

UNIVERSITÉ de CAEN - BASSE-NORMANDIE

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

ÉCOLE DOCTORALE NORMANDE DE CHIMIE - BIOLOGIE

THÈSE

présentée par

Monsieur Benoît BERNAY

et soutenue

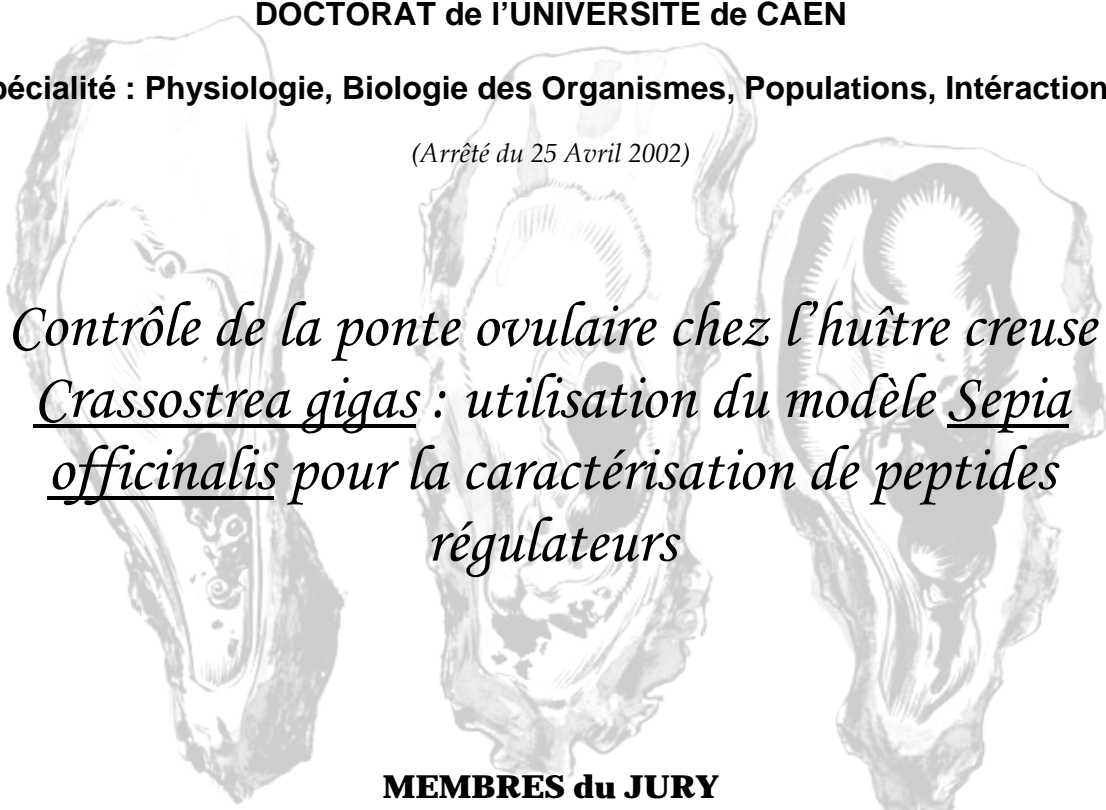
Le 14 Décembre 2005

en vue de l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions.

(Arrêté du 25 Avril 2002)



*Contrôle de la ponte ovulaire chez l'huître creuse
Crassostrea gigas : utilisation du modèle Sepia
officinalis pour la caractérisation de peptides
régulateurs*

MEMBRES du JURY

Mr De LOOF,	Professeur,	Université de Leuven,	Rapporteur
Mr SOYEZ,	Directeur de Recherche CNRS,	Université de Paris VI,	Rapporteur
Mr SAMAIN,	Directeur de Recherche IFREMER,	IFREMER Brest,	Examineur
Mr MATHIEU,	Professeur,	Université de Caen,	Examineur
Mr HENRY,	Maître de Conférences HDR,	Université de Caen,	Directeur de thèse

Je tiens à remercier le Docteur Joël Henry, Maître de Conférences HDR à l'Université de Caen pour la qualité de la direction scientifique qu'il a assuré au cours de cette thèse. Son dynamisme et son optimisme m'ont permis de réaliser ces travaux dans d'excellentes conditions. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur Michel Mathieu, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines et pour sa participation à ce jury de thèse.

Je voudrais remercier Monsieur De Loof, Professeur à l'Université de Leuven, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en étant rapporteur de cette thèse.

Monsieur Soyez, Directeur de Recherche au CNRS a accepté d'être rapporteur de cette thèse, je l'en remercie vivement.

Je remercie Monsieur Samain pour l'intérêt qu'il porte à mon travail et pour avoir accepté de faire parti de ce jury de thèse.

Je remercie Céline Zatylny(j)-Gaudin de l'Université de Caen pour m'avoir fait partager son expérience de la recherche et pour ses encouragements tout au long de cette thèse.

Je souhaite exprimer tous mes remerciements à Michèle Baudy Floc'h Chargée de Recherche au Laboratoire SESO (Institut de Chimie, Rennes) pour sa collaboration dans les synthèses peptidiques.

Je tiens à remercier Monsieur Zanuttini, Maître de Conférences à l'Université de Caen qui a mis au point les logiciels Aaseq et Randseq, outils informatiques indispensables à la recherche de peptides apparentés.

Je remercie Monsieur Gagnon et Monsieur Andrieu du Laboratoire d'enzymologie moléculaire (Institut de Biologie Structurale, J.P. Ebel, Grenoble) pour leur collaboration dans le séquençage de peptides.

Je remercie Monsieur Stéphane Pouvreau de l'écloserie expérimentale d'Argenton pour les approvisionnements en huîtres matures.

Je tiens à remercier le personnel du SMEL de Blainville : Jean Louis Blain, Bertrand Bouchaud et Stéphane Pacary pour le conditionnement des huîtres, leur accueil convivial et l'intérêt qu'ils ont porté aux expérimentations.

Que Monsieur le Professeur Favrel, qui m'a fait profiter de son expérience en biologie moléculaire, et Madame Costil, qui m'a fait partager ses connaissances sur le cycle de l'huître, trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je remercie Aude Houdan, Bertrand Le Roy, Ian Probert et la structure Algobank pour les cultures de microalgues indispensables aux bioessais *in vivo*.

Que Monsieur Roger, Technicien au laboratoire, pour son aide technique et sa bonne humeur communicative trouve ici l'expression de ma plus profonde sympathie.

Je tiens à remercier Madame Adeline, Technicienne au laboratoire pour m'avoir initié aux techniques histologiques.

Je voudrais remercier l'équipage des chalutiers « Père Arthur » et « Gil Dany », leurs commandants Monsieur Rousseville et Gérard, ainsi que Laurence Lafaitteur qui m'ont permis d'obtenir les animaux indispensables à la réalisation de ce travail. A ce titre, je remercie également Thomas Lacoue-labarthe, étudiant en thèse, qui m'a aidé dans l'approvisionnement des dernières seiches de ce travail.

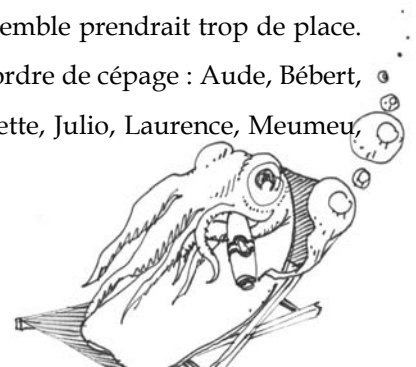
Je remercie Céline Ballandonne et Samuel Thomas, techniciens radioprotection de la structure Imogère pour leur accueil convivial.

Que l'ensemble des techniciens de la Station Marine de Luc sur mer soit remercié pour leur contribution dans le stockage des animaux.

Je tiens à remercier L.L. de Mars, auteur de l'hebdo « Les chants de Maldoror » qui m'a aimablement fourni l'illustration utilisée en page de garde : « Les perles ».

Enfin, je remercie vivement tous les étudiants du laboratoire qui ont animé au quotidien ces trois ans de thèse. Enumérer ici les différents (et excellents) moments passés ensemble prendrait trop de place. Je citerais juste Pierre Dac : « les bons crus font les bonnes cuites ». Par ordre de cépage : Aude, Bébert, Bob, Brice, Caro, Christophe, Estelle, Fanou, Franckie, Jean Marco, Juliette, Julio, Laurence, Meumeu, Mimile, Mimite, Minou, Narayan, Pissou, Ptit kiki, Tomato et Yannick.

Et Christelle qui me supporte depuis si longtemps...



Ce travail a été financé par l'IFREMER
et
le Conseil Régional de Basse Normandie

SOMMAIRE

<i>Introduction générale</i>	<i>Page 1</i>
I. <u>Contexte et problématique</u>	<u>Page 3</u>
II. <u>Les grandes caractéristiques des mollusques</u>	<u>Page 5</u>
III. <u>Description des deux espèces étudiées</u>	<u>Page 6</u>
III.1. L'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)	Page 6
III.1.1. Généralités	Page 6
a) <i>Classification</i>	Page 6
b) <i>Biotope</i>	Page 6
c) <i>L'ostréiculture</i>	Page 6
III.1.2. Anatomie	Page 7
a) <i>Le système nerveux</i>	Page 7
b) <i>L'appareil circulatoire</i>	Page 7
c) <i>La gonade</i>	Page 10
III.1.3. Cycle biologique	Page 10
III.1.4. Modalité de la ponte	Page 14
III.1.5. Fécondation	Page 14
III.1.6. Changement de sexe	Page 15
III.2. La seiche, <i>Sepia officinalis</i> (Linné, 1758)	Page 16
III.2.1. Généralités	Page 16
a) <i>Classification</i>	Page 16
b) <i>Répartition</i>	Page 16
III.2.2. Anatomie	Page 17
a) <i>Le système nerveux</i>	Page 17
b) <i>L'appareil circulatoire</i>	Page 18
c) <i>L'appareil génital</i>	Page 18
III.2.3. Cycle biologique	Page 20
III.2.4. Gamétogenèse et ponte	Page 22
III.2.5. Accouplement	Page 25

IV.	<u>Contrôle moléculaire de la ponte</u>	<u>Page 26</u>
	IV. 1. Les facteurs régulateurs de la ponte	Page 26
	IV.1.1. Les bivalves	Page 26
	IV.1.2. Les céphalopodes	Page 26
	IV.2. Les voies de régulation de la ponte	Page 27
	IV.2.1. Contrôle nerveux	Page 27
	IV.2.2. Contrôle hormonal	Page 28
	IV.2.3. Contrôle ovarien	Page 29
V.	<u>Importance et conservation des familles peptidiques au cours de l'évolution chez les invertébrés</u>	<u>Page 30</u>
	VI.1. ELH-CDCH	Page 30
	VI.2. BCP-CDCP	Page 31
	VI.3. SAPs	Page 32
	VI.4. Attractine	Page 32
	VI.5. FaRPs	Page 33
	VI.6. APGWa-RPs	Page 35
	VI.7. Allatostatines	Page 36
	VI.8. MIPs	Page 36
	VI.9. Myomodulines	Page 38
VI.	<u>Approche expérimentale</u>	<u>Page 39</u>
	<i>Matériels et méthodes</i>	<i>Page 41</i>
I.	<u>Matériel vivant</u>	<u>Page 43</u>
II.	<u>Prélèvement des organes</u>	<u>Page 43</u>
III.	<u>Extraction et prépurification</u>	<u>Page 43</u>
IV.	<u>Chromatographie liquide haute performance (CLHP)</u>	<u>Page 43</u>
V.	<u>microLC-ESI-MS/MS</u>	<u>Page 44</u>
VI.	<u>Purification en LC-ESI-MS</u>	<u>Page 44</u>

VII.	<u>Bioessai myotrope</u>	<u>Page 44</u>
VIII.	<u>Séquençage par dégradation N-terminale d'Edman</u>	<u>Page 45</u>
IX.	<u>Recherche de peptides apparentés et séquençage <i>de novo</i></u>	<u>Page 45</u>
X.	<u>Bioessai <i>in vivo</i></u>	<u>Page 47</u>

*Partie I : Identification de facteurs peptidiques ovariens
impliqués dans le contrôle de la ponte chez
le céphalopode *Sepia officinalis** *Page 49*

I.	<u>Introduction</u>	<u>Page 51</u>
II.	<u>Approche expérimentale</u>	<u>Page 53</u>
III.	<u>Identification d'un facteur ovarien : le SepCRP</u>	<u>Page 55</u>
IV.	<u>Caractérisation d'une famille de facteurs ovariens : les R-SepCRPs</u>	<u>Page 65</u>
V.	<u>Caractérisation d'une seconde famille de facteurs ovariens : les OJPs</u>	<u>Page 79</u>
VI.	<u>Recherche des précurseurs des R-SepCRPs et des OJPs</u>	<u>Page 102</u>
	VI.1. Introduction	Page 102
	VI.2. Matériels et méthodes	Page 103
	VI.2.1. Criblage de banque	Page 103
	a) Préparation des oligonucléotides marqués	Page 103
	b) Protocole de criblage	Page 103
	VI.2.2. Excision <i>in vivo</i>	Page 105
	VI.2.3. Purification et séquençage	Page 106
	VI.3. Résultats	Page 107
	VI.3.1. Criblage de banque	Page 107
	a) Oligonucléotide EIS	Page 107
	b) Oligonucléotide DEV	Page 107
	VI.3.2. Séquençage des clones	Page 107
	a) Oligonucléotide EIS	Page 107
	b) Oligonucléotide DEV	Page 109

VI.4. Discussion	Page 110
VII. <u>Conclusion</u>	<u>Page 111</u>
<i>Partie II : Recherche de facteurs peptidiques impliqués dans le contrôle de la ponte ovulaire chez Crassostrea gigas : utilisation de la seiche Sepia officinalis comme modèle</i>	<i>Page 115</i>
I. <u>Introduction</u>	<u>Page 117</u>
II. <u>Approche expérimentale</u>	<u>Page 119</u>
II.1. Recherche de peptides apparentés aux peptides ovariens de seiche	Page 119
II.2. Recherche de nouveaux peptides régulateurs	Page 119
III. <u>Recherche de peptides apparentés aux R-SepCRPs et OJPs chez C. gigas</u>	<u>Page 120</u>
III.1. Introduction	Page 120
III.2 Matériels et méthodes	Page 121
III.2.1. Recherche de peptides apparentés aux R-SepCRPs et OJPs chez <i>Crassostrea gigas</i>	Page 121
a) Analyse en microLC-ESI-MS/MS	Page 121
b) Elaboration de banques de séquences peptidiques	Page 121
c) Recherche de molécules apparentées	Page 122
III.2.2. Test des différents facteurs chez <i>C. gigas</i>	Page 122
III.3. Résultats	Page 123
III.3.1. Recherche de molécules apparentées aux R-SepCRPs et OJPs chez <i>Crassostrea gigas</i>	Page 123
III.3.2. Bioessai <i>in vivo</i> chez <i>C. gigas</i>	Page 123
III.4. Discussion	Page 124
IV. <u>Identification de deux peptides régulateurs libérés avec les produits génitaux chez C. gigas</u>	<u>Page 125</u>
V. <u>Conclusion</u>	<u>Page 1519</u>
<i>Conclusion générale et perspectives</i>	<i>Page 157</i>
<i>Bibliographie</i>	<i>Page 163</i>

Index des figures

Figure 1 : Anatomie interne de l'huître <i>Crassostrea gigas</i> , mature (A) et immature (B).	Page 8
Figure 2 : Représentation schématique du système nerveux de <i>Crassostrea gigas</i> (A). Vue détaillée du ganglion viscéral (B).	Page 9
Figure 3 : Cycle de l'huître creuse <i>C. gigas</i> .	Page 11
Figure 4 : Cycle de reproduction de l'huître <i>C. gigas</i> en milieu tempéré.	Page 12
Figure 5 : Etapes de l'émission des gamètes chez <i>C. gigas</i> .	Page 13
Figure 6 : Contractions du muscle adducteur observées lors de l'émission des gamètes chez un mâle (A) et une huître femelle en 1936 (B) puis mâle en 1937 (C).	Page 15
Figure 7 : Répartition géographique de l'espèce <i>Sepia officinalis</i> .	Page 16
Figure 8 : Vue dorsale du système nerveux central.	Page 17
Figure 9 : Vue ventrale de l'appareil génital femelle de <i>Sepia officinalis</i> .	Page 19
Figure 10 : Cycle biologique de <i>Sepia officinalis</i> en Baie de Seine.	Page 21
Figure 11 : Etapes de la ponte ovulaire chez <i>S. officinalis</i> .	Page 24
Figure 12 : Détermination de la séquence peptidique par le logiciel Sequest.	Page 46
Figure 13 : Approche expérimentale mise en œuvre pour rechercher des peptides libérés par les ovocytes dans le milieu extérieur.	Page 54
Figure 14 : Protocole du criblage de banque à l'aide d'oligonucléotides marqués.	Page 104
Figure 15 : Séquence du clone positif obtenu après criblage avec l'oligonucléotide EIS.	Page 108
Figure 16 : Séquence du clone positif obtenu après criblage avec l'oligonucléotide DEV.	Page 109
Figure 17 : Représentation schématique des différentes étapes du contrôle de l'émission des ovocytes chez la seiche <i>S. officinalis</i> .	Page 113
Figure 18 : Mouvements de la coquille, mesurés par un kymographe, au cours de la ponte de deux femelles déclenchée soit par ajout de sperme (A) soit par choc thermique (B).	Page 115
Figure 19 : Effet des différents R-SepCRPs et OJPs sur les contractions du muscle adducteur chez <i>C. gigas</i> .	Page 123
Figure 20 : Activité contractile du tractus génital femelle de <i>S. officinalis</i> . Effet des fractions organiques de produits génitaux mâles (A) et femelles (B) de <i>C. gigas</i> .	Page 124
Figure 21 : Représentation schématique des différentes étapes du contrôle de l'émission des ovocytes chez l'huître creuse <i>C. gigas</i> .	Page 154

Index des tableaux

Tableau 1 : Alignement des peptides appartenant à la famille des hormones de ponte caractérisés chez les gastéropodes et les nématodes.	Page 30
Tableau 2 : Homologie de séquence entre l'ovuline de drosophile et l'ELH d' <i>A. californica</i> .	Page 31
Tableau 3 : Conservation du motif RLRf entre les différents BCP et CDCP.	Page 31
Tableau 4 : Alignement des différentes attractines d'Aplysies. Conservation du motif IEECKTS.	Page 32
Tableau 5 : FaRPs caractérisés dans différentes classes de mollusques.	Page 33
Tableau 6 : APGWa-RPs caractérisés dans différents groupes d'invertébrés.	Page 35
Tableau 7 : MIPs caractérisés chez différentes espèces de mollusques.	Page 37
Tableau 8 : Peptides apparentés aux myomodulines caractérisés dans différents groupes d'invertébrés.	Page 38
Tableau 9 : Banques créées par Aaseq 5.0.	Page 121

Glossaire

LC-ESI-MS : CLHP, pi connectée en ligne à un spectromètre de masse dont la source est de type electrospray (ESI).

Source ESI : L'ionisation des molécules se déroule à pression atmosphérique. L'échantillon est repris en solution et introduit dans la source par l'intermédiaire d'un fin capillaire. Sous l'action conjuguée d'un gaz nébuliseur (N₂) et d'un champ électrique, un fin brouillard de gouttelettes polychargées est créé.

Mode full-scan : Mesure des valeurs de m/z des ions présents dans l'extrait analysé.

MS/MS : Mode permettant une fragmentation d'un ion moléculaire, généralement par rupture de la liaison peptidique.

Mode datadependent-scan : Mode d'analyse permettant de fragmenter l'ion moléculaire le plus abondant déterminé à chaque balayage de la gamme de masse.

Exclusion dynamique : Exclusion des ions déjà sélectionnés pour la MS/MS (pendant une durée fixée par l'opérateur).

Ions a et b : Ions N-terminaux.

Ions y : Ion C-terminaux.

Introduction générale

Introduction générale	Page 1
I. <u>Contexte et problématique</u>	Page 3
II. <u>Les grandes caractéristiques des mollusques</u>	Page 5
III. <u>Description des deux espèces étudiées</u>	Page 7
III.1. L'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)	Page 7
III.1.1. Généralités	Page 7
a) <i>Classification</i>	Page 7
b) <i>Biotope</i>	Page 7
c) <i>L'ostréiculture</i>	Page 7
III.1.2. Anatomie	Page 8
a) <i>Le système nerveux</i>	Page 8
b) <i>L'appareil circulatoire</i>	Page 8
c) <i>La gonade</i>	Page 11
III.1.3. Cycle biologique	Page 11
III.1.4. Modalité de la ponte	Page 15
III.1.5. Fécondation	Page 15
III.1.6. Changement de sexe	Page 16
III.2. La seiche, <i>Sepia officinalis</i> (Linné, 1758)	Page 17
III.2.1. Généralités	Page 17
a) <i>Classification</i>	Page 17
b) <i>Répartition</i>	Page 17
III.2.2. Anatomie	Page 18
a) <i>Le système nerveux</i>	Page 18
b) <i>L'appareil circulatoire</i>	Page 19
c) <i>L'appareil génital</i>	Page 19
III.2.3. Cycle biologique	Page 21
III.2.4. Gamétogenèse et ponte	Page 23
III.2.5. Accouplement	Page 26
IV. <u>Contrôle moléculaire de la ponte</u>	Page 27
IV. 1. Les facteurs régulateurs de la ponte	Page 27
IV.1.1. Les bivalves	Page 27
IV.1.2. Les céphalopodes	Page 27
IV.2. Les voies de régulation de la ponte	Page 28
IV.2.1. Contrôle nerveux	Page 28
IV.2.2. Contrôle hormonal	Page 29
IV.2.3. Contrôle ovarien	Page 30
V. <u>Importance et conservation des familles peptidiques au cours de l'évolution chez les invertébrés</u>	Page 31
VI.1. ELH-CDCH	Page 31
VI.2. BCP-CDCP	Page 32
VI.3. SAPs	Page 33
VI.4. Attractine	Page 33
VI.5. FaRPs	Page 34
VI.6. APGWa-RPs	Page 36
VI.7. Allatostatines	Page 37
VI.8. MIPs	Page 37
VI.9. Myomodulines	Page 39
VI. <u>Approche expérimentale</u>	Page 40

I. Contexte et problématique

L'huître est l'une des premières espèces marines cultivée par l'homme. Le plus vieil exemple vient du romain Sergius Orata (140-91 av. JC), qui eut l'idée de stocker et d'engraisser des huîtres en vivier, lassé de les faire venir des côtes françaises.

En France, ce n'est qu'au milieu du XIX^{ème} siècle, que les parcs à huîtres font leur apparition. Ce mollusque cesse alors d'être exploité uniquement en tant que ressource de pêche. L'ostréiculture prend rapidement son essor et occupe une part importante des activités aquacoles. En 2003, avec une production de 128 000 tonnes (source : Comité National de la Conchyliculture), elle arrive en tête de l'aquaculture française. La France se situe au premier rang des producteurs d'huîtres en Europe et au quatrième rang mondial derrière la Chine (3 292 000 tonnes), le Japon (222 000 tonnes) et la Corée (208 000 tonnes) (chiffres du CNC de 1999).

Sur le territoire français, la mise en marché des huîtres est caractérisée par le rôle central des entreprises de Charente-Maritime (44%) et de Bretagne (21%). Cependant, les différentes étapes de la production sont réalisées dans des bassins distincts. En effet, l'étape de captage qui consiste à récolter les larves (ou naissains) grâce à des collecteurs, est en quasi totalité assurée par les bassins de Marennes Oléron et d'Arcachon. Le faible captage des bassins bretons, vendéens et normands oblige les producteurs à importer des naissains des bassins charentais ou à s'approvisionner auprès des écloséries locales qui deviennent un maillon de plus en plus important au sein de la filière ostréicole. Le développement de l'ostréiculture dans le futur passe donc par l'optimisation de la production de naissain en éclosérie et par la maîtrise du contrôle de la fécondité des géniteurs.

L'état des connaissances actuelles concernant la régulation de la ponte chez l'huître ne permettant pas de répondre à cet objectif, l'Ifremer a choisi dans cette optique de créer un programme de recherche sur ces aspects. Le sujet de thèse développé au cours de ces trois années s'inscrit dans cette thématique et vise à caractériser les aspects biochimiques et endocriniens de l'émission des gamètes chez cette espèce.

L'huître présentant une anatomie complexe et peu adaptée à des études physiologiques (système nerveux non centralisé, système circulatoire ouvert et organes non individualisés),

la recherche de facteurs régulateurs de la ponte par une approche classique (purification en CLHP couplée à différents bioessais) semble vouée à l'échec. Afin de contourner cette difficulté, une stratégie croisée, c'est-à-dire un transfert technologique de la seiche vers l'huître, a été mise en oeuvre. Cette approche s'appuie sur les travaux antérieurs réalisés au Laboratoire de Biologie et Biotechnologie Marines. En effet, chez *Sepia officinalis*, différents bioessais visant à caractériser des facteurs régulateurs de la ponte ont déjà été mis au point.

La stratégie expérimentale mise en oeuvre au cours de cette étude, consiste dans un premier temps à identifier de nouveaux facteurs régulateurs chez *Sepia officinalis*. Dans un deuxième temps, ces données sont utilisées pour rechercher des molécules apparentées chez *Crassostrea gigas*. En postulant sur une conservation (même partielle) des séquences primaires entre ces deux espèces, des facteurs de ponte pourront ainsi être identifiés chez l'huître grâce à des outils tels que la spectrométrie de masse.

II. Les grandes caractéristiques des mollusques

Les deux espèces étudiées lors de cette étude sont l'huître creuse *Crassostrea gigas* et la seiche *Sepia officinalis*. Elles appartiennent à l'embranchement des mollusques. Ce sont des métazoaires cœlomates, protostomiens, hyponeuriens à symétrie bilatérale. Cet embranchement est caractérisé par la disparition de la métamérisation et par la présence d'un corps mou qui se divise en trois parties :

- le cephalopodium (tête et pied), qui est souvent bien individualisé
- la masse viscérale (complexe palléo-viscéral), qui comprend le système digestif, les gonades, le cœur et les reins
- le manteau, qui correspond à une formation tégumentaire qui enveloppe la masse viscérale.

Ce phylum est l'un des plus diversifié. Les données sur la relation phylogénétique du groupe, longtemps controversées (Ballard *et al*, 1992 ; Wagele et Stanjek, 1995), font maintenant état d'un groupe polyphylétique (Winnepenincks *et al*, 1996 ; Passamaneck *et al*, 2004) séparé en sept classes :

- les **aplacophores** dont le manteau ne sécrète pas de coquille mais uniquement des spicules calcaires
- les **monoplacophores** qui présentent une coquille univalve
- les **polyplacophores** qui sont aplatis dorso-ventralement et possèdent une coquille constituée par 7 à 8 plaques calcaires articulées entre elles
- les **bivalves** dont la coquille au stade adulte est constituée de deux valves accolées latéralement (l'huître creuse *Crassostrea gigas* appartient à cette classe)
- les **scaphopodes** qui présentent une coquille en forme de tube conique, ouverte aux deux extrémités
- les **gastéropodes** chez lesquels la masse viscérale subit une torsion de 180° au cours du développement
- les **céphalopodes** dont le pied est modifié en un appareil tentaculaire et un entonnoir. De plus, le système nerveux est céphalisé (l'un des deux modèles de cette thèse, la seiche *Sepia officinalis* appartient à cette classe).

III. Description des deux espèces étudiées

III.1. L'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793)

III.1. 1. Généralités

a) Classification



- **Classe :** Bivalve
- **Ordre :** Filibranchia
- **Famille :** Ostreidae
- **Genre :** *Crassostrea*
- **Espèce :** *gigas*

b) Biotope

L'huître creuse est une espèce exclusivement aquatique qui peut cependant survivre à des exondations prolongées. La larve est planctonique nageuse tandis que les adultes vivent fixés au niveau de la zone intertidale ou en zone estuarienne (partie du littoral se découvrant à chaque marée).

c) L'ostréiculture

En France, l'ostréiculture débute pendant la seconde moitié du XIX^{ème} siècle avec la production de l'huître plate indigène *Ostrea edulis*. En 1920, après une première épizootie, le cheptel est anéanti. La production reprend progressivement grâce à l'introduction d'une nouvelle espèce, l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata*, qui est décimée à son tour par une nouvelle épizootie en 1971. C'est l'huître creuse *Crassostrea gigas*, aussi appelée huître japonaise en raison de son origine géographique, qui est alors importée et cultivée. Cette espèce est encore produite actuellement.

Après le captage des naissains assuré par la mise en place de collecteurs, les huîtres sont décrochées de leur support (étape de détachage) puis orientées en fonction de leur morphologie vers les différents bassins de production. Les huîtres passent entre trois et

quatre ans dans des parcs (étape de grossissement). Elles sont placées au sol en milieu profond, ou dans des poches amarrées à des systèmes flottants ou posées sur des tables. La Normandie et la Bretagne présentent des conditions optimales de croissance et sont donc les bassins privilégiés des ostréiculteurs pour cette étape. Enfin, au terme du grossissement en mer, certaines huîtres sont affinées en claire au cœur du bassin de Marennes Oléron.

III.1.2. Anatomie

Les muscles, le système nerveux et le système circulatoire sont logés dans le manteau. Au niveau de la charnière, deux lobes soudés l'un à l'autre forment le capuchon céphalique qui recouvre la bouche et les palpes labiaux. Les deux lobes du manteau délimitent la cavité palléale. Celle-ci, est constituée de deux chambres séparées par les branchies : la chambre inhalante du côté ventral et la chambre exhalante du côté dorsal. A maturité, la cavité palléale est majoritairement occupée par la gonade (Figure 1).

a) Le système nerveux

Le système nerveux s'organise le long du tube digestif. Il est constitué de deux paires de connectifs longitudinaux, portant trois paires de ganglions espacés et réunis par des anastomoses transverses. Chez les lamellibranches, les ganglions cérébroïdes et pleuraux-palléaux sont fusionnés et situés de part et d'autre de l'œsophage, à la base des palpes labiaux. Ils sont reliés par un court connectif aux ganglions pédieux, également situés à la base des palpes labiaux. Deux ganglions viscéraux sont localisés côte à côte à la base du muscle adducteur postérieur, entre la partie lisse et la partie striée (Figure 2). Ces derniers sont suspectés de jouer un rôle dans le contrôle de la gamétogenèse (Lubet, 1981).

b) L'appareil circulatoire

Chez les bivalves, l'appareil circulatoire est ouvert et lacunaire. Il est formé d'un vaisseau dorsal prolongé par de nombreuses artères. Le cœur, accolé au muscle adducteur, est logé dans une enveloppe péricardique. Il est constitué par un ventricule où aboutissent quatre veines branchiales dont les extrémités renflées forment les oreillettes.

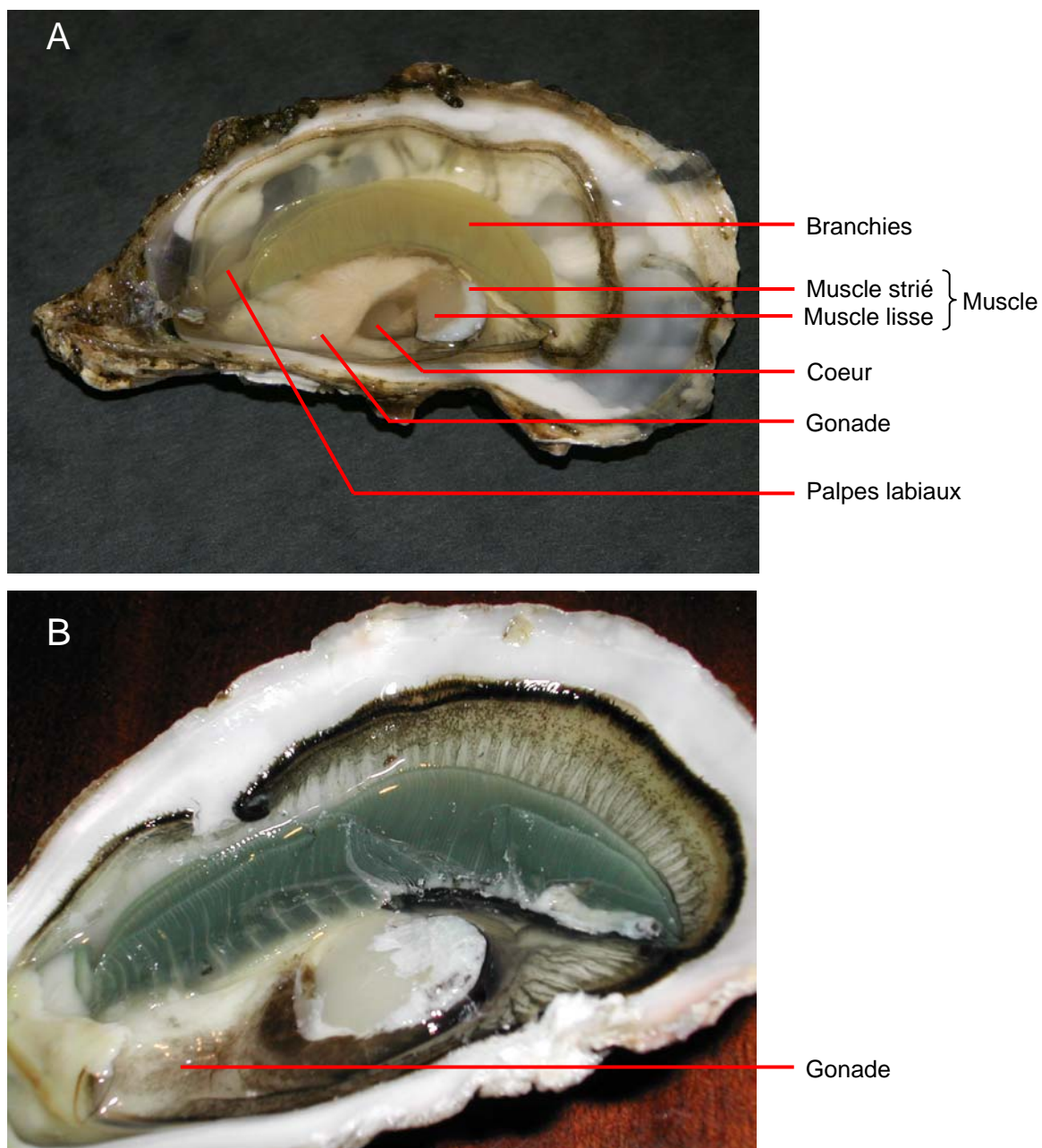


Figure 1 : Anatomie interne de l'huître *Crassostrea gigas*, mature (A) et immature (B).

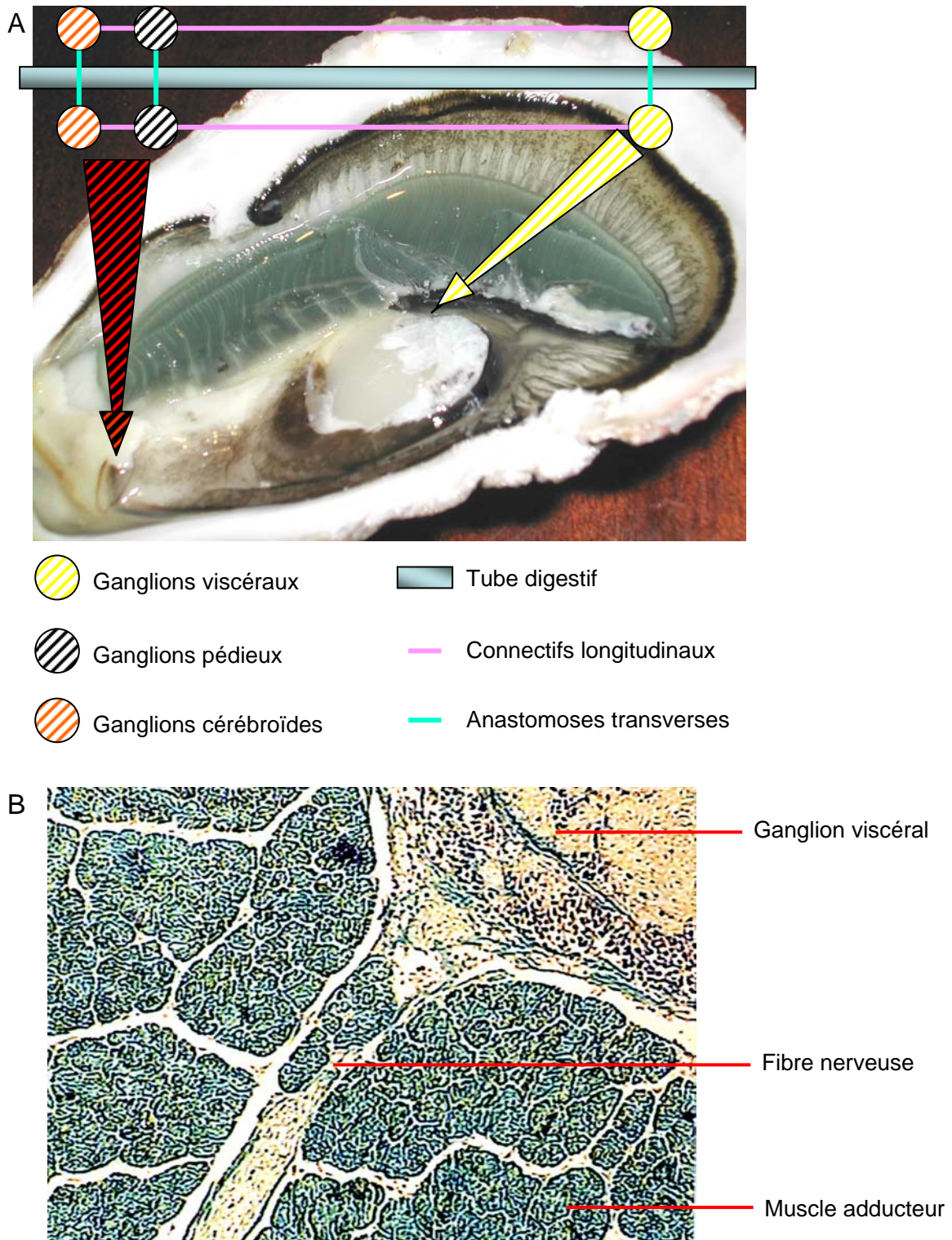


Figure 2 : Représentation schématique du système nerveux de *Crassostrea gigas* (A).
 Vue détaillée du ganglion viscéral (B).

c) La gonade

Cet organe qui est pair lors de l'embryogenèse, fusionne en un organe unique chez l'adulte. C'est une structure diffuse et massive qui est enchâssée entre les diverticules digestifs d'un côté et la surface de l'épithélium de l'autre. Chez les animaux sexuellement matures, elle recouvre la totalité de la masse viscérale antérieure. Son organisation, similaire chez les deux sexes, est comparable à celle des autres bivalves (Eckelbarger et Davis, 1996). Elle est formée de deux systèmes de tubules gonadiques ramifiés, situés de part et d'autre du corps de l'animal, qui s'anastomosent à leur extrémité pour former le gonoducte.

Chez la femelle, un mince épithélium germinale tapisse le follicule ovarien. Celui-ci est constitué d'ovocytes en développement associés à des cellules folliculaires (Eckelbarger, 1994). Ces dernières entourent les ovocytes prévitellogéniques et vitellogéniques précoces. Elles sont à l'origine de l'expression de vitellines (Suzuki *et al*, 1992 ; Matsumoto *et al*, 2003).

A maturité, les ovocytes ou les spermatozoïdes sont libérés dans le gonoducte et progressent dans ce conduit génital grâce à l'épithélium ciliaire qui tapisse la surface endothéliale. Ces mouvements ciliaires observés chez *O. edulis* (Hoek, 1883), ont ensuite été décrits chez *O. lurida* et différentes espèces du genre *Crassostrea*. Ils sont impliqués dans le transport puis dans l'évacuation des gamètes dans la chambre épibranchiale (ou chambre exhalante), au niveau du pore génital (gonopore). Des fibres contractiles disposées le long du gonoducte sont également suspectées de faciliter le transport et l'évacuation des gamètes à l'aide de contractions musculaires. Certaines études suggèrent que ce réseau musculaire serait plus développé au sein de la gonade mâle que la gonade femelle (Galtsoff, 1964).

III.1.3. Cycle biologique

Bien que le cycle biologique de l'huître soit sous la dépendance de nombreux facteurs environnementaux, il peut être résumé et décomposé de la façon suivante :

- le développement indirect de l'huître donne naissance à une larve pélagique trochophore. Il se poursuit par un stade véligère (formation des deux valves) puis pédivéligère (ébauche des branchies et différenciation du système nerveux). La fixation est suivie d'une étape de métamorphose au cours de laquelle les tissus et organes se réorganisent pour donner le naissain (Figure 3),

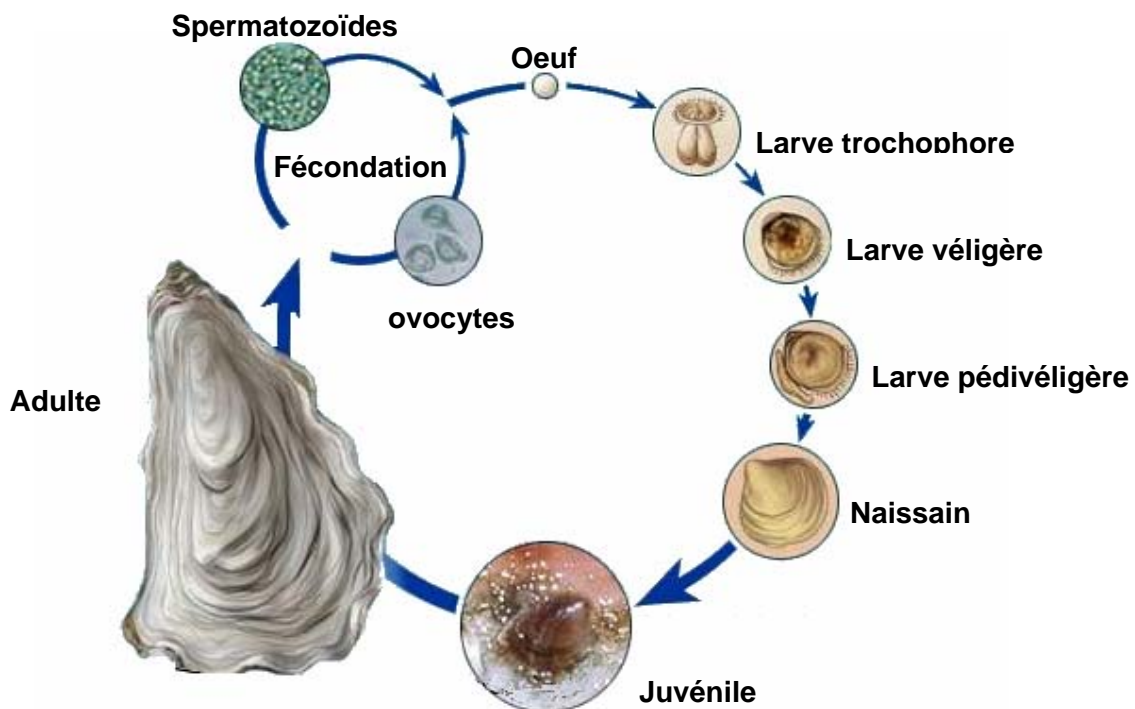


Figure 3 : Cycle de l'huître creuse *C. gigas* (d'après <http://www.planete-nature.org/>).

- les huîtres acquièrent leur maturité sexuelle au cours de la première année. Le développement des lignées germinales, qui correspond à une succession de mitoses puis de méioses goniales, s'accélère progressivement dès la fin de l'hiver jusqu'à la maturité sexuelle en été (Lango-Reynoso *et al*, 2000) (Figure 4),
- en période estivale, l'émission des produits génitaux est fonction des conditions thermiques et trophiques. Elle peut être totale dans les régions où les eaux sont les plus chaudes (région méditerranéenne ou Charente-maritime), alors qu'elle n'est que partielle ou absente dans les régions où les eaux sont les plus froides (Normandie ou Bretagne Nord). Ces émissions partielles expliquent donc les faibles captages observés dans les bassins associés,
- en automne, après l'émission des produits génitaux et l'atrésie des gamètes résiduels, les tubules gonadiques régressés présentent une gamétogenèse lente qui ne correspond pas réellement à un véritable repos sexuel (Lubet, 1991).

Diverses études ont mis en évidence l'influence des facteurs trophiques et thermiques dans la gamétogenèse (Mann, 1979 ; Lubet, 1980) et l'émission des produits génitaux (Nelson, 1928 ; Deslous-Paoli *et al*, 1982 ; Heral *et al*, 1986 ; Maurer et Borel, 1986).

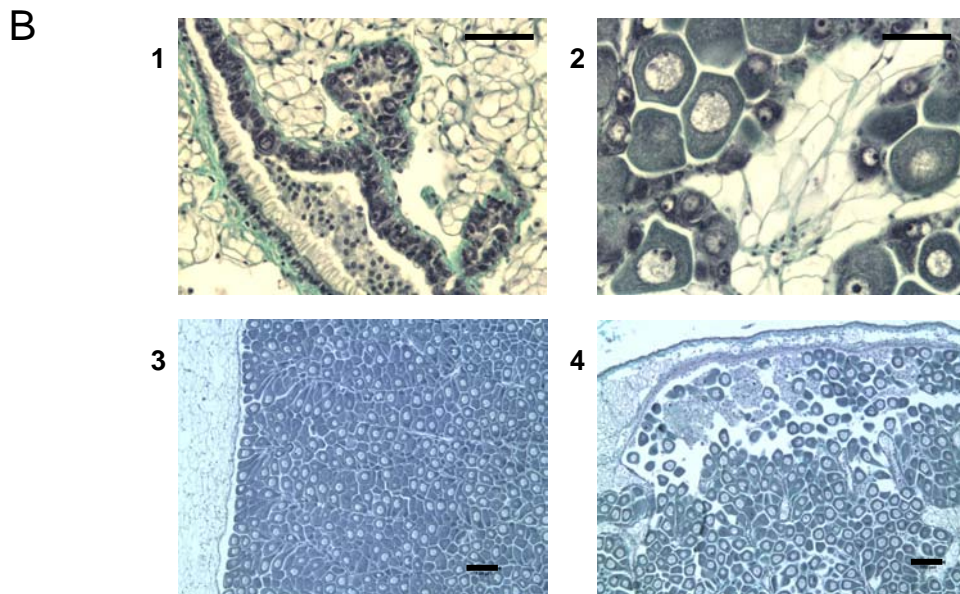
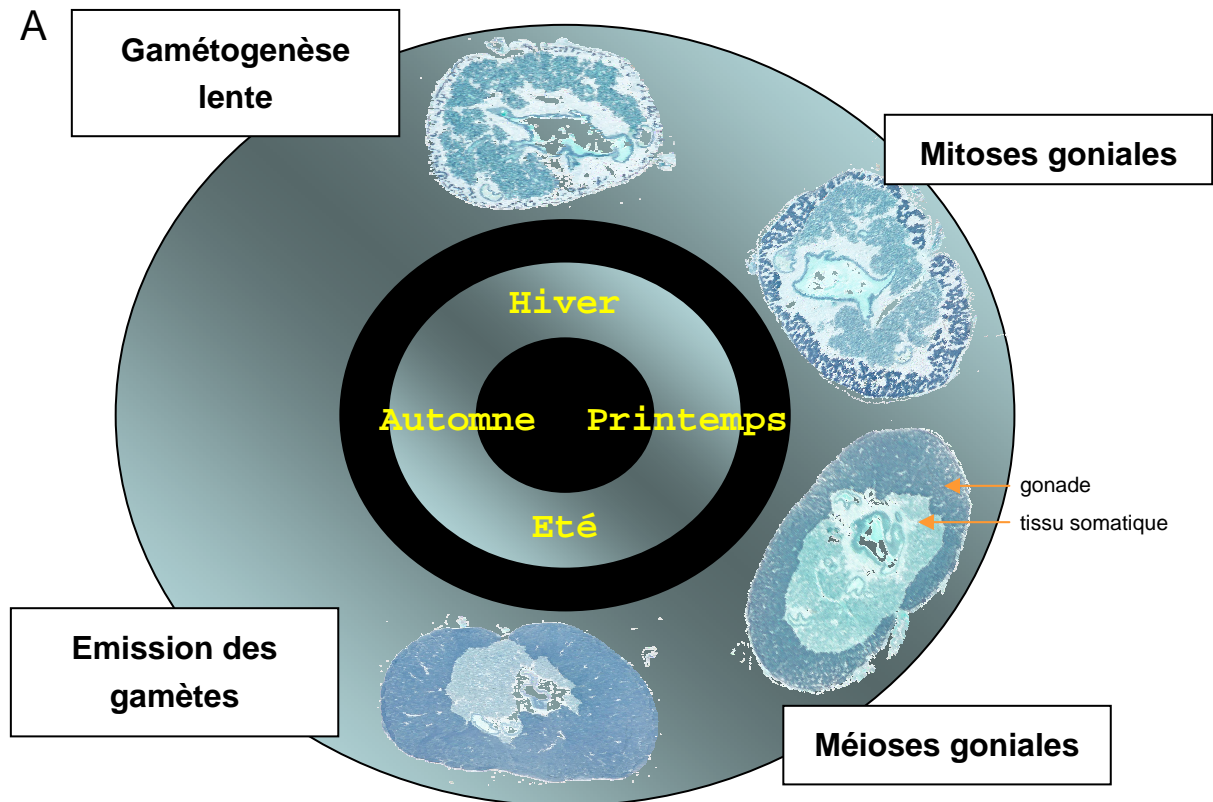


Figure 4 : Cycle de reproduction de l'huître *C. gigas* en milieu tempéré. Des coupes transversales d'huîtres réalisées au niveau de l'extrémité antérieure de l'animal, montrent l'envahissement du tissu conjonctif par le tissu gonadique au cours de la maturation sexuelle (A). Coupes histologiques d'ovaires de *C. gigas* à différents stades : début de multiplication des gonies (1), mitoses goniales (2), maturité (3) et post-ponte (4) (B).

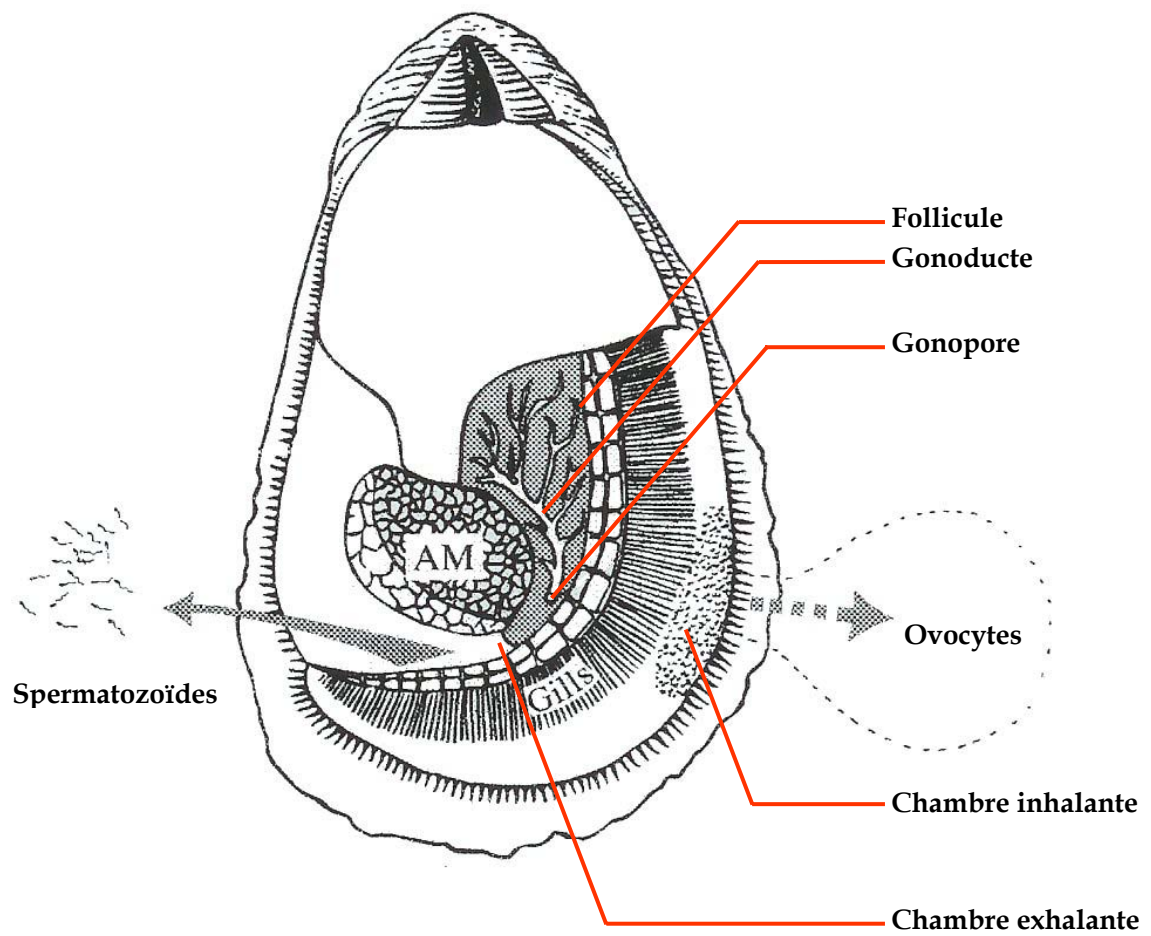


Figure 5 : Etapes de l'émission des gamètes chez *C. gigas* (Adaptée de O Foighil et Taylor, 2000). (AM : muscle adducteur ; Gills : branchies).

Au niveau thermique, les travaux de Galtsoff (1961) montrent que la ponte n'est pas dépendante d'une température « critique » mais plutôt sous l'influence d'une variation élevée et rapide de la température.

III.1.4. Modalité de la ponte

Entre juin et septembre, deux à trois pontes (avec une première émission partielle) peuvent être observées (Galtsoff, 1964 ; Lubet et Choquet, 1971). La première étape, qui est similaire chez les deux sexes, se caractérise par la décharge et l'accumulation des produits génitaux dans la chambre épibranchiale (Galtsoff, 1938a).

Chez le mâle, c'est l'intervention du courant respiratoire (ou courant exhalant) qui assure l'évacuation des gamètes, stockés au niveau de la chambre exhalante, dans le milieu environnant. Chez la femelle, le comportement de ponte est plus complexe et implique plusieurs organes qui interviennent selon une séquence particulière. Dans un premier temps, les deux bords du manteau se rapprochent puis se soudent, bloquant ainsi la libération des ovocytes par le courant respiratoire. Toutefois, un espace communément appelé « fenêtre » persiste à la périphérie du manteau. Bien que sa localisation soit variable, elle reste stable au cours de la ponte. Les ovocytes préalablement libérés et stockés dans la chambre exhalante, traversent les branchies sous l'effet des contractions du muscle adducteur pour s'accumuler dans la chambre inhalante. Les études de Nelson et Allison (1940) montrent que le sperme contient des facteurs capables de stimuler le débit d'eau au niveau des branchies et ainsi faciliter le transport des ovocytes au travers de la branchie. Enfin, les contractions du muscle adducteur permettent l'évacuation des gamètes au niveau de la « fenêtre » formée (Nelson, 1921 ; Galtsoff, 1930a, 1938a, b, 1961, 1964 ; Nelson et Allison 1940) (Figure 5). Ces contractions sont stimulées par des facteurs libérés avec les produits génitaux mâles (Galtsoff, 1938b). Elles entraînent des mouvements de la coquille si caractéristiques qu'ils ne peuvent être confondus avec une autre activité musculaire (Galtsoff, 1938b).

III.1.5. Fécondation

Chez *Crassostrea gigas*, la fécondation est externe. Plus sensibles aux variations des conditions environnementales, les mâles sont généralement les premiers à émettre leurs produits génitaux stimulant ainsi l'émission des individus voisins. Le phénomène s'étend

ensuite à l'ensemble de la communauté. Les spermatozoïdes libérés avec le courant exhalant, restent en suspension dans la masse d'eau avoisinante pendant plusieurs heures. Il arrive que la mer prenne une teinte blanchâtre tant les émissions sont simultanées et abondantes. La réponse des femelles, plus spécifique que celle des mâles, est induite lors de la présence de produits génitaux mâles dans le milieu (Galtsoff, 1964). Cette spécificité de la réponse femelle, associée à un mécanisme complexe d'évacuation des gamètes, assure une libération et une dispersion efficace des ovocytes dans la masse d'eau au moment où les gamètes mâles sont présents. Des expériences de scission du muscle adducteur montrent que les ovocytes peuvent être libérés par le courant exhalant. Dans ce cas, ils sont émis en une masse compacte qui s'agrège rapidement au fond empêchant la rencontre avec les produits génitaux mâles.

III.1.6. Changement de sexe

L'huître creuse présente un hermaphrodisme successif de type protandrique (Amemiya, 1929). Bien que les changements de sexe s'opèrent soit du mâle vers la femelle soit de la femelle vers le mâle, la population tend à se féminiser au fur et à mesure des cycles sexuels (Buroker, 1983). L'huître ne présentant pas de caractères sexuels secondaires, le sexe des individus ne peut être déterminé que lors de la période de reproduction par analyse microscopique des gonades ou des produits génitaux évacués. Au niveau du comportement reproducteur, cette réversion sexuelle se traduit parfois par des reliquats d'activités sexuelles correspondant au sexe de l'année précédente. C'est notamment le cas pour les contractions du muscle adducteur qui sont caractéristiques de l'évacuation des ovocytes et qui peuvent être partiellement observées chez des mâles dont le sexe était femelle l'année précédente (Galtsoff, 1961) (Figure 6).

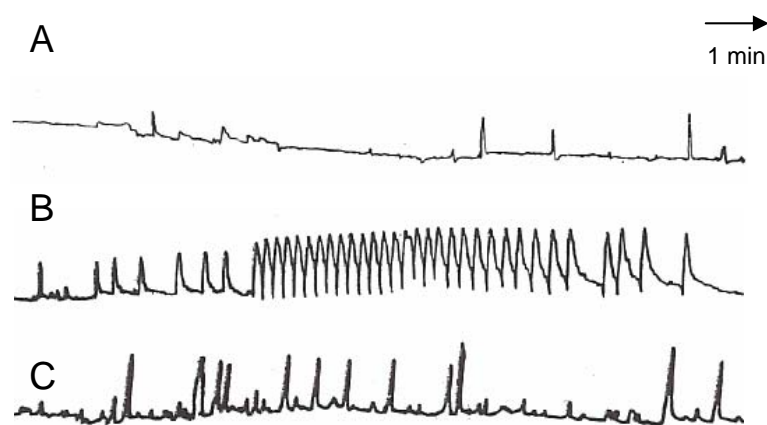


Figure 6: Contractions du muscle adducteur observées lors de l'émission des gamètes chez un mâle (A) et une huître femelle en 1936 (B) puis mâle en 1937 (C) (Galtsoff, 1961).

III.2. La seiche, *Sepia officinalis* (Linné 1758)

III.2. 1. Généralités

a) Classification



- **Classe** : Céphalopodes
- **Ordre** : Coléoïdés
- **Famille** : Sepiidés
- **Genre** : *Sepia*
- **Espèce** : *officinalis*

Chez les céphalopodes, la tête et le pied sont modifiés pour former la tête, l'appareil brachial (constitué de 8 bras et de 2 tentacules préhenseurs chez les décapodes) et l'entonnoir.

b) Répartition

Les céphalopodes sont exclusivement marins. Les seiches sont pêchées sur l'ensemble des côtes françaises (Figure 7).



Figure 7 : Répartition géographique de l'espèce *Sepia officinalis* (Adaptée de Boletzky, 1983).

III.2. 2. Anatomie

a) Le système nerveux

Chez les céphalopodes, les ganglions cérébroïdes, palléo-viscéraux et pédieux sont fusionnés en un système nerveux central céphalisé qui, sur le plan anatomique, est séparé en deux parties principales : le cerveau et les lobes optiques. Deux glandes optiques (structure paranerveuse), sont localisées au niveau du tractus optique (Figure 8).

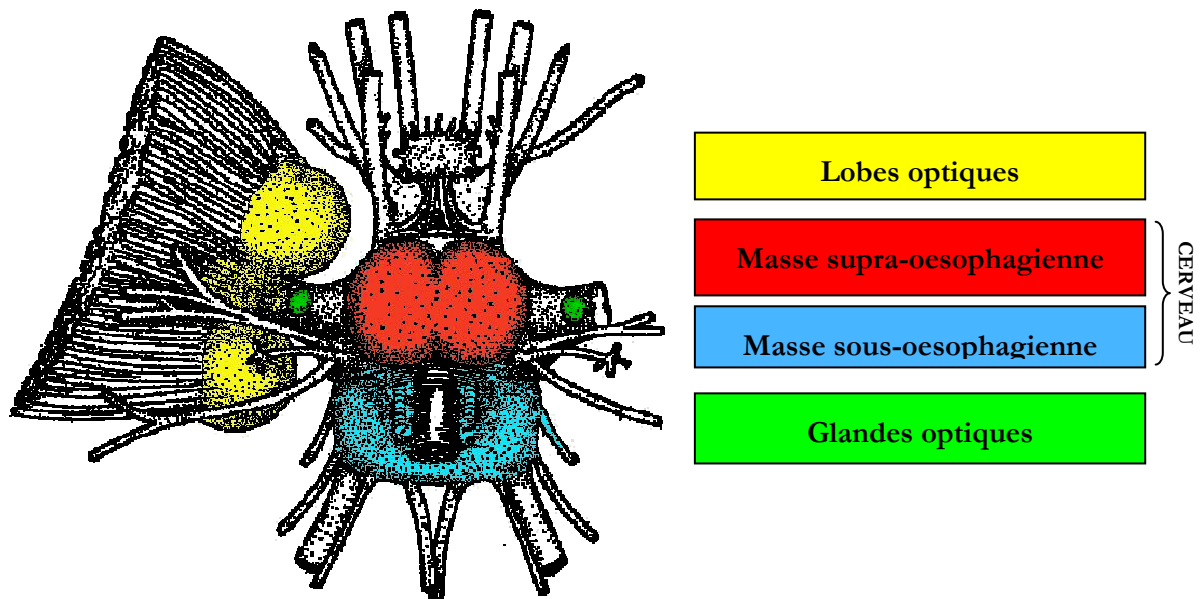


Figure 8 : Vue dorsale du système nerveux central.

- **Le cerveau** : protégé par un « crâne cartilagineux », il correspond au collier péri-oesophagien. Il est constitué d'une **masse supra-oesophagienne** (ganglions cérébroïdes) et d'une **masse sus-oesophagienne** (ganglions palléo-viscéraux et pédieux).
- **Deux lobes optiques** : situés de part et d'autre du cerveau et issus des ganglions cérébroïdes. Ils sont reliés à la masse supra-oesophagienne au niveau du tractus optique.
- **Deux glandes optiques** : situées dorsalement sur le tractus optique, entre les lobes optiques et le cerveau. Chez les *Octopodes*, ces glandes sont suspectées de jouer un rôle dans le contrôle de la gamétogenèse (Wells et Wells, 1959, 1969, 1977 ; Wells 1960 ; Wells *et al* 1975).

b) L'appareil circulatoire

Chez les céphalopodes, l'appareil circulatoire est clos et les artères sont reliées aux veines par un réseau de capillaires. Le cœur est constitué d'un ventricule et de deux oreillettes formées par les dilatations terminales des vaisseaux branchiaux efférents. Au niveau de l'aire neurohémale de la veine cave, deux nerfs viscéraux assurent le drainage de la masse sous-oesophagienne (Tompsett, 1939 ; Alexandrowicz, 1960, 1964, 1965). Chez *Octopus*, une seconde aire neurohémale, localisée au niveau des lobes optiques, permet le drainage de cette structure nerveuse (Young, 1970). Chez les coléoïdés, la circulation veineuse est de plus renforcée par la présence de deux cœurs branchiaux, l'un et l'autre situés à la base de chaque branchie.

c) L'appareil génital

La gonade, paire lors de l'embryogenèse, devient impaire chez l'adulte. Elle est constituée d'un unique gonoducte qui s'étire sur le côté gauche de la cavité palléale.

Chez le mâle, le testicule s'ouvre sur un gonoducte séparé en différentes glandes étroitement associées (vésicules séminales et glandes accessoires) et impliquées dans la formation des spermatophores. Après leur élaboration, les spermatophores sont accumulés dans la poche de Needham avant d'être évacués par les contractions musculaires du pénis. Un bras modifié, appelé bras hectocotyle, assure leur transfert à l'intérieur de la poche sous buccale de la femelle lors de l'accouplement.

Chez la femelle, les organes sexuels comprennent l'ovaire, l'oviducte, la glande de l'oviducte et les glandes nidamentaires principales et accessoires (Figure 9).

L'**ovaire**, suspendu à la paroi du coelome génital, est composé de trois couches distinctes :

- un tissu conjonctif central richement vascularisé
- une zone corticale de cellules germinales
- un épithélium mince à l'origine des futures cellules folliculaires.

Les ovocytes riches en vitellus (type télolécithe) sont ancrés au niveau de pédoncules sur l'ovaire avant d'être libérés dans le coelome génital sous l'effet des contractions du stroma ovarien.

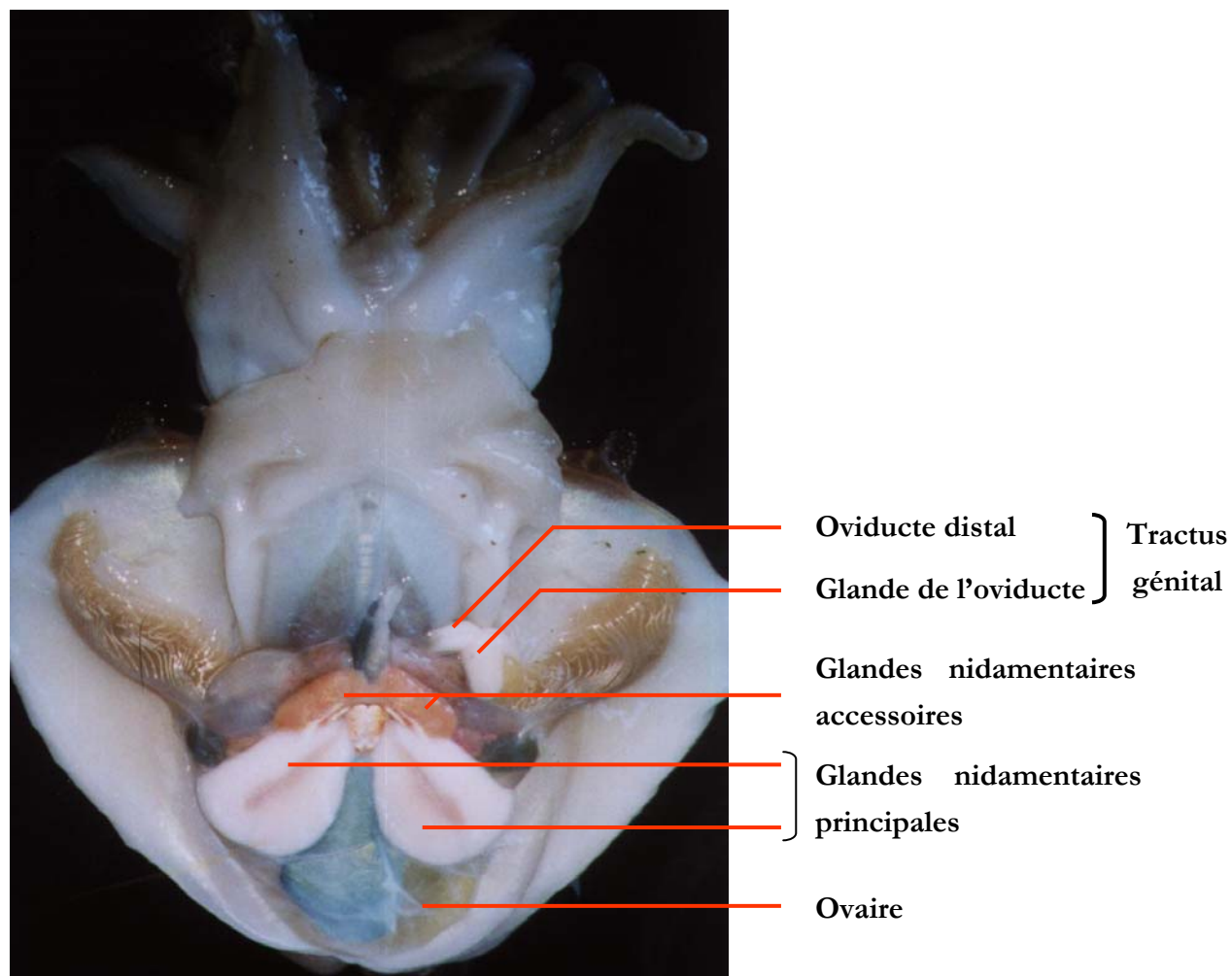


Figure 9 : Vue ventrale de l'appareil génital femelle de *Sepia officinalis*.

L'**oviducte** est constitué de trois parties :

- l'oviducte proximal fait suite au coelome génital. Les ovocytes s'y accumulent avant l'accouplement,
- la glande de l'oviducte correspond à une différenciation glandulaire de l'oviducte. Le passage des ovocytes au travers de la glande de l'oviducte au cours de la ponte comprime les cellules sécrétrices de cette glande. Cet évènement permet la libération de sécrétions qui enrobent l'ovocyte et qui forment une première capsule,
- l'oviducte distal à l'extrémité duquel s'ouvre le pavillon de l'oviducte dans la cavité palléale.

Des **glandes nidamentaires, accessoires et principales** sont logées dans la cavité palléale. Grâce à un canal central, ces glandes sécrètent une substance gélatineuse, constituant la seconde capsule, qui enrobe l'ovocyte et polymérise au contact de l'eau de mer assurant ainsi la protection des embryons.

III.2.3. Cycle biologique

La seiche est une espèce migratrice. Elle hiverne dans des eaux profondes préservées du refroidissement des eaux de surface. Pour la reproduction elle gagne la baie de Seine et le Cotentin au printemps.

Le cycle biologique de la population de Baie de Seine a fait l'objet de plusieurs études ([Figure 10](#)) (Medhioub, 1986 ; Boucaud-Camou et Boismery, 1991 ; Boucaud-Camou *et al* 1991) :

- les éclosions ont lieu dans les eaux littorales à la fin du mois de juillet. Dans ces eaux « chaudes », les juvéniles présentent une croissance rapide. Contrairement à l'huître, le développement embryonnaire est direct et donne à l'éclosion des juvéniles autonomes, identiques aux adultes, pour une taille de 6 à 9 mm en moyenne (Richard 1971)
- au début de l'automne, les animaux de l'année et ceux de l'année précédente effectuent une migration lente d'est en ouest. Ils hivernent dans des eaux profondes en Manche Ouest. La croissance dans ces eaux hivernales froides est très ralentie. Aucun développement sexuel n'est observé la première année

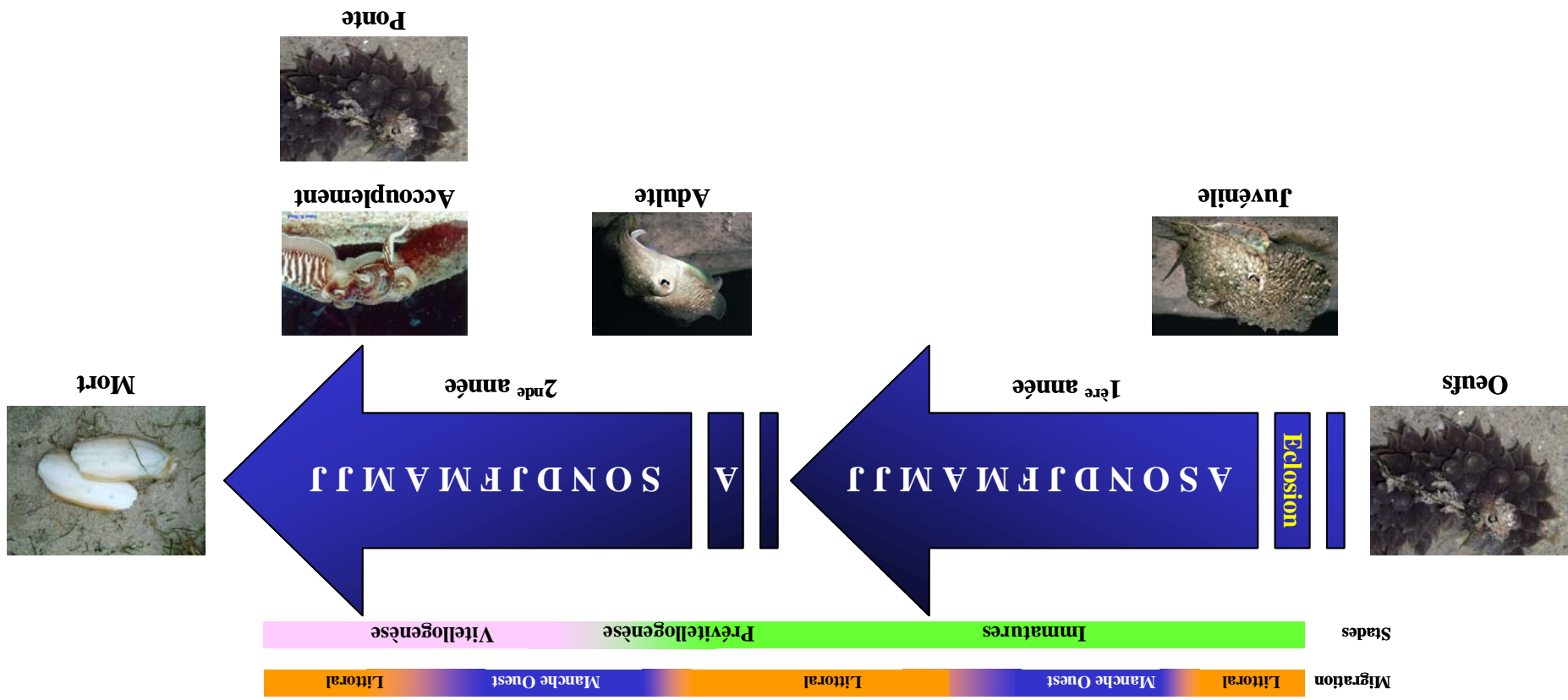


Figure 10 : Cycle biologique de *Sepia officinalis* en Baie de Seine. Les lettres dans les flèches correspondent aux mois de l'année.

- au printemps, la migration vers les côtes normandes est plus rapide. Les animaux immatures de première année gagnent les côtes et restent en périphérie des eaux littorales contrairement aux adultes qui s'y installent pour s'y reproduire et y mourir. Les animaux sont présents sur ces côtes jusqu'en automne. Dans ces eaux estivales chaudes, la croissance est rapide. Les mâles sont matures dès le mois de septembre. Les femelles présentant une maturation sexuelle plus lente sont bloquées en prévitellogenèse tout au long de l'été,
- les seiches migrent à nouveau vers les eaux profondes en Manche Ouest où elles passent la fin de l'automne puis l'hiver. Les femelles débutent leur maturation sexuelle en automne. Celle-ci se poursuivra jusqu'à la reproduction et la mort de l'animal,
- au printemps suivant, les animaux matures gagnent les eaux littorales où ils se reproduisent avant de mourir. Cependant, certains individus sont capables de participer à une seconde reproduction (Boletzky, 1987).

Le cycle sexuel de la seiche est sous la dépendance de nombreux paramètres environnementaux dont la photopériode. En effet, les expériences de Richard (1968) montrent que l'application d'une période lumineuse prolongée sur des seiches élevées dans des conditions de longues nuits déclenche la ponte. Ce résultat peut être relié aux variations d'intensité lumineuse observées entre les eaux profondes à faible intensité lumineuse où les seiches passent l'hiver et les eaux côtières à plus forte intensité lumineuse où les seiches se reproduisent au printemps.

III.2.4. Gamétogenèse et ponte

La maturation sexuelle des femelles a lieu lors de la seconde et dernière année de vie. L'ovogenèse se décompose en six stades selon Dhainaut et Richard (1976) :

- mitoses goniales
- prophase méiotique
- prévitellogenèse marquée par une division intense des cellules folliculaires
- vitellogenèse, période au cours de laquelle le cytoplasme ovocytaire est envahi par le vitellus synthétisé par le syncytium folliculaire
- fin de la vitellogenèse marquée par l'élaboration d'un chorion qui s'immisce entre l'ovocyte et l'épithélium folliculaire en provoquant une déstructuration du réseau folliculaire

- émission des globules polaires.

La gamétogenèse asynchrone se traduit par la présence d'ovocytes à tous les stades de développement dans l'ovaire mature. La ponte, constituée d'une succession d'étapes stéréotypées (Figure 11), peut être décomposée de la manière suivante :

- dans un premier temps, les contractions du stroma ovarien provoquent la rupture des liens qui unissent l'ovocyte à l'épithélium ovarien. Les ovocytes matures, libérés dans le coelome génital, s'engagent dans l'oviducte proximal où ils sont stockés sous l'effet de la libération de 5-HT ovarienne jusqu'à l'accouplement (Zatylny *et al*, 2000a),
- après l'accouplement, les ovocytes reprennent leur progression dans l'oviducte. Cette étape est facilitée par les contractions de l'oviducte qui sont sous la dépendance de neuropeptides, de peptides ovariens et au moins d'un neuromédiateur (Henry *et al*, 1997, 1999 ; Zatylny *et al* 2000a, b, c). Les sécrétions de la glande de l'oviducte forment une première enveloppe autour de l'ovocyte,
- les ovocytes sont libérés dans la cavité palléale au niveau du pavillon de l'oviducte distal. Dans la cavité palléale, ils reçoivent les sécrétions des glandes nidamentaires principales et accessoires qui forment la seconde enveloppe. Les contractions de ces glandes sont au moins partiellement modulées par les peptides apparentés au FMRFamide (FaRPs) (Henry *et al*, 1999),
- les ovocytes, ainsi encapsulés, sont évacués à l'extérieur de la cavité palléale par l'entonnoir. Au niveau de la masse buccale, ils sont saisis et manipulés par les bras de la femelle qui les amènent au contact de la poche sous buccale où la fécondation a lieu en présence des spermatophores déposés par le mâle lors de l'accouplement. Celle-ci est facilitée par la présence d'attractants spermatiques libérés par les ovocytes (Zatylny *et al*, 2002),
- enfin, l'œuf est ligaturé autour d'un support par la femelle. La capsule polymérise en quelques minutes au contact de l'eau de mer assurant ainsi la protection de l'embryon.

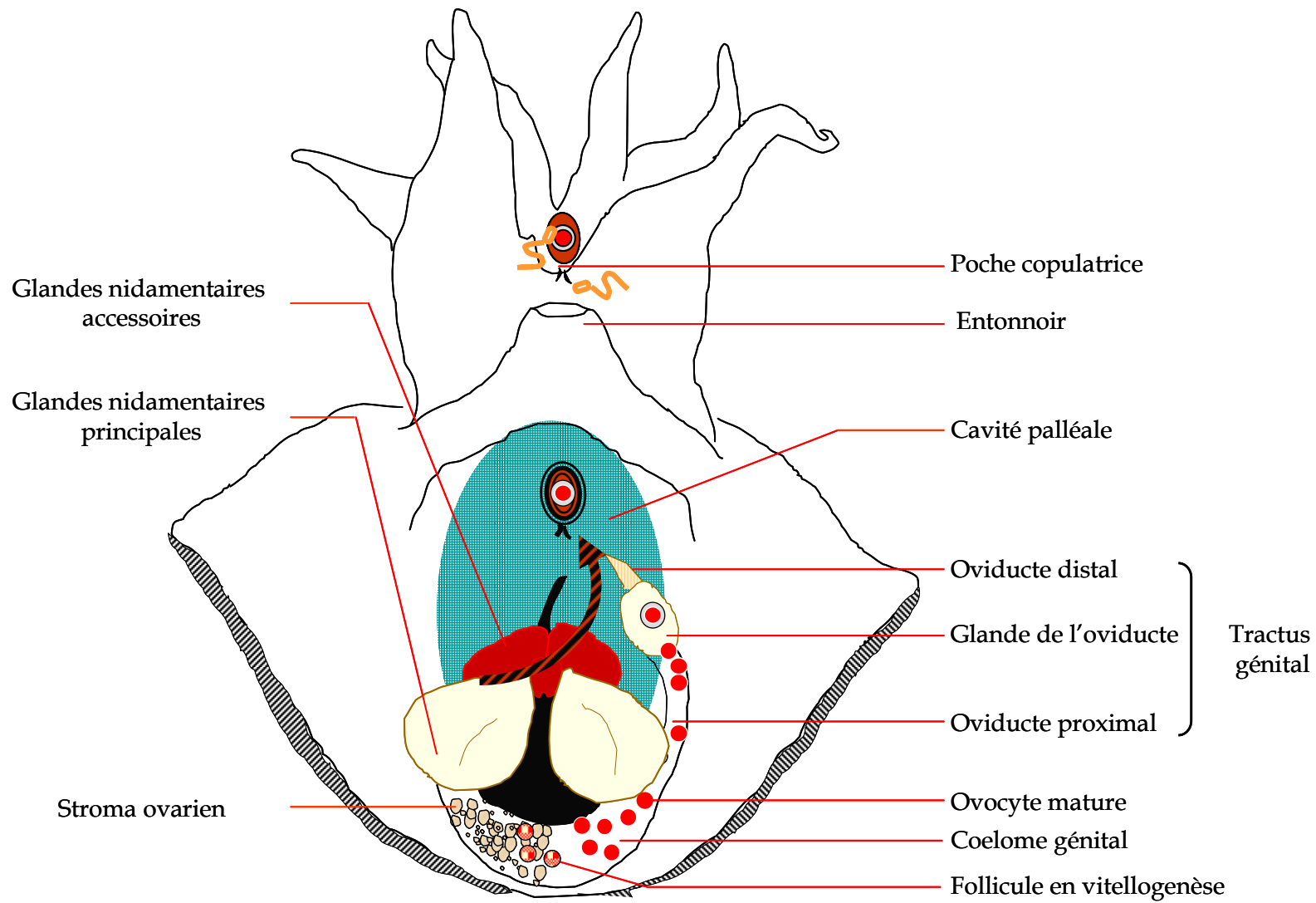


Figure 11 : Etapes de la ponte ovulaire chez *S. officinalis* (Adaptée de Zatylny, 2000d).

III.2.5. Accouplement

Le comportement reproducteur de la seiche a fait l'objet de nombreuses études (pour revue voir Boletsky (1983)). Parmi celles-ci, Hanlon et collaborateurs (1999) segmentent l'accouplement en quatre étapes distinctes :

- **l'initiation**, étape où le mâle s'approche de la femelle avec l'un de ses bras ventraux en avant. Il la saisit ensuite à l'aide de ses bras dorsaux et latéraux pour la faire pivoter et l'amener en position dite « tête-tête » permettant la juxtaposition des deux couronnes de tentacules,
- **le nettoyage**, au cours duquel le mâle, grâce à son entonnoir orientable, envoie un jet d'eau dans la poche sous-buccale de la femelle afin d'éliminer les spermatophores susceptibles d'avoir été déposés lors de précédents accouplements
- **le transfert des spermatophores**, qui est très rapide, voit le mâle collecter, grâce à son bras hectocotyle (bras ventral gauche dont la partie proximale est dépourvue de ventouses), les spermatophores qui s'échappent du pénis et assurer leur transfert dans la poche sous buccale de la femelle. Au contact de l'eau de mer, les spermatophores gonflent et éclatent. L'appareil interne se dévagine et libère le spermatange (réservoir spermatique) contenant les spermatozoïdes,
- **le stockage des spermatanges**, étape au cours de laquelle le mâle envoie un jet d'eau (de faible intensité par rapport à la phase de nettoyage) qui lui permet d'orienter et de stocker les spermatophores au niveau des réceptacles séminaux présents dans la poche sous-buccale de la femelle. La bordure de ces réceptacles séminaux contient des fibres musculaires dont les contractions sont suspectées de favoriser le stockage et/ou déstockage des spermatophores.

IV. Contrôle moléculaire de la ponte

IV.1. Les facteurs régulateurs de la ponte

IV.1.1. Les bivalves

Actuellement, peu d'acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de la ponte ont été identifiés chez les bivalves. La majorité des travaux a été focalisé sur le système monoaminergique et plus spécifiquement sur la 5-HT. Cette molécule, d'origine nerveuse chez les bivalves (Deridovich et Khotimchenko, 1985), est présente dans les terminaisons nerveuses de la gonade (Matsutani et Nomura, 1986). Ce neuromédiateur est capable de déclencher la ponte chez de nombreuses espèces de bivalves (Gibbons et Castagna, 1984 ; Braley, 1985 ; Khotimchenko et Deridovich, 1991 ; Ram *et al*, 1993). Certaines études suggèrent également que des facteurs de type prostaglandines pourraient intervenir dans la régulation de la ponte mais les résultats restent controversés (pour revue voir Deridovich et Reunova (1993)).

Chez l'huître, l'émission des gamètes est stimulée par l'ajout de produits génitaux mâles dans le milieu. Nelson et Allison (1940) ont identifié un facteur de nature protéique qu'ils ont nommé « diantlin » et défini comme « substance active » du sperme. Ce facteur, transmis avec le sperme à la femelle, serait responsable de l'augmentation du débit d'eau par les branchies. Cela faciliterait le passage des ovocytes au travers des branchies au cours de la ponte. Plus récemment, Rice et collaborateurs (2002) ont mis en évidence, chez *Crassostrea virginica*, des protéines membranaires spermatiques capables de déclencher les contractions du muscle adducteur. Dans tous les cas, l'induction de la ponte est suivie d'une période réfractaire de quelques jours au cours de laquelle les femelles ne répondent à aucun stimulus (Galtsoff, 1964).

IV.1.2. Les céphalopodes

Chez les céphalopodes, les premières études abordant la régulation de la ponte se sont intéressées aux glandes optiques, longtemps considérées comme les seules structures contrôlant le développement gonadique (Boycott et Young, 1956 ; Wells et Wells, 1959, 1969, 1972). Ultérieurement, les travaux de Henry, Zatylny et collaborateurs ont mis en évidence

une régulation de la ponte beaucoup plus complexe faisant intervenir des facteurs d'origine nerveuse, hormonale ou encore ovarienne. En effet, chez la seiche *Sepia officinalis*, la progression des ovocytes dans l'oviducte est modulée par des neuropeptides myotropes, apparentés à l'APGWamide ou au FMRFamide (Henry *et al*, 1997, 1999 ; Henry et Zatylny 2002) et par des facteurs paracrines ovariens, comme le peptide ILME (Zatylny *et al*, 2000b), la SepOvotropine (Zatylny *et al*, 2000c) ou la 5-HT (Zatylny *et al*, 2000a).

Chez *Octopus vulgaris*, un peptide apparenté au GnRH a récemment été identifié sur la base de son homologie avec des facteurs de vertébrés. Ce neuropeptide a été caractérisé (Iwakoshi *et al*, 2002) puis localisé au niveau de l'oviducte dont il module les contractions (Iwakoshi-Ukena *et al*, 2004). Toujours chez cette espèce, la céphalotocine (Reich, 1992) et l'octopressine (Takuwa-Kuroda *et al*, 2003) respectivement apparentées aux ocytocines et vasopressines de vertébrés, semblent également être impliquées dans le contrôle de la ponte. En effet, l'octopressine module les contractions de différents organes périphériques dont l'oviducte (Takuwa-Kuroda *et al*, 2003). Bien que la céphalotocine ne présente aucune activité myotrope sur l'oviducte, l'identification et la localisation de l'un de ses récepteurs, au niveau de l'oviducte et de l'ovaire, postulent en faveur d'un rôle biologique régulateur de la ponte (Kanda *et al*, 2003).

IV.2 . Les voies de régulation de la ponte

Les données expérimentales, acquises au cours des travaux de thèse de Henry (1993) et Zatylny (2000d) sur le modèle céphalopode *Sepia officinalis*, posent l'hypothèse d'un contrôle multifactoriel de la ponte de triple origine : nerveuse, hormonale et paracrine. Un schéma similaire a également été décrit chez les gastéropodes.

IV.2.1. Contrôle nerveux

Chez les trois classes de mollusques majoritairement étudiées (bivalves, gastéropodes et céphalopodes), deux familles de neuropeptides myotropes impliquées dans la régulation de la ponte ont été identifiées : les FaRPs (peptides apparentés au FMRFamide) (Price et Greenberg, 1977) et les peptides apparentés à l'APGWamide (Kuroki *et al*, 1990). Ces peptides, exprimés au niveau du système nerveux central (Taussig et Scheller, 1986 ; Smit *et al*, 1992 ; Favrel *et al* 1998), sont transportés par voie nerveuse jusqu'aux organes génitaux

dont ils modulent les contractions (Li *et al*, 1992 ; van Golen *et al*, 1995b ; Henry *et al*, 1997, 1999 ; Henry et Zatylny, 2002). Bien que la majorité des études porte sur leur capacité à moduler l'activité contractile des organes génitaux mâles (canal déférent et pénis de limnée) (Li *et al*, 1992 ; van Golen *et al*, 1995a, b), des travaux réalisés chez la seiche *Sepia officinalis* montrent que ces deux familles sont aussi impliquées dans le contrôle de la ponte (Henry *et al*, 1997, 1999). Chez les gastéropodes, ces neuropeptides agissent en synergie avec d'autres facteurs d'origine nerveuse. En effet, l'effet provoqué par l'APGWamide sur le canal déférent de limnée est antagoniste de celui induit par la 5-HT et/ou la conopressine (Li *et al*, 1992 ; van Golen *et al*, 1995b).

Chez le gastéropode *Achatina fulica*, un neuropeptide, la fulicine, a été caractérisé sur la base de sa capacité à moduler les contractions du vagin et de l'oviducte (Fujisawa *et al*, 2000).

Chez les bivalves, des expériences d'excision de ganglions suggèrent également que la ponte serait en partie régie par le système nerveux (Lubet, 1955). Cependant, les résultats obtenus par Antheunisse (1963) sont en désaccord avec ceux de Lubet. Néanmoins, des expériences ultérieures réalisées chez les bivalves ont permis de mettre en évidence des neuromédiateurs, tels que la 5-HT, impliqués dans la régulation de la ponte.

IV.2.2. Contrôle hormonal

Chez les gastéropodes, la ponte est sous le contrôle d'un groupe de neurones (Kupfermann, 1967), appelés « bags cells » chez l'aplysie et « caudo-dorsal-cells » chez la limnée. Ils expriment des peptides impliqués dans le contrôle des différentes étapes de la ponte. Chez l'aplysie, les « bag-cells » sont en effet le siège de l'expression du précurseur de l'hormone de ponte, l'ELH (Chiu *et al*, 1979) et des peptides associés : l'acidic peptide (Scheller *et al*, 1983), les bag-cell peptides (Scheller *et al*, 1983 ; Geraerts *et al*, 1988) et les califins (Rothman *et al*, 1986). Chez la limnée, les « caudo-dorsal-cells » jouent un rôle primordial dans le contrôle de la ponte. Elles sont le siège de l'expression des caudo-dorsal-cell hormones (Ebberink *et al*, 1985b), des caudo-dorsal-cell peptides (Vreugdenhil *et al*, 1988 ; Li *et al*, 1994a) de la cafluxine et du carboxyl-terminally located peptide (C-TP) (Vreugdenhil *et al*, 1988 ; Li *et al*, 1994a).

Chez les céphalopodes et plus spécifiquement, chez la seiche *Sepia officinalis*, les expériences de Zatylny suggèrent l'existence de facteurs endocrines régulant le transport des ovocytes (Zatylny, 2000d). Cependant, aucun facteur apparenté aux ELH et CDCH de gastéropodes n'a pu être encore identifié.

Chez l'huître, les expériences d'injection d'hémolymphe d'individus en ponte à des femelles matures n'étant pas en ponte n'ont jamais conduit à une induction de la ponte (Galtsoff, 1964). Ce qui tend à démontrer que chez l'huître, la ponte ne serait pas sous le contrôle de facteurs endocrines, mais probablement induite par des neuromédiateurs et des facteurs paracrines.

IV.2.3. Contrôle ovarien

Plusieurs facteurs ovariens libérés par les œufs ou les ovocytes à l'intérieur des voies génitales ou dans le milieu extérieur ont été mis en évidence chez les gastéropodes et les céphalopodes. Chez l'aplysie, une phéromone nommée attractine, composée de 58 acides aminés, a été caractérisée. Elle est libérée par les œufs et provoque l'attraction des géniteurs au niveau des aires de pontes (Painter, 1991 ; Painter *et al*, 1996, 1998, 1999). Le criblage différentiel d'une banque d'ADN complémentaires de glande de l'albumen a permis l'identification de trois nouveaux facteurs ovariens : la temptine, l'enticine et la seductine qui agissent en synergie avec l'attractine (Cummins *et al*, 2004a, 2005a). Plusieurs peptides exprimés à partir du précurseur de l'ELH au niveau de la glande atriale présentent également une activité chémoattractrice et sont capables d'induire la ponte chez l'aplysie (Nagle *et al*, 1986 ; Nambu et Scheller, 1986 ; Painter 1992). Chez la seiche, plusieurs peptides ovariens, libérés par les ovocytes dans le coelome génital ou dans la cavité palléale, sont capables de stimuler les contractions de l'oviducte (Zatylny *et al*, 2000b, c) ou d'induire la chémoattraction des spermatozoïdes vers l'ovocyte (Zatylny *et al*, 2002).

Des observations réalisées en éclosion montrent également que l'ajout de produits génitaux femelles dans des bacs contenant des huîtres matures provoque l'émission des produits génitaux à la fois chez les individus mâles et femelles (Galtsoff, 1964), démontrant ainsi l'existence de facteurs actifs dans les produits génitaux femelles.

V. Importance et conservation des familles peptidiques au cours de l'évolution chez les invertébrés

Depuis trente ans, l'utilisation en routine de techniques de purification telle que la chromatographie liquide haute performance (CLHP) a permis d'identifier et de caractériser de nombreux facteurs régulateurs impliqués notamment dans le contrôle de la reproduction chez les invertébrés. Cet ensemble de données structurales et fonctionnelles met en évidence l'existence de familles de facteurs régulateurs caractérisées par la présence de motifs conservés et distribués dans différents clades. Ce point est illustré par des exemples détaillés dans les paragraphes suivants.

V.1. ELH-CDCH

Ces deux neurohormones (ELH : Egg-Laying Hormone ; CDCH : Caudo-Dorsal-Cell Hormone) ont été caractérisées respectivement chez l'aplysie *Aplysia californica* (Chiu *et al*, 1979) et la limnée *Lymnaea stagnalis* (Ebberink et Joosse, 1985a) sur la base de leur capacité à déclencher la ponte. Chez les différentes espèces d'aplysie, cette neurohormone apparaît comme étant fortement conservée (Li *et al*, 1999a). La recherche de molécules apparentées, grâce à des approches de biologie moléculaire et d'immunologie, a permis d'identifier une hormone de ponte chez un autre gastéropode, l'ormeau *Haliotis rubra* (Wang et Hanna, 1998) et chez un annélide, la sangsue *Theromyzon tessulatum* (Salzet *et al*, 1997) (Tableau 1).

ELH <i>A. parvula</i>	ISINQDLKAIADMLIVEQKQEREKYLADLRQRLLNKa
ELH <i>A. californica</i>	ISINQDLKAITDMLLTEQIRERQRYLADLRQRLLLEKa
CDCH <i>L. stagnalis</i>	LSITQDLRAIADSYLYDQHWLRERQEENLRRRFLELa
aELH <i>H. rubra</i>	LSITNDLRAIADSYLYDQHKLREERQEENLRRRFRLLa
L-ELH <i>T. tessulatum</i>	GSQVSNGGTEMIQLSHIRERQRYWAQDNLRRRFLEKa

Tableau 1 : Alignement des peptides appartenant à la famille des hormones de ponte caractérisés chez les gastéropodes et les nématodes.

L'alignement des différentes séquences peptidiques met en évidence une forte conservation structurale des hormones de ponte entre *A. parvula* et *A. californica* d'une part et entre *L. stagnalis* et *H. rubra* d'autre part. L'hormone de ponte de la sangsue présente des

homologies structurales avec celles de limnée et d'ormeau au niveau de son extrémité C-terminale.

Par ailleurs, l'ovuline de drosophile (Acp 26Aa) possède une région qui présente 11 acides aminés identiques aux 17 acides aminés d'une région de l'ELH d'*A. californica* (Monsma et Wolfner, 1988) (Tableau 2).

ELH <i>A. californica</i>	I S I N Q - D L K A I T D M L L T E Q I R E R Q R Y L A D L R Q R L L E K
Acp 26Aa <i>D. melanogaster</i>	... G S - N Q S A L K A L Q Q R L L T E Q N N S L L L R N H S I Y L M K E I E ...

Tableau 2 : Homologie de séquence entre l'ovuline de drosophile et l'ELH d'*A. californica*.

V.2. BCP-CDCP

Chez l'aplysie *A. californica* et la limnée *L. stagnalis*, la ponte est respectivement sous le contrôle des « bag-cells » et des « caudo-dorsal-cells » qui sont le siège de l'expression des hormones de ponte et de différents peptides dont les BCP « Bag-Cell Peptides » et CDCP « Caudo-Dorsal-Cell Peptides ». Ces deux familles présentent d'importantes homologies de séquence. Les α , β , γ BCP de l'aplysie (Scheller *et al*, 1983 ; Geraerts *et al*, 1988), les α -CDCP et β_{1-3} CDCP de la limnée (Vreugdenhil *et al*, 1988 ; Li *et al*, 1994a) possèdent le motif interne RLRF en commun (Tableau 3).

<i>A. californica</i>		<i>L. stagnalis</i>
α -BCP	APRLRFYSL	
	EPRLRFHVDV	α -CDCP
β -BCP	RLRFH	
	RLRFH	β_1 -CDCP
γ -BCP	RLRFD	
	RLRFN	β_2 -CDCP
	RLRAS	β_3 -CDCP

Tableau 3 : Conservation du motif RLRF entre les différents BCP et CDCP.

V.3. SAPs

Chez les échinodermes et les cnidaires, la fécondation est facilitée par la présence de facteurs solubles associés aux œufs et capables de moduler la réaction acrosomale, l'attraction des spermatozoïdes, la motilité et la respiration spermatique. Cet effet est lié au Speract (Hansbrough et Garbers, 1981) et aux peptides apparentés dont plus de 80 représentants ont été caractérisés chez diverses espèces (Suzuki, 1995 ; Nishigaki *et al*, 1996). Ces facteurs qui présentent de fortes homologues de séquence sont réunis dans la famille des SAPs (Sperm Activating ou Attracting Peptides). Ils se répartissent en six classes, les SAP-I (GFDLNGGGVG) et peptides apparentés qui présentent une extrémité N-terminale en GF et C-terminale en GGGV, les SAP IIA (CVTGAPGCGGGRL) et IIB (KLCPGGNCV) et peptides dérivés, les SAP III (DSDSAQNLI) et peptides dérivés (extrémité C-terminale en LI), le SAP IV (GCPWGGAVC) et le SAP V (GCEGLFHGMGNC) (Yoshino *et al*, 1992 ; Suzuki, 1995).

V.4. Attractine

L'attractine a été identifiée et caractérisée chez différentes espèces du genre *Aplysia* (Painter *et al*, 1996, 1998, 2004). Ce peptide, composé de 58 acides aminés, est impliqué dans le regroupement des géniteurs au niveau des aires de ponte. Des études récentes montrent que le motif interne Ile(30)-Glu-Glu-Cys-Lys-Thr-Ser(36) est strictement conservé entre les différentes attractines caractérisées (Tableau 4). Il est de plus nécessaire au maintien de l'effet chémoattractif de ce facteur ovarien (Cummins *et al*, 2004b).

<i>A. californica</i>	DQNC DIGNITSQCQM QHKNCEDANGCDTII IEECKTSMVERCQNQEFESAAGSTTLGPQ
<i>A. brasiliana</i>	DQNC DIGNITSQCQM QHQCDDANGCDTII IEECKTSMVERCQNQEFESASGSTTLGPQ
<i>A. fasciata</i>	DQNC DIGNITSQCEM QHQCDDANGCNTII IEECKTSMVERCQNQEFESASGSTTLGPQ
<i>A. vaccaria</i>	NNKCDIEFATSECEMRYQDCGEASSCTAL IEECKTSLQEECN--QASSDESSTTVRPE
<i>A. depilans</i>	NNKCDLEFASSECEMRYQDCGEASSCTAL IEECKTSLQEECN--QASSDESSTTIRPE

Tableau 4: Alignement des différentes attractines d'Aplysies. Conservation du motif IEECKTS.

L'alignement des séquences de ce peptide met en évidence deux groupes d'attractines : celles d'*A. californica*, *A. brasiliensis* et *A. fasciata* d'une part et celles de *A. vaccaria* et *A. depilans* d'autre part.

La position des six résidus cystéine impliqués dans la formation de trois ponts disulfures (C₄-C₄₁; C₁₃-C₃₃; C₂₀-C₂₆) (Schein *et al*, 2001 ; Garimella *et al*, 2003) est parfaitement conservée. La structure de l'attractine, déterminée par des analyses en résonance magnétique nucléaire, montre que ce peptide présente deux hélices α qui sont stabilisées par la présence des 3 ponts disulfures (Garimella *et al*, 2003). La seconde hélice, qui contient le motif IEECKTS, présente par ailleurs des homologies avec l'une des hélices α de phéromones de *Euplotes raikovi* (protozoaires ciliés) impliquées dans la reconnaissance avec le récepteur (Weiss *et al*, 1995 ; Luginbühl *et al*, 1996).

V.5. FaRPs

Les FaRPs constituent une famille de neuropeptides initialement identifiés chez les bivalves sur la base de leur activité cardioexcitatrice (Price et Greenberg, 1977). Cette famille est caractérisée par un motif C-terminal conservé de type FXRFamide (avec X = I, L ou M) (pour revue voir Price *et al* (1987)) (Tableau 5). De nombreux travaux ont permis de caractériser différents peptides apparentés dans plusieurs classes de mollusques sur la base de leur activité myotrope. Ces peptides sont impliqués dans divers processus physiologiques : reproduction, alimentation, activité cardiaque...

Gastéropodes	Céphalopodes	Bivalves
FMRFa	FMRFa	FMRFa
FLRFa	FLRFa	FLRFa
SGFLRFa	FIRFa	NFLRFa
NDPFLRFa	ALSGDAFLRFa	ALAGDHFFRFa
GDPFLRFa	AFLRFa	
SDPFLRFa	TFLRFa	
pQDFLRFa		

Tableau 5 : FaRPs caractérisés dans différentes classes de Mollusques (Price et Greenberg, 1977 ; Price *et al*, 1985 ; Ebberink et Joosse, 1985a ; Taussig et Scheller, 1986 ; Ebberink *et al*, 1987 ; Martin et Voigt, 1987 ; Linacre *et al*, 1990 ; Saunders *et al*, 1991 ; Fujisawa *et al*, 1992 ; Loi et Tublitz, 1997 ; Favrel *et al*, 1998).

Chez les mollusques, les études portent essentiellement sur la régulation du comportement reproducteur mâle (Li *et al*, 1995 ; van Golen *et al*, 1995a). Toutefois, Henry et collaborateurs ont montré que les FaRPs étaient également impliqués dans l'évacuation des ovocytes et la sécrétion de la capsule de l'oeuf chez la seiche *Sepia officinalis* (Henry *et al*, 1999).

L'obtention successive des séquences d'ADN complémentaires codant les peptides apparentés au FMRFamide chez l'aplysie (Schaefer *et al*, 1985), la drosophile (Nambu *et al*, 1988 ; Schneider et Taghert 1988), la limnée (Linacre *et al*, 1990), l'anémone (Darmer *et al*, 1991), l'escargot (Lutz *et al*, 1992), *Caenorhabditis elegans* (Rosoff *et al*, 1992), la seiche (Loi et Tublitz, 1997) et la moule (Favrel *et al*, 1998) montre que certains de ces peptides sont fortement répétés sur le précurseur. Les analyses réalisées chez la limnée, à partir des séquences génomiques, ont permis de mettre en évidence un gène composé de cinq exons dont l'épissage alternatif est à l'origine de deux précurseurs codant pour les peptides apparentés au FMRFamide (précurseur 1 : exons I et II (térapeptides) ; précurseur 2 : exons I, III (heptapeptides), IV et V) (Saunders *et al*, 1991 ; Kellett *et al*, 1994 ; Worster *et al*, 1998).

Chez les arthropodes, les FaRPs interviennent dans la régulation de la ponte. En effet, ces peptides, dont le niveau d'expression varie en fonction du stade de maturité de l'animal (Sevala *et al*, 1992, 1993), modulent chez le criquet les contractions de l'oviducte (Schoofs *et al*, 1993 ; Peeff *et al*, 1994 ; Lange et Cheung, 1999) et de la spermathèque (Clark et Lange, 2002). Chez les nématodes, les FaRPs sont également impliqués dans le contrôle de la ponte (Fellowes *et al*, 1998, 2000a, b).

Par ailleurs, de nombreux peptides présentant une extrémité C-terminale en RFamide, mais n'appartenant pas aux FaRPs sont présents sur les exons IV et V du précurseur des FaRPs chez la limnée (Kellett *et al*, 1994 ; Worster *et al*, 1998) et ont également été caractérisés chez différents groupes d'invertébrés et de vertébrés (Espinoza *et al*, 2000).

V.6. APGWa-RPs

Les peptides apparentés à l'APGWamide (APGWa-RPs) sont présents dans les neurones projetant leurs terminaisons nerveuses vers les glandes mâles (Croll et van Minnen, 1992 ; De Lange *et al*, 1997 ; Fan *et al*, 1997 ; De Lange et van Minnen, 1998). Ils se caractérisent par une extrémité C-terminale conservée en GWamide, extrémité nécessaire et suffisante pour le maintien de l'activité myotrope (Henry *et al*, 1997). Cette famille est impliquée dans le comportement reproducteur mâle chez les gastéropodes (Li *et al*, 1992 ; van Golen *et al*, 1995b) et dans le comportement reproducteur femelle chez les céphalopodes (Henry *et al*, 1997 ; Henry et Zatylny, 2002). Cette famille est également présente chez les bivalves (Favrel et Mathieu, 1996 ; Henry *et al*, 2000) et les nématodes (Nathoo *et al*, 2001), mais son rôle physiologique reste flou dans ces deux groupes.

Chez les insectes, le LOM-MIP qui présente une extrémité C-terminale identique, module les contractions de l'oviducte chez *Locustra migratoria* et *Leptinotarsa decemlineata* (Schoofs *et al*, 1991 ; Spittaels *et al*, 1996) (Tableau 6). Par ailleurs, les AKH (AdipoKinetic Hormone) et RPCH (Red Pigment Concentrating Hormone) d'arthropodes présentent des homologies structurales avec les APGWa-RPs (Martinez-Perez *et al*, 2002).

Gastéropodes	Céphalopodes	Bivalves	Nématodes	Insectes	Crustacés
APGWa	APGWa	APGWa	YGGWa	AWQDLNAGWa	pELNFSPGWa
RPGWa	*RPGWa	RPGWa		pELNFSAGWa	
KPGWa	*KPGWa	KPGWa			
TPGWa	TPGWa	TPGWa			
GWa	GWa	GWa			

*sous forme de traces

Tableau 6 : APGWa-RPs caractérisés dans différents groupes d'invertébrés (Kuroki *et al*, 1990 ; Schoofs *et al*, 1991 ; Smit *et al*, 1992 ; Favrel et Mathieu, 1996 ; Henry *et al*, 2000 ; Henry et Zatylny, 2002 ; Martinez-Perez *et al*, 2002).

Les peptides apparentés à l'APGWamide sont exprimés par deux gènes différents qui ont été respectivement caractérisés chez *Mytilus edulis* (Favrel et Mathieu, 1996) et *Lymnaea stagnalis* (Smit *et al*, 1992). Des analyses en spectrométrie de masse mettent en évidence la présence des produits d'expression de ces deux gènes chez les bivalves, les gastéropodes et les céphalopodes (Henry *et al*, 2000 ; Henry et Zatylny, 2002). Ces deux gènes pourraient

donc résulter de la duplication d'un gène ancestral. Ce processus serait intervenu avant la séparation entre les trois principales classes de mollusques.

V.7. Allatostatines

Les peptides apparentés aux allatostatines possèdent une extrémité C-terminale proche de l'extrémité conservée en Y/FXFGL/Iamide. Ils sont présents chez les arthropodes et les nématodes, (pour revue voir Bendena *et al* (1999)).

Chez les insectes, plusieurs peptides de cette famille sont présents au niveau de l'oviducte (Garside *et al*, 2002 ; Woodhead *et al*, 2003 ; Abdel-Latif *et al*, 2004a, b, c), dont ils modulent les contractions (Veelaert *et al*, 1996 ; Vanden Broeck *et al*, 1996 ; Kwok et Orchard, 2002). Ils jouent également un rôle dans l'inhibition de la synthèse d'hormone juvénile (Pratt *et al*, 1989, 1991 ; Woodhead *et al*, 1989, 1994 ; Belles *et al*, 1994 ; Lorenz *et al*, 1995).

Par ailleurs, des analyses immunohistochimiques suggèrent la présence de peptides apparentés aux allatostatines chez les crustacés (Duve *et al*, 2002), les cnidaires, les plathelminthes, les annélides et les mollusques (Smart *et al*, 1994 ; Rudolph et Stay, 1997).

Chez les mollusques, le SepSAP (Sepia Sperm Attracting Peptide), un peptide ovarien présentant une homologie de séquence avec la schistostatine I de *Schistocerca gregaria* (Vanden Broeck *et al*, 1996) a été caractérisé chez *Sepia officinalis* (Zatylny *et al*, 2002).

V.8. MIPs

Les MIPs (*Mytilus* Inhibitory Peptides) constituent une famille de neuropeptides myotropes initialement caractérisée chez le bivalve *Mytilus edulis* (Fujisawa *et al*, 1991). De nombreux peptides apparentés ont été caractérisés ultérieurement chez différents gastéropodes (Ikeda *et al*, 1992 ; Ohtani *et al*, 1995 ; Li *et al*, 1996 ; Fujisawa *et al*, 1999). Les MIPs présentent en commun un motif conservé en position C-terminale, de séquence PXFV/Iamide (Muneoka *et al*, 2000) (Tableau 7). Ces peptides modulent les contractions de différents muscles, dont celle du muscle rétracteur du pénis (Fujisawa *et al*, 1999 ; Smit *et al*, 2003).

<i>Helix pomatia</i>	<i>Mytilus edulis</i>	<i>Meretrix lusolia</i>	<i>Achatina fulica</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Aplysia kurodai</i>
GAPAFVa	GSPMFVa	YTPKFVa	AAPKFVa	GAPRFVa	GAPRFVa
GAPRFVa	GAPMFVa	YRPMFVa	GAPKFVa		GPFRFVa
AAPRFVa	DSLRFVa	GSNRPFVa	GAPVFVa		GSPHFVa
GAPKFVa	YAPRFVa	YVPRFVa	GAPYFVa		GSPRFVa
AAPKFVa	ASHIPRFVa	YTPYFVa	AAPYFVa		GAPRFVa
GPFRFVa	RAPLRFVa	YVPSFVa	GPMPFVa		
GAPMFVa	RSPMFVa	YTPRFVa	GAPFFVa		
GAPRFVa		YTPKFVa	DAPKFGRRDPYFVa		
DPYFVa		YRPRFVa	AAPKFGRRGSPYFVa		
GSPYFVa			AAPKFGRRGAPYFVa		
GAPYFVa					
RAPYFVa					
GPMPFVa					
AAPFFVa					
GYPYFVa					
RAPFFVa					
GAPLRFVa					
SVPIFVa					
VAPKFGRRDPYFVa					

Tableau 7 : MIPs caractérisés chez différentes espèces de mollusques, gastéropodes et bivalves (pour revue voir Muneoka *et al* (2000)).

V.9. Myomodulines

Le terme myomoduline désigne une famille de peptides présentant une extrémité C-terminale consensus en MLRLamide. Les peptides de cette famille ont été caractérisés initialement chez l'aplysie (Cropper *et al*, 1987, 1991 ; Lopez *et al*, 1993 ; Miller *et al*, 1993 ; Brezina *et al*, 1995) puis chez plusieurs espèces de gastéropodes (Fujisawa-Sakata et Kobayashi, 1992 ; Kellett *et al*, 1996 ; van Golen *et al*, 1996 ; Greenberg *et al*, 1997) et bivalves (Hirata *et al*, 1987 ; Ohtani *et al*, 1995b). Les myomodulines jouent un rôle dans la modulation neuronale et présentent également une activité myotrope. Ils interviennent dans différents comportements comme l'alimentation (Perry *et al*, 1998) ou la reproduction. Les myomodulines modulent en effet les contractions du pénis chez la limnée (Li *et al*, 1994b ; van Golen *et al*, 1996) et de la spermathèque chez l'escargot (Greenberg *et al*, 1997).

Par ailleurs, chez les annélides, deux peptides présentant des homologies avec les myomodulines de mollusques ont été caractérisés (Takahashi *et al*, 1994 ; Wang *et al*, 1998). Ces peptides apparentés jouent également un rôle de neuromodulateur (Wang *et al*, 1998) (Tableau 8).

Gastéropodes	Bivalves	Annélides
PMSMLRLa	AMPMLRLa	AMGMLRMa
GSYRMMRLa	ALPMLRMa	GMGALRLa
GWSMLRLa		
GLSMLRLa		
GLQMLRLa		
SLNMLRLa		
SMSMLRLa		
SLSMLRLa		
SLGMLRLa		
pQLSMLRLa		
pQIPMLRLa		

Tableau 8 : Peptides apparentés aux myomodulines caractérisés dans différents groupes d'invertébrés (Cropper *et al*, 1987, 1991 ; Hirata *et al*, 1987 ; Fujisawa-Sakata et Kobayashi, 1992 ; Lopez *et al*, 1993 ; Miller *et al*, 1993 ; Takahashi *et al*, 1994 ; Brezina *et al*, 1995 ; Kellett *et al*, 1996 ; van Golen *et al*, 1996 ; Ohtani *et al*, 1995b ; Greenberg *et al*, 1997 ; Wang *et al*, 1998).

VI. Approche expérimentale

Les familles de peptides régulateurs identifiées chez les invertébrés révèlent une forte conservation structurale et fonctionnelle au cours de l'évolution. Sur la base de ce constat, l'étude de la régulation peptidergique de la ponte chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* a été réalisée en utilisant les données moléculaires obtenues chez la seiche *Sepia officinalis*.

En effet, la seiche peut être considérée comme un modèle pour la réalisation d'études physiologiques. Des bioessais *in vitro* ont été validés chez cette espèce par la caractérisation de peptides régulateurs impliqués dans les étapes successives de la ponte. Ce modèle fournissant différents « outils biologiques », une tentative de transfert technologique de la seiche vers l'huître a donc été mise en oeuvre. Par ailleurs, si l'influence des facteurs environnementaux et trophiques a déjà fait l'objet de nombreuses études chez l'huître, peu d'acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de la ponte ont pu être identifiés. La rareté des données expérimentales est sans doute liée à l'anatomie complexe de ce modèle.

La comparaison des séquences de ponte de ces deux mollusques, permet de dégager un aspect commun. Des contractions musculaires sont à l'origine de l'évacuation des ovocytes : contractions de l'oviducte chez la seiche et du muscle adducteur chez l'huître. L'étude a donc été focalisée sur la recherche de facteurs myotropes capables de moduler spécifiquement l'activité contractile de ces deux organes. De nouveaux peptides impliqués dans la régulation de la ponte ont été recherchés chez *S. officinalis* dans une première partie. En spéculant sur une conservation (même partielle) des séquences primaires, des peptides apparentés aux peptides de seiches ont ensuite été recherchés chez *C. gigas* dans la seconde partie. Enfin, le bioessai mis au point sur l'oviducte de *S. officinalis* a été utilisé pour purifier un facteur myotrope impliqué dans l'émission des ovocytes chez *C. gigas*.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes	Page 41
I. <u>Matériel vivant</u>	<u>Page 43</u>
II. <u>Prélèvement des organes</u>	<u>Page 43</u>
III. <u>Extraction et prépurification</u>	<u>Page 43</u>
IV. <u>Chromatographie liquide haute performance (CLHP)</u>	<u>Page 43</u>
V. <u>microLC-ESI-MS/MS</u>	<u>Page 44</u>
VI. <u>Purification en LC-ESI-MS</u>	<u>Page 44</u>
VII. <u>Bioessai myotrope</u>	<u>Page 44</u>
VIII. <u>Séquençage par dégradation N-terminale d'Edman</u>	<u>Page 45</u>
IX. <u>Recherche de peptides apparentés et séquençage <i>de novo</i></u>	<u>Page 45</u>
X. <u>Bioessai <i>in vivo</i></u>	<u>Page 47</u>

I. Matériel vivant

Les seiches matures sont capturées en Baie de Seine au chalut de fond par deux chalutiers professionnels : « Le père Arthur » de Port-en-Bessin (de janvier à mars) et le « Gil Dany » de Courseulles sur mer (de mai à juin). Quelques individus proviennent de la pêche au casier de Luc sur mer (d'avril à mai) et de la pêche au filet dormant à Blainville et à Agon-Couttaingville. Les animaux sont stockés, à la station marine de Luc-sur-mer (Université de Caen), dans des bassins de 1000 litres thermorégulés à 15°C (+/- 1°C) sous une photopériode naturelle. La filtration des bassins est assurée par un circuit d'eau de mer semi fermé.

Les huîtres provenant de l'Aber Benoît sont conditionnées à l'écloserie expérimentale d'Argenton tandis que celles provenant de St Vaast la Hougue sont conditionnées à l'écloserie expérimentale du SMEL (Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral) située à Blainville.

II. Prélèvement des organes

Les organes sont prélevés sur l'animal vivant anesthésié avant d'être congelés dans l'azote liquide à -196°C puis stockés à -80°C jusqu'à l'extraction.

III. Extraction et prépurification

Les tissus sont extraits et homogénéisés à 100°C dans de l'acide chlorhydrique 0,1N. Après centrifugation, le surnageant est concentré en condition acide (Bennett, 1986) sur colonne Chromafix C18 (Macherey-Nagel). La fraction organique éluée par du MeOH 80% acidifié à 0,1% d'acide formique est aliquotée puis évaporée au speed vac.

IV. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Le fractionnement et l'analyse des extraits sont réalisés 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 214 nm.

V. microLC-ESI-MS/MS

Les analyses sont réalisées sur une chaîne Surveyor (ThermoFinnigan) connectée en ligne à une trappe à ions dotée d'une source ionique de type ESI (Deca XP MS-n ThermoFinnigan). La LC-MS est pilotée par le logiciel Xcalibur (ThermoFinnigan). L'échantillon est repris dans l'éluant A (eau PPI et acide formique 0,1%) avant d'être injecté sur une colonne Thermo Hypersil 50 x 0.5 mm 3µm Betabasic18 avec un gradient croissant d'acétonitrile. Grâce à une dérivation située en amont de la boucle d'injection, la colonne est éluée à un débit voisin de 10µl/min dans la source ionique. L'acquisition est généralement réalisée sous la forme d'un full-scan MS permettant d'accéder à la valeur de m/z des composés ionisables présents dans l'échantillon. L'analyse structurale est assurée par la fragmentation des ions moléculaires en mode MS/MS ou datadependent-scan.

VI. Purification en LC-ESI-MS

Pour la purification des peptides sur la base de leur m/z, l'échantillon est injecté sur une colonne Nucleosil C18 (250x4mm, 7µm) éluée à un débit de 1ml/min, puis fractionné grâce à un gradient croissant d'acétonitrile. Une dérivation située en aval de la colonne permet d'une part de perfuser la source ionique à un débit voisin de 10µl/min et d'autre part de collecter des fractions.

VII. Bioessai myotrope

Les différents organes prélevés chez *S. officinalis* (oviducte distal, tractus génital complet, glandes nidamentaires, œsophage, rectum ou pénis) et *C. gigas* (muscle adducteur) sont ligaturés aux deux extrémités puis suspendus à un capteur. L'organe est placé dans une cuve perfusée par de l'eau de mer synthétique (Instant Ocean) ajustée à 1 mM de glucose. Le débit est de 0,5 ml/min. Le liquide de perfusion est maintenu à 15°C dans une salle thermorégulée. Le capteur est relié à un amplificateur (Bionic Instruments) connecté à une imprimante. Les fractions sont reprises dans le liquide de perfusion avant d'être injectées par un robinet trois voies pour prévenir d'éventuels stress mécaniques. L'arrivée des échantillons dans la cuve est visualisée par la présence de rouge phénol dans le volume de reprise. Avant chaque expérience, la compétence de l'organe est contrôlée par l'injection d'APGWamide ou de FLRFamide synthétique à 10⁻⁷ M.

VIII. Séquençage par dégradation N-terminale d'Edman

L'analyse de la séquence N-terminale des peptides purifiés est réalisée sur un séquenceur protéique automatique Applied Biosystems Model 477 A. Les dérivés phénylthiohydantoïnes des acides aminés sont identifiés et quantifiés en ligne sur un système 120A CLHP. La séquence peptidique obtenue est confrontée aux spectres de fragmentation par les logiciels Sequest (ThermoFinnigan) et MS-Product (Protein Prospector 3.4.1, Université de Californie <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhym/4.0/msprod.htm>).

IX. Recherche de peptides apparentés et séquençage *de novo*

La recherche de peptides apparentés est décomposée en quatre étapes :

- la première étape consiste à analyser l'échantillon en microLC-ESI-MS/MS en mode data-dependent-scan afin d'obtenir les spectres de fragmentation des peptides présents dans l'échantillon,
- des banques de séquences sont ensuite élaborées par le logiciel Aaseq 5.0 (Zanuttini et Henry <http://users.info.unicaen.fr/~zanutti/aaseq/> Université de Caen, France). Ce logiciel est capable de générer toutes les séquences existantes pour une gamme de masse donnée. Par ailleurs, la présence de motifs peut être spécifiée lors de la création de la banque,
- la recherche de peptides apparentés dans l'échantillon est pilotée par le logiciel Sequest (ThermoFinnigan) (Figure 12). Celui-ci procède en comparant les spectres de fragmentation théoriques générés à partir des séquences présentes dans la banque et les spectres de fragmentation expérimentaux. La recherche en banque est réalisée sur la base de la masse de l'ion père,
- enfin, en fonction de la similitude des spectres, le logiciel définit des scores permettant de valider ou non la séquence.

Pour le séquençage *de novo* la banque de séquences est focalisée sur la masse de l'ion père. L'analyse par le logiciel Sequest est ensuite réalisée uniquement sur le spectre de fragmentation du peptide à séquencer contrairement à la recherche de peptides apparentés pour laquelle l'ensemble de l'échantillon est analysé. Les séquences fournies par le logiciel Sequest sont ensuite analysées par le logiciel MS-Product qui est capable de générer la liste des ions fils théoriques issus de la fragmentation d'un ion père de séquence connue.

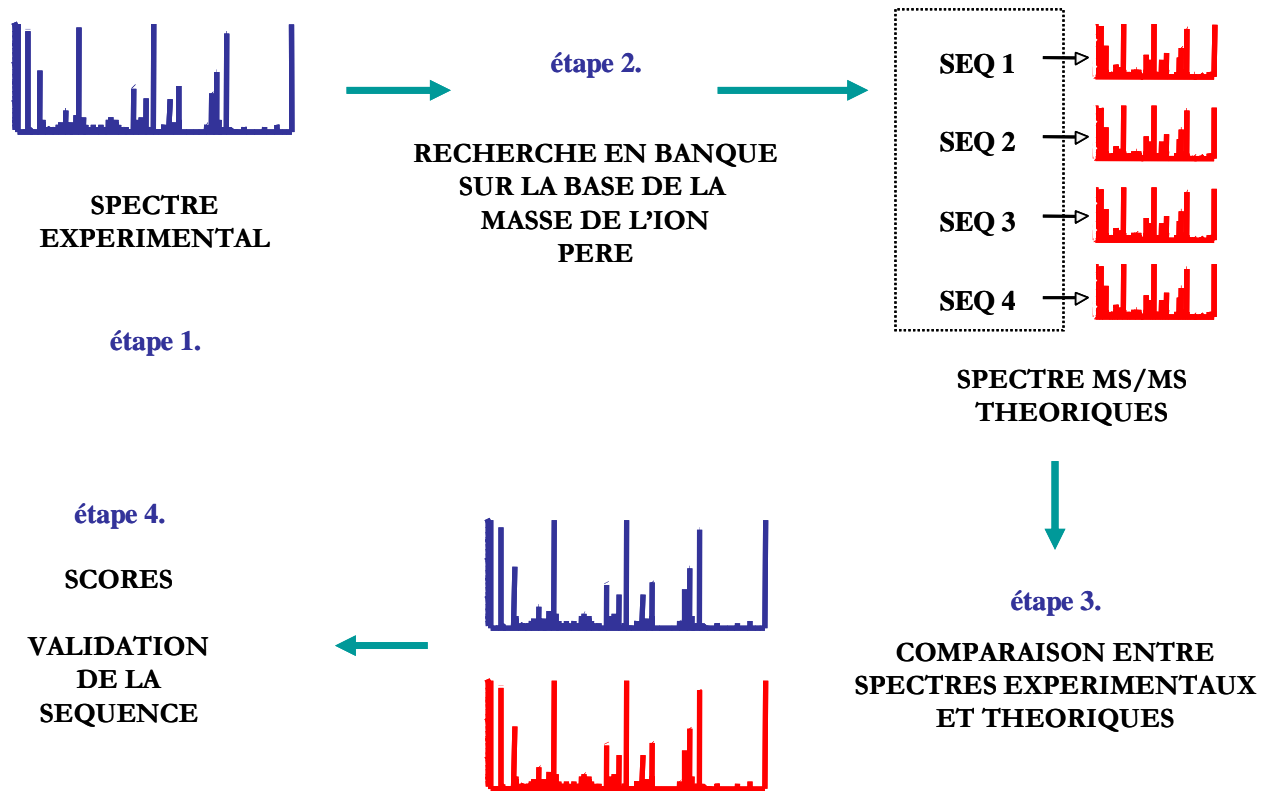


Figure 12 : Détermination de la séquence peptidique par le logiciel Sequest.

X. Bioessai *in vivo*

Les huîtres sont soit disposées à l'intérieur de bacs individuels de 450 ml dont la circulation d'eau en circuit fermé est assurée par un exhausteur, soit placées par lot de 50 à l'intérieur d'un bac commun. Les bacs sont placés dans une structure thermorégulée à 22°C (+/-1°C). Un cocktail de microalgues ajusté à une concentration de 30 cellules/ μl (*Tetraselmis* sp., *T. iso*, *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum*) est ajouté afin de stimuler la filtration des huîtres. Après ajout du peptide ou de l'extrait à tester, les contractions du muscle adducteur (battements rapides des valves) sont comptabilisées de façon visuelle pendant la durée de l'expérience (10 minutes). Pour les huîtres placées dans un bac commun, l'expérience est filmée par une caméra vidéo. Les mouvements des valves au cours de la ponte sont si caractéristiques qu'ils ne peuvent être confondus avec une autre activité musculaire (Galtsoff, 1938a). Après l'expérience, les huîtres sont laissées 20 minutes supplémentaires dans les bacs afin d'observer une éventuelle émission de gamètes. A l'issue de l'expérimentation, les huîtres sont sacrifiées et le sexe est déterminé.

Partie I

Identification de facteurs peptidiques ovariens
impliqués dans le contrôle de la ponte chez
Sepia officinalis

Partie I : Identification de facteurs peptidiques ovariens impliqués dans le contrôle de la ponte chez le céphalopode <i>Sepia officinalis</i>		Page 49
I.	<u>Introduction</u>	<u>Page 51</u>
II.	<u>Approche expérimentale</u>	<u>Page 53</u>
III.	<u>Identification d'un facteur ovarien : le SepCRP</u>	<u>Page 55</u>
IV.	<u>Caractérisation d'une famille de facteurs ovariens : les R-SepCRPs</u>	<u>Page 65</u>
V.	<u>Caractérisation d'une seconde famille de facteurs ovariens : les OJPs</u>	<u>Page 79</u>
VI.	<u>Recherche des précurseurs des R-SepCRPs et des OJPs</u>	<u>Page 102</u>
	VI.1. Introduction	Page 102
	VI.2. Matériels et méthodes	Page 103
	VI.2.1. Criblage de banque	Page 103
	a) Préparation des oligonucléotides marqués	Page 103
	b) Protocole de criblage	Page 103
	VI.2.2. Excision <i>in vivo</i>	Page 105
	VI.2.3. Purification et séquençage	Page 106
	VI.3. Résultats	Page 107
	VI.3.1. Criblage de banque	Page 107
	a) Oligonucléotide EIS	Page 107
	b) Oligonucléotide DEV	Page 107
	VI.3.1. Séquençage des clones	Page 107
	a) Oligonucléotide EIS	Page 107
	b) Oligonucléotide DEV	Page 109
	VI.4. Discussion	Page 110
VII.	<u>Conclusion</u>	<u>Page 111</u>

I. Introduction

La pérennité des espèces repose sur un ensemble de processus physiologiques caractérisés notamment chez la femelle par la vitellogenèse, l'ovulation, la fécondation et la ponte. Ces étapes, sous le contrôle de différentes voies de régulation, font intervenir de nombreux facteurs régulateurs. Chez les invertébrés, des études se sont intéressées au rôle joué par l'ovaire et ont ainsi mis en évidence divers facteurs peptidiques impliqués dans la coordination de ces étapes.

Ainsi, chez les diptères, la vitellogenèse est régulée par deux peptides ovariens : le TMOF (Trypsin Modulating Oostatic Factor) et le Neb-TMOF. Ces deux facteurs, caractérisés respectivement chez *Aedes aegypti* et *Neobelliera bullata*, provoquent une diminution du taux de vitellogénine dans l'hémolymphe en inhibant la synthèse d'enzymes trypsiques (Borovsky *et al*, 1990 ; Bylemans *et al*, 1994). Chez *Aedes aegypti*, la Neb-colloostatin présente la même activité mais le mode d'action est encore inconnu (Bylemans *et al*, 1995). Le Neb-TMOF est de plus capable d'inhiber la synthèse de l'ecdysone (Hua *et al*, 1994). Chez le coléoptère *Schistocerca gregaria*, plusieurs SGPIP (*Schistocerca gregaria* Protease Inhibitor Protein) sont présents au niveau de l'ovaire (Hamdaoui *et al*, 1997, 1998). Cependant, ces peptides ne présentent pas d'homologies structurales avec les TMOF de diptères cités précédemment. Chez cette espèce, un peptide présentant des homologies avec les GPRP (Glycine and Proline Rich Proteins) de végétaux a également été identifié dans l'ovaire d'individus matures (Schoofs *et al*, 1998).

Chez les cnidaires et les échinodermes, des facteurs solubles associés aux œufs, les SAPs (Sperm Activating or Attracting Peptides), favorisent la fécondation. Plus de 80 SAPs ont été identifiés sur la base de leur activité et classés en fonction de leur structure (pour revue voir Suzuki (1995)) :

- les SAP-I (Suzuki *et al*, 1981, 1988a ; Garbers *et al*, 1982 ; Nomura *et al*, 1983 ; Hansbrough et Garbers, 1981)
- les SAP-II subdivisés en deux sous groupes, les SAP-IIA et SAP-IIB (Suzuki *et al*, 1984, 1988b)
- les SAP-III (Suzuki et Yamaguchi, 1986 ; Suzuki *et al*, 1987 ; Takao *et al*, 1990 ; Yoshino *et al*, 1990)
- les SAP-IV (Yoshino *et al*, 1991)

- et les SAP-V (Yoshino *et al*, 1992).

Chez le gastéropode *A. californica*, le regroupement des géniteurs autour des aires de ponte est modulé par des peptides libérés par les cordons d'œufs dans le milieu extérieur : l'attractine, l'enticine, l'emptine et la seductine (Painter *et al*, 1996, 1998, 1999 ; Cummins *et al*, 2004, 2005). Chez le céphalopode *S. officinalis*, la ponte est sous le contrôle de facteurs ovariens de type paracrines : ILME et la SepOvotropine (Zatylny *et al*, 2000b, c). La fécondation est facilitée par un peptide libéré par les ovocytes au niveau de la poche copulatrice, le PIDPGVamide (Zatylny *et al*, 2002).

Chez les invertébrés, l'ovaire semble donc être la principale source de facteurs paracrines et phéromonaux impliqués dans le comportement reproducteur femelle. Ces peptides sont libérés par les ovocytes ou les œufs dans le milieu extérieur. Afin d'identifier de nouveaux facteurs régulateurs de la ponte chez les mollusques et plus spécifiquement chez *S. officinalis*, une approche expérimentale originale a été mise en oeuvre. Celle-ci vise à sélectionner spécifiquement les peptides libérés par les ovocytes matures dans les voies génitales femelles.

II. Approche expérimentale

Chez la seiche, de nouveaux facteurs régulateurs de la ponte ont été recherchés par une approche de type peptidomique. Ce terme, introduit récemment par Clynen et collaborateurs (2001a) et Verhaert et collaborateurs (2001), correspond à l'analyse du contenu peptidique (ou peptidome) d'un échantillon par spectrométrie de masse. Cet outil d'analyse puissant permet en effet de détecter de faibles quantités de peptides à l'intérieur d'échantillons complexes. Chez les invertébrés, cette approche a permis d'identifier des facteurs potentiellement impliqués dans différents processus physiologiques tels que les transitions de phases chez le criquet (Clynen *et al*, 2002) et la réponse immunitaire chez la drosophile (Uttenweiler-Joseph *et al*, 1998 ; Levy *et al*, 2004). Chez *S. officinalis*, cette approche s'est traduite par la comparaison du contenu peptidique des ovocytes matures avec celui de leur milieu d'incubation afin d'identifier des peptides libérés dans les voies génitales et potentiellement impliqués dans le contrôle de la ponte.

L'approche expérimentale, illustrée par la [figure 13](#), est décomposée en 4 étapes :

- **le criblage comparatif** réalisé en microLC-ESI-MS/MS. Le peptidome des ovocytes matures est comparé à celui de leur milieu d'incubation,
- **la purification en LC-ESI-MS/MS**, sur la base de leur masse, des peptides identifiés lors du criblage comparatif. Ces peptides sont testés sur un bioessai myotrope : l'oviducte de seiche. Ceux capables de moduler les contractions de l'oviducte sont soumis à une analyse structurale,
- **l'analyse structurale** des facteurs myotropes, par fragmentation en MS/MS et/ou par dégradation d'Edman. La production des peptides synthétiques permet de confirmer la séquence par confrontation des spectres de fragmentation avec les peptides endogènes et de vérifier l'activité biologique,
- **la recherche de peptides apparentés** en microLC-ESI-MS/MS. Cette recherche, pilotée par les logiciels Sequest et Aaseq 5.0, est axée sur la présence de motifs conservés.

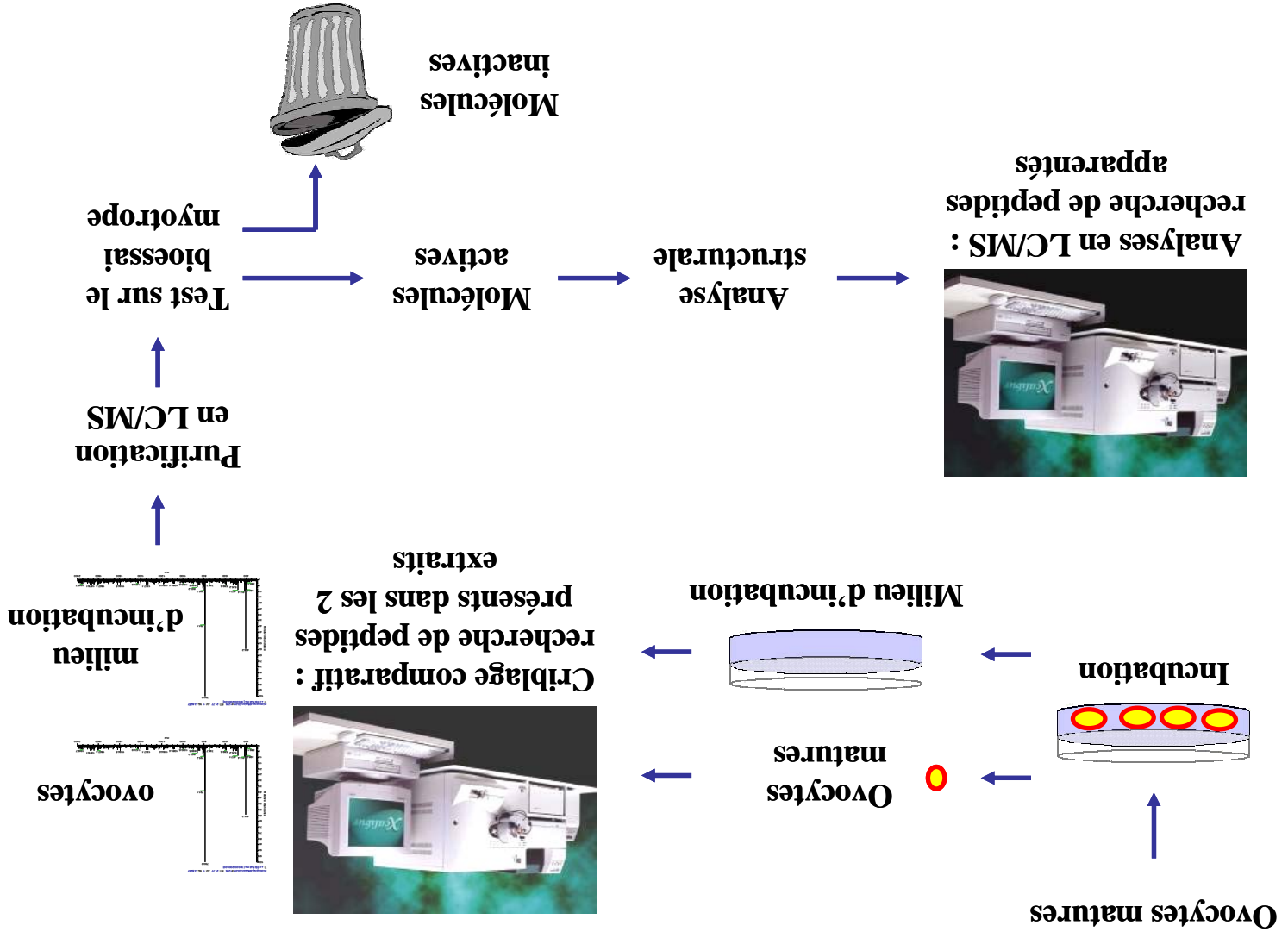


Figure 13 : Approche expérimentale mise en œuvre pour rechercher des peptides libérés par les ovocytes dans le milieu extérieur.

III. Identification d'un facteur régulateur ovarien : le SepCRP

Publication n°1 :

Bernay B, Gagnon J, Henry J. Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004; 314:215-222.

Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*

Benoît Bernay,^a Jean Gagnon,^b and Joël Henry^{a,*}

^a Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR IFREMER Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen, 14032 Caen cedex, France

^b Transmission et Pathogénèse des Maladies à Prions CNRS FRE 2685—Université Joseph Fourier, CHU de Grenoble, Laboratoire d'Immunologie—Hôpital SUD, B.P. 185, 38042 Grenoble cedex 9, France

Received 4 December 2003

Abstract

Mass spectrometry comparative screening was used to identify ovarian regulatory peptides involved in the successive steps of egg-laying in the cuttlefish *Sepia officinalis*. The peptide content of full-grown oocytes (FGO) was compared with that of oocyte-conditioned medium, which resulted in the detection of peptides that were present in both samples. These peptides, which are suspected of being released by the oocyte in the genital tract, were submitted to a structural analysis. This strategy led to the characterization of a new ovarian regulatory peptide (EISLDKD) able to inhibit the contractions of the whole female genital tract and of the main nidamental glands (MNG). As EISLDKD appeared to be the first regulatory peptide directly involved, at physiological concentrations, in the secretion of the egg capsule by the main nidamental glands, it was named SepCRP for *Sepia* Capsule Releasing Peptide. Mass spectrometry analysis clearly demonstrated that SepCRP was expressed during vitellogenesis by the ovarian follicles and released by the FGO in the lumen of the female genital tract. In association with the ovarian 5-HT, SepCRP would be responsible for the storage of FGO to avoid the spawning of unfertilized oocytes before mating. Released by the distal oviduct in the mantle cavity, SepCRP probably in association with a cocktail of ovarian regulatory factors targets the MNG to regulate the egg capsule secretion. Thus, the ovary appeared to be one of the main sources of regulatory peptides involved in the successive steps of egg-laying in the cephalopod mollusk *S. officinalis*.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Egg capsule secretion; Egg-laying; Ovarian regulatory peptide; Myotropin; *Sepia officinalis*; Cephalopod; Invertebrate; Mass spectrometry

In the English channel cuttlefish, *Sepia officinalis*, the reproductive season takes place in the second and last year of the life cycle, between February and June. During this period, the successive steps of egg-laying are clearly stereotyped. Following previtellogenesis which is characterized by an intense phase of cell multiplication, the follicular syncytium synthesizes the yolk proteins leading to the growth of the oocyte. The first step of egg-laying is the release by the ovary of full-grown oocytes (FGO) in the genital coelom [1]. This period is characterized by the release of ovarian 5-HT synthesized in the

FGO and responsible for the inhibition of oviducal contractions [2]. The ovarian 5-HT inhibits oocyte transport of the unmated mature females and leads to the accumulation of FGO in the genital coelom. The mating is probably one of the main events which trigger the egg-laying. The oocyte transport performed by the oviduct contractions is also modulated by neuropeptides such as FMRFamide related Peptides (FarPs) and AP-GWamide related Peptides [3,4] in association with ovarian peptides such as ILME and SepOvotropin [5,6]. During their transport, and before they are released into the mantle cavity by the contractions of the distal oviduct, the oocytes receive a first gelatinous envelope secreted by the oviducal gland. A second egg encapsulation is performed by the secretions of the nidamental

* Corresponding author. Fax: +02-31-538009.

E-mail addresses: henry@ibba.unicaen.fr, henry@ibfa.unicaen.fr (J. Henry).

glands (MNG) [7]. The embedded oocytes are forced into the funnel tube and fertilized by spermatozoa stored in the copulatory pouch [8]. Finally, the eggs are attached to the substrate until hatching. After the first egg-laying, the genital coelom and the main nidamental glands are usually empty. Some females are then able to reconstitute the egg capsule products as well as produce a new batch of oocytes which allows for the occurrence of multiple spawning [9].

The aim of this study was to characterize a peptidic factor released by the oocytes and involved in at least one step of egg-laying. The identification of the peptide was based on a comparative screening performed in microLC–ESI–MS/MS on full-grown oocytes and oocyte-conditioned seawater. The peptides that were detected in the two samples were then suspected to be expressed by the oocytes and released to target organ tissues involved in the successive steps of egg-laying.

Similar factors have been identified in marine invertebrates. In sea urchins, sperm attracting or activating peptides (SAPs) are released by the oocytes to facilitate fertilization [10–17].

In *S. officinalis*, we have recently characterized two ovarian regulatory peptides involved in oocyte transport and sperm attraction which are released by the oocytes and/or the eggs [5,17]. The approach used, which consisted of associating a mass spectrometry screening with a specific myotropic bioassay, appeared to be a powerful strategy to identify regulatory peptides controlling egg-laying and egg capsule secretion.

Materials and methods

Animals. All the cuttlefish were trapped in the Baie de Seine between January and June. They were maintained in 1000-liter outflow tanks at $15 \pm 1^\circ\text{C}$ at the Marine Station of Luc sur Mer (University of Caen, France) under a natural photoperiod.

Recovery of material from tissues and seawater. For HPLC purification and microLC–ESI–MS/MS analysis, 600 g of FGO was homogenized in 10 volumes of HCl 0.1 N at 100°C and centrifuged for 30 min at 35,000g at 4°C . The supernatants were concentrated on Chromafix C18 cartridges. For the microLC–ESI–MS/MS analysis, previtellogenic follicles, vitellogenic follicles, and eggs were extracted as described above. Moreover, the molecules released from 50 full-grown oocytes in 20 ml of synthetic filtered seawater were concentrated after various incubation times on Chromafix C18 cartridges.

MicroLC–ESI–MS/MS analysis. Analyses were performed with a HPLC Surveyor chain connected on-line to an orthogonal electrospray

source (Deca XP MS-n Thermofinnigan) operated in the positive electrospray ionization mode (ESI+). The ions were focused into an ion trap, capable of MS and MS/MS analyses. The mass spectra were acquired during 35 ms from m/z 300 to 2000. The capillary exit of the electrospray ion source was set at 70 V, the octapole at 3 V, and the capillary temperature at 200°C . A counter flow of nitrogen was used as nebulizing gas. Xcalibur data system was used to acquire the data, which were further processed with Turbo Sequest data system. The organic fraction of each extract was resuspended in $10\ \mu\text{l}$ of 0.1% formic acid in water and injected onto a C18 Thermo Hypersil column ($0.5 \times 50\ \text{mm}$, $3\ \mu\text{m}$) with an acetonitrile linear gradient of 3%/min in formic acid 0.1%, from 2 to 60%. A split ratio of 30:1 was used to perfuse the column at a flow rate of $10\ \mu\text{l}/\text{min}$. HPLC column was rinsed with 90% acetonitrile in 0.1% formic acid between each injection. The MS data were acquired in scan mode considering the positive ion signal.

High performance liquid chromatography purification. The FGO extract was resuspended in $100\ \mu\text{l}$ of 0.1% formic acid in water and injected into a MN 250/4 nucleosil 100-7 C18 column with an acetonitrile linear gradient of 0.36%/min in 0.1% formic acid at a flow rate of 1 ml/min, during 25 min. A split ratio of 100:1 was used to perfuse the electrospray source at a flow rate of $10\ \mu\text{l}/\text{min}$ and 1-min fractions were collected.

Biological assay. The myotropic bioassay was performed with several contractile organs. The genital tract (including the proximal oviduct containing FGO, the oviducal gland, and the distal oviduct), the ovarian stroma, the main nidamental gland, and the esophagus were dissected from mature females sacrificed before and after egg-laying. Each organ was suspended from a displacement transducer (Phymp, Bionic Instruments) connected to a computer controlling the recorder and the DATAC (Dispositif d'Acquisition et de Traitement Automatique de la Contraction). The muscle chamber was perfused at a flow rate of 0.5 ml/min with synthetic seawater (Instant Ocean) containing 1 mM glucose and maintained at 15°C . The HPLC fractions were injected in the perfusing flow using a three-way valve in order to avoid mechanical and thermal stress. The flow of fractions into the muscle chamber was traced by addition of phenol red.

Amino acid sequencing. N-terminal sequence analyses were performed using an Applied Biosystems Model 477 A protein sequencer, and amino acid phenylthiohydantoin derivatives were identified and quantified on-line with a Model 120A HPLC system, as recommended by the manufacturer. The amino acid sequence was checked from MS/MS spectrum with the softwares TurboSequest (Thermofinnigan) and MS-Product 1.6.1 (Protein Prospector 3.4.1, University of California).

Bioactivity of EISLDDK. The whole genital tract was perfused with 10 ml FGO conditioned seawater. Moreover, aliquots of a synthetic peptide (Millegen) ranging from 10^{-19} to 10^{-7} M were tested using the oviduct bioassay in order to obtain qualitative and quantitative data about its myotropic activity. To check the specificity of EISLDDK, aliquots from 10^{-15} to 10^{-5} M were tested on different muscles. Each aliquot was resuspended in $100\ \mu\text{l}$ perfusion liquid and immediately injected as described above.

EISLDDK kinetic release from FGO. FGO were displayed in samples of five oocytes in 15 ml of Chromafix C18 filtered seawater. Volumes of 10 ml of seawater were collected by step of 10 min during

Table 1
Counts of m/z 316, 577, and 801 from MS/MS spectra performed from samples of increasing concentrations of synthetic SepCRP

Synthetic peptide (pg)	Counts of m/z 316	Counts of m/z 577	Counts of m/z 801
1	1.2	1.4	7.4
10	1.6	3.2	17.7
100	28.8	41.2	195
1000	204	302	1340
	$y = 1.3205x + 23.235$ $r^2 = 0.9982$	$y = 0.2016x + 2.90$ $r^2 = 0.9983$	$y = 0.2987x + 3.9544$ $r^2 = 0.9988$

1 h and by step of 1 h during 4 h before being concentrated on Chromafix C18 cartridges and analyzed in microLC–ESI-MS/MS as described above.

Dosage of EISLDKD. The quantities of peptide were estimated in MS/MS mode from samples collected from 10 to 300 min and selecting the m/z 819 as the product ion. The relative abundance of the fragment ions SLD-H₂O (m/z 316), SLDK (m/z 577), and EISLDKD-H₂O (m/z 801) was used to establish a relation between the concentration of synthetic peptide and the ion counts obtained from 1-min acquisition time (Table 1).

Results

Mass spectrometry comparative screening

The samples of FGO and full-grown oocytes conditioned seawater were submitted to LC/MS analysis. The total ion chromatograms (TIC) revealed several common peaks. We focused on the peak eluted between 15.5 and 18.9% of acetonitrile corresponding to the single

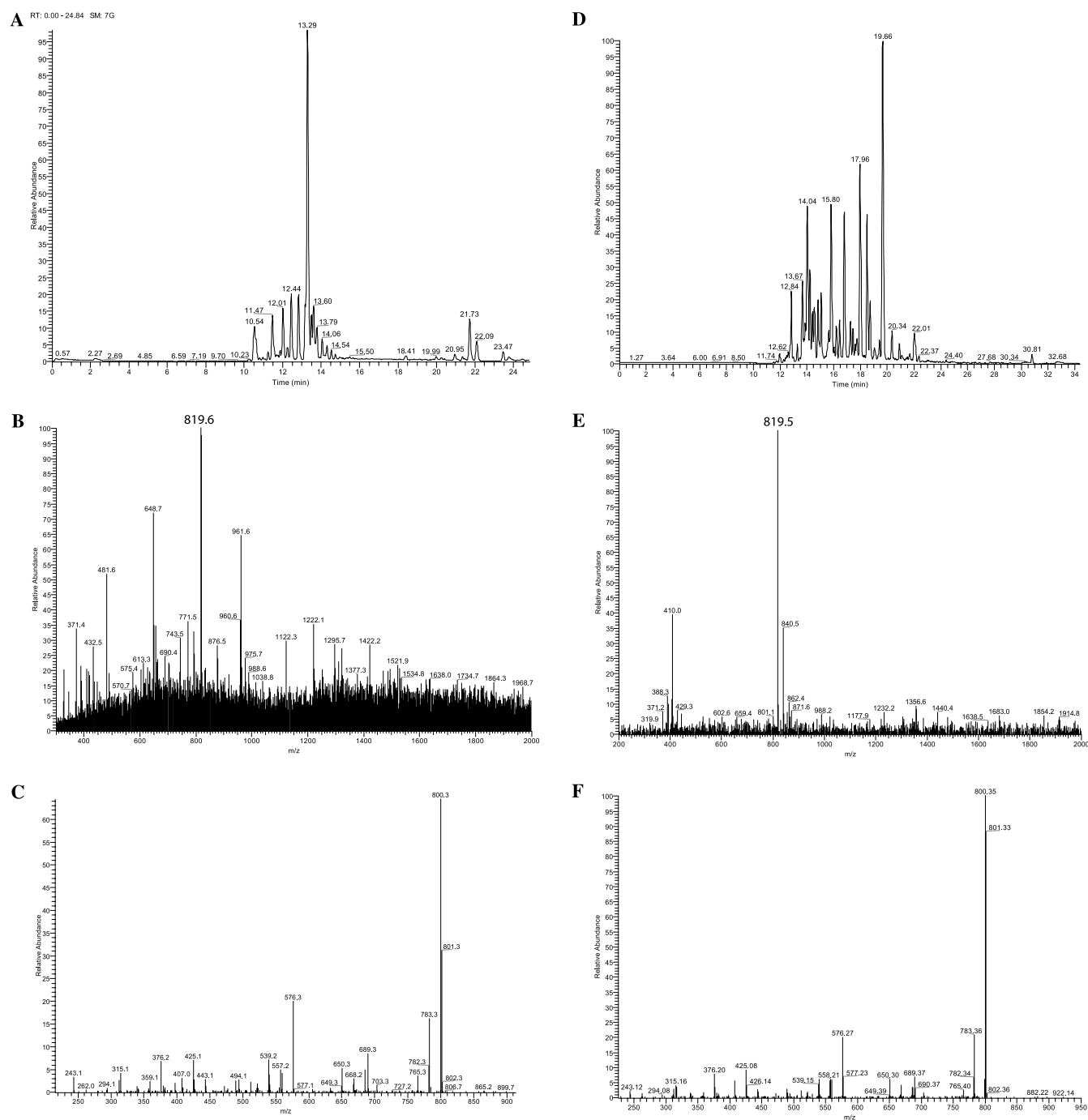


Fig. 1. Ionic chromatograms showing the mass spectrometry comparative screening between full-grown oocytes conditioned seawater (A) and full-grown oocyte extract (D). MS spectra of the two samples for 12.84-min retention time (B,E). MS/MS spectra of the m/z 819 from full-grown oocytes conditioned seawater (C) and full-grown oocyte extract (F).

charged ion at m/z 819 ± 0.5 . The similarity of MS/MS spectrum obtained from the two samples (Fig. 1) clearly demonstrated that the two single charged ions at m/z 819 corresponded to the same peptide.

HPLC purification

The purification was performed in microLC–ESI-MS/MS on the basis of the MS data. The 1-min HPLC fractions were tested on the *in vitro* bioassay. The activity was concentrated in the apparently pure peak for a retention time of 16.34 min (Fig. 2) containing the single charged ion at m/z 819 ± 0.5 detected by the comparative screening described above. This peak eluted in the fractions 16 and 17 was concentrated in order to be submitted to Edman degradation.

Sequence determination

The primary sequence of this peptide was determined by Edman degradation: EISLDKD. The confrontation of MS/MS data obtained from synthetic and endogenic peptide confirmed the amino acid sequence (Fig. 3) and the absence of C-terminally amidation. The apparent molecular weight (818.5 ± 0.1 Da) was very close to the calculated molecular weight (818.41 Da).

Bioactivity of EISLDKD

Increasing concentrations of synthetic peptide were tested on the whole genital tract of a mature female

cuttlefish (proximal oviduct containing vitellogenic oocytes associated to oviducal gland and distal oviduct). The results summarized in Table 2 showed that the activity was closely related to the maturity stage. Indeed, the inhibition of the whole genital tract was observed from 10^{-10} M before egg-laying against only 10^{-18} M after egg-laying. For the main nidamental glands responsible for the secretion of the egg capsule, the thresholds of activity decreased after egg-laying (10^{-13} M against $10^{-8}/10^{-7}$ M before egg-laying) (Figs. 4 and 5). The basal activity was recovered after a time of 5–20 min depending on the peptide concentration applied. As shown in Table 2, the activity of SepCRP was restricted to the genital tract and the main nidamental glands. In addition, a similar bioactivity was recovered by the perfusion of the whole genital tract by the FGO conditioned seawater, as yet described in [5].

MicroLC–ESI-MS/MS tissue mapping of SepCRP

The mapping was performed in MS/MS mode based on the m/z 819. As shown in Table 3, SepCRP was strictly localized in the genital apparatus: the vitellogenic follicles, the FGO, the eggs, and the internal egg-capsule (secreted by the oviduct gland). Moreover, the occurrence of a release by the FGO was clearly established. The analysis performed on the different parts of the central nervous system and the hemolymph did not reveal any trace of this peptide.

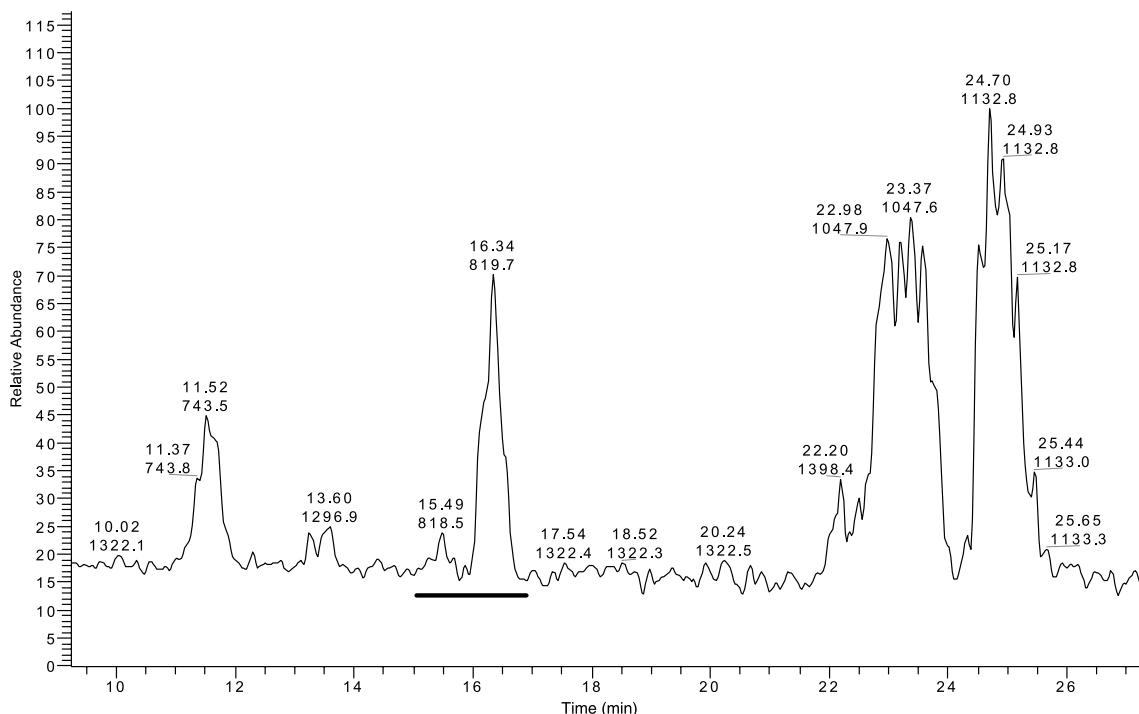


Fig. 2. Ionic chromatogram of the first purification step of full-grown oocytes onto a C18 column. The black line indicates myotropic fraction.

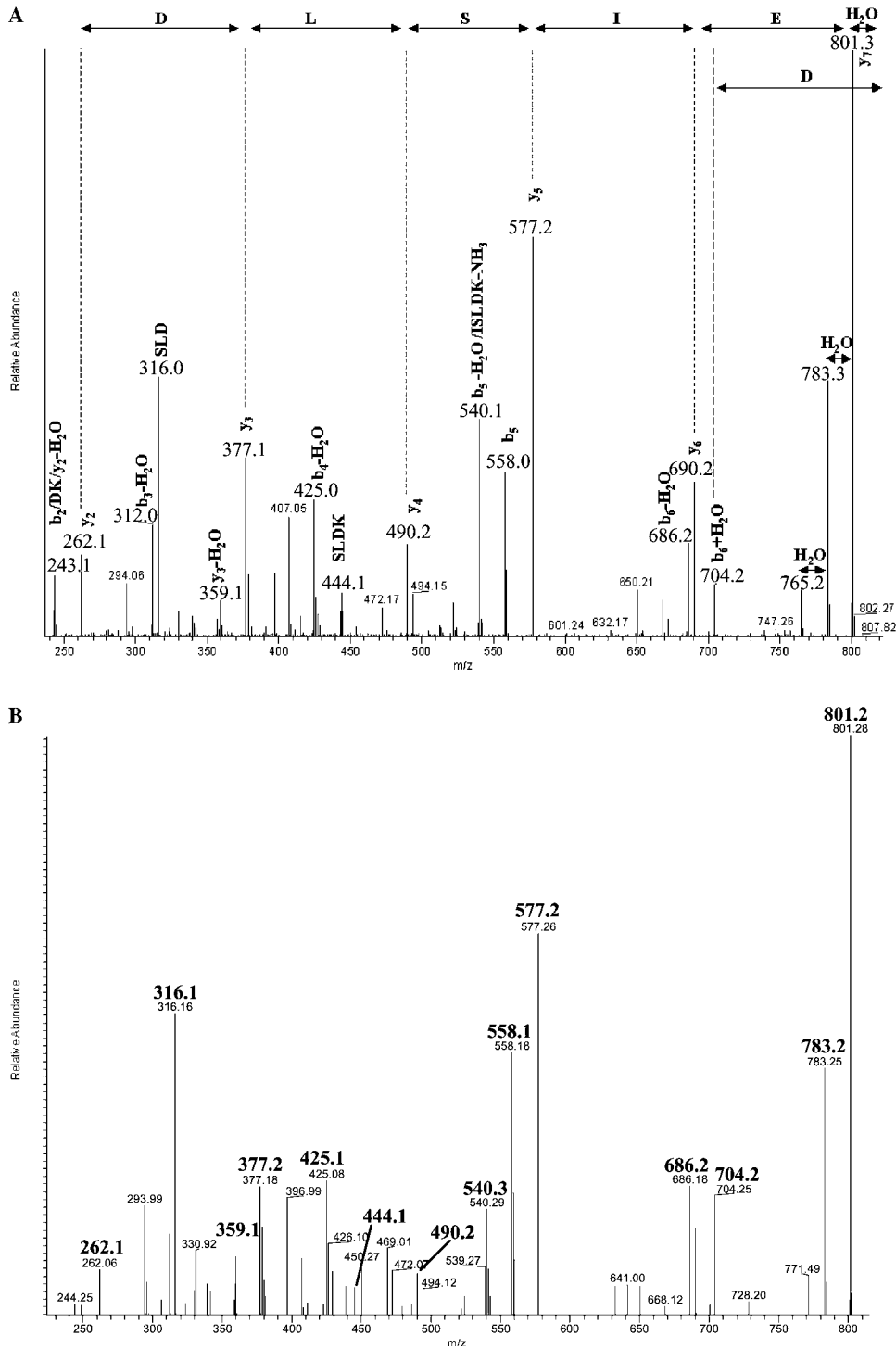


Fig. 3. MS/MS spectra of synthetic SepCRP (A) and endogenic SepCRP (B).

SepCRP kinetic release from full-grown oocytes

The level of SepCRP released was measured in MS/MS mode. The concentration of the *m/z* 819 was directly correlated to the incubation time. The accumulation of SepCRP in the incubation medium corresponded to a calculated release of 0.16 pmol/FGO/min.

Discussion

A new ovarian regulatory peptide named SepCRP was characterized in the cuttlefish *S. officinalis* on the criteria of its ability to be stored (and maybe expressed) and then released in the external medium by the full-grown oocytes. The investigations have been performed using mass

Table 2
Bioactivity of synthetic SepCRP

Muscle	Myotropic activity	Threshold concentration (M)
Whole mature genital tract		
Before the first egg-laying	Inhibition	10^{-18}
After egg-laying	Inhibition	10^{-10}
Before the following egg-laying	Inhibition	10^{-15}
Esophagus	No activity	—
Ovarian stroma	No activity	—
Rectum	No activity	—
Main nidamental glands		
Before egg-laying	Inhibition	10^{-8}
After egg-laying	Inhibition	10^{-13}

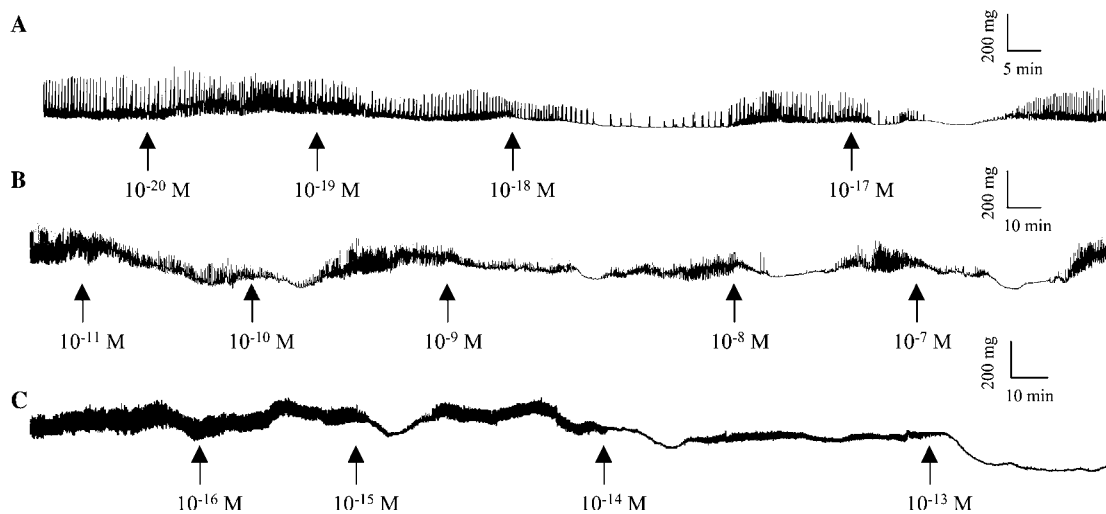


Fig. 4. SepCRP-induced contraction of the cuttlefish whole genital tract for a threshold of (A) 10^{-18} M before the first egg-laying, (B) 10^{-10} M after the first egg-laying, and (C) 10^{-15} M before the following egg-laying.

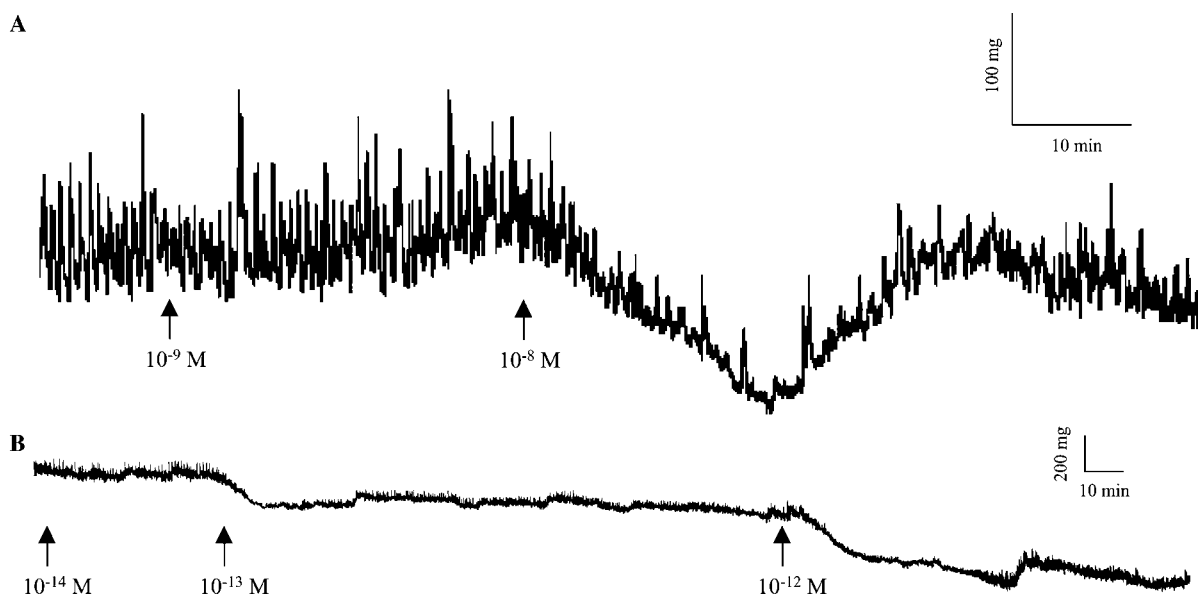


Fig. 5. SepCRP-induced contraction of the cuttlefish main nidamental gland for a threshold of (A) 10^{-8} M before egg-laying and (B) 10^{-13} M after egg-laying.

Table 3
Tissue mapping in microLC-ESI-MS/MS

	Occurrence of EISLDKD
Previtellogenic follicles	Yes
Vitellogenic follicles	Yes
Full-grown oocytes	Yes
Eggs	Yes
Internal capsule	Yes
External capsule	Yes
Vitellogenic follicles conditioned seawater	Yes
Full-grown oocytes conditioned seawater	Yes
Eggs conditioned seawater	Yes
Central nervous system	No
Hemolymph	No

spectrometry comparative screening. This approach appeared to be a powerful means of identification of regulatory factors involved in seasonal and/or local regulations. From a very low level of biological material, a peptide can be identified on the basis of its localization and isolated following the corresponding single and/or multicharged ions in microLC-ESI-MS/MS. The biological activity of the new peptide was then elucidated by testing the effect of increasing concentrations of a synthetic peptide on multiple *in vitro* bioassays involving the different parts of the genital apparatus. These investigations led to the characterization of a totally new heptapeptide expressed in the vitellogenic ovarian follicles as previously described for ILME and SepOvotropin [5,6]. Released by the FGO in the lumen of the oviduct, SepCRP directly targeted the oviduct and inhibited contractions. Similar to what was observed with the ovarian 5-HT [2], the first action of this peptide could be to force the storage of FGO in the genital coelom of unmating mature females in order to avoid the release of unfertilized eggs. The second action could be related to the second target organ identified in this paper: the main MNG. Concurrent with the arrest of FGO transport, the mechanical secretion of egg capsule products by the MNG would be inhibited by the release of SepCRP in the lumen of the oviduct. The distal oviduct opening in the mantle cavity close to the MNG opening would be the route followed by SepCRP to reach the second target and induce the mechanical release of the egg capsule at a concentration as low as 10^{-13} M.

In addition, *in vitro* experiments have clearly demonstrated important variations in response thresholds. These variations appeared to be directly correlated with the egg-laying stage of the animal. Before egg-laying, the inhibition threshold of the oviduct contractions was very low (10^{-18} M) probably to avoid the release of unfertilized eggs even if the genital coelom was not yet full. After mating, when the egg-laying has started, the increase of the threshold (10^{-13} M) allows for the maintenance of FGO transport by the genital tract and the continuation of the egg-laying.

For the MNG, we demonstrated in a previous study the occurrence of FMRFamide related peptides (FaRPs) at the level of the nerve endings surrounding the secretory tissue and their ability to exert a strong stimulation of MNG contractions at physiological concentrations [4]. In association with SepCRP released in the mantle cavity by the FGO at the level of the distal oviduct, the FaRPs could induce the secretion of egg capsule products. Alternating stimulations (FaRPs) and inhibitions (SepCRP) of the muscular fibers surrounding excretory ducts could induce the mechanical transport followed by the secretion of egg capsule products in the mantle cavity necessary for the embedding of the FGO. Indeed, during egg-laying and just before the fertilization, the MNG orifices were in close proximity to the FGO. When maintained during 3 or 4 min (egg-laying frequency) against the orifices of the MNG, each FGO has the potential to release approximately 131 pg/min of SepCRP (0.16 pmol/FGO/min). This release rate was sufficient to maintain a local peptide concentration capable of inducing a response from the MNG (SepCRP threshold: 10^{-13} M = 0.08 pg/ml) despite the stream and dilution caused by the gills in the mantle cavity. We suspect that this local regulation was one of the steps allowing the synchronization between genital coelom content, ovary maturation and egg capsule synthesis, and secretion.

In this context, the ovary of *S. officinalis*, as source of regulatory peptides, appears to be one of the main organs involved in the control of successive reproductive steps such as oocyte transport [2,5,6], egg capsule secretion, oocyte fertilization [17], and adults gathering in the egg-laying area. Moreover, in association with the CNS, the ovary is directly involved in the stimulation of the MNG secretion synthesis [18]. We therefore suspect the occurrence of an ovarian synchronization of growth and maturation of the accessory sex glands (ASG) during gametogenesis. As mass spectrometry analysis clearly demonstrates, SepOvotropin, ILME, and SepCRP are expressed during vitellogenesis, however, we cannot rule out the hypothesis that they could target ASG to regulate the synthesis level.

The regulatory peptides expressed in the ovary or in the ASG, also called sex-peptides, have been characterized in many invertebrates. In the marine snail *Aplysia californica*, a peptide called attractin released by the egg cordons is responsible for the gathering of adults [19,20]. In the insect *Drosophila melanogaster*, the sex-peptides induce oviposition and ovulation [21–24], and in *Neobelliera bullata* the hexapeptide Neb TMOF inhibits ecdysone biosynthesis [25]. Thus, the expression and the release of regulatory peptides by the ovary appears to be a widespread strategy in invertebrates. In *S. officinalis*, even though ovarian peptides did not seem able to trigger egg-laying, they appear to play an important role in this mechanism. Observations performed

in aquaria (unpublished results) demonstrate that mating is one of the *stimuli* (visual, mechanical or chemical?) capable of inducing the egg-laying behavior leading to oocyte transport, egg capsule secretion, fertilization, and constitution of the egg mass.

Acknowledgments

We thank Jean-Marc Nicolas and Darlene Mossman for correcting the English of the manuscript, Didier Rousseville, the captain of the professional fishing boat “Père Arthur” and his crew for the help in providing cuttlefish as well as Laurence Lafaiteur. This work was supported by the Conseil Regional de Basse Normandie.

References

- [1] A. Dhainaut, A. Richard, Vitellogénèse chez les Céphalopodes Décapodes. Evolution de l’ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale, Arch. Anat. Micr. Morph. Exp. 65 (1976) 183–208.
- [2] C. Zatylny, F. Durantou, E. Boucaud-Camou, J. Henry, Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying, Mol. Reprod. Dev. 55 (2) (2000) 182–188.
- [3] J. Henry, P. Favrel, E. Boucaud-Camou, Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the mobility of the mature oviduct in the cuttlefish, *Sepia officinalis*, Peptides 18 (1997) 1469–1474.
- [4] J. Henry, C. Zatylny, E. Boucaud-Camou, Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides, Peptides 20 (1999) 1061–1070.
- [5] C. Zatylny, J. Gagnon, E. Boucaud-Camou, J. Henry, ILME: a waterborne pheromonal peptide released by the eggs of *Sepia officinalis*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 275 (1) (2000) 217–222.
- [6] C. Zatylny, J. Gagnon, E. Boucaud-Camou, J. Henry, The SepOvotropin: a new ovarian peptide regulating oocyte transport in *Sepia officinalis*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 276 (3) (2000) 1013–1018.
- [7] L. Jecklin, Beitrag zur kenntnis der Laichgellerten und der biologie der embryonen decapoder cephalopoden, Rev. suisse Zool. 41 (1934) 593–673.
- [8] S.v. Boletzky, Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda, Adv. Mar. Biol. 25 (1989) 85–115.
- [9] S.v. Boletzky, Fecundity variation in relation to intermittent or chronic spawning in the Cuttlefish, *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda), Bull. Mar. Sci. 40 (2) (1987) 382–387.
- [10] N. Suzuki, K. Nomura, H. Ohtake, S. Isaka, Purification and the primary structure of sperm-activating peptides from the jelly coat of sea urchin eggs, Biochem. Biophys. Res. Commun. 99 (4) (1981) 1238–1244.
- [11] T. Nishigaki, K. Chiba, W. Miki, M. Hoshi, Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs, Zygote 4 (1996) 237–245.
- [12] D.L. Garbers, H.D. Watkins, J.R. Hansbrough, A. Smith, K.S. Misono, The amino acid sequence and chemical synthesis of speract and of speract analogues, J. Biol. Chem. 257 (1982) 2734–2737.
- [13] J.R. Hansbrough, D.L. Garbers, Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa, J. Biol. Chem. 256 (1981) 1447–1452.
- [14] N. Suzuki, H. Shimomura, E.W. Radany, C.S. Ramarao, G.E. Ward, J.K. Bentley, D.L. Garbers, A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa, J. Biol. Chem. 259 (1984) 14874–14879.
- [15] N. Suzuki, K. Yoshino, The relationship between amino acid sequences of sperm-activating peptides and the taxonomy of echinoids, Comp. Biochem. Physiol. B 102 (1992) 679–690.
- [16] N. Suzuki, Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs, Zool. Sci. 12 (1995) 13–27.
- [17] C. Zatylny, L. Marvin, J. Gagnon, J. Henry, Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide, Biochem. Biophys. Res. Commun. 296 (2002) 1186–1193.
- [18] J. Henry, E. Boucaud-Camou, Experimental evidence of a dual endocrine control of biosynthesis in the main nidamental glands of *Sepia officinalis* L. by factors from the central nervous system and the ovary, Comp. Biochem. Physiol. 106 (4) (1993) 739–742.
- [19] S.D. Painter, B. Clough, R.W. Garden, J.V. Sweedler, G.T. Nagle, Characterization of *Aplysia* attractin, the first water-borne peptide pheromone in invertebrates, Biol. Bull. 194 (1998) 120–131.
- [20] S.D. Painter, B. Clough, D.B.G. Akalal, G.T. Nagle, Attractin, a water-borne peptide pheromone in *Aplysia*, Invert. Reprod. Dev. 36 (1–3) (1999) 191–194.
- [21] E. Kubli, The sex-peptide, Bioessays 14 (11) (1992) 779–784, Review.
- [22] M.F. Wolfner, Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products, Insect Biochem. Mol. Biol. 27 (3) (1997) 179–192, Review.
- [23] Y. Heifetz, O. Lung, E.A. Frongillo, M.F. Wolfner, The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary, Curr. Biol. 10 (2) (2000) 99–102.
- [24] P. Saudan, K. Hauck, M. Soller, Y. Choffat, M. Ottiger, M. Sporri, Z. Ding, D. Hess, P.M. Gehrig, S. Klauser, P. Hunziker, E. Kubli, Ductus ejaculatorius peptide 99B (DUP99B), a novel *Drosophila melanogaster* sex-peptide pheromone, Eur. J. Biochem. 269 (3) (2002) 989–997.
- [25] D. Bylemans, D. Borovsky, D.F. Hunt, J. Shabanowitz, L. Grauwels, A. De Loof, Sequencing and characterization of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) from the ovaries of the grey fleshfly, *Neobellieria* (Sarcophaga) *bullata*, Regul. Pept. 50 (1) (1994) 61–72.

IV. Caractérisation d'une famille de facteurs ovariens : les R-SepCRPs

Publication n°2 :

Bernay B, Baudy-Floc'h M, Zanuttini B, Gagnon J, Henry J. Identification of SepCRP analogues in the cuttlefish *Sepia officinalis*: a novel family of ovarian regulatory peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 338:1037-1047.

Identification of SepCRP analogues in the cuttlefish *Sepia officinalis*: A novel family of ovarian regulatory peptides

Benoît Bernay^a, Michèle Baudy-Floc'h^b, Bruno Zanuttini^c, Jean Gagnon^d, Joël Henry^{a,*}

^a *Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100 IFREMER Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France*

^b *Laboratoire SESO, UMR CNRS 6510, Institut de Chimie, Université de Rennes I, 263 Av. du Général Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France*

^c *Groupe de Recherche en Informatique, Image et Instrumentation de Caen (GREYC), CNRS UMR 6072, Université de Caen (UFR des Sciences) et ISMRA, Caen, France*

^d *Laboratoire d'Immunologie, Hôpital SUD, Transmission et Pathogenèse des Maladies à Prions CNRS FRE 2685, Université Joseph Fourier, CHU de Grenoble, France*

Received 3 October 2005

Available online 18 October 2005

Abstract

In the cuttlefish, *Sepia officinalis*, the ovary appears to be one of the main sources of regulatory peptides involved in the successive steps of egg-laying. Following the identification of the SepCRP-1, which is a peptide extracted from ovary and involved in egg capsule secretion, investigations were focused on the identification of related peptides. Seven related-*Sepia* Capsule Releasing Peptides (R-SepCRPs) were identified by means of mass spectrometry and characterized using MS/MS spectra and/or Edman degradation. Finally, primary structures were verified by the comparison of MS/MS spectra from endogenic and synthetic peptides. This new ovarian peptide family exhibits a conserved SLXKD tag involved in the biological activity. LC-MS/MS screening clearly demonstrates that R-SepCRPs are restricted to the female genital tract. Expressed during vitellogenesis, they are released by vitellogenic follicles and full-grown oocytes (FGO) in the genital coelom. Biological activities suggest that R-SepCRPs would be responsible for the storage of FGO before mating and would take part in the mechanical secretion of egg capsule products, as previously described for SepCRP-1.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Egg-laying; Egg capsule secretion; Ovarian regulatory peptide; Myotropin; *Sepia officinalis*; Cephalopod; Invertebrates; Mass spectrometry

Since the isolation of GWamide from the cuttlefish *Sepia officinalis* [1], a constant effort has been invested in the characterization of new myotropic peptides modulating the motility of the oviduct. These investigations have led to the identification of numerous factors such as neuromediators, neuropeptides, and ovarian peptides involved in the successive steps of egg-laying. In the cuttlefish, this event is clearly stereotyped. Following an intense vitellogenic period [2], full-grown oocytes (FGO) are released by the ovary and stored into the genital coelom. Ovarian 5-HT synthesized by FGO and able to inhibit oviducal

contractions is responsible for the storage of FGO in the genital coelom until mating [3]. After mating, ovarian peptides such as ILME and SepOvotropine [4,5], in association with neuropeptides such as FMRFamide-related-peptides (FaRPs) and APGWamide-related-peptides [1,6], modulate oviduct contractions to ensure the release of oocytes. Then, oocytes receive a first gelatinous envelope secreted by the oviducal gland and a second one released by the nidamental glands [7]. Fertilization, facilitated by ovarian peptides [8], is performed with spermatozoa stored in the copulatory pouch [9]. Recently, our laboratory reported the characterization of the SepCRP (*Sepia* Capsule Releasing Peptide), a myotropic ovarian peptide released by the cuttlefish FGO [10]. This new ovarian peptide, able to inhibit the contractions of the

* Corresponding author. Fax: +33 2 31 56 43 56.
E-mail address: joel.henry@unicaen.fr (J. Henry).

whole genital tract and the main nidamental gland (MNG), was suspected to be involved in the storage of FGO in the genital coelom and partially responsible for the mechanical secretion of egg capsule products by the MNG. Characterization of the SepCRP was performed using a mass spectrometry comparative screening associated with a specific bioassay. This approach appeared to be a powerful strategy to identify regulatory peptides from a very small amount of biological material. In this study, using mass spectrometry, we have investigated the putative occurrence of peptides related to SepCRP (R-SepCRPs) in FGO. The first part of this work was aimed at the identification of putative truncated R-SepCRPs. The second part was performed using FGO-conditioned medium and monitored by a myotropic bioassay. Finally, R-SepCRPs were identified by a mass spectrometry screening monitored by sequence libraries focused on the consensus tag. Biological activities were established with synthetic peptides.

Materials and methods

Animals

All the cuttlefish were trapped in the Bay of Seine between January to June. They were maintained in 1000-L outflow tanks at $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ at the Marine Station of Luc sur Mer (University of Caen, France) under a natural photoperiod.

Recovery of material from tissues and seawater

For HPLC purification and microLC–ESI–MS/MS analysis, 600 g FGO was homogenized in 6 L HCl 0.1 N at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ and centrifuged 30 min at $35,000g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatants were concentrated on Chromafix C18 cartridges. For the microLC–ESI–MS/MS analysis, previtellogenic follicles, vitellogenic follicles, and eggs were extracted as described above. In addition, the peptides released from 50 full-grown oocytes or 50 vitellogenic oocytes in 20 ml of synthetic filtered seawater at different pH (5, 5.5, 6, and 6.5) were concentrated on Chromafix C18 cartridges.

MicroLC–ESI–MS/MS analysis

Analysis was performed with a HPLC Surveyor chain connected on-line to an orthogonal electrospray source (Deca XP MS-n Thermofinnigan) operated in the positive electrospray ionization mode (ESI+). The ions were focused into an ion trap, capable of MS and MS/MS analyses. The mass spectra were acquired during 35 ms from 300 to 2000 m/z . The capillary exit of the electrospray ion source was set at 70 V, the octapole at 3 V, and the capillary temperature at $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. A counter flow of nitrogen was used as nebulizing gas. Xcalibur data system was used to acquire the data, which were further processed with a Turbo Sequest data system. The organic fraction of each extract was resuspended in $10\text{ }\mu\text{l}$ of 0.1% formic acid in water and injected onto a C18 Thermo electron corporation C18 column ($50 \times 0.5\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$) with an acetonitrile linear gradient of 3% per minute in formic acid 0.1%, from 2% to 60%. A split ratio of 30:1 was used to perfuse the column at a flow rate of $10\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$. HPLC column was rinsed with 90% acetonitrile in 0.1% formic acid between each injection. The MS data were acquired in scan mode considering the positive ion signal.

Identification of the R-SepCRPs

The whole experimental procedure is summarized in Fig. 1.

Identification of SepCRP-2 and -3

Digestions were performed at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 45 s with $100\text{ }\mu\text{g}$ of synthetic SepCRP-1 (EISLDKD). For N-terminal digestion, 4 aminopeptidase units in a sodium citrate buffer (1 M at pH 8.2) were added to the reaction medium, for C-terminal digestion 4 carboxypeptidase units in a PBS buffer at pH 6.7. The reaction was stopped by addition of 2 volumes of 90% methanol/9% H_2O /1% formic acid in ice. Dry samples were analyzed in mass spectrometry and MS/MS spectra obtained from truncated SepCRPs were compared to MS/MS spectra of the FGO extract.

Identification of SepCRP-4

HPLC purification. HPLC analysis was performed with a Varian 4050 integrator connected to a Varian 9012 solvent delivery system and a Varian 9050 wavelength UV–vis detector set at 214 nm. The FGO-conditioned seawater was resuspended in 0.1% formic acid in water and injected into a C18 column ($250 \times 3\text{ mm}$, $7\text{ }\mu\text{m}$) with an acetonitrile linear gradient of 1.33% per minute in 0.1% formic acid at a flow rate of 1 ml/min, during 45 min from 0% to 60% acetonitrile (ACN). One minute HPLC fractions were dried and kept at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Amino acid sequencing. N-terminal sequence analyses were performed using an Applied Biosystems Model 477 A protein sequencer, and amino acid phenylthiohydantoin derivatives were identified and quantified online with a Model 120A HPLC system, as recommended by the manufacturer. The amino acid sequence was checked from MS/MS spectrum with the software Sequest (Thermofinnigan) and MS-Product 1.6.1 (Protein Prospector 3.4.1, University of California).

Identification of SepCRP-5

The FGO extract was resuspended in $100\text{ }\mu\text{l}$ of 0.1% formic acid in water and injected into a MN 250/4 nucleosil 100-7 C18 column with an acetonitrile linear gradient of 0.36%/min in 0.1% formic acid at a flow rate of 1 ml/min, during 25 min. A split ratio of 100:1 was used to perfuse the electrospray source at a flow rate of $10\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$. The amino acid sequence was determined from MS/MS spectrum and definitively established by the comparison between synthetic and endogenic peptide MS/MS spectra.

Identification of SepCRP-6, -7, and -8

Fasta libraries were generated with the software Aaseq 5.0 (Zanuttini and Henry, University of Caen). Screening was performed using Sequest software (Thermofinnigan) which is able to compare experimental MS/MS spectra and theoretical MS/MS spectra generated from fasta libraries. The amino acid sequence was determined from MS/MS spectrum with the Sequest software (Thermofinnigan), MS-Tag and MS-Product 1.6.1 (Protein Prospector 3.4.1, University of California). For each peptide, the amino acid sequence was definitively established by the comparison between synthetic and endogenic peptide MS/MS spectra.

Synthetic peptides

Peptides were synthesized using classical Fmoc (*N*-[9-fluorenyl]methoxycarbonyl) solid-phase chemistry using a commercial automatic peptide synthesizer by coupling Fmoc- α -amino acids on preloaded Wang resin. Protected amino acids were coupled by in situ activation with diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt). *N*²-Fmoc deprotection was performed with 20% piperidine in DMF. Side chain deprotection and cleavage of peptides from the solid support were performed by treatment with reagent B (88% trifluoroacetic acid (TFA)/5% phenol/5% water/2% TIS) for 2 h at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [11]. Peptides were purified by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) using a Waters semi-preparative HPLC system on an X Terra $10\text{ }\mu\text{m}$ column ($300 \times 19\text{ mm}$). The elution was achieved with a linear gradient of aqueous 0.1% TFA (A) and 0.08% TFA in acetonitrile (B) at a flow rate of 10 ml/min with photodiode array detection at 210–440 nm. The purity of each peptide was controlled by analytical RP-HPLC on the same instrument with a X Terra $5\text{ }\mu\text{m}$ column ($250 \times 4.6\text{ mm}$) using a linear gradient of 0.1% TFA in water and aceto-

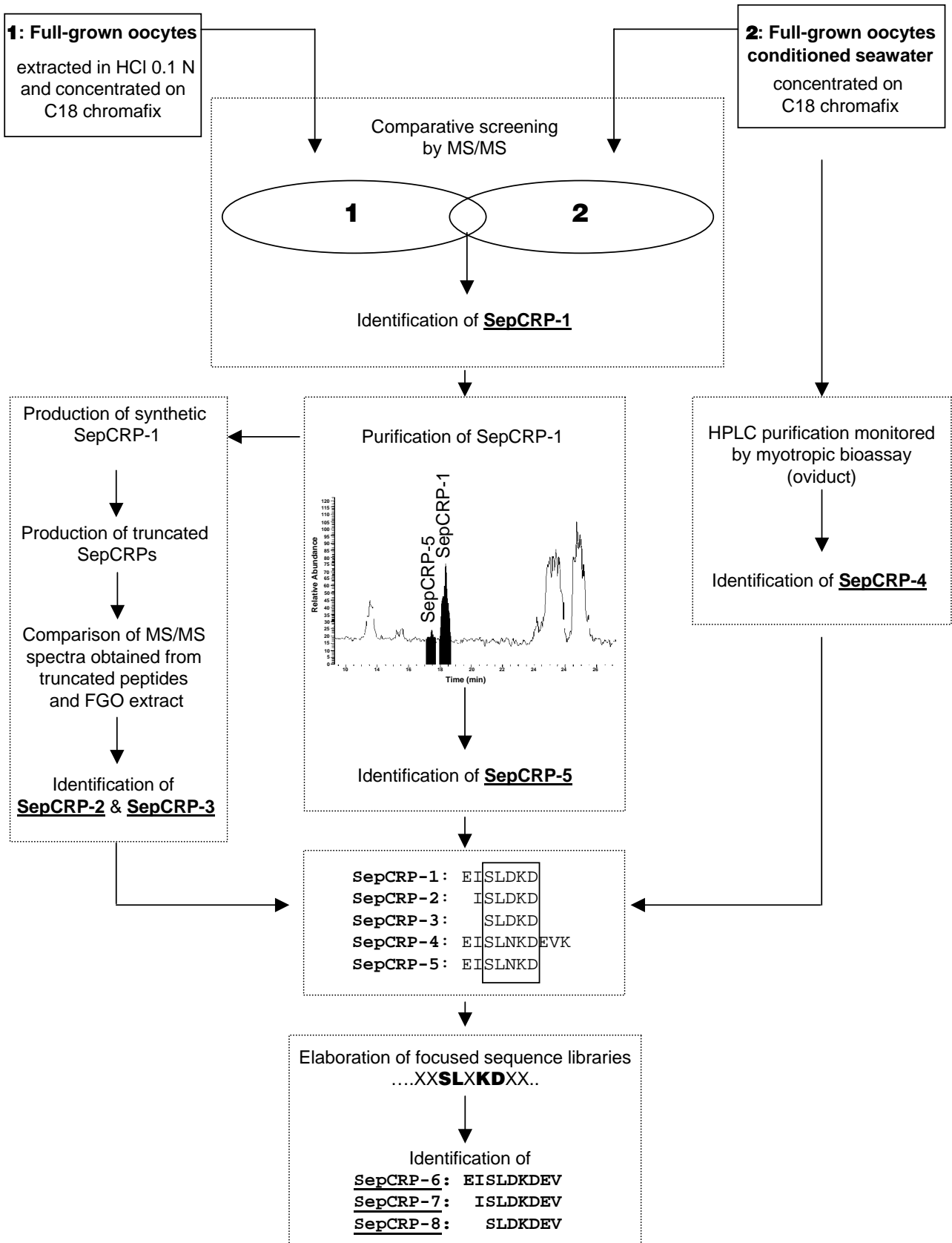


Fig. 1. Experimental procedures performed for the identification and the characterization of R-SepCRPs.

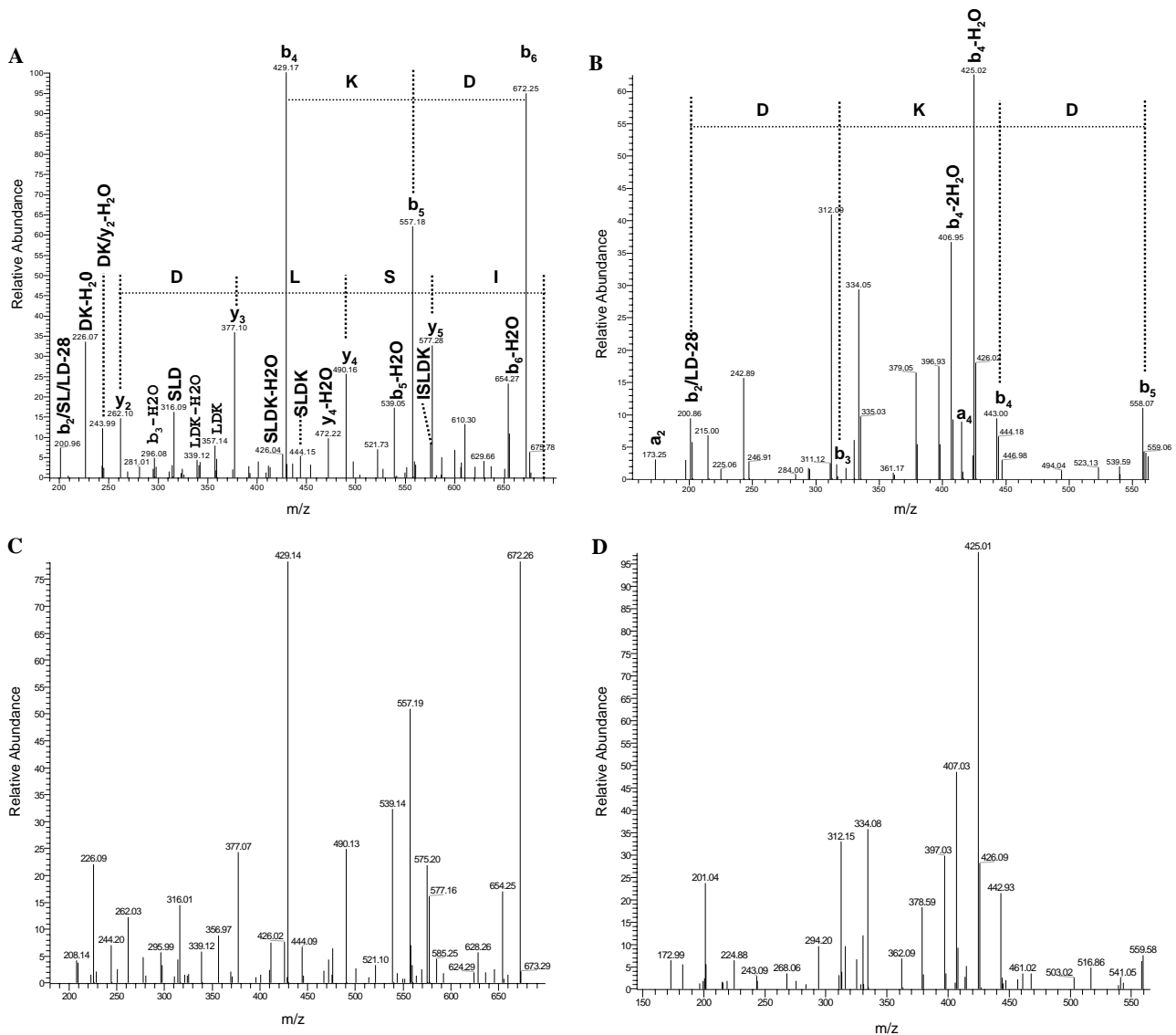


Fig. 2. MS/MS spectra of synthetic SepCRP-2 (A) and SepCRP-3 (B) using the same experimental conditions as for endogenous SepCRP-2 (C), and SepCRP-3 (D).

nitrile containing 0.08% TFA at a flow rate of 1 ml/min. Finally, integrity of each peptide was assessed by LC-ESI-MS/MS analysis.

Biological assay

Several contractile organs were used for the myotropic bioassay. The genital tract (including the proximal oviduct containing FGO, the oviducal gland, and the distal oviduct), the MNG, the esophagus, and the rectum were dissected from mature females. Each organ was suspended from a displacement transducer (Phymep, Bionic Instruments) connected to a computer controlling the recorder and the DATAc (Dispositif d'Acquisition et de Traitement Automatique de la Contraction). The muscle chamber was perfused at a flow rate of 0.5 ml.min⁻¹ with synthetic seawater (Instant Ocean) containing 1 mM glucose and maintained at 15 °C. The HPLC fractions were injected in the perfusing flow using a three-way valve in order to avoid mechanical and thermal stress. The flow of fractions into the muscle chamber was traced by addition of phenol red. Aliquots of synthetic peptide ranging from 10⁻¹⁵ to 10⁻⁶ M were tested on the oviduct and main nidamental glands (MNG) contraction and various somatic muscles to check the specificity of R-SepCRPs.

Results

Identification of SepCRP-2 and -3

Aminopeptidase digestion of synthetic EISLDKD

After the aminopeptidase digestion of the synthetic peptide, 1 µg of the final reaction was injected and analyzed in LC-ESI-MS/MS. The synthetic peptide EISLDKD (SepCRP-1) was completely digested. The m/z 690, 577, and 490 corresponding, respectively, to ISLDKD, SLDKD, and LDKD forms were recovered from the sample.

Carboxypeptidase digestion of synthetic EISLDKD

For carboxypeptidase digestion of the synthetic peptide, the m/z 704, 576, and 461 corresponding, respectively, to EISLDK, EISLD, and EISL forms were recovered from the sample by LC-ESI-MS/MS analysis.

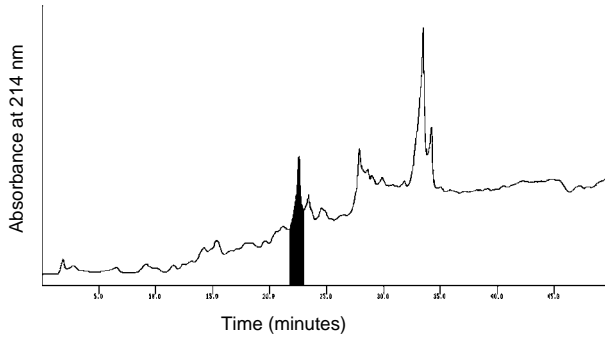


Fig. 3. First step of purification on C18 column of the chromafix C18 eluate of the total FGO conditioned seawater. One myotropic fraction was detected by the myotropic bioassay (shaded part).

FGO sample

The extract of FGO was submitted to LC-ESI-MS/MS analysis. The m/z 690, 577, 490, 704, 576, and 461 corresponding, respectively, to ISLDKD, SLDKD, LDKD, EISLDK, EISLD, and EISL, previously generated by aminopeptidase and carboxypeptidase digestions, were investigated in the sample. For SepCRPs N-terminal truncated forms, the total ion chromatograms (TIC) revealed two peaks at m/z 690 and 577. Comparison of MS/MS data obtained from m/z 690 and 577 from aminopeptidase digestion of synthetic EISLDKD with those of FGO extract revealed the presence of ISLDKD (m/z 690; SepCRP-2) and SLDKD (m/z 577; SepCRP-3) in FGO. The comparison of MS/MS data obtained from synthetic and endogenic

peptides definitively confirmed the amino acid sequence of SepCRP-2 and -3 (Fig. 2). SepCRPs C-terminal truncated forms were not detected in FGO.

Identification of SepCRP-4

HPLC purification

One single step of purification was performed on HPLC from FGO-conditioned seawater. The 1-min HPLC fractions of the sample were tested on the myotropic bioassay (female whole genital tract). After the first separation step, the activity was concentrated in an apparently pure peak at a retention time of 22.5 min (Fig. 3). This peak was manually collected and concentrated to be submitted to Edman degradation.

Sequence determination

Primary sequence of peptide purified in HPLC was determined by Edman degradation: EISLNKDEVK (SepCRP-4) and checked by the comparison of MS/MS data obtained from synthetic and endogenic peptides (Fig. 4).

Identification of SepCRP-5

During the purification of SepCRP-1 [10], a pure peak eluted at 15.5 min containing the m/z 818.5 was detected. MS/MS spectrum of this peptide is closely related to SepCRP-1 (EISLDKD) MS/MS spectrum (Fig. 5). Analysis of m/z 818.5 MS/MS spectrum revealed a loss of 1 Da

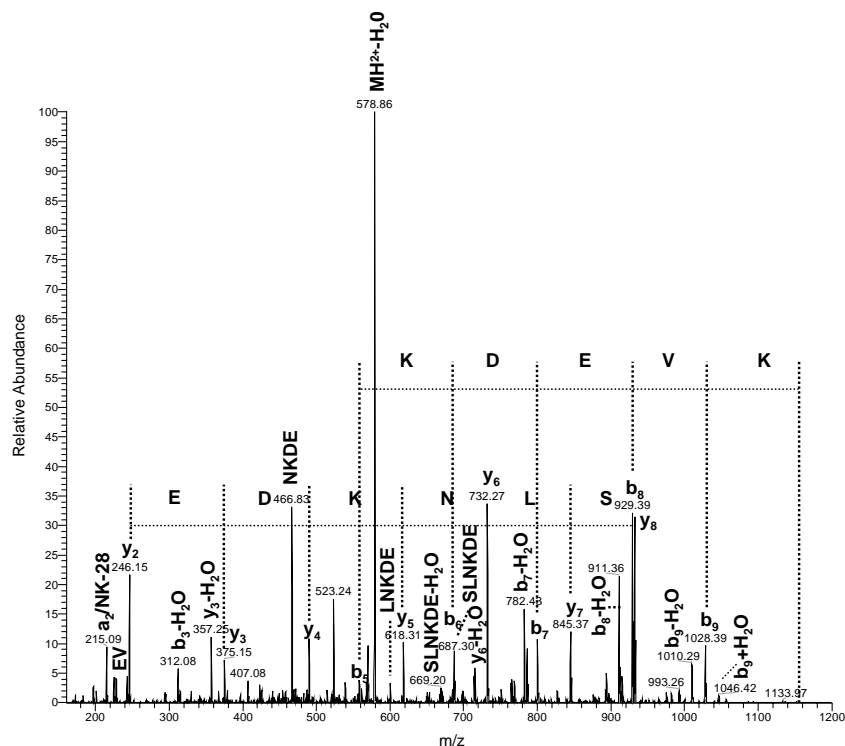


Fig. 4. MS/MS spectrum of endogenic SepCRP-4 (m/z 1174.6).

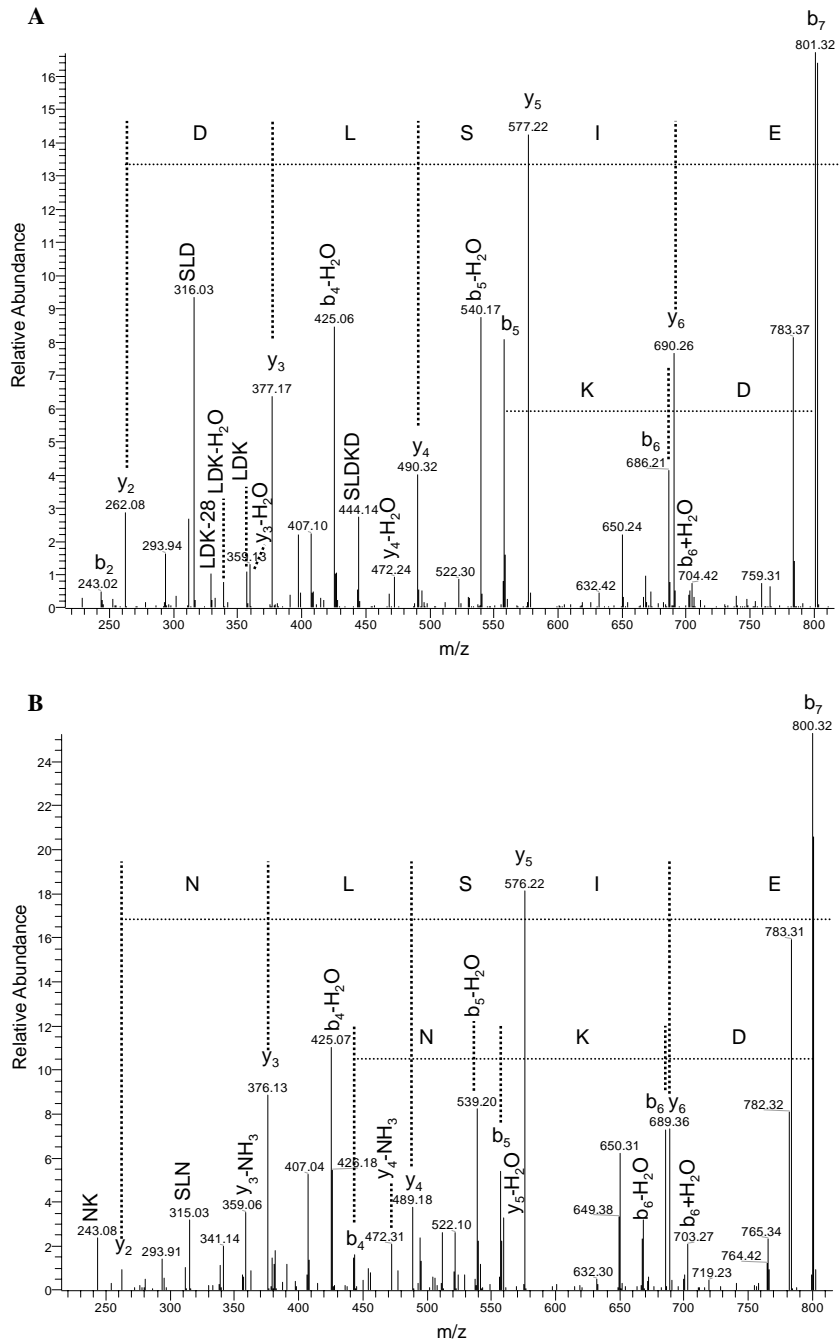


Fig. 5. Comparison of SepCRP-1 (A) and SepCRP-5 (B) MS/MS spectra. MS/MS spectra revealed a loss of 1 Da for y_3 , y_4 , y_5 , and y_6 ions corresponding to the substitution of the internal D (aspartate: 115 Da) by N (asparagine: 114 Da).

for y_3 , y_4 , y_5 , and y_6 ions corresponding to the substitution of an internal D (aspartate: 115 Da) by N (asparagine: 114 Da) leading to the following sequence: EISLNKD. MS/MS data obtained from synthetic EISLNKD confirmed the amino acid sequence and established the occurrence of this new R-SepCRP in FGO.

Identification of SepCRP-6, -7, and -8

Aseq 5.0 software was used to build a sequence library containing the SLXKD tag and ranging from 500 to 1100 Da. Investigations of R-SepCRPs from FGO, moni-

tored by Sequest software and sequence library [SLXKD; 500–1100 Da], led to the identification of 3 new R-SepCRPs: EISLDKDEV (SepCRP-6), ISLDKDEV (SepCRP-7), and SLDKDEV (SepCRP-8) (Fig. 6). Amino acid sequences of these peptides were checked with MS/MS data obtained from synthetic peptides. Table 1 summarizes all R-SepCRPs characterized and identification methods.

Bioactivity of R-SepCRPs

Increasing concentrations of synthetic peptides were tested on the whole genital tract (proximal oviduct contain-

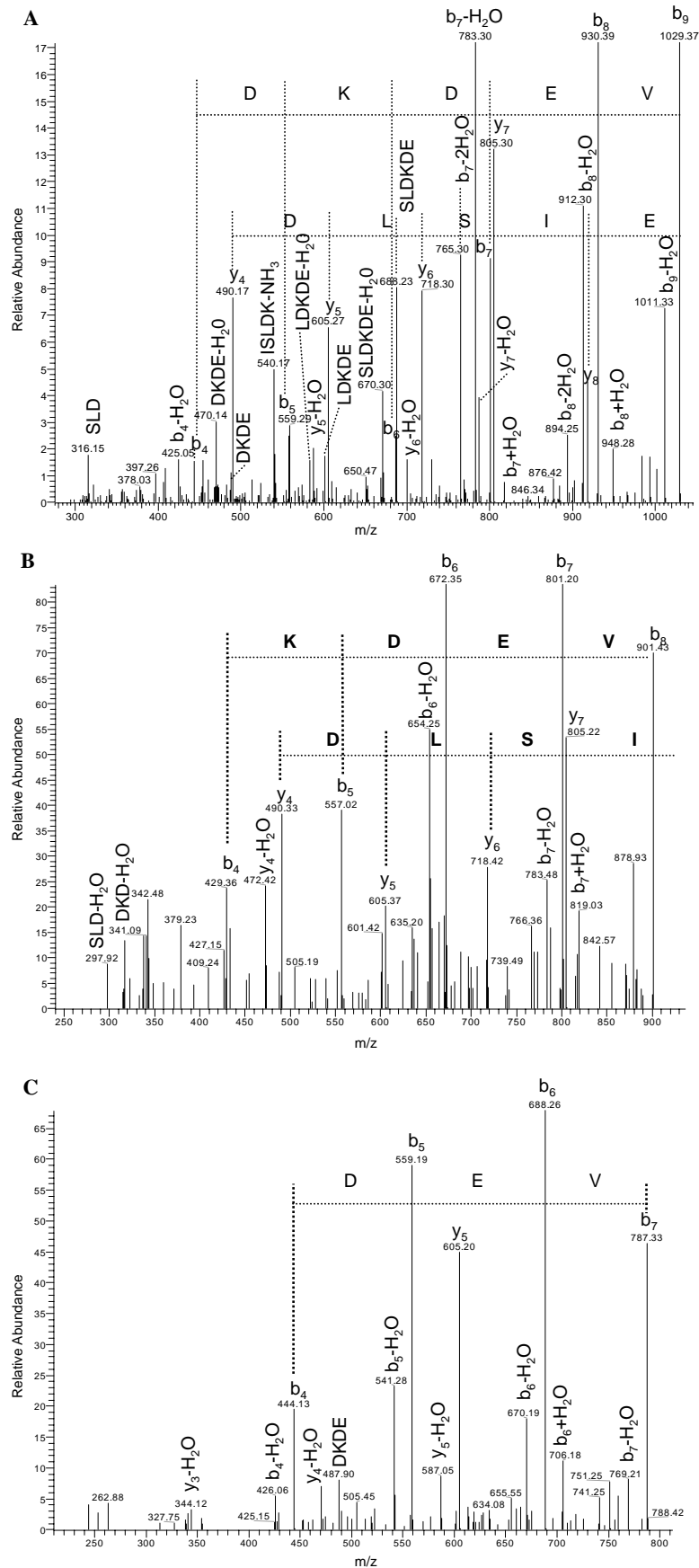


Fig. 6. MS/MS spectra of endogenous SepCRP-6 (A), SepCRP-7 (B), and SepCRP-8 (C).

Table 1
Summary of the eight R-SepCRP primary structures and identification methods

	Sequence	Identification methods
SepCRP-1	EISLDKD	Mass spectrometry comparative screening
SepCRP-2	ISLDKD	Mass spectrometry and aminopeptidase digestion
SepCRP-3	SLDKD	Mass spectrometry and aminopeptidase digestion
SepCRP-4	EISLNKDEVK	HPLC purification monitored by myotropic bioassay (oviduct)
SepCRP-5	EISLNKD	Identification by mass spectrometry
SepCRP-6	EISLDKDEV	Mass spectrometry and specific fasta libraries
SepCRP-7	ISLDKDEV	Mass spectrometry and specific fasta libraries
SepCRP-8	SLDKDEV	Mass spectrometry and specific fasta libraries

Table 2
Bioactivity of R-SepCRPs

Muscles	Threshold concentration				
	SepCRP-1	SepCRP-2	SepCRP-3	SepCRP-4	SepCRP-5
Whole mature genital tract	10 ⁻¹⁸	10 ⁻¹³	10 ⁻¹¹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸
Esophagus	NA	NA	NA	NA	NT
Ovarian stroma	NA	NA	NA	NA	NT
Rectum	NA	NA	NA	NA	NT
Penis	NA	NA	NA	NA	NT
Main nidamental glands	10 ⁻¹³	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹³

The activities of R-SepCRPs appear to be restricted to the female genital tract and the MNG. NA, no activity; NT, not tested.

ing FGO, oviducal gland, and distal oviduct), MNG, ovarian stroma, esophagus, rectum, and penis of mature cuttlefish. As shown in Table 2, the myotropic activities of R-SepCRPs are restricted to the genital tract and the MNG. SepCRP-2, -3, -4, and -5 modulate the whole genital tract contractions from 10⁻¹³, 10⁻¹¹, 10⁻⁹, and 10⁻⁸ M, and the MNG contractions from 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁹, and 10⁻¹³ M (Figs. 7 and 8).

MicroLC-ESI-MS/MS tissue mapping of R-SepCRPs

Tissue mapping was performed in MS/MS mode based on the *m/z* 819 (SepCRP-1), 690 (SepCRP-2), 577 (SepCRP-3), 1174.5 (SepCRP-4), 818 (SepCRP-5), 1047 (SepCRP-6), 918 (SepCRP-7), and 805 (SepCRP-8). The occurrence of peptides was established by the comparison of MS/MS data obtained from the sample and the synthetic peptides. Analysis performed on the different parts of the central nervous system and the hemolymph did not reveal any trace of R-SepCRPs. These peptides appear to be restricted to the vitellogenic follicles, the FGO, and the eggs (Table 3). Moreover, the release of R-SepCRPs by the FGO, and the vitellogenic follicles in various conditions (pH 5, 5.5, 6, and 6.5) was clearly established by the analysis of the conditioned seawater. R-SepCRPs were not recovered in egg-conditioned seawater by MS/MS analysis. This result suggested that the release by eggs seems to be stopped by the internal and external capsules coating the egg. Nevertheless, some traces of R-SepCRPs were detected in the internal capsule, probably trapped during the polymerization of the egg-capsule.

Discussion

The investigation of R-SepCRPs performed in the cuttlefish *S. officinalis* using mass spectrometry screening has led to the identification and the characterization of seven new ovarian regulatory peptides. The addition of a recurrent SLXKD tag (with X = D or N), similar activities, and a tissue mapping restricted to female genital tract clearly demonstrate that these peptides belong to the same family. The multiple organs screened with synthetic peptides revealed that mature female genital tract and MNG are the main targets. The R-SepCRPs, released by vitellogenic follicles and FGO in the lumen of the oviduct, appeared to directly modulate the contractions of oviduct and MNG. In association with SepCRP-1 [10], R-SepCRPs force the storage of the FGO in the genital coelom before mating and induce the mechanical secretion of egg capsule products. Moreover, R-SepCRPs biological activity is restricted to the egg-laying period. The thresholds determined with synthetic R-SepCRPs reveal that SepCRP-1 is more potent than truncated SepCRP-2 and -3 or elongated SepCRP-4. N-terminal elongation of the SLXKD tag appeared to enhance the activity of the peptide, as observed for SepCRP-2 (ISLDKD) and SepCRP-1 (EISLDKD). The substitution of D (aspartic acid) by N (asparagine) reduced the activity of the peptide, as observed for SepCRP-5 and -6. However, R-SepCRPs showed important variations in response thresholds, correlated with the egg-laying stage of the animal. The detection of SepCRP-2, -3, -7, and -8, which are truncated forms, in FGO-conditioned seawater, which is only concentrated (no acidic extraction), demon-

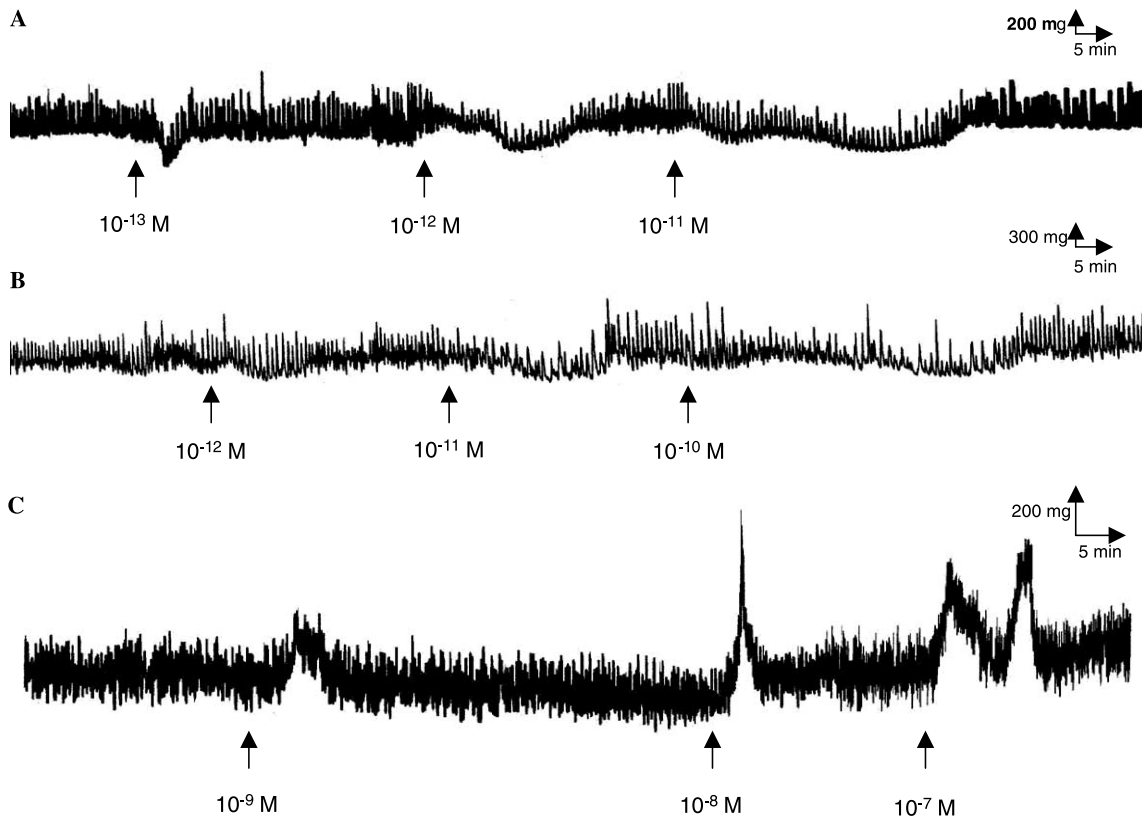


Fig. 7. R-SepCRPs-induced contraction of the cuttlefish whole genital tract for a threshold of 10^{-13} M for SepCRP-2 (A), 10^{-11} M for SepCRP-3 (B), and 10^{-9} M for SepCRP-4 (C).

strates that these forms were not a result of acidic extraction cleavage. Moreover, the investigation of the EISLDKDE, ISLDKDE, and SLDKDE forms which were not recovered in FGO put forward for consideration that SepCRP-2, -3, -7, and -8 are monitored by FGO enzymatic baggage. Despite we do not have any information about R-SepCRPs precursor, we suppose that these peptides results in post-translational modifications, suggesting the occurrence of an original enzymatic baggage in the vitellogenic follicles and the FGO. The recurrent SLXKD tag (X corresponding to D or N) and the biological activity observed for SepCRP-3 suggest that the SLXKD tag is responsible for the activity. If for amidated peptides, the C-terminal extremity is often involved in the activity, for non-amidated families, activity often involves internal tags, such as RLRf/A for BCP (bag-cell peptides) and CDCP (caudo-dorsal-cell peptides) [12,13] or IEECKTS for attractin [14]. Mass spectrometry analyses clearly demonstrate that R-SepCRPs are expressed during vitellogenesis in vitellogenic follicles and released in genital coelom by vitellogenic follicles and FGO. As the genital coelom pH of cephalopods ranges between 5.2 and 6.4 [15], the detection of R-SepCRPs in FGO-conditioned seawater at pH 5, 5.5, 6, and 6.5 confirms the release of R-SepCRPs in genital coelom under physiological conditions. R-SepCRPs are neither detected in egg-conditioned seawater nor in the

external capsule. Thus, internal and external polymerized capsules appear to stop the release of R-SepCRPs into the external medium. This observation demonstrates that R-SepCRPs are only released into the female genital tract close to their targets. Numerous ovarian waterborne peptides have been characterized in marine invertebrates: attractin, emptin, enticin, and seductin in *Aplysia californica* [16–19] and sperm attractive or activating peptides (SAPs) in cnidaria and echinodermata [20–23]. With the identification and characterization of a new regulatory peptidic family, the ovary of the cuttlefish *S. officinalis* appears to be one of the main sources of waterborne regulatory peptides involved in the successive steps of egg-laying. In unmating females, we speculate that a constant concentration of ovarian factors, such as R-SepCRPs and ovarian 5-HT [3,10], is maintained in genital coelom in order to inhibit female genital tract contractions. After mating, peptides involved in oocyte transport such as ovarian peptides, ILME or Sepovotropine [4,5] or neuropeptides, FaRPs or APGWa-RPs [1,6] take over the peptides involved in the storage of FGO. Embedded oocytes released by oviduct in the mantle cavity receive a second envelope secreted by the MNG under control of R-SepCRPs and FaRPs [6]. Finally, the fertilization is facilitated by ovarian SepSAP (*Sepia* Sperm Attracting Peptide) [8]. The occurrence of so many regulatory factors: ovarian peptides, neuropep-

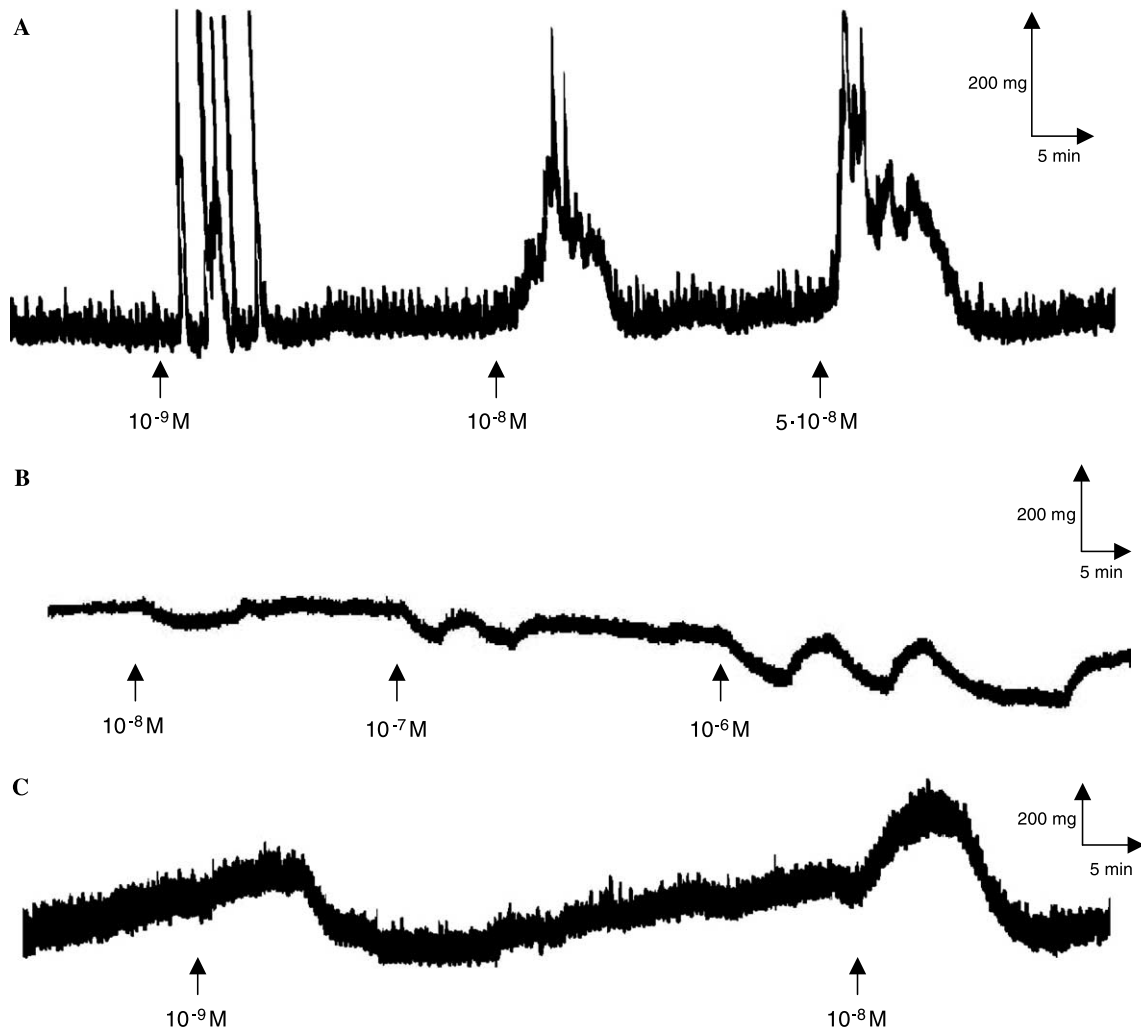


Fig. 8. R-SepCRPs-induced contraction of the cuttlefish main nidamental gland for a threshold of 10^{-9} M for SepCRP-2 (A), 10^{-8} M for SepCRP-3 (B), and 10^{-9} M for SepCRP-4 (C).

Table 3
Tissue mapping of R-SepCRPs performed in microLC-ESI-MS/MS

Occurrence of:	SepCRP-1	SepCRP-2	SepCRP-3	SepCRP-4	SepCRP-5	SepCRP-6	SepCRP-7	SepCRP-8
Previtellogenic follicles	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vitellogenic follicles	d	d	d	d	d	d	d	d
Full-grown oocytes	d	d	d	d	d	d	d	d
Eggs	d	d	d	d	d	d	d	d
Internal capsule	d	nd	d	nd	nd	d	nd	d
External capsule	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vitellogenic follicles-conditioned seawater	d	d	d	d	d	d	d	d
Full-grown oocytes-conditioned seawater	d	d	d	d	d	d	d	d
Egg-conditioned seawater	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Central nervous system	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hemolymph	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

R-SepCRPs are restricted to the vitellogenic follicles, the FGO, and the eggs. nd, not detected; d, detected.

tides, monoamines, and probably neurohormones, demonstrates that egg-laying regulation is a highly complex physiological mechanism. Thus, the association of numerous regulation pathways allows female cuttlefish to achieve an optimal adaptation in response to internal and/or exter-

nal variations, related to the maturity stage. Indeed, egg-laying involves the ovary, accessory sex glands, and the oviduct which have to be synchronized to succeed in the elaboration and release of embedded oocytes which could be fertilized. Finally, the wide range of peptide combinations

associated with the different steps of egg-laying probably allows for the very fine regulation of this critical phase of the life cycle.

Acknowledgments

We thank Jean-Marc Nicolas and Darlene Mossman for correcting the English of the manuscript, Didier Rousseville the captain of the professional fishing boat “Père Arthur” and his crew for help in providing cuttlefish as well as Laurence Lafaiteur. This work was supported by the Conseil Regional de Basse Normandie and IFREMER.

References

- [1] J. Henry, P. Favrel, E. Boucaud-Camou, Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the motility of the mature oviduct in the cuttlefish, *Sepia officinalis*, *Peptides* 18 (1997) 1469–1474.
- [2] A. Dhainaut, A. Richard, Vitellogenèse chez les céphalopodes décapodes. Evolution de l’ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale, *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 65 (1976) 183–208.
- [3] C. Zatylny, F. Durantou, E. Boucaud-Camou, J. Henry, Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying, *Mol. Reprod. Dev.* 55 (2000) 182–188.
- [4] C. Zatylny, J. Gagnon, E. Boucaud-Camou, J. Henry, ILME: a waterborne pheromonal peptide released by the eggs of *Sepia officinalis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (2000) 217–222.
- [5] C. Zatylny, J. Gagnon, E. Boucaud-Camou, J. Henry, The SepOvotropin: a new ovarian peptide regulating oocyte transport in *Sepia officinalis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 1013–1018.
- [6] J. Henry, C. Zatylny, E. Boucaud-Camou, Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides, *Peptides* 20 (1999) 1061–1070.
- [7] L. Jecklin, Beitrag zur kenntnis der Laichgellerten und der biologie der embryonen decapoder cephalopoden, *Rev. Suisse Zool.* 41 (1934) 593–673.
- [8] C. Zatylny, L. Marvin, J. Gagnon, J. Henry, Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (2002) 1186–1193.
- [9] S. Boletzky, Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda, *Adv. Mar. Biol.* 25 (1989) 85–115.
- [10] B. Bernay, J. Gagnon, J. Henry, Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 215–222.
- [11] N. Sole, G. Barany, Optimization of solid-phase synthesis of [Ala8]-dynorphin A, *J. Org. Chem.* 57 (1992) 5399–5403.
- [12] R. Scheller, J. Jackson, L. McAllister, B. Rothman, E. Mayeri, R. Axel, A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior, *Cell* 32 (1983) 7–22.
- [13] W.P. Geraerts, A. Ter Maat, E. Vreugdenhil, The peptidergic neuroendocrine control of egg-laying behavior in *Aplysia* and *Lymnaea*, in: H. Laufer, G.H. Downer (Eds.), *Invertebrate Endocrinology*, Alan R Liss, New York, 1988, pp. 141–231.
- [14] S. Cummins, A. Nichols, K. Rajarathnam, G. Nagle, A conserved heptapeptide sequence in the waterborne attractin pheromone stimulates mate attraction in *Aplysia*, *Peptides* 25 (2004) 185–189.
- [15] R. Peterson, The anatomy and histology of the reproductive systems of *Octopus bimaculoides*, *J. Morphol.* 104 (1959) 61–87.
- [16] S. Painter, B. Clough, R. Garden, J. Sweedler, G. Nagle, Characterization of *Aplysia* attractin, the first water-borne peptide pheromone in invertebrates, *Biol. Bull.* 194 (1998) 120–131.
- [17] S. Painter, B. Clough, D. Akalal, G. Nagle, Attractin, a water-borne peptide pheromone in *Aplysia*, *Invertebr. Repro. Dev.* 36 (1999) 191–194.
- [18] S. Cummins, A. Nichols, A. Amare, A. Hummon, J. Sweedler, G. Nagle, Characterization of *Aplysia* enticin and temptin, two novel water-borne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25614–25622.
- [19] S.F. Cummins, A.E. Nichols, C.J. Warso, G.T. Nagle, *Aplysia* seductin is a water-borne protein pheromone that acts in concert with attractin to stimulate mate attraction, *Peptides* 26 (2005) 351–359.
- [20] N. Suzuki, K. Nomura, H. Ohtake, S. Isaka, Purification and the primary structure of sperm-activity peptides from the jelly coat of sea urchin eggs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 (1981) 1238–1244.
- [21] J. Hansbrough, D. Garbers, Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1447–1452.
- [22] N. Suzuki, Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs, *Zool. Sci.* 12 (1995) 13–27.
- [23] T. Nishigaki, K. Chiba, W. Miki, M. Hoshi, Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs, *Zygote* 4 (1996) 237–245.

V. Caractérisation d'une seconde famille de facteurs ovariens : les OJPs

Publication n°3 :

Bernay B, Baudy-Floc'h M, Gagnon J, Henry J. Ovarian jelly-peptides (OJPs), a new kind of regulatory peptides identified in the cephalopod *Sepia officinalis*. Acceptée dans Peptides.

Ovarian jelly-peptides (OJPs), a new kind of regulatory peptides identified in the cephalopod *Sepia officinalis*.

Benoît Bernay¹, Michèle Baudy-Floc'h², Jean Gagnon³ and Joël Henry^{1*}

¹Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100 IFREMER Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen, 14032 Caen cedex France.

²Laboratoire SESO, UMR CNRS 6510, Institut de Chimie, Université de Rennes I, 263 Av. du Général Leclerc, F-35042 Rennes Cedex France.

³Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale, Jean-Pierre Ebel, CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz 38027 Grenoble France.

* To whom correspondence should be addressed. E-Mail: joel.henry@unicaen.fr

tel. (+33)2 31 56 55 96

fax (+33)2 31 56 43 56

Key words : Egg-laying, egg capsule secretion, myotropin, invertebrates, mass spectrometry, peptidomic.

ABSTRACT

In marine invertebrates, numerous water borne peptides involved in the reproductive behavior have been characterized. In this study, we focused on three ovarian water-borne peptides, released by full-grown oocytes (FGO) in the genital coelom and in the lumen of the oviduct. The first one (DQVKIVL), was characterized by the monitoring of HPLC purification using a myotropic bioassay. Subsequently, a peptidomic approach consisting of a mass spectrometry comparative screening performed between the peptide content of FGO with that of FGO-conditioned medium, led to the identification of two additional water-borne peptides. The second peptide identified (DEVKIVL) was characterized by MS/MS and the primary structure of the third one (DEVKIVLD) was elucidated by the association of Edman degradation, acid hydrolysis and MS/MS analysis. Sequence homology, tissue-mapping and activity demonstrate that these peptides belong to the same family. DQVKIVL-related-peptides strictly localized in the female genital tract, modulate the whole female genital tract and the main nidamental glands contractions. Furthermore, these peptides form a jelly, when resuspended in water. This particular property could play an important role in the kinetics of peptide diffusion in the external medium. Thus, these regulatory peptides were named Ovarian Jelly-Peptides (OJPs).

INTRODUCTION

Since the introduction of the term “pheromone” by Karlson and Luscher (Karlson and Luscher, 1959), numerous waterborne peptides which play an important role in the coordination of the reproductive behavior have been discovered in aquatic organisms. In protozoans, peptide pheromones are responsible for mating interactions (Luporini et al., 1996). In amphibians, sodefrin and silefrin, two sex-pheromone peptides characterized in *Cynops pyrrhogaster* and *C. ensicauda*, respectively (Kikuyama et al., 2002; Toyoda et al., 2004) attracted conspecific females. In the polychaete worm *Nereis*, the peptide nereithione which modulates male nuptial behavior and induces sperm release, was isolated from the coelomic fluid of sexually mature females (Ram et al., 1999; Zeeck et al., 1998b). In cnidaria and echinodermata, more than 80 sperm attracting and activating peptides (SAPs), are released by the eggs in seawater to facilitate fertilization by increasing chances of gamete collision (Hansbrough and Garbers, 1981; Nishigaki et al., 1996; Suzuki, 1995; Suzuki et al., 1981). In molluscs, water-borne peptides have also been identified from gastropods and cephalopods. In *Aplysia*, at least four water-borne peptides, attractin, emptin, enticin and seductin, are released by the egg cordons to induce gathering of mature adults and egg-laying (Cummins et al., 2004; Cummins et al., 2005a; Painter et al., 1999; Painter et al., 1998). In the cuttlefish *Sepia officinalis*, numerous water-borne peptides and one neuromediator able to modulate the successive steps of egg-laying, are released by oocytes in the genital coelom as well as in the lumen of the oviduct (Zatylny et al., 2000a; Zatylny et al., 2000b; Zatylny et al., 2000c). The peptidomic or peptide display technique which consists of the comparison between the peptide content of different samples, is a powerful means of identification of putative regulatory peptides. In the cuttlefish *Sepia officinalis*, this experimental strategy led to the characterization of the SepCRP (*Sepia* Capsule Releasing Peptide), a water-borne peptide released by the full-grown oocytes (FGO) in the genital coelom, and involved in the successive steps of egg-laying (Bernay et al., 2004). After the release of FGO in the genital coelom (ovulation) (Dhainaut and Richard, 1976), the ovarian 5-HT and the SepCRP released by the FGO inhibits the contractions of the oviduct until mating (Bernay et al., 2004; Zatylny et al., 2000a). After mating, the oocyte are transported by the oviduct contractions controlled by neuropeptides (Henry et al., 1997; Henry et al., 1999) and ovarian peptides (Zatylny et al., 2000b; Zatylny et al., 2000c; Zatylny et al., 2002). Then, FGO receive a first gelatinous envelope secreted by the oviduct gland and a second one secreted by the nidamental glands (Bernay et al., 2004; Henry et al., 1999; Jecklin, 1934). Finally, oocytes are fertilized by

spermatozoa stored in the copulatory pouch (Boletzky, 1987; Zatylny et al., 2002). In this context, we focused on water-borne peptides expressed in the ovary and targetting oviduct and accessory sex glands. By means of mass spectrometry screening and HPLC purification, we identified three novel ovarian peptides putatively involved in the regulation of egg-laying. Primary sequence, tissue-mapping, activity and chemical properties demonstrate that these peptides belong to a new single family.

MATERIALS AND METHODS

Animals. All the cuttlefish were trapped in the Bay of Seine between January and June. They were maintained in 1000-liter outflow tanks at 15°C +/- 1°C at the Marine Station of Luc sur Mer (University of Caen, France) under a natural photoperiod.

Recovery of material from tissues and seawater. For HPLC purification and microLC-ESI-MS/MS analysis, 600 g of FGO were homogenized in 6 liters of 0.1 N HCl at 100°C and centrifuged 30 minutes at 35 000g at 4°C. The supernatants were concentrated on Chromafix C18 cartridges. For the microLC-ESI-MS/MS analysis, previtellogenic follicles, vitellogenic follicles and eggs were extracted as described above. Moreover, the molecules released from 50 FGO or 50 vitellogenic oocytes in 20 mL of synthetic filtered seawater were concentrated after various incubation times on Chromafix C18 cartridges to be analysed in microLC-ESI-MS/MS.

MicroLC-ESI-MS/MS analysis. Analyses were performed with a HPLC Surveyor chain connected on-line to an orthogonal electrospray source (Deca XP MS-n Thermofinnigan) operated in the positive electrospray ionization mode (ESI+). The ions were focused into an ion trap, capable of MS and MS/MS analyses. The mass spectra were acquired during 35 ms from m/z 300 to 2000. The capillary exit of the electrospray ion source was set at 70 V, the octapole at 3 V and the capillary temperature at 200°C. A counter flow of nitrogen was used as nebulizing gas. Xcalibur data system was used to acquire the data, which were further processed with the Turbo Sequest data system. The organic fraction of each extract was resuspended in 10 µL of 0.1% formic acid in water and injected onto a C18 Thermo Hypersil column (50 x 0.5 mm, 3 µm) with an acetonitrile linear gradient of 3% per minute in 0.1% formic acid, from 2 to 60%. A split ratio of 30: 1 was used to perfuse the column at a flow rate of 10 µL/min. The HPLC column was rinsed with 90% acetonitrile in 0.1% formic acid between each injection. The MS data was acquired in scan mode considering the positive ion signal.

LC-ESI-MS purification. The FGO extract was resuspended in 100 µL of 0.1% formic acid in water and injected into Nucleosil C18 column (250 x 4 mm, 7 µm) with an acetonitrile linear gradient of 0.36% per minute in 0.1% formic acid at a flow rate of 1 mL/min, during 25 minutes. A split ratio of 100: 1 was used to perfuse the electrospray source at a flow rate of 10 µL/min and one minute fractions were collected. The second step was performed in UV-

HPLC. The bioactive fraction eluted at 22.20 minutes was injected onto a Nucleosil C18 column (250 x 4 mm, 5 μ m) with an acetonitrile linear gradient of 1.33% per minute in 10 mM ammonium acetate at a flow rate of 1 mL/min.

UV-HPLC purification. HPLC analysis was performed with a Varian 4050 integrator connected to a Varian 9012 solvent delivery system and a Varian 9050 wavelength UV-VIS detector set at 214 nm. FGO-conditioned seawater was resuspended in 0.1% formic acid in water and injected into a Nucleosil C18 column (250 x 3 mm, 7 μ m) with an acetonitrile linear gradient of 1.33% per minute in 0.1% formic acid at a flow rate of 1 mL/min, during 45 minutes from 0 to 60% ACN. One minute HPLC fractions were dried and kept at 4°C until use.

Edman degradation. N-terminal sequence analyses were performed using an Applied Biosystems Model 477 A protein sequencer, and amino acid phenylthiohydantoin derivatives were identified and quantified on-line with a Model 120A HPLC system, as recommended by the manufacturer. The amino acid sequence was checked from MS/MS spectrum with the softwares Sequest (ThermoFinnigan) and MS-Product (Protein Prospector 3.4.1, University of California).

Synthetic peptides. Peptides were synthesized using classical Fmoc (N-[9-fluorenyl]methoxycarbonyl) solid-phase chemistry using a commercial automatic peptide synthesizer by coupling Fmoc- α -amino acids on preloaded Wang resin. Protected amino acids were coupled by *in situ* activation with diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt). N^{α} -Fmoc deprotection was performed with 20% piperidine in DMF. Side chain deprotection and cleavage of peptides from the solid support was performed by treatment with reagent B (88% trifluoroacetic acid (TFA) / 5% Phenol/ 5% water/ 2 % TIS) for 2h at 20°C (Sole and Barany, 1992). Peptides were purified by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) using a Waters semi-preparative HPLC system on an X Terra 10 μ m column (300 x 19 mm). The elution was achieved with a linear gradient of aqueous 0.1% TFA (A) and 0.08% TFA in acetonitrile (B) at a flow rate of 10 mL/min with photodiode array detection at 210-440 nm. The purity of each peptide was controlled by analytical RP-HPLC on the same instrument with a X Terra 5 μ m column (250 x 4.6 mm) using a linear gradient of 0.1% TFA in water and acetonitrile containing 0.08% TFA at a flow rate of 1 mL/min. Finally, integrity of each peptide was assessed by LC-ESI-MS/MS analysis.

Biological assay. The myotropic bioassay was performed with the female genital tract (including the proximal oviduct containing FGO, the oviducal gland and the distal oviduct), the MNG, the esophagus, the rectum and the penis which were dissected from mature females and males. Each organ was suspended from a displacement transducer (Phymep, Bionic Instruments) connected to a computer controlling the recorder and the DATAC (Dispositif d'Acquisition et de Traitement Automatique de la Contraction). The muscle chamber was perfused at a flow rate of 0.5 mL/min with synthetic sea-water (Instant Ocean) containing 1 mM glucose and maintained at 15°C. The HPLC fractions were injected in the perfusing flow using a three-way valve in order to avoid mechanical and thermal stress. The flow of fractions into the muscle chamber was traced by addition of phenol red. Aliquots of synthetic peptide ranging from 10^{-15} to 10^{-6} M were tested on the oviduct and main nidamental glands (MNG) contractions and various somatic muscles to check the specificity of the peptides.

RESULTS

Identification of DQVKIVL.

HPLC purification. One single step of purification was performed in UV-HPLC from FGO-conditioned seawater. The activity was concentrated in an apparently pure peak at a retention time of 22.5 minutes (Fig. 1). This peak, manually collected, was concentrated to be submitted to Edman degradation.

Sequence determination. The primary sequence of this peptide, DQVKIVL, was determined by Edman degradation and checked by MS/MS analysis of synthetic peptide (Fig. 2).

Identification of DEVKIVL and DEVKIVLD.

Mass spectrometry comparative screening. The samples of FGO and FGO conditioned seawater were submitted to LC-MS analysis. The total ion chromatograms (TIC) revealed several common peaks. We focused on the peaks eluted between 27 to 28.5% and between 25 to 26.3% of acetonitrile corresponding respectively to the m/z 815.5 and 1397.5. The similarity of retention time, MS and MS/MS spectra in the two samples demonstrated that peptides of m/z 815 and 1397 occurred in the two samples (Figs. 3 and 4).

Identification of DEVKIVL.

Sequence Determination. The primary sequence of the single charged ion at m/z 815.5 was determined from MS/MS spectrum: DEVKIVL (Fig. 5). The confrontation of MS/MS data obtained from synthetic and endogenic peptides confirmed the amino acid sequence and the absence of C-terminal amidation.

Identification of DEVKIVLD.

HPLC purification. First step of purification was performed in microLC-ESI-MS/MS and one minute LC-MS fractions were tested on the oviduct bioassay. The activity was concentrated in the apparently pure peak at 22.20 minutes retention time (Fig. 6) containing the m/z 1397.5 detected by the comparative screening described above. After a second purification step in UV-HPLC, the m/z 1397.5 was concentrated in a pure peak eluted at 21.63 minutes (Figs. 7 and 8). As the MS/MS spectrum did not allow to elucidate the primary sequence, the 21.63 min peak was concentrated to be submitted to Edman degradation.

Sequence Determination. Primary sequence of this peptide was partially elucidated by Edman degradation: X-EVKIVL and acid hydrolysis: Glu (1), Val (2), Lys (1), Ile (1) Leu (1) and Asp (2). According to the amino-acid composition, the m/z of the peptide should be 930.5.

LC-ESI-MS analysis. The zoomscan performed in LC-MS revealed that the m/z 1397 was a dicharged ion (Fig. 9). We deduced that the m/z 1397 corresponded to dicharged $3M2H^+$ of a peptide with a molecular weight of 929.5 (MH^+ 930.5). According to the Edman degradation, acid hydrolysis and MS data, we proposed the following putative sequences: DDEVKIVL or DEVKIVLD. Finally, MS/MS analysis of synthetic peptides led to the single sequence: DEVKIVLD. The interpretation was confirmed by the formation of $3M2H^+$ (m/z 1397.5) during analysis of synthetic DEVKIVLD (m/z 930.5) (Fig. 10). Moreover, a m/z 930.5 was detected in FGO. MS/MS spectrum appeared to be consistent with Edman degradation and acid hydrolysis data (Fig. 11). As retention times of MH^+ and $3M2H^+$ were not similar, we concluded that ionization was performed in the mobile phase before ESI-MS analysis.

Bioactivity of synthetic peptides. Increasing concentrations of synthetic peptides were tested on the whole genital tract (proximal oviduct containing FGO, oviducal gland and distal oviduct) and MNG of mature females. As shown in Table 1, the activities of OJPs are restricted to the genital tract and the MNG. DEVKIVL and DQVKIVL modulate the whole genital tract from 10^{-13} and 10^{-11} M and the MNG from 10^{-13} and 10^{-12} M (Figs. 12 and 13).

MicroLC-ESI-MS/MS tissue mapping. The mapping was performed in MS/MS mode based on the m/z corresponding to the peptides previously characterized (814, 815 and 930 respectively). As shown in the Table 2, these peptides are strictly localized in the genital apparatus: the vitellogenic follicles, the FGO, the eggs and the internal egg-capsule (secreted by the oviduct gland). Although these peptides are released by FGO and vitellogenic follicles, they are not detected in egg-conditioned seawater. The release by eggs could be stopped by the internal and/or external capsules. Some traces of OJPs were detected in the internal capsule, probably trapped during the polymerization of the egg-capsule. The analyses performed on the different parts of the central nervous system and the hemolymph did not reveal any trace of these peptides.

DISCUSSION

Few ovarian peptide families have been characterized in invertebrates. In cnidaria and echinodermata, the SAPs (Sperm Activating or Attracting Peptides) which are short peptides, large glutamine-riche peptide, circular or linear, have been classified by Suzuki into 5 groups: SAP-I (Garbers et al., 1982; Hansbrough and Garbers, 1981; Nomura et al., 1983; Suzuki et al., 1988a; Suzuki et al., 1981; Yoshino et al., 1991); SAP-II (Suzuki et al., 1984; Suzuki et al., 1988b); SAP-III (Suzuki et al., 1987; Suzuki and Yamaguchi, 1986; Takao et al., 1990; Yoshino et al., 1990); SAP-IV (Yoshino et al., 1991) and SAP-V (Yoshino et al., 1992) in relation to their amino acid sequence and structure (for review see (Suzuki, 1995)). In insects, TMOF (Trypsin Modulating Oostatic Factors) control egg development (Borovsky et al., 1990; Bylemans et al., 1994) and inhibits ecdysone biosynthesis (Hua et al., 1994). In mollusks, attractin is released by egg cordons and induces the gathering of adults (Cummins et al., 2005b; Painter et al., 1999; Painter et al., 1998). In invertebrates, ovarian regulatory peptides are involved in the main egg-laying steps: oocytes transport, egg capsule secretion, fertilization and gathering of mature individuals for reproduction. In this context, we focused on the identification of regulatory peptides expressed in the ovary and targeting the oviduct and accessory sex glands of the cephalopod *S. officinalis*. After the identification of ILME, SepOvotropine and SepCRP (Bernay et al., 2004; Zatylny et al., 2000b; Zatylny et al., 2000c), we investigated the occurrence of new regulatory water-borne peptides using mass spectrometry. UV-HPLC purification and mass spectrometry screening led to the identification of three related peptides: DQVKIVL, DEVKIVL and DEVKIVLD. Sequence homologies, biological activities and tissue mapping, clearly demonstrate that these peptides belong to a single peptide family. Although DEVKIVL appeared as a truncated form of the DEVKIVLD, its detection in FGO-conditioned seawater, which is only concentrated on C18 chromafix without any acidic extraction, leads to the conclusion that this peptide does not result from acidic cleavage. DEVKIVL could be expressed by vitellogenic follicles (and maybe FGO) or could be the result of post-translational processing of DEVKIVLD. Biological activities established from synthetic peptides showed that OJPs modulate the whole genital tract and the main nidamental gland contractions of mature females. OJPs probably force the storage of the FGO in the genital coelom before mating and are involved in the mechanical secretion of egg capsule products. The activity thresholds showed that OJPs modulate the contraction of WGT and MNG at concentrations as low as 10^{-12} M and 10^{-11} M. The substitution of glutamic acid (E) by glutamine (Q) seems to reduce the activity of the peptide.

Moreover, OJPs biological activity is restricted to the egg-laying period. Biological activity and tissue mapping very similar to those of SepCRP (Bernay et al., 2004), suggest that OJPs and SepCRP act in consort for the regulation of oocyte release and egg-capsule secretion. Observations performed in captivity showed that mating induces egg-laying behavior less than one hour after sperm is deposited in the copulatory pouch. Deep modifications of the regulatory peptide cocktail targeting the oviduct and accessory sex glands are probably responsible for the stereotyped behavior leading to the formation of eggs (oocytes and capsules) and egg mass. This is illustrated by the fact that regulatory peptides released after mating, such as ILME [16], SepOvotropine [17], FMRFamide-related peptides (FaRPs) [21] and APGWamide-related peptides [20] would take over from peptides allowing the storage of FGO in the virgin females. The property to gel in water observed for synthetic peptides led to technical difficulties during purification steps and was exacerbated for DEVKIVLD. The peptide jelly, which can be compared to a reversible polymerization, could induce slow peptide diffusion in seawater which would contribute to the maintenance of a constant peptide concentration in the genital coelom, oviduct and mantle cavity, close to the targets.

Acknowledged

We thank Jean-Marc Nicolas and Darlene Mossman for correcting the English of the manuscript, Didier Rousseville the captain of the professional fishing boat “Père Arthur” and his crew for help in providing cuttlefish as well as Laurence Lafaitour. This work was supported by the Conseil Regional de Basse Normandie and IFREMER.

Fig. 1: First step of purification on C18 column of the chromafix C18 eluate of the total FGO conditioned seawater. One myotropic fraction was detected by the myotropic bioassay (shaded part).

Fig. 2: MS/MS spectra of endogenous DQVKIVL (A) using the same experimental conditions as for synthetic DQVKIVL (B).

Fig. 3: MS/MS spectra of the m/z 815 from FGO (A) and FGO conditioned seawater (B). MS/MS spectra of the m/z 1397 from FGO (C) and FGO conditioned seawater (D).

Fig. 4: MS/MS spectra of endogenous DEVKIVL.

Fig. 5: Ionic chromatogram of the first purification step of FGO in RP-HPLC. The myotropic fraction is indicated in black (A). Second step of purification of myotropic fraction in RP-HPLC. The fraction containing the discharged ion at m/z 1397 is indicated in black (B). Ionic chromatogram of the 21.63 HPLC fraction containing peak obtained after two purification steps (C).

Fig. 6: Zoomscan analysis of the m/z 1397.5. ΔM of 0.5 Da between monoisotopic peaks revealed a discharged ion.

Fig. 7: LC-ESI-MS analysis of synthetic DEVKIVLD.

Fig. 8: MS/MS spectra of endogenous DEVKIVLD.

Fig. 9: OJPs-induced contraction of the cuttlefish whole genital tract for a threshold of 10^{-13} M for DEVKIVL (A) and 10^{-11} M for DQVKIVL (B).

Fig. 10: OJPs-induced contraction of the cuttlefish main nidamental gland for a threshold of 10^{-13} M for DEVKIVL (A) and 10^{-12} M for DQVKIVL (B).

Table 1: Bioactivity of OJPs.

Table 2: Tissue mapping of OJPs performed in microLC-ESI-MS/MS.

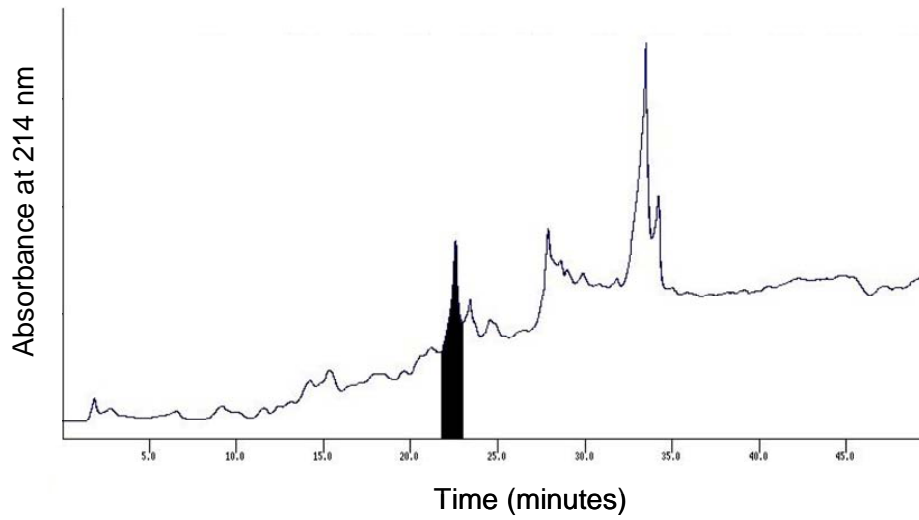


Fig. 1.

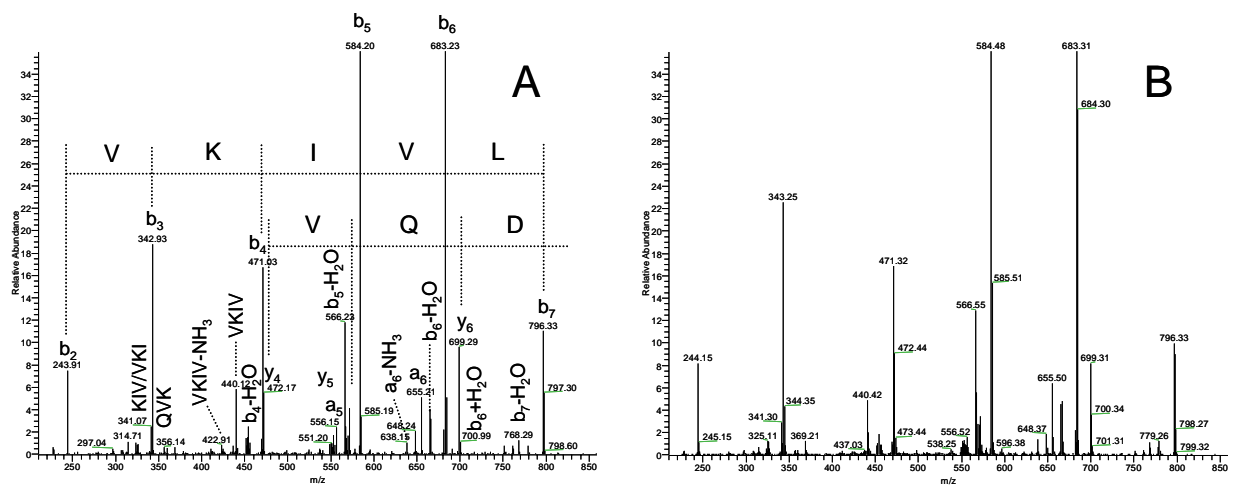


Fig. 2.

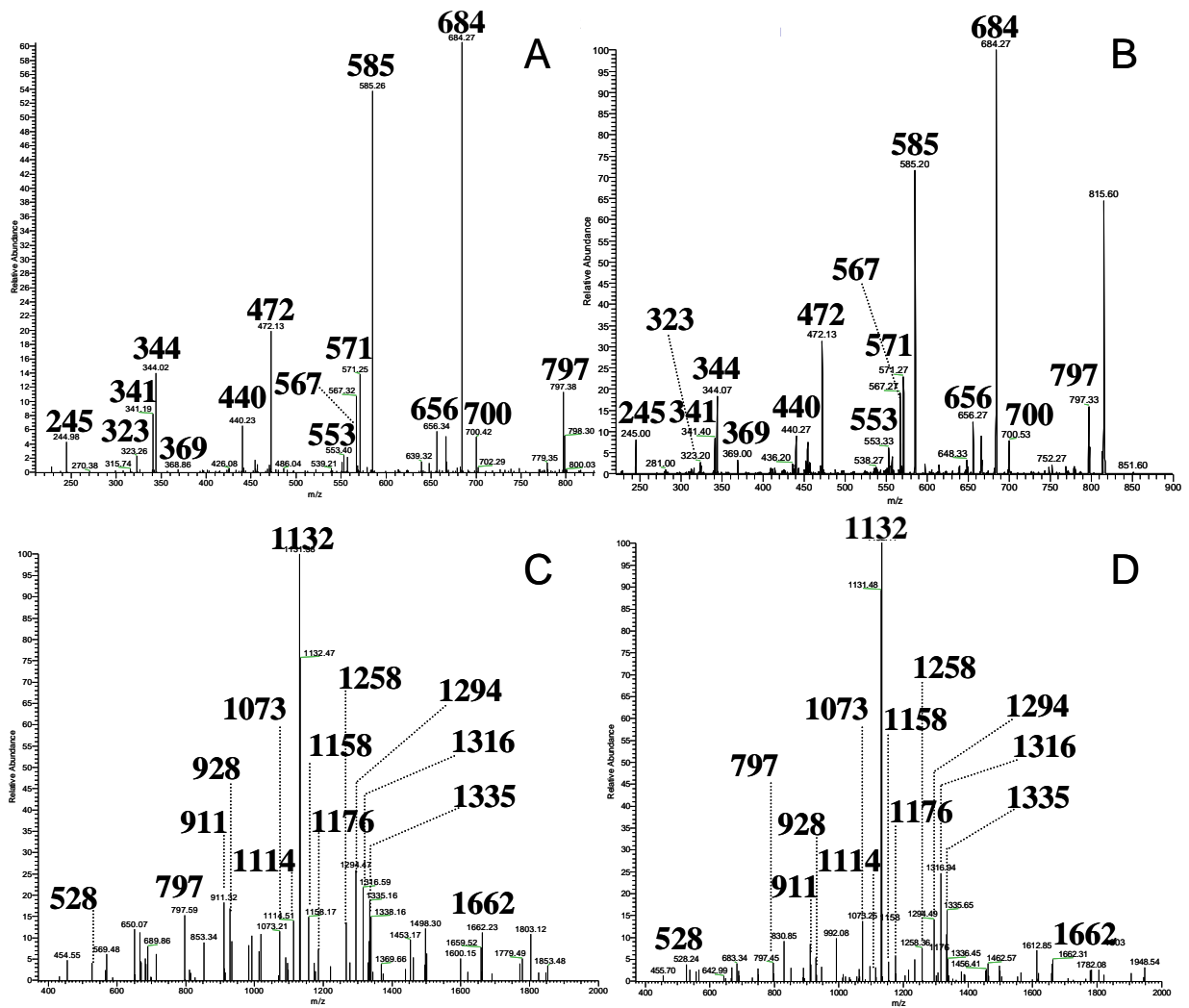


Fig. 3.

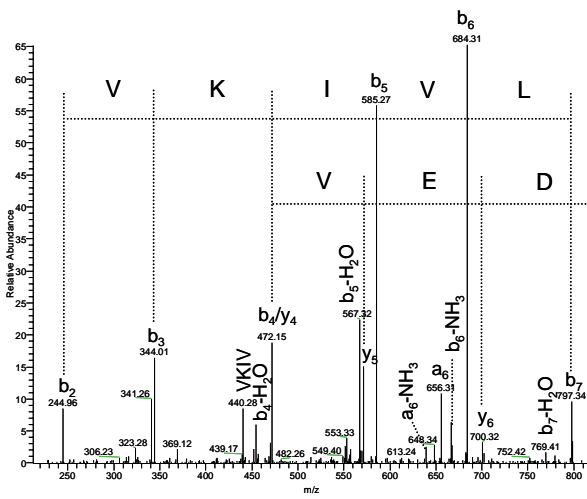


Fig. 4.

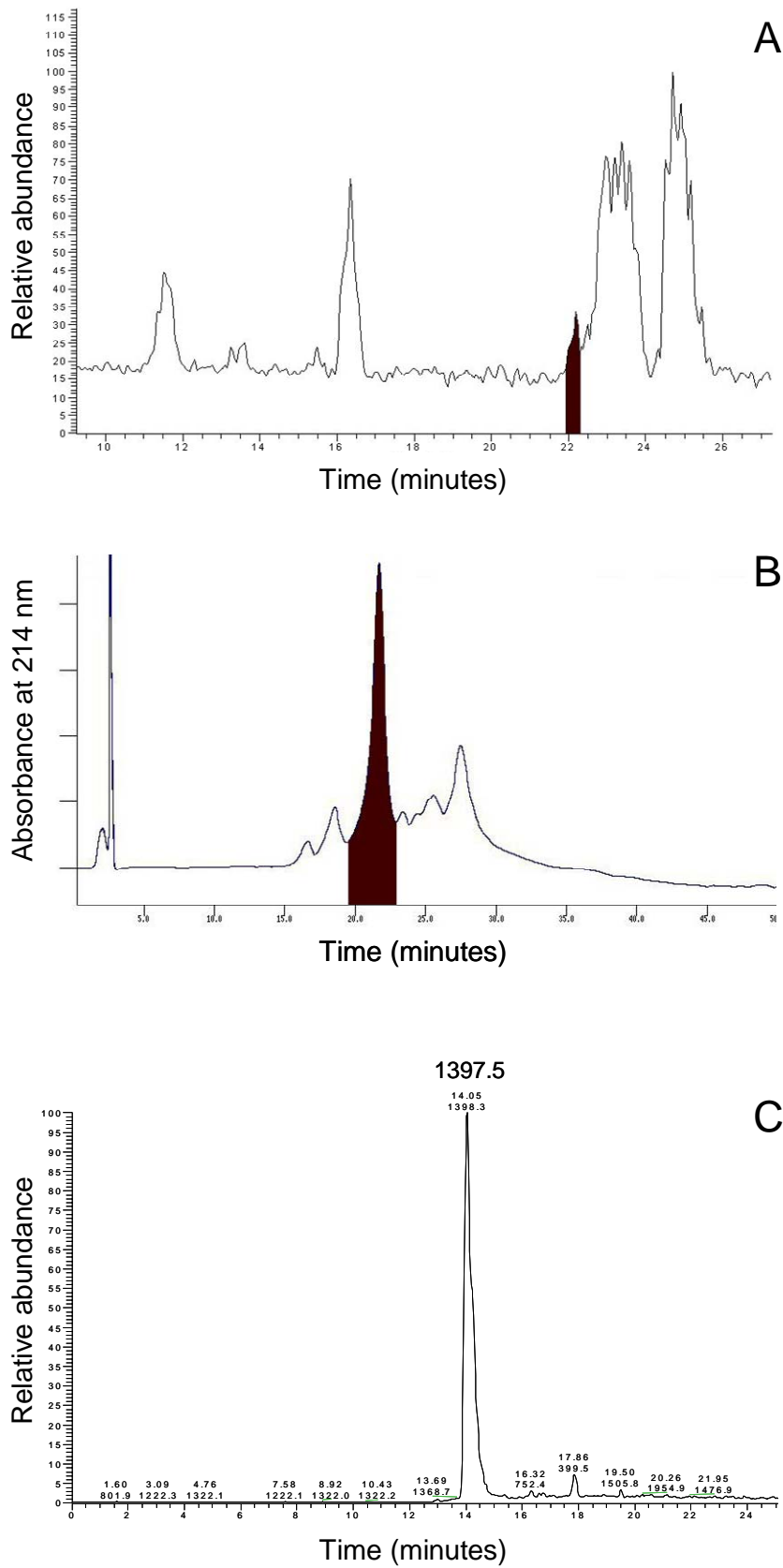


Fig. 5.

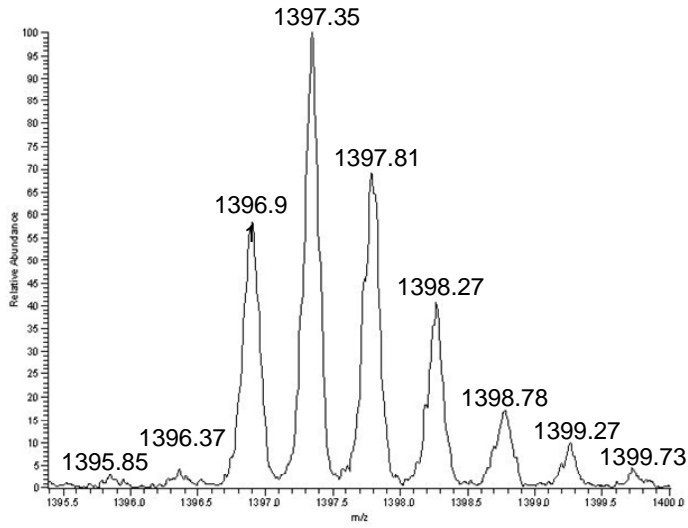


Fig. 6.

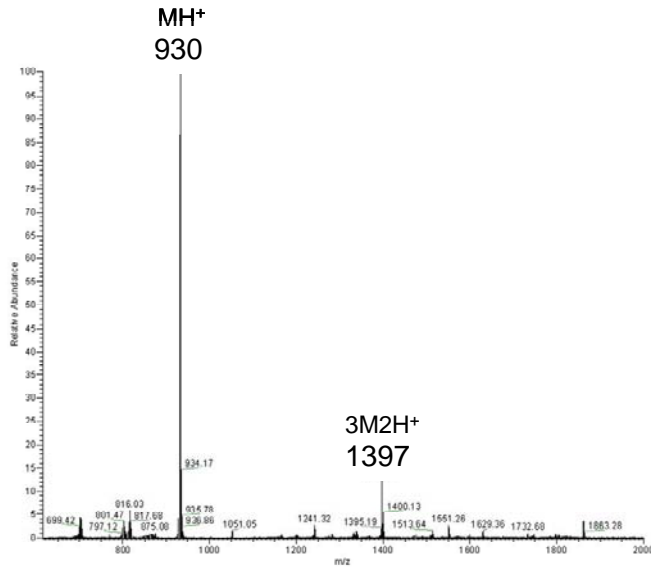


Fig. 7.

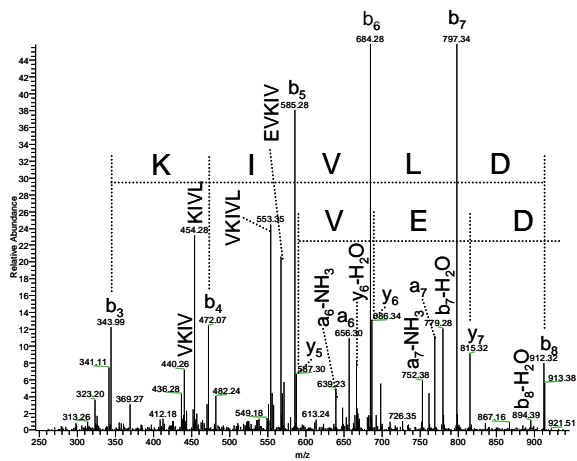


Fig. 8.

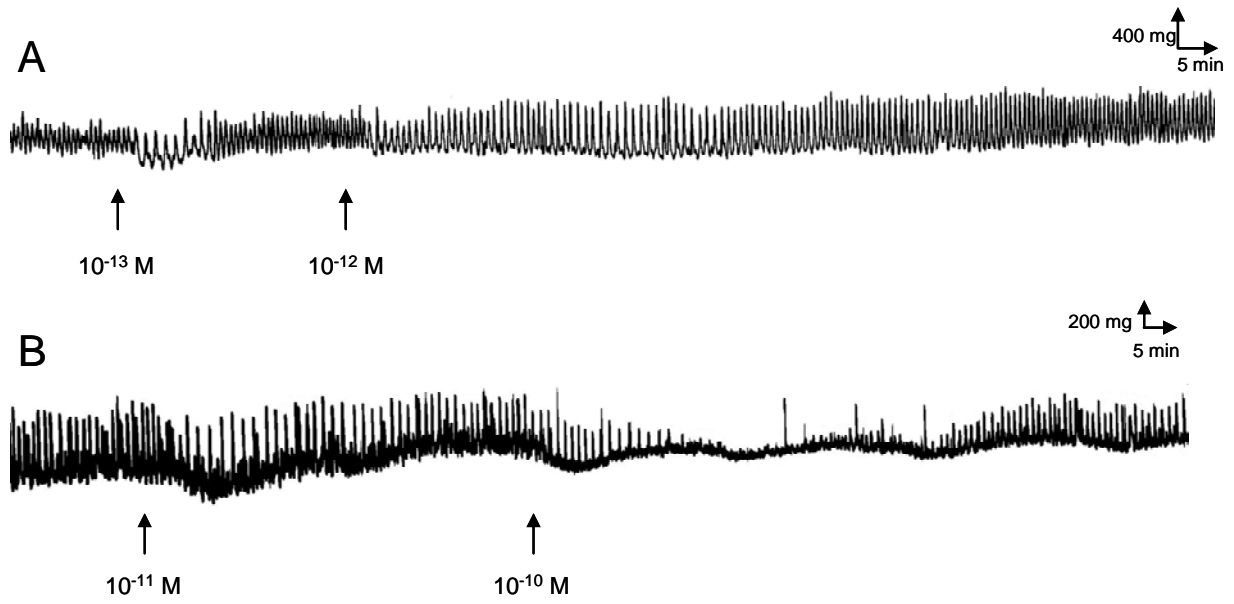


Fig. 9.

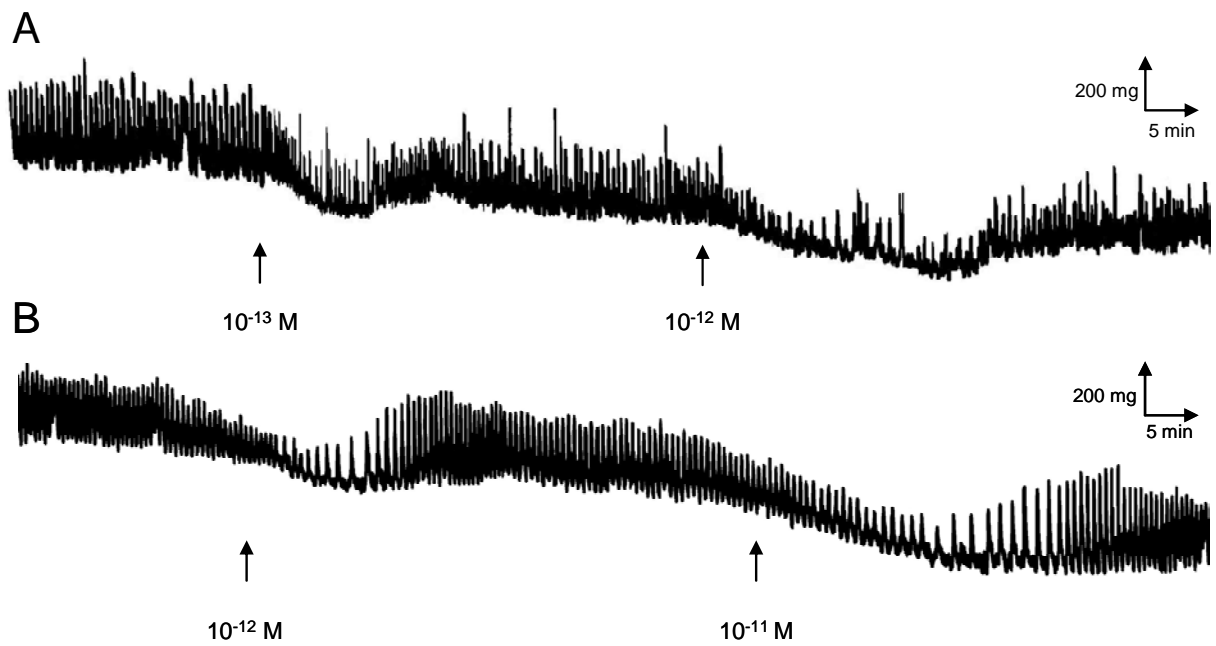


Fig. 10.

Muscles	Threshold concentration	
	DEVKIVL	DQVKIVL
Whole mature genital tract	10 ⁻¹³	10 ⁻¹¹
Esophagus	NA*	NA
Ovarian stroma	NA	NT*
Rectum	NA	NA
Penis	NA	NA
Main nidamental glands	10 ⁻¹³	10 ⁻¹²

Table 1.

NA*: no activity
NT*: not tested

Occurrence of:	DEVKIVL	DQVKIVL	DEVKIVLD
Previtellogenic follicles	nd*	nd	nd
Vitellogenic follicles	d*	d	d
Full-grown oocytes	d	d	d
Eggs	d	d	d
Internal capsule	d	d	d
External capsule	nd	nd	nd
Vitellogenic follicles conditioned seawater	d	d	d
Full-grown oocytes conditioned seawater	d	d	d
Egg-conditioned seawater	nd	nd	nd
Central nervous system	nd	nd	nd
Hemolymph	nd	nd	nd

Table 2.

nd*: not detected
d*: detected

- [1] Karlson P, Luscher M. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 1959;183:55-56.
- [2] Luporini P, Miceli C, Ortenzi C, Vallesi A. Ciliate pheromones. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 1996;17:80-104.
- [3] Toyoda F, Yamamoto K, Iwata T, Hasunuma I, Cardinali M, Mosconi G, Polzonetti-Magni A, Kikuyama S. Peptides pheromones in newts. *Peptides* 2004;25:1531-6.
- [4] Kikuyama S, Yamamoto K, Iwata T, Toyoda F. Peptide and protein pheromones in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2002;132:69-74.
- [5] Zeeck E, Müller C, Beckmann M, Hardege J, Papke U, Sinnwell V, Schroeder F, Francke W. Cysteine-glutathione disulfide, the sperm-release pheromone of the marine polychaete *Nereis succinea* (Annelida: Polychaeta). *Chemoecology.* 1998;8:33-38.
- [6] Ram J, Muller C, Beckmann M, Hardege J. The spawning pheromone cysteine-glutathione disulfide ('nereithione') arouses a multicomponent nuptial behavior and electrophysiological activity in *Nereis succinea* males. *FASEB. J.* 1999;13:945-952.
- [7] Suzuki N, Nomura K, Ohtake H, Isaka S. Purification and the primary structure of sperm-activity peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981;99:1238-1244.
- [8] Hansbrough J, Garbers D. Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 1981;256:1447-1452.
- [9] Suzuki N. Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zoolog. Sci.* 1995;12:13-27.
- [10] Nishigaki T, Chiba K, Miki W, Hoshi M. Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs. *Zygote.* 1996;4:237-245.
- [11] Cummins SF, Nichols AE, Warso CJ, Nagle GT. *Aplysia* seductin is a water-borne protein pheromone that acts in concert with attractin to stimulate mate attraction. *Peptides.* 2005a;26:351-359.
- [12] Painter S, Clough B, Garden R, Sweedler J, Nagle G. Characterization of *Aplysia* attractin, the first water-borne peptide pheromone in invertebrates. *Biol. Bull.* 1998;194: 120-131.
- [13] S. Painter, B. Clough, D. Akalal, and G. Nagle, Attractin, a water-borne peptide pheromone in *Aplysia*, *Invertebr. Repro. Dev.* 1999;36:191-194.
- [14] Cummins S, Nichols A, Amare A, Hummon A, Sweedler J, Nagle G. Characterization of *Aplysia* enticin and temptin, two novel water-borne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction. *J. Biol. Chem.* 2004;279:25614-25622.

- [15] Zatylny C, Durantou F, Boucaud-Camou E, Henry J. Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying. *Mol. Reprod. Dev.* 2000a;55:182-188.
- [16] Zatylny C, Gagnon J, Boucaud-Camou E, Henry J. ILME: a waterborne pheromonal peptide released by the eggs of *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000b;275:217-222.
- [17] Zatylny C, Gagnon J, Boucaud-Camou E, Henry J. The SepOvotropin: a new ovarian peptide regulating oocyte transport in *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000c;276:1013-1018.
- [18] Bernay B, Gagnon J, Henry J. Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;314:215-222.
- [19] Dhainaut A, Richard A. Vitellogenèse chez les céphalopodes décapodes. Evolution de l'ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 1976 ;65 :183-208.
- [20] Henry J, Favrel P, Boucaud-Camou E. Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the motility of the mature oviduct in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Peptides.* 1997;18:1469-1474.
- [21] Henry J, Zatylny C, Boucaud-Camou E. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides, *Peptides.* 1999;20:1061-1070.
- [22] Zatylny C, Marvin L, Gagnon J, Henry J. Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;296:1186-1193.
- [23] Jecklin L. Beitrag zur kenntnis der Laichgellerten und der biologie der embryonen decapoder cephalopoden. *Rev. Suisse Zool.* 1934;41:593-673.
- [24] Boletzky S. Fecundity variation in relation to intermittent or chronic spawning in the Cuttlefish, *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Bull. Mar. Sci.* 1987;40:382-387.
- [25] Sole N, Barany G. Optimization of solid-phase synthesis of [Ala⁸]-dynorphin A. *J. Org. Chem.* 1992;57:5399-5403.
- [26] Garbers D, Watkins H, Hansbrough J, Smith A, Misono K. The amino acid sequence and chemical synthesis of speract and of speract analogues. *J. Biol. Chem.* 1982;257:2734-2737.
- [27] Suzuki N, Kajjura H, Nomura K, Garbers DL, Yoshino K, Kurita M, Tanaka H, Yamaguchi M. Some more speract derivatives associated with eggs of sea urchins,

Pseudocentrotus depressus, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Hemicentrotus pulcherrimus* and *Anthocidaris crassispina*. Comp. Biochem. Physiol. B. 1988a;89:687-693.

[28] Nomura K, Suzuki N, Ohtake H, Isaka S. Structure and action of sperm activating peptides from the egg jelly of a sea urchin, *Anthocidaris crassispina*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983;117:147-153.

[29] Yoshino K, Takao T, Suhara M, Kitai T, Hori H, Nomura K, Yamaguchi M, Shimonishi Y, Suzuki N. Identification of a novel amino acid, o-bromo-L-phenylalanine, in egg-associated peptides that activate spermatozoa. Biochemistry. 1991;30:6203-6209.

[30] Suzuki N, Shimomura H, Radany E, Ramarao C, Ward G, Bentley J, Garbers D. A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. J. Biol. Chem. 1984;259:14874-14879.

[31] Suzuki N, Yoshino K, Kurita M, Nomura K, Yamaguchi M. A novel group of sperm activating peptides from the sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. Comp. Biochem. Physiol. 1988b;90:305-311.

[32] Suzuki N, Yamaguchi M. Species specific respiratory stimulation of sea urchin (*Clypeaster japonicus*) spermatozoa by an egg associated factor. Zoolog. Sci. 1986;3:801-806.

[33] Yoshino K, Takao T, Yamaguchi M, Shimonishi Y, Suzuki N. Derivatives of sperm-activating peptide III (SAP-III) associated with eggs of sand dollars, *Clypeaster japonicus* and *Astriclypeus manni*. Comp. Biochem. Physiol. 1990;97B:679-685.

[34] Suzuki N, Kurita M, Yoshino K, Yamaguchi M. Speract binds exclusively to sperm tails and causes an electrophoretic mobility shift in a major sperm tail protein of sea urchins. Zoolog. Sci. 1987;4:641-648.

[35] Takao T, Yoshino K, Suzuki N, Shimonishi Y. Analysis of post-translational modifications of proteins by accurate mass measurements in fast atom bombardment mass spectrometry. Biomed. Environ. Mass. Spectrom. 1990;19:705-712.

[36] Yoshino K, Takao T, Suhara M, Kitai T, Hori H, Nomura K, Yamaguchi M, Shimonishi Y, Suzuki N. Identification of a novel amino acid, o-bromo-L-phenylalanine, in egg-associated peptides that activate spermatozoa. Biochemistry. 1991;30:6203-6209.

[37] Yoshino K, Takao T, Shimonishi Y, Suzuki N. Sperm-activating peptide type-V (SAP-V), a fifth member of the sperm-activating peptide family, purified from the egg-conditioned media of the heart urchin *Brissus agassizii*. Comp. Biochem. Physiol. B. 1992;102:691-700.

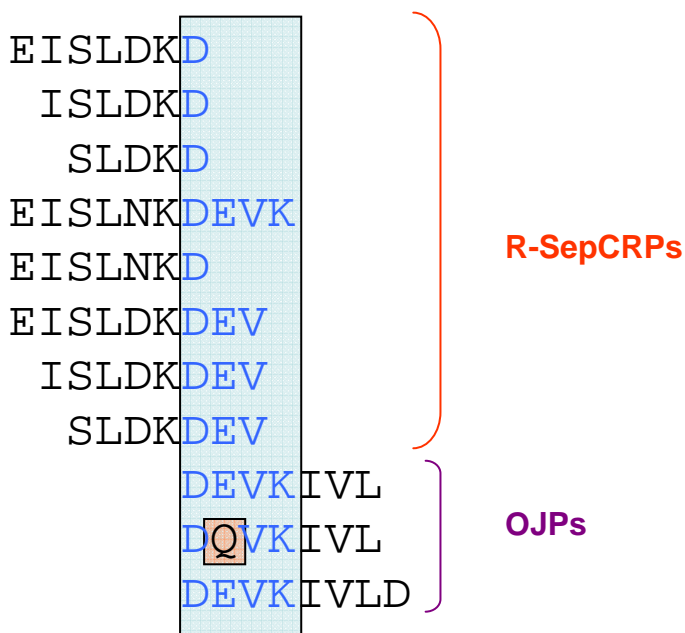
[38] Bylemans D, Borovsky D, Hunt D, Shabanowitz J, Grauwels L, De Loof A. Sequencing and characterization of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) from the ovaries of the grey fleshfly, *Neobellieria (Sarcophaga) bullata*. Regul. Pept. 1994;50:61-72.

- [39] Borovsky D, Carlson D, Griffin P, Shabanowitz J, Hunt D. Mosquito oostatic factor: a novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. *FASEB. J.* 1990;4:3015-3020.
- [40] Hua Y, Bylemans D, De Loof A, Koolman J. Inhibition of ecdysone biosynthesis in flies by a hexapeptide isolated from vitellogenic ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1994;104:R1-4.
- [41] Cummins SF, Schein CH, Xu Y, Braun W, Nagle GT. Molluscan attractins, a family of water-borne protein pheromones with interspecific attractiveness. *Peptides.* 2005b;26:121-129.

VI. Recherche des précurseurs des R-SepCRPs et des OJPs

VI.1. Introduction

Deux familles de peptides régulateurs ovariens, les R-SepCRPs et les OJPs, ont été identifiées dans les follicules vitellogéniques et les ovocytes matures. Ces peptides, strictement localisés au niveau de l'ovaire, modulent les contractions du tractus génital femelle et des glandes nidamentaires principales. En plus d'une activité biologique et d'une cartographie similaires, les deux familles présentent des homologies structurales.

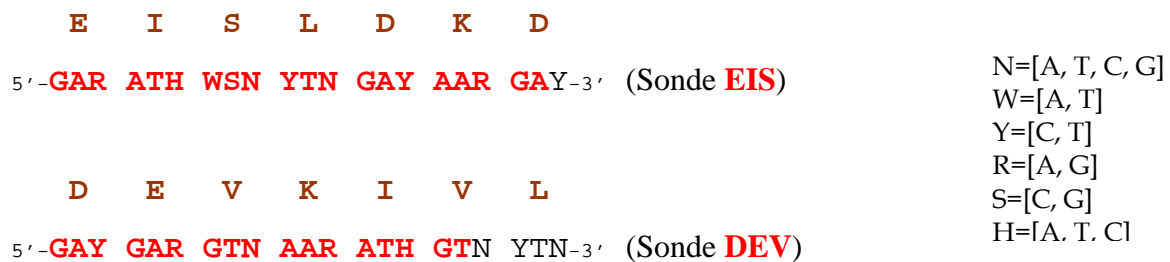


En effet, un motif de trois à quatre acides aminés (DEV(K)) est parfaitement conservé entre les SeCRP-5, 6, 7 et 8 et l'ensemble des OJPs (avec une exception pour le résidu glutamine du DQVKIVL). Ces différentes homologies suggèrent que les R-SepCRPs et les OJPs pourraient être exprimés par le même précurseur. Afin de vérifier cette hypothèse, le(s) précurseur(s) de ces deux familles ont été recherchés par le criblage d'une banque d'ADN complémentaires (ADNc) de follicules vitellogéniques (Zatylny, 2000d). L'obtention des séquences nucléiques devrait par ailleurs permettre d'élucider les mécanismes de maturation à l'origine des différents peptides, notamment en ce qui concerne les formes tronquées.

VI.2. Matériels et méthodes

VI.2.1. Criblage de banque

Le criblage de la banque d'ADNc de follicules vitellogéniques a été réalisé avec deux oligonucléotides synthétiques dégénérés (**indiqués en rouge**), codant pour les peptides EISLDKD et DEVKIVL :



a) Préparation des oligonucléotides marqués

Le transfert d'un groupement phosphate radioactif à partir du γ -ATP^{P32} sur les deux oligonucléotides est assuré par une T4 polynucléotide kinase (PNK) pendant 1h30 à 37°C. Les oligonucléotides marqués sont ensuite purifiés sur une colonne Sephadex G50 de 8 cm coulée dans une pipette pasteur stérile et équilibrée avec un tampon Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM.

b) Protocole de criblage

Le protocole du criblage de banque est illustré sur la [figure 14](#).

Transfert :

Quatre boîtes LB/agar sont préparées avec une culture de nuit de bactéries XL1 blue infectée par 50 000 phages provenant d'une banque d'ADNc de follicules vitellogéniques. Après une nuit à 37°C, les plages de lyse sont transférées sur 2 membranes de nylon « gene screen » chargée positivement (NEN life sciences) afin de disposer d'une membrane originale et d'une membrane réplique pour chaque boîte.

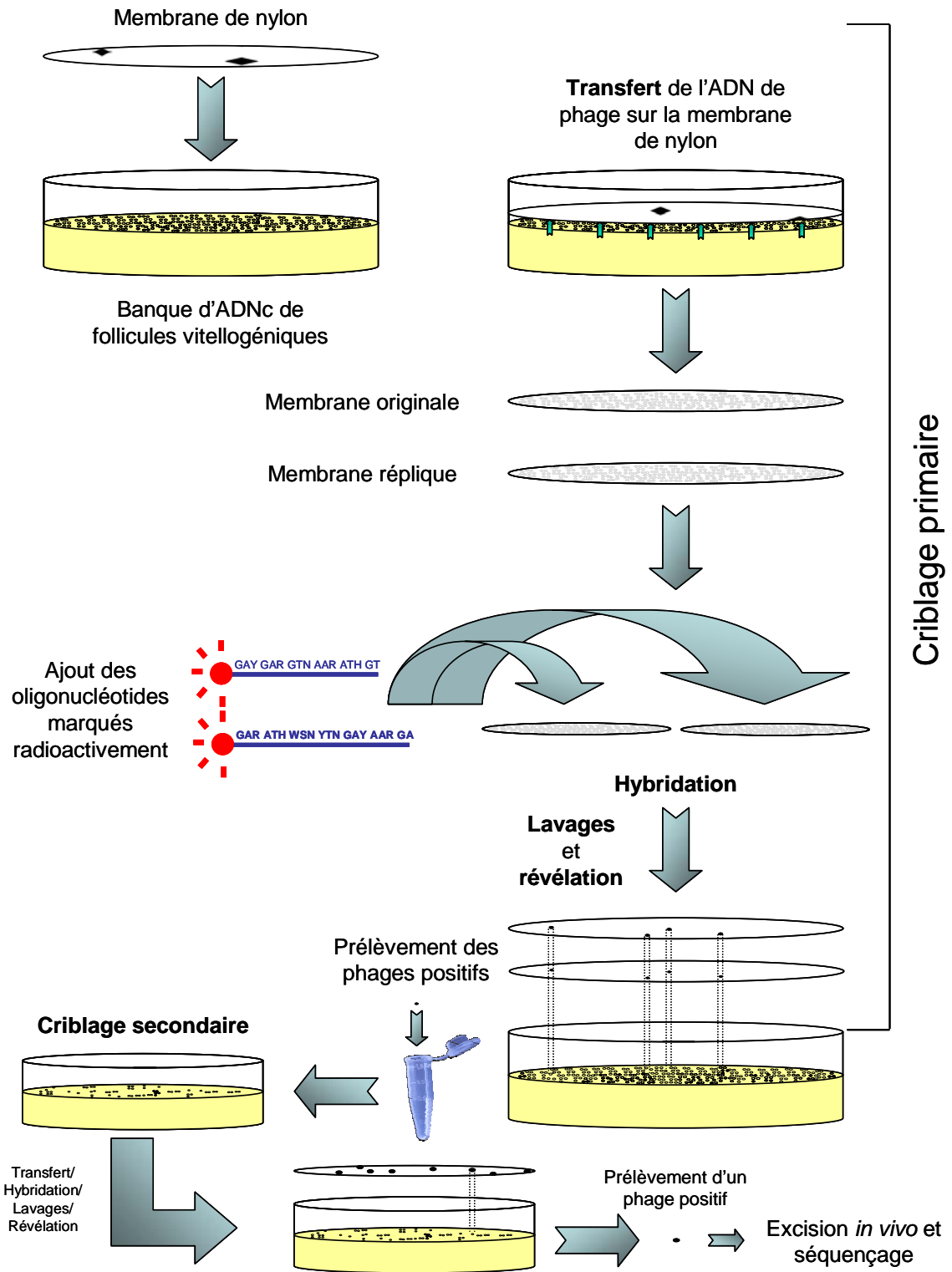


Figure 14 : Protocole du criblage de banque à l'aide d'oligonucléotides marqués.

Les membranes sont ensuite dénaturées dans un tampon de 1,5 M de NaCl et 0,5 M de NaOH, neutralisées dans une solution de 1,5 M NaCl et 1 M Tris-HCl pH 8 avant d'être rincées dans du 2xSSC (0,3 M NaCl et 30 mM de citrate de sodium, pH 7) puis séchées deux heures à 80°C.

Préhybridation :

Les membranes sont placées dans un tampon de préhybridation/hybridation [6xSSC ; 5x Denhardt's (2% (w/v) albumine sérique bovine, 2% Ficoll 400, 2% polyvinyl pyrrolidone) ; 0,5% de sodium dodécyl sulfate (SDS) et 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé] pendant quatre heures à 40 °C dans un four rotatif.

Hybridation :

Après l'étape de préhybridation, les deux oligonucléotides marqués (à $1,8 \times 10^6$ cpm/ml) sont ajoutés individuellement au tampon de préhybridation/hybridation. L'hybridation est réalisée pendant 72 heures à 40°C dans un four rotatif.

Rinçages et révélation :

Cinq lavages de 10 minutes sont effectués à 42°C, trois avec du 6xSSC/0,1% SDS et deux avec du 5xSSC/0,1% SDS. Les membranes sont révélées par autoradiographie pendant 72 heures à -80°C.

Criblage secondaire et tertiaire :

A l'issue du premier criblage, les phages présentant un marquage positif sur la membrane d'origine et sur la membrane réplique sont prélevés, mis en suspension dans une solution de SM (20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 100mM NaCl ; 10 mM MgSO₄ ; 0,02% gélatine) puis remis en présence de bactéries pour un second criblage réalisé selon le même protocole. Après le second criblage, les clones positifs peuvent éventuellement être soumis à un criblage tertiaire, selon le même protocole.

VI.2.2. Excision *in vivo*

Les phages positifs, individualisés à l'issue du deuxième ou du troisième criblage subissent une excision *in vivo* par coinfection d'une bactérie XL1 blue avec un phage « helper » de manière à obtenir un plasmide recombinant.

VI.2.3. Purification et séquençage

L'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA purification System (Promega). Les clones isolés sont remis en culture dans 5 ml de milieu riche LB additionné d'ampicilline (50µg/1). Après 12 heures de culture, les bactéries sont centrifugées et les culots sont repris dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5 contenant 10 mM EDTA et 100 µg/ml de RNase A. Une lyse alcaline des bactéries est réalisée dans une solution de 0,2 M NaOH et 1% SDS avec une protéase alcaline. Les débris cellulaires sont ensuite précipités par ajout d'acétate de potassium 0,75 M pH 4,2. L'ADN en solution est purifié par passage sur une résine d'affinité. Après lavage à l'éthanol 60%, l'ADN est élué par de l'eau stérile. L'ADN est alors quantifié par spectrophotométrie à 280 nm. Le séquençage est réalisé à partir de 4 µg de plasmide purifié par la société Genome express®.

VI.3. Résultats

VI.3.1. Criblage de banque

a) Oligonucléotide EIS

Sur les 200 000 phages criblés, quatre se sont révélés positifs à l'issue du premier criblage. Après le second criblage, un seul des quatre clones s'est révélé positif.

b) Oligonucléotide DEV

Après un criblage primaire réalisé sur 200 000 phages, quatre clones se sont révélés positifs. A l'issue d'un criblage secondaire puis tertiaire, ces quatre clones se sont tous révélés positifs.

VI.3.1. Séquençage des clones

Aucune des séquences nucléotidiques obtenues ne correspond au(x) précurseur(s) des R-SepCRPs et OJPs. Cependant, les deux précurseurs hybridés par les oligonucléotides ESI et DEV possèdent des similitudes avec les deux oligonucléotides utilisés, ce qui expliquerait le résultat du criblage.

a) Oligonucléotide EIS

Après excision *in vivo* et purification, un clone d'environ 900 pb a pu être séquencé (figure 15). La traduction de la séquence nucléique en acides aminés dans les différents cadres de lecture montre que ce précurseur n'est pas celui des R-SepCRPs. Cependant, une zone du précurseur, fortement répétée, présente des similitudes avec la sonde EIS qui expliqueraient l'hybridation. L'obtention de la queue polyA indique que la zone du précurseur obtenue correspond à l'extrémité 3'. Cette partie précurseur étant probablement non codante (nombreux codons stop), il n'est pas possible de déterminer le cadre de lecture.

b) Oligonucléotide DEV

Après excision *in vivo*, quatre clones de 600 pb ont été séquencés. A l'issue du séquençage, ces quatre clones se sont tous révélés être identiques. Bien qu'une zone de ce précurseur présente des similitudes avec les OJPs qui expliqueraient l'hybridation, la traduction de la séquence nucléique en acides aminés montre que ce précurseur n'est pas celui des OJPs (figure 16). L'obtention de la queue polyA indique que la zone du précurseur obtenue correspond à l'extrémité 3'.

```

17      P R A A G I R H E A S C R I R H E
51 5'-CCC CGG GCT GCA GGA ATT CGG CAC GAG GCC TCG TGC CGA ATT CGG CAC GAG
                                     :. :.
                                     5'-GAY GAR
35  V K I E V C S F S G Y K I Y P G H G
105 GTG AAG ATT GAA GTG TGT AGT TTC AGC GGA TAT AAA ATT TAT CCT GGC CAT GGA
    :. :. :. :. :.
    GTN AAR ATH GTN YTN-3'
53  K R M V K T D G K I M Q F L N A K C
159 AAA CGA ATG GTC AAG ACT GAC GGC AAG ATA ATG CAG TTT CTC AAT GCT AAG TGT

71  E R S Y K M K R N P R K I N W T V L
213 GAA CGC TCC TAT AAA ATG AAG CGT AAT CCA CGG AAA ATC AAC TGG ACA GTG TTG

89  Y R R K H K K G Q T E E V T K K R T
267 TAT CGC CGT AAA CAC AAA AAA GGT CAG ACT GAA GAA GTT ACC AAG AAG CGA ACT

107 R R T A K F Q R A I A G A T L S D I
321 CGC AGA ACG GCA AAA TTT CAG AGG GCT ATT GCT GGT GCA ACT CTC AGT GAC ATT

125 M A K R N Q K P E V R K A Q R E Q A
375 ATG GCT AAA CGT AAC CAA AAA CCT GAG GTT AGA AAA GCA CAG AGA GAG CAA GCT

143 I R A A K E K Q K A K E A K K T T T
429 ATC AGA GCT GCT AAA GAA AAG CAA AAA GCT AAA GAA GCC AAG AAG ACA ACT ACA

161 K P A K S V L P K V K A T K T V P V
483 AAG CCA GCC AAG TCT GTC CTT CCT AAG GTA AAA GCA ACA AAG ACT GTT CCA GTG

179 R A P R V G G K R *
545 AGA GCC CCC CGG GTT GGT GGT AAA CGC TAA aatgtactgaacactaaataaatgttttga

596 aatcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3'

```

CAC GAG GTG AAG ATT GAA GTG : Zone du précurseur qui présente des similarités avec l'oligonucléotide DEV.

GAY GAR GTN AAR ATH GTN YTN : Oligonucléotide DEV.

aaataaa : Séquence consensus signal de polyadénylation.

Figure 16 : Séquence du clone positif obtenu après criblage avec l'oligonucléotide DEV.

VI.4. Discussion

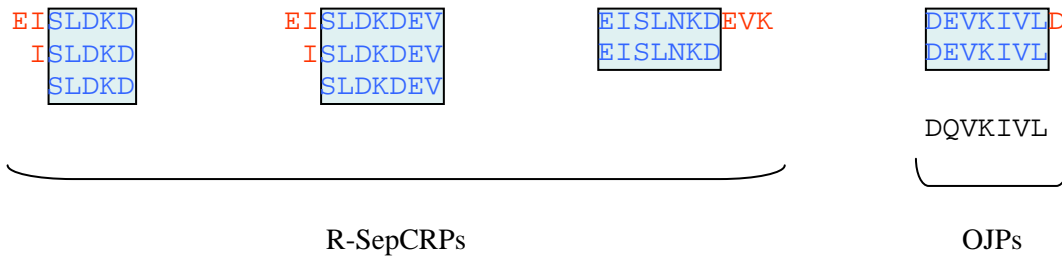
La recherche des précurseurs des R-SepCRPs et des OJPs chez la seiche *S. officinalis* a été entreprise par criblage d'une banque d'ADNc avec des oligonucléotides dégénérés. Cependant, les deux précurseurs obtenus ne sont pas ceux escomptés. Les similitudes entre les séquences nucléiques de ces précurseurs et les séquences dégénérées des deux oligonucléotides EIS et DEV utilisés expliquent les résultats obtenus.

Néanmoins, il convient de préciser que les conditions de criblage (température d'hybridation et concentrations en sel des différents tampons...) sont difficiles à déterminer. De plus, les oligonucléotides présentent un degré de dégénérescence variable selon la nature des acides aminés.

Les deux oligonucléotides et les conditions utilisés n'ont donc pas permis d'obtenir les précurseurs des R-SepCRPs et des OJPs. Afin d'identifier ces précurseurs, les conditions de criblage devront être modifiées. De plus, des oligonucléotides plus longs et donc plus spécifiques, correspondants par exemple au EISLNKDEVK pour les R-SepCRPs et au DEVKIVLD pour les OJPs, pourront être utilisés (la structure de ces deux peptides n'ayant été élucidée que postérieurement au criblage de la banque d'ADNc).

VII. Conclusion

Grâce à une approche visant à sélectionner les peptides libérés par les ovocytes matures, dans les voies génitales femelles, deux nouvelles familles de peptides régulateurs ont pu être identifiées chez *S. officinalis* : les R-SepCRPs et les OJPs. Ces deux familles, sont caractérisées par la présence de motifs internes conservés et de formes tronquées endogènes.



Un R-SepCRPs (EISLDKD) et un OJPs (DEVKIVL) présentent par ailleurs la substitution d'un acide aminé acide (D pour les R-SepCRPs et E pour les OJPs) par l'acide aminé non chargé correspondant (N et Q). Ces formes pourraient donc être la conséquence d'une duplication puis d'une substitution survenue à l'intérieur d'un gène ancestral. La substitution d'une seule base nucléique permet en effet de remplacer un acide aspartique (D) par une asparagine (N) et un acide glutamique (E) par une glutamine (Q).

Asp (D)	Asn (N)	Gln (Q)	Glu (E)
AAA	AAU	CAA	GAA
AAG	AAC	CAG	GAG

Ces deux familles présentent des homologies structurales. En effet, le motif DEV(K) est commun à certains R-SepCRPs et OJPs. De plus, la composition en acides aminés des R-SepCRPs et des OJPs est voisine. Ces peptides sont riches en résidus acides et leucine/isoleucine .

R-SepCRPs :

Asp + Glu : 37%

Leu + Ile : 24%

OJPs :

Asp + Glu : 27%

Leu + Ile : 27%

Cette composition pourrait être responsable du comportement particulier des R-SepCRPs et des OJPs. En effet, ces deux familles présentent la propriété de gélifier en condition aqueuse ; cet effet est cependant plus marqué dans le cas des OJPs. La gélification de ces peptides pourrait permettre une diffusion progressive à l'intérieur des voies génitales et donc assurer le maintien d'une concentration constante de R-SepCRPs et OJPs à proximité des différentes cibles.

Les analyses réalisées en spectrométrie de masse montre clairement que la distribution tissulaire des R-SepCRPs et des OJPs est restreinte à l'ovaire. Exprimés par les follicules vitellogéniques, au cours de la vitellogenèse, ils sont libérés par les follicules et les ovocytes matures à l'intérieur des voies génitales femelles. Ils modulent, à concentration physiologique, l'activité contractile du tractus génital et des glandes nidamentaires principales. Les R-SepCRPs et les OJPs interviendraient dans le stockage des ovocytes avant l'accouplement et dans la sécrétion de la capsule externe de l'oeuf. Leur activité varie suivant le stade de ponte. Il est cependant difficile de connaître le stade des animaux (préponte, ponte et postponte), du fait de leur provenance directe du milieu naturel. Ces variations stade-dépendantes tendent à démontrer que l'expression des récepteurs associés varie en fonction du stade de maturité. Le profil d'expression des récepteurs permettrait de mieux cerner la régulation exercée par les R-SepCRPs et les OJPs.

Le mode d'action de ces peptides sur les étapes successives de la ponte apparaît être très complexe puisque ceux-ci n'agissent bien sûr pas isolément, mais en synergie avec d'autres facteurs : neuromédiateurs, neuropeptides, prostaglandines et peut être stéroïdes. Ces deux nouvelles familles viennent confirmer et compléter le schéma régulateur de la ponte proposé par Zatylny (2000d) chez cette espèce ([figure 17](#)). La ponte et son contrôle peuvent donc être décomposées de la manière suivante :

- les liens qui unissent l'ovocyte au stroma ovarien sont rompus au moment de l'**ovulation**. Les ovocytes sont libérés dans le coelome génital,

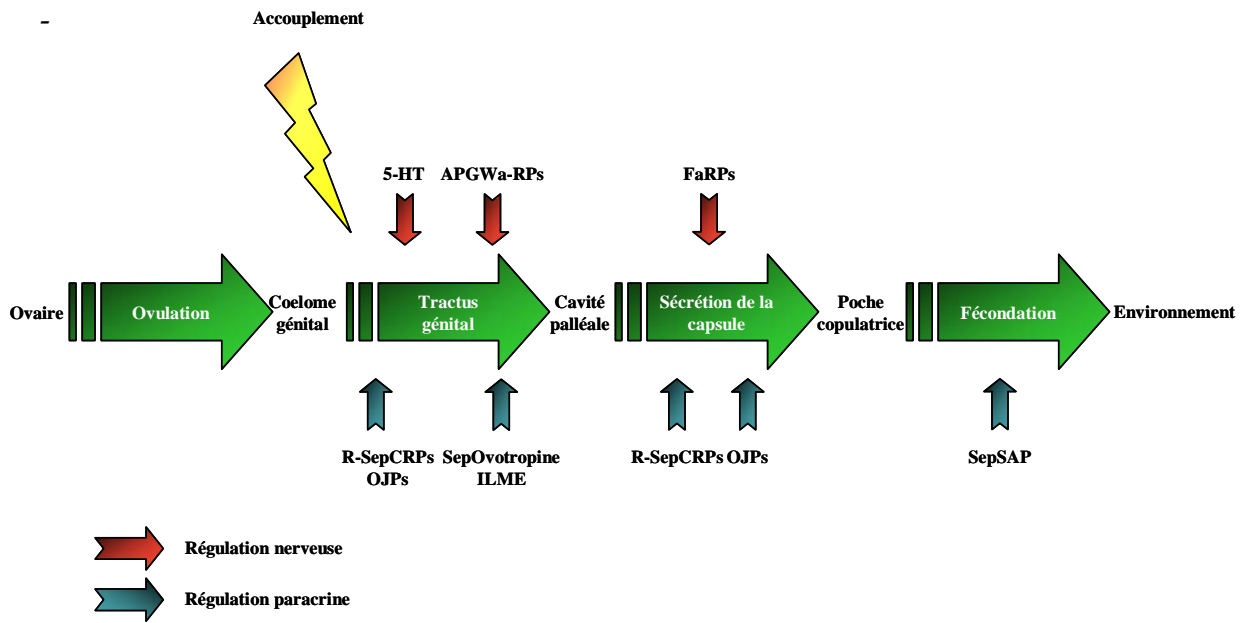


Figure 17 : Représentation schématique des différentes étapes du contrôle de l'émission des ovocytes chez la seiche *S. officinalis*.

- la 5-HT ovarienne (Zatylny *et al*, 2000a), les R-SepCRPs et les OJPs, libérés par les ovocytes dans les voies génitales, inhibent les contractions du tractus génital. Ils assurent ainsi le **stockage des ovocytes** dans le coelome génital et la lumière de l'oviducte jusqu'à l'accouplement,
- après l'accouplement, le **transport des ovocytes** est facilité par les contractions du tractus génital qui sont sous le contrôle de neuropeptides (les APGWa-RPs et les FaRPs (Henry *et al*, 1997, 1999)) et de facteurs ovariens (ILME et la SepOvotropine (Zatylny *et al*, 2000b, c)),
- la **sécrétion de la capsule** est assurée par la glande de l'oviducte puis par les glandes nidamentaires accessoires et principales. Ces dernières sont modulées par des neuropeptides, les FaRPs (Henry *et al*, 1999) et des peptides ovariens, les R-SepCRPs et les OJPs,
- la **fécondation** au niveau de la poche sous-buccale est facilitée par un facteur ovarien : le SepSAP, libéré par les ovocytes en cours de fécondation (Zatylny *et al*, 2002).

En conclusion, l'ovaire apparaît comme l'une des principales sources de facteurs régulateurs capables de moduler successivement le stockage des ovocytes avant l'accouplement, leur transport dans le tractus génital, la sécrétion de la capsule de l'oeuf et la fécondation. Outre les facteurs ovariens, des neuromédiateurs et probablement des facteurs hormonaux (Zatylny, 2000d) interviennent également dans le contrôle de ces différentes étapes. En réponse à des stimuli et/ou à des variations internes et/ou externes, l'association de différentes voies de régulation et de multiples facteurs régulateurs permet une régulation fine et optimale qui est dépendante du stade de maturité de l'animal. Au sein de cette régulation, les R-SepCRPs et les OJPs semblent occuper une place importante. Il sera donc intéressant de vérifier si des facteurs apparentés sont présents dans les autres classes de mollusques et notamment chez les bivalves.

Cette première partie a permis de caractériser des nouveaux facteurs myotropes régulateurs de la ponte chez *Sepia officinalis*. En spéculant sur une possible conservation structurale et fonctionnelle, la recherche de peptides apparentés a donc été entreprise chez *C. gigas*.

Partie II

Recherche de facteurs peptidiques impliqués
dans le contrôle de la ponte ovulaire chez
Crassostrea gigas : utilisation de la seiche *Sepia*
officinalis comme modèle

Partie II : Recherche de facteurs peptidiques impliqués dans le contrôle de la ponte ovulaire chez <i>Crassostrea gigas</i> : utilisation de la seiche <i>Sepia officinalis</i> comme modèle		Page 115
I.	<u>Introduction</u>	Page 117
II.	<u>Approche expérimentale</u>	Page 119
	II.1. Recherche de peptides apparentés aux peptides ovariens de seiche	Page 119
	II.2. Recherche de nouveaux peptides régulateurs	Page 119
III.	<u>Recherche de peptides apparentés aux R-SepCRPs et OJPs chez <i>C. gigas</i></u>	Page 120
	III.1. Introduction	Page 120
	III.2 Matériels et méthodes	Page 121
	III.2.1. Recherche de peptides apparentés aux R-SepCRPs et OJPs chez <i>Crassostrea gigas</i>	Page 121
	a) <i>Analyse en microLC-ESI-MS/MS</i>	Page 121
	b) <i>Elaboration de banques de séquences peptidiques</i>	Page 121
	c) <i>Recherche de molécules apparentées</i>	Page 122
	III.2.2. Test des différents facteurs chez <i>C. gigas</i>	Page 122
	III.3. Résultats	Page 123
	III.3.1. Recherche de molécules apparentées aux R-SepCRPs et OJPs chez <i>Crassostrea gigas</i>	Page 123
	III.3.2. Bioessai <i>in vivo</i> chez <i>C. gigas</i>	Page 123
	III.4. Discussion	Page 124
IV.	<u>Identification de deux peptides régulateurs libérés avec les produits génitaux chez <i>C. gigas</i></u>	Page 125
V.	<u>Conclusion</u>	Page 151

I. Introduction

Au-delà des peptides exprimés et libérés par l'ovaire (voir Partie I), des facteurs transmis par le mâle au cours de l'accouplement sont également capables de réguler la coordination des différentes étapes de la ponte. Chez les invertébrés, plusieurs peptides répondant à ces critères ont été identifiés dans les glandes accessoires mâles.

Chez la drosophile, à la suite d'expériences de transplantations (Leahy, 1966 ; Merle, 1969) et d'injections de glandes accessoires mâles (Leahy et Lowe, 1967), différents peptides stimulant la ponte et inhibant les accouplements chez la femelle ont été caractérisés (pour revue voir Wolfner (1997)) :

- l'Acp70A (Accessory gland Proteins, position 70A sur les chromosomes polytènes) communément nommé « sex-peptide », identifié chez *D. melanogaster* (Chen *et al*, 1988), *D. sechellia* (Chen et Balmer, 1989) et *D. sukuzii* (Schmidt *et al*, 1993),
- l'Acp26Aa ou « ovuline », identifiée chez *D. melanogaster* (Monswa et Wolfner 1988)
- le DUP99B (Ductus Ejaculatory Peptide), caractérisé chez *D. melanogaster*. La partie C-terminale correspond au sex-peptide (Saudan *et al*, 2002),
- l'OSS (Ovulation Stimulating Substance), caractérisée chez *D. sukuzii* (Ohashi *et al*, 1991),
- le ED-OSS, caractérisée chez *D. biarmipes*, qui présente une extrémité C-terminale homologue au sex-peptide (Imamura *et al*, 1998).

Chez le criquet, la Lom-AG-mytotropine est également suspectée d'être transmise au cours de l'accouplement. Ce peptide module de façon spécifique les contractions de l'oviducte (Paemen *et al*, 1991). Par ailleurs, chez le criquet, un neuropeptide modulant les contractions de l'oviducte, le LOM-MIP, présente une homologie de séquence avec les peptides de la famille de l'APGWamide (Schoofs *et al*, 1991) qui jouent un rôle dans la reproduction chez les mollusques (Li *et al*, 1992 ; van Golen *et al*, 1995b ; Henry *et al*, 1997). Chez la limnée, ces peptides sont en effet présents au niveau de l'appareil génital mâle et sont impliqués dans l'émission des produits génitaux (Li *et al*, 1992 ; van Golen *et al*, 1995b).

Chez l'huître, l'émission des ovocytes est conditionnée par plusieurs stimuli externes : la variation brutale des conditions extérieures (température, bloom phytoplanctonique...)

et/ou la présence de facteurs libérés avec les produits génitaux (Nelson et Allison, 1940 ; Galtsoff, 1964 ; Rice *et al*, 2002).

Sur la base de ce constat, des peptides impliqués dans la régulation de la ponte ont été recherchés dans les tissus gonadiques des deux sexes. Les contractions du muscle adducteur assurant l'étape ultime de la ponte ovulaire, des peptides présentant une activité myotrope ont été recherchés.

II. Approche expérimentale

La recherche de facteurs régulateurs libérés avec les produits génitaux a été décomposée en deux parties.

II.1. Recherche de peptides apparentés aux peptides ovariens de seiche

Cette recherche est basée sur le criblage d'échantillons tissulaires préalablement analysés en microLC-ESI-MS/MS. Elle est assurée par le logiciel Sequest qui procède en comparant les spectres de fragmentation des peptides présents dans l'échantillon analysé avec les spectres de fragmentation théoriques générés à partir de séquences présentes dans une banque donnée.

Dans un premier temps, des peptides apparentés aux R-SepCRPs et OJPs caractérisés préalablement chez *S. officinalis* ont été recherchés chez *C. gigas*. Pour ce faire, différentes banques focalisées sur les séquences des R-SepCRPs et OJPs ont été réalisées par le logiciel Aaseq 5.0.

Dans un deuxième temps, une banque constituée à partir des données bibliographiques et contenant la majeure partie des séquences de peptides régulateurs d'invertébrés a été utilisée pour la recherche de peptides connus, dans les produits génitaux mâles chez *C. gigas* et *S. officinalis*.

II.2. Recherche de nouveaux peptides régulateurs

Puisque chez *C. gigas* l'émission des ovocytes nécessite les contractions musculaires du muscle adducteur, il est apparu intéressant de rechercher des facteurs pouvant moduler l'activité contractile de ce muscle. Dans cette optique, un couplage entre des techniques de purification en CLHP, pi et un bioessai myotrope a été mis en œuvre. Les contractions du muscle adducteur n'étant pas adaptées à la purification de facteurs myotropes, le bioessai mis au point par Henry (1993) sur la motilité de l'oviducte de seiche a donc été utilisé. Les facteurs ainsi identifiés, sont ensuite testés chez l'huître grâce à la production de peptides mimétiques.

III. Recherche de peptides apparentés aux R-SepCRPs et OJPs chez *C. gigas*

III.1. Introduction

Chez l'huître creuse, l'un des événements les plus caractéristiques de la ponte correspond aux contractions du muscle adducteur participant à l'émission des ovocytes hors de la cavité palléale. Ces contractions rythmiques sont visualisées par une augmentation de la fréquence d'ouverture et de fermeture des deux valves. Elles assurent ainsi une éjection rapide et brutale de l'eau contenue dans la cavité palléale. Les études de Galtsoff (1964) montrent que cette activité contractile est stimulée par une hausse rapide de la température et par l'ajout de produits génitaux dans le milieu (Figure 18).

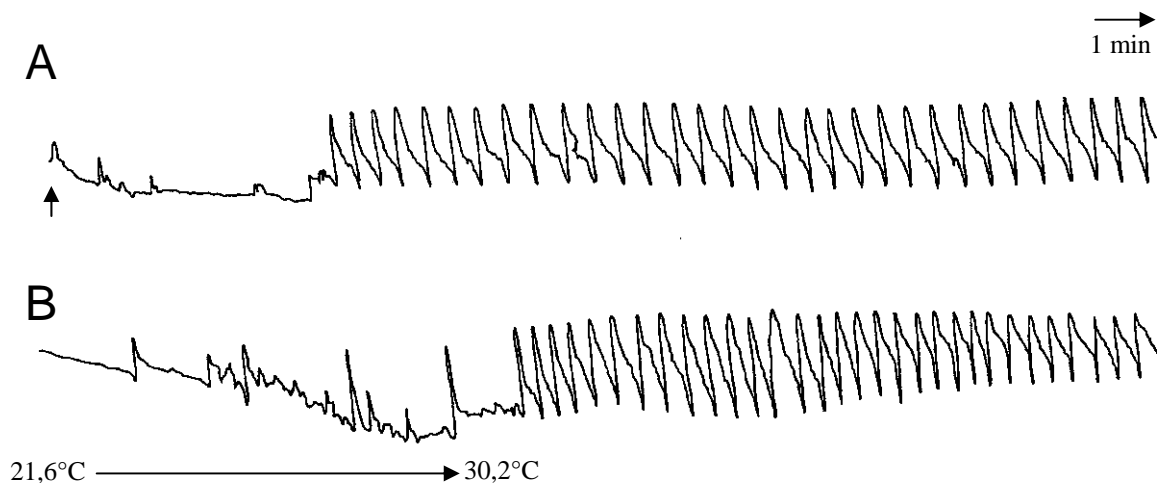


Figure 18 : Mouvements de la coquille, mesurés par un kymographe, au cours de la ponte de deux femelles déclenchée soit par ajout de sperme (A) soit par choc thermique (B) (Galtsoff, 1964).

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons pu vérifier que l'injection d'extrait d'ovaire de seiche provoque également une augmentation de la fréquence des contractions du muscle adducteur. Il existe donc des régulateurs ovariens communs aux deux espèces. Sur la base de cette observation, des peptides apparentés aux SepCRPs et aux OJPs ont été recherchés par un criblage en spectrométrie de masse et testés grâce à un bioessai chez *C. gigas*.

III.2 Matériels et méthodes

III.2.1. Recherche de peptides apparentés aux R-SepCRPs et OJPs chez *Crassostrea gigas*

a) Analyse en microLC-ESI-MS/MS

Après extraction dans de l'HCl 0,1 N à 100°C, centrifugation et concentration sur colonne Chromafix C18, les extraits de gonade d'huître sont suspendus dans de l'eau acidifiée et injectés en microLC-ESI-MS/MS. L'analyse est réalisée pendant 60 minutes avec un gradient linéaire de 1% d'ACN par minute dans 0,1% d'acide formique, en mode datadependentscan avec une exclusion dynamique d'une minute.

b) Elaboration de banques de séquences peptidiques

Des banques de séquences sont créées par le logiciel Aaseq 5.0. Ces banques sont focalisées sur les séquences des R-SepCRPs et des OJPs caractérisés préalablement chez *Sepia officinalis* (Tableau 9).

Motifs	Gammes de masse
NH ₂ -...SLD...-COOH	[500-900 Da]
NH ₂ -...DKD...-COOH	[500-900 Da]
NH ₂ -...SLXKD...-COOH	[700-1000 Da]
NH ₂ -D...KIVL...-COOH	[700-1000 Da]
NH ₂ -...DEVK...-COOH	[500-900 Da]
NH ₂ -...DQVK...-COOH	[500-900 Da]
NH ₂ -...DXVK...-COOH	[500-900 Da]
NH ₂ -DEV...-COOH	[500-900 Da]
NH ₂ -...IVL...-COOH	[500-900 Da]

Tableau 9 : Banques créées par Aaseq 5.0. Les motifs et les gammes de masse sont spécifiés lors de l'élaboration de la banque.

c) Recherche de molécules apparentées

La recherche de peptides apparentés aux R-SepCRPs et aux OJPs est pilotée par le logiciel Sequest comme décrit dans le chapitre « Matériels et méthodes » (page 32). Les séquences proposées par le logiciel Sequest sont ensuite analysées par le logiciel MS-Product. Ce dernier génère la liste des ions fils théoriques issus de la fragmentation d'un ion père de séquence connue.

III.2.2. Test des différents facteurs chez *C. gigas*

Différents échantillons ont été testés sur des huîtres matures selon le protocole décrit dans le chapitre « Matériels et méthodes » (page 32) :

- **1. Témoin** : eau de mer synthétique
- **2. EISLDKD** 10^{-7} M
- **3. DEVKIVL** 10^{-7} M
- **4. R-SepCRPs** : EISLDKD + ISLDKD + SLDKD + EISLNKDEVK à 10^{-7} M chacun
- **5. OJPs** : DEVKIVL + DQVKIVL à 10^{-7} M chacun
- **4 + 5. R-SepCRPs + OJPs.**

III.3. Résultats

III.3.1. Recherche de molécules apparentées aux R-SepCRPs et aux OJPs chez *Crassostrea gigas*

Après analyse des extraits de produits génitaux et de gonades femelles, les fragmentations ont été confrontées aux séquences présentes dans les banques générées par Aaseq 5.0. Cependant, aucun peptide apparenté aux SepCRPs et aux OJPs n'a pu être identifié.

III.3.2. Bioessai *in-vivo* chez *C. gigas*

Après avoir comptabilisé les contractions du muscle adducteur, les huîtres ont été sacrifiées afin de déterminer le sexe. Le résultat du bioessai est présenté sur la [figure 19](#).

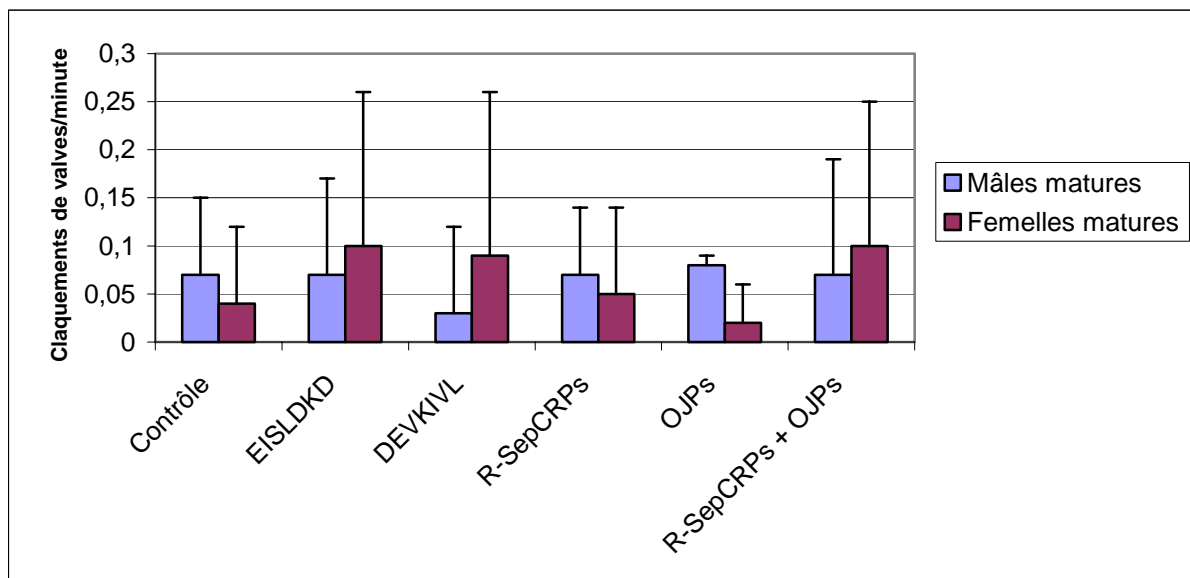


Figure 19 : Effet des différents R-SepCRPs et OJPs sur les contractions du muscle adducteur chez *C. gigas*. (Effectifs : Contrôle : 14 mâles, 19 femelles ; EISLDKD : 7 mâles, 8 femelles ; DEVKIVL : 10 mâles, 10 femelles ; R-SepCRPs : 8 mâles, 5 femelles ; OJPs : 7 mâles, 6 femelles ; R-SepCRPs + OJPs : 6 mâles, 7 femelles).

Les R-SepCRPs et/ou les OJPs injectés seuls ou en mélange ne déclenchent aucune réponse significative sur les contractions du muscle adducteur.

III.4. Discussion

Le bioessai mis en œuvre montre que les R-SepCRPs et les OJPs ne sont pas à l'origine des modifications d'activité contractile observées au niveau du muscle adducteur suite à l'ajout d'extrait d'ovaire de seiche. Par ailleurs, aucun peptide apparenté n'a été identifié chez l'huître. En plus des R-SepCRPs et OJPs, des peptides apparentés à ILME et la SepOvotropine (Zatylny *et al*, 2000b, c) ont été recherchés. Ces peptides ont également été testés chez l'huître, mais sans résultats significatifs dans les deux cas. L'absence d'activité et la non détection en microLC-ESI-MS/MS permettent de conclure à l'absence de R-SepCRPs et OJPs chez *C. gigas*.

Par ailleurs, l'effet des d'extraits d'ovaire de seiche sur l'activité contractile du muscle adducteur montre l'existence de facteurs régulateurs communs aux deux espèces. Cette observation est confirmée par l'action des fractions organiques de produits génitaux mâles ou femelles d'huître sur les contractions du tractus génital femelle de seiche (Figure 20). Une seconde approche expérimentale a donc été mise en oeuvre pour identifier des facteurs myotropes présents dans les produits génitaux chez *C. gigas*.

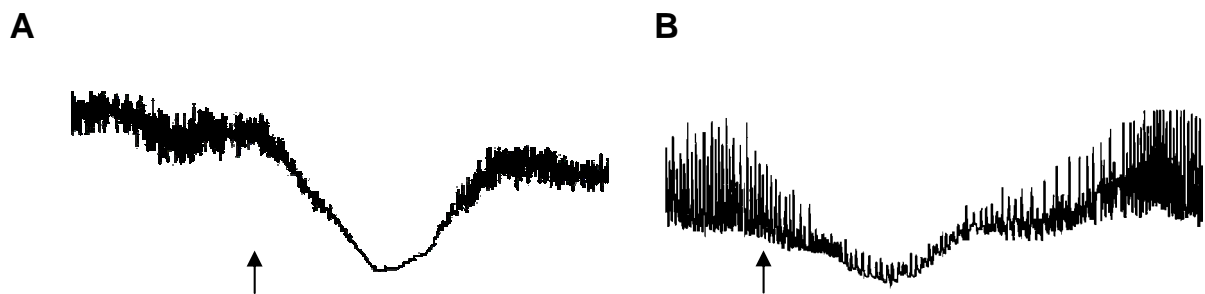


Figure 20 : Activité contractile du tractus génital femelle de *S. officinalis*. Effet des fractions organiques de produits génitaux mâles (A) et femelles (B) de *C. gigas*.

IV. Identification de deux peptides régulateurs libérés avec les produits génitaux chez *C. gigas*

Publication n°4 :

Bernay B, Baudy-Floc'h M, Zanuttini B, Zatylny Z, Pouvreau P, Henry J. Ovarian and sperm regulatory peptides regulate ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*. Soumise dans Mol Reprod Dev.

Ovarian and sperm regulatory peptides regulate ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*.

Benoît Bernay¹, Michèle Baudy-Floc'h², Bruno Zanuttini³, Céline Zatylny¹, Stéphane Pouvreau⁴ and Joël Henry^{1*}

¹Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100 IFREMER Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen, 14032 Caen cedex France.

²Laboratoire SESO, UMR CNRS 6510, Institut de Chimie, Université de Rennes I, 263 Av. du Général Leclerc, F-35042 Rennes Cedex France.

³Groupe de Recherche en Informatique, Image et Instrumentation de Caen (GREYC) CNRS UMR 6072 Université de Caen (UFR des Sciences) et ISMRA Caen France.

⁴IFREMER, UMR 100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Site Expérimental d'Argenton, Presqu'île du Vivier, 29840 Argenton en Landunvez France

* To whom correspondence should be addressed. E-Mail: joel.henry@unicaen.fr

tel. (+33)2 31 56 55 96

fax (+33)2 31 56 43 56

Short title : Ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*.

For more than six decades, several studies have shown that genital products to entering the mantle cavity via the incurrent siphon, initiate in oyster, strong and rhythmic contractions of the adductor muscle (AM). In order to characterize the regulatory peptides capable of triggering AM contractions, we focused on the identification of putative myotropic peptides from genital products. Two experimental approaches were developed. The first one, based on a mass spectrometry screening of the male genital products, led to the identification of the tetrapeptide APGWamide. This neuropeptide was also detected in the seminal secretions of the cephalopod *Sepia officinalis*. In this species, APGWamide is directly involved in the oocyte transport. In oyster, *in vitro* bioassay demonstrated that APGWamide modulates the AM contractions that ensure the release of oocytes in the external medium. Exposure of oysters to a physiological concentration of APGWamide triggered repetitive shell closures. The second experimental approach was based on the monitoring of HPLC purification by a myotropic bioassay using the cuttlefish oviduct contractions as a target. The successive purification steps of the acidic extraction of ovaries from mature female oysters, led to the characterization of the hexapeptide PIESVD. When applied to mature female oysters, this peptide triggered the increase of shell closure frequency. The activity of these two regulatory peptides is the first experimental evidence of a peptidergic control of egg-laying in oyster. APGWamide and PIESVD could be used, in commercial and experimental hatcheries, for the identification of mature females to be selected for *in vitro* fertilization.

Introduction

In the oyster *Crassostrea gigas*, egg-laying is a complex behavior described by O Foighil and Taylor [1] as “trans-ctenidial ovulation” (TCO). This behavior involves the coordinated activity of the mantle margins, gills and adductor muscle (AM) and is exclusively restricted to the spawning females. The regulation of TCO by environmental factors has been well described [2-4]. To date, no regulatory peptides involved in TCO have been identified in oysters, although several studies demonstrate that the addition of a sperm suspension to the water medium triggers egg-laying in mature oysters [5-7]. Furthermore, in most of the observed cases, the release of male products precedes the induction of egg-laying in females. Recently, Rice *et al* [8] identified from *C. virginica* an intrinsic sperm membrane protein involved in the regulation of egg-laying. The addition of female genital products of the same specie also triggered spawning from mature females. In the cuttlefish, *Sepia officinalis*, the ovarian peptide content involved in the egg-laying regulation was investigated by a myotropic bioassay, using oviduct contractions as an endpoint [9-11]. This bioassay was also used to identify neuropeptides regulating the same egg-laying steps in *S. officinalis* [12, 13]. In both *C. gigas* and *S. officinalis*, these steps are clearly stereotyped. In oysters, the transport of oocytes through the genital tract is performed by the ciliary motion of the epithelium [7, 14]. Oocytes are released and stored in the exhalent chamber. Then, they are forced through the gills to the inhalent chamber by highly characteristic AM contractions [6, 15]. Finally, oocytes are released into the external medium, by the AM contractions, through a small spawning window opened between the inhalent chamber mantle margins [5-8, 15-18]. This activity is thought to result in a relatively wide and uniform distribution of oocytes, improving the chances of fertilization. In the cuttlefish, the first step of egg-laying is the release by the ovary of full-grown oocytes (FGO) into the genital coelom [19]. During this period, ovarian factors released by FGO inhibit the oviducal contractions and lead to the accumulation of FGO in the genital coelom [11, 20]. After mating, oocytes transport is performed through the oviduct by the whole genital tract (WGT) contractions which are modulated by neuro- and ovarian peptides [9, 10, 12, 13]. Oocytes then received two gelatinous envelopes and are fertilized by spermatozoas stored in the female’s copulatory pouch [21, 22]. Finally, the eggs are attached to a substrate until hatching. In both species studied, muscle contractions are responsible for the release of oocytes: AM contractions in oyster and WGT contractions in cuttlefish. In the last six decades, numerous studies have shown that oysters initiate a series of strong and rhythmic contractions of the AM in

response to genital products entering the mantle cavity via the incurrent siphon [5-8, 23]. In order to characterize myotropic peptides from male and female genital products in oyster, we developed two experimental approaches. The first one was based on the peptidomic analysis performed on male genital products. The peptidome was screened by means of mass spectrometry using specific sequence libraries. The second experimental approach consisted of the HPLC purification of putative ovarian peptides monitored by the cuttlefish oviduct contractions myotropic bioassay, which is a reliable and specific biological test.

MATERIALS AND METHODS

Animals. All the cuttlefish were trapped in the Baie of Seine between January and June. They were maintained in 1000-liter outflow tanks at 15°C +/- 1°C at the Marine Station of Luc sur Mer (University of Caen, France) under a natural photoperiod. Oysters come from Aber Benoît (Bretagne, France) and Saint Vaast la Hougue (Normandie, France).

MicroLC-ESI-MS/MS analysis. Analyses were performed with a HPLC Surveyor chain connected on-line to an orthogonal electrospray source (Deca XP MS-n Thermofinnigan) operated in the positive electrospray ionization mode (ESI+). The ions were focused into an ion trap, capable of MS and MS/MS analyses. The mass spectra were acquired during 35 ms from *m/z* 300 to 2000. The capillary exit of the electrospray ion source was set at 70 V, the octapole at 3 V and the capillary temperature at 200°C. A counter flow of nitrogen was used as nebulizing gas. An Xcalibur data system was used to acquire the data, which were further processed with Turbo Sequest data system. The organic fraction of each extract was resuspended in 10 µL of 0.1% formic acid in water and injected onto a C18 Thermo Hypersil column (50 x 0.5mm, 3µm) with an acetonitrile linear gradient of 3% per minute in formic acid 0.1%, from 2 to 60%. A split ratio of 30: 1 was used to perfuse the column at a flow rate of 10µL/min. HPLC column was rinsed with 90% acetonitrile in 0.1% formic acid between each injection. The MS data was acquired in scan mode considering the positive ion signal.

In vitro bioassay. The myotropic bioassay was performed with several contractile organs: the WGT, the penis and the vas deferens from *S. officinalis* and the AM from *C. gigas*. Each organ was suspended from a displacement transducer (Phymep, Bionic Instruments) connected to a computer controlling the recorder and the DATAC (Dispositif d'Acquisition et de Traitement Automatique de la Contraction). The muscle chamber was perfused at the flow rate of 0.5 mL/min with synthetic seawater (Instant Ocean) containing 1 mM glucose and maintained at 15°C. The samples were injected in the perfusing flow using a three-way valve in order to avoid mechanical and thermal stress. The flow of fractions into the muscle chamber was traced by addition of phenol red.

In vivo bioassay: shell closure frequency. Oysters were placed at 4°C out of water the night before the bioassay. During the experiment, each oyster was placed at 22°C +/- 1°C, in a 450 mL tank containing an algal cocktail (25% *Tetraselmis* sp., 25% *T. iso*, 25% *Chaetoceros*

calcitrans and 25% *Skeletonema costatum*) adjusted to 30 cells per micro liter. Water was circulated in each tank to ensure opening of the valves and filtration by the animals. Following addition of sample, the shell closure frequency was visually monitored during the subsequent assay period (10 minutes). Shell movements during female spawning period are so typical that they cannot be mistaken from any other type of muscular activity (Galtsoff 1938a).

Synthetic peptides. Peptides were synthesized using classical Fmoc (N-[9-fluorenyl]methoxycarbonyl) solid-phase chemistry and a commercially available automated peptide synthesizer by coupling Fmoc- α -amino acids on preloaded Wang resin. Protected amino acids were coupled by *in situ* activation with diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt). *N*^α-Fmoc deprotection was performed with 20% piperidine in DMF. Side chain deprotection and cleavage of peptides from the solid support was performed by treatment with reagent B (88% trifluoroacetic acid (TFA)/ 5% Phenol/ 5% water/ 2 % TIS) for 2h at 20°C [24]. Peptides were purified by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) using a Waters semi-preparative HPLC system on an X Terra 10 μ m column (300x19mm). The elution was achieved with a linear gradient of aqueous 0.1% TFA (A) and 0.08% TFA in acetonitrile (B) at a flow rate of 10 mL/min with photodiode array detection at 210-440 nm. The purity of each peptide was controlled by analytical RP-HPLC on the same instrument with a X Terra 5 μ m column (250x4.6mm) using a linear gradient of 0.1% TFA in water and acetonitrile containing 0.08% TFA at a flow rate of 1mL/min. Finally, integrity of each peptide was assessed by microLC-ESI-MS/MS analysis.

Sperm peptides

Recovery of material from tissues. Organs were harvested as follows: for *S. officinalis*: central nervous system (supra-oesophageal mass, sub-oesophageal mass, optic lobes) and genital tract (vas deferens, seminal vesicles, penis, spermatophores dissected from mature male); for *C. gigas*: oocytes, mantle edge, gills, labial palpe, smooth muscle and striated muscle of the AM dissected from mature males and females. For microLC-ESI-MS/MS analysis, 5 animal-equivalent of each organ studied, 80 animal-equivalent of visceral ganglions, 150 g of oocytes and 40 g of sperm from *C. gigas* were successively homogenized in 10 volumes of 0.1 N HCl at 100°C and centrifuged 30 minutes at 35 000 x g at 4°C. The supernatants were concentrated using Chromafix C18 cartridges. In *S. officinalis*, the spermatophores (complex tubular system containing spermatozoa) were removed from the spermatophoric sacs or Needham's

organs and separated into two aliquots. The first aliquot was washed with artificial SW (Instant Ocean) in order to remove seminal secretions. The two aliquots were then extracted as described above.

Identification of regulatory peptides from male genital products. A specific fasta library containing most invertebrates regulatory peptides was created to enable the identification of peptides by MS/MS. Screenings were performed using the Sequest software (ThermoFinnigan) which can compare experimental and theoretical MS/MS spectra generated from fasta libraries. For each peptide, the amino acid sequence was definitely confirmed by the comparison between synthetic and endogenous peptide MS/MS spectra.

Bioactivity of APGWamide. Aliquots of synthetic APGWamide (Sigma Aldrich) ranging from 10^{-8} to 10^{-6} M were tested using the *in vitro* and *in vivo* bioassays in order to obtain qualitative and quantitative data associated with its myotropic activity.

APGWamide oysters in vivo bioassay. Two bioassays were performed with the APGWamide. The first bioassay was performed using 15 oysters and 10^{-7} M APGWamide for the first sample and 26 oysters and 10^{-6} M APGWamide for the second sample. The second bioassay was performed with 200 oysters and 10^{-6} M APGWamide. For each bioassay, the shell closure events were recorded during 10 minutes after injection of the peptide. The experiment was followed by the sacrifice of the animals for sex determination.

Tissue mapping by microLC-ESI-MS/MS. The occurrence of peptides in the samples was established by the MS/MS data of the m/z 429.5 (APGWa), 459.6 (TPGWa), 486.7 (KPGWa), 514.7 (TPGWa) and 261.2 (GWa). This method detected small amounts of peptide. Peptide identifications were obtained from the comparison of MS/MS spectra of the selected m/z with the synthetic peptides.

Ovarian peptides

Recovery of material from tissues. For HPLC purification and microLC-ESI-MS/MS analysis, 400 g of oyster ovaries were homogenized in 4 liters of 0.1 N HCl at 100°C and centrifuged for 30 minutes at 35,000 × g at 4°C. Supernatants were concentrated on Chromafix C18 cartridges. Moreover, the female genital products released by 5 oysters were extracted in 0.1 N HCl at 100°C, centrifuged and concentrated on Chromafix C18 cartridges.

UV-HPLC purification. HPLC analyses were performed with a Varian 4050 integrator connected to a Varian 9012 solvent delivery system and a Varian 9050 wavelength UV-VIS detector set at 214 nm. The ovary extract was resuspended in 0.1% formic acid in water and injected onto a Nucleodur C18 column (250 x 10 mm, 20 µm) with an acetonitrile linear gradient of 1.33% per minute in 0.1% formic acid at a flow rate of 5 mL/min. A bioactive fraction eluted at 29 minutes and was injected onto a Nucleosil C18 column (250 x 3 mm, 7 µm) with an acetonitrile linear gradient of 1.05% per minute in 10 mM ammonium acetate at a flow rate of 1 mL/min. The third purification step was performed on a Supelcosil C18 column (150 x 4.6 mm, 3 µm) with an acetonitrile linear gradient of 1.33% per minute in 0.1% formic acid at a flow rate of 1 mL/min. Finally, the last step of purification was performed in LC-ESI-MS/MS on a Nucleosil C18 column (120 x 4 mm, 3 µm) with an acetonitrile linear gradient of 0.66% per minute in 0.1% formic acid at a flow rate of 600 µL/min. A split ratio of 100:1 was used to perfuse the electrospray source at a flow rate of 10 µL/min. One minute fractions of each step were collected, dried and stored at 4°C until use.

Amino acid sequencing. Fasta libraries were generated with the software Aaseq 5.0 (Zanuttini and Henry, University of Caen). Screenings were performed using Sequest software (ThermoFinnigan) which is able to compare experimental MS/MS spectra and theoretical MS/MS spectra generated from fasta libraries. The MS/MS spectrum of the amino acid sequence was then checked using MS-Tag and MS-Product (Protein Prospector 3.4.1, University of California). Finally, primary structures were verified by Edman degradation. N-terminal sequence analyses were performed using an Applied Biosystems Model 477 A protein sequencer and amino acid phenylthiohydantoin derivatives were identified and quantified on-line with a Model 120A HPLC system, as recommended by the manufacturer.

PIESVD oysters in vivo bioassay. The shell closure bioassay was performed in the middle of June with oysters from Saint Vaast la Hougue, matured in SMEL (Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral, Blainville). The first bioassay was performed with PIESVD 10⁻⁷ M on a sample of 8 oysters and the second on a sample of 39 oysters with PIESVD 10⁻⁶ M. Shell closure events were visually recorded during 10 minutes. The experiment was followed by the sacrifice of animals for sex determination.

Statistics. Significant differences between treatments were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) using the Statistica software. The method used to discriminate among the means was the Student Newman Keuls procedure. Results were deemed significant for $p < 0.05$.

RESULTS

Regulatory peptides from sperm

Detection of APGWamide by LC-ESI-MS/MS in male genital products of both studied species. Putative regulatory peptides were investigated by Sequest software using the sequence library of invertebrate regulatory peptides. This approach led to the identification of APGWamide in male genital products of both *S. officinalis* and *C. gigas*. The comparison of MS/MS data obtained from synthetic and endogenic peptides confirmed the amino acid sequence (Fig. 1). Furthermore, in the cuttlefish, APGWamide was detected in the seminal fluid coating of spermatophores but not in washed spermatophores demonstrating that APGWamide associated with the seminal fluid.

*Bioactivity of APGWamide on *S. officinalis* male genital tract.* For concentrations ranging from 10^{-8} to 10^{-6} M, APGWamide had no effect on penis and proximal vas deferens contractions.

*Bioactivity of APGWamide on *S. officinalis* female WGT.* The synthetic peptide was tested on the WGT of mature and immature females. From a threshold at 10^{-7} M, APGWamide inhibited the contraction of this tract, decreasing the amplitude and the intensity of the contractions in mature females (data not shown). This biological activity was previously described in [12]. In immature females, APGWamide had no effect on WGT contractions.

Bioactivity of APGWamide on oyster AM. The synthetic peptide was tested on the AM of mature female oysters. From 10^{-7} M, APGWamide decreased the intensity of the contractions. In a dose-response experiment, the increase of concentration appeared to be correlated with the increase of biological activity (Fig. 2).

Shell closure in vivo biological assay. Egg-laying was never triggered during experiments. For the first bioassay, oysters were exposed to 10^{-7} M or 10^{-6} M APGWamide and shell closure events were recorded during 10 minutes. After dissection, we noticed that APGWamide increased shell closure frequency from a threshold of 10^{-7} M on mature females. This peptide had no significant effect on mature males and immature oysters (Fig. 3). A second experiment was performed by exposing 200 oysters to 10^{-6} M APGWamide. Shell closures were recorded during 10 minutes. Shell closures (≥ 4) were displayed by 41% of oysters. Sex was confirmed after dissection. APGWamide induced shell closure events in 6% of immature oysters, 30% of males and 67% of females. Results are summarized in Figure 4.

APGWa-RPs tissue-mapping by microLC-ESI-MS/MS. Standard MS/MS spectra were acquired from the injection of 1 ng of each of the APGWamide-related-peptides (APGWa-RPs). These spectra were used for the identification of APGWa-RPs in the tissues of *S. officinalis* and *C. gigas*. Table 1 summarizes the results obtained for the tissue-mapping performed in the male genital tract and central nervous system (CNS) of *S. officinalis*. In the male genital tract, APGWa was detected in the spermatophoric glands and TPGWa in the vas deferens. In the CNS, APGWa, TPGWa and GWa were detected in the optic lobes, supra- and sub-oesophageal mass. No APGWamide-related peptides were detected in the hemolymph. Table 2 summarizes the results obtained for the tissue-mapping performed in males and females of *C. gigas*. Only APGWamide was detected in the sperm and visceral ganglions. APGWa-RPs were not detected in somatic tissues.

Ovarian regulatory factors.

HPLC purification. The purification of oyster oocytes extract was monitored by the cuttlefish oviduct bioassay. After the first purification step, a myotropic activity was detected in the 28-29 min fraction. After two further steps of purification, the activity was concentrated in an apparently pure peak with a retention time of 17-18 min (Fig 5). The last purification step was performed in LC-ESI-MS/MS.

LC-ESI-MS/MS purification. The 17-18 min HPLC fraction, containing the myotropic activity was submitted to LC-ESI-MS/MS purification. The spectrum revealed a pure peak at m/z 659 \pm 0.5 (Fig 6). This peak was concentrated to be submitted to Edman degradation.

Amino-acid sequence determination. Aaseq 5.0 software was used to build a sequence library ranging from 657 to 660 Da. The primary sequence of the peptide was partially determined by Sequest software, MS-Tag and MS-Product: PI/LESVD. The primary sequence of this peptide was definitively established by Edman degradation as PIESVD and checked by MS/MS analysis of the synthetic peptide.

Bioactivity of synthetic peptide. Increasing concentrations of synthetic PIESVD were tested on the WGT of cuttlefish. From a threshold of 10^{-6} M, the peptide decreased the intensity of the contractions (Fig. 7).

In vivo bioassay: shell closure frequency. Oysters were exposed to increasing concentrations of synthetic PIESV. Shell closure frequency was visually recorded. From a threshold at 10^{-6} M, PIESVD induced a significant increase of shell closure frequency compared to the control in the population of mature females. The peptide had no significant effect on mature males (Fig. 8).

Tissue-mapping by microLC-ESI-MS/MS. Mapping was performed in MS/MS mode based on the m/z 659. Analysis performed in the male genital tract, hemolymph and nervous system (visceral ganglions) did not reveal any trace of this peptide. PIESVD was restricted to the ovary. Furthermore, the analysis of the genital products of spawning females clearly established the occurrence of a release of PIESVD during egg-laying.

Discussion

Two regulatory peptides isolated from *C. gigas* were identified by mean of mass spectrometry screening and RP-HPLC purification and provide the first experimental evidence of a peptidergic control of egg-laying in oyster. The first approach, based on a peptidomic analysis, led to the identification of the tetrapeptide APGWamide in male genital products of *C. gigas*. Subsequently, this neuropeptide was detected in seminal secretions of the cuttlefish *S. officinalis*. MicroLC-ESI-MS/MS tissue mapping demonstrated that this peptide is located in the CNS and male genital tract in both oyster and cuttlefish, as well as, according to previous studies, in gastropods, bivalves and cephalopods [25-30]. In cuttlefish, APGWamide is directly involved in oocyte transport [12], whereas in gastropods, APGWamide detected in the male genital tract modulates the male mating behavior [29, 31]. In *S. officinalis*, *in vitro* bioassays clearly demonstrate that APGWamide has no effect on penis and vas deferens contractions. The APGWamide detected in seminal fluid is deposited with spermatophores in the female copulatory pouch during mating. This pouch contains seminal receptacles surrounded by muscle fibres which could be involved in the storage of spermatophores [22] and may be modulated by APGWamide. We speculate that the APGWamide detected in the oyster CNS (visceral ganglions) could target the AM of mature females, as is described in the sea scallop [25]. Bioassays performed on the AM, which is responsible for the release of oocytes into the external medium, demonstrated that APGWamide induces AM contractions from 10^{-7} M. When oysters were exposed *in vivo*, a physiological concentration of APGWamide triggered repetitive shell closures. The *in vivo* bioassay also demonstrated that a majority of mature females appear to be sensitive to APGWamide (67% of females compared to only 30% of males). Moreover, when shell closures were observed, the frequency was higher in females. Contractions observed in the male population could be a consequence of the successive hermaphroditism of *C. gigas* [18, 32]. Galtsoff demonstrated that although sex change was characterized by modifications in the spawning behavior, a developed female reaction could appear in sex-reversed males [18]. Furthermore, we suspect that the APGWamide detected in the visceral ganglions targets longitudinal and circular muscle fibers of the genital channel [7]. A similar observation was made in the sea scallop, where APGWamide immunoreactivity was found around the gonoduct [25]. In this species, similar investigations led to the detection of 5-HT immunoreactivity around this channel [33]. *In vivo* experiments clearly demonstrated the involvement of 5-HT in the enhancement of oocytes release in bivalves [34-40]. Thus, we

speculate that APGWamide and 5-HT could be associated in the regulation of oocyte transport through this genital channel. APGWamide could also be involved in the regulation of egg-laying through a second pathway. APGWamide released with male genital products, and detected by mean of mass spectrometry screening, is suspected to target the AM of mature oysters through a pheromonal pathway. However, the effective concentration of 10^{-7} M established with synthetic peptide is much higher than those observed for other water-borne peptides identified in some invertebrates [9-11, 41-45]. Yet, it is similar to that observed in the polychaete worm *Nereis* for the water-borne peptide nereithione involved in male nuptial behavior and sperm release [46, 47]. Similarly, the proximity and high density of mature adults could lead to high concentrations of genital products in the environment surrounding mature females and participate in the regulation of egg-laying in oysters. Hence, the release of oocytes is probably induced by the action of multiple regulatory factors and APGWamide is only one of them. The results from this study using tissue mapping as well as biological activities as endpoints, clearly establish the involvement of APGWamide in the regulation of physiological mechanisms related to egg-laying in *C. gigas* and *S. officinalis*. In addition to sperm-linked regulatory peptides, we also focused on the identification of ovarian regulatory peptides, based on regulatory pathways established in the cuttlefish [9, 10, 45]. Following successive steps of UV-HPLC and microLC-ESI-MS/MS purification, a new hexapeptide was characterized from the ovary of mature females based on its ability to modulate the cuttlefish oviduct contractions. The primary structure of this ovarian peptide was established by MS/MS analysis and Edman degradation as PIESVD. MicroLC-ESI-MS/MS tissue mapping revealed that this peptide was restricted to the ovary. The occurrence of a release with female genital products in seawater was clearly established by MS/MS analysis. Furthermore, when synthetic PIESVD was added to a rearing tank containing a population of oysters, shell closure frequency increases from a concentration of 10^{-6} M. This biological activity appears to be restricted to mature females. Thus, we speculate that PIESVD triggers AM contractions through two pathways: (i) when released with oocytes in the exhalant chamber, this peptide targets the AM and ensures the release of oocytes into the external medium, and (ii) through a pheromonal pathway, the PIESVD released by spawning females with genital products could induce the egg-laying behaviour of other mature females in the immediate vicinity. Although the activity threshold of PIESVD is relatively high, the proximity and density of mature oyster populations is consistent with pheromonal activity. The biological activity of PIESVD on the cuttlefish WGT demonstrates that some ovarian regulatory peptides could be highly conserved between cephalopods and

bivalves and probably among the seven molluscan classes. Indeed, concerning oysters, *in vitro* bioassays are not reliable enough to monitor the purification of a peptide and *in vivo* bioassays require large quantities of biological material. Thus, the purification and characterization of regulatory peptides appears to be possible using interspecies bioassays. Finally, APGWamide and PIESVD could be used in commercial as well as in experimental hatcheries, for non-destructive sex and maturity stage determination in oysters. Statistical analysis clearly established that the main targets of APGWamide and PIESVD are the mature females in which they induce an important increase of shell closures. APGWamide and PIESVD, could be used to select mature females in order to provide pure gametes for use in genetic manipulation and *in vitro* fertilization.

Acknowledgments

We thank Jean-Marc Nicolas and Darlene Mossman for correcting the English of the manuscript, Didier Rousseville the captain of the professional fishing boat “Père Arthur” and his crew for help in providing cuttlefish as well as Laurence Lafaitteur. We thank Aude Houdan, Bertrand Le Roy, Ian Probert and Algobank for microalgal cultures and Jean Louis Blain, Bertrand Bouchaud and Stéphane Pacary from the SMEL for maturing oysters. This work was supported by the Conseil Regional de Basse Normandie and IFREMER.

Table 1. Tissue mapping of APGWamide-RPs in male *Sepia officinalis*.

Table 2. Tissue mapping of APGWamide-RPs in *Crassostrea gigas*.

FIG. 1. MS/MS spectra of synthetic APGWa (A) and endogenic APGWa detected in male products of *Crassostrea gigas* (B) and *Sepia officinalis* (C).

FIG. 2. Dose dependent APGWamide-induced contractions of the adductor muscle of *Crassostrea gigas*.

FIG. 3. Shell closure *in vivo* bioassay. APGWamide-induced contraction of the female adductor muscle of *Crassostrea gigas* at a threshold of 10^{-7} M. Letters indicate a significant difference between treatments (mean \pm S.D.; ANOVA, $p < 0.05$).

FIG. 4. Shell closure *in vivo* bioassay performed with APGWamide 10^{-6} M. APGWamide triggers more shell closures in mature females than in males or immature oysters.

FIG. 5. First (A), second (B) and third (C) purification steps of oyster oocyte extract. Myotropic fractions are indicated in black.

FIG. 6. ESI-MS spectrum of the myotropic HPLC fraction obtained after three steps of purification (A). MS/MS spectra of the m/z 659 from oyster oocytes (B).

FIG. 7. PIESVD-induced contractions of the cuttlefish whole genital tract at a threshold of 10^{-6} M.

FIG. 8. PIESVD-induced contractions of oyster adductor muscle at a threshold of 10^{-6} M. Letters indicate significant difference between treatments (mean \pm S.D.; ANOVA, $p < 0.05$).

Occurrence of:	APGWa	RPGWa	KPGWa	TPGWa	GWa
Sub-oesophageal mass	d*	nd	nd	d	d
Supra-oesophageal mass	d	nd	nd	d	d
Optic lobes	d	nd	nd	d	d
Male genital tract	d	nd	nd	d	nd
Spermatophores	nd*	nd	nd	nd	nd
Seminal fluid	d	nd	nd	nd	nd
Penis	nd	nd	nd	nd	nd
Seminal vesicles	d	nd	nd	nd	nd
Vas deferens	nd	nd	nd	d	nd

nd*: not detected
d*: detected

Table 1.

Occurrence of:	APGWa	RPGWa	KPGWa	TPGWa	GWa
Male and female gills	nd*	nd	nd	nd	nd
Male and female mantle edge	nd	nd	nd	nd	nd
Male and female smooth muscle	nd	nd	nd	nd	nd
Male and female striated muscle	nd	nd	nd	nd	nd
Male and female labial palps	nd	nd	nd	nd	nd
Male and female visceral ganglions	d*	nd	nd	nd	nd
Female genital products	nd	nd	nd	nd	nd
Male genital products	d	nd	nd	nd	nd

nd*: not detected
d*: detected

Table 2.

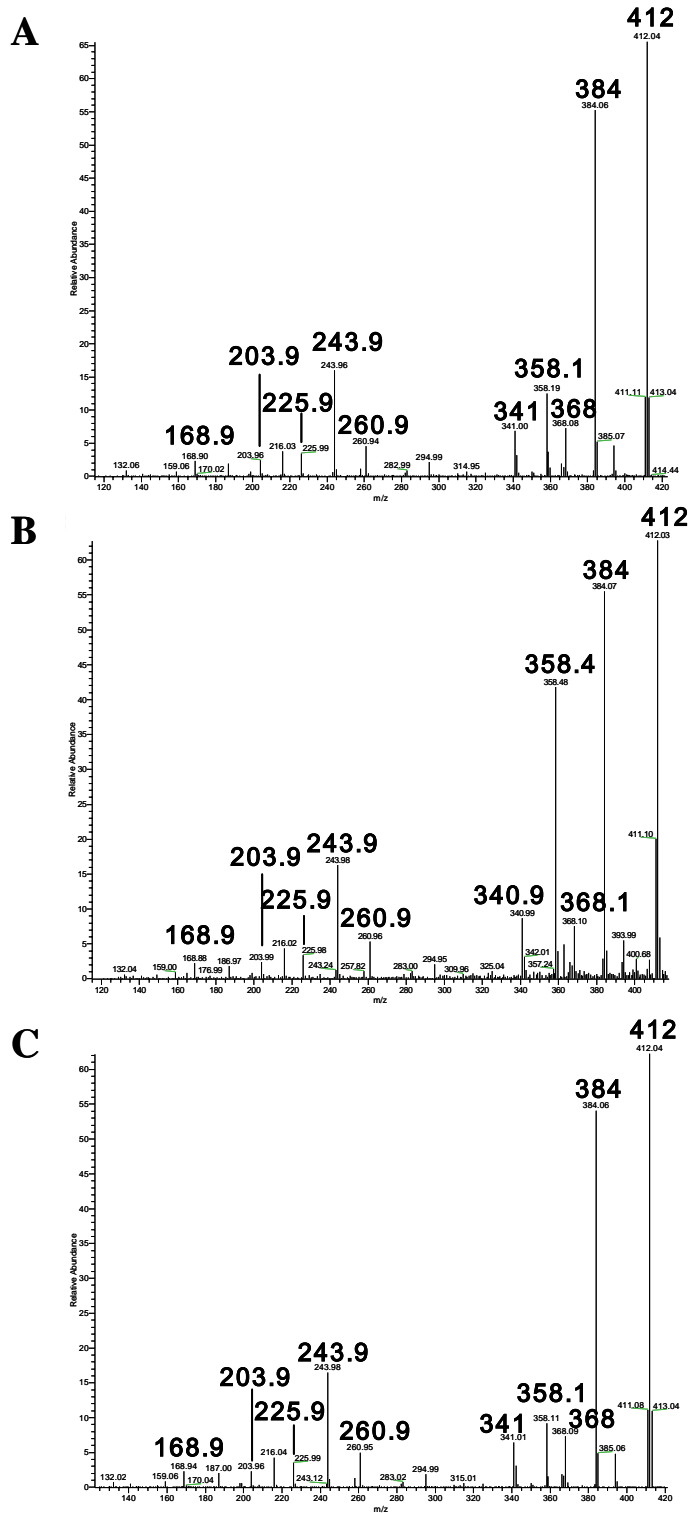


FIG. 1.

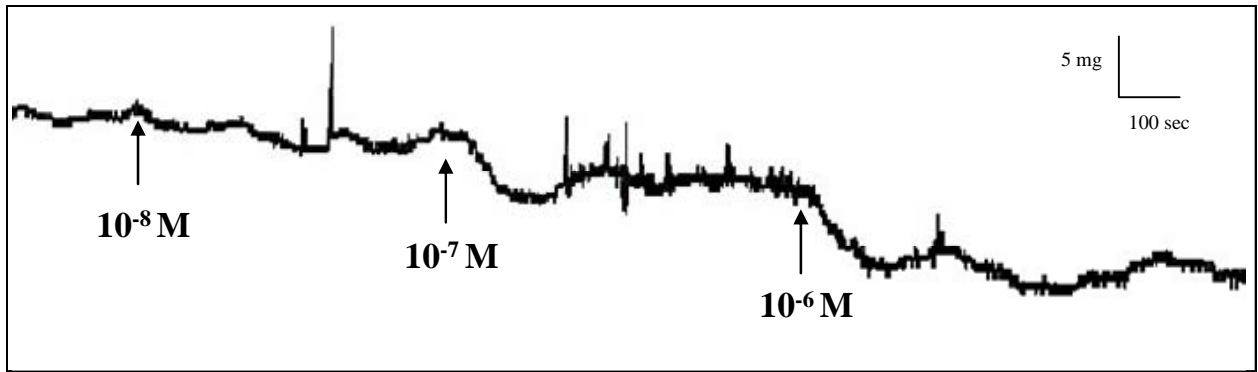


FIG. 2.

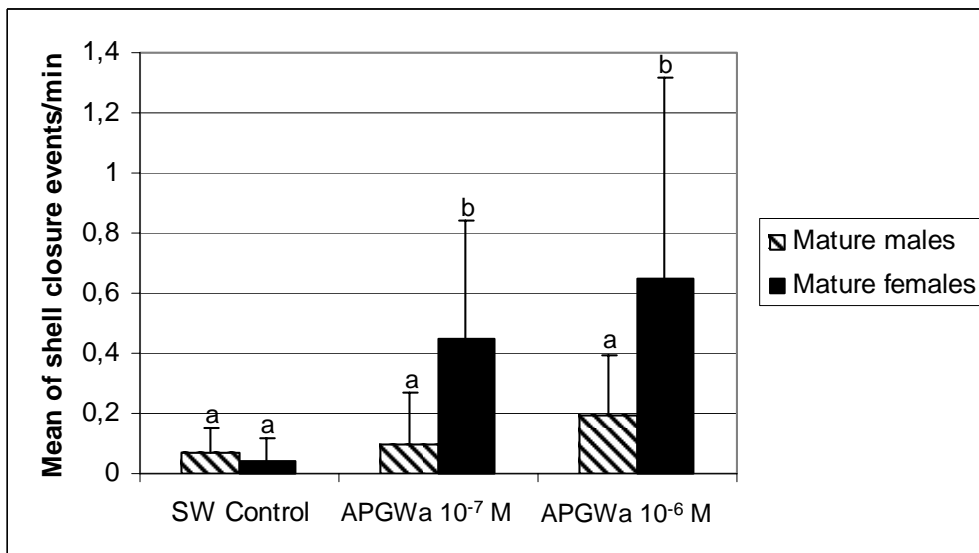


FIG. 3.

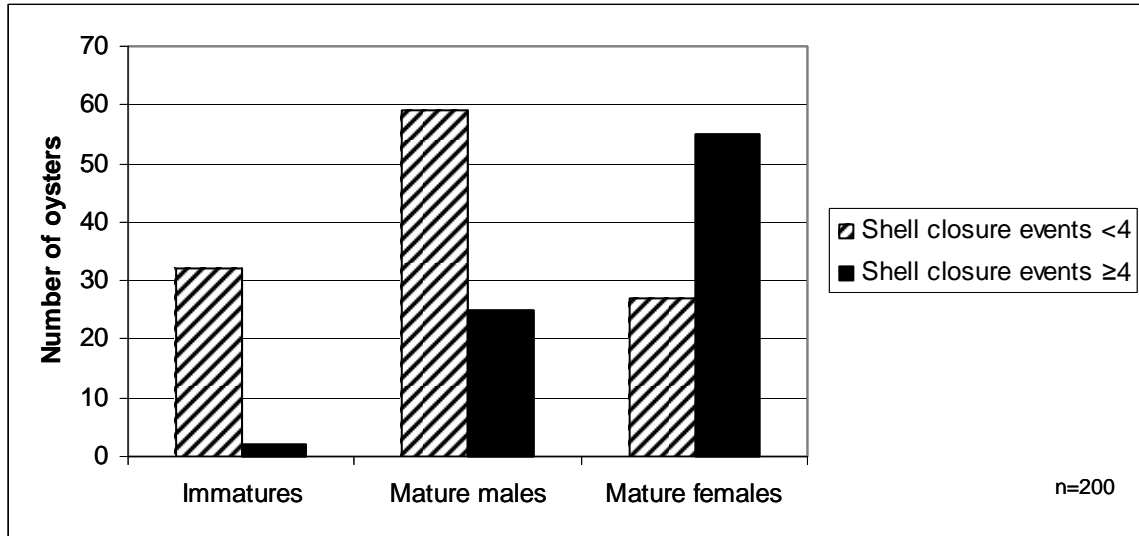


FIG. 4.

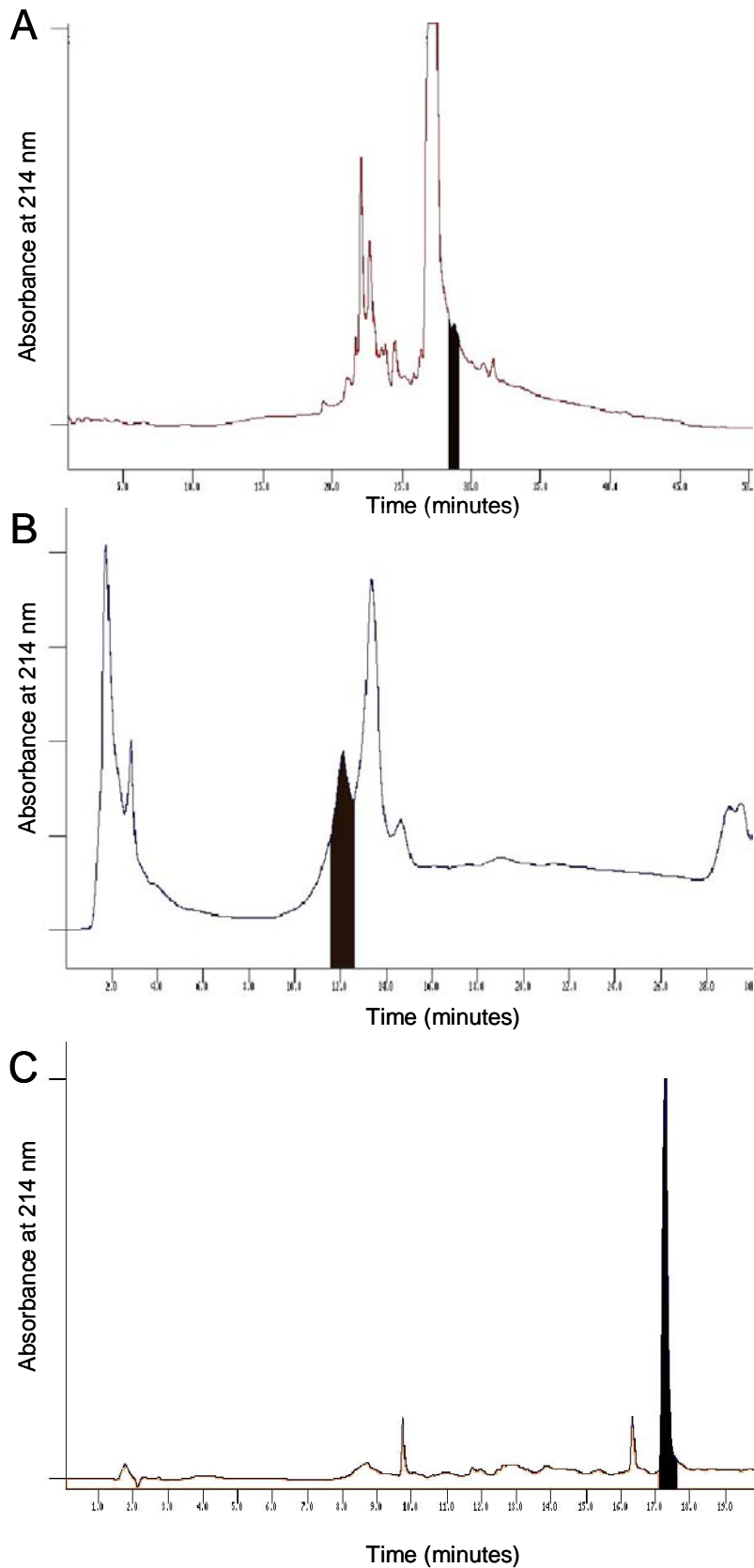


FIG. 5.

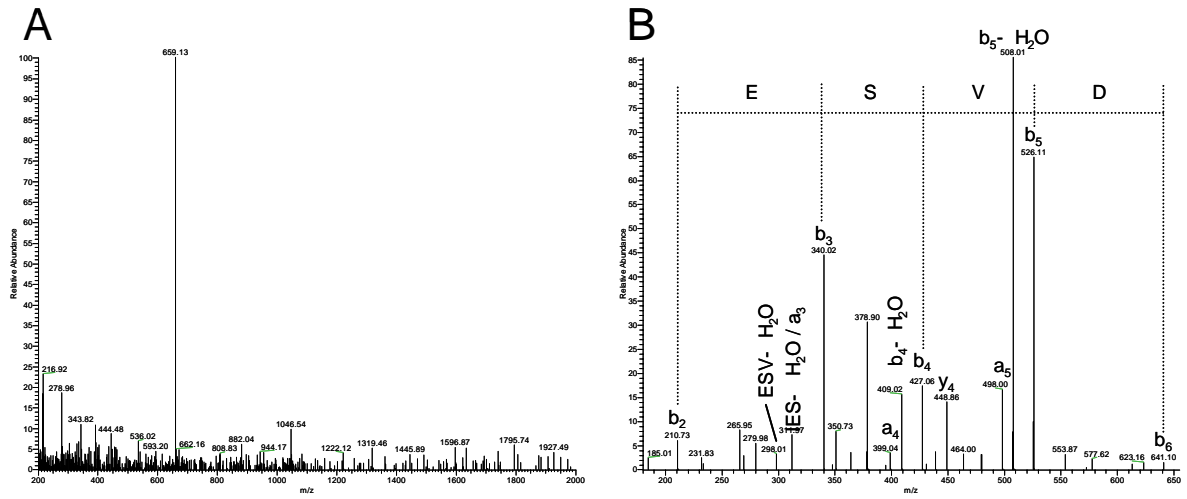


FIG. 6.

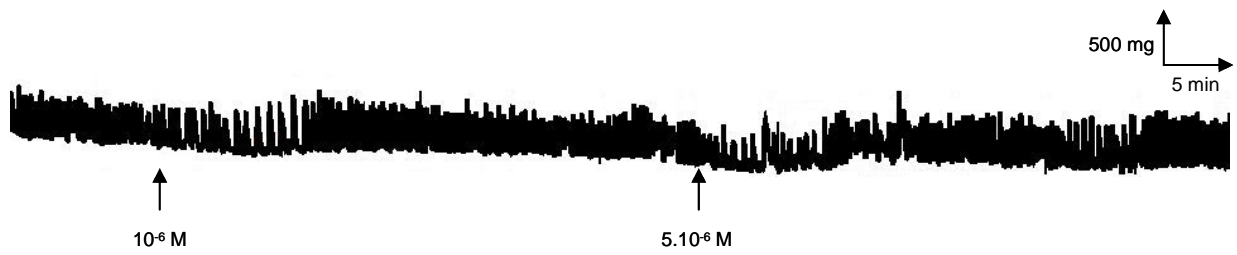


FIG. 7.

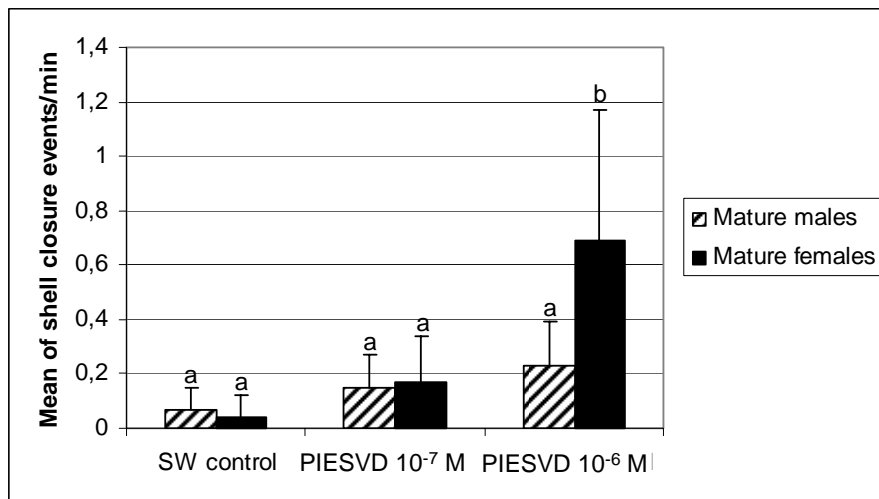


FIG. 8.

1. O Foighil D, Taylor D. Evolution of parental care and ovulation behavior in oysters. *Mol Phylogenet Evol* 2000; 15: 301-313.
2. Deslous-Paoli J, Heral M, Berthome J, Razet D, Garnier J. Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thunberg dans le bassin de Marennes-Oleron en 1979 et 1981 : aspects biochimiques et énergétiques. *Rev Trav Inst Pêches marit* 1982; 45: 319-327.
3. Heral M, Deslous-Paoli J, Prou J. Influence du climat sur le recrutement et sur la production d'huîtres cultivées (*C. angulata* et *C. gigas*) dans le bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis* 1986; 15: 193-207.
4. Maurer D, Borel M. Croissance, engraissement et cycle sexuel de *C. gigas* dans le bassin d'Arcachon: comparaison de huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis* 1986; 15: 217-228.
5. Galtsoff P. Physiology of reproduction of *Ostrea virginica* II. Stimulation of spawning in the female oyster. *Biol Bull* 1938b; 75: 286-307.
6. Nelson T, Allison J. On the nature and action of diantlin; a new hormone-like substance carried by the spermatozoa of the oyster. *J Exp Zool* 1940; 85: 299-338.
7. Galtsoff P. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish Bull U.S.*; 1964.
8. Rice P, Ray SM, Painter SD, Nagle GT. An intrinsic membrane protein in oyster sperm stimulates spawning behaviors in *Crassostrea virginica*: implications for aquaculture. *J Shellfish Res* 2002; 21: 715-718.
9. Zatylny C, Gagnon J, Boucaud-Camou E, J H. ILME: a waterborne pheromonal peptide released by the eggs of *Sepia officinalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000b; 275: 217-222.
10. Zatylny C, Gagnon J, Boucaud-Camou E, Henry J. The SepOvotropin: a new ovarian peptide regulating oocyte transport in *Sepia officinalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000c; 276: 1013-1018.
11. Bernay B, Gagnon J, Henry J. Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 215-222.
12. Henry J, Favrel P, Boucaud-Camou E. Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the motility of the mature oviduct in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Peptides* 1997; 18: 1469-1474.
13. Henry J, Zatylny C, Boucaud-Camou E. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* 1999; 20: 1061-1070.
14. Hoek P. Researches on the generative organs of the oyster (*O. edulis*). *Bulletin of the U.S. Fish Commission* 1883; 2: 343-345.
15. Galtsoff P. Physiology of reproduction of *Ostrea virginica* I. Spawning reactions of the female and male. *Biol Bull* 1938a; 74: 461-486.
16. Nelson T. Aids to successful oyster culture. I. Procuring the seed. (*N J Agr Exp Sta ed. Vol. Bull 351*) 1921.
17. Galtsoff P. The role of chemical stimulation in the spawning reactions of *Ostrea virginica* and *Ostrea gigas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1930a; 16: 555-559.
18. Galtsoff P. Physiology of reproduction in molluscs. *Am Zoologist* 1961; 1: 273-289.
19. Dhainaut A, Richard A. Vitellogenèse chez les céphalopodes décapodes. Evolution de l'ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale. *Arch Anat Micr Morph Exp* 1976; 65: 183-208.
20. Zatylny C, Durantou F, Boucaud-Camou E, Henry J. Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying. *Mol Reprod Dev* 2000a; 55: 182-188.

21. Boletsky S. *Sepia officinalis*. In: Boyle P (ed.) Cephalopods life cycles, vol. 1. London: Academic Press; 1983: 31-52.
22. Hanlon R, Ament S, Gabr H. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). Mar Biol 1999; 134: 719-728.
23. Galtsoff P. Spawning reactions of three species of oysters. J Wash Acad Sci 1932; 22: 65-69.
24. Sole N, Barany G. Optimization of solid-phase synthesis of [Ala⁸]-dynorphin A. J. Org. Chem. 1992; 57: 5399-5403.
25. Smith S, Nason J, Croll R. Detection of APGWamide-like immunoreactivity in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. Neuropeptides 1997; 31: 155-165.
26. Smit A, Jimenez C, Dirks R, Croll R, Geraerts W. Characterization of a cDNA clone encoding multiple copies of the neuropeptide APGWamide in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. J Neurosci 1992; 12: 1709-1715.
27. Favrel P, Mathieu M. Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of Ala-Pro-Gly-Trp amide-related neuropeptides from the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. Neurosci Lett 1996; 205: 210-214.
28. Henry J, Zatylny C. Identification and tissue mapping of APGWamide-related peptides in *Sepia officinalis* using LC-ESI-MS/MS. Peptides 2002; 23: 1031-1037.
29. Li K, Smit A, Geraerts W. Structural and functional characterization of neuropeptides involved in the control of male mating behavior of *Lymnaea stagnalis*. Peptides 1992; 13: 633-638.
30. Fan X, Croll R, Wu B, Fang L, Shen Q, Painter SD, Nagle GT. Molecular cloning of a cDNA encoding the neuropeptide APGWamide and cerebral peptide 1: localization of APGWamide-like immunoreactivity in the central nervous system and male reproductive organs of *Aplysia*. J Comp Neurol 1997; 387: 53-62.
31. van Golen F, Li K, De Lange R, Van Kesteren R, Van Der Schors R, Geraerts W. Co-localized neuropeptides conopressin and ALA-PRO-GLY-TRP-NH₂ have antagonistic effects on the vas deferens of *Lymnaea*. Neuroscience 1995b; 69: 1275-1287.
32. Amemiya I. On the sex-change of the japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. Proceedings of the imperial academy (of Japan) 1929; 5: 284-286.
33. Matsutani T, Nomura T. Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Cell Tissue Res 1986; 244: 515-517.
34. Khotimchenko Y, Deridovich I. Monoaminergic and cholinergic mechanisms of reproduction control in marine bivalve molluscs and echinoderms: a review. Comp Biochem Physiol C 1991; 100: 311-317.
35. Gibbons MC, Castagna M. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. Aquaculture 1984; 40: 189-191.
36. Ram J, Crawford G, Walker J, Mojares J, Patel N, Fong P, Kyozuka K. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. The Journal of Experimental Zoology 1993; 265: 587-598.
37. Fong P, Duncan J, Ram J. Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). Experientia 1994; 50: 506-509.
38. Fong P, Huminski P, D'Urso L. Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). J Exp Zool 1998; 280: 260-264.
39. Matsutani T, Nomura T. Induction of spawning by serotonin in the scallop *Patinopecten yessoensis* (jay). Mar Biol Letters 1982; 3: 353-358.

40. Braley R. Serotonin-induced spawning in giant clams (bivalvia: tridacnidae). *Aquaculture* 1985; 47: 321-325.
41. Suzuki N. Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zoolog Sci* 1995; 12: 13-27.
42. Cummins SF, Schein CH, Xu Y, Braun W, Nagle GT. Molluscan attractins, a family of water-borne protein pheromones with interspecific attractiveness. *Peptides* 2005; 26: 121-129.
43. Cummins SF, Nichols AE, Warso CJ, Nagle GT. *Aplysia* seductin is a water-borne protein pheromone that acts in concert with attractin to stimulate mate attraction. *Peptides* 2005; 26: 351-359.
44. Cummins S, Nichols A, Amare A, Hummon A, Sweedler J, Nagle G. Characterization of *Aplysia* enticin and temptin, two novel water-borne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction. *J Biol Chem* 2004; 279: 25614-25622.
45. Zatylny C, Marvin L, Gagnon J, Henry J. Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2002a; 296: 1186-1193.
46. Zeeck E, Müller C, Beckmann M, Hardege J, Papke U, Sinnwell V, Schroeder F, Francke W. Cysteine-glutathione disulfide, the sperm-release pheromone of the marine polychaete *Nereis succinea* (Annelida: Polychaeta). *Chemoecology* 1998; 8: 33-38.
47. Ram J, Muller C, Beckmann M, Hardege J. The spawning pheromone cysteine-glutathione disulfide ('nereithione') arouses a multicomponent nuptial behavior and electrophysiological activity in *Nereis succinea* males. *FASEB J* 1999; 13: 945-952.

V. Conclusion

Chez l'huître creuse, les différentes étapes de la ponte sont clairement stéréotypées. Les ovocytes quittent le follicule et sont transportés dans le gonoducte jusqu'au niveau de la chambre exhalante avant d'être évacués par les contractions du muscle adducteur. Cette ultime étape est sous la dépendance de facteurs libérés avec les produits génitaux. Dans ce contexte, la recherche de facteurs régulateurs de la ponte s'est traduite par l'identification des peptides myotropes libérés avec les ovocytes et le sperme. Dans un premier temps, la construction de banques de séquences a permis de rechercher des peptides apparentés aux SepCRPs et aux OJPs chez *C. gigas*, mais sans résultats significatifs. Deux approches complémentaires ont donc été mises en oeuvre. La première repose sur l'analyse peptidomique des produits génitaux mâles et la seconde sur la purification d'un facteur ovarien sur la base de son activité contractile.

Identification d'un facteur régulateur libéré avec les produits génitaux mâles : l'APGWamide.

La création d'une banque constituée de séquences de peptides régulateurs caractérisés chez les invertébrés, a permis d'identifier l'APGWamide dans les produits génitaux mâles. Ce neuropeptide, initialement caractérisé chez un gastéropode prosobranch (Kuroki *et al*, 1990), est exprimé au niveau du système nerveux central (Favrel et Mathieu, 1996). Il est transporté par voie nerveuse jusqu'au niveau des voies génitales et du muscle adducteur chez les bivalves (Smith *et al*, 1997). Chez *C. gigas*, la distribution tissulaire de ce neuropeptide est similaire à celle décrite chez les autres bivalves.

Les résultats des bioessais *in vitro* et *in vivo* montrent que l'APGWamide module les contractions du muscle adducteur chez les femelles matures et présente une activité plus faible chez les huîtres mâles d'une part et immatures d'autre part. Chez *C. gigas*, ce peptide est exprimé dans les ganglions viscéraux et transporté par voie nerveuse jusqu'au muscle adducteur et jusqu'à la gonade mâle. Chez les animaux exprimant l'APGWamide, ce peptide serait capable de moduler les contractions du muscle adducteur, assurant ainsi l'émission des ovocytes. Il pourrait également participer au transport des gamètes au travers du gonoducte en modulant l'activité contractile des fibres musculaires associées, sur le modèle de ce qui a été décrit chez la seiche (Henry *et al*, 1997 ; Henry et Zatylny, 2002). Enfin, en

association avec d'autres facteurs présents dans les produits génitaux mâles, l'APGWamide serait capable de stimuler le comportement de ponte des autres femelles matures. Chez *C. gigas*, la régulation exercée par ce peptide est donc assurée par deux voies distinctes : l'une nerveuse et l'autre phéromonale. L'APGWamide est donc le premier neuropeptide libéré dans le milieu environnant. Chez le criquet, un peptide apparenté, le LOM-MIP, est également suspecté d'être transmis avec les produits génitaux mâles lors de l'accouplement (Paemen *et al*, 1991). Cependant, cette étape étant interne chez cette espèce, ce peptide n'est donc pas libéré dans le milieu environnant.

L'APGWamide, détecté dans les produits génitaux mâles, semble être en partie responsable de l'effet observé sur le tractus de seiche lors de l'injection d'extraits de sperme (Figure 20), ce neuropeptide modulant en effet les contractions de l'oviducte (Henry *et al*, 1997 ; Henry et Zatylny, 2002). Par ailleurs, les résultats obtenus chez la seiche sont comparables à ceux de l'huître. Détecté dans les sécrétions séminales, l'APGWamide est libéré avec les produits génitaux mâles. Chez ces deux espèces, il ne présente pas d'activité sur le tractus génital d'animaux immatures ou mâles. Chez la seiche, l'APGWamide est probablement déposé avec les spermatophores dans la poche copulatrice de la femelle. Bien que des APGWA-RPs et des FaRPS aient également été détectés au niveau des terminaisons nerveuses de l'appareil génital mâle, seul l'APGWamide est présent dans les produits génitaux.

Identification d'un facteur régulateur ovarien : le PIESVD.

Grâce à l'utilisation d'un bioessai *in vitro* mis au point chez *S. officinalis*, un peptide ovarien de séquence PIESVD a pu être identifié chez *C. gigas*. Ce facteur semble être en partie responsable des effets myotropes déclenchés par l'injection d'ovaire d'huître sur le tractus génital de seiche. Purifié sur la base de cette activité, le PIESVD est le premier peptide régulateur d'origine ovarienne caractérisé chez un bivalve. Le bioessai *in vivo* montre que ce peptide module l'activité contractile du muscle adducteur et que cette activité est restreinte aux femelles matures. En effet, le PIESVD ne présente aucune activité significative chez les individus mâles ou immatures. Par ailleurs, les analyses réalisées en spectrométrie de masse montre que la distribution tissulaire de ce peptide est limitée à l'ovaire et qu'il est libéré au cours de la ponte avec les produits génitaux femelles.

Le PIESVD est suspecté d’agir par deux voies de régulation distinctes : l’une paracrine et l’autre phéromonale. Libéré avec les ovocytes dans la cavité palléale, ce peptide est capable de moduler les contractions du muscle adducteur de l’animal chez lequel il est exprimé et donc de participer à l’évacuation des produits génitaux. De plus, en association avec d’autres facteurs présents dans les produits génitaux femelles, le PIESVD serait également capable de cibler le muscle adducteur des autres femelles matures par voie phéromonale.

Ce peptide présentant une activité contractile à la fois chez l’huître et chez la seiche, on peut donc en déduire l’existence de peptides apparentés chez *S. officinalis* même si les analyses en spectrométrie de masse n’ont pu confirmer une telle hypothèse. Par ailleurs, la composition en acides aminés du PIESVD présente certaines similarités avec celle des R-SepCRPs et des OJPs, peptides ayant la particularité d’être riches en résidus chargés négativement et en leucine/isoleucine.

<u>R-SepCRPs</u> :	<u>OJPs</u> :	<u>PIESVD</u> :
Asp + Glu : 37%	Asp + Glu : 27%	Asp + Glu : 33%
Leu + Ile : 24%	Leu + Ile : 27%	Leu + Ile : 16.6%
Val : 7%	Val : 27%	Val : 16.6%
Ser : 14%	Lys : 14%	Ser : 16.6%
Lys : 15%		
Asn : 3%	Gln : 5%	
		Pro : 16.6%

Des peptides apparentés au PIESVD ont également été recherchés chez *C. gigas*, mais sans résultats concluants. Enfin, une approche croisée similaire a également été mise en œuvre pour purifier un facteur myotrope à partir des extraits mâles chez l’huître. Cependant, la population utilisée pour cette étape étant constituée à 80% d’individus femelles (Aber Benoît), la quantité de matériel biologique s’est avérée insuffisante pour mener à terme la purification.

Contrôle de la ponte.

L’identification de facteurs régulateurs permet de mieux appréhender la régulation des différentes étapes de la ponte chez *C. gigas* et d’en ébaucher pour la première fois un schéma (Figure 21).

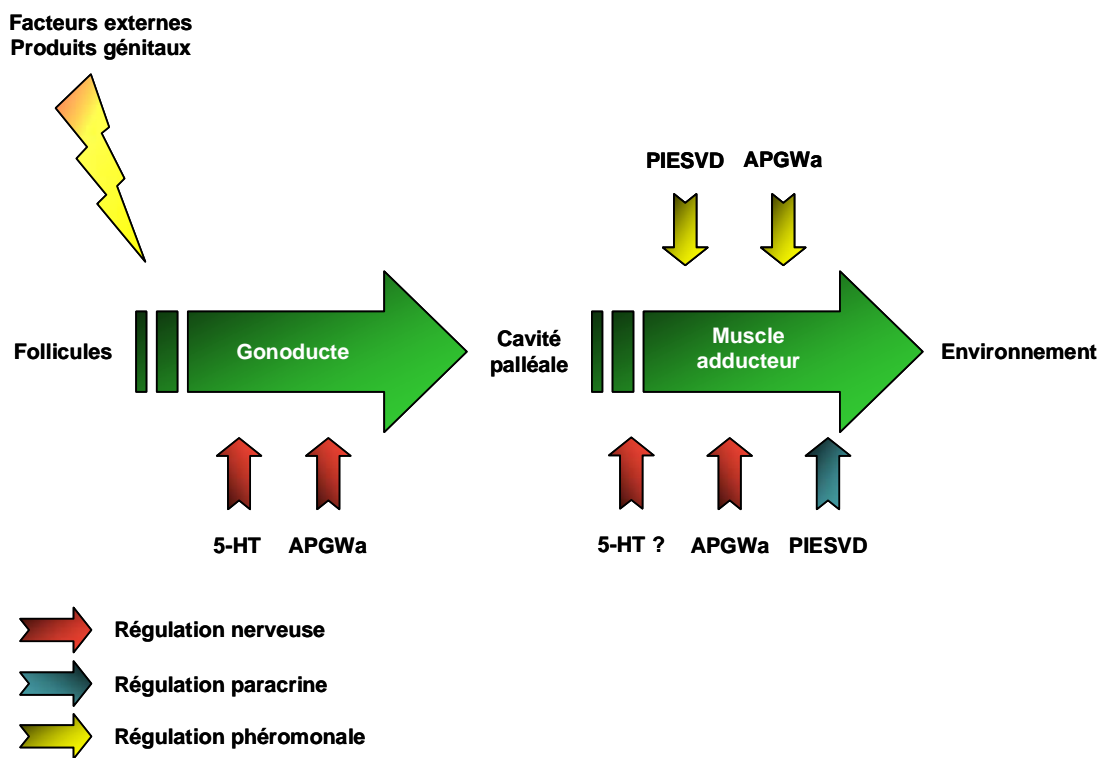


Figure 21 : Représentation schématique des différentes étapes du contrôle de l'émission des ovocytes chez l'huître creuse *C. gigas*.

Ovulation : les ovocytes gagnent le gonoducte qui les achemine dans la cavité palléale. Le transport au travers du gonoducte est assuré par la combinaison de mouvements ciliaires et de contractions. Cette première étape est probablement sous le contrôle de neuropeptides tels que l'APGWamide présent au niveau de la gonade (Smith *et al*, 1997) et de neuromédiateurs tels que la sérotonine, distribuée le long du gonoducte des bivalves (Matsutani and Nomura, 1986). Modulant l'activité ciliaire (Pavlova *et al*, 1999 ; Doran *et al*, 2004), la sérotonine peut en outre agir sur l'activité contractile de différents muscles chez les bivalves (Muneoka *et al*, 1991 ; Sugi *et al*, 1999).

Libération des ovocytes dans le milieu environnant : cette étape, assurée par les contractions du muscle adducteur, est sous le contrôle de facteurs paracrines myotropes, tels que le PIESVD, libérés par les ovocytes stockés dans la cavité palléale. L'APGWamide, présent au niveau des ganglions viscéraux et transporté par voie nerveuse, module également l'activité contractile de ce muscle. Par ailleurs, l'APGWamide et le PIESVD, libérés avec les produits génitaux dans le milieu externe, pourraient en association avec de multiples facteurs phéromonaux contrôler l'émission des ovocytes.

Applications en écloséries expérimentales et commerciales.

En éclosérie, la production de larves de qualité est conditionnée par l'émission des produits génitaux par des animaux ayant atteint leur pleine maturité sexuelle. Or, il est difficile de déterminer avec précision le stade de maturité d'une huître sans la sacrifier. Il semble donc intéressant de disposer de molécules spécifiques endogènes permettant l'identification des individus sexuellement matures. Les deux facteurs identifiés au cours de cette étude pourraient répondre à cet objectif. En effet, ces peptides modulent de façon spécifique les contractions du muscle adducteur chez les femelles matures et ne présentent pas d'activité significative chez les mâles et les individus immatures. L'ajout de ces peptides dans des bassins d'élevage permettrait d'identifier puis d'isoler les femelles matures sans déclencher la ponte. Le bioessai mis au point au cours de ces travaux, ainsi que l'utilisation des deux peptides identifiés (APGWamide et PIESVD), permettrait, en isolant les femelles des mâles matures, de collecter indépendamment les ovocytes des spermatozoïdes ceci, en vue de fécondations *in vitro* et/ou de manipulations génétiques, afin d'optimiser la production de naissain en éclosérie.

Nous avons pu noter que la présence de salissures dans le fond des bacs (fécès, sédiments...) facilitait l'observation des contractions du muscle adducteur. En effet, ces contractions sont si brutales qu'elles remettent en suspension les substances décantées. L'addition d'un fond sableux pourrait donc permettre d'optimiser l'expérience. Dans l'optique d'une utilisation de l'APGWamide en écloserie, des études ont montré que chez *S. officinalis* la réponse déclenchée par le GWamide sur l'oviducte est 3000 fois plus élevée que celle induite par l'APGWamide (Henry *et al*, 1997). Ce dipeptide, plus petit et donc moins onéreux, pourrait donc être utilisé à la place de l'APGWamide.

En écloserie, cette expérience pourrait être réalisée avec un dispositif expérimental simple, composé d'un caméscope équipé d'un objectif grand angle et disposé au dessus de bacs contenant les huîtres. Après addition du peptide approprié, les contractions du muscle adducteur sont filmées pendant la durée de l'expérience. L'utilisation d'une grille numérotée horizontalement et verticalement, permettrait de repérer et d'isoler rapidement les animaux stimulés par l'ajout du peptide : les femelles matures.

Conclusion générale et perspectives

Chez la seiche et chez l'huître, les différentes étapes de la ponte sont clairement stéréotypées. Après la libération des ovocytes dans le coelome génital chez *S. officinalis* ou dans la chambre épibranchiale chez *C. gigas*, des contractions musculaires sont à l'origine de l'évacuation des gamètes femelles dans le milieu environnant. Si l'influence des paramètres environnementaux sur l'émission des gamètes chez *C. gigas* a fait l'objet de nombreuses études, les acteurs moléculaires sont encore mal connus. L'objectif de cette thèse était donc d'identifier les facteurs peptidiques impliqués dans les mécanismes de régulation de la ponte ovulaire chez *C. gigas*. Plusieurs peptides ont ainsi pu être identifiés et caractérisés, grâce à l'utilisation de techniques de criblages couplés à des bioessais mis au point sur le modèle *S. officinalis*. Les résultats obtenus lors de cette étude soulignent la complexité de cette régulation chez ces deux espèces. Pour la première fois, l'ébauche d'un schéma de régulation de la ponte ovulaire chez *C. gigas* reposant sur des données structurales a pu être proposé.

Les deux espèces étudiées au cours de ce travail, appartiennent à l'embranchement des mollusques. Cet embranchement apparaît dès le Cambrien inférieur (- 550 Ma). Les données paléontologiques permettent de dater approximativement la séparation entre les bivalves et les céphalopodes au Cambrien. Malgré cette divergence précoce, les travaux de cette thèse mettent en évidence la conservation de certains facteurs régulateurs entre bivalves et céphalopodes : la conservation notamment de facteurs d'origine nerveuse mais également d'origine ovarienne. En effet, chez *S. officinalis* et chez *C. gigas*, la caractérisation de nouveaux peptides régulateurs ovariens fait apparaître le rôle important de l'ovaire dans cette régulation. Chez la seiche, deux familles peptidiques, les R-SepCRPs et les OJPs, ont été caractérisées grâce à une approche de type peptidomique. Exprimés au cours de la vitellogenèse, ces peptides sont libérés par les follicules et les ovocytes dans les voies génitales femelles. Ils modulent successivement le stockage des ovocytes avant l'accouplement et la sécrétion de la capsule externe de l'œuf. D'un point de vue structural, ces deux familles sont caractérisées par la présence de formes tronquées endogènes et par un motif interne conservé (SLXKD pour les R-SepCRPs et DXVKIVL pour les OJPs) impliqué dans l'activité biologique. Par ailleurs, la présence d'acides aminés additionnels en position N et C-terminale ainsi que la nature de l'acide aminé X modifient cette activité. En outre, celle-ci est directement liée au stade de ponte : pré-ponte, ponte ou post-ponte. Ces données suggèrent que l'expression des récepteurs des R-SepCRPs et des OJPs est dépendante du stade de maturité de l'animal. La caractérisation de ces récepteurs permettrait d'obtenir un profil d'expression, indispensable à la pleine compréhension des mécanismes mis en jeu. De

plus, la production de ces récepteurs permettrait de réaliser des modélisations tridimensionnelles et ainsi de déterminer l'influence des différents motifs (acides aminés additionnels en position N et/ou C-terminale ou nature de l'acide aminé X) sur les interactions entre ligands et récepteur(s).

Au cours des synthèses peptidiques, nous avons constaté que les R-SepCRPs et les OJPs présentent la particularité de gélifier en condition aqueuse. Cette propriété pourrait faire l'objet d'une étude approfondie en relation avec les mécanismes de libération et de diffusion de ces peptides.

Chez l'huître creuse, la recherche de facteurs apparentés, aux R-SepCRPs et aux OJPs, n'a fourni aucun résultat. Cette première analyse tend à démontrer que ces deux familles sont spécifiques des céphalopodes. Cependant, d'autres analyses suggèrent que des facteurs ovariens sont présents à la fois chez les céphalopodes et chez les bivalves. En effet, l'injection d'extraits de produits génitaux d'huître provoque l'inhibition des contractions de l'oviducte de seiche et parallèlement, les extraits d'ovaire de seiche induisent une modification de l'activité contractile du muscle adducteur d'huître. C'est d'ailleurs sur la base de ces observations qu'un facteur ovarien a été purifié en CLHP, pi et LC-ESI-MS/MS. Ce peptide, de séquence PIESVD, libéré avec les ovocytes dans la cavité palléale, capable de déclencher des contractions du muscle adducteur chez les femelles matures, est sans doute impliqué dans l'émission des ovocytes.

La recherche de peptides apparentés au PIESVD par spectrométrie de masse s'est avérée infructueuse. L'identification du précurseur et son étude fourniront des informations concernant l'existence d'éventuels peptides apparentés.

Chez la seiche et chez l'huître, l'accouplement et/ou la présence de sperme induit l'émission des ovocytes par un mécanisme qui est encore inconnu. Sur la base de cette observation, le peptidome des produits génitaux mâles a été fragmenté en MS/MS puis analysé. Cette approche a permis de détecter l'APGWamide, un neuropeptide déjà connu pour son rôle dans les mécanismes de régulation de l'accouplement chez les gastéropodes (Li *et al*, 1992 ; van Golen *et al*, 1995b) et de la ponte chez les céphalopodes (Henry *et al*, 1997 ; Henry et Zatylny, 2002). Sa distribution tissulaire et ses cibles sont tout à fait comparables chez la seiche et chez l'huître. Exprimé par le système nerveux central, il est transporté par voie nerveuse jusqu'aux muscles assurant le transport des ovocytes. Chez la seiche comme chez l'huître, l'APGWamide module les contractions de ces muscles pour des concentrations

physiologiques. La libération de ce neuropeptide avec les produits génitaux mâles a été clairement démontrée dans cette étude. Chez *S. officinalis*, l'APGWamide présent dans les produits génitaux mâles est probablement transporté par les courants d'eau assurant la respiration branchiale jusqu'au pavillon de l'oviducte distal ouvert dans la cavité palléale. Par ailleurs, il pourrait jouer un rôle dans le stockage des spermatophores au niveau de la poche copulatrice après l'accouplement. Chez l'huître, des analyses statistiques indiquent que les cibles de l'APGWamide et du PIESVD sont les femelles matures. L'activité de ces peptides est donc dépendante du sexe et du stade de maturité. La caractérisation des récepteurs du PIESVD et de l'APGWamide permettrait de réaliser des mesures d'expression et d'étudier la régulation s'effectuant lors des changements de sexe.

Deux facteurs provoquant des réponses comparables chez la seiche et chez l'huître ont donc été identifiés :

- l'APGWamide qui est parfaitement conservé dans au moins trois classes de mollusques : bivalves, céphalopodes et gastéropodes,
- le PIESVD, pour lequel la recherche de peptides apparentés n'a fourni aucun résultat. Toutefois, les activités obtenues sur l'oviducte de seiche montrent que des peptides apparentés sont présents chez *S. officinalis*.

Au cours de l'évolution, ces deux espèces ont adopté et développé différentes stratégies de reproduction. L'étude de la régulation de la ponte montre que certains facteurs régulateurs sont conservés (APGWamide et sans doute PIESVD-like) et donc probablement issus d'un ancêtre commun. D'autres familles de peptides régulateurs, telles que les R-SepCRPs et les OJPs, semblent avoir évolué indépendamment ce qui les rend spécifiques d'une espèce ou d'une classe. Sur la base de ces observations, nous en déduisons que l'approche à favoriser pour la caractérisation de nouveaux peptides régulateurs chez *C. gigas* est la mise en œuvre du bioessai croisé. L'étude de la régulation de la ponte chez l'huître nécessitant l'identification de nouveaux facteurs régulateurs, ce type d'approche pourrait de nouveau être mis en place pour la purification de peptides à partir de différents tissus. Chez *S. officinalis* et *C. gigas*, les organes génitaux mâles qui semblent être une source importante de facteurs régulateurs de la ponte pourraient faire l'objet d'une prochaine étude. L'identification de nouveaux facteurs régulateurs permettrait de plus de réaliser des tests d'activité en synergie.

Des approches par des techniques de biologie moléculaire seront également mises en oeuvre. La réalisation de banques d'ESTs ovariens chez *S. officinalis* permettra d'obtenir rapidement de nombreuses séquences, parmi lesquelles des séquences de peptides régulateurs. La multiplication de données structurales permettra d'optimiser la recherche de peptides apparentés en spectrométrie de masse chez *C. gigas*.

Ces travaux débouchent sur de multiples perspectives pour les écloséries commerciales et expérimentales. En effet, l'APGWamide et le PIESVD caractérisés chez l'huître creuse provoquent des réponses ciblées sur les femelles matures. En éclosérie, ces deux peptides pourraient donc être utilisés pour l'identification et l'isolement de femelles matures en vue de fécondations *in vitro*.

Cette étude vient compléter les résultats des précédents travaux réalisés chez les bivalves et les céphalopodes. Elle démontre en outre que la seiche est un modèle particulièrement bien adapté pour des études de physiologie comparée chez les mollusques et pour des analyses de type peptidomique.

Bibliographie

A.

- Abdel-latif, M., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K. (2004a). Characterization of a novel peptide with allatotropic activity in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Regul Pept*, 122, 69-78.
- Abdel-Latif, M., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K. (2004b). Type-A allatostatins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: molecular cloning, expression and tissue-specific localization. *Arch Insect Biochem Physiol*, 56, 120-132.
- Abdel-Latif, M., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K. (2004c). Expression and localization of the *Spodoptera frugiperda* allatotropin (Spofr-AT) and allatostatin (Spofr-AS) genes. *Arch Insect Biochem Physiol*, 55, 188-199.
- Alexandrowicz, J. (1960). Innervation of the hearts of *Sepia officinalis*. *Acta zool*, 41, 65-100.
- Alexandrowicz, J. (1964). The neurosecretory system of the vena cava in Cephalopoda. I. *Eledone cirrosa*. *J Mar Biol Ass UK*, 44,111-132.
- Alexandrowicz, J. (1965). The neurosecretory system of the vena cava in Cephalopoda. II. *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris*. *J Mar Biol Ass UK*, 45, 209-228.
- Amemiya, I. (1929). On the sex-change of the japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. *Proceedings of the imperial academy (of Japan)*, 5, 284-286.
- Antheunisse, L. (1963). Neurosecretory phenomena in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. *Archives Néerlandaises de Zoologie*, 15, 237-314.

B.

- Ballard, J., Olsen, G., Faith, D., Odgers, W., Rowell, D., Atkinson, P. (1992). Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods. *Science*, 258, 1345-1348.
- Belles, X., Maestro, J. L., Piulachs, M. D., Johnsen, A. H., Duve, H., Thorpe, A. (1994). Allatostatic neuropeptides from the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Identification, immunolocalization and activity. *Regul Pept*, 53, 237-247.
- Bendena, W., Donly, B., Tobe, S. (1999). Allatostatins: a growing family of neuropeptides with structural and functional diversity. *Ann N Y Acad Sci*, 897, 311-329.
- Bennett, H. (1986). Use of ion-exchange Sep-Pak cartridges in the batch fractionation of pituitary peptides. *J Chromatogr*, 359, 383-390.
- Boletzky, S. (1983). *Sepia officinalis*. In P. Boyle (Ed.), *Cephalopods life cycles* (Vol. 1, pp. 31-52). London: Academic Press.
- Boletzky, S. (1987). Fecundity variation in relation to intermittent or chronic spawning in the Cuttlefish, *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Bull Mar Sci*, 40, 382-387.
- Boletzky, S. (1989). Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. *Adv Mar Biol*, 25, 85-115.

- Borovsky, D., Carlson, D., Griffin, P., Shabanowitz, J., Hunt, D. (1990). Mosquito oostatic factor: a novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. *FASEB J*, 4, 3015-3020.
- Boucaud-Camou, E., Boismery, J. (1991). The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis*) in the English channel. In E. Boucaud-Camou (Ed.), *The cuttlefish* (pp. 179-189) : Centre de publication de l'Université de Caen, France.
- Boucaud-Camou, E., Koueta, N., Boismery, J., Medhioub, A. (1991). The sexual cycle of *Sepia officinalis* L. from the Bay of Seine. In E. Boucaud-Camou (Ed.), *The cuttlefish* (pp. 141-151) : Centre de publication de l'Université de Caen, France.
- Boycott, B., Young, J. (1956). The subpedoncular body and nerve and the other organs associated with the optic tract of cephalopods. In K. Wingstrand (Ed.), Bertil Hanström: Zoological papers in honour of his sixty-fifth birthday (pp. 76-105) : Zoological Institute, Lund.
- Braley, R. (1985). Serotonin-induced spawning in giant clams (bivalvia: tridacnidae). *Aquaculture*, 47, 321-325.
- Brezina, V., Bank, B., Cropper, E., Rosen, S., Vilim, F., Kupfermann, I., Weiss, K. (1995). Nine members of the myomodulin family of peptide neurotransmitters at the B16-ARC neuromuscular junction of *Aplysia*. *J Neurophys*, 74, 54-72.
- Buroker, N. (1983). Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *C. gigas*. *Malacologia*, 23, 271-279.
- Bylemans, D., Borovsky, D., Hunt, D., Shabanowitz, J., Grauwels, L., De Loof, A. (1994). Sequencing and characterization of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) from the ovaries of the grey fleshfly, *Neobellieria* (*Sarcophaga*) *bullata*. *Regul Pept*, 50, 61-72.
- Bylemans, D., Proost, P., Samijn, B., Borovsky, D., Grauwels, L., Huybrechts, R., Van Damme, J. Van Beeumen, J. De Loof, A. (1995). Neb-colloostatin, a second folliculostatin of the grey fleshfly, *Neobellieria bullata*. *Eur J Biochem*, 228, 45-49.

C.

- Chen, P., Stumm-Zollinger, E., Aigaki, T., Balmer, J., Bienz, M., Bohlen, P. (1988). A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell*, 54, 291-298.
- Chen, P. S., Balmer, J. (1989). Secretory proteins and sex peptides of the male accessory gland in *Drosophila sechellia*. *J Insect Physiol*, 35, 759-764.
- Chiu, A., Hunkapiller, M., Heller, E., Stuart, D., Hood, L., Strumwasser, F. (1979). Purification and primary structure of the neuropeptide egg-laying hormone of *Aplysia californica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 6656-6660.
- Clark, J., Lange, A. (2002). Evidence for the association of FMRFamide-related peptides with the spermatheca of *Locusta migratoria*. *Peptides*, 23, 613-619.

- Clynen, E., Baggerman, G., Veelaert, D., Cerstiaens, A., Van der Horst, D., Harthoorn, L., Derua, R., Waelkens, E., De Loof, A., Schoofs, L. (2001). Peptidomics of the pars intercerebralis-corpora cardiaca complex of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Eur J Biochem*, 268, 1929-1939.
- Clynen, E., Stubbe, D., De Loof, A., Schoofs, L. (2002). Peptide differential display: a novel approach for phase transition in locusts. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 132, 107-115.
- Croll, R., Van Minnen, J. (1992). Distribution of the peptide Ala-Pro-Gly-Trp-NH₂ (APGWamide) in the nervous system and periphery of the snail *Lymnaea stagnalis* as revealed by immunocytochemistry and in situ hybridization. *J Comp Neurol*, 324, 567-574.
- Cropper, E., Tenenbaum, R., Kolks, M., Kupfermann, I., Weiss, K. (1987). Myomodulin: a bioactive neuropeptide present in an identified cholinergic buccal motor neuron of *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 5483-5486.
- Cropper, E., Vilim, F., Alevizos, A., Tenenbaum, R., Kolks, M., Rosen, S., Kupfermann, I., Weiss, K. (1991). Structure, bioactivity and cellular localization of myomodulin B: a novel *Aplysia* peptide. *Peptides*, 12, 683-690.
- Cummins, S., Nichols, A., Amare, A., Hummon, A., Sweedler, J., Nagle, G. (2004a). Characterization of *Aplysia* enticin and temptin, two novel water-borne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction. *J Biol Chem*, 279, 25614-25622.
- Cummins, S., Nichols, A., Rajarathnam, K., Nagle, G. (2004b). A conserved heptapeptide sequence in the waterborne attractin pheromone stimulates mate attraction in *Aplysia*. *Peptides*, 25, 185-189.
- Cummins, S., Nichols, A., Warso, C., Nagle, G. (2005a). *Aplysia* seductin is a water-borne protein pheromone that acts in concert with attractin to stimulate mate attraction. *Peptides*, 26, 351-359.
- Cummins, S., Schein, C., Xu, Y., Braun, W., Nagle, G. (2005b). Molluscan attractins, a family of water-borne protein pheromones with interspecific attractiveness. *Peptides*, 26, 121-129.

D.

- Darmer, D., Schmutzler, C., Diekhoff, D., Grimmelikhuijzen, C. J. P. (1991). Primary structure of the precursor for the sea-anemone neuropeptide Antho-RFamide (<Glu-Gly-Arg-Phe-NH₂). *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 2555-2559.
- De Lange, R., van Golen, F., 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 Lange, R., van Golen, F., 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 Lange, R., van Minnen, J. (1998). Localization of the neuropeptide APGWamide in gastropod molluscs by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Gen Comp Endocrinol*, 109, 166-174.

- Deridovich, I., Khotimchenko, Y. (1985). Biogenic monoamines in the central nervous system of the Japanese scallop *Mizuho-pecten yessoensis* and the mussel *Creno-mytilus grayanus*. *Mar Biol Vladivostok*, 3, 53-58.
- Deridovich, I., Reunova, O. (1993). Prostaglandins: reproduction control in bivalve molluscs. *Comp Biochem Physiol*, 104A, 23-27.
- Deslous-Paoli, J., Heral, M., Berthome, J., Razet, D., Garnier, J. (1982). Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thunberg dans le bassin de Marennes-Oleron en 1979 et 1981 : aspects biochimiques et énergétiques. *Rev Trav Inst Pêches Marit*, 45, 319-327.
- Dhainaut, A., Richard, A. (1976). Vitellogenèse chez les céphalopodes décapodes. Evolution de l'ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale. *Arch Anat Micr Morph Exp*, 65, 183-208.
- Doran, S., Koss, R., Tran, C., Christopher, K., Gallin, W., Goldberg, J. (2004). Effect of serotonin on ciliary beating and intracellular calcium concentration in identified populations of embryonic ciliary cells. *J Exp Biol*, 207, 1415-1429.
- Duve, H., Johnsen, A., Scott, A., Thorpe, A. (2002). Allatostatins of the tiger prawn, *Penaeus monodon* (Crustacea: Penaeidea). *Peptides*, 23, 1039-1051.

E.

- Ebberink, R., Joosse, J. (1985a). Molecular properties of various snail peptides from brain and gut. *Peptides*, 6, 451-457.
- Ebberink, R., van Loenhout, H., Geraerts, W., Joosse, J. (1985b). Purification and amino acid sequence of the ovulation neurohormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 7767-7771.
- Ebberink, R., Price, D., van Loenhout, H., Doble, K., Riehm, J., Geraerts, W., Greenberg, M. (1987). The brain of *Lymnaea* contains a family of FMRFamide-like peptide. *Peptides*, 8, 515-522.
- Eckelbarger, K. (1994). Diversity of metazoan ovaries and vitellogenic mechanisms: implications for life history theory. *Proc Biol Soc Wash*, 107, 193-218.
- Eckelbarger, K., Davis, C. (1996). Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Mar Biol*, 127, 79-87.
- Espinoza, E., Carrigan, M., Thomas, S., Shaw, G., Edison, A. (2000). A statistical view of FMRFamide neuropeptide diversity. *Mol Neurobiol*, 21, 35-56.

F.

- Fan, X., Wu, B., Nagle, G., Painter, S. (1997). Molecular cloning of a cDNA encoding a potential water-borne pheromonal attractant released during *Aplysia* egg laying. *Brain Res Mol Brain Res*, 48, 167-170.

- Fan, X., Croll, R., Wu, B., Fang, L., Shen, Q., Painter, S., Nagle, G. (1997). Molecular cloning of a cDNA encoding the neuropeptide APGWamide and cerebral peptide 1: localization of APGWamide-like immunoreactivity in the central nervous system and male reproductive organs of *Aplysia*. *J Comp Neurol*, 387, 53-62.
- Favrel, P., 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*. *Neurosci Lett*, 205, 210-214.
- Favrel, P., Lelong, C., Mathieu, M. (1998). Structure of the cDNA encoding the precursor for the neuropeptide FMRFamide in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Neuroreport*, 9, 2961-2965.
- Fong, P., Huminski, P., D'Urso, L. (1998). Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *J Exp Zool*, 280, 260-264.
- Fujisawa, Y., Kubota, I., Ikeda, T., Minakata, H., Muneoka, Y. (1991). A variety of *Mytilus* inhibitory peptides in the ABRM of *Mytilus edulis*: isolation and characterization. *Comp Biochem Physiol C*, 100, 525-531.
- Fujisawa, Y., Ikeda, T., Nomoto, K., Yasuda-Kamatani, Y., Minakata, H., Kenny, P., Kubota, I., Muneoka, Y. (1992). The FMRFamide-related decapeptide of *Mytilus* contains a D-amino acid residue. *Comp Biochem Physiol C*, 102, 91-95.
- Fujisawa, Y., Furukawa, Y., Ohta, S., Ellis, T., Dembrow, N., Li, L., Floyd, P., Sweedler, J., Minakata, H., Nakamaru, K., Morishita, F., Matsushima, O., Weiss, K., Vilim, F. (1999). The *Aplysia mytilus* inhibitory peptide-related peptides: identification, cloning, processing, distribution, and action. *J Neurosci*, 19, 9618-9634.
- Fujisawa, Y., Masuda, K., Minakata, H. (2000). Fulcin regulates the female reproductive organs of the snail, *Achatina fulica*. *Peptides*, 21, 1203-1208.
- Fujiwara-Sakata, M., Kobayashi, M. (1992). Neuropeptides regulate cardiac activity of a prosobranch mollusc, *Rapana thomasi*. *Cell Tissue Res*, 269, 241-247.

G.

- Galtsoff, P. (1930). The role of chemical stimulation in the spawning reactions of *Ostrea virginica* and *Ostrea gigas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 16, 555-559.
- Galtsoff, P. (1932). Spawning reactions of three species of oysters. *J Wash Acad Sci*, 22, 65-69.
- Galtsoff, P. (1938a). Physiology of reproduction of *Ostrea virginica* I. Spawning reactions of the female and male. *Biol Bull*, 74, 461-486.
- Galtsoff, P. (1938b). Physiology of reproduction of *Ostrea virginica* II. Stimulation of spawning in the female oyster. *Biol Bull*, 75, 286-307.
- Galtsoff, P. (1961). Physiology of reproduction in molluscs. *Am. Zoologist*, 1, 273-289.
- Galtsoff, P. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin: *Fish Bull U.S.*

- Garbers, D., Watkins, H., Hansbrough, J., Smith, A., Misono, K. (1982). The amino acid sequence and chemical synthesis of speract and of speract analogues. *J Biol Chem*, 257, 2734-2737.
- Garimella, R., Xu, Y., Schein, C., Rajarathnam, K., Nagle, G., Painter, S., Braun, W. (2003). NMR solution structure of attractin, a water-borne protein pheromone from the mollusk *Aplysia californica*. *Biochemistry*, 42, 9970-9979.
- Garside, C., Koladich, P., Bendena, W., Tobe, S. (2002). Expression of allatostatin in the oviducts of the cockroach *Diploptera punctata*. *Insect Biochem Mol Biol*, 32, 1089-1099.
- Geraerts, W., Ter Maat, A., Vreugdenhil, E. (1988). The peptidergic neuroendocrine control of egg-laying behavior in *Aplysia* and *Lymnaea*. In H. Laufer G. H. Downer (Eds.), *Invertebrate Endocrinology* (Vol. 2, Endocrinology of selected invertebrate types, pp. 141-231). New York: Alan R Liss.
- Gibbons, M., Castagna, M. (1984). Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*, 40, 189-191.
- Greenberg, M., Doble, K., Lesser, W., Lee, T., Pennell, N., Morgan, C., Price, D. (1997). Characterization of myomodulin-related peptides from the pulmonate snail *Helix aspersa*. *Peptides*, 18, 1099-1106.

H.

- Hamdaoui, A., Schoofs, L., Wateleb, S., Bosch, L., Verhaert, P., Waelkens, E., De Loof, A. (1997). Purification of a novel, heat-stable serine protease inhibitor protein from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem Biophys Res Commun*, 238, 357-360.
- Hamdaoui, A., Wateleb, S., Devreese, B., Chiou, S., Vanden Broeck, J., Van Beeumen, J., De Loof, A., Schoofs, L. (1998). Purification and characterization of a group of five novel peptide serine protease inhibitors from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *FEBS letters*, 422, 74-78.
- Hanlon, R., Ament, S., Gabr, H. (1999). Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). *Mar Biol*, 134, 719-728.
- Hansbrough, J., Garbers, D. (1981). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J Biol Chem*, 256, 1447-1452.
- Heifetz, Y., Lung, O., Frongillo, O., Wolfner, M. (2000). The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary. *Current Biology*, 10, 99-102.
- Henry, J. (1993). Etude de la fécondité des femelles de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode): Caractérisation et purification de facteurs impliqués dans le contrôle de la vitellogenèse et de la ponte. Thèse de Doctorat, Université de Caen, pp 1-143.
- Henry, J., Favrel, P., Boucaud-Camou, E. (1997). Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the motility of the mature oviduct in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Peptides*, 18, 1469-1474.

- Henry, J., Zatylny, C., Boucaud-Camou, E. (1999). Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides*, 20, 1061-1070.
- Henry, J., Zatylny, C., Favrel, P. (2000). HPLC and electrospray ionization mass spectrometry as tools for the identification of APGWamide-related peptides in gastropod and bivalve mollusks: comparative activities on *Mytilus* muscles. *Brain Res*, 862, 162-170.
- Henry, J., Zatylny, C. (2002). Identification and tissue mapping of APGWamide-related peptides in *Sepia officinalis* using LC-ESI-MS/MS. *Peptides*, 23, 1031-1037.
- Heral, M., Deslous-Paoli, J., Prou, J. (1986). Influence du climat sur le recrutement et sur la production d'huîtres cultivées (*C. angulata* et *C. gigas*) dans le bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis*, 15, 193-207.
- Hirata, T., Kubota, I., Takabatake, I., Kawahara, A., Shimamoto, N., Muneoka, Y. (1987). Catch-relaxing peptide isolated from *Mytilus* pedal ganglia. *Brain Res*, 422(2), 374-376.
- Hoek, P. (1883). Researches on the generative organs of the oyster (*O. edulis*). *Bulletin of the U.S. Fish Commission*, 2, 343-345.
- Hua, Y., Bylemans, D., De Loof, A., Koolman, J. (1994). Inhibition of ecdysone biosynthesis in flies by a hexapeptide isolated from vitellogenic ovaries. *Mol Cell Endocrinol*, 104, R1-4.

I.

- Ikeda, T., Yasuda-Kamatani, Y., Minakata, H., Kenny, P. T., Nomoto, K., Muneoka, Y. (1992). *Mytilus*-inhibitory peptide analogues isolated from the ganglia of a pulmonate mollusc, *Achatina fulica*. *Comp Biochem Physiol C*, 101, 245-249.
- Imamura, M., Haino-Fukushima, K., Aigaki, T., Fuyama, Y. (1998). Ovulation stimulating substances in *Drosophila biarmipes* males: their origin, genetic variation in the response of females, and molecular characterization. *Insect Biochem Mol Biol*, 28, 365-372.
- Iwakoshi-Ukena, E., Ukena, K., Takuwa-Kuroda, K., Kanda, A., Tsutsui, K., 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. *J Comp Neurol*, 477, 310-323.

J.

- Jecklin, L. (1934). Beitrag zur kenntnis der Laichgellerten und der biologie der embryonen decapoder cephalopoden. *Rev Suisse Zool*, 41, 593-673.

K.

- Kanda, A., Takuwa-Kuroda, K., Iwakoshi-Ukena, E., Furukawa, Y., Matsushima, O., Minakata, H. (2003). Cloning of *Octopus* cephalotocin receptor, a member of the oxytocin/vasopressin superfamily. *J Endocrinol*, 179, 281-291.
- Karlson, P., Luscher, M. (1959). Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 55-56.
- Kellett, E., Saunders, S., Li, K., Staddon, J., Benjamin, P., Burke, J. (1994). Genomic organization of the FMRFamide gene in *Lymnaea*: multiple exons encoding novel neuropeptides. *J Neurosci*, 14, 6564-6570.
- Kellett, E., Perry, S., Santama, N., Worster, B., Benjamin, P., Burke, J. (1996). Myomodulin gene of *Lymnaea*: structure, expression, and analysis of neuropeptides. *J Neurosci*, 16, 4949-4957.
- Khotimchenko, Y., Deridovich, I. (1991). Monoaminergic and cholinergic mechanisms of reproduction control in marine bivalve molluscs and echinoderms: a review. *Comp Biochem Physiol C*, 100, 311-317.
- Kikuyama, S., Yamamoto, K., Iwata, T., Toyoda, F. (2002). Peptide and protein pheromones in amphibians. *Comp Biochem Physiol B*, 132, 69-74.
- Kubli, E. (1992). The sex-peptide. *Bioessays*, 14, 779-784.
- Kupfermann, I. (1967). Stimulation of egg laying: possible neuroendocrine function of bag cells of abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *Nature*, 216, 814-815.
- Kuroki, Y., Kanda, T., Kubota, I., Fujisawa, Y., Ikeda, T., Miura, A., Minamitake, Y., Muneoka, Y. (1990). A molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone, RPCH. *Biochem Biophys Res Commun*, 167, 273-279.
- Kwok, R., Orchard, I. (2002). Characterization of a putative SchistoFLRFamide receptor in the CNS of *Locusta migratoria*. *Peptides*, 23, 765-772.

L.

- Lange, A. B., Cheung, I. L. (1999). The modulation of skeletal muscle contraction by FMRFamide-related peptides of the locust. *Peptides*, 20, 1411-1418.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J., Le Pennec, M. (2000). Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 190, 183-199.
- Leahy, M. (1966). Egg deposition in *D. melanogaster* increased by transplant of male paragonia. *Drosophila Inf Serv*, 41, 145-146.
- Leahy, M. G., Lowe, M. L. (1967). Purification of the male factor increasing egg deposition in *D. melanogaster*. *Life Sci*, 6, 151-156.

- Levy, F., Rabel, D., Charlet, M., Bulet, P., Hoffmann, J. A., Ehret-Sabatier, L. (2004). Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie*, 86, 607-616.
- Li, K., Smit, A., Geraerts, W. (1992). Structural and functional characterization of neuropeptides involved in the control of male mating behavior of *Lymnaea stagnalis*. *Peptides*, 13, 633-638.
- Li, K., Jimenez, C., Van Veelen, P., Geraerts, W. (1994a). Processing and targeting of a molluscan egg-laying peptide prohormone as revealed by mass spectrometric peptide fingerprinting and peptide sequencing. *Endocrinology*, 134, 1812-1819.
- Li, K., van Golen, F., van Minnen, J., van Veelen, P., van der Greef, J., Geraerts, W. (1994b). Structural identification, neuronal synthesis, and role in male copulation of myomodulin-A of *Lymnaea*: a study involving direct peptide profiling of nervous tissue by mass spectrometry. *Brain Res Mol Brain Res*, 25, 355-358.
- Li, K., el Filali, Z., Van Golen, F., Geraerts, W. (1995). Identification of a novel amide peptide, GLTPNMNSLFF-NH₂, involved in the control of vas deferens motility in *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Biochem*, 229, 70-72.
- Li, K. W., van Minnen, J., van Veelen, P. A., van der Greef, J., Geraerts, W. P. (1996). Structure, localization and action of a novel inhibitory neuropeptide involved in the feeding of *Lymnaea*. *Brain Res Mol Brain Res*, 37, 267-272.
- Li, L., Garden, R., Floyd, P., Moroz, T., Gleeson, J., Sweedler, J., Pasa-Tolic, L., Smith, R. (1999a). Egg-laying hormone peptides in the aplysiidae family. *J Exp Biol*, 202, 2961-2973.
- Linacre, A., Kellett, E., Saunders, S., Bright, K., Benjamin, P., Burke, J. (1990). Cardioactive neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) and novel related peptides are encoded in multiple copies by a single gene in the snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci*, 10, 412-419.
- Loi, P., Tublitz, N. (1997). Molecular analysis of FMRFamide- and FMRFamide-related peptides (FaRPS) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J Exp Biol*, 200, 1483-1489.
- Lopez, V., Wickham, L., DesGroseillers, L. (1993). Molecular cloning of myomodulin cDNA, a neuropeptide gene expressed in neuron L10 of *Aplysia californica*. *DNA Cell Biol*, 12, 53-61.
- Lorenz, M. W., Kellner, R., Hoffmann, K. (1995). A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J Biol Chem*, 270, 21103-21108.
- Lubet, P. (1955). Cycle neurosécrétoire chez *Chlamys varia* L. et *Mytilus edulis* L. (Mollusques lamellibranches). *C R Hebd Seances Acad Sci*, 241, 119-121.
- Lubet, P., Choquet, C. (1971). Cycles et rythmes sexuels chez les mollusques bivalves et gastéropodes. *Haliotis*, 1, 129-149.
- Lubet, P. (1980). Influence des facteurs externes sur la reproduction des lamellibranches. *Oceanis*, 6, 469-489.
- Lubet, P. (1981). Action des facteurs internes sur la reproduction des mollusques lamellibranches. *Oceanis*, 6, 491-510.

- Lubet, P. (1991). Bases biologiques de la culture des mollusques. In Bases biologiques écologiques de l'aquaculture (Barnabé Edit ed., pp. 166-189): Lavoisier, Tec Doc.
- Luginbühl, P., Wu, J., Zerbe, O., Ortenzi, C., Luporini, P., Wüthrich, K. (1996). The NMR solution structure of the pheromone Er-11 from the ciliated protozoan *Euplotes raikovi*. *Protein Sci.*, 5, 1512-1522.
- Luporini, P., Miceli, C., Ortenzi, C., Vallesi, A. (1996). Ciliate pheromones. *Prog Mol Subcell Biol*, 17, 80-104.
- Lutz, E., Macdonald, M., Hettle, S., Price, D., Cottrell, G., Sommerville, J. (1992). Structure of cDNA clones and genomic DNA encoding FMRFamide-related peptides (FaRPs) in *Helix*. *Mol Cell Neurosci*, 3, 373-382.

M.

- Mann, R. (1979). Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *C. gigas* and *O. edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J Mar Biol Ass UK*, 59, 95-110.
- Martin, R., Voigt, K. (1987). The neurosecretory of the octopus vena cava: A neurohemal organ. *Experientia*, 43, 537-543.
- Martinez-Perez, F., Becerra, A., Valdes, J., Zinker, S., Arechiga, H. (2002). A possible molecular ancestor for mollusk APGWAamide, insect Adipokinetic Hormone, and crustacean Red Pigment Concentrating Hormone. *J Mol Evol*, 54, 703-714
- Matsumoto, T., Nakamura, A., Mori, K., Kayano, T. (2003). Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zoolog Sci*, 20, 37-42.
- Matsutani, T., Nomura, T. (1982) Induction of spawning by serotonin in the scallop *Pactinopecten yessoensis* (jay). *Mar Biol Letters*, 3, 353-358.
- Matsutani, T., Nomura, T. (1986). Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Pactinopecten yessoensis*. *Cell Tissue Res*, 244, 515-517.
- Maurer, D., Borel, M. (1986). Croissance, engraissement et cycle sexuel de *C. gigas* dans le bassin d'Arcachon: comparaison de huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis*, 15, 217-228.
- Medhioub, A. (1986). Etude de la croissance et du cycle sexuel de la seiche (*Sepia officinalis*) des côtes normandes. Thèse de Doctorat, Université de Caen, pp 1-117.
- Merle, J. (1969). Nature des stimulations apportées par le mâle sur la physiologie des Drosophiles femelles. Paper presented at the Abst 1st European Drosophila Res Conf, The Hague, Netherlands.
- Miller, M., Beushausen, S., Vitek, A., Stamm, S., Kupfermann, I., Brosius, J., Weiss, K. (1993). The myomodulin-related neuropeptides: characterization of a gene encoding a family of peptide cotransmitters in *Aplysia*. *J Neurosci*, 13, 3358-3367.
- Monsma, S., Wolfner, M. (1988). Structure and expression of a *Drosophila* male accessory gland gene whose product resembles a peptide pheromone precursor. *Genes Dev*, 2, 1063-1073.

- Muneoka, Y., Fujisawa, Y., Matsuura, M., Ikeda, T. (1991). Neurotransmitters and neuromodulators controlling the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol C*, 98, 105-114.
- Muneoka, Y., Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O., Kobayashi, M., Ohtani, M., Takahashi, T., Iwakoshi, E., Fujisawa, Y., Minakata, H. (2000). Comparative aspects of invertebrate neuropeptides. *Acta Biol Hung*, 51, 111-132.

N.

- Nagle, G., Painter, S., Blankenship, J., Dixon, J., Kurosky, A. (1986). Evidence for the expression of three genes encoding homologous atrial gland peptides that cause egg laying in *Aplysia*. *J Biol Chem*, 261, 7853-7859.
- Nambu, J., Murphy-Erdosh, C., Andrews, P., Feistner, G., Scheller, R. H. (1988). Isolation and characterization of a *Drosophila* neuropeptide gene. *Neuron*, 1, 55-61.
- Nambu, J., Scheller, R. H. (1986). Egg-laying hormone genes encoding homologous atrial gland peptides that cause egg-laying in *Aplysia*. *Neuroscience*, 6, 2026-2036.
- Nathoo, A., Moeller, R., Westlund, B., Hart, A. (2001). Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditis elegans* and other species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14000-14005.
- Nelson, T. (1921). Aids to successful oyster culture. I. Procuring the seed (N J Agr Exp Sta ed. Vol. Bull 351).
- Nelson, T. (1928). Relation of spawning of the oyster to temperature. *Ecology*, 9, 145-154.
- Nelson, T., Allison, J. (1940). On the nature and action of diantlin; a new hormone-like substance carried by the spermatozoa of the oyster. *J Exp Zool*, 85, 299-338.
- Nishigaki, T., Chiba, K., Miki, W., Hoshi, M. (1996). Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs. *Zygote*, 4, 237-245.
- Nomura, K., Suzuki, N., Ohtake, H., Isaka, S. (1983). Structure and action of sperm activating peptides from the egg jelly of a sea urchin, *Anthociadis crassipina*. *Biochem Biophys Res Commun*, 117, 147-153.

O.

- O Foighil, D., Taylor, D. (2000). Evolution of parental care and ovulation behavior in oysters. *Mol Phylogenet Evol*, 15, 301-313.
- Ohashi, Y., Haino-Fukushima, K., Fuyama, Y. (1991). Purification and characterization of an ovulation stimulating substance from the male accessory glands of *Drosophila suzuki*. *Insect Biochem*, 21, 413-419.

Ohtani, M., Muneoka, Y., Kanemoto, N., Ogino, K., Masui, Y., Aimoto, S. (1995a). Structure and action of MIP (Mytilus inhibitory peptide)-related tetrapeptides synthesized with a multipolypeptide synthesizer. *Acta Biol Hung*, 46, 445-448.

Ohtani, M., Muneoka, Y., Takahashi, T., Teranishi, H. (1995b). Bioactive peptides isolated from the clam *Meretrix lusoria*. *Acta Biol Hung*, 46, 449-452.

P.

Paemen, L., Tips, A., Schoofs, L., Proost, P., Van Damme, J., De Loof, A. (1991). Lom-AG-myotropin: a novel myotropic peptide from the male accessory glands of *Locusta migratoria*. *Peptides*, 12, 7-10.

Painter, S., Chong, M., Wong, M., Gray, A., Cormier, J., Nagle, G. (1991). Relative contributions of the egg layer and egg cordon to pheromonal attraction and the induction of mating and egg-laying behavior in *Aplysia*. *Biol. Bull.*, 181, 81-94.

Painter, S. (1992). Coordination of reproductive activity in *Aplysia*: peptide neurohormones, neurotransmitters, and pheromones encoded by the egg-laying hormone family of genes. *Biol Bull*, 183, 165-172.

Painter, S., Clough, B., Fan, X., Nagle, G. (1996). Characterization of a potential pheromonal attractant in *Aplysia*. *Soc Neurosci Abstr*, 22, 837.

Painter, S., Clough, B., Garden, R., Sweedler, J., Nagle, G. (1998). Characterization of *Aplysia* attractin, the first water-borne peptide pheromone in invertebrates. *Biol Bull*, 194, 120-131.

Painter, S., Clough, B., Akalal, D., Nagle, G. (1999). Attractin, a water-borne peptide pheromone in *Aplysia*. *Invertebr Reprod Dev*, 36, 191-194.

Painter, S., Cummins, S., Nichols, A., Akalal, D., Schein, C., Braun, W., Smith, J., Susswein, A., Levy, M., de Boer, P., ter Maat, A., Miller, M., Scanlan, C., Milberg, R., Sweedler, J., Nagle, G. (2004). Structural and functional analysis of *Aplysia* attractins, a family of water-borne protein pheromones with interspecific attractiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6929-6933.

Passamanek, Y., Schander, C., Halanych, K. (2004). Investigation of molluscan phylogeny using large-subunit and small-subunit nuclear rRNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 32, 25-38.

Pavlova, G., Willows, A., Gaston, M. (1999). Serotonin inhibits ciliary transport in esophagus of the nudibranch mollusk *Tritonia diomedea*. *Acta Biol Hung*, 50, 175-184.

Peeff, N., Orchard, I., Lange, A. (1994). Isolation, sequence, and bioactivity of PDVDHVFLRFamide and ADVGHVFLRFamide peptides from the locust central nervous system. *Peptides*, 15, 387-392.

Perry, S., Straub, V., Kemenes, G., Santama, N., Worster, B., Burke, J., Benjamin, P. (1998). Neural modulation of gut motility by myomodulin peptides and acetylcholine in the snail *Lymnaea*. *J Neurophysiol*, 79, 2460-2474.

Peterson, R. (1959). The anatomy and histology of the reproductive systems of *Octopus bimaculoides*. *J Morphol*, 104, 61-87.

- Pratt, G., Farnsworth, D., Siegel, N., Fok, K., Feyereisen, R. (1989). Identification of an allatostatin from adult *Diploptera punctata*. *Biochem Biophys Res Commun*, 163, 1243-1247.
- Pratt, G., Farnsworth, D., Fok, K., Siegel, N., McCormack, A., Shabanowitz, J., Hunt, D., Feyereisen, R. (1991). Identity of a second type of allatostatin from cockroach brains: an octadecapeptide amide with a tyrosine-rich address sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2412-2416.
- Price, D., Greenberg, M. (1977). Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from a central ganglia of bivalve mollusc. *Prep Biochem*, 7, 261-281.
- Price, D., Cottrell, G., Doble, K., Greenberg, M., Jorenby, W., Lehman, H., Riehm, J. (1985). A novel FMRFamide-related peptide in *Helix*: pQDPFLRFamide. *Biol Bull*, 169, 256-266.
- Price, D., Davies, N., Doble, K., Greenberg, M. (1987). The variety and distribution of the FMRFamide-related peptides in molluscs. *Zoolog Sci*, 4, 395-410.

R.

- Ram, J., Crawford, G., Walker, J., Mojares, J., Patel, N., Fong, P., Kyojuka, K. (1993). Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *J Exp Zool*, 265, 587-598.
- Ram, J., Muller, C., Beckmann, M., Hardege, J. (1999). The spawning pheromone cysteine-glutathione disulfide ('nereithione') arouses a multicomponent nuptial behavior and electrophysiological activity in *Nereis succinea* males. *FASEB J*, 13, 945-952.
- Ramarao, C. S., Burks, D. J., Garbers, D. L. (1990). A single mRNA encodes multiple copies of the egg peptide speract. *Biochemistry*, 29, 3383-3388.
- Reich, G. (1992). A new peptide of the oxytocin/vasopressin family isolated from nerves of the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Neurosci Lett*, 134, 191-194.
- Rice, P., Ray, S. M., Painter, S. D., Nagle, G. T. (2002). An intrinsic membrane protein in oyster sperm stimulates spawning behaviors in *Crassostrea virginica*: implications for aquaculture. *J Shellfish Res*, 21, 715-718.
- Richard, A. (1968). Mise en évidence de l'action de la lumière dans le déterminisme de la ponte chez le céphalopode *Sepia officinalis* L. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 267D, 2360-2363.
- Richard, A. (1971). Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences de Lille, pp 1-264.
- Rosoff, M., Bürglin, T., Li, C. (1992). Alternatively spliced transcripts of the flp-1 gene encode distinct FMRFamide-like peptides in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 12, 2356-2361.
- Rothman, B., Hawke, D., Brown, R., Lee, T., Dehghan, A., Shively, J., Mayeri, E. (1986). Isolation and primary structure of the califins, three biologically active egg-laying hormone-like peptides from the atrial gland of *Aplysia californica*. *J Biol Chem*, 261, 1616-1623.

Rudolph, P., Stay, B. (1997). Cockroach allatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the freshwater snails *Bulinus globosus* (Planorbidae) and *Stagnicola elodes* (Lymnaeidae). *Gen Comp Endocrinol*, 106, 241-250.

S.

Salzet, M., Verger-Bocquet, M., Vandenbulcke, F., Van Minnen, J. (1997). Leech egg-laying-like hormone: structure, neuronal distribution and phylogeny. *Brain Res Mol Brain Res*, 49, 211-221.

Saudan, P., Hauck, K., Soller, M., Choffat, Y., Ottiger, M., Sporri, M., Ding, Z., Hess, D., Gehrig, P., Klauser, S., Hunziker, P., Kubli, E. (2002). Ductus ejaculatorius peptide 99B (DUP99B), a novel *Drosophila melanogaster* sex-peptide pheromone. *Eur J Biochem*, 269, 989-997.

Saunders, S., Bright, K., Kellett, E., Benjamin, P., Burke, J. (1991). Neuropeptides Gly-Asp-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-amide (GDPFLRFamide) and Ser-Asp-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-amide (SDPFLRFamide) are encoded by an exon 3' to Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) in the snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci*, 11, 740-745.

Schaefer, M., Picciotto, M., Kreiner, T., Kaldany, R., Taussig, R., Scheller, R. H. (1985). *Aplysia* neurons express a gene encoding multiple FMRFamide neuropeptides. *Cell*, 41, 457-467.

Schein, C., Nagle, G., Page, J., Sweedler, J., Xu, Y., Painter, S., Braun, W. (2001). *Aplysia* attractin: biophysical characterization and modeling of a water-borne pheromone. *Biophys J*, 81, 463-472.

Scheller, R., Jackson, J., McAllister, L., Rothman, B., Mayeri, E., Axel, R. (1983). A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior. *Cell*, 32, 7-22.

Schmidt, T., Choffat, Y., Schneider, M., Hunziker, P., Fuyama, Y., Kubli, E. (1993). *Drosophila suzukii* contains a peptide homologous to the *Drosophila melanogaster* sex-peptide and functional in both species. *Insect Biochem Mol Biol*, 23, 571-579.

Schneider, L., Taghert, P. (1988). Isolation and characterization of a *Drosophila* gene that encodes multiple neuropeptides related to Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide). *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 1993-1997.

Schoofs, L., Holman, G., Hayes, T., Nachman, R., De Loof, A. (1991). Isolation, identification and synthesis of locustamyoinhibiting peptide (LOM-MIP), a novel biologically active neuropeptide from *Locusta migratoria*. *Regul Pept*, 36, 111-119.

Schoofs, L., Holman, G., Paemen, L., Veelaert, D., Amelinckx, M., De Loof, A. (1993). Isolation, identification, and synthesis of PDVDHFLRFamide (SchistoFLRFamide) in *Locusta migratoria* and its association with the male accessory glands, the salivary glands, the heart, and the oviduct. *Peptides*, 14, 409-421.

Schoofs, L., Hamdaoui, A., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Loof, A. (1998). The ovary of the desert locust *Schistocerca gregaria* contains a glycine- and proline-rich peptide that displays sequence similarities with a new class of GPRP proteins from plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 243, 390-394.

- Sevala, V., Sevala, V., Davey, K., Loughton, B. (1992). A FMRFamide-like peptide is associated with the myotropic ovulation hormone in *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 20, 193-203.
- Sevala, V., Sevala, V., Loughton, B. (1993). FMRFamide-like activity in the female locust during vitellogenesis. *J Comp Neurol*, 337(2), 286-294.
- Smart, D., Johnston, C., Curry, W. J., Williamson, R., Maule, A., Skuce, P., Shaw, C., Halton, D., Buchanan, K. (1994). Peptides related to the *Diptoptera punctata* allatostatins in nonarthropod invertebrates: an immunocytochemical survey. *J Comp Neurol*, 347, 426-432.
- Smit, A., Jimenez, C., Dirks, R., Croll, R., Geraerts, W. (1992). Characterization of a cDNA clone encoding multiple copies of the neuropeptide APGWamide in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci*, 12, 1709-1715.
- Smit, A., van Kesteren, R., Spijker, S., Van Minnen, J., van Golen, F. A., Jimenez, C. R., Li, K. (2003). Peptidergic modulation of male sexual behavior in *Lymnaea stagnalis*: structural and functional characterization of -FVamide neuropeptides. *J Neurochem*, 87, 1245-1254.
- Smith, S., Nason, J., Croll, R. (1997). Detection of APGWamide-like immunoreactivity in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Neuropeptides*, 31, 155-165.
- Sole, N., Barany, G. (1992). Optimization of solid-phase synthesis of [Ala⁸]-dynorphin A. *J Org Chem*, 57(20), 5399-5403.
- Spittaels, K., Vankeerberghen, A., Schoofs, L., Proost, P., Van Damme, J., De Loof, A. (1996). Isolation and characterization of *Locusta migratoria* accessory gland myotropin I (Lom-Ag-MT-I) from the brain of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 31, 149-155.
- Sugi, H., Iwamoto, H., Shimo, M., Shirakawa, I. U. (1999). Evidence for load-bearing structures specialized for the catch state in *Mytilus* smooth muscle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 122, 347-353.
- Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H., Isaka, S. (1981). Purification and the primary structure of sperm-activity peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem Biophys Res Commun*, 99, 1238-1244.
- Suzuki, N., Shimomura, H., Radany, E., Ramarao, C., Ward, G., Bentley, J., Garbers, D. (1984). A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. *J Biol Chem*, 259, 14874-14879.
- Suzuki, N., Yamaguchi, M. (1986). Species specific respiratory stimulation of sea urchin (*Clypeaster japonicus*) spermatozoa by an egg associated factor. *Zoolog Sci*, 3, 801-806.
- Suzuki, N., Kurita, M., Yoshino, K., Yamaguchi, M. (1987). Speract binds exclusively to sperm tails and causes an electrophoretic mobility shift in a major sperm tail protein of sea urchins. *Zoolog Sci*, 4, 641-648.
- Suzuki, N., Kajiura, H., Nomura, K., Garbers, D. L., Yoshino, K., Kurita, M., Tanaka, H., Yamaguchi, M. (1988a). Some more speract derivatives associated with eggs of sea urchins, *Pseudocentrotus*

depressus, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Hemicentrotus pulcherrimus* and *Anthocardis crassispira*.
Comp Biochem Physiol B, 89, 687-693.

Suzuki, N., Yoshino, K., Kurita, M., Nomura, K., Yamaguchi, M. (1988b). A novel group of sperm activating peptides from the sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. Comp Biochem Physiol, 90, 305-311.

Suzuki, N., Yoshino, K. (1992). The relationship between amino acid sequences of sperm-activating peptides and the taxonomy of echinoids. Comp Biochem Physiol B, 102, 679-690.

Suzuki, N. (1995). Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. Zoolog Sci, 12, 13-27.

Suzuki, T., Hara, A., Yamaguchi, K., Mori, K. (1992). Purification and immunolocalization of the vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mar Biol, 113, 239-245.

T.

Takahashi, T., Matsushima, O., Morishita, F., Fujimoto, M., Ikeda, T., Minakata, H., Nomoto, K. (1994). A myomodulin-CARP-related peptide isolated from a polychaete annelid, *Perinereis vancaurica*. Zoolog Sci, 11, 33-38.

Takao, T., Yoshino, K., Suzuki, N., Shimonishi, Y. (1990). Analysis of post-translational modifications of proteins by accurate mass measurements in fast atom bombardment mass spectrometry. Biomed environ Mass Spectrom, 19, 705-712.

Takuwa-Kuroda, K., Iwakoshi-Ukena, E., Kanda, A., Minakata, H. (2003). *Octopus*, which owns the most advanced brain in invertebrates, has two members of vasopressin/oxytocin superfamily as in vertebrates. Regul Pept, 115, 139-149.

Taussig, R., Scheller, R. (1986). The *Aplysia* FMRFamide gene encodes sequences related to mammalian brain peptides. DNA, 5, 453-461.

Tompsett, D. (1939). *Sepia*. Liverpool: Liverpool University press.

Toyoda, F., Yamamoto, K., Iwata, T., Hasunuma, I., Cardinali, M., Mosconi, G., Polzonetti-Magni, A., Kikuyama, S. (2004). Peptides pheromones in newts. Peptides, 25, 1531-6.

U.

Uttenweiler-Joseph, S., Moniatte, M., Lagueux, M., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J. A., Bulet, P. (1998). Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 11342-11347.

V.

- van Golen, F., Li, K., de Lange, R., Jespersen, S., Geraerts, W. (1995a). 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.
- van Golen, F., Li, K., De Lange, R., Van Kesteren, R., Van Der Schors, R., Geraerts, W. (1995b). Co-localized neuropeptides conopressin and ALA-PRO-GLY-TRP-NH₂ have antagonistic effects on the vas deferens of *Lymnaea*. *Neuroscience*, 69, 1275-1287.
- van Golen, F., Li, K., Chen, S., Jimenez, C., Geraerts, W. (1996). Various isoforms of myomodulin identified from the male copulatory organ of *Lymnaea* show overlapping yet distinct modulatory effects on the penis muscle. *J Neurochem*, 66, 321-329.
- Vanden Broeck, J., Veelaert, D., Bendena, W., Tobe, S., De Loof, A. (1996). Molecular cloning of the precursor cDNA for schistostatins, locust allatostatin-like peptides with myoinhibiting properties. *Mol Cell Endocrinol*, 122, 191-198.
- Veelaert, D., Devreese, B., Schoofs, L., Van Beeumen, J., Vanden Broeck, J., Tobe, S., De Loof, A. (1996). Isolation and characterization of eight myoinhibiting peptides from the desert locust, *Schistocerca gregaria*: new members of the cockroach allatostatin family. *Mol Cell Endocrinol*, 122, 183-190.
- Verhaert, P., Uttenweiler-Joseph, S., de Vries, M., Loboda, A., Ens, W., Standing, K. (2001). Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry: an elegant tool for peptidomics. *Proteomics*, 1, 118-131.
- Vreugdenhil, E., Jackson, J., Bouwmeester, T., Smit, A., Van Minnen, J., Van Heerikhuizen, H., Klootwijk, J., Joosse, J. (1988). Isolation, characterization, and evolutionary aspects of a cDNA clone encoding multiple neuropeptides involved in the stereotyped egg-laying behavior of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci*, 8, 4184-4191.

W.

- Wagele, J., Stanjek, G. (1995). Arthropod phylogeny inferred from partial 12S rRNA revisited: monophyly of the Tracheata depends on sequence alignment. *J Zool Syst Evol Res*, 33, 75-80.
- Wang, L., Hanna, P. (1998). Isolation, cloning, and expression of DNA sequence encoding an egg-laying hormone of the backlip abalone (*Haliotis rubra* leach). *J Shellfish Res*, 17, 789-793.
- Weiss, M., Anderson, D., Raffioni, S., Bradshaw, R., Ortenzi, C., Luporini, P., Eisenberg, D. (1995). A cooperative model for receptor recognition and cell adhesion: evidence from the molecular packing in the 1.6-Å crystal structure of the pheromone Er-1 from the ciliated protozoan *Euplotes raikovi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 10172-10176.
- Wells, M., Wells, J. (1959). Hormonal control of sexual maturity in *Octopus*. *J exp Biol*, 36, 1-33.
- Wells, M. (1960). Optic glands and the ovary of *Octopus*. *Symp Zool Soc Lond*, 2, 87-101.

- Wells, M., Wells, J. (1969). Pituitary analogue in the *Octopus*. *Nature*, 222, 293-294.
- Wells, M., Wells, J. (1972). Sexual displays and mating of *Octopus vulgaris* Cuvier and *Octopus cyanea* Gray and attempts to alter performance by manipulating the glandular condition of the animals. *Anim Beh*, 20, 293-308.
- Wells, M., O'Dor, R., Buckley, S. (1975). An in vitro bioassay for a molluscan gonadotropin. *J exp Biol*, 62, 433-446.
- Wells, M., Wells, J. (1977). Optic glands and endocrinology of reproduction. *Symp Zool Soc Lond*, 38, 525-540.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., De Wachter, R. (1996). Investigation of molluscan phylogeny on the basis of 18S rRNA sequences. *Mol Biol Evol*, 13, 1306-1317.
- Wolfner, M. (1997). Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem Mol Biol*, 27, 179-192.
- Woodhead, A. P., Stay, B., Seidel, S. L., Khan, M. A., Tobe, S. S. (1989). Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5997-6001.
- Woodhead, A., Khan, M., Stay, B., Tobe, S. (1994). Two new allatostatins from the brains of *Diploptera punctata*. *Insect Biochem Mol Biol*, 24, 257-263.
- Woodhead, A., Thompson, M., Chan, K., Stay, B. (2003). Allatostatin in ovaries, oviducts, and young embryos in the cockroach *Diploptera punctata*. *J Insect Physiol*, 49, 1103-1114.
- Worster, B., Yeoman, M., Benjamin, P. (1998). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometric analysis of the pattern of peptide expression in single neurons resulting from alternative mRNA splicing of the FMRFamide gene. *Eur J Neurosci*, 10, 3498-3507.

Y.

- Yoshino, K., Takao, T., Yamaguchi, M., Shimonishi, Y., Suzuki, N. (1990). Derivatives of sperm-activating peptide III (SAP-III) associated with eggs of sand dollars, *Clypeaster japonicus* and *Astriclypeus manni*. *Comp Biochem Physiol*, 97B, 679-685.
- Yoshino, K., Takao, T., Suhara, M., Kitai, T., Hori, H., Nomura, K., Yamaguchi, M., Shimonishi, Y., Suzuki, N. (1991). Identification of a novel amino acid, o-bromo-L-phenylalanine, in egg-associated peptides that activate spermatozoa. *Biochemistry*, 30, 6203-6209.
- Yoshino, K., Takao, T., Shimonishi, Y., Suzuki, N. (1992). Sperm-activating peptide type-V (SAP-V), a fifth member of the sperm-activating peptide family, purified from the egg-conditioned media of the heart urchin *Brissus agassizii*. *Comp Biochem Physiol B*, 102, 691-700.
- Young, J. (1970). Neurovenous tissues in cephalopods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 257, 309-321.

Z.

- Zatylny, C., Durantou, F., Boucaud-Camou, E., Henry, J. (2000a). Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying. *Mol Reprod Dev*, 55, 182-188.
- Zatylny, C., Gagnon, J., Boucaud-Camou, E., Henry, J. (2000b). ILME: a waterborne pheromonal peptide released by the eggs of *Sepia officinalis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 275, 217-222.
- Zatylny, C., Gagnon, J., Boucaud-Camou, E., Henry, J. (2000c). The SepOvotropin: a new ovarian peptide regulating oocyte transport in *Sepia officinalis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 276, 1013-1018.
- Zatylny, C. (2000d). Etude du contrôle de la ponte chez la seiche *Sepia officinalis* L.: Applications à la conservation des stocks et au repeuplement dans l'Ouest Cotentin. Thèse de Doctorat, Université de Caen, pp 1-119.
- Zatylny, C., Marvin, L., Gagnon, J., Henry, J. (2002). Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 1186-1193.
- Zeeck, E., Müller, C., Beckmann, M., Hardege, J., Papke, U., Sinnwell, V., Schroeder, F., Francke, W. (1998). Cysteine-glutathione disulfide, the sperm-release pheromone of the marine polychaete *Nereis succinea* (Annelida: Polychaeta). *Chemoecology*, 8, 33-38.

Contrôle de la ponte ovulaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: utilisation du modèle *Sepia officinalis* pour la caractérisation de peptides régulateurs.

Résumé

Si l'influence des paramètres environnementaux sur la physiologie de l'huître creuse *C. gigas* a fait l'objet de nombreuses études, les acteurs moléculaires internes sont encore mal connus. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au contrôle peptidergique de la ponte ovulaire. Afin de caractériser chez l'huître creuse des peptides impliqués dans la régulation de cette étape, la seiche *S. officinalis* a été utilisée comme modèle. Dans un premier temps, des peptides régulateurs ont été recherchés chez la seiche, par une approche originale de type peptidomique. Celle-ci a permis de caractériser onze nouveaux régulateurs ovariens qui se répartissent, sur le plan structural, en deux familles : les SepCRPs (*Sepia* Capsule Releasing Peptides) et les OJPs (Ovarian Jelly Peptides). Libérés par les ovocytes dans les voies génitales, ils participent au stockage des ovocytes avant la ponte et à la sécrétion de la capsule externe de l'œuf. Dans un deuxième temps, des peptides apparentés aux peptides de seiche ont été recherchés chez l'huître. Cette stratégie n'ayant pas aboutie, l'utilisation d'un bioessai basé sur les contractions de l'oviducte de seiche a permis d'identifier le premier peptide régulateur impliqué dans l'émission des ovocytes chez l'huître creuse : PIESVD. Ce peptide module spécifiquement les contractions du muscle adducteur chez les femelles matures, contractions qui sont à l'origine de l'évacuation des ovocytes dans le milieu environnant. Parallèlement, l'APGWamide a été identifié dans les produits génitaux mâles chez la seiche et chez l'huître par analyse du peptidome. Ce neuropeptide module le transport des ovocytes chez ces deux espèces. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour les écloséries commerciales et expérimentales, en particulier pour l'isolement des femelles matures en vue de manipulations génétiques et fécondations *in vitro*.

Ovulation control in the japanese oyster *Crassostrea gigas*: *Sepia officinalis* as a model for the characterisation of regulatory peptides.

Abstract

Despite the fact that the involvement of environmental factors in the physiology of the japanese oyster *C. gigas* is fully described, regulatory peptides are not known. In this study, we focused on peptidergic control of egg-laying. In order to characterize peptides involved in the regulation of egg-laying in *C. gigas*, the cuttlefish *S. officinalis* was used as a model. Firstly, regulatory peptides were investigated in the cuttlefish by peptidomic analysis. This approach led to the identification of eleven new ovarian regulatory peptides. Based on conserved tags, these peptides have been classified into two families: the SepCRPs (*Sepia* Capsule Releasing Peptides) and the OJPs (Ovarian Jelly Peptides). Released by oocytes into the genital coelom, they are responsible for the storage of oocytes before mating and external egg capsule secretion. In a second step, peptides related to SepCRPs and OJPs were investigated in oysters by means of mass spectrometry, but without any success. Nevertheless, using a myotropic bioassay based on recorded cuttlefish oviduct contractions, the first ovarian regulatory peptide from the oyster was characterized: PIESVD. This peptide triggers adductor muscle contractions in mature females, these contractions being involved in oocyte release. Subsequently, peptidomic analysis of male genital products led to the identification of APGWamide in both cuttlefish and oysters. This neuropeptide triggers oocyte release in both species. Thus, in commercial and experimental hatcheries, APGWamide and PIESVD could be used for the selection of mature females to perform genetic manipulations and *in vitro* fertilizations.

Mots clés : Mollusques, Bivalves, Céphalopodes, Peptides, Spectrométrie de masse, Ovaire, Ostréiculture.