropin-releasing activity of oct-GnRH on quail anterior pituitary cells [15]. Variability of this motif may also account for the disparity of results obtained in mollusks by

immunochemical methods based on the use of antibodies against vertebrate GnRHs [5,39] or in term of potency of the distinct vertebrate GnRHs to activate target cells [25].

In contrast to the GnRH peptide, the long companion C-terminal peptide generated from the precursor, also named GnRH-associated peptide (GAP) does not exhibit sequence conservation with vertebrate GAPs. Despite moderate identity among mollusk GAPs, the pattern of cysteine residues, known to be critical for strengthening the tertiary structure of secreted peptides, was strictly conserved. This suggests that GAP might be functional in mollusks but with a probable accessory role that would explain the lower selective pressure during evolution.

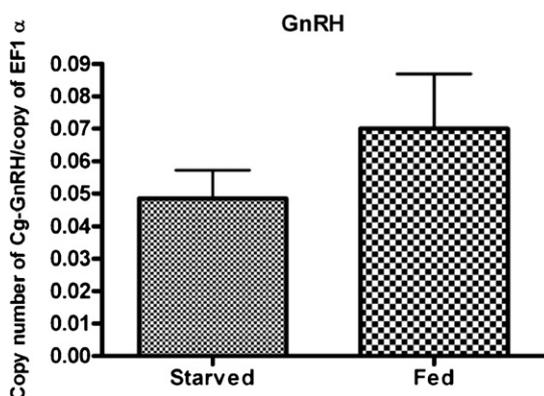


**Fig. 3.** Differential Cg-GnRH gene expression in adult tissues (A) and in the visceral ganglia of male (M) and female (F) individuals at different stages of reproduction (B) of *C. gigas* measured by real-time quantitative RT-PCR. Each value is the mean + S.E. of 5 pools of 6 visceral ganglia. Expression levels are calculated as the number of copies of Cg-GnRH transcript per copy of elongation factor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) mRNA. Stage 0: sexual resting stage, stage 1: gonial multiplication stage, stage 2: tubule development and maturation stage, stage 3: sexual maturity stage.

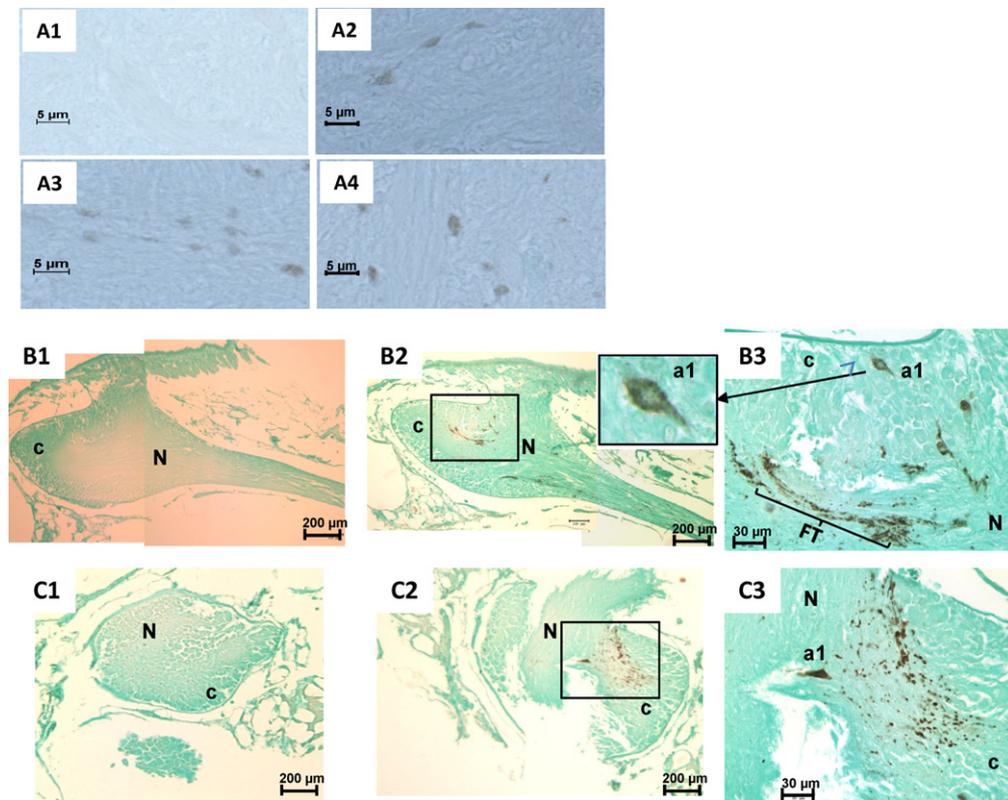
Previous studies in mollusks have demonstrated a wide distribution of GnRH transcripts in the central nervous system and accessory sex organs [38] or oocytes [6]. In contrast, oyster Cg-GnRH transcripts were highly and exclusively expressed in the visceral ganglia. This pattern of expression is somewhat reminiscent of the major expression of GnRH-II in vertebrate midbrain and octopus brain and implies that Cg-GnRH would serve as neural regulator in the CNS as was suggested for oct-GnRH [14]. In *Octopus*, endogenous oct-GnRH acts as a multifunctional modulatory factor in memory processing, sensory, movement, autonomic functions and feeding [22]. Ap-GnRH in *Aplysia* was also shown to modulate a wide range of behavioral events such as parapodial opening and inhibition of feeding [33]. The higher expression of Cg-GnRH transcripts in fed oysters compared to starved oysters also coincides with a role in the control of feeding. With the experimental demonstration that GnRH-II is a potent anorexigenic factor in vertebrates [20], inhibition of feeding now emerges as a likely GnRH ancestral function shared by both vertebrates and Protostoma. In vertebrates, it has been proposed that GnRH-II would coordinate changes in nutrition with reproductive status [32]. As storage metabolism in oysters is closely associated with reproduction [2]; it is thus intriguing to notice changes in

expression of Cg-GnRH transcripts in oyster CNS along the reproductive cycle. Although careful additional investigations should be developed, Cg-GnRH appears as a good candidate neuropeptide to synchronize nutritional status with energy requirements during reproduction in oyster as was already suggested in vertebrates [32].

The failure to reveal mature Cg-GnRH peptide in any peripheral tissues of the oyster suggests that nerve terminals controlling the activity of these tissues do not release the peptide locally except in amounts not detectable with the method applied. As was proposed for oct-GnRH [15], the possibility that Cg-GnRH would be released into the circulation and work as a neurohormone to regulate peripheral organs cannot be rule-out. This suggestion is in agreement with the demonstration of oct-GnRH immunoreactive neurosecretory cells in the nervous ganglia of *M. edulis* and conforms to previous studies demonstrating the activity of vertebrate GnRHs on reproductive or non reproductive target cells in bivalve mollusks [23,25]. Another key point that argues for the endocrine activity of Cg-GnRHs in *C. gigas* is the occurrence of GnRH receptor orthologs present either specifically in the gonad [29] or in various peripheral organs [30]. Expression of these receptors in the gonads is consistent with a reproductive modulating activity of Cg-GnRHs as putative ligands. Similar involvement in reproductive-related processes was also put forward for oct-GnRH in *Octopus* [17] though no reproductive activity could be demonstrated for ap-GnRH in *Aplysia* [33]. On the other hand, the wide tissue distribution of some oyster GnRH receptor forms [30] also implies additional non-reproductive regulatory activities. It remains to be proven functionally using reverse endocrinology methods [18] whether oyster receptors are the true targets for Cg-GnRHs. Although *C. gigas* receptors most likely bind different sets of peptides [30] they appear phylogenetically closer to the ecdysozoan AKH receptors than to the functionally characterized octopus GnRH receptor which clusters with insect corazonin receptors. AKHs, the insect metabolic hormones that mobilize energy substrates during energy-consuming activities [9] have been shown to affect reproduction processes in *C. elegans* [18] and plausibly to play a role in oocyte maturation in the fall armyworm [1]. The recent identification of true AKH-related neuropeptides in *C. gigas* (unpublished results) and in other classes of mollusks [28] demonstrates that the paths connecting the GnRH, AKH and corazonin families of peptides through metazoan evolution are more complex than formerly anticipated.



**Fig. 4.** Differential Cg-GnRH gene expression in visceral ganglia of fasted and fed individuals of *C. gigas*. Each value is the mean + S.E. of 15 individual visceral ganglia. Expression levels are calculated as the number of copies of Cg-GnRH transcript per copy of elongation factor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) mRNA. Results were statistically tested with a one-way ANOVA,  $p < 0.05$ . No significant statistical difference was observed.



**Fig. 5.** GnRH-like immunoreactivity in the central nervous system of *Crassostrea gigas* (A) and *Mytilus edulis* (B and C) using anti oct-GnRH. (A) Sections of visceral ganglia: (A1) control section, (A3/4) few scattered immunoreactive neurons and (A2) nerve fibers. (B) Sections of cerebral ganglia: (B1) control section, (B2/3) Immunopositive sections showing immunoreactive a1 neurosecretory cells within the cortical region (c), insert (higher magnification). A prominent fiber tract (FT) at the vicinity of the neuropile (N). (C) Sections of pedal ganglia. (C1): control section, (C2/3) sections showing immunopositive typical pyriform type a1 neurosecretory cells as well as immunoreactive axon fibers.

## Acknowledgments

The authors thank Pr. H. Minakata (Osaka, Japan) for providing us with anti-oct-GnRH antiserum and the staff of the experimental hatchery of Argenton (France) for the trophic conditioning of the oysters. This work was funded by the ANR project “Gametogenes” (ANR-08-GENM-041). L. Bigot was funded by Ifremer and a Région Basse-Normandie doctoral grant.

## References

- [1] Abdel-Latif M, Hoffmann KH. The adipokinetic hormones in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: cDNA cloning, quantitative real time RT-PCR analysis, and gene specific localization. *Insect Biochem Mol Biol* 2007;37:999–1014.
- [2] Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2000;125:359–69.
- [3] Cazzamali G, Saxild N, Grimmelikhuijzen C. Molecular cloning and functional expression of a *Drosophila* corazonin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:31–6.
- [4] Chavez-Villalba J, Cochard JC, Le Pennec M, Barret J, Enriquez-Diaz MR, Caceres-Martinez C. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Shellfish Res* 2003;22:721–31.
- [5] Di Cosmo A, Di Cristo C. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *J Comp Neurol* 1998;398:1–12.
- [6] Di Cristo C, De Lisa E, Di Cosmo A. GnRH in the brain and ovary of *Sepia officinalis*. *Peptides* 2009;30:531–7.
- [7] Ernande B, Boudry P, Clobert J, Haure J. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J Evol Biol* 2004;17:342–56.
- [8] Fleury E, Huvet A, Lelong C, de Lorgeril J, Boulo V, Guéguen Y, et al. Generation and analysis of a 29,745 unique expressed sequence tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* 2009;10:341.
- [9] Gade G. Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family: a new take on biodiversity. *Ann NY Acad Sci* 2009;1163:125–36.
- [10] Gorbman A, Whiteley A, Kavanaugh S. Pheromonal stimulation of spawning release of gametes by gonadotropin releasing hormone in the chiton, *Mopalia* sp. *Gen Comp Endocrinol* 2003;131:62–5.
- [11] Guillemin R. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science* 1978;202:390–402.
- [12] Huvet A, Normand J, Fleury E, Quillien V, Fabioux C, Boudry P. Reproductive effort of Pacific oysters: a trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 2010;304:95–9.
- [13] Illanes-Bucher AJW, Lubet P. Etude de l'activité neurosécrétoire au cours du cycle sexuel annuel de la moule *Mytilus edulis* L. *Bull Soc Zool France* 1980;105:141–51.
- [14] Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Takuwa-Kuroda K, Kanda A, Tsutsui K, Minakata H. Expression and distribution of octopus gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 2004;477:310–23.
- [15] Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fujisawa Y, Hisada M, Ukena K, Tsutsui K, et al. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:1187–93.
- [16] Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 2007;153:346–64.
- [17] Kanda A, Takahashi T, Satake H, Minakata H. Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin-releasing-hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Biochem J* 2006;395:125–35.
- [18] Lindemans M, Liu F, Janssen T, Husson SJ, Mertens I, Gade G, et al. Adipokinetic hormone signaling through the gonadotropin-releasing hormone receptor modulates egg-laying in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1642–7.
- [19] Loumaye E, Thorner J, Catt KJ. Yeast mating pheromone activates mammalian gonadotrophs: evolutionary conservation of a reproductive hormone. *Science* 1982;218:1323–5.
- [20] Matsuda K, Nakamura K, Shimakura S, Miura T, Kageyama H, Uchiyama M, et al. Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Horm Behav* 2008;54:83–9.
- [21] Millar RP. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* 2005;88:5–28.

- [22] Minakata H, Shigeno S, Kano N, Haraguchi S, Osugi T, Tsutsui K. Octopus gonadotrophin-releasing hormone: a multifunctional peptide in the endocrine and nervous systems of the cephalopod. *J Neuroendocrinol* 2009;21:322–6.
- [23] Nakamura S, Osada M, Kijima A. Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Mol Reprod Dev* 2007;74:108–15.
- [24] Park Y, Kim YJ, Adams ME. Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand–receptor coevolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11423–8.
- [25] Pazos AJ, Mathieu M. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen Comp Endocrinol* 1999;113:112–20.
- [26] Piferrer F, Beaumont AR, Falguière J-C, Flajshans M, Haffray P, Colombo L. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 2009;293:125–56.
- [27] Ramakrishnappa N, Rajamahendran R, Lin YM, Leung PC. GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. *Anim Reprod Sci* 2005;88:95–113.
- [28] Roch GJ, Busby ER, Sherwood NM. Evolution of GnRH: diving deeper. *Gen Comp Endocrinol* 2011;171:1–16.
- [29] Rodet F, Lelong C, Dubos MP, Costil K, Favrel P. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochim Biophys Acta* 2005;1730:187–95.
- [30] Rodet F, Lelong C, Dubos MP, Favrel P. Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of gonadotropin-releasing hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 2008;414:1–9.
- [31] Staubli F, Jorgensen TJ, Cazzamali G, Williamson M, Lenz C, Sondergaard L, et al. Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3446–51.
- [32] Temple JL, Millar RP, Rissman EF. An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. *Endocrinology* 2003;144:13–9.
- [33] Tsai PS, Sun B, Rochester JR, Wayne NL. Gonadotropin-releasing hormone-like molecule is not an acute reproductive activator in the gastropod, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* 2010;166:280–8.
- [34] Tsai PS, Zhang L. The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. *Biol Reprod* 2008;79:798–805.
- [35] Twan WH, Hwang JS, Lee YH, Jeng SR, Yueh WS, Tung YH, et al. The presence and ancestral role of gonadotropin-releasing hormone in the reproduction of scleractinian coral, *Euphyllia ancora*. *Endocrinology* 2006;147:397–406.
- [36] Veenstra JA. Neurohormones and neuropeptides encoded by the genome of *Lotitia gigantea*, with reference to other mollusks and insects. *Gen Comp Endocrinol* 2010;167:86–103.
- [37] Young KG, Chang JP, Goldberg JL. Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction. *J Comp Neurol* 1999;404:427–37.
- [38] Zhang L, Tello JA, Zhang W, Tsai PS. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* 2008;156:201–9.
- [39] Zhang L, Wayne NL, Sherwood NM, Postigo HR, Tsai PS. Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* 2000;118:77–89.

## ***Détermination des ligands des récepteurs orthologues aux récepteurs GnRH***

Ainsi, l'identification du peptide GnRH chez l'huître creuse confirme la présence de cette voie de signalisation chez *C. gigas*, présence suggérée par Rodet *et al.* (2005) lors de l'identification des récepteurs orthologues de récepteurs à la GnRH. La nature de ces récepteurs n'a été déterminée que par leurs similitudes de séquences et/ou de structure avec de tels récepteurs. Ainsi, tout comme pour les récepteurs liés aux récepteurs NPY, il est nécessaire de développer des tests fonctionnels pour confirmer la nature de leur ligand. De plus, d'après Rodet *et al.* (2005 ; 2008), les deux sous-types Cg-GnRH-R et Cg-GnRH-RII sont susceptibles de lier des ligands de natures différentes.

En effet, les auteurs ont suggéré que le sous-type I de récepteur, exprimé presque exclusivement dans l'aire gonadique, était un bon candidat comme récepteur à la GnRH, alors que le sous-type II, qui semble avoir une expression plus ubiquiste, pourrait lier un ligand différent, éventuellement l'APGWamide.

Ainsi, des tests d'endocrinologie inverse ont été effectués sur ces deux récepteurs, à l'aide de divers ligands synthétiques, de type APGWamide et de type GnRH-AKH d'Invertébrés. Les ligands potentiels testés ont tout d'abord été deux GnRHs de Mollusques, celui du bivalve *Mizhuopecten yessoensis*, identifié par criblage de banque d'EST publique, et de l'aplysie, *A. californica* (tableau 5). Ensuite, le GnRH étant identifié chez *C. gigas*, il a donc pu être testé sur ces récepteurs. De plus, d'après les hypothèses émises par Rodet *et al.* (2005 et 2008), le récepteur de type GnRH II de *C. gigas* serait susceptible de lier les peptides de mollusques de type APGWamide. Un précurseur de cette famille est présent dans la banque de *C. gigas*, et les différents peptides déduits de sa séquence ont été synthétisés : APGWamide, RPGWamide, KPGWamide et VPGWamide (tableau 5).

**Tableau 5 :** Liste des différents peptides testés sur les récepteurs orthologues de récepteurs GnRH chez *C. gigas*. Les 3 GnRHs de Mollusques et l'AKH-GnRH du nématode *C. elegans* ont été synthétisés à partir de séquences connues, les peptides A/R/K/VPGWamide ont été déduits à partir du précurseur identifié dans Gigas Database de *C. gigas*. Cg = *Crassostrea gigas*, My = *Mizuhopecten yessoensis*, Ap = *Aplysia californica*, Ce = *Caenorhabditis elegans*, Lm = *Locusta migratoria*.

Nom du peptide	Séquence peptidique
<b>Peptides de <i>C. gigas</i></b>	
CgGnRH	pENYHFSNGWQPamide
APGWa	APGWamide
RPGWa	RPGWamide
KPGWa	KPGWamide
VPGWa	VPGWamide
<b>Autres peptides</b>	
MyGnRH	pENFHYSNGWQPamide
ApGnRH	pENYHFSNGWYAAamide
CeAKH-GnRH	pEMTFTDQWT

### Résultats des tests:

De la même façon que pour les tests effectués sur les récepteurs de type NPY-R, plusieurs méthodologies ont été utilisées afin de tester la liaison des peptides sélectionnés aux deux récepteurs orthologues des récepteurs GnRH. Ainsi, des lignées cellulaires CHO et HEK ont été utilisées pour tester l'augmentation de calcium intracellulaire respectivement par luminescence et par fluorescence, comme détaillé dans le chapitre 2.

Pour le récepteur Cg-GnRH-RII, des résultats ont été obtenus avec la technique d'endocrinologie inverse, en transfectant des cellules CHO PAM28. Le récepteur Cg-GnRH-R n'a été activé par aucun des ligands potentiels testés, que ce soit en cellules CHO WTA11, CHO PAM28 ou HEK (tableau 6).

**Tableau 6 :** Récapitulatif des peptides ayant activé les deux RCPGs orthologues des récepteurs GnRH étudiés, transfectés en cellules CHO PAM28 exprimant de manière stable l'aéuorine, mais pas la protéine  $G\alpha 16$ . Cette protéine  $G\alpha 16$  n'est pas nécessairement co-transfectée pour deux d'entre eux (A4 et H4), mais les autres récepteurs n'en ont pas besoin pour induire une augmentation de calcium, ce qui indique la(les) protéine(s) G recrutée(s) par ces récepteurs.

Récepteur transfecté	Peptide(s) activateur(s)	$G\alpha 16$ co-transfectée ?	Protéine(s) G probablement associée(s) au RCPG
GnRH R	Pas de réponse	/	/
GnRH RII	APGWa, KPGWa, RPGWa	Non	Gaq

Le récepteur Cg-GnRH-R, supposé être un vrai récepteur GnRH, n'a pas donné de réponse, avec les GnRH d'autres mollusques, celui de *C. gigas* ou encore les peptides de type APGWamide.

Le récepteur Cg-GnRH-RII, quant à lui, a été activé par l'APGWamide lors des premiers tests d'endocrinologie inverse, en cellules CHO. Cependant, ces résultats n'ont pas pu être reproduits lors des tests suivants, et n'ont pas pu être confirmés lors des tests fluorimétriques avec les cellules HEK. En effet, les peptides testés (GnRHs et peptides apparentés à l'APGWamide) engendrent une réponse calcique des cellules HEK, sans transfection de récepteur d'huître, ce qui signifie que ces peptides sont capables de lier et d'activer des récepteurs endogènes de cette lignée cellulaire. Ainsi, les récepteurs orthologues des récepteurs GnRH ne peuvent pas être testés sur les cellules HEK, mais seulement sur les deux lignées cellulaires CHO.

## ***Discussion :***

L'hormone gonadotrope, ou GnRH, est bien existante chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Elle présente une forte conservation avec les GnRHs de mollusques déjà identifiés, tant au niveau protéique, que par la séquence nucléotidique de son précurseur. De manière logique, cette GnRH est plus proche des GnRH identifiées chez les Lophotrochozoaires que de celles de Vertébrés, mais elle présente également des similarités avec l'hormone adipokinétique d'Ecdysozoaires.

La liaison de ce peptide a donc été testée sur les récepteurs orthologues des récepteurs à la GnRH (Rodet *et al.*, 2005 et 2008), mais tout comme pour les tests avec les récepteurs apparentés aux récepteurs NPY, des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés avec la technique d'endocrinologie inverse. En effet, l'APGWamide a lié le récepteur Cg-GnRH-RII, à plusieurs concentrations différentes, lors de tests avec les cellules CHO, ce qui concorde avec les hypothèses émises par Rodet *et al.* (2008). Malheureusement, ces hypothèses n'ont pas pu être confirmées, puisqu'aucun résultat reproductible n'a pu être obtenu. Cependant, ces premiers tests sont encourageants, et incitent à améliorer la technique de pharmacologie inverse sur ces récepteurs d'huître, afin d'obtenir une activation reproductible et dose-dépendante du récepteur Cg-GnRH-RII avec les peptides de *C. gigas* testés. Pour le récepteur Cg-GnRH-R, malgré quelques pics de luminescence traduisant une légère augmentation du calcium intracellulaire, aucun ligand potentiel n'a pu être mis en évidence.

Ces problèmes peuvent avoir différentes causes : depuis quelques années, il a été prouvé qu'une partie des RCPGs ne pouvaient être activés que sous forme de dimères, homo- ou hétérodimères (Jordan et Devi, 1999). Il est également reconnu que ces dimères peuvent être indispensables à la bonne fonctionnalité de ces RCPGs, comme il a été montré pour les récepteurs GABA (Marshall *et al.*, 1999). Il est possible que le récepteur GnRH de *C. gigas* ne puisse ainsi être fonctionnel qu'en présence d'un autre RCPG, formant donc un hétérodimère, ce qui a déjà été montré pour de tels récepteurs d'Invertébrés. En effet, chez l'ascidie *C. intestinalis*, 4 sous-types de récepteurs de type récepteurs à la GnRH ont été mis en évidence. Ces différentes formes ont des caractéristiques différentes, puisque le sous-type Ci-GnRH-R1 lie effectivement les différentes formes de GnRH existant chez cette espèce, alors que le sous-type Ci-GnRH-R4 est resté orphelin. Sakai *et al.* (2008) ont démontré que ce

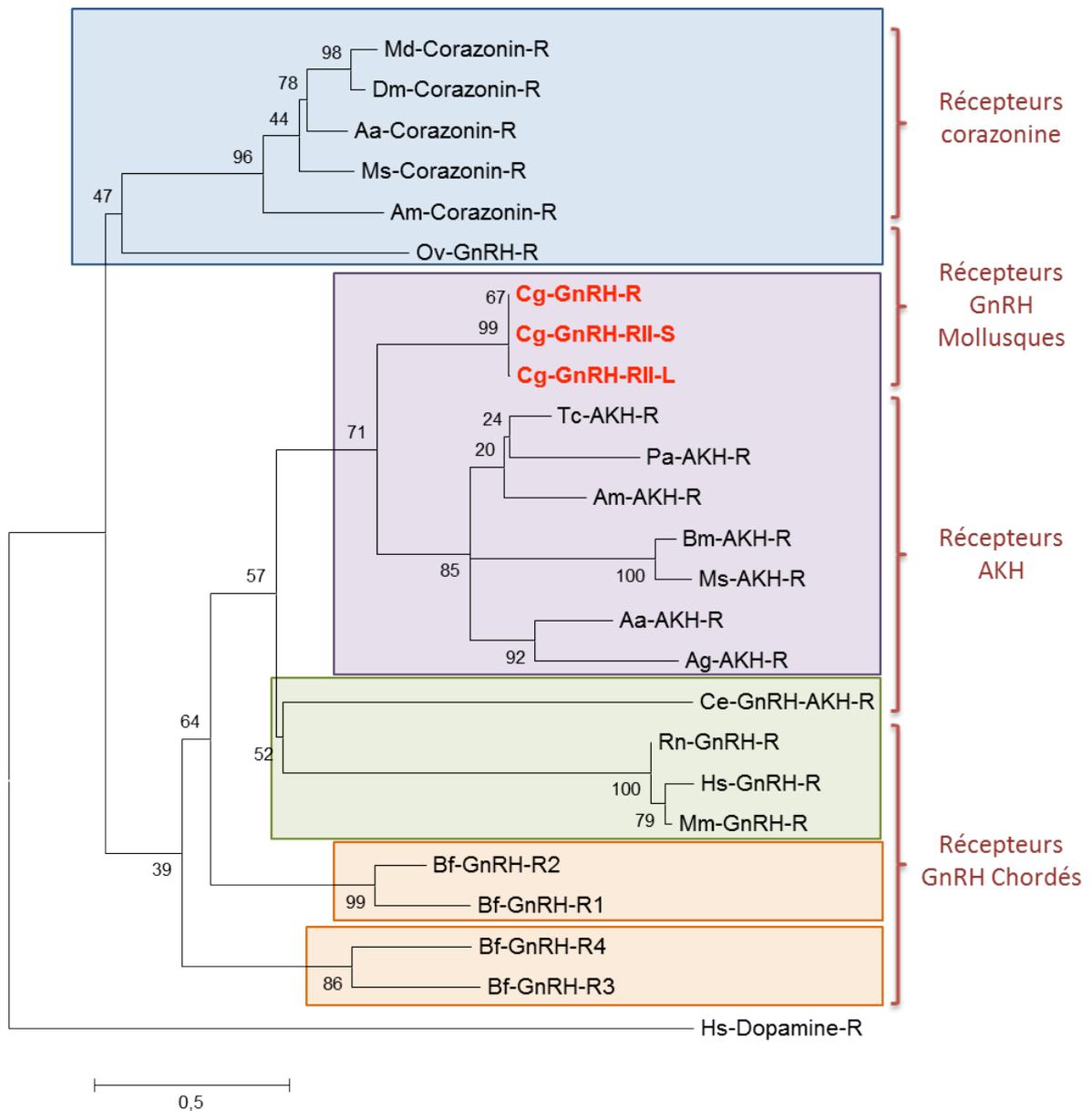
dernier RCPG pouvait se lier au récepteur R1 et en moduler l'activité. La forme R4 de récepteur n'est cependant pas capable de lier les peptides de type GnRHs identifiés chez cette espèce, ni d'augmenter l'affinité du récepteur R1 pour son ligand, mais lorsque ces deux récepteurs sont co-exprimés en système hétérologue, ils peuvent former un dimère qui entraîne une potentialisation de la réponse cellulaire générée par la liaison du récepteur R1 à son ligand (Sakai *et al.*, 2010). Ainsi, la forme R4 n'est pas un récepteur non-fonctionnel, il a un rôle de modulateur endogène de la transduction du signal de la PKC, suite à l'activation du récepteur R1. On peut donc imaginer que le récepteur d'huître Cg-GnRHR ne soit fonctionnel qu'en présence d'un autre RCPG, ou ait un rôle uniquement modulateur sur un autre récepteur au GnRH.

De plus, des problèmes de méthodologie peuvent aussi interférer dans l'obtention de résultats fiables, tout comme pour les tests avec les récepteurs apparentés aux récepteurs NPY. La protéine  $G\alpha_{16}$  ne lie en effet que 80% des récepteurs couplés aux protéines G, ce qui signifie qu'un RCPG sur 5 ne peut pas lier cette protéine et ne peut donc pas activer la voie des phosphoinositols, à l'exception des récepteurs recrutant naturellement la protéine  $G\alpha_q$ . Enfin, il est probable que des problèmes d'adressage de ces récepteurs surviennent lors d'expression en système hétérologue, comme c'est le cas pour ces tests. Ainsi, comme avec les récepteurs de type NPY, il serait judicieux de vérifier la bonne expression et le bon adressage de ces récepteurs à la membrane des cellules de Mammifères, soit par immunocytochimie, à l'aide d'anticorps reconnaissant des « étiquettes » ajoutées en fin de séquence, soit par fluorescence, à l'aide d'une construction RCPG-GFP, qui permettrait la production de protéine GFP (Green Fluorescent Protein) et donc une fluorescence verte dans les cellules, lors de l'expression du RCPG d'huître.

Enfin, différentes formes de récepteurs orthologues des récepteurs de GnRH existent chez *C. gigas*, et seules la forme Cg-GnRH-R et Cg-GnRH-RII courte ont été testées. Ainsi, il est probable que la forme longue de Cg-GnRH-RII soit plus active, ou soit celle qui reconnaît le GnRH ou l'APGWamide. C'est pourquoi il faudrait tester également ces peptides sur cette dernière forme de récepteur. Une forme tronquée de récepteur GnRH a également été mise en évidence chez *C. gigas* (Rodet *et al.*, 2008), et bien qu'il soit peu probable qu'elle puisse être fonctionnelle pour lier un ligand et activer une cascade cellulaire, il est possible qu'elle puisse participer à la régulation des autres récepteurs du même type. En effet, des hypothèses ont été émises sur son rôle potentiel dans l'adressage ou dans la séquestration des autres récepteurs orthologues de récepteurs à la GnRH chez l'huître creuse. Ainsi, des tests de co-transfection

avec cette forme tronquée peuvent également être envisagés, afin de reproduire au mieux les régulations qui peuvent survenir de manière endogène chez *C. gigas*.

Cependant, il est fortement probable que le véritable ligand de ces récepteurs n'ait pas encore été mis en évidence. En effet, les récepteurs mis en évidence par Rodet (2008) sont également très proches des récepteurs AKH. Ces similarités sont en accord avec les résultats de Staubli *et al.* (2002) qui ont découvert la liaison de cette hormone avec les récepteurs de type GnRH de la drosophile et du ver à soie *B. mori*. Ils ont ainsi mis en évidence la similarité structurelle et évolutive entre les récepteurs AKH et les récepteurs GnRH, ce qui suppose une relation étroite entre ces deux types d'hormones. En effet, depuis 2002, d'autres récepteurs d'Ecdysozoaires, orthologues aux récepteurs GnRH, ont montré une liaison avec des hormones de type AKH (Hansen *et al.*, 2006 ; Lindemans *et al.*, 2009). La relation entre les récepteurs GnRH de mollusques et les récepteurs AKH d'insectes remonterait à la base de l'embranchement des chordés, avec l'amphioxus *Branchiostoma floridae*. Cette espèce présente en effet 4 sous-types de récepteurs GnRH différents, qui peuvent être regroupés deux à deux selon une étude phylogénétique (Tello et Sherwood, 2009). Deux de ces récepteurs sont fortement liés aux récepteurs GnRH de Vertébrés, alors que les deux autres sont proches du groupe des récepteurs au GnRH de mollusques et des récepteurs AKH (figure 45). Ainsi, les récepteurs GnRH de Vertébrés et de mollusques auraient divergé à partir de l'embranchement des chordés, et ce dernier type aurait divergé à la base des Ecdysozoaires en liant une neurohormone dont la structure est proche de celle de la GnRH, l'AKH. Parallèlement, un autre récepteur proche du récepteur AKH identifié par Staubli *et al.* (2002) chez la drosophile est activé par la corazonine, d'après les travaux d'endocrinologie inverse effectués par Park *et al.* (2002). Les auteurs soutiennent notamment une hypothèse de co-évolution entre les récepteurs et les ligands AKH et corazonine. En plus de ces similarités entre récepteurs, il existe une relation phylogénétique étroite entre les précurseurs peptidiques de l'AKH d'Ecdysozoaires, de la RCPH de Crustacés et de l'APGWamide de Mollusques (Martinez-Perrez *et al.*, 2002).



**Figure 45 :** Arbre phylogénétique des relations existant entre les séquences des récepteurs à la corazonine, à la GnRH et à l'AKH, construit par la méthode du maximum de vraisemblance, grâce au logiciel Mega5.

Md : *Musca domestica*, Dm : *Drosophila melanogaster*, Aa : *Aedes aegypti*, Ms : *Manduca sexta*, Am : *Apis mellifera*, Ov : *Octopus vulgaris*, Cg : *Crassostrea gigas*, Bm : *Bombyx mori*, Tc : *Tribolium castaneum*, Pa : *Periplaneta americana*, Ag : *Anopheles gambiae*, Ce : *Caenorhabditis elegans*, Bf : *Branchiostoma floridae*, Hs : *Homo sapiens*, Mm : *Mus musculus*, Rn : *Rattus norvegicus*

Les différents groupes phylogénétiques sont encadrés de différentes couleurs : les récepteurs de type corazonine en bleu, les récepteurs de type AKH en violet, les récepteurs liés aux récepteurs de type GnRH de Vertébrés en vert, et les récepteurs de l'Amphioxus, liant à la fois un peptide de type AKH et un peptide de type GnRH, en orange.

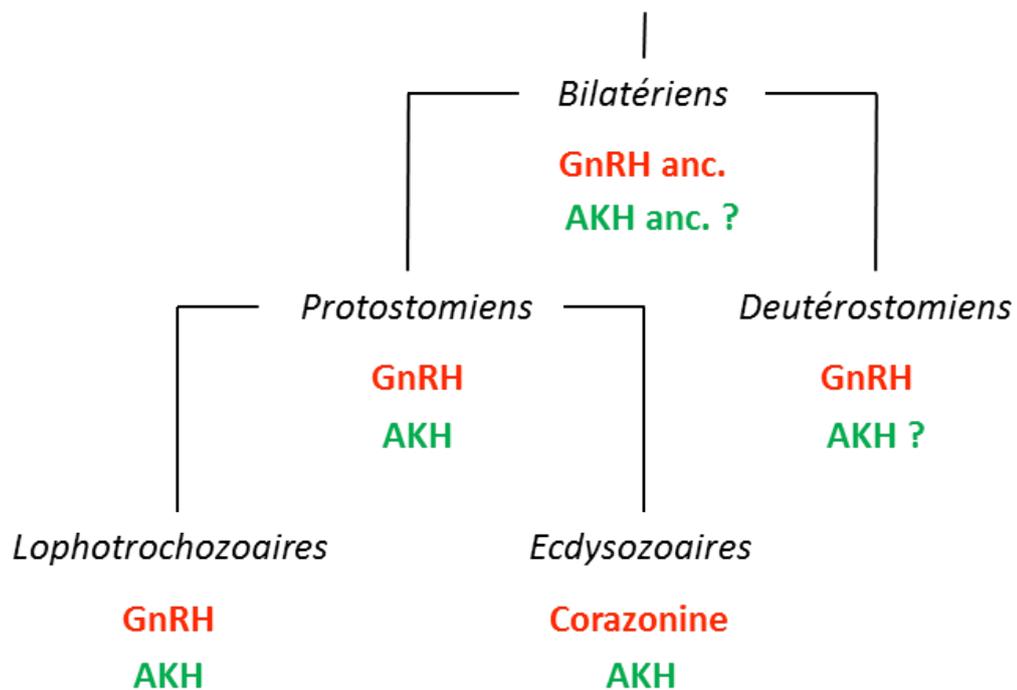
Cette théorie est appuyée notamment par le fait qu'aucun peptide de type AKH n'a été mis en évidence chez les Lophotrochozoaires, et que le GnRH n'a jamais été isolé chez les Ecdysozoaires. Or, dernièrement, un peptide de type AKH a été mis en évidence chez *C. gigas*, en plus du peptide GnRH (Favrel, communication personnelle). La présence de ces

deux types de précurseurs dans le même génome remet ainsi en question la théorie de l'évolution des récepteurs GnRH en récepteurs AKH dans le groupe des Ecdysozoaires. Des peptides homologues de l'AKH ont également été identifiés par Roch *et al.* (2011) dans les génomes des Mollusques *Aplysia californica* et *Lottia gigantea*, ce qui confirme donc la présence d'une voie AKH chez les Lophotrochozoaires. Enfin, d'après l'arbre phylogénétique regroupant les récepteurs des différentes familles GnRH, AKH, et corazonine, les récepteurs GnRH identifiés chez *C. gigas* par Rodet *et al.* (2005 et 2008) apparaissent dans le même groupe que les récepteurs AKH d'Ecdysozoaires (figure 45).

De plus, chez le moustique *Anopheles gambiae*, la structure 3D d'un récepteur à l'AKH identifié par Belmont *et al.* (2006) a été élucidée par Mugumbate *et al.* (2011). Cette structure cristallographique a permis de mettre en évidence la poche de liaison au ligand AKH la plus probable, cette liaison reposant ainsi sur les ponts hydrogène formés entre le ligand et 3 résidus de la séquence protéique du récepteur : une glutamine sur la 2ème boucle extracellulaire (position 209), une tyrosine sur le 6ème segment transmembranaire (position 285) et une lysine sur la 3ème boucle extracellulaire (position 306). De manière intéressante, on retrouve ces résidus sur les mêmes domaines sur la séquence du récepteur Cg-GnRH-R (Gln174, Tyr270 et Lys290) qui permettraient ainsi de former les ponts hydrogène nécessaires à la fixation d'un peptide de type AKH à ce récepteur. Cette conservation des résidus chez cet orthologue de récepteur à la GnRH confirme donc la relation étroite entre les récepteurs GnRH et AKH, et appuie l'hypothèse que ce récepteur pourrait lier l'AKH récemment identifiée chez *C. gigas*.

Contrairement à ces récepteurs de *C. gigas*, le récepteur à la GnRH identifié chez le céphalopode *Octopus vulgaris* semble plus fortement lié au groupe des récepteurs corazonine qu'à celui des récepteurs à l'AKH (figure 45). Il semble donc que les récepteurs d'huître ne fassent pas partie du même groupe phylogénétique que le seul récepteur à la GnRH caractérisé chez les Mollusques. Ce dernier étant proche des récepteurs à la corazonine, qui est un peptide identifié uniquement chez les Ecdysozoaires, un lien étroit entre GnRH de Mollusques et corazonine peut ainsi être établi. Les récepteurs de *C. gigas* étant proches des récepteurs AKH, on peut donc supposer qu'ils soient plus susceptibles de lier l'AKH que la GnRH, ce qui semble se confirmer au vu des tests d'endocrinologie inverse qui suggèrent qu'ils ne seraient pas capables de lier la GnRH. Ainsi, on peut supposer que ce sont des récepteurs à l'AKH, ce qui doit être confirmé par la suite avec de nouveaux tests en présence du peptide de type AKH détecté chez *C. gigas*.

Une nouvelle hypothèse peut alors être émise, remplaçant celle qui suggérait que l'AKH était un équivalent évolutif de la GnRH chez les Ecdysozoaires. La voie AKH semble être conservée chez l'ensemble des Protostomiens, alors que la voie de la GnRH semble présente uniquement chez les Lophotrochozoaires. Chez les Ecdysozoaires, la corazonine, capable de lier également des récepteurs apparentés aux récepteurs GnRH, représenterait ainsi l'équivalent en terme évolutif de la GnRH chez ce groupe (figure 46).



**Figure 46 :** Schéma récapitulatif de l'hypothèse d'apparition des neuro-hormones GnRH, AKH et corazonine au sein des des Bilatériens. La GnRH est conservée chez les Protostomiens comme chez les Deutérostomiens, et posséderait donc un ancêtre commun à l'embranchement des Bilatériens, elle aurait évolué en corazonine chez les Ecdysozoaires. L'AKH serait présente chez l'ensemble des Protostomiens, avec un ancêtre commun potentiel dès l'embranchement des Bilatériens, au vu des récepteurs de type AKH présents chez l'Amphioxus, bien que la présence d'AKH chez les Deutérostomiens n'ait jamais été démontrée.



# *Discussion générale et conclusion*



L'huître creuse *Crassostrea gigas* présente une relation étroite entre reproduction et mise en réserve énergétique (Berthelin *et al.*, 2000), ces deux fonctions suivant chacune un cycle annuel au sein de l'aire gonadique. Ces cycles sont alternés au long de l'année, les réserves en glycogène servant à approvisionner en énergie le tissu gonadique au cours de la gamétogenèse, ce qui a conduit à l'hypothèse d'une balance physiologique régulant le cycle de reproduction de *C. gigas*. Ces fonctions sont par ailleurs étroitement liées chez de nombreux modèles, et sont principalement régulées par le système neuroendocrine. Ainsi, plusieurs familles de neurohormones, ou neuropeptides, participent au contrôle de la mise en réserve, de la prise alimentaire et des processus liés à la reproduction, à la fois chez les Vertébrés et les Invertébrés. Ces familles de neuropeptides sont très diverses, et incluent notamment la famille du neuropeptide Y, ou son homologue chez les Invertébrés, le neuropeptide Y/F.

### **1) Le neuropeptide Y/F et ses récepteurs potentiels chez *C. gigas***

Ce neuropeptide, chez les Vertébrés, est très étudié pour son rôle régulateur le comportement alimentaire : il active la recherche et l'ingestion de nourriture (Gruninger *et al.*, 2007). mais régule négativement les processus liés à la reproduction, en inhibant l'axe hypothalamo-hypophysaire, et en maintenant des niveaux de LH bas (Hill *et al.*, 2002). Le neuropeptide Y/F d'invertébré est également impliqué dans ce type de régulations, puisqu'il joue un rôle dans la prise alimentaire chez la Drosophile, en contrôlant la réponse à la nourriture et le temps de recherche de nourriture (Wu *et al.*, 2003). Il exerce les mêmes régulations également chez les Crustacés, puisque l'injection ou l'administration orale de NPY augmente sensiblement la prise alimentaire chez la crevette (Kiris *et al.*, 2004). Des homologues de ce neuropeptide ont également été identifiés chez les Mollusques, et sont impliqués dans la régulation négative de la reproduction et de la croissance, comme c'est le cas chez la limnée (De Jong-Brink *et al.*, 2001).

Chez l'huître creuse, un tel peptide a été mis en évidence, sa structure présente de fortes similitudes avec les neuropeptides Y/F identifiés chez les Mollusques (la limnée et l'aplysie). Bien qu'il n'ait pas pu être détecté dans sa forme longue par spectrométrie de masse, une forme tronquée a été mise en évidence, de telles formes courtes étant très fréquemment rencontrées chez les Invertébrés (Nässel et Wegener, 2011). En revanche, le

précurseur de ce neuropeptide est exprimé dans divers tissus, bien que majoritairement dans les ganglions viscéraux, qui représentent le siège du système nerveux central. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Stanek *et al.* (2002), qui montrent que le NPY/F du moustique *A. aegypti* est présent dans le cerveau essentiellement, mais que l'on retrouve également des cellules immunoréactives au NPY/F dans le tube digestif des larves et des adultes. De plus, son expression a tendance à croître au fur et à mesure du cycle de gamétogenèse, pour atteindre un maximum en stade 3, lors de la maturité sexuelle des animaux. Cette faible régulation peut tout de même laisser supposer une éventuelle implication de ce neuropeptide dans le cycle annuel de gamétogenèse, ou dans celui qui régule la mobilisation des réserves énergétiques pour soutenir cette maturation sexuelle. Chez le moustique femelle, ce NPY/F voit son taux hémolympatique baisser rapidement après un repas de sang, pour atteindre un pic 24h après (Brown *et al.*, 1994 ; Stanek *et al.*, 2002), les auteurs relient ces fluctuations au stade de l'ovogenèse des femelles étudiées, ce qui appuie une fois de plus le lien étroit entre métabolisme énergétique et reproduction. Ce NPY/F aurait ainsi un rôle inhibiteur sur l'ovogenèse chez *A. aegypti*, puisque son pic apparaît au moment où cette ovogenèse est arrêtée (Stanek *et al.*, 2002). De manière similaire, chez la limnée *L. stagnalis*, le NPY/F a un effet inhibiteur sur la reproduction (De Jong-Brink *et al.*, 2001). Chez l'huître creuse, les régulations transcriptionnelles du précurseur du NPY/F sont faibles au cours du cycle de reproduction, mais une régulation de la quantité de peptide produit par le système nerveux central est possible. Pour la mettre en évidence, des expériences d'immunohistochimie ou de RIA peuvent être envisagées, afin de détecter la quantité de NPY/F aux différents stades de reproduction.

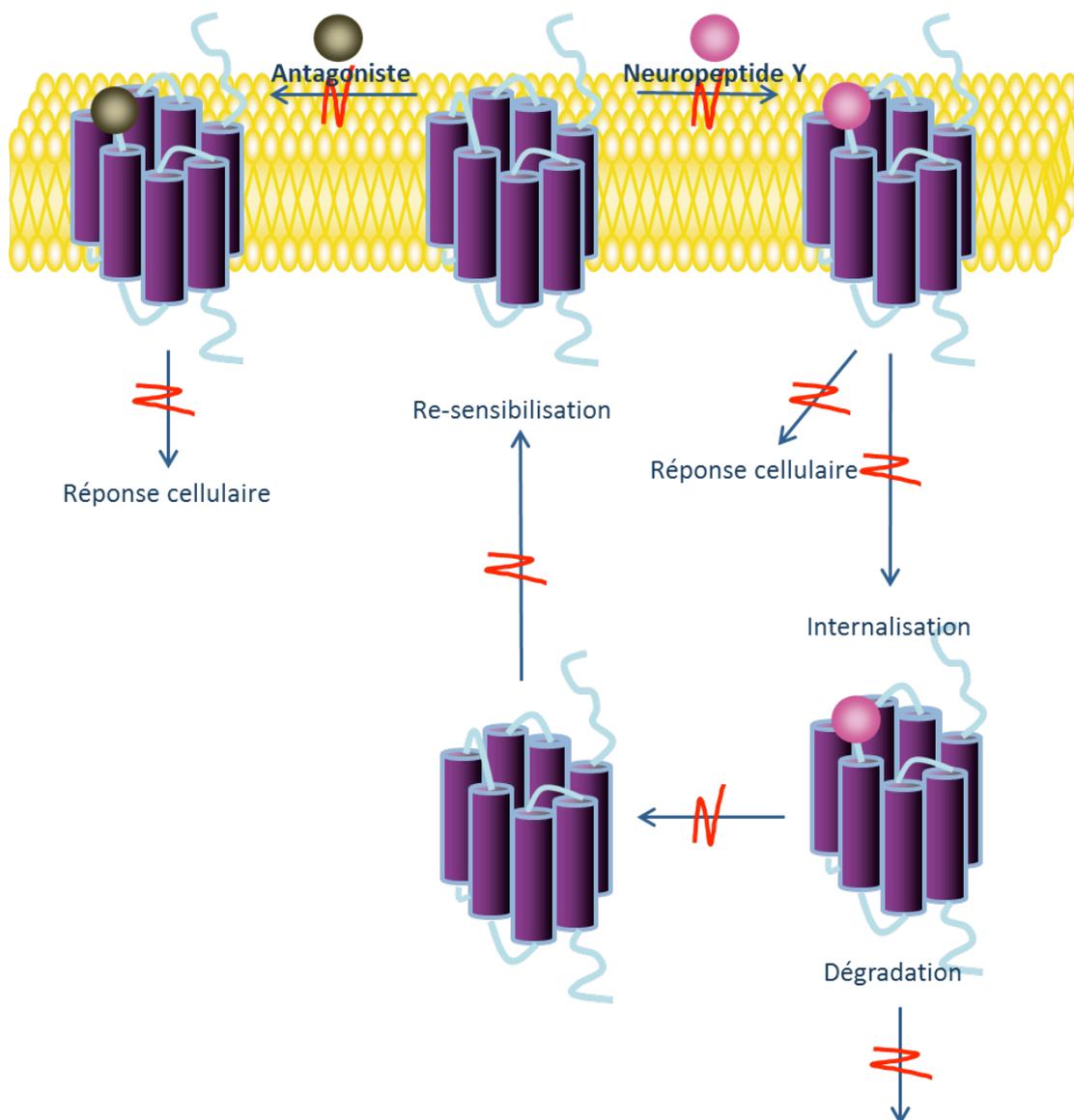
Au vu du rôle tenu par le NPY/F chez certains Invertébrés sur le comportement alimentaire (Gonzalez et Orchard, 2009 ; Nässel et Wegener, 2011), et afin d'en déterminer une éventuelle conservation chez l'huître creuse, des études d'expression ont été menées sur des animaux nourris et à jeun. Elles ont démontré la surexpression du précurseur, donc probablement la surproduction de neuropeptide, lorsque des animaux sont placés à jeun. Cette différence d'expression traduit une réponse de l'organisme face au stress trophique, qui passe par l'activation de la voie du neuropeptide Y/F. Ce processus serait en adéquation avec le rôle qui lui est connu à la fois chez les Vertébrés et chez les Invertébrés. En effet, chez le moustique *A. aegypti*, le NPY/F est capable de réguler le transport transépithélial et la motilité musculaire dans l'estomac des larves, influant ainsi sur la digestion (Onken *et al.*, 2004). Chez le lépidoptère *H. zea*, le NPY/F est détecté dans les cellules endocrines du système

digestif, et atteint une forte concentration durant les stades larvaires pendant lesquels la prise alimentaire est la plus élevée, suggérant ainsi un effet orexigène du neuropeptide, permettant la forte croissance des chenilles (Huang *et al.*, 2011). De la même façon, chez *C. gigas*, la forte expression du précurseur du NPY/F lors d'une baisse de la disponibilité en nourriture dans l'environnement, pourrait permettre une augmentation de la prise alimentaire, c'est-à-dire la filtration de micro-particules, et le stockage énergétique, afin de compenser le manque de nourriture dans le milieu. La fonction orexigène du NPY/F démontrée chez les Vertébrés pourrait ainsi être conservée chez notre modèle, cette fonction étant encore à explorer.

Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences fonctionnelles devraient être mises en place. Tout d'abord, il est envisageable de pratiquer des injections de neuropeptide Y/F sur des huîtres dont la prise de nourriture serait mesurée, comme pratiqué chez la crevette (Kiris *et al.*, 2004), afin de déterminer si celle-ci est influencée par la voie du NPY/F. D'autre part, il est possible de réguler la voie de signalisation du NPY/F en modulant l'activité de ses récepteurs. Une technique a notamment été mise au point récemment chez l'huître creuse par Fabioux *et al.* (2009), pour inhiber l'expression de gènes ciblés, l'interférence d'ARN (RNAi). En effet, par injection d'ARN double brin, l'expression du gène marqueur du développement *vasa* a pu être fortement inhibée, conduisant ainsi à un arrêt ou un blocage des proliférations goniales, allant parfois jusqu'à la stérilité des individus (Fabioux *et al.*, 2009). De la même façon, le rôle fonctionnel du ligand TGF $\beta$  de l'huître a été exploré par Huvet *et al.* (2011), et l'injection d'ARN double brin codant pour une partie de ce facteur a conduit à 77,5% d'inhibition de l'expression du gène *og-TGF $\beta$* , 34 jours après injection, ce qui confirme l'efficacité de la méthode chez l'huître creuse. Ainsi, après identification du ou des récepteur(s) de ce neuropeptide, il est envisagé d'en déterminer les fonctions par inhibition de son expression, et suivi de la gamétogenèse et de la prise alimentaire.

Une autre approche pour déterminer le rôle de la voie NPY/F chez l'huître creuse, est une approche pharmacologique. Compte tenu du fort intérêt médical que suscite la voie de signalisation du neuropeptide Y chez les Vertébrés, plusieurs agents pharmacologiques ont été mis au point afin d'enrayer cette voie et d'identifier ses cibles. En effet, chez les Vertébrés, plusieurs sous-types de récepteurs au NPY ont été identifiés, Y1, Y2, Y4 et Y5, chacun étant impliqué dans des régulations spécifiques, et des molécules agonistes et antagonistes ont été dessinées pour chacun d'entre eux (Walther *et al.*, 2011, pour revue). Mais les récepteurs au neuropeptide Y/F d'Invertébrés forment un groupe phylogénétique distinct des récepteurs au NPY de Vertébrés, et il est donc difficile de les relier à un sous-type de récepteurs de

Vertébrés donné. On peut cependant envisager d'injecter un cocktail d'antagonistes aux différents sous-types de récepteurs NPY, qui devrait pouvoir bloquer les récepteurs au NPY/F. Cependant, des agents pharmacologiques existent chez l'Homme pour différentes étapes de la fixation du ligand, l'activation des voies de signalisation, la dégradation des récepteurs, etc (Walther *et al.*, 2011). Compte-tenu des similitudes entre le NPY et le NPY/F, et entre leurs récepteurs, on peut tout à fait envisager d'utiliser ces agents pour caractériser la voie du NPY/F chez *Crassostrea gigas*, en jouant sur différentes étapes de la signalisation (figure 47).



**Figure 47** : Schématisation des différentes interventions possibles sur le système NPY chez l'Homme, chaque marque rouge représentant les étapes de la vie du récepteur NPY pouvant être régulées par des agents pharmacologiques. Des agonistes ou des antagonistes peuvent moduler à la fois la disponibilité du site de liaison au ligand, et donc la liaison du NPY sur son récepteur, et l'activation de la voie cellulaire par le récepteur du NPY. D'autres agents pharmacologiques permettent d'influer sur la régulation du récepteur : son internalisation et sa dégradation, qui permettent la désensibilisation, et l'adressage à la membrane du récepteur recyclé qui permet la re-sensibilisation du récepteur. D'après Walther *et al.*, 2011.

Les récepteurs du NPY/F appartiennent, comme la plupart des récepteurs aux neuropeptides, à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, ou encore récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Ces domaines nécessitant une conservation des résidus formant les hélices  $\alpha$  qui traversent la membrane plasmique, des motifs conservés de ces récepteurs les rendent facilement identifiables dans les banques de données génomiques. Ils lient des protéines G qui peuvent être de différentes natures, et qui activent donc différentes voies de signalisation cellulaire. Dans le cas du récepteur au NPY de Limnée, son activation conduit à la diminution de taux d'AMP cyclique, ce qui signifie qu'il lie une protéine de type G $\alpha_i$  (Tensen *et al.*, 1998).

Chez *Crassostrea gigas*, aucun récepteur orthologue de récepteurs au NPY/F n'était connu, mais on dispose d'une banque de données génomiques importante, Gigas Database (Fleury *et al.*, 2009). Afin d'identifier des récepteurs potentiels du NPY/F de l'huître, des recherches ont été menées sur cette banque, tout d'abord pour isoler toutes les séquences correspondant à des récepteurs couplés aux protéines G. Parmi ceux-ci, cinq ont montré des similarités avec les récepteurs au NPY/F connus. Après analyse phylogénétique de leur séquence entière, il est apparu que deux d'entre eux semblaient vraiment phylogénétiquement proches des récepteurs NPY/F, mais les études d'expression ont néanmoins porté sur les cinq récepteurs. Ces récepteurs sont globalement exprimés dans les ganglions viscéraux, la glande digestive, et l'aire gonadique. Les ganglions viscéraux représentent le lieu de synthèse principal des neuropeptides, et du neuropeptide Y/F plus particulièrement, ce qui justifie la présence de transcrits de récepteurs aux neuropeptides dans ce tissu. Les profils d'expression des récepteurs sont donc tout à fait concordants avec leur ligand potentiel, le NPY/F. Afin d'obtenir plus d'informations quant à leurs fonctions potentielles, leur expression a été étudiée sous différentes conditions, et il s'avère que plusieurs d'entre eux ont une expression qui diminue au cours du cycle de gamétogenèse, dans l'aire gonadique, et, de manière intéressante, 3 d'entre eux sont surexprimés chez des animaux placés à jeun, comme pour le neuropeptide F. Ces données ont donc renforcé l'hypothèse de leur interaction avec le NPF, et donc de leur implication dans le métabolisme énergétique et/ou les fonctions liées à la reproduction.

Afin de confirmer leur implication dans les processus liés à la reproduction ou à la prise alimentaire, plusieurs tests fonctionnels sont envisageables. Ainsi, des expériences de RNAi sont envisagées pour ces récepteurs, couplées à un suivi de la gamétogenèse par histologie, et à un suivi de la prise alimentaire, c'est-à-dire de la quantité de micro-algues

filtrées. Ces tests pourraient ainsi permettre de déterminer dans quel type de régulation est impliqué plus spécifiquement chacun des cinq récepteurs de neuropeptides identifiés chez *C. gigas*.

Pour mener à bien ces études fonctionnelles, il est donc nécessaire d'identifier le(s) récepteur(s) au neuropeptide F de *C. gigas* avec certitude. Pour parvenir à cette identification, une technique a été développée pour déterminer le(s) ligand(s) de récepteurs couplés aux protéines G orphelins, il s'agit de l'endocrinologie inverse. Cette méthode, qui passe par l'expression du récepteur d'intérêt en cellules de Mammifères, permet de tester différents ligands potentiels sur ce récepteur, et de détecter la fixation de ceux-ci par la mise en évidence de l'activation de voies de signalisation des protéines G. Elle a été mise au point tout d'abord pour identifier les ligands de RCPGs humains, comme cibles thérapeutiques potentielles. Son utilisation a ensuite été étendue à d'autres modèles, notamment chez les Invertébrés. Chez la Limnée *L. stagnalis*, par exemple, un homologue du neuropeptide Y/F a été isolé grâce aux tests effectués sur un récepteur orthologue des récepteurs NPY/F avec des extraits peptidiques de tissu nerveux (Tensen *et al.*, 1998). Ainsi, chez *C. gigas*, des expériences semblables ont été menées sur les cinq récepteurs apparentés aux récepteurs NPY/F préalablement caractérisés, avec le neuropeptide Y/F de la même espèce, et ses formes courtes, mais également avec des peptides appartenant à la même famille des RFamides. Aucun récepteur n'a été activé spécifiquement par le NPY/F ou ses formes courtes. Cependant, les tests ont été répétés plusieurs fois, dans des lignées cellulaires différentes, et avec des méthodes de détection différentes, et certains de ces tests ont donné des résultats prometteurs, mais n'ont pas pu être reproduits par la suite. Ces problèmes techniques peuvent avoir différentes causes : tout d'abord, il faudrait ainsi vérifier la correcte expression de ces récepteurs en système hétérologue, et le bon adressage des récepteurs d'huître dans les cellules de Mammifères, ou la dimérisation possible de ces récepteurs, de manière endogène. De plus, les récepteurs n'ont été identifiés dans la banque de données qu'à partir de similitudes de séquences, ce qui implique que d'autres récepteurs de neuropeptides ont été écartés, bien qu'ils puissent également lier le NPY/F, même s'ils présentent moins d'homologies de séquence avec les récepteurs de NPY. Enfin, les séquences ont été sélectionnées à partir d'une version de Gigas Database ne contenant que 30 000 séquences uniques (Fleury *et al.*, 2009), alors que la dernière version en contient 80 000, et que le génome de cette espèce sera bientôt disponible. Il serait ainsi intéressant de poursuivre les études bio-informatiques afin de mettre en évidence d'éventuelles nouvelles séquences de récepteurs potentiels du NPY/F.

## 2) Identification d'une voie LFRFamide chez l'huître creuse

Ainsi, malgré les problèmes de reproductibilité, il semble qu'elle soit tout de même efficace avec les RCPGs de l'huître creuse, puisque l'un d'eux a pu être « désorphanisé ». En effet, le récepteur qui semblait le plus proche phylogénétiquement des récepteurs au neuropeptide Y/F a été activé par deux peptides synthétiques déduits d'un précurseur présent dans la banque d'ESTs Gigas Database. Les deux peptides qui lient spécifiquement ce récepteur sont les suivants : GALFRFamide et GSLFRFamide. Ils appartiennent tous deux à la famille des LFRFamides, famille de neuropeptides peu étudiée, mais dont certains membres ont déjà été caractérisés chez les Mollusques. Ils ont été mis en évidence chez l'aplysie (Cropper *et al.*, 1994), l'escargot *Helix aspersa* (Chen *et al.*, 1995), la limnée (Hoek *et al.*, 2005), la seiche *S. officinalis* (Zatylny-Gaudin *et al.*, 2010) et le gastéropode *Lottia gigantea* (Veenstra *et al.*, 2010). De manière intéressante, aucune identification d'un peptide de cette famille n'a été rapportée dans la littérature, hormis chez les Mollusques. Il semble ainsi que ces peptides soient spécifiques des Lophotrochozoaires. Ce sont des neuropeptides largement répandus dans le système nerveux, qui agissent sur les contractions musculaires, notamment les contractions rectales de la seiche, suggérant un rôle régulateur dans le comportement alimentaire. Chez la limnée, un tel peptide a été mis en évidence grâce à sa sur-régulation lors de parasitisme, et il inhibe les cellules neuro-endocrines qui contrôlent la croissance, le métabolisme et la reproduction. De manière intéressante, le NPY/F de limnée a également été identifié grâce à sa régulation différentielle en fonction de l'état de parasitisme des animaux, puisqu'il est surexprimé chez les animaux parasités. C'est ainsi que des injections de ce neuropeptide ont pu être réalisées, et ont montré que le NPY/F de limnée est capable de diminuer la quantité d'œufs produits et d'augmenter la prise alimentaire (De Jong-Brink *et al.*, 1999). Ainsi, les deux voies NPY/F et LFRFamide semblent liées chez la Limnée pour leur rôle dans le métabolisme énergétique lors de la parasitisation des animaux. Chez *C. gigas*, un lien entre ces deux voies semble également envisageable, puisque le récepteur qui apparaît lier les peptides de type LFRFamide est phylogénétiquement lié aux récepteurs du (s)NPY/F. De plus, bien que le récepteur caractérisé ne soit pas un récepteur au NPY/F, il semblerait qu'il puisse être tout de même impliqué dans le métabolisme énergétique, en liant des peptides de type LFRFamide. Cependant, le précurseur de ces peptides n'est pas exprimé de manière différentielle lors d'un conditionnement trophique, contrairement à son récepteur, qui montre une expression plus importante quand les animaux sont placés à jeun. Ainsi, il semblerait que cette voie soit impliquée dans le contrôle du métabolisme énergétique, par le

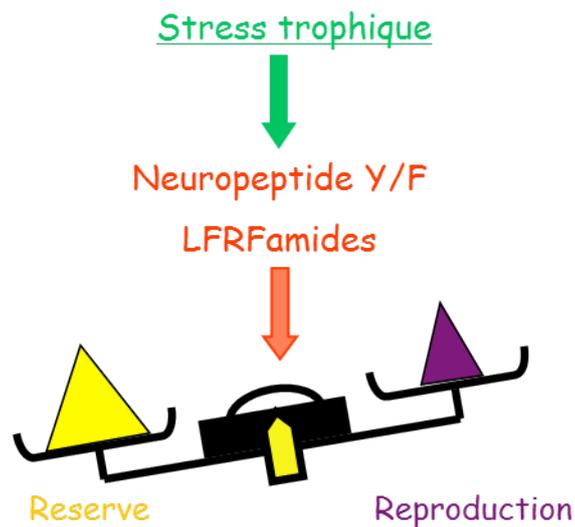
biais d'une régulation du récepteur et non des neuropeptides qu'il lie. D'après l'expression de ce récepteur, il est susceptible d'influer positivement sur la prise alimentaire et/ou la mise en réserve énergétique dans le but de compenser un stress dû au manque de nourriture. Etant donné que son expression diminue dans l'aire gonadique au cours du cycle de reproduction, il est envisageable qu'il soit exprimé dans les cellules qui stockent le glycogène, puisque ce tissu de réserve voit son volume diminuer au cours du cycle annuel de gamétogenèse. Cette hypothèse est à confirmer, soit par hybridation *in situ*, soit par analyse de l'expression dans les tubules gonadiques et le tissu de réserve séparés par microdissection laser.

L'implication de cette voie LFRFamide dans le métabolisme énergétique de l'huître creuse en fait une bonne candidate pour aider à la compréhension des processus physiologiques conduisant aux surmortalités estivales de cette espèce. En effet, il a été prouvé que le métabolisme énergétique, et notamment la disponibilité en nourriture dans le milieu, ainsi que l'activité glycogène-synthase, est un facteur clé dans la sensibilité ou la résistance des huîtres aux surmortalités estivales (Bacca *et al.*, 2005 ; Soletchnik *et al.*, 2006 ; Samain et McCombie, 2007). Ainsi, la régulation de l'expression du récepteur LFRFamide en fonction des conditions trophiques relie cette voie directement aux processus impliqués dans ces mortalités. Pour confirmer l'implication de cette voie à la fois dans le métabolisme, mais aussi par conséquence dans les mortalités estivales, des tests fonctionnels sont nécessaires. Comme pour la voie NPY, il est envisageable d'inhiber la voie LFRFamide par RNAi sur le récepteur caractérisé, afin de mesurer la prise alimentaire ou le gain de poids des organismes ainsi modifiés, et de déterminer l'implication de cette voie dans le comportement alimentaire et/ou le métabolisme énergétique.

Ainsi, il semble que les neuropeptides appartenant à la famille des RFamides (incluant à la fois le NPY/F et les LFRFamides) soient fortement impliqués dans le métabolisme énergétique, ce qui en fait de bons candidats pour répondre à la problématique de cette thèse. D'une part, le neuropeptide Y/F est régulé en fonction du niveau trophique, suggérant un rôle dans la régulation dans la réponse au stress trophique, bien que son récepteur n'ait malheureusement pas pu être identifié jusqu'à présent. D'autre part, une nouvelle voie, celle des LFRFamides, a été mise en évidence, par identification du récepteur de ces neuropeptides, grâce à l'endocrinologie inverse. Ce récepteur est également régulé en fonction du niveau trophique, et pourrait donc être responsable d'une implication de toute cette voie dans le contrôle du métabolisme énergétique. Etant donné l'équilibre existant chez cette espèce entre réserves énergétiques et reproduction, il est supposé que ces RFamides influeraient sur la

balance énergétique contrôlant ces deux fonctions. Les deux voies RFamide permettraient ainsi d'augmenter la prise alimentaire et/ou la mise en réserve, au détriment de la reproduction, lors de conditions trophiques défavorables (figure 48).

### Régulation de la balance physiologique réserve/reproduction par les RFamides



**Figure 48 :** Schématisation de l'influence possible des peptides de type RFamides caractérisés chez l'huître creuse sur la balance physiologique régulant l'équilibre entre mise en réserve énergétiques et fonctions liées à la reproduction chez *C. gigas*. Suite à un stress trophique, les peptides NPY/F et LRFamides sont ainsi susceptibles de favoriser la mise en réserve énergétique au détriment de la reproduction lors de carences nutritionnelles.

Cependant, ces peptides RFamide ne sont pas les seuls régulateurs neuroendocrines du métabolisme et/ou des fonctions liées à la reproduction, l'étude des autres facteurs endocrines impliqués dans ces fonctions était ainsi nécessaire pour les caractériser de manière plus exhaustive. Parmi ces autres neuropeptides régulateurs, la famille la plus étudiée est celle de la GnRH (Gonadotropin Releasing-Hormone).

### 3) Caractérisation de la signalisation GnRH de *C. gigas*

Ce peptide a été étudié essentiellement chez les Vertébrés pour son rôle indispensable dans la fonction de reproduction. En effet, il contrôle entre autres l'axe hypothalamo-hypophysaire qui conduit à la libération des hormones stéroïdes sexuelles, et donc à la gamétogenèse, ainsi qu'au dimorphisme sexuel. Chez les prostostomiens, la GnRH n'a été

mise en évidence que chez les Lophotrochozoaires, et pas chez les Ecdysozoaires. Cependant, des récepteurs de type GnRH ont été mis en évidence chez ces derniers, et il se trouve qu'ils lient l'AKH (Adipokinetic Hormone) ou la corazonine, neuropeptides intervenant dans la mobilisation des réserves énergétiques et le métabolisme énergétique (Gäde *et al.*, 1994 ; Veenstra, 2009). De la même façon, ces hormones ont été caractérisées exclusivement chez les Ecdysozoaires jusqu'à présent. Chez l'huître creuse, un gène codant un récepteur orthologue des récepteurs GnRH a été mis en évidence (Rodet *et al.*, 2005), mais aucun peptide homologue de la GnRH n'a été mis en évidence. Ce gène permet la synthèse de différents sous-types de récepteurs, par épissage alternatif (Rodet *et al.*, 2008). Les auteurs ont supposé que ces récepteurs pouvaient lier des ligands différents, compte tenu de leur différence de séquences, mais également de leurs profils d'expression très contrastés. Ainsi, d'après Rodet *et al.* (2008), le 2ème sous-type serait susceptible de lier un autre membre de la famille des GnRH/AKH, l'APGWamide. Ce térapeptide, spécifique des Mollusques et présent chez l'huître creuse, a été rapproché de cette famille pour sa similarité de structure avec la partie C-terminale de l'AKH, mais aucune liaison à un récepteur n'a pu être mise en évidence jusqu'à présent. Afin de caractériser la voie GnRH et son éventuelle implication dans la reproduction ou la mise en réserve chez *C. gigas*, l'identification du ou des ligand(s) de ces récepteurs était nécessaire ; il a donc fallu mettre en évidence un peptide de type GnRH chez notre modèle.

Un tel peptide a été isolé et séquencé par spectrométrie de masse, sa séquence est la suivante : pQNYHFNSNGWQP-NH<sub>2</sub>. Cette séquence montre de grandes similitudes avec les autres GnRHs de Mollusques identifiées, ce qui suggère une forte conservation de cette voie. De manière attendue, le précurseur de ce peptide est exprimé essentiellement au niveau du système nerveux central, dans les ganglions viscéraux, qui représentent donc le lieu de synthèse de la GnRH. Pour déterminer les organes cibles de ce peptide, une détection par spectrométrie de masse a été menée dans les différents organes adultes, mais la GnRH mature n'a pu être mise en évidence que dans les ganglions viscéraux. Compte tenu de l'expression des différents récepteurs GnRH (dans la gonade pour le 1er sous-type, dans divers tissus périphériques pour le second), il semble improbable que la GnRH ne soit présente que dans les ganglions viscéraux. Cependant, il est possible qu'elle soit présente en trop faible quantité dans d'autres tissus, et demeure ainsi indétectable par spectrométrie. Cette faible concentration impliquerait une libération probable de ce neuropeptide dans la circulation générale, ce qui expliquerait sa forte dilution dans l'organisme. Chez le céphalopode *Octopus*

*vulgaris*, la GnRH serait considérée à la fois comme un neurorégulateur, et comme une neurohormone (Iwakoshi *et al.*, 2002). Par ailleurs, chez cette même espèce, la GnRH semble impliquée dans la reproduction, puisqu'elle est capable d'induire une augmentation de la libération de LH sur des cellules pituitaires en culture (Iwakoshi *et al.*, 2002). Chez l'aplysie, un des tissus cibles de la GnRH, les neurones des « bag cells », est responsable de la libération de l'hormone de ponte ELH, et donc de la ponte et de certains comportements reproducteurs, ce qui relie directement la GnRH et la régulation de la reproduction de ce modèle (Zhang *et al.*, 2008). Cependant, au vu de la large distribution de ce neuropeptide dans le système nerveux central et les tissus périphériques, la GnRH n'est certainement pas limitée à la régulation de la reproduction. La GnRH d'*Octopus vulgaris* a aussi un rôle cardio-excitateur (Iwakoshi-Ukena *et al.*, 2004), renforçant l'hypothèse que la GnRH serait un neuropeptide généraliste chez les Invertébrés, contrairement à sa haute spécialisation en tant qu'activateur de la reproduction chez les Vertébrés. Ainsi le rôle essentiel de la GnRH sur le contrôle de la reproduction reste encore controversé chez les Mollusques : d'après Kanda *et al.* (2006), elle activerait la stéroïdogénèse, alors que Tsai *et al.* (2010) ont montré qu'elle avait un rôle minime sur l'activation de la reproduction. Bien que la GnRH soit probablement impliquée dans la régulation de la reproduction de *C. gigas*, il est possible qu'elle représente un neuromodulateur bien plus généraliste, même si sa présence n'a pas pu être mise en évidence dans des tissus autres que les ganglions viscéraux.

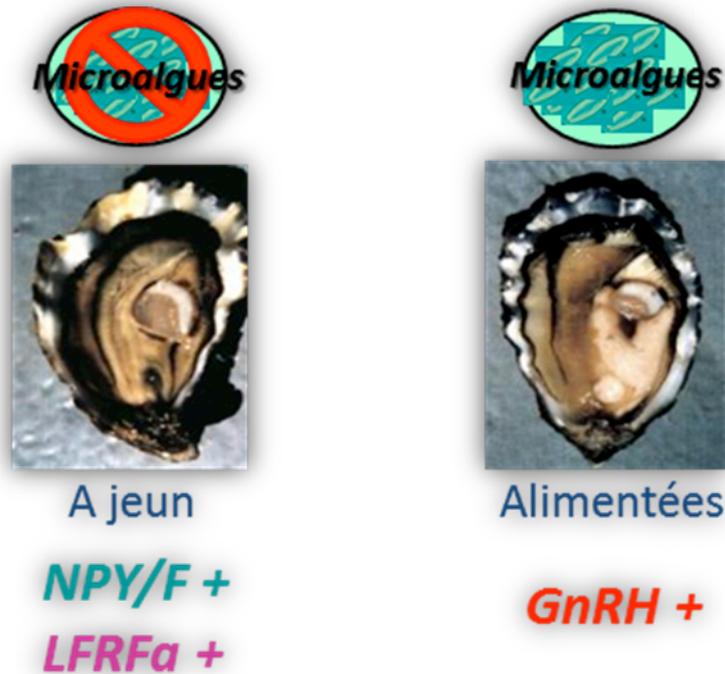
Ainsi, pour caractériser plus finement la voie de la GnRH, des expériences d'endocrinologie inverse ont été menées afin d'étudier la liaison de ce peptide aux récepteurs mis en évidence par Rodet *et al.* (2005 et 2008). En parallèle, et d'après les hypothèses émises par les auteurs, les peptides déduits du précurseur de type APGWamide de l'huître ont également été testés sur ces récepteurs. Malheureusement, aucun test n'a permis d'aboutir à un résultat fiable pour le moment, bien que quelques résultats préliminaires aient confirmé en premier lieu l'hypothèse d'une liaison de l'APGWamide sur le récepteur de type II, celle-ci n'a pas pu être confirmée ultérieurement. Tout comme pour les récepteurs de type NPY, des mises au point sont probablement nécessaires pour obtenir des résultats plus fiables. De plus, tous les sous-types de récepteurs orthologues au récepteur GnRH n'ont pas été clonés, il serait donc intéressant de tous les tester, avec les ligands GnRH et APGWamide. Enfin, un précurseur de type AKH a été récemment détecté chez l'huître creuse (Favrel, communication personnelle), ce qui remettrait en cause l'hypothèse actuelle qui considère que l'AKH serait une sorte d'équivalent évolutif de la GnRH chez les Ecdysozoaires. Par ailleurs, Roch *et al.*

(2011) ont déjà soulevé la question de la présence d'AKH chez les Mollusques, en découvrant deux décapeptides très proches des AKHs, codés par le génome de l'aplysie et de la patelle.

Afin d'étudier la relation entre les voies GnRH et AKH chez l'huître creuse, une étude phylogénétique a été menée sur les récepteurs orthologues aux récepteurs GnRH mis en évidence chez les Mollusques *C. gigas* (Rodet *et al.*, 2005) et *O. vulgaris* (Kanda *et al.*, 2006). Cette étude montre que les récepteurs de ces deux espèces n'appartiennent apparemment pas au même groupe phylogénétique, malgré leur ressemblance avec la même famille de récepteurs de la GnRH ; il semblerait que le récepteur à la GnRH d'*O. vulgaris* appartienne à la famille des récepteurs corazonine d'Ecdysozoaires, alors que les récepteurs de *C. gigas* sont plus proches des récepteurs AKH. Or, le récepteur GnRH d'*Octopus* est le seul récepteur à la GnRH qui ait été caractérisé chez un Mollusque, alors que les récepteurs de *C. gigas* ne semblent pas lier la GnRH mise en évidence chez cette même espèce. D'après ces résultats, et la présence du peptide AKH chez plusieurs espèces de Mollusques, on peut supposer que l'équivalent évolutif de la GnRH chez les Ecdysozoaires serait représenté par la famille de la corazonine, alors que l'AKH serait une voie parallèle de régulation du métabolisme, présente chez l'ensemble des Protostomiens. Ainsi, afin de mettre en évidence une éventuelle voie conservée de l'AKH et de la GnRH chez *C. gigas*, il est envisagé de tester également le peptide déduit de ce précurseur de type AKH sur les différents sous-types de récepteurs GnRH. Si les deux voies co-existent bien en parallèle chez cet organisme, elles pourraient représenter des régulateurs clés du métabolisme énergétique et de la reproduction, qui sont les deux fonctions qui leur sont largement associées, et ainsi peser également sur la balance physiologique réserve/reproduction.

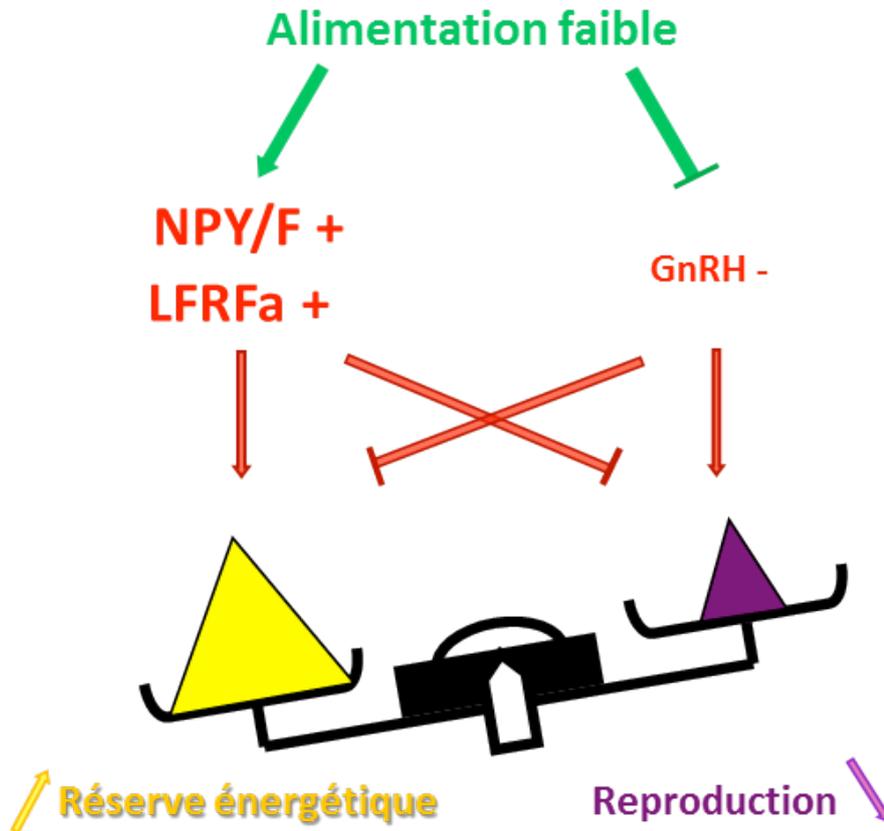
#### **4) Régulation neuro-endocrine de la reproduction et du métabolisme énergétique chez *C. gigas***

Ainsi, grâce à ces travaux, différents facteurs régulateurs physiologiques ont pu être mis en évidence et caractérisés chez l'huître creuse *C. gigas*. Les voies de signalisation de ces différents neuropeptides sont régulées en fonction de la disponibilité en nourriture dans le milieu (figure 49). Alors que les RFamides sont plus exprimés chez des animaux placés à jeun, la GnRH montre une expression plus importante chez les animaux alimentés en microalgues, suggérant ainsi un rôle opposé à celui des RFamides sur la balance physiologique réserve/reproduction.



**Figure 49 :** Expression différentielle des différents facteurs neuroendocrines (NPY/F, LRFamides et GnRH) en fonction de la disponibilité en nourriture dans le milieu, chez des individus *C. gigas* adultes.

De manière intéressante, chez les Vertébrés, il a été prouvé que la libération et l'activité de la GnRH sont dépendantes du statut nutritionnel des individus, la restriction en nourriture inhibant la libération de GnRH (Temple *et al.*, 2003). Ainsi, il semble que cette régulation soit conservée chez les Lophotrochozoaires, puisque le précurseur de la GnRH est moins fortement exprimé chez les animaux en restriction alimentaire. Sachant que la GnRH favorise les comportements et processus liés à la reproduction, cette régulation pourrait permettre de n'activer la reproduction que lorsque les conditions trophiques sont favorables. Ainsi, lors d'un stress trophique, les peptides de type RFamide seraient surexprimés pour favoriser la filtration et la mise en réserve énergétique, alors que la GnRH serait moins exprimée, afin d'inhiber la reproduction chez l'huître creuse. Ainsi, lors d'un manque de nourriture, la faible production de GnRH cumulée à la plus forte expression des voies RFamides conduiraient à une augmentation de la prise alimentaire et/ou de la mise en réserve énergétique couplée à une diminution de la fonction de reproduction (figure 50).



**Figure 50 :** Schéma de la régulation neuroendocrinne de la balance physiologique régulant la mise en réserve et la reproduction lors d'un stress trophique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, implication des neuropeptides de type LFRFamide, NPY/F et GnRH. Quand les conditions trophiques sont défavorables, la GnRH est peu exprimée, alors que les voies NPY/F et LFRFamide sont plus exprimées, conduisant à une inhibition des processus liés à la reproduction et à une activation de la prise alimentaire et/ou la mise en réserve de glycogène, afin d'augmenter les réserves énergétiques.

Ces différents facteurs semblent donc influencer la balance entre mise en réserve énergétique et reproduction, et viennent s'ajouter à la voie insuline dont le rôle a déjà été démontré dans la régulation de ces fonctions physiologiques essentielles (Jouaux, 2010). De nouvelles voies neuroendocrines ont ainsi été mises en évidence et caractérisées chez *C. gigas*. Elles représentent de bonnes candidates comme régulatrices de cette balance physiologique, et sont donc potentiellement impliquées dans la sensibilité ou la résistance aux surmortalités estivales touchant l'huître creuse.

# *Annexes*



## I. Séquence traduite du précurseur du neuropeptide F

1	GAA GAA CTT TAC ATT TCC CGA AAA ACG GAA CAT	ATG AAC GGT ATT	45
		<u>M N G I</u>	4
46	ATG CAA ACG TCC TCC <b>CTT TTG GCC GTG TTA CTG GTG</b> ACC CTG CTT	90	
5	<u>M Q T S S L L A V L L V T L L</u>	19	
91	TCA GTA TGG ACT GTG TTG GGC AAT GAC TCT CTC CTA CCC CCC <b>AAC</b>	135	
20	<u>S V W T V L G</u> <b>N D S L L P P N</b>	34	
136	<b>AGA CCC TCT CGC TTC AGC</b> AGC CCG GGA CAG CTC CGA CAA TAC CTG	180	
35	<b>R P S R F S S P G Q L R Q Y L</b>	49	
181	AAA GCT CTC AAT GAT TAC TAT GCC ATC GTT GGA CGG CCG AGA TTT	225	
50	<b>K A L N D Y Y A I V G R P R F</b>	64	
226	GGG AAA AGG GAT AGC GAA TTT TCT TCA TAT GGA CAA GAA CCT CGA	270	
65	<b>G</b> <b>K R</b> D S E F S S Y G Q E P R	79	
271	TCA GAC GGA ATT CTT TCG AGC AGT CGA GAC AGA GAG GAT TTT GCG	315	
80	S D G I L S S S R D R E D F A	94	
316	GGA CCA CAA TGG TGG TAG CGA CTC ATC TCA TCA TCA TTT TTG TTC	360	
95	G P Q W W *		
361	TCT CTG ATT TGC ATA TTG GTG ATG GTT ATT GAA ATA AAA CAC GAA	405	
406	AAC CTT AAA TCA TAA TCA ATA TTC ATC AAT GTA AAT TTT ACG ATT	450	
451	AGA CAG CTA TTT ACA AAG TGT TAC TGT AAA AAC ATT ATA GTT TCA	495	
496	TGA TTT AAT GTA ATA TAT TTT TGT TTT CGT CAA GGA AAA AAA TTG	540	
541	GTG TGT CAT TTA TGC ACT TGT CTG TTT AAT TCT TTA TGA GGA CTT	585	
586	AAA CCT GTT CAT TTT GTT CAA TCA GGG TTG AGT TTG AAC TTT AAA	630	
631	TAA AAT TTA ATT ATT ATT	648	

**Annexe I :** Séquence du précurseur du neuropeptide F/Y de *C. gigas*, présent dans la banque d'EST (CU983945.1), et sa traduction en séquence protéique, générée grâce au logiciel BioEdit. L'ORF supposé, du premier résidu Met au premier codon STOP (représenté par \*), est représenté en gras, le peptide signal est constitué des résidus d'acides aminés soulignés, et la séquence peptidique du NPY est surlignée en jaune. Le site d'amidation du neuropeptide est encadré en vert, et le site de clivage après le peptide est encadré en bleu. Enfin, les amorces ayant servi aux expériences de PCR quantitative sont représentées par les nucléotides rouges.

## II. Séquence traduite du récepteur A4

1	ATG TGG ACA CAG AAC TGT ACC AGT GTC ATT GGT CAA CAA GTG TTT	45
1	M W T Q N C T S V I G Q Q V F	15
46	ACA CAC GTG GAC TCC AGT CTC CTC GCC ATC ACA GAC GGC GCA CCA	90
16	T H V D S S L L A I T D G A P	30
91	TTA AAA CCG ATT CCA TTC GTG GAA ATC ATC CTC AAA GTA TTT TTC	135
31	L K P I P F V E I I L K <b>V F F</b>	45
136	TAC CTA CTT GTT TTC TTA CTA GAC ATC ATT GGA AAT TCG ATC GTA	180
46	<b>Y L L V F L L D I I G N S I V</b>	60
181	GTT TTC ATC ATT TAT GCC AAC AAG CGC ATG CGT ACT TCG GCG AAC	225
61	<b>V F I I Y</b> A N K R M R T S A N	75
226	ATT CTG ATC GTG AAT CTG ACA ATA TCC GAC ATT CTG GTT GGT TGT	270
76	<b>I L I V N L T I S D I L V G C</b>	90
271	TTT TGT ATG TGG GTT CAC CTT GGT AAC CAG ATC ACA CAC AAT TGG	315
91	<b>F C M W V H L G</b> N Q I T H N W	105
316	CCG TTC GGA GCG TTC CTC TGC AAA TTT GAG ACC TTT GTA CAA GTG	360
106	P F G A F L C K F E T F <b>V Q V</b>	120
361	GTA GCA GTA ATC TCC AGT GTG GTG ACT CTT ACC TCT CTG TCC ATA	405
121	<b>V A V I S S V V T L T S L S I</b>	135
406	GAA AGA TTC CTC ATT GTG ATG TTT CCA ATG AAA GGC AGA CTT TCT	450
136	<b>E R F L I</b> V M F P M K G R L S	150
451	AAA AAC TTG TTA ACC TTC TTA GTA GTC TTC TCC TGG GTC GCT GCC	495
151	K N <b>L L T F L V V F S W V A A</b>	165
496	ATA GGA ACG AGC GCG CCA AAT CTG ACA GTG AGA CAA AAA CTC GAA	540
166	<b>I G T S A P N L T V</b> R Q K L E	180
541	ATC CAA TGG AGG AAT CGT AAA GAC GTG TGG TGT GAC GAG ATT TGG	585
181	I Q W R N R K D V W C D E I W	195
586	CCG AGA TTT TAC ACG GAT ACG AGG TGT AAT TCG GAC CAG CCC GGA	630
196	P R F Y T D T R C N S D Q P G	210
631	CGG AGA AGT TAT TAC GTT TTT TTG TCT GTT TTT ATG TAC TTT ATC	675
211	R R S Y <b>Y V F L S V F M Y F I</b>	225
676	CCT ATC ACG GTG ATG ATG TTG GCC TAT GGA CTC ATA GGC GTG AGG	720
226	<b>P I T V M M L A Y G L I</b> G V R	240
721	TTA TTC CGG CGT CAG ATG CCT GGT AAC GGG GTC ACT GCT GTC AAC	765
241	L F R R Q M P G N G V T A V N	255
766	GAC GTG CAT GGC AAC GCT AGG AAA AAG GTG ATG AGG ATG TTT GTG	810
256	D V H G N A R K K V M R M <b>F V</b>	270
811	<b>GTG GTT CTA ACC GCC TTC ATC</b> GTC TGC TGG ACT CCA CAA CAA ATC	855
271	<b>V V L T A F I V C W T P Q Q I</b>	285

```

856   CTG ATT CTG TAC AGA GTG TAC AGG GAC GAA CAA AAA CAG GTT CCG   900
286   L I L Y R V Y R D E Q K Q V P   300

901   TAT TAC CTC AAA GAC CTC CAG TAT GCG GCC CTG TTC GTG GCG TAC   945
301   Y Y L K D L Q Y A A L F V A Y   315

946   AGT AAC AGC GCA ATC AAT CCA ATC ATA TAC GCT GGG ATG AGT CAG   990
316   S N S A I N P I I Y A G M S Q   330

991   AAA TTC AGA AAA GGG TTC CAC GAC GCC ATG CGG TCC TCA AAC ATG   1035
331   K F R K G F H D A M R S S N M   345

1036  CGC AAG AAA CAA AAT CAG CTG CTC TGA   1062
346   R K K Q N Q L L *

```

**Annexe II :** Séquence récepteur A4 de *C. gigas*, et sa traduction en séquence protéique, générée grâce au logiciel BioEdit, selon l'ORF supposé, du premier résidu Met au premier codon STOP (représenté par \*). Les domaines transmembranaires sont surlignés en jaune et les amorces ayant servi aux expériences de PCR quantitative sont situées dans la séquence nucléotidique au niveau des nucléotides rouges.

### III.Séquence traduite du récepteur D1

1	ATG TCG GAG TGC TTT TCG TGG ATT AAA ACT AAA TAC GGC TTG AAC	45
1	M S E C F S W I K T K Y G L N	15
46	GCG AAT TCC ACG ATG TCG GAT GTG AAT TTG GCA TTC AGG GAC TGG	90
16	A N S T M S D V N L A F R D W	30
91	AAT ATG GGT GCC CTA GTT CTC ATC AGT GTC ATC ATT TTG CCT GGC	135
31	N M G A L V L I S V I I L P G	45
136	ATT CTG GGA AAC TCT CTG GTG ATG GCG ATT TTT TAC AGG GAG TTC	180
46	I L G N S L V M A I F Y R E F	60
181	AAG AAG TCC GCG TAC AGA ACG TTT GTC CTG TGG CTC GCA GTG TTA	225
61	K K S A Y R T F V L W L A V L	75
226	GAT ATC GCC GGG TGT CTT CTA GTA ATG CCG TAC CTC TTG GTC AAT	270
76	D I A G C L L V M P Y L L V N	90
271	<b>ATC GTG ACC CCA GTA TCC ATG</b> GAC AAC GAG GTC GTC TGT AAA GTG	315
91	I V T P V S M D N E V V C K V	105
316	GGA AGA TTT TTA TCC TAC GTC ATC ATG ATG ACG TCA CAT <b>TTT ATT</b>	360
106	G R F L S Y V I M M T S H F I	120
361	<b>CTG GTC GTT ATT GCG GTG</b> GAC AGG TAT CGT AAA ATT TGT AAG CCA	405
121	L V V I A V D R Y R K I C K P	135
406	CAT TCT TTT CAA ATT GCG CAA TCG CAG ACA TCA CGC TGT TGT TTG	450
136	H S F Q I A Q S Q T S R C C L	150
451	GGA ATG TTA ATT TTC TCA TTA ATT CTT TCC ATT CCC GCG GTT ATT	495
151	G M L I F S L I L S I P A V I	165
496	CTG TAT GGG AAC AGT AGT CTG GAT ATA GGG ATT CCG GGA TTA AAG	540
166	L Y G N S S L D I G I P G L K	180
541	GCC ACT CGG TGT TTC ACG GCG GAT AAA TAC AAG GAT TCT CCC GCG	585
181	A T R C F T A D K Y K D S P A	195
586	CAT CTC ATT TAC TAC ATC GTC ATC AAC GTT CTA GGG GCC ATG GTT	630
196	H L I Y Y I V I N V L G A M V	210
631	ACT CTG CTT ATT TCT GTG CTT TAT TTT CAA GTC ATT CGA AAG ATC	675
211	T L L I S V L Y F Q V I R K I	225
676	AGG AAA CAG TTT CAA GAA AAC GAG ATG ACG CTC CAT CCC AGC GTT	720
226	R K Q F Q E N E M T L H P S V	240
721	CCA AAA CTG CAA CAC AGC GGA AGT AAT TGG GAG GAA AAA ATA AAC	765
241	P K L Q H S G S N W E E K I N	255
766	CGG AAG TTG GTC AAA ACG ACG GTG ACG TTG TTG GCG GTA ACC GTT	810
256	R K L V K T T V T L L A V T V	270
811	GTA TTC GTG CTG ACT ATA TTC CCT CAT ACT CTG TTA GCC CTG GTT	855
271	V F V L T I F P H T L L A L V	285
856	GAT TAC TCG GTG GGG AGT TTC TTC TGT CGT TTG AGC TTC GCT GAA	900

286	D	Y	S	V	G	S	F	F	C	R	L	S	F	A	E	300
901	GGA	GTA	GCT	TAC	AAT	ACG	GCG	ATG	CAT	TTC	TTT	TTG	CTG	AAC	AGC	945
301	G	V	A	Y	N	T	A	M	H	F	F	L	L	N	S	315
946	GTT	TTG	AAC	AGC	GTA	ATT	TAC	GGG	TTC	ACG	GAC	AAA	AGG	TTC	AGA	990
316	V	L	N	S	V	I	Y	G	F	T	D	K	R	F	R	330
991	GGA	GAT	TTT	TGT	GTG	TTC	AGA	GAC	ACA	GTT	CAT	GTG	ACA	CAG	GAA	1035
331	G	D	F	C	V	F	R	D	T	V	H	V	T	Q	E	345
1036	ACA	CCG	ATG	ACG	TCC	TCA	CAC	GTA	TAT	AGA	TGT	CAG	ACA	TTC	TGC	1080
346	T	P	M	T	S	S	H	V	Y	R	C	Q	T	F	C	360
1081	CGA	TAT	CAG	CAC	AGT	GCG	CCG	CTC	GAG	TCT	AGA	GGA	CGC	GAT	CGA	1125
361	R	Y	Q	H	S	A	P	L	E	S	R	G	R	D	R	375
1126	GTA	GCT	ATC	CTA	GCT	TTC	TCG	GCT	CGA	ATC	TAA				1158	
376	V	A	I	L	A	F	S	A	R	I	*					

**Annexe III :** Séquence récepteur D1 de *C. gigas*, et sa traduction en séquence protéique, générée grâce au logiciel BioEdit, selon l'ORF supposé, du premier résidu Met au premier codon STOP (représenté par \*). Les domaines transmembranaires sont surlignés en jaune et les amorces ayant servi aux expériences de PCR quantitative sont situées dans la séquence nucléotidique au niveau des nucléotides rouges.

#### IV. Séquence traduite du récepteur F3

1	ATG GCT CAG AAC GTG ACA GAC ATT TTG TAC AAC GTT ACC GGT AAC	45
1	M A Q N V T D I L Y N V T G N	15
46	ATC ACG GAA CTG ACG ACA CTT GGG ATG GCC AAG GGA GAA TCG GAT	90
16	I T E L T T L G M A K G E S D	30
91	CAG ATC ATG CAG AAA CGG GGA CTT GCC GTG CTC TTT ATC GGT CTC	135
31	Q I M Q K R G L A V L F I G L	45
136	TAC ATC ATC ATC TTT ATC CTA GGA CTA AGC GGA AAT ACA CTG GTA	180
46	Y I I I F I L G L S G N T L V	60
181	GTG TAT GTG GTG GTC CGC AAC AGA ACC ATG CAG ACA ATC ACC AAC	225
61	V Y V V V R N R T M Q T I T N	75
226	ATA TTT ATC ACC AAC CTC GCT GTT TCT GAT ATT CTT ATA TGT CTA	270
76	I F I T N L A V S D I L I C L	90
271	CTC TCT ATT CCT TTC ACA CCA CTC GGA TAT TTT CTG AAT TCG TGG	315
91	L S I P F T P L G Y F L N S W	105
316	ATG TTC GGG GAG GCG CTG TGT CAC ATA GTT CCA ATG TCT CAA GCA	360
106	M F G E A L C H I V P M S Q A	120
361	ATA AGT GTC TAT GTG TCC ACG TTG ACT TCC ACC GCC ATT GCA GTG	405
121	I S V Y V S T L T S T A I A V	135
406	GAC CGA TAT TTC GTC ATT GTG TAC CCG TTC AAG CCC CGG ATG AAA	450
136	D R Y F V I V Y P F K P R M K	150
451	GTG ATG ATT TGC TTA CTC GTC ATT GTG TCA ATA TGG ATC ATT TCT	495
151	V M I C L L V I V S I W I I S	165
496	ATT TCC ATA TCA CTT CCA CTC GGT ATT TAC ATG ACA CTG ACT ACT	540
166	I S I S L P L G I Y M T L T T	180
541	GAG ACT TCA GGT GAG CAC AGG TGC GCT GAA GAA TGG CCA CGT GAC	585
181	E T S G E H R C A E E W P R D	195
586	CAG GCT GGG CAG TTT TTC ACG GTC ACT AGT CTT GTT CTG CAG TAC	630
196	Q A G Q F F T V T S L V L Q Y	210
631	GTA GTG CCT TGT AGT ATT ATA ACG TAC TGT TAT CTC AAA GTC TCG	675
211	V V P C S I I T Y C Y L K V S	225
676	CTG GCG CTC AAG AAA CGC TCC AGA ACA AAA ATA GGG AGT GGC TCA	720
226	L A L K K R S R T K I G S G S	240
721	AAA TGT CGT GAG AGG GAC GAA CAA GAA ATT CGA CGA AAG CGT CGA	765
241	K C R E R D E Q E I R R K R R	255
766	ACA AAC AGA ATG CTA ATC GCC ATG GTA ACT ATA TTT GTT CTC TGT	810
256	T N R M L I A M V T I F V L C	270
811	TGG CTT ATG CTC AAT ATC GTC AAT GTG ACA ATT TCG TAC AAA AAG	855
271	W L M L N I V N V T I S Y K K	285

856	AAT	TAT	GCT	CAT	TGG	TAT	TAT	TAT	ACG	CTT	ATA	TTT	TTT	ATT	GCG	900
286	N	Y	A	H	W	Y	Y	Y	T	L	I	F	F	I	A	300
901	CAC	GTC	ATT	GCT	GTG	AGT	TCA	ACC	ATA	TAT	AAC	CCC	TTT	TTG	TAT	945
301	H	V	I	A	V	S	S	T	I	Y	N	P	F	L	Y	315
946	GCG	TGG	ATG	AAT	GAT	AAT	TTT	AGA	AAG	GAA	TTC	AAA	CAA	GTT	TTG	990
316	A	W	M	N	D	N	F	R	K	E	F	K	Q	V	L	330
991	CCT	TGT	CTT	TTC	CGT	GGT	GAT	CGG	GAG	CGA	CAT	GTC	AAC	GGA	AGT	1035
331	P	C	L	F	R	G	D	R	E	R	H	V	N	G	S	345
1036	ACC	ACA	AAC	ACT	CAG	TAC	ACT	AAC	GTG	GAC	AAT	CAG	CCG	TCT	GTG	1080
346	T	T	N	T	Q	Y	T	N	V	D	N	Q	P	S	V	360
1081	CTG	ATC	AAT	CGA	TCA	CCG	CAG	AGA	GAG	TCC	GAT	GAA	ATG	AAC	AAC	1125
361	L	I	N	R	S	P	Q	R	E	S	D	E	M	N	N	375
1126	ATG	AAA	AAA	TCC	AAG	GTG	TTC	TAT	GAC	ACG	GAA	TCT	GAG	AGA	GTC	1170
376	M	K	K	S	K	V	F	Y	D	T	E	S	E	R	V	390
1171	CAC	CTG	AAT	CAG	CTC	AAT	GCT	GAT	ACC	ACC	GAC	GAT	TCC	GTG	TGA	1215
391	H	L	N	Q	L	N	A	D	T	T	D	D	S	V	*	

**Annexe IV** : Séquence récepteur F3 de *C. gigas*, et sa traduction en séquence protéique, générée grâce au logiciel BioEdit, selon l'ORF supposé, du premier résidu Met au premier codon STOP (représenté par \*). Les domaines transmembranaires sont surlignés en jaune et les amorces ayant servi aux expériences de PCR quantitative sont situées dans la séquence nucléotidique au niveau des nucléotides rouges.

## V. Séquence traduite du récepteur H4

1	ATG AAT CTT ACG ACA GAA AAT TTC AAT GCC ATG TAT TCG GAC TGG	45
1	M N L T T E N F N A M Y S D W	15
46	CTC ACT CCT AAT ACA GCC GTT CTT GGT ATC CTC CTC ACG ATG GGG	90
16	L T P N T <b>A V L G I L L T M G</b>	30
91	ACT CTT GGA AAC AGT TTC GCT CTT TAT CTG TAC ATA GTT CGT GTT	135
31	<b>T L G N S F A L Y L</b> Y I V R V	45
136	CCC CAC ACT GAT GAA CGA TTT TTC ATT CCG TTT CTT GGA GCA GTG	180
46	P H T D E R F F I P <b>F L G A V</b>	60
181	GAT TTA TTT GTG TGT TTA TGG TCG GGA ACG TTT GCA ATA ATT CTA	225
61	<b>D L F V C L W S G T F A I I L</b>	75
226	AAC TTT TAT CGT GCA GAT TTT CCA TCG GCA AAA CTA TGC AAA GTA	270
76	<b>N F Y</b> R A D F P S A K L C K V	90
271	ACG TAT TTT TTC TCG TGG GGA TCC ATT AAC TAT TCT GCA TTA CTT	315
91	T Y F <b>F S W G S I N Y S A L L</b>	105
316	CTC TTA ATA ATA GCA TTT CAT AGG TAC AAG AAA ATT TGC AGA CCA	360
106	<b>L L I I A F</b> H R Y K K I C R P	120
361	GTA TCT TTA CAA TGG ACC AAA CGA AAG AGT CGG CTC GCT GTT GGA	405
121	V S L Q W T K R K S R <b>L A V G</b>	135
406	GTT GCC GGA TTT ATA CCT TAT CTT CTG ACT GTC CCC ATT CTG GTT	450
136	<b>V A G F I P Y L L T V P I L V</b>	150
451	TTA TTT GGT GAA AGA AAA GGA CAT ATC ATT TAC ACA GGA ACC AAT	495
151	<b>L</b> F G E R K G H I I Y T G T N	165
496	GTT ACG CTT ATA ACA TGT AAT ATT ATG AGC TTT ACT CGT GAG GTG	540
166	V T L I T C N I M S F T R E V	180
541	AGC TTT TAT TAT TTG GGA TTT ATT ATC CTT TAC TTT ATC ATC TTA	585
181	S F Y Y <b>L G F I I L Y F I I L</b>	195
586	ATG ACA TTA ATC ATT ATA TTG TAC TCT CTC ATT GGA TTG ACA ATT	630
196	<b>M T L I I I L Y S L I G L T I</b>	210
631	TTC CGA ACA TTT CGA GTC ATA CGA GCC TCG AGA AAA GTT CAA AAC	675
211	<b>F</b> R T F R V I R A S R K V Q N	225
676	CAT ATA ACA TTC GAC CGA GGA <b>CAC GAA AGC ACG ATT TCA GAA</b> GTT	720
226	H I T F D R G H E S T I S E V	240
721	TCA AAT ACA ACA ATG GAA GCA TCG ATG TCC ACT TCT AAA GAC GTT	765
241	S N T T M E A S M S T S K D V	255
766	AAA AAA GAA AAT CAA ACA CAA ATC AAG AAT <b>GTC ATT CGG AAA CAC</b>	810
256	K K E N Q T Q I K N V I R K H	270
811	<b>GTT CGC</b> CAG AAT TTT ACC GGC ATG TTT GCC GCC ATA ATT GGG TTT	855
271	V R Q <b>N F T G M F A A I I G F</b>	285

856	TGG GTC ATT TCC TAT CTA CCA ACC ATT ACG TTA ATA ATC ATA CCA	900
286	W V I S Y L P T I T L I I I P	300
901	GCT GTT AAG AAT TCA ATA GAG TTT TGG TTT CAT ATG GAC CCG GTA	945
301	A V K N S I E F W F H M D P V	315
946	GCT ACA AAT GTT TTA CTT TTC CTC AAC AGA ACA TTT TTG TTG AAC	990
316	A T N V L L F L N R T F L L N	330
991	CAT GTC GTT AAT CCA TTT ATA TAT GGA TAC TTT GAT GTT GGG TTT	1035
331	H V V N P F I Y G Y F D V G F	345
1036	CGT AAG GAA GCT GCG AAT TTA TTC TGC TGC CAC AAA ATG TTA GCA	1080
346	R K E A A N L F C C H K M L A	360
1081	AAT TAA	1086
361	N *	

**Annexe V :** Séquence du récepteur H4 de *C. gigas*, et sa traduction en séquence protéique, générée grâce au logiciel BioEdit, selon l'ORF supposé, du premier résidu Met au premier codon STOP (représenté par \*). Les domaines transmembranaires sont surlignés en jaune et les amorces ayant servi aux expériences de PCR quantitative sont situées dans la séquence nucléotidique au niveau des nucléotides rouges.

## VI. Séquence traduite du récepteur F1

1	ATG GCA AAA ACA AAC ATA ACT TTT GAT GTT GAG GAC TGG AAT AAT	45
1	M A K T N I T F D V E D W N N	15
46	GAA TAT GCC AGA AGG TAT CTG GTA AGC ACC ATA TTG CAG TCC CTC	90
16	E Y A R R Y L V S T I L Q S L	30
91	TTC TTA GTT GTT GGA TTC TGT GGA AAC CTG ATT GTA ATC ATC GTG	135
31	F L V V G F C G N L I V I I V	45
136	TAT ACA ACC AAA ATG AAA TCT AAA CAC GAT GAC AGA TAC TTT ATA	180
46	Y T T K M K S K H D D R Y F I	60
181	CCT TTT CTT GCA AGT GTG GAT TTA GCC GGA TGT CTC GTT TCA ACA	225
61	P F L A S V D L A G C L V S T	75
226	ACT TTA ATT TTA CTG AGC AAT AAT CAA CCT TAC AAA TAT CCA AAT	270
76	T L I L L S N N Q P Y K Y P N	90
271	TCT ACA GTT TGC AAA AGT TTG AAT GTC GTG GCT TGT GGG CTT ATT	315
91	S T V C K S L N V V A C G L I	105
316	GTT GCC TCC ATT TTT CTG CTG TTA GTG ATA TCT GTA CAA CGT TAC	360
106	V A S I F L L L V I S V Q R Y	120
361	CAG AAG ATA TGT CGT CCA TTC GGA TTT CAG ATG AAC ATA AAA TGT	405
121	Q K I C R P F G F Q M N I K C	135
406	AAG CGA ACT GTC GTA GCG ATA GTT TTA TTG CTC GCA GCA GCC TTT	450
136	K R T V V A I V L L L A A A F	150
451	GCC TTT CCA ACA ATC TTT CTC TAT GAA AAA GTT GAA GTT GTT CAC	495
151	A F P T I F L Y E K V E V V H	165
496	CCT GTG AGA AAC ATC ACT GGC CAT AGA TGT GGA CCT GTT CCT AAT	540
166	P V R N I T G H R C G P V P N	180
541	ACA GAA AAA TTT GGA GAG ATC TAT CGC GGG ATA GTC ATT GGG GCA	585
181	T E K F G E I Y R G I V I G A	195
586	GAA CTA ACG TCC GTT ATT TGT ATG TCT TTT TTC TAC GGC TTT GTT	630
196	E L T S V I C M S F F Y G F V	210
631	GGC TAC ACC CTA ATA ACA AAA ATG AAA CCA ACA AGA AAA GAG CAT	675
211	G Y T L I T K M K P T R K E H	225
676	GAA AAA GTA AGT GAA TCA CGA GCA ACC AAT TCA GAA TTC ACT GGA	720
226	E K V S E S R A T N S E F T G	240
721	GAT GAA TCC AAA ACT ACA GGG ACA ATT GAT GAT ACA ACT GAC GTT	765
241	D E S K T T G T I D D T T D V	255
766	GAG CTT CGA TTA GAC AAA AAT GGA GGT ACA TCT AAT AAA TTG GAA	810
256	E L R L D K N G G T S N K L E	270
811	AAG AAA AAT GAA AAG ACA AGA AAT GCA AAG ACT CGC ACC GGA AAG	855
271	K K N E K T R N A K T R T G K	285

856	CAA TAT TCC TTG ATG TTT ATG CTG ATT TCA CTG GTC AGC ATT CTT	900
286	Q Y S L M F M L I S L V S I L	300
901	TGC TTT TTC CCA CCT TGG ATA TTT GTT TTA CTG GAA ACA AAG AAC	945
301	C F F P P W I F V L L E T K N	315
946	AAA GCC TTT TGG AAT CAT TTA ACG TAC GAG GAA ACA CAA GTA TTC	990
316	K A F W N H L T Y E E T Q V F	330
991	ATT ATT ATT CGA GGA CTT TTC GTG TTA AAC TTT GTA GTA AAT CCA	1035
331	I I I R G L F V L N F V V N P	345
1036	TTT ATT TAT GGT TAT TTT GAT TCC AAA TTC CGA CGA AAT GTT GCT	1080
346	F I Y G Y F D S K F R R N V A	360
1081	AAA GTC ATT TTT TCT TTC TGC AAG TAG	
361	K V I F S F C K *	

**Annexe VI :** Séquence du récepteur F1 de *C. gigas*, et sa traduction en séquence protéique, générée grâce au logiciel BioEdit, selon l'ORF supposé, du premier résidu Met au premier codon STOP (représenté par \*). Les domaines transmembranaires sont surlignés en jaune et les amorces ayant servi aux expériences de PCR quantitative sont situées dans la séquence nucléotidique au niveau des nucléotides rouges.



# *Bibliographie*



-A-

- Abdel-Latif, M. and Hoffmann, K. H. 2007. The adipokinetic hormones in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: cDNA cloning, quantitative real time RT-PCR analysis, and gene specific localization. *Insect biochemistry and molecular biology* 37:999-1014.
- Adams, B. A., Tello, J. A., Erchegeyi, J., Warby, C., Hong, D. J., Akinsanya, K. O., Mackie, G. O., Vale, W., Rivier, J. E., and Sherwood, N. M. 2003. Six novel Gonadotropin-Releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology* 144:1907-1919.
- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B., and de Rosa, R. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:4453-4456.
- Amatruda, T. T., Steele, D. A., Slepak, V. Z., and Simon, M. I. 1991. G alpha 16, a G protein alpha subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:5587-5591.
- Attwood, T. K. and Findlay, J. B. 1994. Fingerprinting G protein-coupled receptors. *Protein engineering* 7:195-203.

-B-

- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.-Y. Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A., and Moal, J. 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 140:635-646.
- Barb, C. R., Hausman, G. J., and Lents, C. A. 2008. Energy metabolism and leptin: Effects on neuroendocrine regulation of reproduction in the gilt and sow. *Reproduction in Domestic Animals* 43:324-330.
- Baumeister, R., Schaffitzel, E., and Hertweck, M. 2006. Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *The Journal of endocrinology* 190:191-202.
- Bechtold, D. A. and Luckman, S. M. 2007. The role of RFamide peptides in feeding. *The Journal of endocrinology* 192:3-15.
- Beets, I., Lindemans, M., Janssen, T., and Verleyen, P. 2011. Deorphanizing G protein-coupled receptors by a calcium mobilization assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 789:377-391.
- Belmont, M., Cazzamali, G., Williamson, M., Hauser, F., and Grimmlikhuijzen, C. J. 2006. Identification of four evolutionarily related g protein-coupled receptors from the malaria

- mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemical and biophysical research communications* 344:160–165.
- Bernheim, S. M. and Mayeri, E. 1995. Complex behavior induced by egg-laying hormone in *Aplysia*. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology* 176:131–136.
- Berthelin, C., Kellner, K., and Mathieu, M. 2000. Storage metabolism in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 125:359–369.
- Berthelin, C., 2000. Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. Thèse de doctorat, Université de Caen. 156p.
- Billas, I. M. and Moras, D. 2005. Ligand-binding pocket of the ecdysone receptor. *Vitamins and hormones* 73:101–129.
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J., and Brown, A. 1990. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1031:163–224.
- Bjarnadóttir, T. K., Fredriksson, R., Höglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerström, M. C., and Schiöth, H. B. 2004. The human and mouse repertoire of the adhesion family of G protein-coupled receptors. *Genomics* 84:23–33.
- Bjarnadóttir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., and Schiöth, H. B. 2006. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* 88:263–273.
- Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. 1988. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333:370-373.
- Brockmann, A., Annangudi, S. P., Richmond, T. A., Ament, S. A., Xie, F., Southey, B. R., Rodriguez-Zas, S. R., Robinson, G. E., and Sweedler, J. V. 2009. Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:2383-2388.
- Broeck, J. V. 2001. Insect g protein-coupled receptors and signal transduction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48:1–12.
- Brown, M. 1999. Identification of a drosophila brain-gut peptide related to the neuropeptide y family. *Peptides* 20:1035–1042.
- Brown, M. R., Klowden, M. J., Crim, J. W., Young, L., Shrouder, L. A., and Lea, A. O. 1994. Endogenous regulation of mosquito host-seeking behavior by a neuropeptide. *Journal of Insect Physiology* 40:399–406.
- Budhiraja, S. and Chugh, A. 2009. Neuromedin U : physiology, pharmacology and therapeutic potential. *Fundamental & clinical pharmacology* 23:149–157.

Bulenger, S., Marullo, S., and Bouvier, M. 2005. Emerging role of homo- and heterodimerization in G protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends in pharmacological sciences* 26:131–137.

Bundelmann, B. U., Schipp, R., and von Boletzky, S. 1997. Cephalopoda. In *The Microscopic Anatomy of Invertebrate: Mollusca II* (Harrison, F. W., and Kohn, A. J., Eds.), volume 6A. Wiley-Liss, New York, NY.

-C-

Cazzamali, G., Saxild, N., and Grimmelikhuijzen, C. 2002. Molecular cloning and functional expression of a drosophila corazonin receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 298:31-36.

Cerstiaens, A., Benfekih, L., Zouiten, H., Verhaert, P., De Loof, A., and Schoofs, L. 1999. Led-NPF-1 stimulates ovarian development in locusts. *Peptides* 20:39–44.

Chan, L. J. J., Hossain, M. A. A., Samuel, C. S., Separovic, F., and Wade, J. D. 2011. The relaxin peptide family—structure, function and clinical applications. *Protein and peptide letters* 18:220–229.

Chavez-Villalba J, Cochard JC, Le Pennec M, Barret J, Enriquez-Diaz MR, Caceres-Martinez C. 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 22:721-731.

Chen, M. L., Sharma, R., and Walker, R. J. 1995. Structure-activity studies of RFamide analogues on central neurones of *Helix aspersa*. *Regulatory peptides* 58:99–105.

Cheung, C. C., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. 2000. Perspectives on leptin's role as a metabolic signal for the onset of puberty. *Frontiers of hormone research* 26:87-105.

Cheung, L. W. and Wong, A. S. 2008. Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *The FEBS journal* 275:5479-5495.

Chiu, A. Y., Hunkapiller, M. W., Heller, E., Stuart, D. K., Hood, L. E., and Strumwasser, F. 1979. Purification and primary structure of the neuropeptide egg-laying hormone of *Aplysia californica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:6656-6660.

Choi, S.-H. H., Lee, G., Monahan, P., and Park, J. H. 2008. Spatial regulation of corazonin neuropeptide expression requires multiple cis-acting elements in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of comparative neurology* 507:1184-1195.

Christopoulos, A., Christopoulos, G., Morfis, M., Udawela, M., Laburthe, M., Couvineau, A., Kuwasako, K., Tilakaratne, N., and Sexton, P. M. 2003. Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *The Journal of biological chemistry* 278:3293–3297.

Chronwall, B. M. and Zukowska, Z. 2004. Neuropeptide Y, ubiquitous and elusive. *Peptides*

25:359-363.

- Chung, S., Funakoshi, T., and Civelli, O. 2007. Orphan GPCR research. *Br J Pharmacol* 153:S339–S346.
- Civelli, O., Saito, Y., Wang, Z., Nothacker, H.-P. P., and Reinscheid, R. K. 2006. Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacology & therapeutics* 110:525-532.
- Clynen, E., Husson, S. J., and Schoofs, L. 2009. Identification of new members of the (short) neuropeptide F family in locusts and *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163:60–74.
- Clynen, E., Huybrechts, J., Verleyen, P., De Loof, A., and Schoofs, L. 2006. Annotation of novel neuropeptide precursors in the migratory locust based on transcript screening of a public EST database and mass spectrometry. *BMC genomics* 7:201+.
- Clynen, E. and Schoofs, L. 2009. Peptidomic survey of the locust neuroendocrine system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39:491–507.
- Corporeau, C., Groisillier, A., Jeudy, A., Barbeyron, T., Fleury, E., Fabioux, C., Czjzek, M., and Huvet, A. 2011. A functional study of transforming growth Factor-Beta from the gonad of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 13:971–980.
- Croll, R. P., van Minnen, J., Kits, K. S., and Smit, A. B. 1990. APGWamide : molecular, histological and physiological examination of a novel neuropeptide involved with reproduction in the snail, *Lymnea stagnalis*. In K. S. Kits, H. H. Boer, and J. Joosee (eds.), *Molluscan Neurobiology*, pp. 248–254.
- Cropper, E. C., Brezina, V., Vilim, F. S., Harish, O., Price, D. A., Rosen, S., Kupfermann, I., and Weiss, K. R. 1994. FRF peptides in the ARC neuromuscular system of aplysia: purification and physiological actions. *Journal of neurophysiology* 72:2181–2195.
- Crown, A., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. 2007. Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology* 86:175–182.

-D-

- De Jong-Brink, M., Reid, C. N., Tensen, C. P., and Ter Maat, A. 1999. Parasites flicking the NPY gene on the host's switchboard: why NPY? *The FASEB journal* 13:1972–1984.
- De Jong-Brink, M., ter Maat, A., and Tensen, C. P. 2001. NPY in invertebrates: molecular answers to altered functions during evolution. *Peptides* 22:309–315.
- De Lange, R. P., van Golen, F. A., and van Minnen, J. 1997. Diversity in cell specific co-expression of four neuropeptide genes involved in control of male copulation behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience* 78:289–299.
- De Loof, A., Baggerman, G., Breuer, M., Claeys, I., Cerstiaens, A., Clynen, E., Janssen, T., Schoofs, L., and Vanden Broeck, J. 2001. Gonadotropins in insects: an overview.

*Archives of insect biochemistry and physiology* 47:129–138.

- Déry, O., Thoma, M. S., Wong, H., Grady, E. F., and Bunnett, N. W. 1999. Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. Beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *The Journal of biological chemistry* 274:18524-18535.
- Dheilly, N. M., Lelong, C., Huvet, A., and Favrel, P. 2011. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. *BMC genomics* 12:468+.
- Di Cosmo, A. and Di Cristo, C. 1998. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *The Journal of comparative neurology* 398:1-12.
- Di Cristo, C., De Lisa, E., and Di Cosmo, A. 2009. GnRH in the brain and ovary of *Sepia officinalis*. *Peptides* 30:531-537.
- Di Fiore, M. M., Rastogi, R. K., Ceciliani, F., Messi, E., Botte, V., Botte, L., Pinelli, C., D'Aniello, B., and D'Aniello, A. 2000. Mammalian and chicken I forms of gonadotropin-releasing hormone in the gonads of a protochordate, *Ciona intestinalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:2343-2348.
- Dockray, G. J. 2004. The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Experimental physiology* 89:229–235.
- Drews, J. 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science (New York, N.Y.)* 287:1960–1964.

-E-

- Ebberink, R. H., van Loenhout, H., Geraerts, W. P., and Joosse, J. 1985. Purification and amino acid sequence of the ovulation neurohormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:7767-7771.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., and Haure, J. 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. spatial variation in food abundance. *Journal of evolutionary biology* 17:342-356.

-F-

- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., and Huvet, A. 2009. In vivo RNA interference in oyster *vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal* 276:2566–2573.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J. Y., Minguant, C., and

- Le Pennec, M. 2004. Oyster *vasa*-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and biophysical research communications* 320:592–598.
- Fan, X., Croll, R. P., Wu, B., Fang, L., Shen, Q., Painter, S. D., and Nagle, G. T. 1997. Molecular cloning of a cDNA encoding the neuropeptides APGWamide and cerebral peptide 1: localization of APGWamide-like immunoreactivity in the central nervous system and male reproductive organs of aplysia. *The Journal of comparative neurology* 387:53-62.
- Faury, N., Remoue, S., Soletchnik, P., Gouletquer, P., Geairon, P., Le Moine, O., Razet, D., Guilpain, P., Robert, S., and Taillade, S. 2001. Mortalités printanière et estivale de l’huître creuse *C. gigas* en élevage à plat dans le bassin de Marennes-Oléron. Etude du métabolisme du glycogène sur différentes origines de cheptels. Technical report, Ifremer.
- Favrel, P., Lelong, C., and Mathieu, M. 1998. Structure of the cDNA encoding the precursor for the neuropeptide FMRFamide in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Neuroreport* 9:2961–2965.
- Favrel, P. and Mathieu, M. 1996. Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of Ala-Pro-Gly-Trp amide-related neuropeptides from the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Neuroscience Letters* 205:210–214.
- Feng, D. D., Yang, S.-K. K., Loudes, C., Simon, A., Al-Sarraf, T., Culler, M., Alvear-Perez, R., Llorens-Cortes, C., Chen, C., Epelbaum, J., and Gardette, R. 2011. Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. *The European journal of neuroscience* 34:732–744.
- Feng, G., Reale, V., Chatwin, H., Kennedy, K., Venard, R., Ericsson, C., Yu, K., Evans, P. D., and Hall, L. M. 2003. Functional characterization of a neuropeptide F-like receptor from *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Neuroscience* 18:227–238.
- Filipek, S., Stenkamp, R. E., Teller, D. C., and Palczewski, K. 2003. G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annual review of physiology* 65:851–879.
- Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P., and Huvet, A. 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* 410:187–196.
- Fleury, E., Huvet, A., Lelong, C., de Lorgeril, J., Boulo, V., Gueguen, Y., Bachère, E., Tanguy, A., Moraga, D., Fabioux, C., Lindeque, P., Shaw, J., Reinhardt, R., Prunet, P., Davey, G., Lapègue, S., Sauvage, C., Corporeau, C., Moal, J., Gavory, F., Wincker, P., Moreews, F., Klopp, C., Mathieu, M., Boudry, P., and Favrel, P. 2009. Generation and analysis of a 29,745 unique expressed sequence tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC genomics* 10:341+.
- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y. Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C.,

- Boudry, P., Favrel, P., and Huvet, A. 2010. Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 12:326–339.
- Flood, J. F., Hernandez, E. N., and Morley, J. E. 1987. Modulation of memory processing by neuropeptide y. *Brain research* 421:280-290.
- Franco, A., Jouaux, A., Mathieu, M., Sourdaire, P., Lelong, C., Kellner, K., and Heude Berthelin, C. 2010. Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell and tissue research* 340:201-210.
- Frankish, H. M., Dryden, S., Hopkins, D., Wang, Q., and Williams, G. 1995. Neuropeptide Y, the hypothalamus, and diabetes: insights into the central control of metabolism. *Peptides* 16:757–771.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H. B. 2003. The G-Protein-coupled receptors in the human genome form five main families. phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology* 63:1256–1272.
- Fuxe, K., Marcellino, D., Genedani, S., and Agnati, L. 2007. Adenosine A(2A) receptors, dopamine d(2) receptors and their interactions in parkinson's disease. *Movement disorders* 22:1990-2017.
- G-
- Gäde, G. 2009. Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family: a new take on biodiversity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163:125-136.
- Gäde, G., Goldsworthy, G. J., Schaffer, M. H., Cook, J. C., and Rinehart, K. L. 1986. Sequence analyses of adipokinetic hormones II from corpora cardiaca of *Schistocerca nitans*, *Schistocerca gregaria*, and *Locusta migratoria* by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochemical and biophysical research communications* 134:723–730.
- Gäde, G., Janssens, M. P., and Kellner, R. 1994. A novel peptide in the AKH/RPCH family isolated from the corpora cardiaca of the emperor dragonfly, *Anax imperator*. *Peptides* 15:1–6.
- Garczynski, S. F., Brown, M. R., Shen, P., Murray, T. F., and Crim, J. W. 2002. Characterization of a functional neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Peptides* 23:773-780.
- Garczynski, S. F., Crim, J. W., and Brown, M. R. 2005. Characterization of neuropeptide F and its receptor from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Peptides* 26:99–107.
- Gazit, Y., Dunkelblum, E., Ben-Aziz, O., and Altstein, M. 1992. Immunochemical and biological analysis of pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Heliothis peltigera*. *Archives of insect biochemistry and physiology* 19:247-260.

- Gessi, S., Merighi, S., Varani, K., and Borea, P. A. A. 2011. Adenosine receptors in health and disease. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 61:41–75.
- Gether, U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 21:90–113.
- Gilchrist, A. 2010. GPCR molecular pharmacology and drug targeting : shifting paradigms and new directions. *John Wiley & Sons*.
- Goldberg, J. I., Garofalo, R., Price, C. J., and Chang, J. P. 1993. Presence and biological activity of a GnRH-like factor in the nervous system of *Helisoma trivolvis*. *Journal of Comparative Neurology* 336:571–582.
- Gonzalez, R. and Orchard, I. 2009. Physiological activity of neuropeptide F on the hindgut of the blood-feeding hemipteran, *Rhodnius prolixus*. *Journal of insect science (Online)* 9:1–14.
- Gorbman, A., Whiteley, A., and Kavanaugh, S. 2003. Pheromonal stimulation of spawning release of gametes by gonadotropin releasing hormone in the chiton, *Mopalia sp.* *General and comparative endocrinology* 131:62-65.
- Gricourt, L., Bonnac, G., Boujard, D., Mathieu, M., and Kellner, K. 2003. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *General and comparative endocrinology* 134:44–56.
- Groneberg, D. A., Folkerts, G., Peiser, C., Chung, K. F., and Fischer, A. 2004. Neuropeptide Y (NPY). *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 17:173-180.
- Grönke, S., Clarke, D.-F. F., Broughton, S., Andrews, T. D., and Partridge, L. 2010. Molecular evolution and functional characterization of drosophila insulin-like peptides. *PLoS genetics* 6.
- Gruninger, T. R., LeBoeuf, B., Liu, Y., and Garcia, L. R. 2007. Molecular signaling involved in regulating feeding and other motivated behaviors. *Molecular neurobiology* 35:1–20.
- Guillemin, R. 1977. Purification, isolation, and primary structure of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor of ovine origin. a historical account. *American journal of obstetrics and gynecology* 129:214-218.
- Guillemin, R. 1978. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science (New York, N.Y.)* 202:390-402.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W. K., Cooper, K., and Jr 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* thunberg. *Evolution* 52:394-402.

-H-

Hamada, M., Shimosono, N., Ohta, N., Satou, Y., Horie, T., Kawada, T., Satake, H.,

- Sasakura, Y., and Satoh, N. 2011. Expression of neuropeptide- and hormone-encoding genes in the *Ciona intestinalis* larval brain. *Developmental biology* 352:202-214.
- Hamano, K., Awaji, M., and Usuki, H. 2005. cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. *The Journal of endocrinology* 187:55-67.
- Hansen, K. B. and Bräuner-Osborne, H. 2009. Xenopus oocyte electrophysiology in GPCR drug discovery. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 552:343-357.
- Hansen, K. K., Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., and Grimmelikhuijzen, C. J. 2006. Cloning and characterization of the adipokinetic hormone receptor from the cockroach *Periplaneta americana*. *Biochemical and biophysical research communications* 343:638-643.
- Hansen, K. K., Stafflinger, E., Schneider, M., Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Kollmann, M., Schachtner, J., and Grimmelikhuijzen, C. J. 2010. Discovery of a novel insect neuropeptide signaling system closely related to the insect adipokinetic hormone and corazonin hormonal systems. *The Journal of biological chemistry* 285:10736-10747.
- Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. 1989. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* 264:12657-12665.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.
- Henry, B. A., Goding, J. W., Tilbrook, A. J., Dunshea, F. R., and Clarke, I. J. 2001. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight. *The Journal of endocrinology* 168:67-77.
- Henry, J., Zatylny, C., and Boucaud-Camou, E. 1999. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* 20:1061-1070.
- Herpin, A., Lelong, C., and Favrel, P. 2004. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Developmental and comparative immunology* 28:461-485.
- Hill, J. W., Xu, M., and Levine, J. E. 2002. Revisiting the reproductive functions of neuropeptide Y. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 9:203-214.
- Hoek, R. M., Li, K. W., Van Minnen, J., Lodder, J. C., De Jong-Brink, M., Smit, A. B., and Van Kesteren, R. E. 2005. LFRFamides: a novel family of parasitism-induced -RFamide neuropeptides that inhibit the activity of neuroendocrine cells in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurochemistry* 92:1073-1080.
- Hoek, R. M., van Kesteren, R. E., Smit, A. B., de Jong-Brink, M., and Geraerts, W. P. 1997. Altered gene expression in the host brain caused by a trematode parasite: neuropeptide

- genes are preferentially affected during parasitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:14072–14076.
- Hoffmann, K. H., Meyering-Vos, M., and Lorenz, M. W. 1999. Allatostatins and allatotropins: Is the regulation of corpora allata activity their primary function? *European Journal of Entomology* 96:255-266.
- Hua, X. Y., Boublik, J. H., Spicer, M. A., Rivier, J. E., Brown, M. R., and Yaksh, T. L. 1991. The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide y in the rat: systematic studies on structure-activity relationship. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 258:243-248.
- Huang, H.-C. C. and Klein, P. S. 2004. The frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome biology* 5.
- Huang, Y., Crim, J. W., Nuss, A. B., and Brown, M. R. 2011. Neuropeptide F and the corn earworm, *Helicoverpa zea*: A midgut peptide revisited. *Peptides* 32:483–492.
- Huvet, A., Fleury, E., Corporeau, C., Quillien, V., Daniel, J. Y. Y., Riviere, G., Boudry, P., and Fabioux, C. 2011. In vivo RNA interference of a Gonad-Specific transforming growth factor- $\beta$  in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* pp. 1-9.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.-F. F., and Cunningham, C. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343:211–220.
- Huvet A, Normand J, Fleury E, Quillien V, Fabioux C, Boudry P. 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: a trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304:95-9.

-I-

- Illanes-Bucher AJW, Lubet P. 1980. Etude de l'activité neurosécrétoire au cours du cycle sexuel annuel de la moule *Mytilus edulis* L. *Bull Soc Zool France* 105:141-51.
- Ivell, R. and Einspanier, A. 2002. Relaxin peptides are new global players. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13:343-348.
- Ivell, R., Kotula-Balak, M., Glynn, D., Heng, K., and Anand-Ivell, R. 2011. Relaxin family peptides in the male reproductive system - a critical appraisal. *Molecular human reproduction* 17:71-84.
- Iwakoshi, E., Takuwa-Kuroda, K., Fujisawa, Y., Hisada, M., Ukena, K., Tsutsui, K., and Minakata, H. 2002. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochemical and biophysical research communications* 291:1187–1193.
- Iwakoshi-Ukena, E., Ukena, K., Takuwa-Kuroda, K., Kanda, A., Tsutsui, K., and Minakata,

H. 2004. Expression and distribution of octopus gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *The Journal of comparative neurology* 477:310–323.

-J-

- Janer, G. and Porte, C. 2007. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology (London, England)* 16:145–160.
- Jiang, H., Ren, F., Sun, J., He, L., Li, W., Xie, Y., and Wang, Q. 2010. Molecular cloning and gene expression analysis of the leptin receptor in the chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *PloS one* 5.
- Jing, J., Sweedler, J. V., Cropper, E. C., Alexeeva, V., Park, J.-H. H., Romanova, E. V., Xie, F., Dembrow, N. C., Ludwar, B. C., Weiss, K. R., and Vilim, F. S. 2010. Feedforward compensation mediated by the central and peripheral actions of a single neuropeptide discovered using representational difference analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:16545–16558.
- Jing, J., Vilim, F. S., Horn, C. C., Alexeeva, V., Hatcher, N. G., Sasaki, K., Yashina, I., Zhurov, Y., Kupfermann, I., Sweedler, J. V., and Weiss, K. R. 2007. From hunger to satiety: Reconfiguration of a feeding network by aplysia neuropeptide Y. *The Journal of Neuroscience* 27:3490–3502.
- Johard, H. A., Yoishii, T., Dirksen, H., Cusumano, P., Rouyer, F., Helfrich-Förster, C., and Nässel, D. R. 2009. Peptidergic clock neurons in drosophila: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. *The Journal of comparative neurology* 516:59–73.
- Jordan, B. A. and Devi, L. A. 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399:697–700.
- Jouaux, A., 2010. Gestion de l'allocation d'énergie à la croissance ou à la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : implication d'une régulation pas les insulín-like. Thèse de doctorat, Université de Caen. 248p.
- Jouaux, A., Heude-Berthelin, C., Sourdaíne, P., Blin, J. L., Mathieu, M., and Kellner, K. 2011. Identification of ras, pten and p70S6K homologs in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and diet control of insulin pathway. *General and comparative endocrinology* .

-K-

- Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L. G., Vaillant, C., and Lareyre, J. J. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *General and comparative endocrinology* 153:346-364.

- Kanda, A., Takahashi, T., Satake, H., and Minakata, H. 2006. Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin-releasing-hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*). *The Biochemical journal* 395:125-135.
- Kaufmann, C., Merzendorfer, H., and Gäde, G. 2009. The adipokinetic hormone system in culicinae (diptera: Culicidae): molecular identification and characterization of two adipokinetic hormone (AKH) precursors from *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* and two putative AKH receptor variants from *A. aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology* 39:770-781.
- Kavanaugh, S. I., Root, A. R., and Sower, S. A. 2005. Distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by *in situ* hybridization in the tunicate *Ciona intestinalis*. *General and comparative endocrinology* 141:76-83.
- Keating, C. D., Kriek, N., Daniels, M., Ashcroft, N. R., Hopper, N. A., Siney, E. J., Holden-Dye, L., and Burke, J. F. 2003. Whole-Genome analysis of 60 G Protein-Coupled receptors in *Caenorhabditis elegans* by gene knockout with RNAi. *Current Biology* 13:1715–1720.
- Kiris, I., Eroldogan, O., Kir, M., and Kumlu, M. 2004. Influence of neuropeptide Y (NPY) on food intake and growth of penaeid shrimps and (decapoda: Penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 139:239–244.
- Kolakowski, L. F. 1994. GCRDb: a G protein-coupled receptor database. *Receptors & channels* 2:1–7.
- Koval, A., Purvanov, V., Egger-Adam, D., and Katanaev, V. L. 2011. Yellow submarine of the Wnt/Frizzled signaling: Submerging from the G protein harbor to the targets. *Biochemical pharmacology* .
- Kriegsfeld, L. J. 2006. Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel. *Hormones and behavior* 50:655–666.
- Kristiansen, K. 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & Therapeutics* 103:21–80.
- Kuroki, Y., Kanda, T., Kubota, I., Ikeda, T., Fujisawa, Y., Minakata, H., and Muneoka, Y. 1993. FMRFamide-related peptides isolated from the prosobranch mollusc *Fusinus ferrugineus*. *Acta biologica Hungarica* 44:41–44.

-L-

- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M., and Poulet, S. A. 2001. A vibrio splendidus strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the bay of Morlaix (north brittany, France). *Diseases of aquatic organisms* 46:139-145.

- Lafont, R. and Mathieu, M. 2007. Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology (London, England)* 16:109–130.
- Laguette, M. and Veenstra, J. A. 2010. Ecdysone receptor homologs from mollusks, leeches and a polychaete worm. *FEBS letters* 584:4458–4462.
- Lameh, J., Bertozzi, F., Kelly, N., Jacobi, P. M., Nguyen, D., Bajpai, A., Gaubert, G., Olsson, R., and Gardell, L. R. 2010. Neuropeptide FF receptors have opposing modulatory effects on nociception. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 334:244–254.
- Lawrence, C. B., Celsi, F., Brennan, J., and Luckman, S. M. 2000. Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nature neuroscience* 3:645–646.
- Le Curieux-Belfond, O., Moslemi, S., Mathieu, M., and Seralini, G. E. 2001. Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas*: evidence for 17 $\beta$ -HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 78:359-366.
- Le Poul, E., Hisada, S., Mizuguchi, Y., Dupriez, V. J., Burgeon, E., and Detheux, M. 2002. Adaptation of aequorin functional assay to high throughput screening. *Journal of biomolecular screening* 7:57-65.
- Lee, K.-S. S., You, K.-H. H., Choo, J.-K. K., Han, Y.-M. M., and Yu, K. 2004. Drosophila short neuropeptide F regulates food intake and body size. *The Journal of biological chemistry* 279:50781–50789.
- Lee, V. H., Lee, L. T., and Chow, B. K. 2008. Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the GnRH gene. *The FEBS journal* 275:5458–5478.
- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quéré, H., Rodet, F., Dubos, M. P., and Favrel, P. 2007. Cg-TGF- $\beta$ , a TGF- $\beta$ /activin homologue in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against gram-negative microbial infection. *Developmental and comparative immunology* 31:30–38.
- Lelong, C., Mathieu, M., and Favrel, P. 2000. Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *European Journal of Biochemistry* 267:3986–3993.
- Leung, P. S., Shaw, C., Maule, A. G., Thim, L., Johnston, C. F., and Irvine, G. B. 1992. The primary structure of neuropeptide F (NPF) from the garden snail, *Helix aspersa*. *Regulatory peptides* 41:71–81.
- Li, K. W., el Filali, Z., Van Golen, F. A., and Geraerts, W. P. 1995. Identification of a novel amide peptide, GLTPNMNSLFF-NH<sub>2</sub>, involved in the control of vas deferens motility in *Lymnaea stagnalis*. *European journal of biochemistry / FEBS* 229:70–72.
- Li, K. W., Holling, T., de With, N. D., and Geraerts, W. P. 1993. Purification and characterization of a novel tetradecapeptide that modulates oesophagus motility in *Lymnaea stagnalis*. *Biochemical and biophysical research communications* 197:1056–

1061.

- Li, K. W., Smit, A. B., and Geraerts, W. P. M. 1992. Structural and functional characterization of neuropeptides involved in the control of male mating behavior of *Lymnaea stagnalis*. *Peptides* 13:633–638.
- Li, Q., Osada, M., Suzuki, T., and Mori, K. 1998. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction & Development* 33:87–93.
- Libert, F., Vassart, G., and Parmentier, M. 1991. Current developments in G protein-coupled receptors. *Current opinion in cell biology* 3:218–223.
- Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M. M., and Motta, M. 2003. The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Frontiers in neuroendocrinology* 24:279-295.
- Linacre, A., Kellett, E., Saunders, S., Bright, K., Benjamin, P. R., and Burke, J. F. 1990. Cardioactive neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFamide) and novel related peptides are encoded in multiple copies by a single gene in the snail *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:412-419.
- Lindemans, M., Liu, F., Janssen, T., Husson, S. J., Mertens, I., Gäde, G., and Schoofs, L. 2009. Adipokinetic hormone signaling through the gonadotropin-releasing hormone receptor modulates egg-laying in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:1642–1647.
- Lingo, P. R., Zhao, Z., and Shen, P. 2007. Co-regulation of cold-resistant food acquisition by insulin- and neuropeptide Y-like systems in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience* 148:371–374.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. 1990. Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 265:3202-3211.
- Loumaye, E., Thorner, J., and Catt, K. J. 1982. Yeast mating pheromone activates mammalian gonadotrophs: evolutionary conservation of a reproductive hormone? *Science (New York, N.Y.)* 218:1323-1325.
- Luo, S., Kleemann, G. A., Ashraf, J. M., Shaw, W. M., and Murphy, C. T. 2010. TGF- $\beta$  and insulin signaling regulate reproductive aging via oocyte and germline quality maintenance. *Cell* 143:299–312.
- Luo, S., Shaw, W. M., Ashraf, J., and Murphy, C. T. 2009. TGF-beta Sma/Mab signaling mutations uncouple reproductive aging from somatic aging. *PLoS genetics* 5.

-M-

- Maier, W., Adilov, B., Regenass, M., and Alcedo, J. 2010. A neuromedin U receptor acts with the sensory system to modulate food type-dependent effects on *C. elegans* lifespan. *PLoS biology* 8.
- Marshall, F. H., Jones, K. A., Kaupmann, K., and Bettler, B. 1999. GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends in pharmacological sciences* 20:396–399.
- Martínez-Pérez, F., Becerra, A., Valdés, J., Zinker, S., and Aréchiga, H. 2002. A possible molecular ancestor for mollusk APGWamide, insect adipokinetic hormone, and crustacean red pigment concentrating hormone. *Journal of Molecular Evolution* 54:703–714.
- Matsuda, K., Nakamura, K., Shimakura, S.-I., Miura, T., Kageyama, H., Uchiyama, M., Shioda, S., and Ando, H. 2008. Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Hormones and behavior* 54:83-89.
- Matsumoto, T., Nakamura, A. M., Mori, K., Akiyama, I., Hirose, H., and Takahashi, Y. 2007. Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *General and comparative endocrinology* 151:195–201.
- Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y., and Mori, K. 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118:811–817
- Maule, A. G., Shaw, C., Halton, D. W., Thim, L., Johnston, C. F., Fairweather, I., and Buchanan, K. D. 1991. Neuropeptide f: a novel parasitic flatworm regulatory peptide from moniezia expansa (cestoda: Cyclophyllidea). *Parasitology* 102:309-316.
- McAllister, L. B., Scheller, R. H., Kandel, E. R., and Axel, R. 1983. *In situ* hybridization to study the origin and fate of identified neurons. *Science (New York, N.Y.)* 222:800-808.
- McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G., and Foord, S. M. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393:333–339.
- Meeusen, T., Mertens, I., De Loof, A., and Schoofs, L. 2003. G protein-coupled receptors in invertebrates: a state of the art. *International review of cytology* 230:189–261.
- Melcher, C., Bader, R., Walther, S., Simakov, O., and Pankratz, M. J. 2006. Neuromedin U and its putative drosophila homolog hugin. *PLoS biology* 4.
- Mertens, I., Meeusen, T., Huybrechts, R., De Loof, A., and Schoofs, L. 2002. Characterization of the short neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and biophysical research communications* 297:1140–1148.
- Metallinou, C., Asimakopoulos, B., Schröer, A., and Nikolettos, N. 2007. Gonadotropin-releasing hormone in the ovary. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 14:737-749.
- Mikani, A., Wang, Q.-S. S., and Takeda, M. 2011. Brain-midgut short neuropeptide F

mechanism that inhibits digestive activity of the american cockroach, *Periplaneta americana*, upon starvation. *Peptides*.

- Millar, R. P. 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Animal reproduction science* 88:5-28.
- Millar, R. P., Pawson, A. J., Morgan, K., Rissman, E. F., and Lu, Z.-L. L. 2008. Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Frontiers in neuroendocrinology* 29:17-35.
- Minakata, H., Shigeno, S., Kano, N., Haraguchi, S., Osugi, T., and Tsutsui, K. 2009. Octopus gonadotrophin-releasing hormone: a multifunctional peptide in the endocrine and nervous systems of the cephalopod. *Journal of neuroendocrinology* 21:322–326.
- Minamino, N., Sudoh, T., Kangawa, K., and Matsuo, H. 1985. Neuromedins: novel smooth-muscle stimulating peptides identified in porcine spinal cord. *Peptides* 6 Suppl 3:245-248.
- Minth, C. D., Bloom, S. R., Polak, J. M., and Dixon, J. E. 1984. Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:4577–4581.
- Mirzadegan, T., Benkö, G., Filipek, S., and Palczewski, K. 2003. Sequence analyses of G protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* 42:2759-2767.
- Mita, M., Yoshikuni, M., Ohno, K., Shibata, Y., Paul-Prasanth, B., Pitchayawasin, S., Isobe, M., and Nagahama, Y. 2009. A relaxin-like peptide purified from radial nerves induces oocyte maturation and ovulation in the starfish, *Asterina pectinifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:9507–9512.
- Morcillo, Y., Albalat, A., and Porte, C. 1999. Mussels as sentinels of organotin pollution: Bioaccumulation and effects on p450-mediated aromatase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:1203-1208.
- Mori, K., Muramatsu, T., and Nakamura, Y. 1996. Effect of steroid on oyster III : sex reversal from male to female in *Crassostrea gigas* by oestradiol-17 $\beta$ . *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35:1072-1076.
- Moulédous, L., Mollereau, C., and Zajac, J.-M. M. 2010. Opioid-modulating properties of the neuropeptide FF system. *BioFactors (Oxford, England)* 36:423–429.
- Mugumbate, G., Jackson, G. E., and van der Spoel, D. 2011. Open conformation of adipokinetic hormone receptor from the malaria mosquito facilitates hormone binding. *Peptides* 32:553–559.

-N-

- Naimi, A., Martinez, A.-S. S., Specq, M.-L. L., Diss, B., Mathieu, M., and Sourdain, P. 2009a. Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenetic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative*

*biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 154:134–142.

- Naimi, A., Martinez, A.-S. S., Specq, M.-L. L., Mrac, A., Diss, B., Mathieu, M., and Sourdain, P. 2009b. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 152:189–196.
- Nakamura, S., Osada, M., and Kijima, A. 2007. Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Molecular reproduction and development* 74:108–115.
- Narbonne, P. and Roy, R. 2006. Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling. *Development (Cambridge, England)* 133:611–619.
- Nässel, D. R., Enell, L. E., Santos, J. G., Wegener, C., and Johard, H. A. 2008. A large population of diverse neurons in the drosophila central nervous system expresses short neuropeptide F, suggesting multiple distributed peptide functions. *BMC neuroscience* 9:90+.
- Nässel, D. R. and Wegener, C. 2011. A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates: Any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling? *Peptides* .
- Nathans, J. and Hogness, D. S. 1983. Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34:807–814.

-O-

- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., and Barak, L. S. 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of biological chemistry* 275:17201-17210.
- Offermanns, S. and Simon, M. I. 1995. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *The Journal of biological chemistry* 270:15175–15180.
- Okubo, K. and Nagahama, Y. 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta physiologica (Oxford, England)* 193:3–15.
- Olinski, R. P. P., Dahlberg, C., Thorndyke, M., and Hallböök, F. 2006. Three insulin-relaxin-like genes in *Ciona intestinalis*. *Peptides* 27:2535–2546.
- Onitsuka, C., Yamaguchi, A., Kanamaru, H., Oikawa, S., Takeda, T., and Matsuyama, M. 2009. Molecular cloning and expression analysis of a GnRH-like dodecapeptide in the swordtip squid, *Loligo edulis*. *Zoological science* 26:203-208.
- Onken, H., Moffett, S. B., and Moffett, D. F. 2004. The anterior stomach of larval mosquitoes (*Aedes aegypti*): effects of neuropeptides on transepithelial ion transport and muscular

motility. *The Journal of experimental biology* 207:3731-3739.

-P-

- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G Protein-Coupled receptor. *Science* 289:739–745.
- Papke, R. L. and Smith-Maxwell, C. 2009. High throughput electrophysiology with xenopus oocytes. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 12:38–50.
- Park, Y., Kim, Y.-J. J., and Adams, M. E. 2002. Identification of G protein-coupled receptors for drosophila PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11423–11428.
- Parmentier, M. and Detheux, M. 2006. Deorphanization of g-protein-coupled receptors. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings* pp. 163-186.
- Pawson, A. J., Morgan, K., Maudsley, S. R., and Millar, R. P. 2003. Type II gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in reproductive biology. *Reproduction (Cambridge, England)* 126:271-278.
- Pazos, A. and Mathieu, M. 1999. Effects of five natural Gonadotropin-Releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: Stimulation of gonial DNA synthesis. *General and Comparative Endocrinology* 113:112–120.
- Peier, A. M., Desai, K., Hubert, J., Du, X., Yang, L., Qian, Y., Kosinski, J. R., Metzger, J. M., Poci, A., Nawrocki, A. R., Langdon, R. B., and Marsh, D. J. 2011. Effects of peripherally administered neuromedin U on energy and glucose homeostasis. *Endocrinology* 152:2644–2654.
- Piferrer F, Beaumont AR, Falguière J-C, Flajšhans M, Haffray P, Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293:125-56.
- Pissios, P. and Maratos-Flier, E. 2003. Melanin-concentrating hormone: from fish skin to skinny mammals. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14:243–248.
- Price, D. A. and Greenberg, M. J. 1977. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Preparative biochemistry* 7:261-281.

-R-

- Raina, A. K. and Klun, J. A. 1984. Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth. *Science (New York, N.Y.)* 225:531-533.

- Rajpara, S. M., Garcia, P. D., Roberts, R., Eliassen, J. C., Owens, D. F., Maltby, D., Myers, R. M., and Mayeri, E. 1992. Identification and molecular cloning of a neuropeptide Y homolog that produces prolonged inhibition in aplysia neurons. *Neuron* 9:505–513.
- Ramakrishnappa, N., Rajamahendran, R., Lin, Y.-M. M., and Leung, P. C. 2005. GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. *Animal reproduction science* 88:95-113.
- Reinscheid, R. K. 2008. Neuropeptide S: anatomy, pharmacology, genetics and physiological functions. *Results and problems in cell differentiation* 46:145–158.
- Renault, T., Le Deuff, R. M., Cochenec, N., Chollet, B., and Maffart, P. 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Veterinary research* 26:539-543.
- Reis-Henriques, M. and Coimbra, J. 1990. Variations in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 95:343-348.
- Robertson, H. M. 2001. Updating the str and srj (stl) families of chemoreceptors in *Caenorhabditis* nematodes reveals frequent gene movement within and between chromosomes. *Chemical Senses* 26:151-159
- Roch, G. J., Busby, E. R., and Sherwood, N. M. 2011. Evolution of GnRH: Diving deeper. *General and comparative endocrinology* 171:1–16.
- Rodet F., 2008. Caractérisation moléculaire de récepteurs orthologues des récepteurs de type GnRH et mise en évidence de peptides apparentés à la GnRH chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, université de Caen. 364p.
- Rodet, F., Lelong, C., Dubos, M., Costil, K., and Favrel, P. 2005. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1730:187–195.
- Rodet, F., Lelong, C., Dubos, M.-P. P., and Favrel, P. 2008. Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of Gonadotropin-Releasing hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 414:1–9.
- Rosen, O., Manor, R., Weil, S., Gafni, O., Linial, A., Aflalo, E. D., Ventura, T., and Sagi, A. 2010. A sexual shift induced by silencing of a single insulin-like gene in crayfish: ovarian upregulation and testicular degeneration. *PLoS one* 5.

-S-

- Sakai, T., Aoyama, M., Kusakabe, T., Tsuda, M., and Satake, H. 2008. Functions of a GnRH receptor heterodimer of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Acta Biologica Hungarica* 59:241–243.

- Sakai, T., Aoyama, M., Kusakabe, T., Tsuda, M., and Satake, H. 2010. Functional diversity of signaling pathways through G protein-coupled receptor heterodimerization with a species-specific orphan receptor subtype. *Molecular biology and evolution* 27:1097–1106.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J., and Yanagisawa, M. 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573–585.
- Samain J.F., McCombie H. 2007. Mortalités estivales de l’huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Ed Ifremer/Quae, 332 p.
- Scarborough, R. M., Jamieson, G. C., Kalish, F., Kramer, S. J., McEnroe, G. A., Miller, C. A., and Schooley, D. A. 1984. Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:5575–5579.
- Schaefer, M., Picciotto, M. R., Kreiner, T., Kaldany, R. R., Taussig, R., and Scheller, R. H. 1985. *Aplysia* neurons express a gene encoding multiple FMRFamide neuropeptides. *Cell* 41:457-467.
- Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., Nair, R. M., Debeljuk, L., and White, W. F. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science (New York, N.Y.)* 173:1036-1038.
- Schiöth, H. B. and Fredriksson, R. 2005. The GRAFS classification system of G protein coupled receptors in comparative perspective. *General and comparative endocrinology* 142:94–101.
- Schulz, C., Kiger, A. A., Tazuke, S. I., Yamashita, Y. M., Pantalena-Filho, L. C., Jones, D. L., Wood, C. G., and Fuller, M. T. 2004. A misexpression screen reveals effects of bag-of-marbles and TGF beta class signaling on the drosophila male germ-line stem cell lineage. *Genetics* 167:707-723.
- Seeburg, P. H., Mason, A. J., Stewart, T. A., and Nikolics, K. 1987. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent progress in hormone research* 43:69-98.
- Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. 2001. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science (New York, N.Y.)* 294:1307–1313.
- Shi, Y., Huang, H., Deng, X., He, X., Yang, J., Yang, H., Shi, L., Mei, L., Gao, J., and Zhou, N. 2011. Identification and functional characterization of two orphan G protein-coupled receptors for adipokinetic hormones from silkworm *Bombyx mori*. *The Journal of biological chemistry* 286:42390–42402.

- Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology* 59:223-239.
- Shimomura, O. 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of microscopy* 217:1-15.
- Siegert, K. J. 1999. Locust corpora cardiaca contain an inactive adipokinetic hormone. *FEBS letters* 447:237-240.
- Sithigorngul, P., Pupuem, J., Krungkasem, C., Longyant, S., Panchan, N., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., and Petsom, A. 2002. Four novel PYFs: members of NPY/PP peptide superfamily from the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptides* 23:1895-1906.
- Smart, D., Shaw, C., Johnston, C., Thim, L., Halton, D., and Buchanan, K. 1992. Peptide tyrosine phenylalanine: a novel neuropeptide F-related nonapeptide from the brain of the squid, *Loligo vulgaris*. *Biochemical and biophysical research communications* 186:1616-1623.
- Smit, A. B., Jiménez, C. R., Dirks, R. W., Croll, R. P., and Geraerts, W. P. 1992. Characterization of a cDNA clone encoding multiple copies of the neuropeptide APGWamide in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12:1709-1715.
- Smith, S. A., Nason, J., and Croll, R. P. 1997. Detection of APGWamide-like immunoreactivity in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Neuropeptides* 31:155-165.
- Soletchnik, P., Faury, N., and Gouletquer, P. 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of pacific oyster *Crassostrea gigas* (thunberg) in Marennes-Oléron bay (france). *Aquaculture* 252:328-338.
- Soletchnik P, Razet D, Geairon P, Faury N, Gouletquer P 1997. Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): Metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquatic living Resources* 10: 177-185.
- Spittaels, K., Verhaert, P., Shaw, C., Johnston, R. N., Devreese, B., Van Beeumen, J., and De Loof, A. 1996. Insect neuropeptide F (NPF)-related peptides: Isolation from colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) brain. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26:375-382.
- Stables, J., Green, A., Marshall, F., Fraser, N., Knight, E., Sautel, M., Milligan, G., Lee, M., and Rees, S. 1997. A bioluminescent assay for agonist activity at potentially any G protein-coupled receptor. *Analytical biochemistry* 252:115-126.
- Stanek, D. M., Pohl, J., Crim, J. W., and Brown, M. R. 2002. Neuropeptide F and its expression in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Peptides* 23:1367-1378.
- Staubli, F., Jorgensen, T. J., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Sondergaard, L., Roepstorff, P., and Grimmelikhuijzen, C. J. 2002. Molecular identification of the insect

adipokinetic hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:3446–3451.

Stone, J. V., Mordue, W., Batley, K. E., and Morris, H. R. 1976. Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* 263:207–211.

-T-

Takayanagi, Y. and Onaka, T. 2010. Roles of prolactin-releasing peptide and RFamide related peptides in the control of stress and food intake. *The FEBS journal* 277:4998-5005.

Tatemoto, K. 1982. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:5485–5489.

Tello, J. A. and Sherwood, N. M. 2009. Amphioxus: beginning of vertebrate and end of invertebrate type GnRH receptor lineage. *Endocrinology* 150:2847–2856.

Temple, J. L., Millar, R. P., and Rissman, E. F. 2003. An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. *Endocrinology* 144:13-19.

ten Dijke, P., Miyazono, K., and Heldin, C. H. 1996. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Current opinion in cell biology* 8:139-145.

Tensen, C. P., Cox, K. J. A., Burke, J. F., Leurs, R., van der Schors, R. C., Geraerts, W. P. M., Vreugdenhil, E., and van Heerikhuizen, H. 1998. Molecular cloning and characterization of an invertebrate homologue of a neuropeptide Y receptor. *European Journal of Neuroscience* 10:3409–3416.

Terakado, K. 2001. Induction of gamete release by gonadotropin-releasing hormone in a protochordate, *Ciona intestinalis*. *General and comparative endocrinology* 124:277-284.

Trejo, J. and Coughlin, S. R. 1999. The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *The Journal of biological chemistry* 274:2216–2224.

Tsai, P.-S. S. and Zhang, L. 2008. The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. *Biology of reproduction* 79:798–805.

Tsai, P.-S. S., Sun, B., Rochester, J. R., and Wayne, N. L. 2010. Gonadotropin-releasing hormone-like molecule is not an acute reproductive activator in the gastropod, *Aplysia californica*. *General and comparative endocrinology* 166:280-288.

Twan, W.-H. H., Hwang, J.-S. S., Lee, Y.-H. H., Jeng, S.-R. R., Yueh, W.-S. S., Tung, Y.-H.

H., Wu, H.-F. F., Dufour, S., and Chang, C.-F. F. 2006. The presence and ancestral role of gonadotropin-releasing hormone in the reproduction of scleractinian coral, *Euphyllia ancora*. *Endocrinology* 147:397-406.

-V-

- Vadakkadath Meethal, S., Gallego, M. J., Haasl, R. J., Petras, S. J., Sgro, J.-Y. Y., and Atwood, C. S. 2006. Identification of a gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue in *Caenorhabditis elegans*. *BMC evolutionary biology* 6:103+.
- Van Golen, F. A., Li, K. W., de Lange, R. P. J., Jespersen, S., and Geraerts, W. P. M. 1995. Mutually exclusive neuronal expression of peptides encoded by the FMRFa gene underlies a differential control of copulation in lymnaea. *J. Biol. Chem.* 270:28487–28493.
- Veelaert, D., Schoofs, L., and De Loof, A. 1998. Peptidergic control of the corpus cardiacum-corpora allata complex of locusts. *International review of cytology* 182:249–302.
- Veenstra, J. A. 1989. Isolation and structure of corazonin, a cardioactive peptide from the american cockroach. *FEBS letters* 250:231–234.
- Veenstra, J. A. 2009. Does corazonin signal nutritional stress in insects? *Insect biochemistry and molecular biology* 39:755-762.
- Veenstra, J. A. 2010. Neurohormones and neuropeptides encoded by the genome of *Lottia gigantea*, with reference to other mollusks and insects. *General and comparative endocrinology* 167:86–103.
- Veenstra, J. A. and Lambrou, G. 1995. Isolation of a novel RFamide peptide from the midgut of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Biochemical and biophysical research communications* 213:519–524.
- Ventura, T., Rosen, O., and Sagi, A. 2011. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. *General and comparative endocrinology* .
- Visiers, I., Ballesteros, J. A., and Weinstein, H. 2002. Three-dimensional representations of G protein-coupled receptor structures and mechanisms. *Methods in enzymology* 343:329–371.
- Von Eggelkraut-Gottanka, R. and Beck-Sickinger, A. G. 2004. Biosynthesis of peptide hormones derived from precursor sequences. *Current medicinal chemistry* 11:2651–2665.
- Vreugdenhil, E., Geraerts, W. P., Jackson, J. F., and Joosse, J. 1985. The molecular basis of the neuro-endocrine control of egg-laying behaviour in lymnaea. *Peptides* 6 Suppl 3:465-470.

-W-

- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.-L. L., Marissal, E., and Berthe, F. 2002. Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Comptes rendus biologiques* 325:231-238.
- Walker, R. J., S. Papaioannou, 2009. A review of FMRFamide- and RFamide-like peptides in metazoa. *Invertebrate Neuroscience* 9(3-4): 111-53.
- Walther, C., Mörl, K., and Beck-Sickinger, A. G. 2011. Neuropeptide Y receptors: ligand binding and trafficking suggest novel approaches in drug development. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 17:233–246.
- White, R. B., Eisen, J. A., Kasten, T. L., and Fernald, R. D. 1998. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:305–309.
- Widerlöv, E., Lindström, L. H., Wahlestedt, C., and Ekman, R. 1988. Neuropeptide Y and peptide YY as possible cerebrospinal fluid markers for major depression and schizophrenia, respectively. *Journal of psychiatric research* 22:69-79.
- Wilkinson, T. N. and Bathgate, R. A. 2007. The evolution of the relaxin peptide family and their receptors. *Advances in experimental medicine and biology* 612:1–13.
- Wilkinson, T. N., Speed, T. P., Tregear, G. W., and Bathgate, R. A. 2005. Evolution of the relaxin-like peptide family. *BMC evolutionary biology* 5.
- Wilson, S., Bergsma, D. J., Chambers, J. K., Muir, A. I., Fantom, K. G., Ellis, C., Murdock, P. R., Herrity, N. C., and Stadel, J. M. 1998. Orphan G protein-coupled receptors: the next generation of drug targets? *Br J Pharmacol* 125:1387–1392.
- Wise, A., Gearing, K., and Rees, S. 2002. Target validation of G protein coupled receptors. *Drug discovery today* 7:235–246.
- Wise, A., Jupe, S. C., and Rees, S. 2004. The identification of ligands at orphan G protein coupled receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 44:43–66.
- Witten, J. L., Schaffer, M. H., O’Shea, M., Cook, J. C., Hemling, M. E., and Rinehart, K. L. 1984. Structures of two cockroach neuropeptides assigned by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochemical and biophysical research communications* 124:350–358.
- Wu, Q., Wen, T., Lee, G., Park, J. H., Cai, H. N., and Shen, P. 2003. Developmental control of foraging and social behavior by the drosophila neuropeptide Y-like system. *Neuron* 39:147–161.

-X-

Xu, Y.-L. L., Gall, C. M., Jackson, V. R., Civelli, O., and Reinscheid, R. K. 2007. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 500:84–102.

-Y-

Yamanaka, A., Beuckmann, C. T., Willie, J. T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K. i., Sugiyama, F., Goto, K., Yanagisawa, M., and Sakurai, T. 2003. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701–713.

Yang, C.-H. H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L. Y., and Jan, Y.-N. N. 2008. Drosophila egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science (New York, N.Y.)* 319:1679–1683.

Young, K. G., Chang, J. P., and Goldberg, J. I. 1999. Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction. *The Journal of comparative neurology* 404:427–437.

-Z-

Zatylny-Gaudin, C., Bernay, B., Zanuttini, B., Leprince, J., Vaudry, H., and Henry, J. 2010. Characterization of a novel LFRFamide neuropeptide in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Peptides* 31:207–214.

Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Ménard, L., and Caron, M. G. 1996. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* 271:18302-18305.

Zhang, L., Wayne, N. L., Sherwood, N. M., Postigo, H. R., and Tsai, P. S. 2000. Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. *General and comparative endocrinology* 118:77-89.

Zhang, L., Tello, J. A., Zhang, W., and Tsai, P.-S. 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. *General and Comparative Endocrinology* 156:201–209.

Zhuang, H. and Matsunami, H. 2008. Evaluating cell-surface expression and measuring activation of mammalian odorant receptors in heterologous cells. *Nature protocols* 3:1402–1413.