



Ifremer

N° attribué par la bibliothèque

Université de CAEN/BASSE-NORMANDIE

Institut de Biochimie et de Biologie Appliquée
Ecole Doctorale Normande Chimie-Biologie
Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines

THESE
présentée par

Linda GRICOURT

Soutenue le 26 avril 2002

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE CAEN

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

(Arrêté du 30 mars 1992)

Implication des molécules du système insuline/IGF dans la croissance et la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : effets biologiques *in vitro* d'un ligand hétérologue (IGF-1 recombinant humain), caractérisation et expression d'un récepteur homologue de type insuline.

Composition du jury

Directeur de thèse : **M. M. MATHIEU**, *Professeur, Université de Caen*

M. J.-F. SAMAIN	<i>Chercheur, Centre IFREMER de Brest</i>	Rapporteur
M. D. SELLOS	<i>Chargé de Recherches CNRS, MNHN, Collège de France, Concarneau</i>	Rapporteur
M. J.-P. TRILLES	<i>Professeur, Université Montpellier 2</i>	Examineur
M. D. BOUJARD	<i>Professeur, Université Rennes 1</i>	Examineur
M. P. FAVREL	<i>Professeur, Université de Caen</i>	Examineur
M. M. MATHIEU	<i>Professeur, Université de Caen</i>	Examineur

A mon frère Stéphane,

- Avant Propos -

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines de l'Université de Caen, associé au centre IFREMER de Brest dans le cadre de l'Unité Mixte de Recherche "Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques".

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à M. le Professeur M. MATHIEU, directeur du laboratoire, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et qui m'a confié ce sujet de recherche. Pour votre confiance, disponibilité et expérience, je vous en suis sincèrement reconnaissante.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma plus profonde reconnaissance ainsi que toute mon amitié à Mme Kristell KELLNER, Maître de Conférences à l'Université de Caen. Pour ton encadrement scientifique rigoureux, ta très grande disponibilité et gentillesse, je t'en remercie vivement.

Je suis très honorée que M. D. SELLOS, Chargé de Recherche au CNRS, Station Marine de Concarneau/Muséum National d'Histoire Naturelle, ait accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Je remercie M. J.-F. SAMAIN, du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés du centre IFREMER de Brest, d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous en suis reconnaissante.

Je suis très honorée de compter parmi les membres du jury M. J.-P. TRILLES, Professeur à l'Université de Montpellier 2. Je vous prie de trouver dans ces quelques mots l'expression de toute ma reconnaissance.

Je souhaite également exprimer tous mes remerciements à M. D. BOUJARD, Professeur à l'Université de Rennes 1, pour avoir accepté de faire partie de ce jury ainsi que pour m'avoir si gentiment accueillie au sein de son laboratoire dans le cadre d'une collaboration scientifique des plus intéressantes et fructueuses.

J'associe à ces remerciements, avec toute ma sympathie et gratitude, Mme G. BONNEC qui m'a initiée à l'hybridation in situ et qui m'a fait profiter de son expérience.

Que M. P. FAVREL, Professeur à l'Université de Caen, soit ici remercié pour l'intérêt porté à ce travail et pour m'avoir inculqué les bases de la biologie moléculaire.

Je souhaite également associer à ces remerciements, M. Christophe LELONG, Maître de Conférences à l'Université de Caen. Pour ta gentillesse, disponibilité et soutien, je te remercie.

Je n'oublie pas l'équipe de Mme Colette DISSOUS, de l'Institut Pasteur de Lille, qui m'a très gentiment accueillie et guidée dans ma quête en biologie moléculaire.

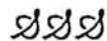
Je tiens à exprimer ma plus profonde sympathie à Mme Katherine COSTIL, Maître de Conférences à l'Université de Caen, pour sa bonne humeur et son aide précieuse dans les analyses statistiques.

J'associe à ces remerciements M. Brice DUBOIS pour sa gentillesse et sa grande disponibilité.

Je remercie également M. J.-P. ROBIN, Maître de Conférences à l'Université de Caen, et M. Vincent DENIS, Docteur de l'Université de Caen, pour le temps consacré à résoudre mes démêlés informatiques au cours de ces années passées au laboratoire.

Mes remerciements s'adressent également à Mme Joëlle BARBIER, technicienne au laboratoire, pour la préparation des échantillons histologiques.

Je souhaite exprimer enfin toute ma reconnaissance et mon amitié à tous ceux qui m'ont aidé au cours de ce travail et particulièrement aux enseignants chercheurs, aux étudiants et au personnel technique du Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines. Avec une reconnaissance toute particulière à Clothilde, Juliette, Amandine, Christophe, Vincent, Didier, Benoît, Antoine, Jean-Marc, Fabien, et à tous les autres joyeux lurons qui hantent le laboratoire...



Pendant deux années, j'ai pu bénéficier d'un financement de thèse, c'est pourquoi je tiens à associer à ces remerciements les différents organismes financeurs : les fonds structurels européens (FEDER) dans le cadre du soutien aux activités de recherche appliquée et DIELEN Laboratoires et son Président Directeur Général M. B. NOEL.

A mes Parents ;

*A mon frère et à ma belle-sœur,
et leur petit Léo ;*

A Mikaël ;

A ma famille et à mes amis.

- Résumé -

L'ostréiculture française repose essentiellement sur l'exploitation d'une seule espèce, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Face aux difficultés rencontrées par la profession, une meilleure compréhension de la reproduction et de la croissance de ces animaux s'avère essentielle.

L'implication de molécules de la famille des insulines/IGFs dans la régulation de ces processus physiologiques a été recherchée chez *C. gigas* : l'effet biologique de l'IGF-1 recombinant humain (IGF-1 rh) a été suivi au cours d'un cycle biologique sur des cellules de gonade et de bord du manteau, tissus cibles de la reproduction et de la croissance somatique et coquillière chez l'huître.

- L'IGF-1 rh stimule les proliférations cellulaires dans la gonade en période de multiplication des cellules germinales (68% à 10^{-12} M) et active les synthèses de protéines des cellules germinales lors de la période de développement et de maturation des gamètes (41% à 10^{-13} M).

- L'IGF-1 rh stimule les synthèses protéiques des cellules de bord du manteau en période de croissance des parties molles de l'huître (57,5% à 10^{-11} M) et de pousse coquillière active (56% à 10^{-10} M).

Ces données indiquent que des molécules de type insuline/IGF seraient impliquées dans le contrôle de la reproduction et de la croissance chez *C. gigas*.

L'effet saisonnier de molécules de type insuline/IGF peut être associé à une expression différentielle des récepteurs spécifiques de ces molécules. L'existence de ces récepteurs a été mise en évidence chez *C. gigas* par le déplacement de la liaison de l'IGF-1 rh au niveau des différents tissus cibles. De plus, la caractérisation d'un récepteur homologue de type insuline a été réalisée par une approche de biologie moléculaire. Ce récepteur présente une relative conservation avec les autres récepteurs de la famille. Il s'exprime de façon ubiquitaire chez l'adulte, son niveau d'expression variant selon les tissus, et présente une expression différentielle au cours du développement larvaire.

- Summary -

Oyster rearing along the French Atlantic coastline relies upon a single species, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In this context, understanding of reproduction and growth processes would be useful to cope with the difficulties coming upon the profession - spawn obtention, summer mortalities, epizootic risks and growth problems.

Involvement of some molecules belonging to insulin/IGF superfamily in regulation of growth and reproduction has been investigated in *C. gigas*. *In vitro* biological effects of human recombinant IGF-1 (IGF-1 rh) on gonadic and mantle edge cells - which are target tissues to oyster reproduction, somatic growth and shell growth - have been followed up during an annual cycle.

- IGF-1 rh stimulates cell proliferation during germinal cells multiplication stage (68% at 10^{-12} M). It also activates germinal cells protein synthesis during gametes development and maturation (41% at 10^{-13} M). These results indicate that *C. gigas* reproduction may be under partial control of some insulin/IGF-like molecules.

- IGF-1 rh stimulates mantle edge cells protein synthesis during oyster soft tissues growth (57,5% at 10^{-11} M) and active shell growth (56% at 10^{-10} M).

These results suggest that insulin/IGF-like molecules may also be involved in somatic growth control.

Insulin/IGF-like seasonal effect on those biological processes can be associated with differential expression of their specific receptors. In *C. gigas*, the occurrence of such a receptor has been enlightened studying the shift of IGF-1 rh binding to its target tissues. Furthermore, a homologous insulin-like receptor has been characterised using a molecular biology approach. This receptor presents a relative conservation when compared to other members of the family. Its expression is ubiquitous during adult stage even though expression level is tissue specific. The receptor also shows a differential pattern of expression during larval development.

- Sommaire -

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : SYSTEME INSULINE/IGF CHEZ LES VERTEBRES ET LES INVERTEBRES.....	9
1. <u>GENERALITES</u>	9
2. <u>LES LIGANDS DU SYSTEME INSULINE/IGF</u>	10
2.1. <u>Les ligands insuline et IGFs chez les Vertébrés</u>	10
2.1.1. <u>L'insuline</u>	10
2.1.2. <u>Les IGF de type 1 (IGF-1) et de type 2 (IGF-2)</u>	11
2.2. <u>Les molécules de type insuline chez les Agnathes (cyclostomes) et les Prochordés (Urochordés et Céphalocordés)</u>	12
2.2.1. <u>Chez les Agnathes (cyclostomes)</u>	12
2.2.2. <u>Chez les Tuniciers (Urochordés)</u>	13
2.2.3. <u>Chez les Céphalochordés</u>	14
2.3. <u>Molécules de type insuline chez les Invertébrés</u>	15
2.3.1. <u>Chez les Arthropodes</u>	15
2.3.2. <u>Chez les Mollusques</u>	18
2.3.3. <u>Chez les Nématodes</u>	20
2.4. <u>Evolution des ligands du système insuline/IGF</u>	21
3. <u>LES PROTEINES DE LIAISON DES IGFs (IGFBPs)</u>	22
4. <u>LES RECEPTEURS DU SYSTEME INSULINE/IGF</u>	24
4.1. <u>Les récepteurs à l'insuline et aux IGFs chez les Vertébrés</u>	24
4.1.1. <u>Le récepteur à l'insuline</u>	24
4.1.2. <u>Le récepteur à l'IGF de type 1</u>	26
4.1.3. <u>Le récepteur à l'IGF de type 2</u>	27
4.1.4. <u>Le récepteur apparenté au récepteur à l'insuline humain, les récepteurs hybrides et atypiques</u>	28
4.2. <u>Le récepteur de l'amphioxus (Prochordé)</u>	29
4.3. <u>Les récepteurs de type insuline chez les Invertébrés</u>	29
4.3.1. <u>Chez les Arthropodes</u>	29
4.3.2. <u>Chez les Mollusques</u>	30
4.3.3. <u>Chez les Nématodes</u>	31
4.3.4. <u>Chez les Cnidaires</u>	31
4.3.5. <u>Chez les Spongiaires</u>	31
4.4. <u>Evolution des récepteurs du système insuline/IGF</u>	32
5. <u>LES VOIES DE SIGNALISATION DU SYSTEME INSULINE/IGF</u>	32
CHAPITRE II : APPROCHE CELLULAIRE DU SYSTEME INSULINE/IGF CHEZ L'HUITRE : EFFETS BIOLOGIQUES IN VITRO ET DEPLACEMENT D'UNE LIAISON.....	35
I. <u>INTRODUCTION</u>	35
II. <u>MATERIEL ET METHODES</u>	39
II.1. <u>Matériel biologique</u>	39
II.2. <u>Histologie</u>	39

2.1. Echantillonnage.....	39
2.2. Fixation des tissus et montage des lames.....	39
II.3. Préparation des suspensions cellulaires.....	39
3.1. Conditions de stérilité.....	39
3.2. Milieu de dissociation et de maintien des cellules.....	40
3.3. Prélèvement et dissociation des tissus.....	40
3.4. Dénombrement et estimation de la viabilité cellulaire.....	40
II.4. Tests biologiques in vitro.....	41
4.1. Préparation de l'IGF-1 recombinant humain (IGF-1 rh).....	41
4.2. Mesure de l'incorporation de [¹⁴ C]-acides aminés dans les protéines.....	41
4.3. Mesure de l'incorporation de [³ H]-thymidine dans l'ADN.....	42
4.4. Réalisation des tests biologiques in vitro.....	42
4.5. Validation des résultats : réplicats, témoins et analyse statistique.....	42
II.5. Liaison de l'IGF-1 recombinant humain (IGF-1 rh).....	43
5.1. Préparation de membranes plasmiques.....	43
5.2. Mesure de la liaison.....	43
5.2.1. Quantité optimale de membranes.....	44
5.2.2. Cinétique de la liaison.....	44
5.2.3. Mesure de la liaison de l'IGF-1 rh.....	44
5.2.4. Représentations de la mesure de la liaison.....	44
5.2.4.1. Capacité de déplacement de la liaison totale.....	44
5.2.4.2. Représentation de Scatchard.....	45
III. RESULTATS.....	46
III.1. Suivi histologique des variations saisonnières de la gonade.....	46
1.1. Evolution qualitative de la gamétogenèse.....	46
1.2. Evolution qualitative du tissu de réserve.....	47
III.2. Effets biologiques in vitro de l'IGF-1 rh sur les cellules de la gonade.....	48
2.1. Suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses d'ADN.....	48
2.2. Suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines.....	48
III.3. Effets biologiques in vitro de l'IGF-1 rh sur les cellules du bord du manteau.....	49
3.1. Suivi annuel des synthèses de protéines et d'ADN des cellules du bord du manteau.....	49
3.2. Suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines.....	50
3.3. Suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses d'ADN.....	50
III.4. Liaison de l'IGF-1 rh à des membranes de bord du manteau, de gonade et de palpes labiaux.....	51
4.1. Cinétique de la liaison.....	51
4.2. Concentration optimale en protéines de membranes plasmiques.....	51
4.3. Capacité de déplacement de la liaison totale de [¹²⁵ I]-IGF-1 rh par l'IGF-1 rh.....	51
4.4. Représentation de Scatchard de la liaison de l'IGF-1 rh.....	52
IV. DISCUSSION.....	53

CHAPITRE III : CARACTERISATION ET EXPRESSION D'UN RECEPTEUR DE TYPE INSULINE HOMOLOGUE 72

I. INTRODUCTION.....	72
II. MATERIEL ET METHODES.....	74

<i>II.1. Caractérisation du précurseur du récepteur endogène</i>	74
1.1. Animaux.....	74
1.2. Amorces oligonucléotidiques utilisées (5'→3').....	74
1.3. Extraction des ARN.....	75
1.3.1. Extraction des ARN totaux.....	75
1.3.1.1. Tissus adultes.....	75
1.3.1.2. Ovocytes et larves.....	76
1.3.2. Purification des ARN polyadénylés.....	76
1.4. Amplification par "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction" : RT-PCR.....	77
1.4.1. Transcription inverse.....	77
1.4.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	77
1.5. Amplification par la technique de "Rapid Amplification of cDNA Ends - PCR" : RACE-PCR.....	78
1.5.1. La technique de 5' et 3'RACE-PCR par l'ajout d'adaptateurs (kit "Marathon™ cDNA Amplification").....	78
1.5.1.1. Synthèse de l'ADNc.....	78
1.5.1.2. "Ligation" des adaptateurs.....	79
1.5.1.3. Amplification génique <i>in vitro</i>	79
1.5.2. La technique de 5'RACE-PCR par l'ajout en 3' d'une queue polycytidinée.....	80
1.5.2.1. Transcription inverse.....	80
1.5.2.2. Purification de l'ADNc simple brin.....	80
1.5.2.3. Synthèse de la queue polycytidinée.....	81
1.5.2.4. Amplification génique <i>in vitro</i>	81
1.6. Criblage d'une banque d'ADNc de bord de manteau.....	81
1.6.1. Préparation de la souche bactérienne hôte.....	82
1.6.2. Titrage de la banque de phages.....	82
1.6.3. Transfert des plages de lyse sur membrane.....	82
1.6.4. Marquage de la sonde.....	83
1.6.5. Hybridation des acides nucléiques avec une sonde radioactive.....	83
1.6.6. Excision <i>in vivo</i>	83
1.7. Séquençage des produits d'amplification et des fragments sous-clonés.....	84
1.7.1. Purification des fragments d'ADNc à partir du gel d'agarose.....	84
1.7.2. Sous-clonage de l'ADN dans un vecteur plasmidique.....	85
1.7.3. Transformation de bactéries électrocompétentes.....	85
1.7.4. Extraction de l'ADN plasmidique.....	86
1.7.5. Séquençage automatique.....	86
1.8. Analyses informatiques des séquences.....	87
1.8.1. Interrogation de banques de données.....	87
1.8.2. Analyse des séquences.....	87
<i>II.2. Expression du récepteur CIR</i>	88
2.1. Amorces oligonucléotidiques utilisées.....	88
2.2. Amplification par RT-PCR.....	88
2.3. Northern blotting.....	89
2.3.1. Marquage de la sonde (voir le paragraphe 1.5).....	89
2.3.2. Séparation des ARN sur gel dénaturant et transfert sur membrane.....	89
2.3.3. Hybridation.....	89
2.4. Hybridation <i>in situ</i>	90

2.4.1. Synthèse des sondes ARN sens et antisens.....	90
2.4.2. Fixation des tissus et montage des lames.....	91
2.4.3. Prétraitement et hybridation des coupes.....	91
2.4.4. Autoradiographie et révélation des lames.....	92
III. RESULTATS.....	93
<i>III.1. Caractérisation du précurseur de CIR.....</i>	<i>93</i>
1.1. Amplification par RT-PCR d'un ADNc partiel de récepteur de type insuline/IGF.....	93
1.2. Caractérisation du précurseur.....	94
1.2.1. 5' et 3' RACE-PCR ("Marathon").....	94
1.2.2. Criblage d'une banque d'ADNc.....	94
1.2.3. 5'RACE-PCR.....	95
1.3. Analyse de la séquence partielle du précurseur de CIR.....	96
1.3.1. Séquence nucléotidique.....	96
1.3.2. Séquence protéique.....	96
1.4. Comparaison de la séquence protéique du précurseur de CIR avec les séquences de récepteurs de type insuline/IGF-1 d'Invertébrés et de Vertébrés.....	98
1.5. Arbre phylogénétique.....	101
<i>III.2. Localisation et expression du messager de CIR.....</i>	<i>102</i>
2.1. Détection par "Northern blotting".....	102
2.2. Analyse qualitative de l'expression de l'ARNm de CIR par RT-PCR.....	102
2.3. Localisation des sites d'expression par Hybridation <i>In Situ</i> (HIS).....	103
IV. DISCUSSION.....	104
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	118
BIBLIOGRAPHIE	121
ANNEXES	146

-Abréviations-

ABRP	A grius B ombyxin- R elated P eptide
ADN	A cide D éoxyribo N ucléique
ADNc	A cide D éoxyribo N ucléique complémentaire
ARN	A cide R ibo N ucléique
ARNm	A cide R ibo N ucléique m essenger
BIR	B ombyx m ori I nsulin-like R eceptor
CIR	<i>Crassostrea gigas</i> I nsulin receptor-related R eceptor
DAF	D auer F ormation
DILP	D rosophila I nsulin- L ike P eptide
EGR	E arly G rowth R esponse
FAO	F ood and A griculture O rganisation of the United Nations
GnRH	G onadotropin R eleasing H ormon
HSC	H eat S hock C ognate protein
HSP	H eat S hock P rotein
IFREMER	I nstitut F rançais pour la R echerche et l' E xploitation de la MER
IGF rh	I nsulin-like G rowth F actor r ecombinant h umain
IGF	I nsulin-like G rowth F actor
IGFBP	I nsulin-like G rowth F actor B inding P rotein
IGFBP-rPs	I nsulin-like G rowth F actor B inding P rotein related P eptides
ILP	I nsulin- L ike P eptide
IRR	I nsulin R eceptor-related R eceptor
IRS-1	I nsulin R eceptor S ubstrate type 1
LBBM	L aboratoire de B iologie et B iotecnologies M arines
LGCs	L ight G reen C ells
LIRP T1	L ocusta I nsulin- R elated P eptide T ranscript 1
LIRP T2	L ocusta I nsulin- R elated P eptide T ranscript 2
MDCs	M edio D orsal C ells
mGDF	m olluscan G rowth and D ifferentiation F actor
MIP	M olluscan I nsulin-related P eptide
MIPR	M olluscan I nsulin-related P eptide R eceptor
MIR	M osquito I nsulin R eceptor
MLN	M edian L ip N erves
MTT	3-(4,5-di M éthyl T hiazol-2-yl)-2,5-diphényl T étrazolium bromide
3' NTR	E xtrémité 3' N on T Raduite de l'ARN messenger
5' NTR	E xtrémité 5' N on T Raduite de l'ARN messenger
RACE-PCR	R apid A mplification of c DNA E nds - P CR
REG	R eticulum E ndoplasmique G ranuleux
RIGF-1	R écepteur à l' I GF-1

RIGF-2	R écepteur à l' I GF-2
Rins	R écepteur à l' i nsuline
RT-PCR	R everse T ranscriptase - P olymerase C hain R eaction
SATMAR	S ociété A Tlantique de M ARiculture
SBRP	S amia B ombyxin- R elated P eptide
TCA	T ri C hloro A cetic acid
TGF-β	T ransforming G rowth F actor-β

Introduction Générale

L'huître est un Mollusque bivalve de la famille des Ostréidés. Au sein de cette famille, la classification distingue plusieurs genres, dont deux sont actuellement présents sur nos côtes et font l'objet d'une ostréiculture développée :

- le genre *Ostrea*, représenté par l'huître plate européenne *Ostrea edulis*, fut décimé dans les années 1970 par deux parasitoses successives (Grizel *et al.*, 1974) provoquées par les protozoaires *Marteilia refringens* (maladie dite des Abers ou de la glande digestive en 1974) et *Bonamia ostreae* (la bonamiose en 1979) ; toutefois quelques gisements ont subsisté et leur exploitation fournit actuellement une production de base constante.

- le genre *Crassostrea* qui regroupe plusieurs espèces réparties dans le monde entier, dont les deux espèces les plus importantes sur le plan ostréicole : *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*. En Europe, l'espèce *Crassostrea angulata*, originaire du Portugal, a été importée en France et cultivée jusque dans les années 70 où elle a disparu, victime d'une épizootie virale, la "maladie des branchies" (Comps et Duthoit, 1976). Son remplacement par *Crassostrea gigas* a permis l'essor de l'ostréiculture en France ces dernières années.

Situation économique de la conchyliculture.

La culture de Mollusques bivalves est une activité très ancienne pratiquée dans la plupart des pays qui possèdent une façade littorale. L'huître est l'espèce la plus cultivée au monde : sa production annuelle dépasse 3,5 millions de tonnes en provenance majoritaire de Chine, premier producteur mondial (78% de la production mondiale). La France occupe le 4^{ème} rang mondial avec une production annuelle qui avoisine les 150 000 tonnes (5% de la production mondiale) (données F.A.O, 1999) ce qui représente près de 90% de la production européenne. La région Basse-Normandie est l'une des plus importantes régions ostréicoles françaises : elle produit 30 000 tonnes d'huîtres destinées soit à la consommation, soit à l'exportation vers d'autres régions ostréicoles françaises, comme la région de Marennes Oléron qui pratique sur les huîtres normandes un affinage spécifique (verdissement des branchies par les pigments de la microalgue *Haslea ostrearia*) qui leur confère un label de qualité commerciale. La production bas-normande est répartie dans quatre principaux sites de production : Meuvaines-Asnelles, la Baie des Veys, Saint-Vaast-la-Hougue et la côte ouest du Cotentin. L'ostréiculture repose sur un approvisionnement en naissain en quantité suffisante et de bonne qualité, issu soit du captage naturel soit de la production en éclosérie, et sur l'optimisation de la croissance de ce naissain jusqu'à sa commercialisation. La compréhension et la maîtrise des processus de reproduction, de développement larvaire et de

croissance de ces animaux s'avèrent donc essentielles pour le développement de cette pratique.

Reproduction.

L'appareil reproducteur, localisé dans la région gonadique, tissu mixte entre la glande digestive et le manteau, est constitué de tubules gonadiques, plus ou moins développés selon le stade de la gamétogenèse, et de tissu de réserve. En période de maturité sexuelle, les tubules gonadiques envahissent la totalité de la région gonadique qui, du fait de son aspect laiteux et de sa coloration blanchâtre, devient visible. Cet appareil génital ne présente pas d'organes sexuels accessoires.

Chez les huîtres creuses *Crassostrea gigas*, la sexualité est dite alternative, les animaux présentant parfois des changements de sexe d'un cycle gamétogénétique à l'autre. Le déterminisme de cet hermaphrodisme successif facultatif reste encore mal connu, impliquant certainement des facteurs externes (température et alimentation) mais aussi des facteurs internes. Seuls quelques cas d'hermaphrodisme "vrais" (présence simultanée de gamètes mâles et femelles dans la même gonade) ont été observés.

La reproduction comprend globalement trois phases : en automne, une phase de repos sexuel marquée par la réorganisation du tissu de réserve (après la ponte) ; en hiver et au printemps, une phase de développement des tubules gonadiques, de multiplication des cellules germinales par mitoses successives puis de maturation des gamètes ; au cours de la troisième phase en été a lieu l'émission des gamètes matures. Ces gamètes matures sont émis par "pontes" successives directement dans l'eau de mer où se déroule la fécondation ; l'huître creuse est une espèce ovipare à fécondation et développement externes, à la différence de l'huître plate *Ostrea edulis* chez laquelle ces processus ont lieu dans la cavité palléale. Sur les côtes françaises, selon les conditions environnementales, l'émission des gamètes est plus ou moins complète : dans les régions les plus au sud (Côtes Aquitaines et Charentaises) la ponte est totale, alors que dans les régions plus au nord (Normandie et Bretagne), où la température de l'eau est plus basse, la ponte est partielle et de nombreux gamètes résiduels subsistent dans la gonade après la ponte estivale.

Les différentes phases de la reproduction présentent donc une périodicité qui peut subir quelques variations chronologiques selon les conditions environnementales. Lors de chaque nouveau cycle, la gamétogenèse est réinitiée dans les tubules régressés qui se situent à la périphérie de la région gonadique, accolés à l'épithélium qui limite cette région. Dans ces

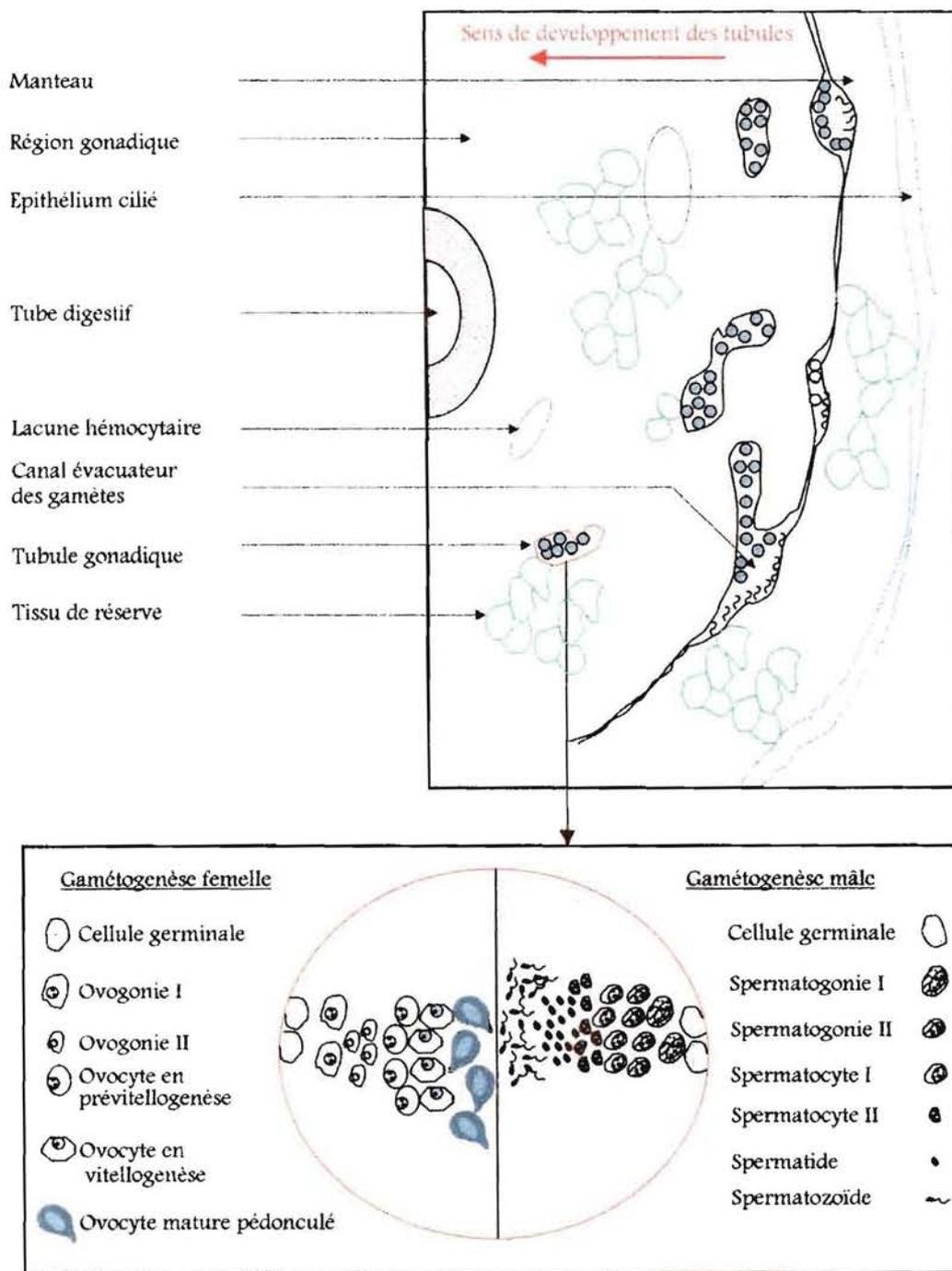


Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'huître creuse *Crassostrea gigas*. Détail d'un tubule gonadique.

(D'après Heude-Berthelin, 2000).

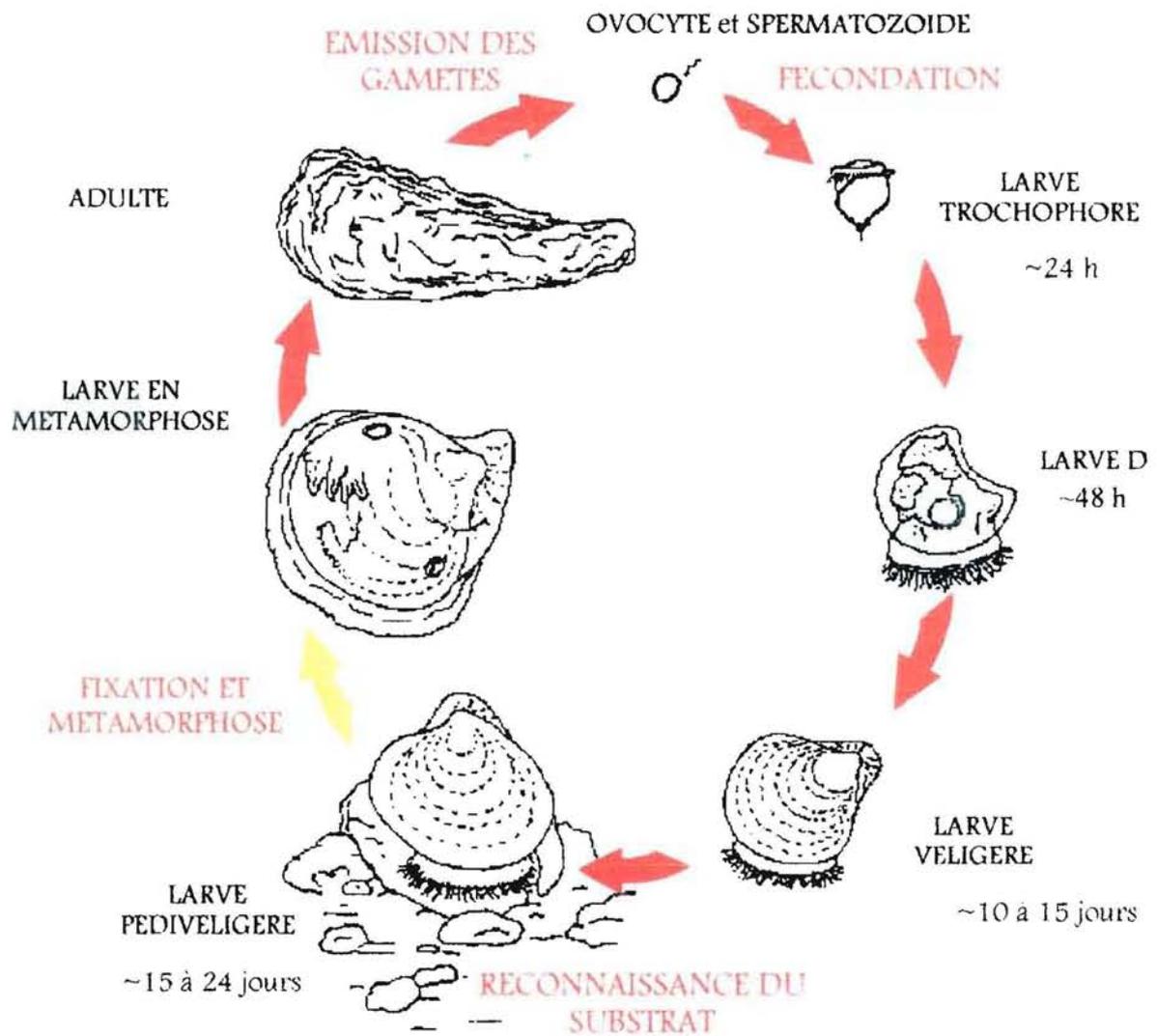


Figure 2 : Cycle de développement de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (à 25°C).
(D'après Lelong, 1999).

tubules, la gamétogenèse et l'élongation des tubules à la suite des mitoses successives se déroulent de façon centripète (**Figure 1**). Une première maturité sexuelle est atteinte dès l'âge d'un an, mais reste cependant réduite en terme de quantité de gamètes par rapport à des animaux qui réalisent leur deuxième ou troisième cycle de reproduction.

Développement embryonnaire et larvaire. (Figure 2).

L'ensemble du cycle de développement (de la fécondation à l'obtention de naissain) dure environ 21 jours.

Le développement embryonnaire des larves d'huîtres creuses *C. gigas* débute après la fécondation par une succession de clivages de l'œuf aboutissant au stade *morula*, *blastula* puis *gastrula* (au bout de 4 à 6 heures). L'embryon se développe ensuite en *larve trocophore* (40 à 50 µm) qui possède un organe de nage cilié constitué de deux couronnes de cils mobiles (le prototroche qui formera le velum et le télotroche localisé en arrière du blastopore) et d'un organe sensoriel (touffe de cils à l'extrémité antérieure). La glande de la coquille se met en place et s'étend rapidement pour former les deux valves qui entourent peu à peu l'animal. La larve se différencie ensuite en *larve véligère* (larve D, véligère à umbo puis larve oeuillée) dont les caractéristiques principales sont une charnière rectiligne contrastant avec le reste du contour curviligne, et un velum permettant à la larve de se déplacer mais aussi de capter et orienter les particules alimentaires vers la bouche. L'étape de la *larve umbonnée* (présence de l'umbo ou véliconche) est caractéristique des larves planctotrophes. Le tractus digestif se met en place et devient fonctionnel. Les divers organes larvaires (cœur, rein, gonade...) et le système nerveux commencent à s'organiser. Le stade suivant, stade de la *larve pédivéligère*, s'accompagne de la mise en place d'ébauches indifférenciées de certains organes adultes comme les branchies, et d'une différenciation plus nette d'organes larvaires et du système nerveux. Le pied cilié se développe et s'élargit permettant ainsi à la larve de se fixer (fin de la vie planctonique) afin d'acquérir par la suite les caractéristiques de l'adulte. La plupart des tissus et organes vont ensuite subir une réorganisation, appelée métamorphose, conduisant à l'obtention d'une huître dite juvénile qui compose le naissain.

La métamorphose résulte de processus physiologiques distincts mais complémentaires. Certains organes larvaires (pied, velum, muscle adducteur antérieur) dégèrent ou se résorbent sous l'action enzymatique des lysosomes ou par phagocytose. D'autres, se réorganisent ou se réorientent : fusionnement des ganglions viscéraux et cérébroïdes, rotation de la bouche, formation des palpes labiaux à partir des tissus dégénérés du velum... Enfin,

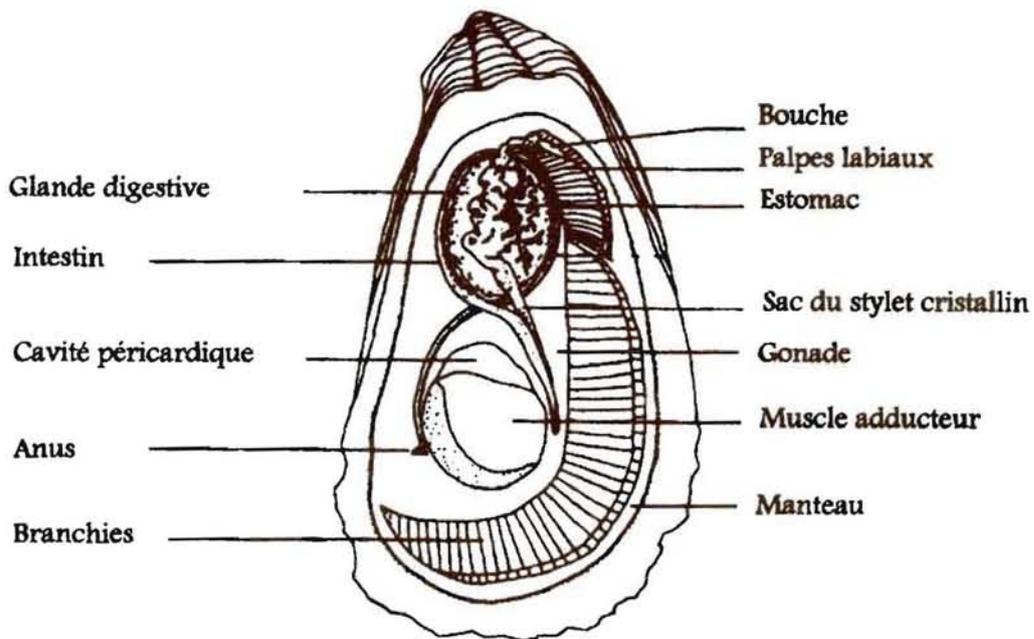
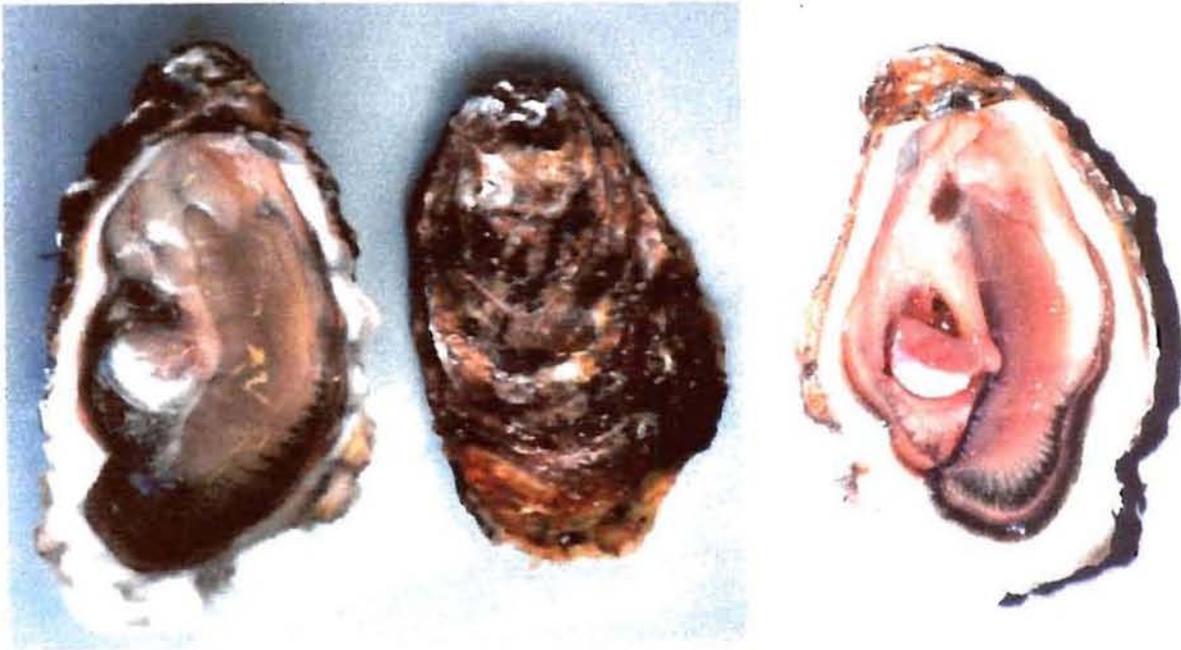


Figure 3 : Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

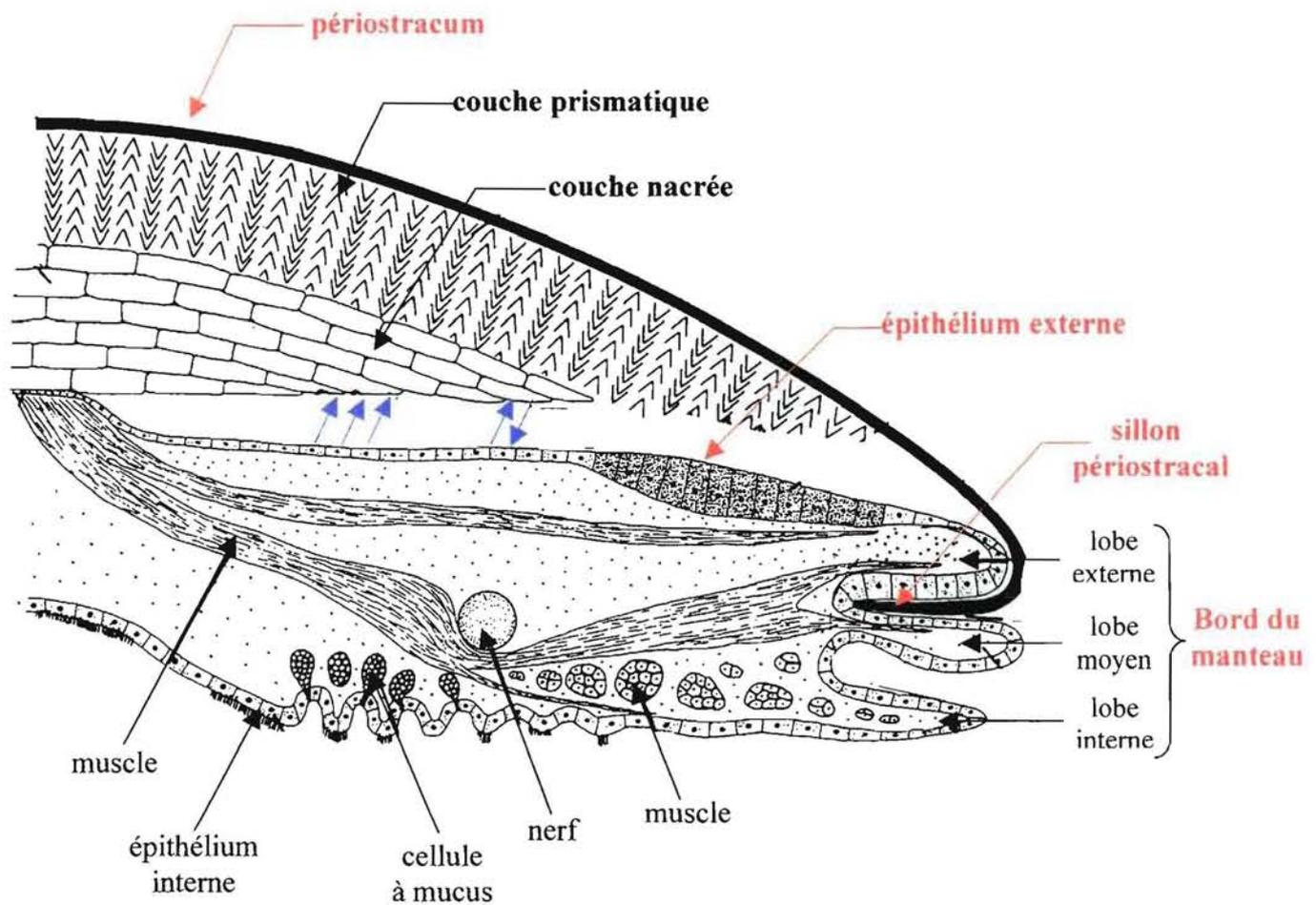


Figure 4 : Coupe transversale d'un Mollusque Bivalve. Relations entre la coquille et le manteau.

Les différentes couches de la coquille, le bord du manteau et les échanges extra-palléaux (flèches bleues) sont représentés.

(D'après Saleuddin et Wilbur, 1983).

certaines tissus ou organes s'élaborent à partir de tissus indifférenciés présents chez la larve, comme les branchies, ou bien encore la coquille qui se développe et croît en même temps que le manteau.

Ces modifications morphologiques et physiologiques des larves au cours de la métamorphose impliquent de nombreux facteurs morphogénétiques tels que des facteurs de transcription et des facteurs de croissance qui participent au contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire. Chez *C. gigas*, une protéine de la famille des TGF- β , le mGDF ("molluscan Growth and Differentiation Factor"), a récemment été caractérisée (Lelong *et al.*, 2000, 2001). Cette protéine se comporte comme un facteur de croissance et de différenciation multifonctionnel au cours du développement larvaire (expression dans de nombreux types cellulaires), mais semble également réguler des fonctions plus spécifiques dans certains tissus adultes (bord du manteau). Le développement de *C. gigas* semble donc être soumis à des mécanismes moléculaires analogues à ceux décrits chez les Vertébrés et certains Invertébrés (*Drosophile*, *Caenorhabditis elegans*,...) qui impliquent des molécules apparentées à des facteurs de croissance (TGF- β , EGF, IGF,...).

Croissance.

L'huître est un animal à corps mou protégé de l'environnement extérieur (du dessèchement à marée basse et des prédateurs) par une coquille à deux valves asymétriques (**Figure 3**). La croissance de l'animal résulte de processus continus, avec des pics saisonniers mais asynchrones entre le développement des parties molles et la pousse coquillière.

La coquille, comme toute structure de nature calcaire résultant d'un processus de biominéralisation, est constituée d'une trame organique sur laquelle se déposent les constituants minéraux puisés dans l'eau de mer. La coquille, sécrétée par le bord du manteau, est composée de trois couches superposées (**Figure 4**) :

- la plus externe, appelée périostracum, est constituée de matière organique (la conchyoline) formée par des protéines tannées non minéralisées. Elle est sécrétée par des cellules glandulaires localisées sur la face interne du lobe externe de bord libre épaissi du manteau (sillon périostracal). Cette couche, extrêmement fine et cornée, disparaît rapidement.

- sous le périostracum, une couche prismatique médiane constituée d'un empilement de cristaux de calcite (carbonate de calcium) sur une trame organique. Elle est sécrétée par des cellules de la face externe du lobe externe du bord du manteau.

- une couche interne nacrée, constituée de feuillets de lamelles de cristaux d'aragonite (carbonate de calcium orthorhombique) en alternance avec un réseau de matrice organique. Cette troisième couche est sécrétée par l'épithélium externe du manteau en contact constant avec la coquille.

Les cellules du manteau et plus particulièrement du bord du manteau jouent donc un rôle primordial dans la formation de la coquille via la synthèse et la sécrétion de protéines mais aussi par le transport des ions Ca^{2+} à partir de l'espace extra-palléal. Les hémocytes, cellules circulantes impliquées principalement dans les processus de défense immunitaire, semblent également être impliquées dans le processus de réparation de la coquille (Suzuki *et al.*, 1991).

Des travaux récents portant sur les cellules du manteau et les hémocytes d'un mollusque gastéropode nacrier *Haliotis tuberculata* ont montré l'implication de facteurs de croissance tels que l'IGF-1 et le TGF- β dans les synthèses de protéoglycannes et de collagènes, composants de la matrice extracellulaire qui participent au processus de biominéralisation c'est-à-dire à la formation de la coquille (Poncet *et al.*, 2000 ; Serpentine *et al.*, 2000).

Problèmes rencontrés.

L'ostréiculture est une activité économique dont la production est bien maîtrisée, mais qui repose essentiellement sur une seule espèce, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Cette situation de quasi-monoculture rend donc l'ensemble du parc ostréicole français vulnérable face à un certain nombre de difficultés et notamment face aux risques d'épizooties. Récemment, un virus de type Herpes a été identifié chez *C. gigas* en France et en Nouvelle-Zélande au cours de l'été 1991. Cette infection virale a été corrélée à des mortalités anormales de larves et de naissain dans les écloséries.

Depuis les années 60, d'importantes mortalités estivales touchent également les huîtres adultes au Japon (Mori, 1979), aux Etats-Unis (Perdue *et al.*, 1981), et plus récemment en France où ces mortalités généralement autour de 10 à 15% du parc ostréicole peuvent atteindre jusqu'à 80% de perte certaines années et pour les secteurs les plus touchés. Les mortalités toucheraient les animaux à indice de condition élevé, et seraient favorisés par les fortes températures (20°C et plus) au cours ou après l'émission des gamètes dans l'eau. Plusieurs facteurs peuvent être incriminés dans ce phénomène. Les fortes températures semblent en effet augmenter la sensibilité des huîtres aux agents pathogènes tels que le virus

de type Herpes, mais ceux-ci sont loin d'être systématiquement présents lors des cas de mortalités observés (Renault *et al.*, 1994, 1995). Les conditions physico-chimiques de l'eau de mer et les pratiques culturales semblent pouvoir aussi intervenir dans la fragilisation des huîtres. Les huîtres cultivées en poche sur des tables surélevées bénéficient d'une meilleure accessibilité à la nourriture et d'une cinétique d'utilisation des réserves en glycogène plus tardive que les huîtres élevées à plat (Soletchnik *et al.*, 1999). Les caractéristiques physiologiques des animaux pourraient également être impliquées dans l'apparition de ces mortalités. En effet, l'été est une période particulièrement difficile sur le plan énergétique (réorganisation de la gonade après l'émission des gamètes, forte activité de croissance) alors que les réserves en glycogène sont au plus bas. Les travaux de Heude-Berthelin (2000 a et b), sur des huîtres de provenances différentes, ont montré que la synthèse du glycogène a essentiellement lieu en hiver. Au cours de la gamétogenèse, le taux de glycogène, utilisé comme support énergétique de la reproduction, diminue progressivement jusqu'à la fin de l'été puis le métabolisme des réserves glucidiques s'inverse de nouveau en automne. Les seuls paramètres environnementaux ne peuvent suffire à expliquer cette inversion métabolique qui fait probablement l'objet d'une régulation interne stricte portant soit sur l'entrée du glucose dans les cellules de réserves soit sur les enzymes de la glycogénogenèse et de la glycogénolyse. Même si les mortalités estivales résultent certainement de facteurs concomitants dont fait partie la gestion des réserves en glycogène, la compréhension des mécanismes associés à cette gestion énergétique est essentielle pour aborder ce problème.

L'approvisionnement français en naissain est essentiellement assuré par le captage naturel (les larves issues de la fécondation naturelle sont récoltées sur des supports où elles se fixent en vue de la métamorphose en juvéniles). Le recrutement est donc principalement issu de géniteurs sauvages (seuls 15 à 20% de la production française de naissain proviennent d'écloseries). La situation en Normandie est différente de celle des bassins ostréicoles d'Arcachon ou des Charentes : en effet, la faible température estivale de l'eau (inférieure à 20°C) ne permet pas une ponte massive des animaux. Le recrutement par captage naturel est de ce fait inefficace dans la région, et les éleveurs sont tributaires d'un naissain provenant soit de régions où le captage naturel est abondant, soit d'écloseries. Le naissain d'écloseries est produit à partir de géniteurs maturés en conditions artificielles et sa fixation est réalisée sur des poudres de coquilles broyées et calibrées (microbrisure). Cette production nécessite donc une parfaite maîtrise des différentes étapes du développement et du prégrossissement. En Normandie, l'écloserie la SATMAR, localisée à Gatteville, assure cette production de naissain.

Par ailleurs, l'huître est une espèce aquacole particulièrement appréciée des consommateurs mais essentiellement consommée pendant une période hivernale restreinte. En effet, en été, les huîtres en pleine maturité sexuelle sont chargées de gamètes, conférant aux huîtres un aspect laiteux et un goût particulier peu favorable à la consommation. Afin de disposer d'une qualité de chair homogène sur toute l'année (celle des huîtres non mures) et ainsi d'étaler la saison de vente, un programme de polyploïdisation a été entrepris, et a conduit à la production d'huîtres triploïdes stériles et présentant de meilleures performances de croissance (l'allocation énergétique de l'animal est alors consacrée essentiellement à la croissance). La production de triploïdes est actuellement en nette progression dans les différents bassins ostréicoles et concourt au développement de l'activité des écloséries.

Axes de recherche.

La production d'huîtres juvéniles puis adultes repose donc sur une meilleure compréhension et maîtrise de la reproduction et de la croissance, mais aussi du métabolisme énergétique associé à ces processus. Aussi, plusieurs axes de recherche ont été mis en place pour répondre aux attentes des producteurs.

Un premier axe consiste à sélectionner des géniteurs destinés à la production de larves et à rechercher des marqueurs de souches à fortes performances de croissance, et des marqueurs de souches résistantes aux stress environnementaux et aux mortalités estivales.

Le second axe est orienté sur l'acquisition de connaissances approfondies de la physiologie de l'huître (processus associés à la reproduction et à la croissance, métabolisme énergétique, mécanismes de défense), afin d'étudier à terme l'effet des paramètres environnementaux ou de régimes alimentaires, et ainsi d'optimiser la production de naissain, le prégrossissement et la croissance des huîtres. Cette démarche peut d'ailleurs également permettre d'identifier de nouveaux marqueurs utilisables en sélection. Dans le cadre de ce programme, le Laboratoire de Biologie et de Biotechnologies Marines (LBBM), unité mixte IFREMER, dispose de plusieurs modèles de cultures cellulaires (cellules de réserve dissociées, gonies, hémocytes, cellules du manteau...) ce qui permet d'envisager une étude des effets de facteurs externes (environnement, écotoxicologie, nutrition) et de facteurs internes sur les cellules de tissus cibles impliqués dans les divers processus physiologiques de l'huître. La possibilité de travailler sur des tissus cryopréservés (hémocytes, gamètes) devrait également faciliter ce travail, en permettant de s'affranchir des problèmes de saisonnalité de ces métabolismes.

Intérêt de l'étude des molécules de type insuline/IGF dans ce contexte.

Parmi les différentes molécules susceptibles d'intervenir dans les processus de régulations physiologiques, notre choix s'est arrêté sur les molécules de type insuline/IGF. En effet, chez les Invertébrés, et notamment les Insectes et les Mollusques gastéropodes, comme chez les Vertébrés, les molécules de la famille des insulines/IGFs sont largement impliquées dans le contrôle des processus de reproduction, de croissance et les métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Ces molécules, qui appartiennent en fait à un vaste système insuline/IGF composé de ligands, de récepteurs, de protéines de liaison, de transporteurs de glucose, de protéines de signalisation et de messagers secondaires de la cascade de transduction du signal des facteurs de croissance, ont initialement été identifiées sur la base de leur activité biologique et purifiées par des techniques classiques, et plus récemment chez de nombreuses espèces à partir de leur homologie de structure.

Chez l'huître creuse *C. gigas*, les contraintes anatomiques, ainsi que la probable faible conservation de séquence des molécules de type insuline entre elles, ont jusqu'à présent mené à l'échec les tentatives de caractérisation de ces molécules basées sur l'utilisation de test biologique d'activité ou de réactifs spécifiques (anticorps, sondes, amorces oligonucléotidiques). Néanmoins, une alternative consistant à rechercher l'existence d'un signal biologique médié par les récepteurs de la membrane plasmique des cellules cibles, particulièrement bien conservés du fait de leur activité catalytique à tyrosine kinase, peut être envisagée.

Objectifs des travaux de thèse.

Ainsi, les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit portent dans un premier temps sur la mise en évidence *in vitro* de l'implication physiologique de molécules de type insuline/IGF dans les processus de reproduction et de croissance de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Le métabolisme énergétique fait, quant à lui, l'objet d'autres travaux au LBBM (effet biologique de molécules de type insuline/IGF et de type glucagon, transporteurs de glucose) et au Laboratoire de Physiologie des Invertébrés du centre IFREMER de Brest (enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène). Le deuxième aspect de ces travaux traite de la caractérisation et de l'étude de l'expression d'un récepteur de type insuline homologue chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Chapitre I :

**Systeme insuline/IGF
chez les Vertébrés et les Invertébrés**

Les molécules de type insuline et IGFs font partie d'un vaste système appelé système insuline/IGF, qui inclut également des récepteurs membranaires spécifiques, des protéines de liaison et des protéases de ces protéines de liaison ; toutes ces molécules interagissent de manière complexe afin de réguler différentes voies de signalisation intracellulaire (**Figure I.1**).

1. Généralités.

Chez les Vertébrés, l'insuline est essentiellement synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas puis libérée dans la circulation générale. Elle exerce une régulation de type endocrine sur le métabolisme des cellules et des tissus cibles (synthèses d'ADN, d'ARN, de protéines et métabolisme glucidique), principalement par l'activation de facteurs de transcription nucléaires.

Les IGFs (IGF de type 1 et IGF de type 2) s'expriment au contraire de façon ubiquitaire puisque, si le foie est la principale source de l'IGF-1 circulant, les IGFs peuvent être sécrétés par la plupart des tissus. Toutefois, les teneurs tissulaires en IGFs sont beaucoup plus faibles que leur niveau sérique, ce qui fait du plasma le principal lieu de stockage des IGFs (Daughaday et Rotwein, 1989 ; Humbel, 1990). Seul 1% des IGFs circulent sous forme libre dans les fluides biologiques avec une demi-vie de 10 minutes (Kostecka et Blahovec, 1999, pour revue). En effet, la très grande majorité des IGFs circulent sous une forme liée à des protéines de liaison spécifiques, les IGFBPs (Insulin-like Growth Factors Binding Proteins), qui leur confère une meilleure résistance à la dégradation protéolytique et ainsi une demi-vie plus longue (10 à 12 heures) (Kostecka et Blahovec, 1999, pour revue). Ces protéines de liaison assurent également un rôle de modulateurs de la disponibilité et de l'activité des IGFs (Jones et Clemmons, 1995, pour revue). Les IGFs peuvent donc ainsi exercer des régulations de type autocrine/paracrine mais également de type endocrine sur le développement fœtal (IGF-2) et les développements embryonnaire et post-natal (IGF-1).

Les synthèses ou la disponibilité de l'insuline, de l'IGF-1 et de l'IGF-2, sont déclenchées en réponse à des stimuli de différentes natures : hormonaux, nutritionnels ou bien encore spécifiques aux tissus (Steiner *et al.*, 1985 ; Reinecke et Collet, 1998, pour revues).

Les molécules d'insuline, d'IGF-1 ou d'IGF-2, sécrétées ou acheminées par la circulation générale au niveau des tissus cibles interagissent alors avec leurs récepteurs

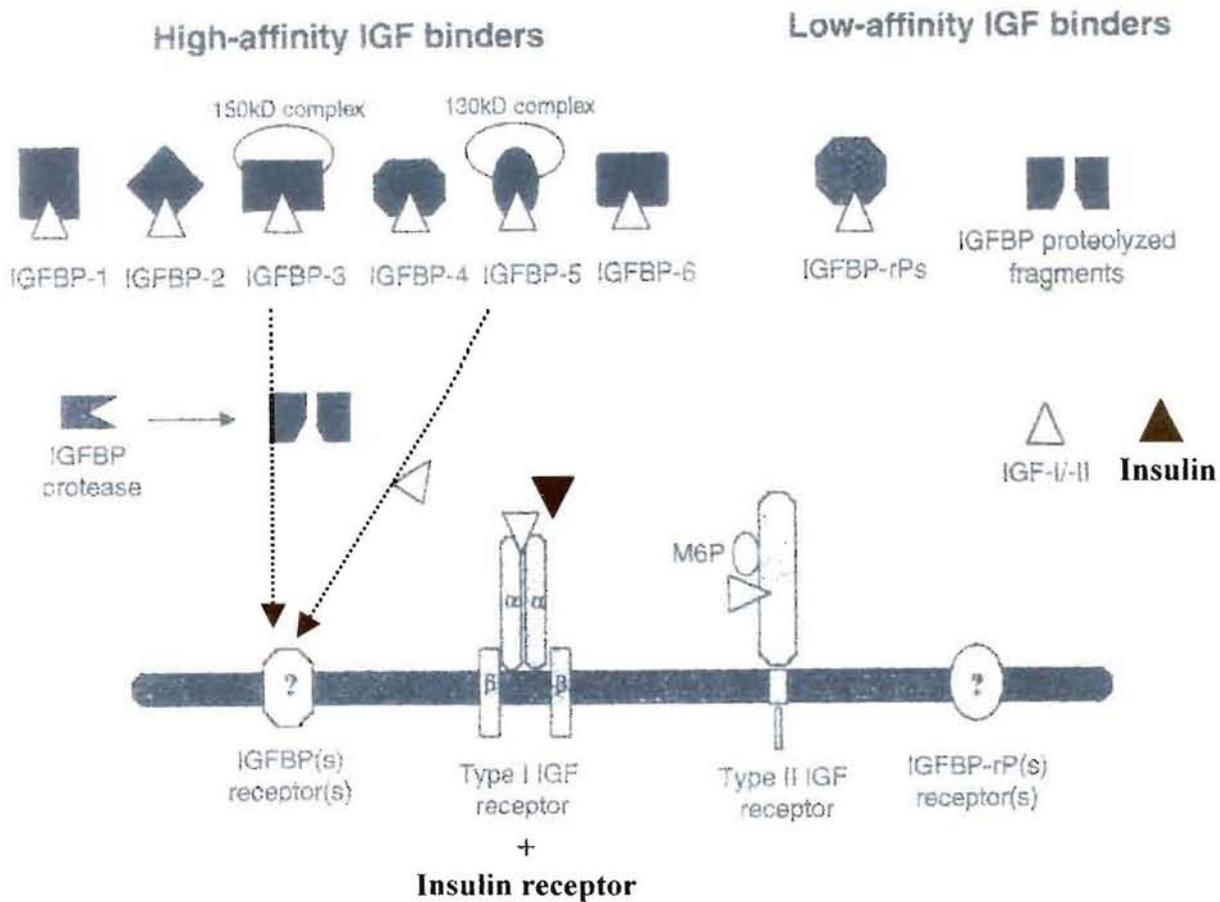


Figure I.1 : Les différentes composantes du système insuline/IGF chez les Mammifères.

Le système comprend les peptides d'insuline, d'IGF-1 et d'IGF-2, les six protéines de liaison des IGFs (IGFBPs), les protéines apparentées aux IGFBPs (IGFBP-rPs), les protéases des IGFBPs, les récepteurs à l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2, et des récepteurs potentiels aux IGFBPs et aux IGFBP-rPs. (M6P : mannose-6-phosphate).

(D'après Hwa *et al.*, 1999).

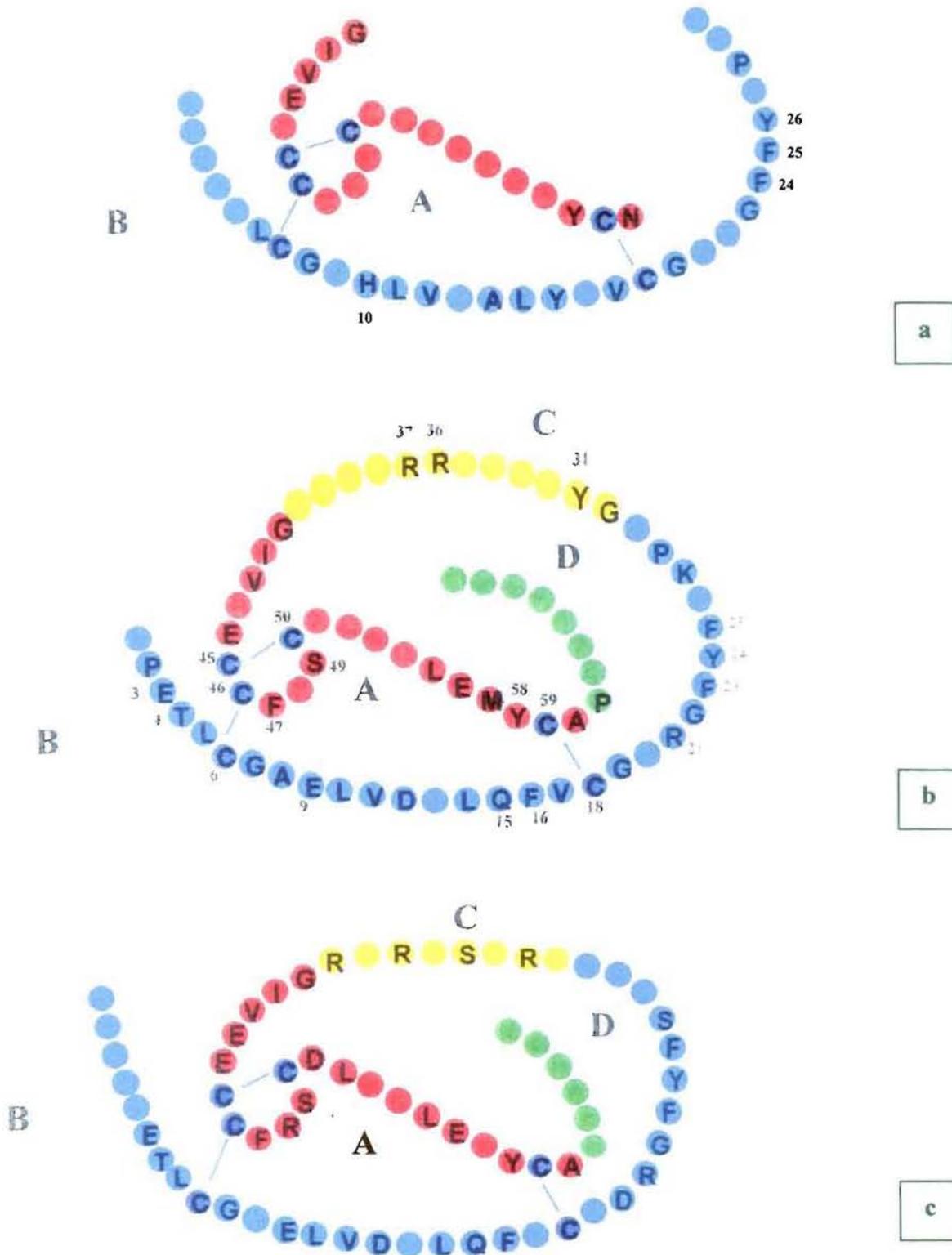


Figure I.2 : Structures secondaires de l'insuline (a), de l'IGF-1 (b) et de l'IGF-2 (c) de Vertébrés.

Les domaines B, C, A et D des peptides matures sont représentés en bleu, jaune, rouge et vert, respectivement. Les six cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures sont indiquées en bleu foncé. Les résidus conservés sont indiqués par une lettre correspondant à leur nature. Les résidus impliqués dans la liaison de l'IGF-1 et de l'insuline à leurs récepteurs, et ceux impliqués dans l'interaction de l'IGF-1 avec les IGFBPs sont numérotés.

(D'après Duval, 2000).

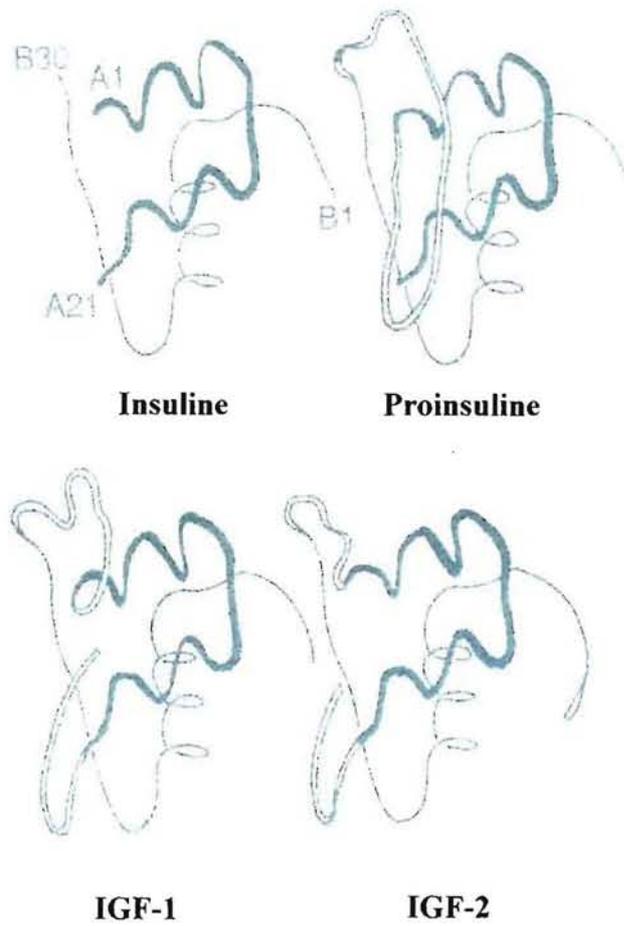


Figure I.3 : Structures tertiaires de l'insuline, de la proinsuline, de l'IGF-1 et de l'IGF-2.

La chaîne A est représentée par une ligne en gras, la chaîne B est représentée par une ligne fine, le domaine D (extension de la chaîne A) et le peptide C (connexion entre les chaînes A et B) sont représentés par une ligne double.

(D'après LeRoith *et al.*, 1995).

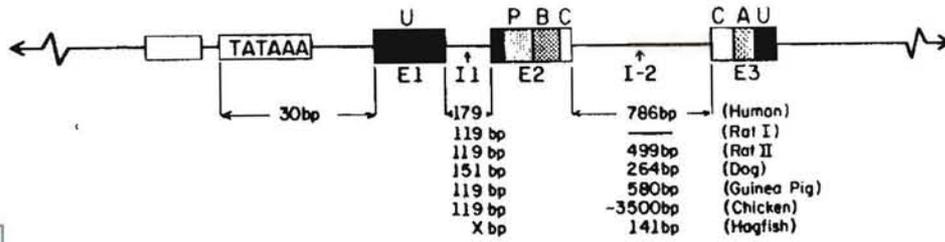
spécifiques (récepteur à l'insuline, récepteur à l'IGF-1 et récepteur à l'IGF-2) mais peuvent aussi se lier aux autres récepteurs du système insuline/IGF, avec des affinités différentes : pour le récepteur à l'insuline (Rins), l'affinité de l'insuline est supérieure à celle de l'IGF-1, elle-même supérieure à celle de l'IGF-2 ; pour le récepteur à l'IGF-1 (RIGF-1), l'affinité de l'IGF-1 est supérieure à celle de l'IGF-2, elle-même supérieure à celle de l'insuline, et enfin, pour le récepteur à l'IGF-2 (RIGF-2), seul l'IGF-2 est susceptible de s'y lier. La liaison des molécules aux récepteurs induit des changements conformationnels au niveau de ces récepteurs entraînant une autophosphorylation de leur partie cytoplasmique. Ils peuvent alors interagir avec des protéines de signalisation intracellulaire composant plusieurs voies de transduction du signal des ligands.

2. Les ligands du système insuline/IGF.

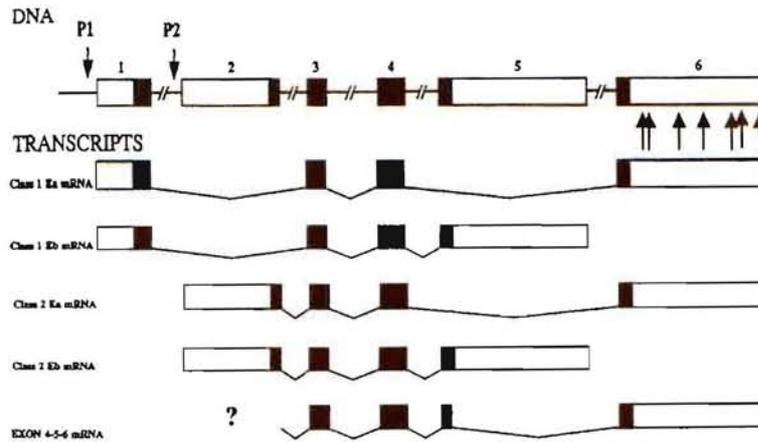
2.1. Les ligands insuline et IGFs chez les Vertébrés.

2.1.1. L'insuline.

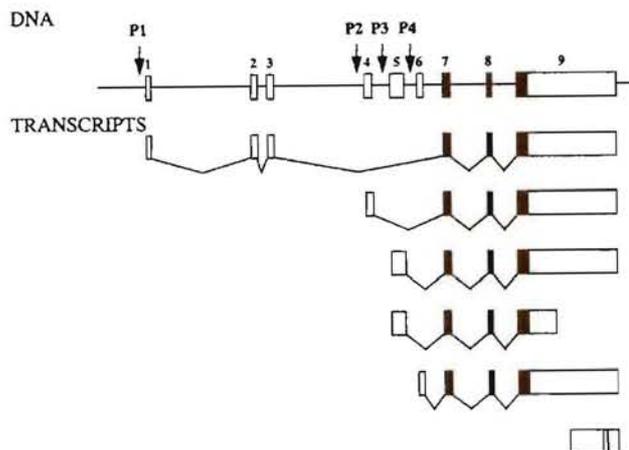
L'insuline est une protéine bicaténaire d'environ 6 kDa constituée de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne A de 21 acides aminés et la chaîne B de 30 acides aminés, reliées entre elles par trois ponts disulfures : deux ponts disulfures associant les chaînes A et B, entre les résidus cystéines B7/A7 et B19/A20, et un pont disulfure supplémentaire au sein de la chaîne A entre les résidus A6/A11. La molécule d'insuline contient également des résidus très conservés (A1-4, A6-7, A11, A19-21 et B6-8, B10-12, B14-16, B18-20, B23-26, B28) qui constituent un noyau hydrophobe au sein de la molécule et participent ainsi à l'élaboration de la structure tridimensionnelle de la protéine (**Figures I.2 et I.3**). Parmi ces résidus, impliqués dans la conformation tertiaire, le triplet d'acides aminés aromatiques B24-26 apparaît essentiel à la liaison de l'insuline à son récepteur. Les fortes conservations de séquence primaire et de structure tertiaire traduisent une remarquable conservation de l'activité biologique de l'insuline. De plus, les molécules d'insuline, soumises à de nombreuses interactions non-covalentes entre les acides aminés des deux chaînes, et notamment les acides aminés de surface non impliqués dans le noyau hydrophobe, tendent à s'assembler rapidement en dimères. En présence d'ions Zn^{2+} (ou d'autres ions métalliques divalents), et par interaction avec le résidu histidine localisé en B10 ou sérine en B9, les dimères peuvent



a



b



c

Figure I.4 : Structure des gènes de l'insuline (a), de l'IGF-1 (b) et de l'IGF-2 (c) chez l'Homme.

Le gène de l'insuline, qui diffère entre les espèces par la longueur et la séquence de ses introns, est transcrit en un ARNm unique. Les gènes de l'IGF-1 et de l'IGF-2 sont transcrits sous plusieurs formes d'ARNm selon l'utilisation de 2 (IGF-1) ou 4 promoteurs (IGF-2) qui sont activés différemment selon le tissu et le stade de développement, l'épissage alternatif d'exons codants (régions noires) ou non codants (régions blanches), et l'existence de plusieurs signaux de polyadénylation.

(D'après Steiner *et al.*, 1985 ; Chan *et al.*, 1993 ; LeRoith *et al.*, 1995 ; Reinecke et Collet, 1998).

également s'agréger par trois afin de former des hexamères d'insuline, forme de stockage de l'insuline, moins sensible à la dégradation (Derewenda *et al.*, 1989).

L'insuline est codée par un gène unique (localisé en 11p15 sur les chromosomes humains) qui représente environ 5 kb d'ADN chromosomique. Toutefois, chez certains rongeurs, l'insuline peut être issue de l'expression de deux gènes distincts. Le gène de l'insuline présente une organisation typique avec 3 exons séparés par 2 introns variables en taille et en séquence selon les espèces mais maintenus à des positions conservées (Steiner *et al.*, 1985 ; Chan *et al.*, 1993) (**Figure I.4**). Le gène de l'insuline est d'abord transcrit en préproinsuline, constituée d'un peptide signal de 24 acides aminés, de la chaîne B, d'un peptide C et de la chaîne A. Le peptide signal, qui permet l'adressage de la préprotéine dans le réticulum endoplasmique rugueux et qui, potentiellement, participe au repliement de la molécule, est rapidement clivé pour donner la proinsuline, molécule précurseur de l'insuline. Le peptide connectif C, qui relie les chaînes B et A et qui participe ainsi à l'acquisition de la structure tertiaire typique de la molécule, est ensuite clivé par des endoprotéases spécifiques au niveau de sites dibasiques à la fin de la maturation de la molécule d'insuline au niveau des granules de sécrétion de l'appareil de Golgi.

2.1.2. Les IGF de type 1 (IGF-1) et de type 2 (IGF-2).

Les molécules d'IGF-1 et d'IGF-2 sont constituées d'une chaîne polypeptidique unique, respectivement de 70 et 66 ou 67 acides aminés (soit environ 7,5 kDa), et présentent des structures relativement proches l'une de l'autre (70% de similarité) ainsi que de la molécule d'insuline (50% d'identité pour les chaînes B et A). Comme la proinsuline, les molécules d'IGFs comportent des domaines B et A séparés par un peptide C. Toutefois, ce peptide C de séquence plus divergente et plus courte, n'est pas clivé au cours des processus de maturation des IGFs (molécules monocaténares). En outre, les molécules d'IGFs se caractérisent en C-terminal par la présence d'un court domaine D de longueur variable (6 à 8 acides aminés), ainsi que par une extension de longueur variable, le peptide E clivé à la fin de la maturation. Malgré ces divergences au niveau de la structure secondaire, les molécules d'IGFs contiennent tous les résidus aminés caractéristiques de la structure tridimensionnelle des molécules de la famille des insulines/IGFs et impliqués dans la liaison de l'hormone à son récepteur ou aux IGFBPs (**Figures I.2 et I.3**).

Les gènes codants pour l'IGF-1 et l'IGF-2, sont de structure importante et complexe, et présentent des profils d'expression complexes du fait de l'épissage alternatif

d'exons codants ou non codants et de l'état de polyadénylation différentiel, qui sont spécifiques des tissus et/ou des stades de développement (**Figure I.4**). Le gène de l'IGF-1 (localisé en 12p22 sur les chromosomes humains) comporte 6 exons, avec un épissage alternatif des exons 2, 5 et 6 tissu-spécifique, et 2 promoteurs possibles (P1 et P2) (Reinecke et Collet, 1998). Ces caractéristiques du gène de l'IGF-1 se traduisent par une grande diversité de peptides signal (plusieurs sites d'initiation de la transcription au niveau des exons 1 et 2 en fonction du promoteur) et de peptides E (épissage alternatif des exons 5 et 6), qui conduisent à l'expression de plusieurs isoformes de prépropeptides de l'IGF-1. Par ailleurs, il existe chez les Mammifères un IGF-1 tronqué de 3 acides aminés (Gly-Pro-Glu) à l'extrémité N-terminale du domaine B, au niveau du site de reconnaissance des IGFBPs. Cette troncature résulte probablement de modifications post-traductionnelles (après le clivage du peptide signal et du domaine E) qui ont pour conséquence de diminuer l'affinité de l'IGF-1 pour les IGFBPs ainsi que d'augmenter l'affinité de l'IGF-1 pour son récepteur (LeRoith *et al.*, 1995a). Le gène de l'IGF-2 (localisé en 11p14 sur les chromosomes humains), contigu au gène de l'insuline (en aval), est organisé en 9 exons dont 3 codants pour l'IGF-2 mature (exons 7,8 et 9) et possède 4 promoteurs différents (Reinecke et Collet, 1998). Cette multiplicité de promoteurs spécifiques aux tissus et au stade de développement conduit à l'expression de plusieurs transcrits qui ne diffèrent qu'au niveau de leurs régions non traduites. Le transcrit issu de l'expression du promoteur P1 est spécifiquement actif au niveau du foie adulte, alors que les transcrits des promoteurs P2, P3 et P4 s'expriment différemment dans les tissus fœtaux.

2.2. Les molécules de type insuline chez les Agnathes (cyclostomes) et les Prochordés (Urochordés et Céphalocordés).

2.2.1. *Chez les Agnathes (cyclostomes).*

∞ Deux protéines distinctes appartenant à la famille des insulines/IGFs, l'une de type insuline (Chan *et al.*, 1981) et l'autre de type proIGF (Nagamatsu *et al.*, 1991), ont été caractérisées chez la myxine *Myxine glutinosa*.

L'insuline de myxine présente une importante homologie de séquence primaire et tertiaire avec les molécules d'insuline de Vertébrés supérieurs et notamment l'insuline humaine (76% de similitude). Cependant, quelques différences significatives sont observées

entre l'insuline de myxine et les insulines de Vertébrés au niveau des résidus habituellement invariants, impliqués dans la formation de dimères et d'hexamères. De plus, la séquence du peptide C de la proinsuline de myxine est beaucoup plus variable. Le gène de l'insuline de myxine possède lui aussi une organisation typique des gènes des insulines, avec 3 exons et 2 introns. Toutefois, les introns, bien que localisés à des positions conservées, présentent une certaine divergence de séquence et de taille.

Le proIGF de myxine comporte également tous les résidus déterminants de la structure tertiaire (les ponts disulfures, le noyau hydrophobe, et le triplet d'acides aminés aromatiques de la chaîne B) ce qui lui confère l'activité biologique des IGFs. Le proIGF de myxine présente un fort niveau de similitude avec l'IGF-1 et l'IGF-2 humains (70% de similitude pour les chaînes B et A (Nagamatsu *et al.*, 1991), ou 60% pour l'IGF-1 et 65% pour l'IGF-2 si l'on considère la molécule mature entière (Chan *et al.*, 1993)). L'homologie apparaît cependant beaucoup plus faible au niveau des domaines C, D et E du précurseur. Enfin, la séquence du prépro-IGF de myxine contient un long peptide signal, caractéristique des prépro-IGF de type I de mammifères, amphibiens et poissons, et semble être principalement exprimé au niveau du foie (du moins chez l'adulte) comme chez les Mammifères. Le proIGF unique de myxine semble donc être plus proche de l'IGF-1.

La divergence des gènes de l'insuline et des IGFs s'est donc probablement produite avant l'émergence des Agnathes chez un ancêtre commun apparu très tôt dans l'évolution, et celle de l'IGF-1 et de l'IGF-2 se serait réalisée par duplication après l'apparition des Agnathes.

✂ Chez la lamproie *Petromyzon marinus*, une molécule d'insuline a également été caractérisée par purification (Plisetskaya *et al.*, 1988). Toutefois, bien que présentant toutes les caractéristiques des insulines de Vertébrés et de l'insuline de myxine, l'insuline de lamproie et l'insuline de myxine apparaissent aussi éloignées l'une de l'autre, avec 32,5% de divergence, que les insulines de poissons et de Mammifères

2.2.2. Chez les Tuniciers (Urochordés).

Chez l'ascidie *Chelyosoma productum*, McRory et Sherwood (1997) ont mis en évidence l'existence de deux molécules distinctes : une de type insuline et une de type IGF. Ces deux molécules possèdent une forte identité de séquence et de structure tertiaire avec l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2 de Mammifères, mais aussi entre elles avec une homologie de

87%. En effet, chacune est constituée de la plupart des résidus invariants qui déterminent la structure et la fonction des molécules de la superfamille des insulines/IGFs (noyau hydrophobe, ponts disulfures et site de liaison au récepteur). Par ailleurs, ces deux molécules présentent des profils d'expression similaires : expression ubiquitaire prédominante dans le foie, et moins prononcée au niveau du tissu nerveux, du cœur, de l'intestin et de la gonade.

2.2.3. Chez les Céphalochordés.

En 1990, Chan et ses collaborateurs réalisent le clonage d'une molécule de type insuline chez l'amphioxus *Branchiostoma californiensis*. Cette molécule, appelée ILP (Insulin-Like Peptide), présente, pour les domaines B et A, le même niveau d'homologie (48%) avec l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2 humains. En effet, les résidus indispensables à la conformation tertiaire des molécules de la famille des insulines/IGFs sont conservés ou bien substitués par des résidus de même nature. Cependant, quelques particularités ont été observées, comme l'absence d'un résidu essentiel à l'activité biologique de l'insuline (asparagine en A21), et la présence de domaines D et E caractéristiques des molécules d'IGF-1, d'IGF-2 et de leurs précurseurs, mais de séquences peu homologues de celles des IGFs. Deux hypothèses quant à l'origine de cette molécule ILP ont alors été avancées :

- l'ILP serait une molécule hybride insuline et IGF puisque le peptide C est clivé comme pour les insulines et que son précurseur comporte les domaines D et E caractéristiques des proIGFs. Cette hypothèse fut longtemps admise jusqu'à l'identification de molécules distinctes d'insuline et d'IGFs chez l'ascidie qui est apparue parallèlement à l'émergence des Céphalochordés (McRory et Sherwood, 1997).

- l'alternative à cette première hypothèse consiste à considérer l'ILP d'amphioxus comme une forme intermédiaire du gène d'IGF qui aurait évolué à partir d'un ancêtre commun de type insuline : la proto-insuline.

Chez l'amphioxus, il existerait donc non seulement une molécule de type ILP assimilée au proIGF, mais aussi très certainement une molécule de type insuline non identifiée à ce jour. La seule indication quant à la présence d'une molécule d'insuline chez l'amphioxus est une détection immunologique avec un anticorps dirigé contre l'insuline humaine obtenue dans des cellules du système digestif (Reinecke 1981 ; Reinecke *et al.*, 1993).

2.3. Molécules de type insuline chez les Invertébrés.

2.3.1. Chez les Arthropodes.

⌘ Chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, 7 gènes (dilp 1-7) codant pour des molécules apparentées à l'insuline ont été identifiés (Brogiolo *et al.*, 2001) à partir du génome complet de la drosophile et sur la base de la conservation de l'espacement des 4 cystéines de la chaîne A des molécules de la famille des insulines (Blundell et Humbel, 1980). Les gènes dilp 1-5 sont localisés sur le chromosome 3, et semblent former des unités de transcription (transcription opposée entre les gènes dilp 3,4,5 et les gènes dilp 1,2), tandis que les gènes dilp 6 et 7 sont situés sur le chromosome X à deux loci différents (**Figure I.5**). Les 7 gènes codent pour des précurseurs de 107 à 156 acides aminés, de structure similaire à celle de la proinsuline. En outre, le gène dilp 1 pourrait correspondre à un pseudogène du fait de l'absence d'identification des transcrits correspondants.

Les peptides DILP 2,3,4 et 5 possèdent l'organisation typique de l'insuline humaine, qui se caractérise par la présence de deux chaînes, B et A, indépendantes après le clivage du peptide C et reliées entre elles par deux ponts disulfures (en plus du pont disulfure intrachaîne A). Toutefois, les DILPs 1,7 et le DILP 6 se distinguent au niveau de leur chaîne B, par une extension en N-terminal (DILPs 1,7) et par une extension en C-terminal (DILP 6) résultant de l'absence de site de clivage N-terminal du peptide C (**Figure I.5**). La plus forte homologie de séquence avec l'insuline de mammifère est observée avec le peptide DILP 2 (35%). Cette importante similitude de structure conduit donc à considérer les peptides DILP 1-7 comme de bons candidats ligands pour le récepteur unique de type insuline de drosophile.

Par ailleurs, les transcrits des DILPs s'expriment de façon différentielle au cours du développement embryonnaire et de manière tissu-spécifique au cours du développement larvaire avec une plus forte expression au niveau des tissus précurseurs des organes adultes (tube digestif, mésoderme et système nerveux). Chez l'embryon, seuls les DILPs 2,4 et 7 sont exprimés dans le mésoderme et l'intestin (Brogiolo *et al.*, 2001). Au cours du développement larvaire, les DILPs 2,3 et 5 sont fortement exprimés dans les cellules neurosécrétrices du système nerveux central connectées aux cellules de la glande de Weissman dont les cellules de *corpora cardiaca*. La sécrétion de ces DILPs par les *corpora cardiaca* serait sous contrôle nutritionnel (Brogiolo *et al.*, 2001 ; Leervers *et al.*, 2001, pour revues). En fait, le DILP 3 est spécifiquement exprimé par les cellules neurosécrétrices pendant le développement larvaire. Par ailleurs, le DILP 2, qui apparaît comme étant le peptide le plus proche de l'insuline

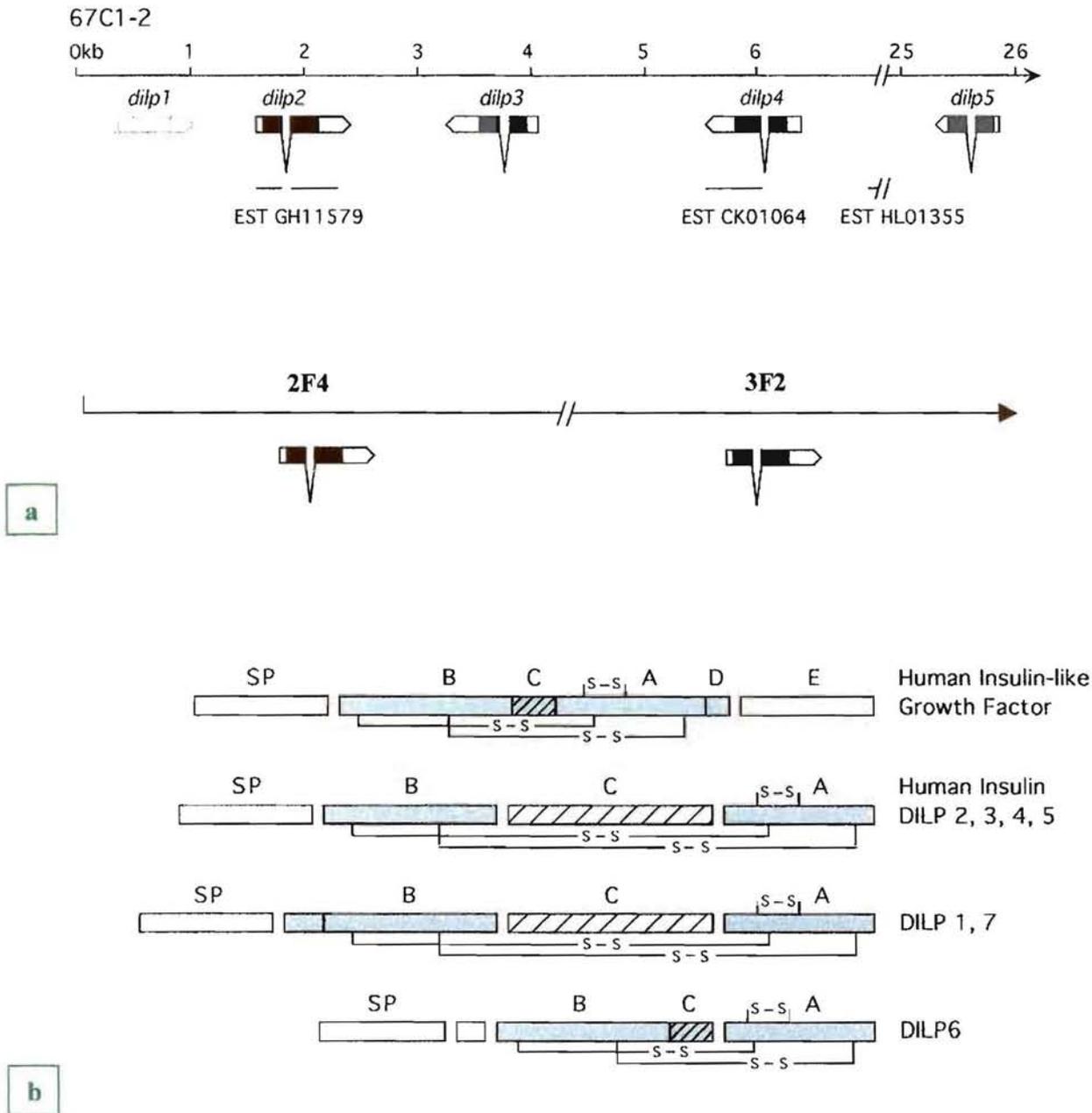
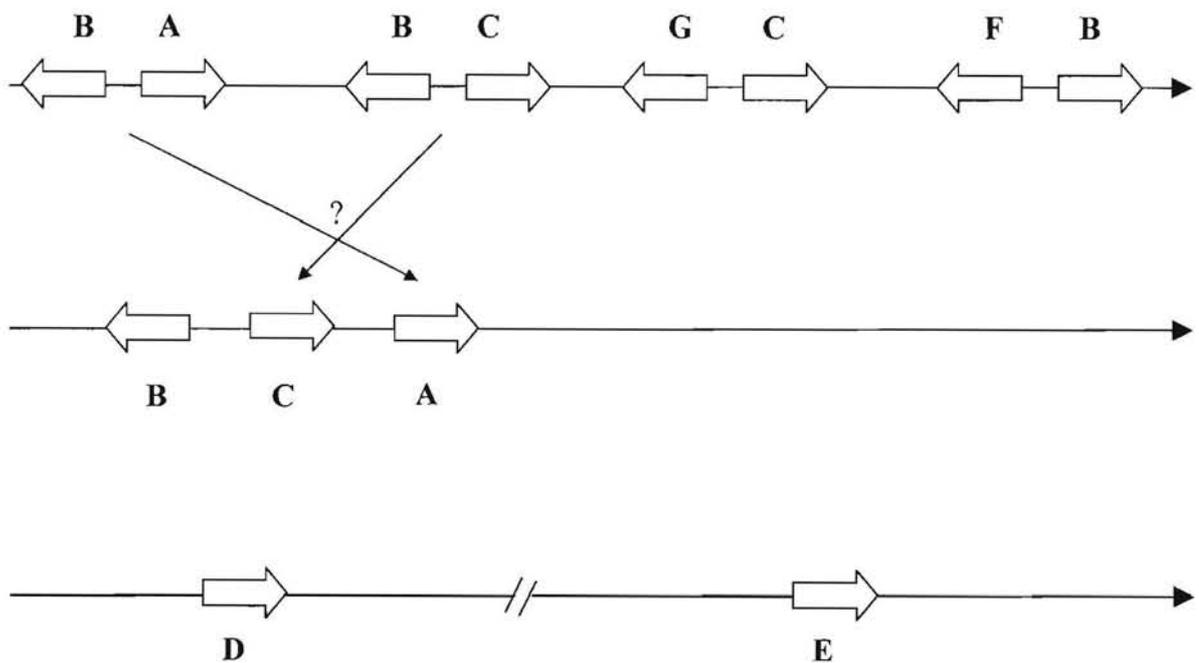


Figure I.5 : Les peptides de type insuline chez la drosophile *Drosophila melanogaster*.

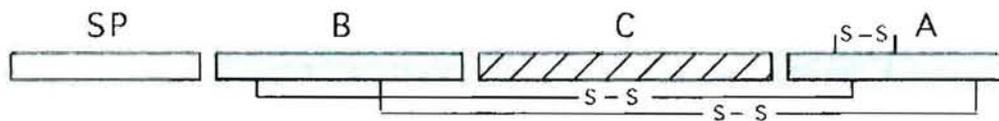
a : Organisation génomique du groupe de gènes *dilps* 1-5 (*drosophila* insulin-like peptides) localisé au locus 67C1-2 sur le chromosome 3, et des gènes *dilps* 6 et 7 positionnés à deux loci différents 2F4 et 3F2 sur le chromosome sexuel X. Les *dilps* 1 et 2 ont un sens de transcription opposé à celui des *dilps* 3,4 et 5. Le gène *dilp* 1 pourrait être un pseudogène (pas de transcrits identifiés). Pas d'informations concernant le sens de transcription des gènes *dilps* 6 et 7.

b : Représentation schématique de la structure prédictive des peptides DILPs 1 à 7.

(D'après Brogiolo *et al.*, 2001).



a



b

Figure I.6 : Les peptides de type insuline chez le ver à soie *Bombyx mori*.

a : Organisation génomique des gènes de bombyxines. Les gènes de bombyxines s'organisent en trois catégories au niveau de trois segments du génome : des paires de gènes B/A, B/C, G/C et F/B, des triplets de gènes B/C/A, et des gènes isolés D et E.

b : Représentation de la structure des prépro-bombyxines et des bombyxines matures (similaire à celle de l'insuline humaine).

(D'après Kawakami *et al.*, 1989 ; Tsuzuki *et al.*, 1997 ; Yoshida *et al.*, 1997, 1998).

humaine, présente une forte expression au niveau des disques imaginaux (organe épithélial larvaire qui se réorganise au cours de la métamorphose pour former les structures épidermiques adultes comme les ailes et les yeux) où il contrôle la division et la croissance des cellules des différents organes. Cao et Brown (2001) ont d'ailleurs mis en évidence par immunocytochimie, à partir d'un anticorps dirigé contre la chaîne A potentielle des DILPs, la présence chez la drosophile de DILPs ou de peptides apparentés au niveau des cellules neurosécrétrices et de leurs axones chez la larve et l'adulte, et également au niveau des cellules de *corpora cardiaca* chez la larve. Une détection plus faible de peptides apparentés aux DILPs a également été obtenue au niveau des cellules neurosécrétrices de moustiques *Aedes aegypti* femelles.

♁ Chez le ver à soie *Bombyx mori*, 38 gènes codant pour des molécules de type insuline (les bombyxines) ont été caractérisés (Nagasawa *et al.*, 1984, 1986 ; Adachi *et al.*, 1989 ; Iwami *et al.*, 1989, 1990 ; Maruyama *et al.*, 1990, 1992 a et b ; Kondo *et al.*, 1996 ; Tsuzuki *et al.*, 1997 ; Yoshida *et al.*, 1997, 1998). Ces gènes sont répartis en 7 familles, A-G, divergentes (Kondo *et al.*, 1996 ; Tsuzuki *et al.*, 1997 ; Yoshida *et al.*, 1998) et sont organisés en 3 catégories au niveau de 3 segments du génome : des paires de gènes B/A, B/C, G/C ou F/B, avec une transcription opposée des deux gènes (Kawakami *et al.*, 1989 ; Yoshida *et al.*, 1997, 1998), des triplets de gènes B/C/A où les gènes C et A sont transcrits en sens inverse du gène B, et qui résultent probablement de crossing-over inégaux entre les paires de gènes B/A et B/C, et enfin des gènes D et E seuls (**Figure I.6**). Les gènes, distants de quelques dizaines de paires de bases (Kawakami *et al.*, 1989), semblent ainsi former des unités de transcription (transcription dans des sens opposés). Tous ces gènes se caractérisent par l'absence d'introns, l'existence de petites séquences répétées de part et d'autre de la région transcrite, et pour certains par la présence d'une séquence poly(A⁺) immédiatement à la suite du site de terminaison de la transcription. Ces éléments sont caractéristiques des gènes appelés rétrotransposons, c'est-à-dire des gènes qui résultent de la transcription inverse d'ARNm réinsérés dans le génome pour former des pseudogènes.

Les bombyxines matures résultent du clivage protéolytique du peptide C et de la conversion d'un résidu glutamine en une structure cyclique, le pyroglutamate, à l'extrémité N-terminale de la chaîne B (Kawakami *et al.*, 1989). Le blocage de la chaîne B par ce résidu pyroglutamate permet aux bombyxines d'acquérir une plus grande stabilité ainsi qu'une activité biologique potentiellement plus importante. La bombyxine A2 est plus proche au niveau structural de la relaxine de Vertébrés que de l'insuline, ce qui suggère que le site de

reconnaissance du récepteur chez les insulines (l'extrémité C-terminale de la chaîne B) n'a évolué seulement qu'à partir des Vertébrés (Smit *et al.*, 1998, pour revue).

Les bombyxines s'expriment au cours du développement embryonnaire (Fugo *et al.*, 1987), plus faiblement au cours du développement larvaire (Saegusa *et al.*, 1992) et au niveau de nombreux organes et tissus adultes tels que le cerveau, les ganglions, l'épiderme, les testicules, les ovaires, le corps gras et le tube digestif (Iwami *et al.*, 1989, 1996b). Iwami et ses collaborateurs (1989) suggèrent d'ailleurs que les bombyxines pourraient être des homologues de l'IGF-2 du fait de leur structure primaire et de leur fonction dans l'embryogenèse. Les bombyxines semblent donc exercer de nombreuses fonctions au cours des premières étapes du développement (embryonnaire et larvaire), mais également chez l'adulte et notamment dans le contrôle de l'ovogenèse (Kawakami *et al.*, 1989). Ces molécules agissent via la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Kawakami *et al.*, 1989), ainsi que du métabolisme glucidique (Satake *et al.*, 1997). D'ailleurs, par voie de rétrocontrôle, il semblerait que le taux de glucose circulant soit un signal nutritionnel régulateur de la sécrétion de bombyxine par le système nerveux central (Masumura *et al.*, 2000).]

Des molécules proches des bombyxines ont également été mise en évidence chez d'autres espèces d'insectes lépidoptères : chez *Samia cynthia ricini*, les SRBPs (*Samia* bombyxin-related peptides) sont impliqués dans le développement de la puppe jusqu'au stade adulte (Kimura-Kawakami *et al.*, 1992 ; Nagata *et al.*, 1999) et chez *Agrius convolvuli*, des ABRPs (*Agrius* bombyxin-related peptides) ont également été identifiés (Iwami *et al.*, 1996a).

✎ Chez le criquet migrateur *Locusta migratoria*, un seul gène d'organisation similaire à celle des gènes d'insulines de Mammifère a été caractérisé (Lagueux *et al.*, 1990 ; Kromer-Metzger et Lagueux, 1994). Mais ce gène semble s'exprimer sous la forme d'au moins deux transcrits divergents au niveau de leur 5'NTR (extrémité 5' non traduite de l'ARNm) et de l'extrémité 5' de la région codante qui possède deux codons ATG initiateurs de la transcription. Le gène comporte donc au minimum deux promoteurs, ce qui permet une régulation différentielle de l'expression de ces deux isoformes. Le transcrit LIRP T1 est exprimé au niveau des cellules neurosécrétrices du cerveau, alors que le transcrit LIRP T2 s'exprime en quantité plus faible dans tous les tissus périphériques (Kromer-Metzger et Lagueux, 1994). Ces transcrits sont présents en quantité significative depuis les stades tardifs

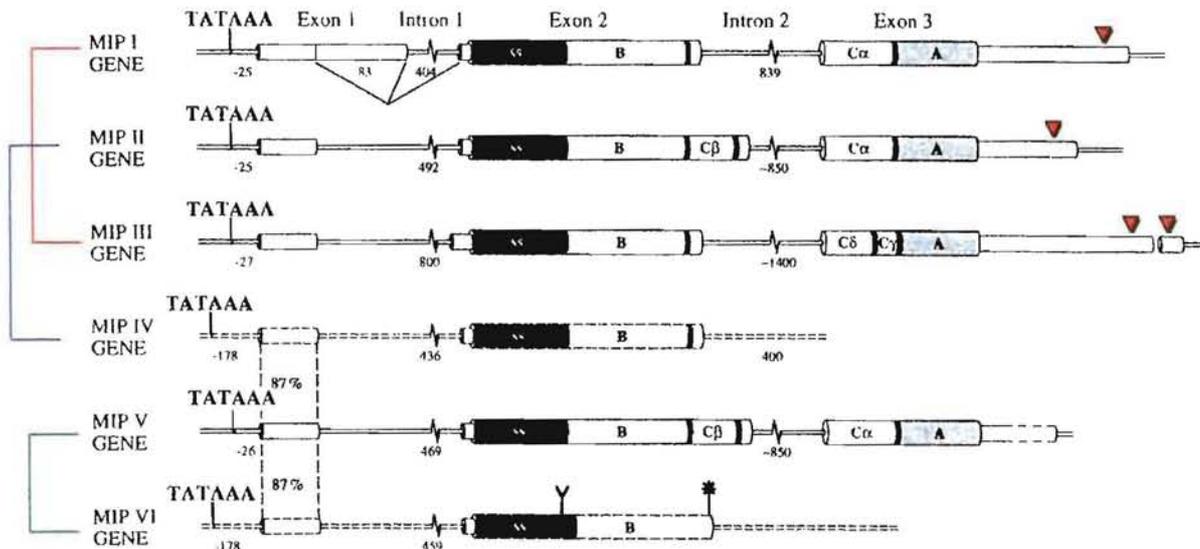
du développement embryonnaire jusqu'à l'adulte, et un effet activateur des processus de vitellogenèse des femelles adultes a été observé (Goltzene *et al.*, 1992).

Le peptide LIRP semble assez proche de la bombyxine A2 avec 30% et 50% d'identité sur les domaines B et A, respectivement. Cependant, quelques différences majeures persistent : le peptide LIRP est plus long, et contrairement aux bombyxines, l'extrémité N-terminale de sa chaîne A n'est pas bloquée. En fait, le LIRP est aussi proche des bombyxines que des insulines de poissons ou de reptiles. En outre, le LIRP et les bombyxines divergent davantage des MIPs que des insulines de Vertébrés (Lagueux *et al.*, 1990).

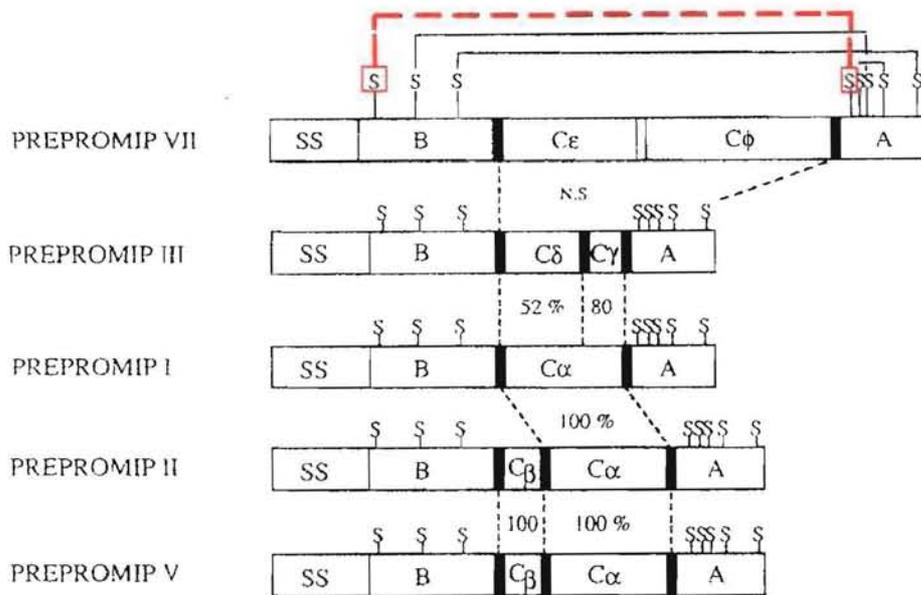
2.3.2. Chez les Mollusques.

♣ Chez la limnée *Lymnaea stagnalis*, Smit et ses collaborateurs (1988) ont été les premiers à caractériser un peptide apparenté aux insulines/IGFs à partir des cellules neurosécrétrices des ganglions cérébraux des Light Green Cells (LGCs). Actuellement, 6 gènes codant pour des MIPs et l'ADNc du MIP VII (Molluscan Insulin-related Peptides) ont été identifiés et séquencés (Smit *et al.*, 1988, 1991, 1992 a, 1993, 1996 ; Li *et al.*, 1992 a et b ; Li et Geraerts, 1992). Les gènes sont organisés en paires dans le génome (MIP III/MIP I, MIP II/MIP IV et MIP VI/ MIP V) et tous sont transcrits dans le même sens ; ils ne forment donc pas d'unités de transcription comme c'est le cas pour les bombyxines. Toutefois, seuls 4 gènes semblent fonctionnels (**Figure I.7**), les gènes codant pour le MIP IV et le MIP VI s'apparenteraient, eux, à des pseudogènes du fait de l'absence de boîtes Goldberg-Hogness ("TATA box"), de l'exon 3 dans le gène du MIP VI (insertion de 7 nucléotides à l'extrémité C-terminale de l'exon 2 qui conduit à l'insertion d'un codon Stop dans la phase ouverte de lecture), et de l'absence de détection de leurs ARNm. Toutefois, dans de rares cas, les pseudogènes peuvent être rétrotranscrits de façon fonctionnelle (Smit *et al.*, 1998, pour revue). Cette diversité des gènes MIPs pourrait résulter de la pression de mutation exercée au niveau d'un gène MIP ancestral et qui aurait conduit à des phénomènes de crossing-over inégaux et à la transformation partielle de gènes.

Les peptides MIPs se caractérisent par la présence d'une cystéine supplémentaire à chacune des deux extensions N-terminales des chaînes B et A ce qui a conduit à la formation d'un pont disulfure interchaîne additionnel (4^{ème} pont disulfure) afin probablement d'assurer une meilleure stabilisation de la molécule en réponse aux modifications de la structure primaire (extensions) et de la structure tertiaire plus lâche et donc moins stable que celle de l'insuline (**Figure I.7**). Parfois, les MIPs se distinguent également par la formation de résidus



a



b

Figure I.7 : Les peptides de type insuline chez la limnée *Lymnaea stagnalis*.

a : Représentation schématique des gènes MIP I, II, III, IV, V et VI. Sont indiqués : l'épissage alternatif de l'exon 1 du gène MIP I, la position de la boîte "TATA", les signaux potentiels de polyadénylation (▼), l'insertion (Y) de 7 nucléotides dans l'exon 2 du gène MIP VI qui introduit un codon stop (*). (D'après Smit *et al.*, 1998).

b : Représentation schématique des précurseurs des MIP I, II, III, V et VII. Les MIP IV et VI ne sont probablement pas exprimés car leurs gènes présentent des caractéristiques de pseudogènes. Les MIPs possèdent deux cystéines supplémentaires aux extrémités N-terminales des chaînes B et A ce qui induit la formation d'un pont disulfure additionnel (pointillés rouges). Les pourcentages d'identité entre peptides C sont donnés. (D'après Smit *et al.*, 1996).

pyroglutamate aux extrémités N-terminales des chaînes B et A (comme les bombyxines ou l'insuline-like de l'aplysie). Néanmoins, les MIPs restent des molécules assez divergentes entre elles, avec un maximum de 38% d'identité entre les chaînes B et de 76% entre les chaînes A (Smit *et al.*, 1998). Le peptide C des précurseurs des MIPs semble, lui, mieux conservé, avec un faible taux de mutations (sauf chez le MIP VII) ce qui suggère que ce peptide pourrait avoir un rôle physiologique important s'il n'est pas fortement dégradé ou tronqué au niveau intracellulaire (de With *et al.*, 1997). Le MIP VII comporte un peptide C inhabituellement long et sans aucune identité de séquence avec les peptides C des autres MIPs.

Cette importante divergence de la structure primaire des MIPs entre eux et avec l'insuline de Vertébrés, ainsi que la présence d'un pont disulfure supplémentaire qui pourrait altérer l'environnement de ces résidus, conduit probablement les MIPs à se lier à un récepteur unique présentant d'importantes différences par rapport au récepteur à l'insuline de Vertébrés. Cette liaison s'effectuerait avec des affinités différentes selon le ligand afin de contrôler les nombreux processus associés à la croissance, à la reproduction et au métabolisme. En outre, l'expression des MIPs au niveau des LGCs et leur libération au niveau des MLNs ("Median Lip Nerves") pourrait être différentielle en réponse à divers stimuli physiologiques et/ou environnementaux. Les gènes MIP I, II, III et V s'expriment exclusivement dans les LGCs où ils sont impliqués dans la régulation de la croissance, de la reproduction et des métabolismes associés (Geraerts *et al.*, 1992), alors que le gène VII s'exprime au niveau des LGCs mais aussi au niveau du ganglion buccal ce qui suggère son implication dans la nutrition (Smit *et al.*, 1996).

✂ Par ailleurs, un gène codant pour une molécule apparentée à l'insuline a également été caractérisé chez l'aplysie *Aplysia californica* (Floyd *et al.*, 1999). L'insuline d'aplysie (9146 Da) est une des plus longues molécules de type insuline d'Invertébrés et de Vertébrés. Elle présente une extension C-terminale de la chaîne A représentée par un peptide D (acétylé à son extrémité N-terminale), caractéristique des IGFs et que l'on retrouve chez le LIRP de *Locusta migratoria* et certains ILPs de *C. elegans*. La proinsuline d'aplysie semble également assez proche au niveau de sa structure primaire des MIPs, avec la présence de 8 résidus cystéines assurant l'élaboration de 4 ponts disulfures, et de 2 peptides C (C α et C β) peu homologues avec les peptides C de Vertébrés mais avec une relative identité de séquence avec les peptides C des MIPs. En effet, les peptides C α de la proinsuline d'aplysie et des proMIPs partagent une similarité de séquence au niveau de leur extrémité C-terminale, et le

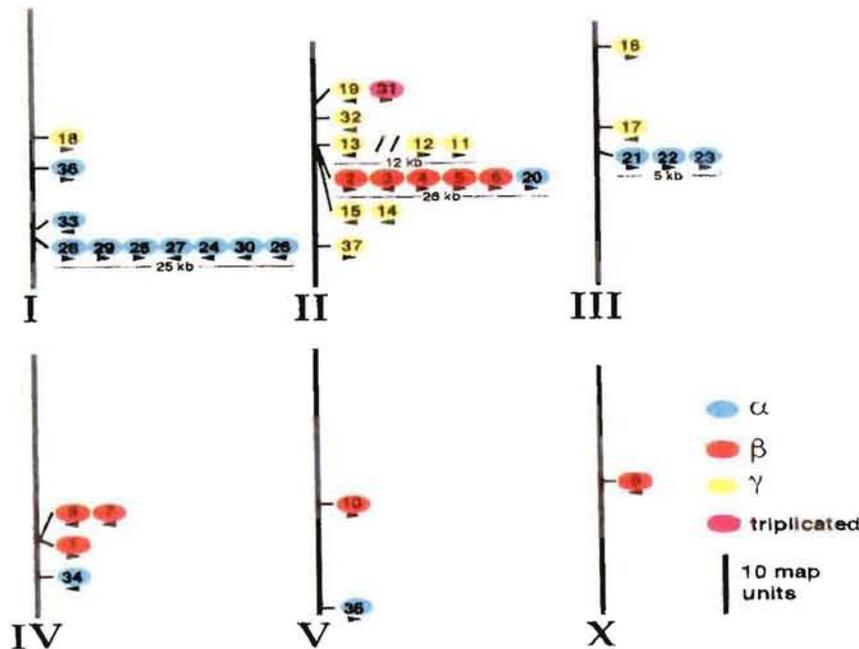
peptide C β de la proinsuline d'aplysie est similaire à l'extrémité N-terminale du peptide C β du proMIP III. Enfin, comme chez les bombyxines et certains MIPs, la chaîne A peut être bloquée par la formation d'un résidu pyroglutamate.

Ce peptide apparenté à l'insuline est synthétisé au niveau des cellules des ganglions cérébraux puis est transporté jusqu'à l'aire neurohémale pour y être libéré ou stocké. L'expression de ce peptide semble être dépendante du stimulus nutrition ce qui suggère son implication dans la régulation du métabolisme.

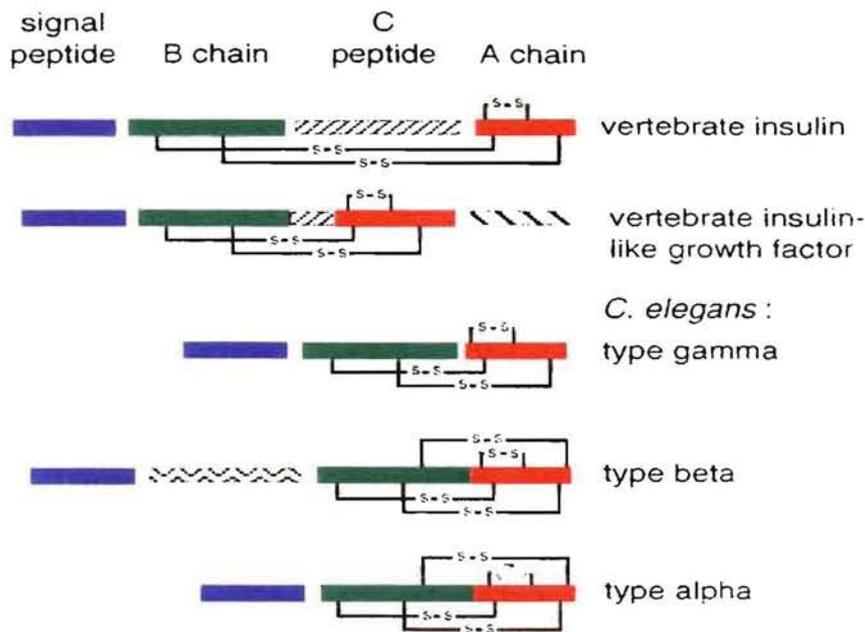
2.3.3. Chez les Nématodes.

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, 3 molécules apparentées à l'insuline ont été caractérisées par clonage (Grégoire *et al.*, 1998 ; Kawano *et al.*, 2000). Toutefois, à partir de l'analyse informatique du génome presque complet du nématode, 37 gènes de la famille des insulines/IGFs ont été identifiés à ce jour (Duret *et al.*, 1998 ; Pierce *et al.*, 2001).

Ces 37 gènes potentiels sont répartis sur l'ensemble du génome, soit 5 autosomes et un chromosome sexuel X (Pierce *et al.*, 2001). La plupart des gènes sont organisés en groupe de 3 ou 7 gènes contigus, constituant ainsi le plus souvent des unités de transcription (sens de transcription opposé) (**Figure I.8**) (Pierce *et al.*, 2001). Mais tous ces gènes sont très divergents avec seulement 13 à 25% d'identité entre les chaînes A ou B (Duret *et al.*, 1998). Ces données suggèrent donc que ces molécules de type insuline ont évolué à la suite de deux duplications très anciennes qui auraient conduit à la formation de 3 familles de gènes, α , β et γ (**Figure I.8**) (Duret *et al.*, 1998), puis de duplications de gènes relativement récentes qui ont aboutit à la formation de groupes de gènes contigus, lesquels ont ensuite rapidement évolué, ce qui explique la forte divergence de séquence entre gènes de chaque groupe. La diversité de séquences des gènes se situe à plusieurs niveaux : la présence du peptide C, la présence de domaines additionnels, en plus des chaînes A et B et du peptide C, et de sites de clivage potentiels, et l'insertion ou la délétion de nucléotides. Toutefois, malgré cette importante diversité, tous les peptides matures possèdent la structure tertiaire typique des molécules de la famille des insulines/IGFs, y compris les propeptides de la famille α pour lesquels l'absence des 2 cystéines additionnelles de la chaîne A est compensée par la substitution de deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et/ou tyrosine) conduisant à une interaction hydrophobe qui remplace le pont disulfure.



a



b

Figure I.8 : Les peptides de type insuline chez *Caenorhabditis elegans*.

a : Organisation génomique de la famille de gènes de type insuline sur les chromosomes de *C. elegans* (chiffres romains). Beaucoup de gènes sont organisés en grappe de 2 à 7 gènes de la même classe. Il existe 3 classes de gènes : le type γ (jaune), le type β (rouge) et le type α (bleu), mais aussi un gène codant pour trois peptides de type insuline (prune). La taille des grappes est indiquée pour celles constituées de plus de 3 gènes. Le sens de transcription des gènes est indiqué par une flèche située sous le gène. (D'après Pierce *et al.*, 2001).

b : Représentation schématique de la structure des peptides matures d'insuline et d'IGF de Vertébrés et des trois classes de peptides de type insuline de *C. elegans*. Les types α et β n'ont pas de peptide C potentiel mais un pont disulfure additionnel (type β) qui peut être substitué par une interaction hydrophobe phénylalanine et/ou tyrosine (type α). (D'après Duret *et al.*, 1998).

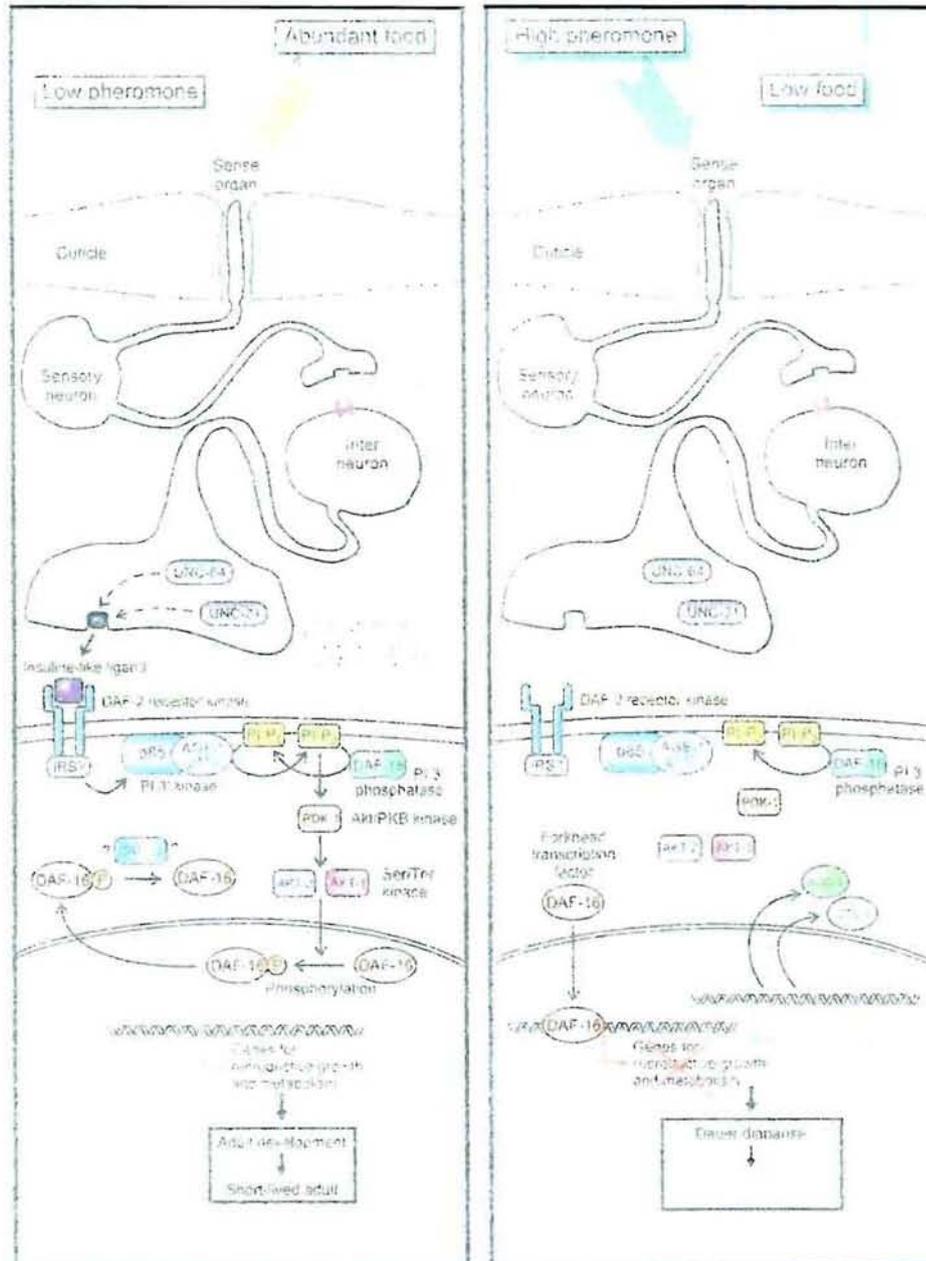


Figure I.9 : Représentation de la régulation de la durée de vie de *Caenorhabditis elegans* par la perception des conditions environnementales et de la signalisation par les molécules de type insuline. (D'après Braeckman *et al.*, 2001).

Les gènes des molécules de type insuline s'expriment au cours du développement embryonnaire et des 4 stades larvaires de *C. elegans* et particulièrement au cours de l'étape critique du 2^{ème} stade larvaire au niveau duquel se décident l'arrêt en diapause (espérance de vie augmentée) ou la poursuite du développement en vue de la reproduction (vieillesse normale).

Les membres de cette grande famille complexe de molécules agissent probablement de façon indépendante afin d'assurer de multiples fonctions, peut-être redondantes. Il semblerait que les différents peptides de type insuline de *C. elegans*, selon leur structure primaire, agissent de façon antagoniste (s'ils ont un peptide C clivé) ou agoniste (si leur peptide C n'est pas clivé) vis-à-vis d'un récepteur unique appelé DAF-2 (Kimura *et al.*, 1997) (Pierce *et al.*, 2001). En outre, ces gènes présentent des profils d'expression différentielle en réponse à différents stimuli externes et internes (Hsin et Kenyon, 1999 ; Gems et Partridge, 2001 ; Braeckman *et al.*, 2001). Ainsi, des conditions environnementales défavorables comme une température élevée, une insuffisance de nourriture, ou une forte densité de population qui conduit à l'accumulation d'une phéromone naturellement sécrétée, semblent favoriser l'arrêt en diapause des larves de stade larvaire L2 ou empêcher la sortie de diapause de ces larves, conjointement à un arrêt d'expression de gènes codant pour des molécules de type insuline (**Figure I.9**). En revanche, dans des conditions normales de nutrition et de reproduction (Hsin et Kenyon, 1999 ; Gems et Partridge, 2001), des neurones chimiosensoriels peut-être à sérotonine pourraient médier l'effet des stimuli jusqu'aux voies de signalisation de DAF-2, afin de réguler le métabolisme notamment énergétique (voie PI-3 kinase), la reproduction, la croissance, ainsi qu'une sénescence normale (voie Akt/PKB kinase et DAF-16).

2.4. Evolution des ligands du système insuline/IGF.

Les importantes similitudes des séquences primaires et de structures tertiaires entre les molécules d'insuline et d'IGFs indiquent que ces deux molécules sont probablement issues d'une molécule ancestrale commune. D'ailleurs, les IGF de type 1 et de type 2 sont des molécules à chaîne unique comme la proinsuline (Humbel, 1990). De plus, chez l'homme, les gènes codants pour l'insuline et l'IGF-2 sont portés par le chromosome 11 et le gène de l'IGF-1 est localisé sur le chromosome 12. Ces données suggèrent que le gène ancestral aurait subi une duplication en tandem donnant le gène de l'insuline et le gène d'un proto-IGF lequel aurait ensuite rapidement subi une duplication avec translocation chromosomique à l'origine

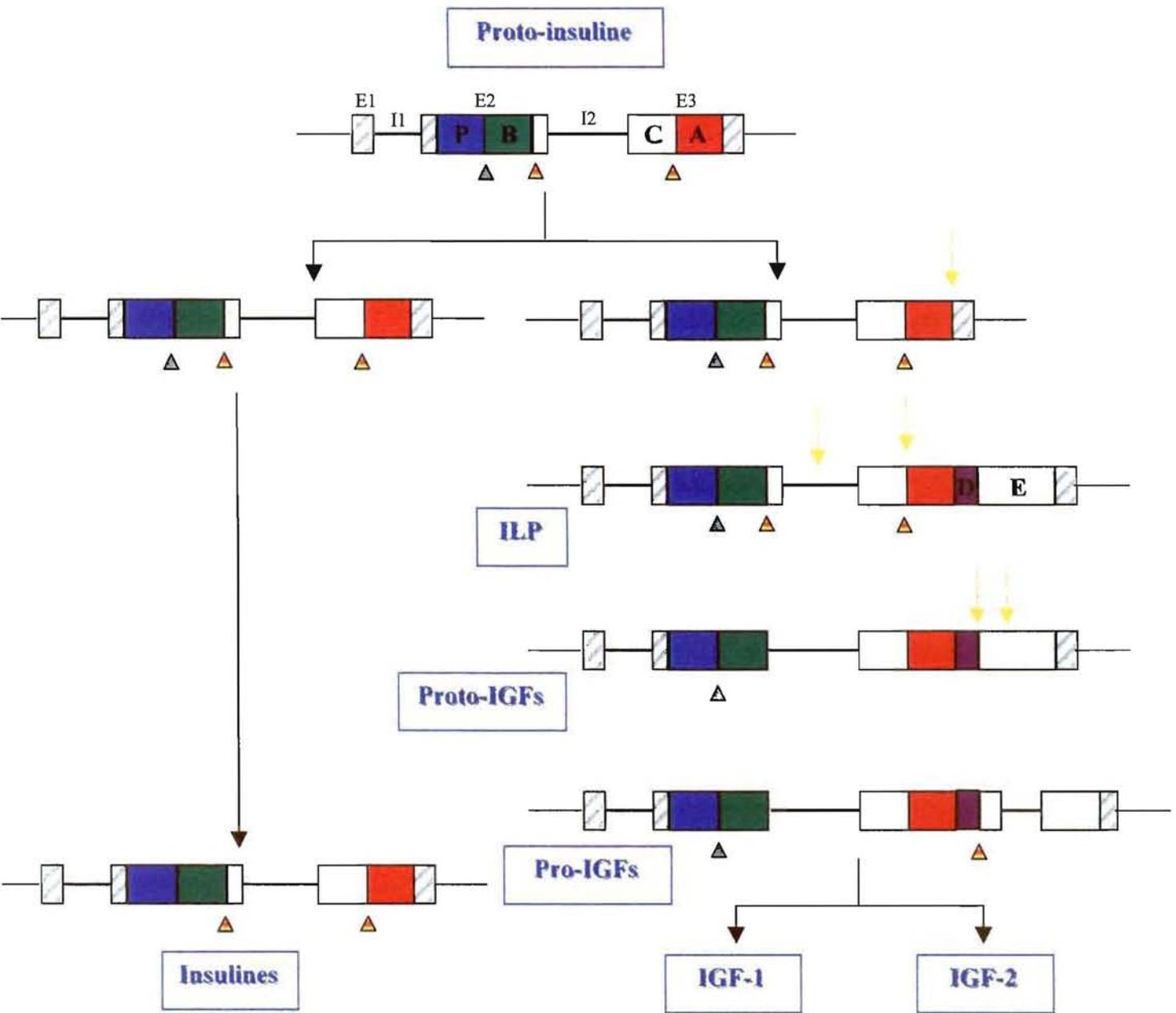
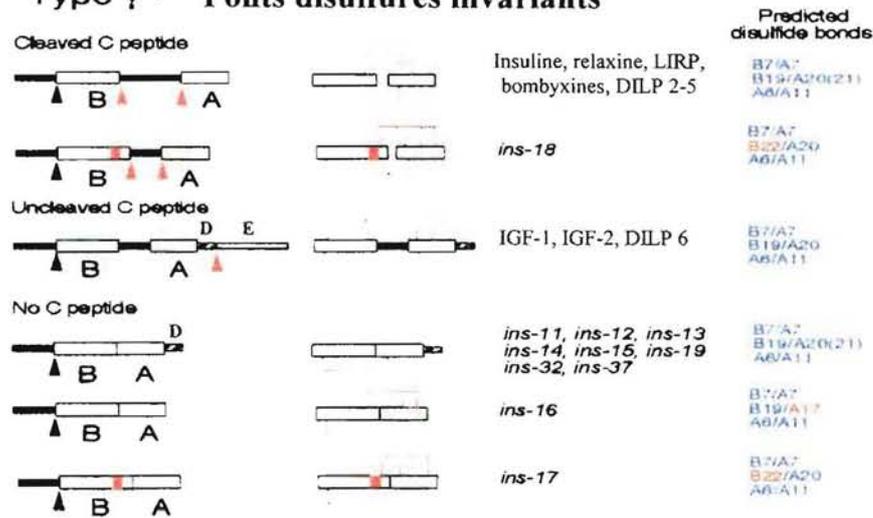


Figure I.10 : Modèle proposé pour l'évolution des gènes des ligands du système insuline/IGF chez les Vertébrés.

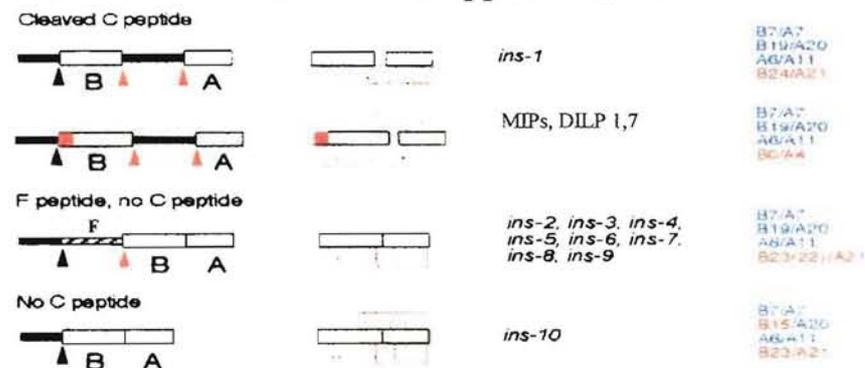
(Adaptation du modèle proposé par Chan *et al.*, 1990, 1993).

Le gène de proto-insuline présente la même organisation exon/intron que le gène de l'insuline de Vertébrés avec 3 exons (E1, E2 et E3) et deux introns (I1 et I2). La conversion proto-insuline/ILP est réalisée par une mutation non-sens/sens à l'extrémité C-terminale de la séquence codante pour la chaîne A ; la conversion ILP/proto-IGF est réalisée par l'insertion de nucléotides en amont de l'intron I2 à l'extrémité C-terminale de la séquence codante de la chaîne B). Les gènes de l'IGF-1 et de l'IGF-2 résultent de l'insertion d'un intron dans la séquence codante du domaine E puis d'une duplication du gène. Les gènes des insulines proviennent de mutations sans conséquences majeures sur la structure des peptides. Les flèches oranges représentent les points de mutations, les triangles gris correspondent au site de clivage du peptide signal (P), et les triangles jaune/rouges correspondent aux sites de clivage du peptide C (C) et du domaine E.

Type γ - Ponts disulfures invariants



Type β - Pont disulfure supplémentaire



Type α - Absence ou substitution du pont disulfure A6/A11

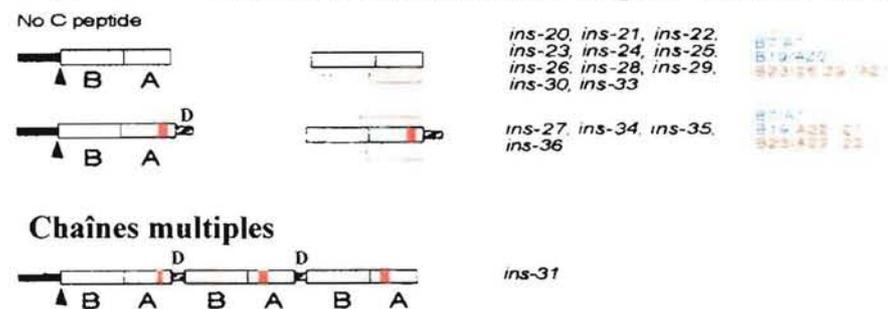


Figure I.11 : Organisation génomique et structure secondaire des peptides de la famille des insulines/IGFs (Vertébrés et Invertébrés) répartis dans les trois catégories γ , β et α . (Adaptation de Pierce *et al.*, 2001 et Brogiolo *et al.*, 2001).

Les ponts disulfures et la position des cystéines indiqués en bleu sont ceux retrouvés dans la structure de l'insuline de Vertébrés. Les ponts disulfures et la position des cystéines indiqués en rouge sont absents ou variables dans l'insuline de Vertébrés. Les parties oranges représentent des insertions d'acides aminés. Les triangles noirs et oranges indiquent respectivement les sites de clivage protéolytique du peptide signal et les sites de clivage prédictifs des peptides C, E ou F. Une quatrième catégorie de gènes a été identifiée chez *C. elegans* ; il s'agit de gènes à chaînes multiples.

LIRP : *Locusta* insulin-related peptide ; DILP : *Drosophila* insulin-related peptide ; *ins*: peptides de type insuline de *Caenorhabditis elegans*; MIP: molluscan insulin-related peptide (*Lymnaea stagnalis*).

du gène de l'IGF-1 porté par le chromosome 12, la copie du proto-IGF restée sur le chromosome 11 ayant évolué vers le gène de l'IGF-2 et le gène de l'IGF-1 (Reinecke et Collet, 1998, pour revue).

L'évolution des ligands du système insuline/IGF chez les Prochordés et les Vertébrés se serait donc déroulée en 3 étapes (**Figure I.10**) :

- 1^{ère} étape : après sa duplication, une des copies du gène de la proto-insuline subit une mutation non-sens/sens au niveau du codon de l'extrémité C-terminale de la chaîne A. Au niveau de la séquence primaire, le codon stop n'existe alors plus et des extensions D et E apparaissent caractérisant les IGFs. Le peptide C est toujours présent, scindé en deux par un intron au niveau génique, avec à chaque extrémité des sites de clivage comme pour l'insuline. Le gène de proto-insuline devient alors un gène codant pour une molécule de type ILP. La seconde copie du gène de la proto-insuline subit également des mutations, mais de moindre importance, conduisant à la relative diversité des insulines de Vertébrés.

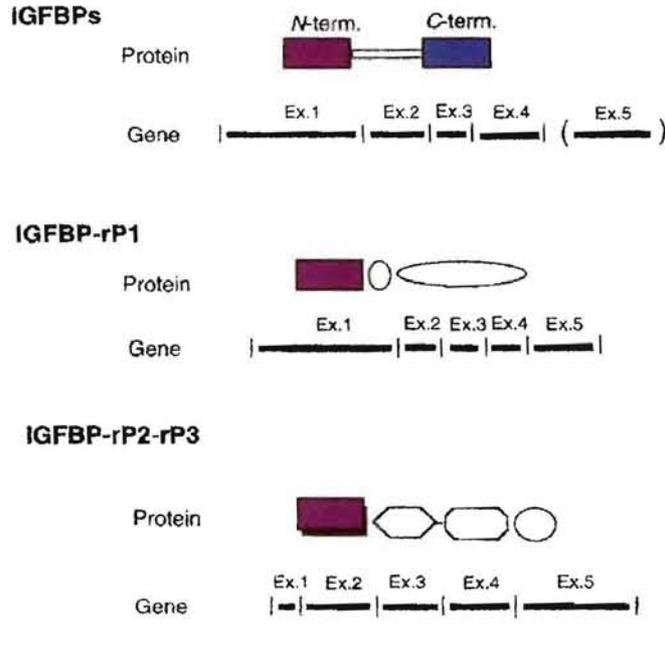
- 2^{ème} étape : le gène de type ILP subit des modifications (mutations) au niveau de l'intron inséré dans l'exon codant pour le peptide C, ainsi qu'au niveau de la jonction peptide C/chaîne B. Ces mutations conduisent à l'obtention d'une molécule à une seule chaîne polypeptidique contenant un peptide C de plus petite taille mais non clivé et des domaines D et E ; cette molécule pourrait correspondre à une molécule de proto-IGF.

- 3^{ème} étape : la molécule de proto-IGF subit de nouvelles mutations conduisant à l'insertion d'un intron au sein de la séquence codante du domaine E ainsi qu'à la formation d'un site de clivage protéolytique à l'extrémité N-terminale du domaine E, puis une duplication avec translocation chromosomique qui aboutit à l'émergence de deux molécules distinctes, l'IGF-1 et l'IGF-2.

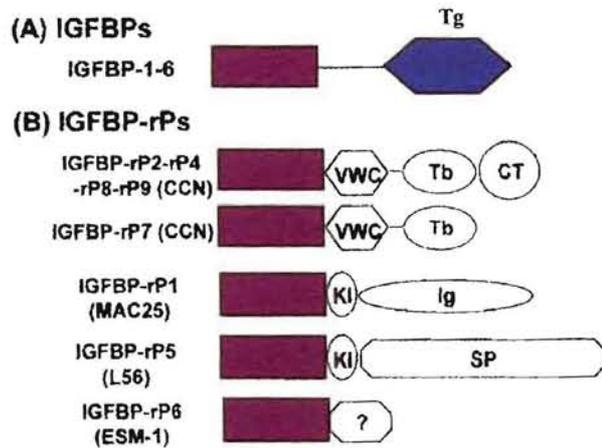
Chez les Invertébrés, la molécule ancestrale proto-insuline pourrait elle aussi avoir subi de nombreuses mutations puis, plus tardivement, des duplications avec inversion ou translocation chromosomique, conduisant à la diversité des molécules de type insuline au sein de chaque espèce d'Insectes, de Mollusques et de Nématode (**Figure I.11**).

3. Les protéines de liaison des IGFs (IGFBPs).

Chez les Mammifères, 6 protéines de liaison des IGFs (IGFBPs) ont été caractérisées (Hwa *et al.*, 1999, pour revue). Les IGFBPs sont des protéines de 216 à 289 acides aminés (22,8 à 31,4 kDa) riches en cystéines (16 à 20 résidus) réparties entre les



a



b

Figure I.12 : Structure des gènes des molécules de la superfamille des protéines de liaison des IGFs (IGFBPs) (a) et schématisation des domaines structuraux des IGFBPs et des IGFBP-rPs matures (b).

Les IGFBPs sont codées par 4 exons (5 pour l'IGFBP-3) et les IGFBP-rPs sont codées par 5 exons. Les IGFBPs matures sont constituées d'un domaine N-terminal, d'un domaine intermédiaire et d'un domaine C-terminal riche en thyroglobuline de type I (Tg). Les IGFBP-rPs sont constituées d'un domaine N-terminal et de domaines variables : VWC, répétition de facteurs de "Von Willebrand" de type C ; Tb, répétition de thrombospondine de type I ; CT, domaine C-terminal ; KI, inhibiteur de protéinase à sérine de type Kazal ; Ig, domaine apparenté à l'immunoglobuline ; SP, protéinase à sérine.

(D'après Hwa *et al.*, 1999).

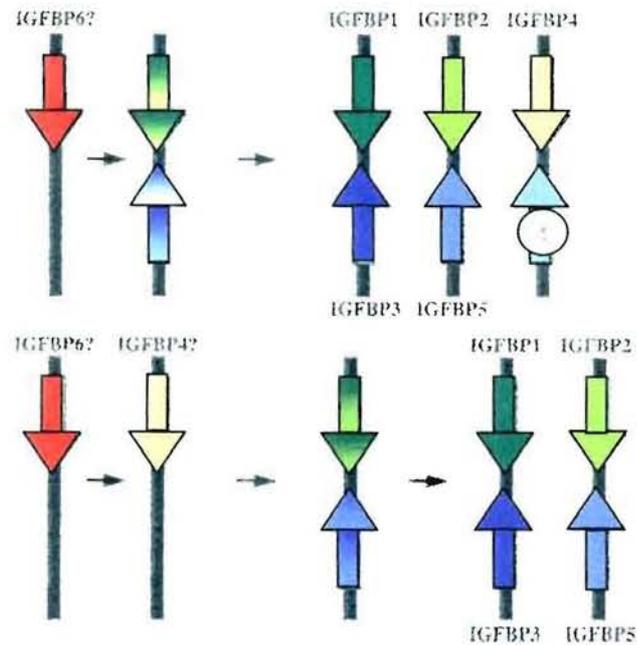


Figure I.13 : Voies possibles de l'évolution des protéines de la superfamille des IGFBPs (IGFBPs et IGFBP-rPs).

Dans les deux voies possibles, l'IGFBP-6 serait la plus ancestrale des protéine de liaison des IGFs. Une duplication en tandem du gène ancestral suivie d'une inversion serait la première étape de la duplication de la famille, suivie de deux étapes successives de duplication de chromosomes avec translocation.

(D'après Reinecke et Collet, 1998).

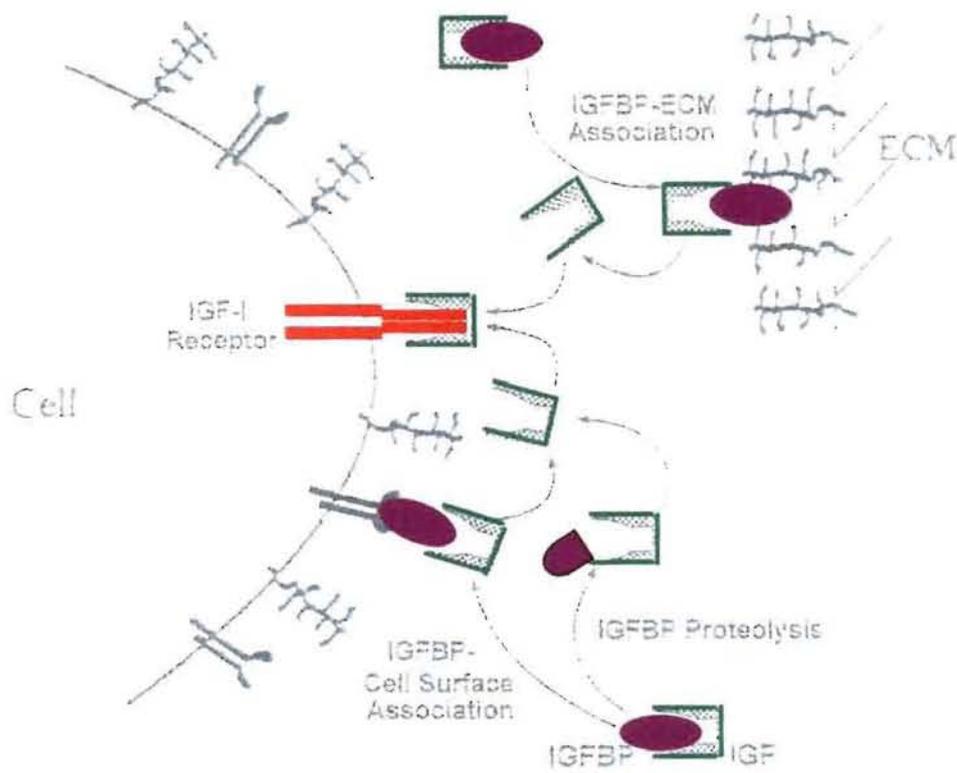


Figure I.14 : Représentation du mécanisme par lequel les IGFBPs potentialisent l'action des IGFs à la surface cellulaire.

L'interaction des complexes IGFBPs/IGFs avec les protéines de la surface cellulaire ou de la matrice extracellulaire (EMC) résulte en une augmentation de la concentration locale en IGF dans le voisinage des récepteurs aux IGFs. Cette interaction diminue l'affinité des IGFBPs pour les IGFs, induit la protéolyse des IGFBPs et libère ainsi l'IGF pour le récepteur.

(D'après Jones et Clemmons, 1995).

domaines N- et C-terminal des protéines. Les IGFbps sont organisés en 3 domaines structuraux de taille équivalente (**Figure I.12**):

- le domaine N-terminal, très conservé avec 58% de similitude, est hautement structuré avec la présence d'au maximum 6 ponts disulfures intradomaine (10 à 12 cystéines conservées en positions invariantes). Ce domaine est particulièrement impliqué dans la liaison des IGFs, mais aussi probablement de l'insuline. Cette "séquestration" des IGFs par les IGFbps conduit à une diminution des interactions des IGFs avec leurs récepteurs, ainsi qu'à l'augmentation de la demi-vie des IGFs ; cette forme liée protégeant de la dégradation protéolytique.

- le domaine "intermédiaire", très variable avec moins de 15% de similitude, ne sert probablement que de lien entre les domaines des extrémités (N- et C-terminal). Toutefois, ce domaine est soumis à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que des N- et/ou O-glycosylations, qui n'influencent pas l'affinité des IGFbps pour les IGFs mais qui pourraient certainement conférer aux IGFbps une plus grande résistance à la dégradation protéolytique (par les protéases spécifiques des IGFbps), ou bien au contraire des modifications par phosphorylation au niveau de résidus sérine qui pourraient accroître l'affinité des IGFbps pour les IGFs.

- le domaine C-terminal très conservé, mais moins que le domaine N-terminal, présente 34% de similitude entre les différentes IGFbps. Il est également très structuré avec la présence de 3 ponts disulfures intradomaine conservés (6 cystéines invariantes). Ce domaine est impliqué dans la liaison des IGFs, mais aussi (avec la région intermédiaire) dans la liaison de plusieurs autres protéines telles que les protéoglycanes de la surface cellulaire et de la matrice extracellulaire (permettant de disposer d'un réservoir d'IGFs au niveau de la matrice extracellulaire et potentiellement près des récepteurs) (**Figure I.14**) et même des composants intracellulaires et notamment de la membrane nucléaire (translocation des IGFbps et /ou des IGFs dans le noyau).

Les gènes codant pour les IGFbps sont de taille variable (5,7 à 33 kb), du fait de la grande divergence de taille des introns, et possèdent 4 exons codants (**Figure I.13**). Chez l'homme, ces gènes sont généralement répartis en paires sur le génome IGFBP-1/IGFBP-3 (7p14-p12) et IGFBP-2/IGFBP-5 (2q33-q34), mais peuvent aussi être seuls IGFBP-4 (17q12-q21.1) et IGFBP-6 (12q13). Les gènes des IGFbps auraient probablement évolué par duplication de gènes en tandem avec inversion, et cela très tôt au cours de l'évolution. La molécule ancestrale serait l'IGFBP-6, molécule la plus divergente des IGFbps, qui s'apparenterait alors à une proto-IGFBP.

Récemment, des protéines riches en cystéines et présentant de fortes similarités structurales (conservation du domaine N-terminal) et fonctionnelles avec les IGFBPs, mais agissant indépendamment du système IGF, ont été mise en évidence. Ces IGFBP-rPs (IGFBP related Proteins) constituent avec les IGFBPs, la superfamille des IGFBPs.

Des molécules d'IGFBPs ont été caractérisées chez de nombreux Vertébrés supérieurs. Chez les Vertébrés inférieurs et les Invertébrés, aucune IGFBP n'a été identifiée à ce jour. Seule une détection immunologique de trois IGFBPs dans le sérum de la lamproie *Geotria australis* (protochordé) a été réalisée (Upton *et al.*, 1993).

4. Les récepteurs du système insuline/IGF.

4.1. Les récepteurs à l'insuline et aux IGFs chez les Vertébrés.

4.1.1. Le récepteur à l'insuline.

Le gène unique codant pour le récepteur humain à l'insuline (19p7) (Yang Feng *et al.*, 1985) s'étend sur environ 150 kb d'ADN chromosomique et est organisé en 22 exons séparés par 21 introns (Seino *et al.*, 1990) (**Figure I.15**). Bien que l'information codante ne soit contenue que dans 4,2 kb d'ADNc, la plupart des types cellulaires expriment de nombreuses isoformes d'ARNm de longueur variable, comprise entre 5,7 et 9,5 kb (Goldstein *et al.*, 1987 ; Goldstein et Kahn, 1989). Cette hétérogénéité des transcrits provient essentiellement de l'existence de signaux de polyadénylation variables dans la région 3' non traduite conduisant à une 3'NTR de longueur variable. La région 5'NTR, de longueur plus constante (entre 0,5 et 1 kb), présente également une certaine variabilité au niveau de la région promotrice, typique des gènes "housekeeping". Leur expression constitutive est due à l'absence de motifs consensus de type CAAT et TAAT et à une très forte proportion de nucléotides G+C (guanine et cytosine) constituant de nombreux sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription (Sp1 ou facteurs de transcription précoces de la famille EGR) (Seino et Bell, 1989 ; Mamula et Goldfine, 1992). Toutefois, l'hétérogénéité ne touchant que des régions non traduites (5' et 3'NTR), tous les ARNm sont traduits en un précurseur unique simple chaîne.

Le prorécepteur (environ 180 kDa) contient la séquence complète codant à la fois pour la sous-unité α et la sous-unité β , reliées entre elles par un peptide connectif de 4 acides aminés (**Figure I.15**). Après sa synthèse au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (REG), le prorécepteur est acheminé à travers l'appareil de Golgi où il est rapidement glycosylé et acquiert ainsi un poids moléculaire d'environ 210 kDa. Les prorécepteurs sont ensuite maturés en dimères (α - β) par le clivage protéolytique des deux sous-unités au niveau d'un site tétrabasique [R-K-R-R] et la formation de ponts disulfures inter-sous-unités, puis en hétérotétramères fonctionnels (α_2 - β_2) par la formation de ponts disulfures intra-sous-unités et par une dernière étape de glycosylation et d'acétylation des acides gras. Le récepteur à l'insuline actif est donc constitué de deux dimères (α - β) reliés entre eux par des ponts disulfures.

- La sous-unité α (135 kDa), entièrement extracellulaire, codée par les exons 1 à 11, comporte un domaine N-terminal (exons 1 et 2), un domaine riche en résidus cystéine (exons 3 à 5), et un domaine C-terminal (exons 6 à 11). La région riche en cystéine codée par l'exon 3 ainsi que les extrémités N-terminale (68 premiers acides aminés) et C-terminale (400 derniers acides aminés) de la sous-unité α comportent les déterminants structuraux de la liaison de l'insuline (Siddle, 1992, pour revue). L'exon 11 codant pour 36 pb à l'extrémité C-terminale peut être soumis à un épissage alternatif, qui conduit à l'expression de deux isoformes de récepteur à l'insuline différant par la présence ou l'absence de 12 acides aminés à l'extrémité C-terminale de la sous-unité α (Ullrich *et al.*, 1985 ; Ebina *et al.*, 1985 ; Seino et Bell, 1989). Ces deux isoformes du récepteur sont exprimées dans la plupart des tissus, mais dans des proportions différentes d'un tissu à l'autre. La proportionnalité entre ces deux formes issues d'épissage alternatif pourrait légèrement influencer sur la capacité de liaison de l'insuline et de l'IGF-1 au récepteur, la forme ayant subi l'épissage de l'exon 11 liant plus facilement l'IGF-1, mais aussi l'insuline, et présentant une internalisation du récepteur plus active (Kahn *et al.*, 1993, pour revue).

- La sous-unité β (95 kDa) est composée d'un domaine extracellulaire qui présente de nombreux sites de N-glycosylation, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine cytoplasmique comprenant une région catalytique à activité tyrosine kinase. Le domaine transmembranaire joue un rôle relativement passif dans la transduction du signal, même si, du fait de son imbrication dans la bicouche phospholipidique, il interagit avec celle-ci pour assurer la mobilité latérale et l'internalisation du récepteur, qui conduit à la dégradation du récepteur activé et du ligand et donc à la suppression de l'effet biologique du ligand. Le

domaine intracellulaire est constitué d'un domaine catalytique particulièrement bien conservé, d'un domaine juxtamembranaire impliqué dans l'endocytose du récepteur stimulé et dans la signalisation par la liaison de la molécule substrat IRS-1, et d'un domaine C-terminal riche en résidus tyrosine et surtout sérine et thréonine. Le récepteur à l'insuline, à l'état de base (avant la liaison du ligand), est phosphorylé au niveau des résidus sérine et thréonine, alors que lorsqu'il est stimulé par la liaison du ligand, cette phosphorylation s'étend au niveau des résidus sérine et thréonine mais aussi et surtout au niveau de résidus tyrosine. Ainsi, le récepteur est hautement contrôlé par une cascade d'autophosphorylation sur les résidus tyrosine (régulation positive) et sur des résidus sérine et thréonine (régulation négative).

4.1.2. Le récepteur à l'IGF de type 1.

Le gène codant pour le récepteur humain à l'IGF de type 1 (RIGF-1) est un gène unique (15q25-26) couvrant plus de 100 kb d'ADN chromosomique et similaire en taille et dans son organisation exon/intron (21 exons/20 introns) au gène du récepteur à l'insuline (Abbott *et al.*, 1992) (**Figure I.15**). La différence majeure réside dans le fait que l'exon 11 du gène du récepteur à l'IGF-1 ne peut pas subir d'épissage alternatif (Siddle, 1992). La région 5'NTR du gène au récepteur à l'IGF-1 présente également une région promotrice typique des gènes "housekeeping", mais, à la différence du gène au récepteur à l'insuline, la transcription est initiée à partir d'un site unique contenu dans un motif "initiateur" (LeRoith *et al.*, 1995b, pour revue) à environ 1000 pb en amont du codon ATG d'initiation de la traduction. Le gène du récepteur à l'IGF-1 code donc pour une longue 5'NTR qui pourrait être impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire (Kozak, 1991), d'autant plus que cet élément "initiateur" est décrit dans les gènes très fortement régulés au cours de la différenciation et du développement.

La transcription du gène du récepteur à l'IGF-1 conduit à deux types d'ARNm de 11 et 7 kb chez l'homme, mais, chez la plupart des espèces, seul l'ARNm de 11 kb est transcrit (Ullrich *et al.*, 1986). L'information codante ne représentant que 5 kb, la longueur du transcrit est due à la présence de longues extrémités 5' et 3' non traduites, respectivement 1 et 5 kb. Le transcrit est présent dans tous les tissus et types cellulaires, mais en faible quantité. Cette expression ubiquitaire, faible mais constante, du récepteur à l'IGF-1 illustre le fait que la croissance de la plupart des types cellulaires requièrent de l'IGF-1 (ou bien de grandes quantités d'insuline). L'expression la plus importante est obtenue lors du développement embryonnaire et notamment au cours de l'organogenèse précoce, ainsi que lors des premiers

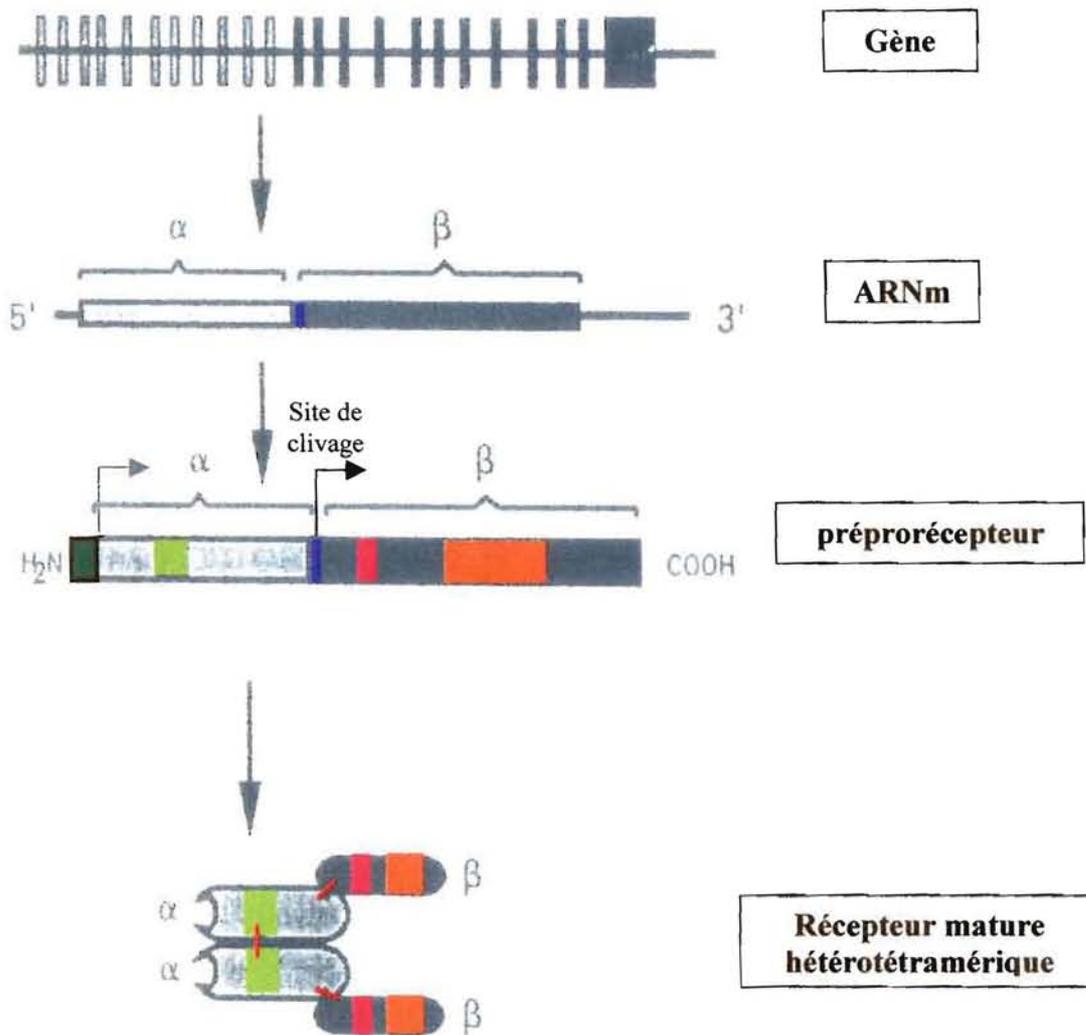
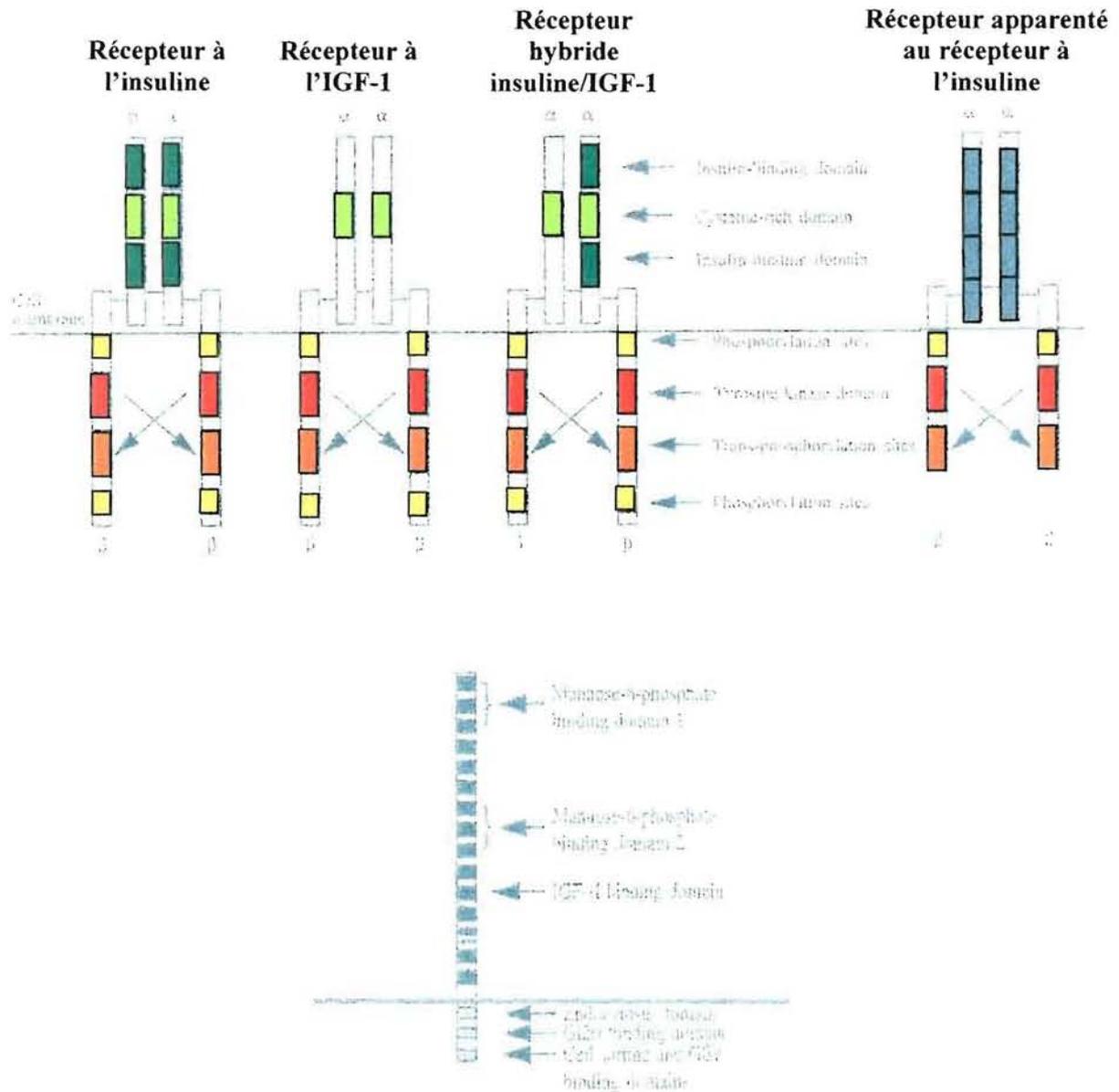


Figure I.15 : Biosynthèse du récepteur à l'insuline et à l'IGF-1 de Vertébrés (du gène à la protéine mature et fonctionnelle).

Les gènes du récepteur à l'insuline et du récepteur à l'IGF-1 sont constitués de 22 et 21 exons, respectivement, répartis sur plus de 100 kb d'ADN chromosomique. Les 11 (ou 10) premiers exons codent pour la région 5' non traduite (5'NTR) et la sous-unité α , et les suivants codent donc pour la sous-unité β et la région 3'NTR. Ces gènes sont rétrotranscrits en ARNm : plusieurs ARNm de taille variable pour le récepteur à l'insuline et un ARNm majoritaire pour le récepteur à l'IGF-1. Les messagers sont ensuite traduits en préprorécepteurs (chaîne unique) puis maturés en un hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ à l'issue du processus de N-glycosylation, de la formation de ponts disulfures, et du clivage protéolytique des deux sous-unités (formation d'un hétérodimère $\alpha\beta$ qui va se dimériser pour donner l'hétérotétramère).

Le domaine riche en cystéine (en vert), le site de clivage protéolytique (en bleu), le domaine transmembranaire (en fuschia) et le domaine tyrosine kinase (en rouge) sont représentés. Les ponts disulfures sont représentés par des barres rouges.



Récepteur à l'IGF-2

Figure 1.16 : Structures des récepteurs à l'insuline, à l'IGF-1, d'un récepteur hybride à l'insuline/IGF-1, d'un récepteur apparenté au récepteur à l'insuline, et du récepteur à l'IGF-2. (Adaptation de Reinecke et Collet, 1998).

stades de développement post-natal, ce qui suggère que le récepteur à l'IGF-1 est impliqué à la fois dans la différenciation et la croissance des organes. Pour des stades plus tardifs, le processus de différenciation étant achevé, le récepteur à l'IGF-1 retrouve un niveau de base assurant la croissance longitudinale.

Le récepteur à l'IGF-1 présente une structure primaire et tertiaire similaire à celle du récepteur à l'insuline avec toutefois, pour seule différence, une spécificité accrue pour l'IGF-1 assurée par le domaine riche en cystéines.

4.1.3. Le récepteur à l'IGF de type 2.

Le récepteur à l'IGF de type 2/mannose-6-phosphate cation-indépendant (RIGF-2/M-6-P) est issu de l'expression d'un gène unique (6q25-q27) (Laureys *et al.*, 1988). Ce récepteur à l'IGF-2, monomérique (300 kDa), est tout à fait distinct d'un point de vue structural et fonctionnel (ne présente pas d'activité tyrosine kinase) des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 (**Figure I.16**). Il est essentiellement constitué d'une partie extracellulaire (représentant 92% de la molécule) qui comporte 15 séquences répétées de 134 à 167 acides aminés, contenant chacune 8 résidus cystéines, et 16 sites potentiels de N-glycosylation, d'un domaine transmembranaire, et d'une courte région cytoplasmique. Le récepteur à l'IGF-2 est une protéine multifonctionnelle qui peut lier simultanément deux protéines à résidus mannose-6-phosphate au niveau des séquences répétées 1-3 et 7-9 et une molécule d'IGF-2 au niveau de la séquence répétée 11 (Grimme *et al.*, 2000). La liaison des résidus mannose-6-phosphate induit une plus grande affinité du récepteur à l'IGF-2 pour l'IGF-2 (Humbel, 1990). Le récepteur à l'IGF-2 pourrait ainsi prendre en charge l'IGF-2 à la surface cellulaire afin de l'ôter de la circulation (internalisation et dégradation dans le compartiment lysosomal), notamment en fin de croissance somatique fœtale, ainsi que des enzymes lysosomales à résidus mannose-6-phosphate (hydrolases acides) afin de les transporter de leur site de synthèse jusqu'au compartiment endosome/prélysosome (Stewart et Rotwein, 1996). Par ailleurs, il semblerait que le domaine extracellulaire du récepteur à l'IGF-2 puisse être clivé protéolytiquement lors du développement et ainsi être libéré sous forme soluble dans le milieu. Bien qu'aucune fonction de cette forme soluble du récepteur à l'IGF-2 n'ait encore pu être clairement établie, on pense qu'elle pourrait avoir un rôle de "carrier" de l'IGF-2 (Jones et Clemmons, 1995, pour revue).

Le gène du récepteur à l'IGF-2 présente 99,8% d'identité avec le gène du récepteur humain mannose-6-phosphate cation-dépendant localisé sur le chromosome 12. Il résulte

probablement de la duplication d'un gène ancestral du récepteur mannose-6-phosphate, à l'origine d'un récepteur mannose-6-phosphate cation-dépendant (46 kDa) et du récepteur mannose-6-phosphate cation-indépendant (300 kDa). Les deux récepteurs à mannose-6-phosphate sont présents chez les Mammifères, les oiseaux, les reptiles et les amphibiens. Récemment, ces deux récepteurs ont également été identifiés chez un poisson téléostéen, la truite (Nadimpalli *et al.*, 1999), et un récepteur cation-indépendant a été mis en évidence chez un Invertébré, le Mollusque bivalve *Unio pictorum* (Lakshmi *et al.*, 1999). Toutefois, il semble que le récepteur à mannose-6-phosphate cation-indépendant (RIGF-2) n'ait acquis la capacité de lier l'IGF-2 que très récemment chez les Mammifères.

4.1.4. Le récepteur apparenté au récepteur à l'insuline humain, les récepteurs hybrides et atypiques.

Le récepteur apparenté au récepteur à l'insuline (IRR) présente le même pourcentage de similarité respectivement avec le récepteur à l'insuline et avec le récepteur à l'IGF-1 que ces deux récepteurs comparés entre eux (Shier et Watt, 1989) (**Figure I.16**). Le récepteur apparenté au récepteur à l'insuline est particulièrement bien conservé au niveau du domaine tyrosine kinase mais aussi dans la région de liaison des ligands, même si à ce jour aucun ligand n'a encore été identifié. Toutefois, les sous-unités α et β de ce récepteur orphelin apparaissent légèrement plus petites (respectivement 108 et 60 kDa contre 135 et 95 kDa) avec une extrémité C-terminale également plus courte (57 acides aminés seulement).

Le récepteur hybride insuline/IGF-1 résulte de l'association d'un dimère α - β de récepteur à l'insuline et d'un dimère α - β de récepteur à l'IGF-1, lorsque les deux types de récepteurs sont présents en quantité significative (notamment au cours du développement fœtal) (LeRoith *et al.*, 1995b ; Jones et Clemmons, 1995, pour revues). Ce récepteur hybride lie l'insuline et l'IGF-1 avec des affinités comparables à celles du récepteur à l'IGF-1 classique, c'est-à-dire avec une plus grande affinité pour l'IGF-1 que pour l'insuline. En fait, la formation de récepteur hybride est supposée être pour la cellule une façon de diminuer sa sensibilité à l'insuline en retenant une partie des dimères de récepteurs à l'insuline sous la forme des récepteurs hybrides présentant moins d'affinité pour l'insuline que le récepteur à l'insuline classique. Ce récepteur serait une façon d'accroître la diversité de récepteurs afin de réguler le profil d'action de chaque ligand (Siddle, 1992, pour revue).

Une autre forme d'hétérogénéité des récepteurs se traduit par la présence de propriétés de liaison atypiques des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 en présence de concentrations de ligands anormales (pathophysiologiques) (Siddle, 1992, pour revue).

4.2. Le récepteur de l'amphioxus (Prochordé).

Chez l'amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*, un gène unique codant pour un récepteur de type insuline a été identifié par Pashmforoush et ses collaborateurs (1996). Ce gène code pour un transcrite de 7,5 kb traduit en une protéine précurseur de 1363 acides aminés qui comporte tous les éléments structuraux caractéristiques des molécules de la famille des Rins/RIGF-1. Le prorécepteur (190 kDa) est clivé par protéolyse en deux sous-unités α et β fortement glycosylées et de taille identique (110 kDa). Le récepteur à l'ILP est plus proche des récepteurs d'insuline (48,6%) et d'IGF-1 (47,3%) que du récepteur apparenté au récepteur à l'insuline humain hIRR (43,7%). Cette meilleure homologie de séquence est d'ailleurs retrouvée quel que soit le domaine structural du récepteur considéré ; elle semble indiquer que le récepteur à l'ILP pourrait être une forme ancestrale des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 qui se serait dupliquée au moment de la transition Prochordés/Vertébrés.

4.3. Les récepteurs de type insuline chez les Invertébrés.

4.3.1. *Chez les Arthropodes.*

♣ Chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, deux isoformes de récepteur de type insuline ont été caractérisées (Petruzzelli *et al.*, 1986 ; Nishida *et al.*, 1986 ; Fernandez-Almonacid et Rosen, 1987 ; Fernandez *et al.*, 1995 ; Marin-Hincapie et Garofalo, 1999). Il s'agit des isoformes $[\alpha_2(\beta_{90})_2]$ et $[\alpha_2(\beta_{170})_2]$. Ces deux isoformes sont codées par un gène unique relativement compact constitué de 10 exons et d'introns de petite taille (56 à 102 nucléotides). L'organisation du gène, relativement proche (conservation de nombreux liens exons/introns) de celle des gènes de Vertébrés, reste toutefois moins complexe. Le gène est transcrite de façon spécifique du tissu et du stade de développement sous la forme de deux messagers de tailles différentes (8,6 et 11 kb) mais qui ne diffèrent que par leurs régions non traduites : les deux isoformes du récepteur proviendraient seulement de modifications post-

traductionnelles du prorécepteur par protéolyse tissu-spécifique de l'extension C-terminale. L'isoforme [$\alpha_2(\beta 170)_2$] de 2148 acides aminés, du fait d'une extension C-terminale d'environ 400 acides aminés, présente 32,5% et 33,3% d'homologies avec les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 humains.

Les deux types de récepteurs s'expriment fortement au cours de l'embryogenèse (Petruzzelli *et al.*, 1986) dans les processus de prolifération cellulaire, tandis que seule l'isoforme contenant l'extension C-terminale semble impliquée dans la survie cellulaire.

✎ D'autres récepteurs de type insuline ont également été caractérisés chez le ver à soie *Bombyx mori* (Fullbright *et al.*, 1997 ; Lindstrom-Dinnetz et Iatrou, 1997, [AF025542]) et chez le moustique *Aedes aegypti* (Graf *et al.*, 1997). Les récepteurs de moustique MIR (Mosquito insulin receptor) et de ver à soie BIR (*Bombyx mori* insulin-like receptor), issus de la maturation de prorécepteurs de 200 et 300 kDa, respectivement, ne possèdent pas d'extension C-terminale, contrairement au récepteur de drosophile. Les deux récepteurs sont fortement exprimés dans les ovaires où ils semblent participer aux processus d'ovogenèse.

4.3.2. Chez les Mollusques.

✎ Chez la limnée *Lymnaea stagnalis*, le récepteur de type insuline MIPR (Molluscan Insulin-related Peptide Receptor), cloné par Roovers et ses collaborateurs (1995), résulte de l'expression d'un gène unique. Le précurseur de MIPR (1572 acides aminés), probablement très glycosylé (nombreux sites de N-glycosylation), est clivé en deux sous-unités, la sous-unité α de 125 kDa et la sous-unité β de 95 kDa qui comporte une importante extension C-terminale de 308 acides aminés. La protéine mature présente toutes les caractéristiques de la famille des Rins/RIGF et notamment un domaine tyrosine kinase particulièrement bien conservé avec 70% d'homologie avec le récepteur à l'IGF-1 humain et 62% avec le récepteur de type insuline de drosophile.

✎ Un récepteur de type insuline a également été caractérisé chez un autre Mollusque gastéropode : *Biomphalaria glabrata* (Lardans *et al.*, 2001). Ce récepteur résulte de la maturation d'une préproprotéine de 1672 acides aminés issue de la traduction d'un messenger unique de 5,6 kb. Il présente toutes les caractéristiques des récepteurs de la famille y compris une expression ubiquitaire.

4.3.3. Chez les Nématodes.

Le récepteur de type insuline du nématode *Caenorhabditis elegans*, DAF-2 (Kimura *et al.*, 1997), possède une similarité de séquence de 35% avec le récepteur à l'insuline humain, de 34% avec le récepteur à l'IGF-1 humain et de 33% avec le récepteur apparenté au récepteur à l'insuline humain. Comme les autres récepteurs de type insuline d'Invertébrés, le récepteur DAF-2 est codé par un seul gène, et, comme pour les récepteurs de drosophile et de Mollusques gastéropodes, possède une importante extension C-terminale de 318 acides aminés.

4.3.4. Chez les Cnidaires.

Chez l'hydre d'eau douce *Hydra vulgaris*, Steele et ses collaborateurs (1996) ont caractérisés un récepteur de type insuline (HTK7) codé par un seul gène et issu de la traduction d'un unique messager de 4,8 kb. Ce récepteur semble impliqué dans le contrôle des divisions cellulaires des cellules épithéliales du corps de l'hydre lorsqu'il est fortement exprimé, et dans la régulation de la différenciation des cellules épithéliales des extrémités de l'hydre (tentacules et pied) lorsqu'il est plus faiblement exprimé.

4.3.5. Chez les Spongiaires.

Des récepteurs de type insuline ont également été partiellement caractérisés chez des espèces appartenant aux trois classes de Spongiaires : les éponges calcaires (*Sycon raphanus*), les démosponges (*Suberites domuncula* et *Geodia cydonium*) et les hexactinellides (*Aphrocallistes vastus*) (Schäcke *et al.*, 1994 ; Skorokhod *et al.*, 1999). Les séquences de leur domaine tyrosine kinase apparaissent plus proches de celles des Insectes *Aedes aegypti* et *Drosophila melanogaster*, lorsqu'on les compare aux séquences d'Invertébrés disponibles. Mais ces séquences présentent également une homologie relativement élevée (60 à 65%) avec les domaines catalytiques des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 de Vertébrés et de type insuline de l'amphioxus. L'analyse phylogénétique des domaines catalytiques des récepteurs de type insuline de Spongiaires (diploblastiques) révèle néanmoins que ceux-ci appartiennent à un groupe statistiquement divergent de celui des triploblastiques (Nématodes, Mollusques, Insectes et Vertébrés).

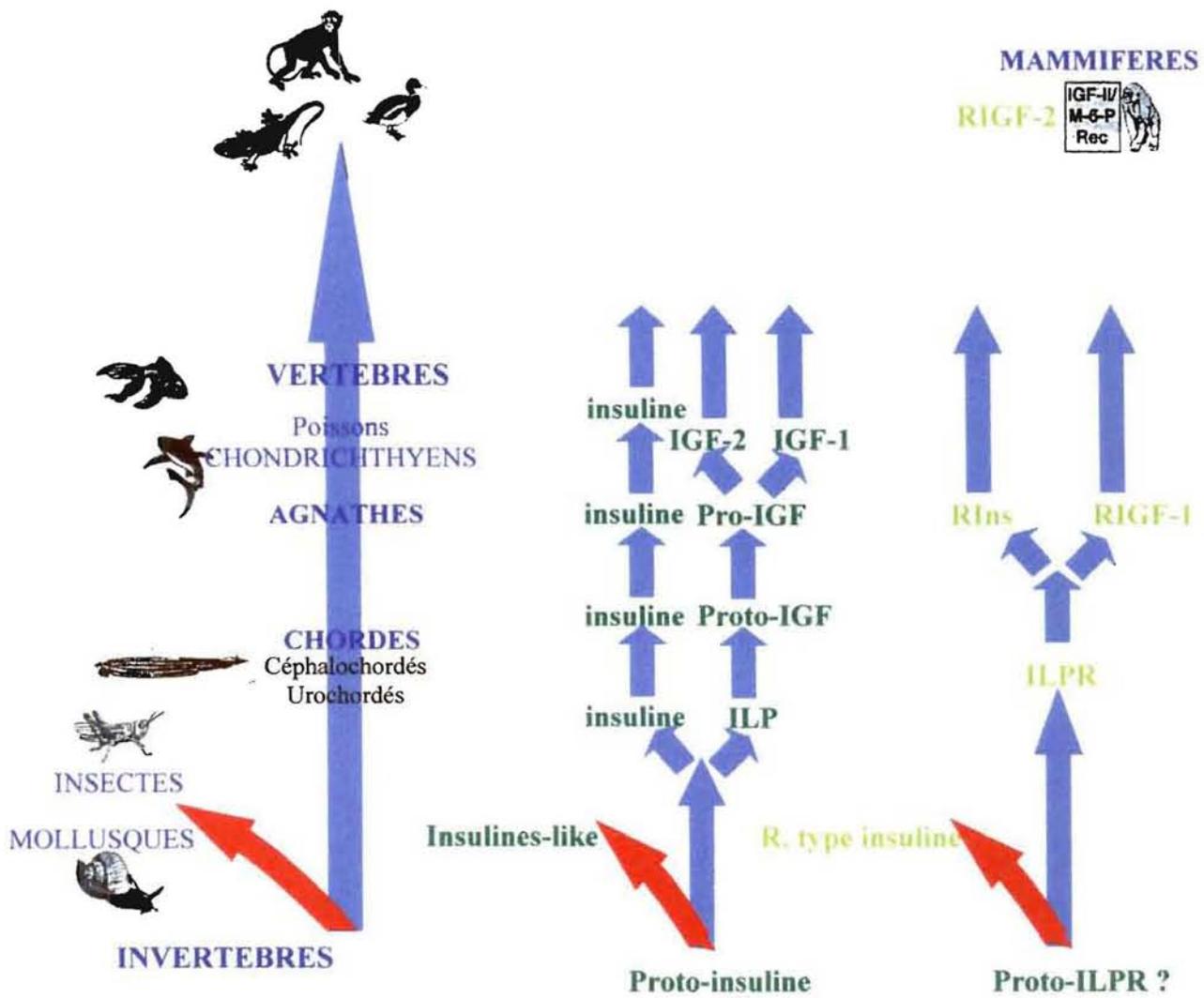


Figure I.17 : Modèle de l'évolution du système insuline/IGF (ligands et récepteurs).

(Modèle adapté de Chan *et al.*, 1990, 1993 ; Reinecke et Collet, 1998)

4.4. Evolution des récepteurs du système insuline/IGF.

Le récepteur à l'ILP de l'amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* (Pashmforoush *et al.*, 1996) serait le représentant de la forme ancestrale qui se serait dupliquée lors de la transition prochordés/Vertébrés pour donner le récepteur à l'insuline et le récepteur aux IGFs. Cette duplication de récepteurs a probablement permis une spécialisation de fonction des molécules d'insuline et de proto-IGF, accrue par l'apparition de l'IGF-1 et de l'IGF-2 à l'émergence des poissons chondrichthyens (Duguay *et al.*, 1995) et surtout du récepteur à l'IGF-2 chez les Mammifères (**Figure I.17**).

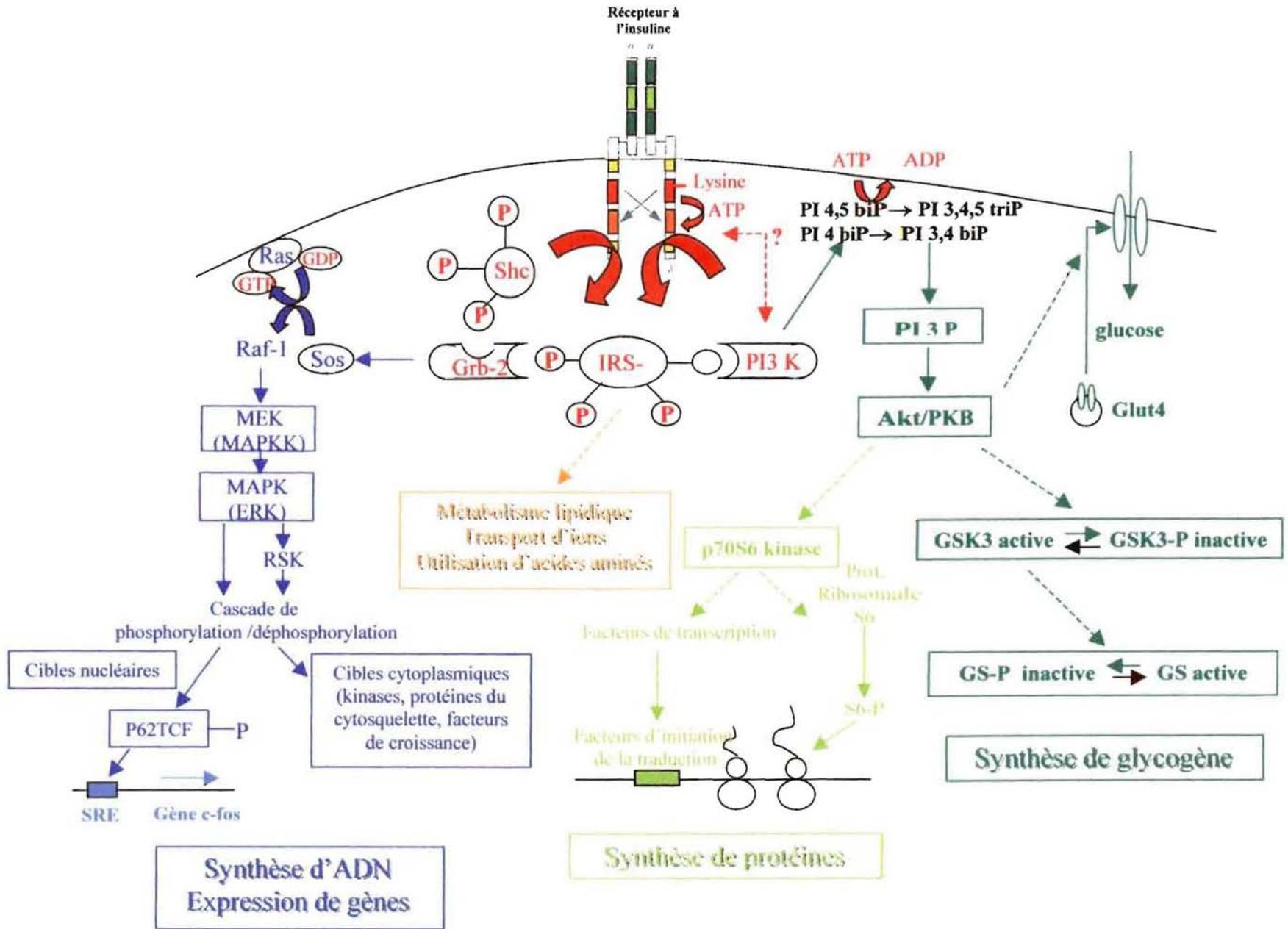
Chez les Invertébrés, ce gène ancestral aurait subi de nombreuses mutations conduisant à une importante diversité de récepteurs de type insuline, mais toujours uniques au sein de chaque espèce. Ce récepteur aurait une capacité de liaison de ligands multiples et d'activation de nombreuses voies de signalisation.

5. Les voies de signalisation du système insuline/IGF.

L'insuline et l'IGF-1 induisent une grande diversité de réponses qui peuvent être réparties en deux catégories : les effets métaboliques (transport du glucose et synthèse de glycogène, lipogénèse et lipolyse, et synthèse de protéines) et les effets de type croissance (prolifération et différenciation cellulaire) (Fantl *et al.*, 1993). La transduction du signal de ces ligands, médié par des récepteurs à tyrosine kinase, emprunte de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Mais ces voies restent relativement difficiles à dissocier car elles font appel à des effecteurs de signalisation cytoplasmiques communs (**Figure I.18**).

Les récepteurs à tyrosine kinase ont un mode de fonctionnement semblable à celui des enzymes allostériques (Ullrich et Schlessinger, 1990) : la fixation du ligand au récepteur provoque un changement conformationnel (la levée de l'inhibition de la sous-unité β par la sous-unité α) qui conduit à l'autophosphorylation de la sous-unité β par un mécanisme "cis" (intramoléculaire) ou "trans" (intermoléculaire) des résidus tyrosine du domaine catalytique et de l'extrémité C-terminale portés par la sous-unité β . Dans certains cas, c'est la fixation du

Figure 1.18 : Représentation des principales voies de transduction du signal des molécules de type insuline/IGF.



ligand au niveau de la sous-unité α d'un dimère qui induit l'association de deux dimères, donc la formation d'un complexe hétérotétramérique stabilisé par un pont disulfure.

Les résidus phosphotyrosine, selon leur environnement en acides aminés, constituent des sites de liaison spécifiques capables de recruter et d'activer deux sortes de protéines de signalisation cytoplasmiques : soit des protéines de signalisation à domaines SH2 ou PTB (activation directe), soit des molécules d'ancrage (IRS, Shc, Gab-1) comportant de nombreux sites de reconnaissance pour des protéines à domaines SH2 ou PTB (activation indirecte), ce qui conduit à la diversification du signal initial et permet de mettre en place en parallèle plusieurs voies de signalisation indépendantes (cascades de protéines kinases à sérine/thréonine voire à tyrosine). L'activation de ces protéines peut en fait résulter de divers mécanismes : la phosphorylation de résidus tyrosine, des modifications conformationnelles, ou la translocation de protéines cytoplasmiques vers la membrane plasmique.

Parmi les multiples voies de transduction du signal, deux semblent prépondérantes : la voie phosphoinositol-3-kinase (PI-3-kinase) et la voie MAP kinase ("Mitogen-activated-protein kinase").

La voie PI-3-kinase via la molécule Akt/PKB est impliquée dans la régulation des métabolismes des glucides, des lipides et des protéines. En fait, la PI-3-kinase est composée de deux sous-unités : la sous-unité régulatrice p85 qui peut s'associer à la protéine d'ancrage IRS et entraîner ainsi l'activation de la PI-3-kinase, et la sous-unité catalytique p110 qui possède deux activités enzymatiques, une activité de phosphorylation de lipides qui aboutit à l'activation de la Akt/PKB et une activité kinase sur les résidus sérine capable de phosphoryler la sous-unité p85 et la protéine d'ancrage (IRS). En outre, la PI-3-kinase est capable d'interagir directement avec le récepteur activé au niveau de résidus tyrosine de l'extrémité C-terminale, ce qui représente un mode d'activation alternatif. L'Akt/PKB activée peut alors agir sur la synthèse de glycogène, soit indirectement en activant l'entrée de glucose par les transporteurs de type GLUT4, soit directement en activant, à l'issue d'une cascade de phosphorylation/déphosphorylation, la glycogène synthétase. L'Akt/PKB est également impliquée dans l'activation des synthèses de protéines via la p70S6 kinase qui initie la traduction et l'élongation des protéines au niveau des ribosomes.

La voie MAP kinase régule l'activité de nombreuses protéines cellulaires, telles que les facteurs de croissance, les facteurs de transcription ou des protéines du cytosquelette, conduisant ainsi à l'expression de différents gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire. Dans cette voie, le récepteur activé s'associe à des protéines

d'ancrage (IRS ou Shc) ce qui crée des sites de reconnaissance pour la protéine Grb2, une autre protéine adaptatrice constitutivement liée à la molécule Sos, facteur d'échange qui favorise le passage de la forme inactive Ras-GDP à la forme active Ras-GTP. La Ras-GTP active ensuite par une cascade de phosphorylation/déphosphorylation les protéines kinases Raf-1 (résidus sérine), MEK ou MAPKK (résidus sérine et thréonine) et MAPK ou ERK (résidus thréonine et tyrosine). Les cibles finales de ces protéines phosphorylées se situent au niveau du noyau, du cytoplasme et de la surface cellulaire. Dans le noyau, elles agissent sur la synthèse d'ADN ou sur l'expression de gènes, via l'activation de kinases nucléaires et la phosphorylation de facteurs de transcription. Les cibles cytoplasmiques et de la surface cellulaire sont des récepteurs de facteurs de croissance, des kinases impliquées dans d'autres voies de signalisation, des protéines du cytosquelette ou bien encore des phospholipases (Guan, 1994).

Par ailleurs, l'association du récepteur activé à l'IRS-1 (protéine d'ancrage) est également impliquée dans une troisième voie métabolique, encore mal connue, aboutissant à l'activation du métabolisme lipidique, de l'utilisation des acides aminés et du transport des ions à travers la membrane.

La sélectivité de la transmission du signal en fonction du ligand, assurée par la fixation de l'insuline ou de l'IGF-1 sur son récepteur spécifique, semble donc relative. La spécificité de réponse cellulaire pour un ligand donné résulterait plutôt de la conjonction de plusieurs éléments dont le profil d'expression des différents types de récepteurs à la surface des cellules cibles, la concentration physiologique des ligands, l'affinité relative du récepteur pour les différents ligands, ou bien encore la nature des molécules impliquées dans la transduction du signal et en particulier des molécules situées en fin de cascade de signalisation (les facteurs de transcription).

Chapitre II :

**Approche cellulaire du système insuline/IGF
chez l'huître creuse :
effets biologiques *in vitro* et
déplacement d'une liaison**

I. INTRODUCTION

Les molécules de la famille des insulines/IGFs sont présentes chez de nombreuses espèces d'Invertébrés. Diverses méthodes d'identification (techniques immunologiques, tests biologiques *in vitro*, purifications et caractérisations moléculaires) ont permis de détecter ces molécules chez des insectes (Le Roith *et al.*, 1981 ; Nagasawa *et al.*, 1984, 1986; Iwami *et al.*, 1989), des crustacés (Sanders, 1983a, b), des annélides (Le Roith *et al.*, 1981 ; Sauber *et al.*, 1990 ; Hrženjak *et al.*, 1993), un nématode (Duret *et al.*, 1998 ; Grégoire *et al.*, 1998 ; Kawano *et al.*, 2000), des mollusques (Plisetskaya *et al.*, 1978 ; Thorpe et Duve, 1984 ; Khan *et al.*, 1992 ; Gomot *et al.*, 1992), un échinoderme (de Pablo *et al.*, 1988 ; Kuno *et al.*, 1994 a, b ; Sakuma *et al.*, 1997), une éponge (Robitzki *et al.*, 1989), et des ascidies (O'Neil *et al.*, 1986 ; Galloway et Cutfield, 1988). Des molécules de cette famille ont même été détectées chez une levure (Fawell et Lenard, 1988 ; Muthukumar et Lenard, 1991), ainsi que chez des plantes supérieures et des algues (Collier *et al.*, 1987 ; Garcia Flores *et al.*, 2000 ; Oliveira *et al.*, 1999).

Chez les Mollusques, l'existence de molécules apparentées aux insulines/IGFs a été mise en évidence par des techniques immunologiques au niveau de l'épithélium digestif de nombreuses espèces telles que *Buccinum undatum* (Davidson *et al.*, 1971), *Strophocheilus oblongus* (Falkmer *et al.*, 1975 ; Marques et Falkmer, 1976), *Mytilus edulis* (Fritsch *et al.*, 1976), *Unio pictorum* et *Anodonta cygnaea* (Plisetskaya *et al.*, 1978), *Achatina fulica* (van Noorden *et al.*, 1980), *Helix aspersa* (Marchand et Colard, 1991), *Planorbarius corneus* (Franchini et Ottaviani, 1992) et récemment *Helisoma duryi* et *Otala lactea* (Abdraba *et al.*, 1999, 2000 a). Ces molécules ont également été localisées dans des cellules neurosécrétrices de ganglions du système nerveux central de nombreux gastéropodes, *Lymnaea stagnalis* (Schot *et al.*, 1981), *Aplysia californica* (van Minnen et Schallig, 1990), *Helisoma duryi* (Khan *et al.*, 1992 ; Saleuddin *et al.*, 1992 ; Sevala *et al.*, 1993a, b), *Helix aspersa* (Gomot *et al.*, 1992), *Planorbarius corneus* (Sonetti *et al.*, 1992) et *Otala lactea* (Abdraba *et al.*, 2000 b), ainsi que d'un bivalve, *Mytilus edulis* (Kellner-Cousin *et al.*, 1994). Ces substances de type insuline/IGF peuvent également être libérées dans l'hémolymphe, puisqu'elles ont été détectées par dosage radioimmunologique contre l'insuline humaine dans l'hémolymphe de *Helisoma duryi* (Sevala *et al.*, 1993) et *Otala lactea* (Abdraba *et al.*, 1999), et contre

l'insuline de saumon dans l'hémolymphe de limace *Prophysaon foliatum* (Plisetskaya et Deyrup-Olsen, 1987).

Ces molécules participeraient à la régulation de nombreux processus métaboliques tels que le métabolisme glucidique, la croissance, le développement et la reproduction.

Ainsi, divers travaux rapportent un effet hypoglycémiant d'insulines de Vertébrés chez de nombreuses espèces de mollusques. L'insuline mammalienne provoque la diminution de la teneur en glucose circulant et augmente le contenu en glycogène dans la glande digestive et le muscle du gastéropode *Strophocheilus oblongus* (Marques et Falkmer, 1976) et dans le manteau du bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Madar *et al.*, 1979), ainsi que dans le muscle adducteur des bivalves d'eau douce *Anodonta cygnaea* et *Unio pictorum* (Plisetskaya *et al.*, 1978) et des bivalves marins *Mytilus galloprovincialis* et *Chlamys glaber ponticus* (Plisetskaya *et al.*, 1979). L'insuline de saumon ainsi qu'une substance semi-purifiée chez *Unio pictorum* et apparentée à l'insuline, provoquent des réponses physiologiques identiques à celles de l'insuline mammalienne chez *Anodonta cygnaea* et *Unio pictorum* (Plisetskaya *et al.*, 1978) et chez *Anodonta cygnaea* et *Mytilus galloprovincialis* (Plisetskaya *et al.*, 1978 ; Rusakov *et al.*, 1979).

Des effets de type insuline/IGF sur la croissance et le développement ont également été obtenus sur des juvéniles d'escargot *Helix aspersa* (Gomot et Gomot, 1995), sur la croissance et la régénération de la queue de la limace *Prophysaon foliatum* (Plisetskaya et Deyrup-Olsen, 1987), et sur la croissance des neurites chez *Lymnaea stagnalis* (Kits *et al.*, 1990). Les insulines/IGFs semblent exercer cette fonction en stimulant les synthèses de protéines, ce qui a été démontré sur les cellules du manteau chez *Helisoma duryi* (Saleuddin *et al.*, 1992), *Mytilus edulis* (Kellner-Cousin *et al.*, 1994) et *Pecten maximus* (Giard *et al.*, 1998), ainsi que sur les cellules de la glande digestive chez *Pecten maximus* (Giard *et al.*, 1998).

Enfin, d'autres travaux ont également montré l'implication de ces molécules dans le contrôle des activités liées à la reproduction. Chez *Helix aspersa* (Wijdenes *et al.*, 1987 ; van Minnen et Schallig, 1990), *Planorbarius corneus* (van Minnen et Schallig, 1990 ; Sonetti *et al.*, 1992) et *Lymnaea stagnalis* (Geraerts, 1976b ; Geraerts, 1992 ; van Minnen et Schallig, 1990), les molécules de type MIP ("Molluscan Insulin-related Peptide") sécrétées par des cellules neuroendocrines du système nerveux central (Light Green Cells ou Mediodorsal Cells) agiraient au niveau des cellules des corps dorsaux, inhibant ainsi la libération d'une hormone impliquée dans le contrôle de la reproduction, comme suggéré chez *Helix aspersa* et *Limax maximus* (van Minnen et Schallig, 1990). Gomot (1993) émet ainsi l'hypothèse qu'une

partie du système nerveux central du mâle de *Helix aspersa* est impliquée dans le contrôle de la spermatogenèse en stimulant la synthèse d'ADN associée aux divisions des cellules germinales, et qu'une autre partie, dont les cellules sont connectées aux corps dorsaux, inhibe plutôt cette synthèse d'ADN. Par ailleurs, Geraerts et collaborateurs (1992) indiquent que les MIPs de la limnée exerceraient une fonction différente dans les processus de contrôle des divers métabolismes du fait d'une expression différentielle stimulus-dépendante des gènes de MIPs au niveau du système nerveux central. C'est ainsi que la mise en place de la gamétogenèse chez *Lymnaea stagnalis* induit un ralentissement de la croissance du fait d'une réorientation des métabolites vers la production d'ovocytes (Geraerts *et al.*, 1976 a et b). De même, un régime riche en glucides conduit à un arrêt de la croissance, à une stimulation de la mise en réserve des glucides et active la reproduction (Geraerts *et al.*, 1992) ; ces phénomènes s'accompagnent d'une diminution de la quantité de transcrits de MIP II et de MIP III suggérant leur implication dans le contrôle de la croissance mais aussi de la reproduction.

Chez les Mollusques, une seule famille de molécules endogènes apparentées aux insulines/IGFs a pu être séquencée chez le gastéropode *Lymnaea stagnalis* (Smit *et al.*, 1988 ; Smit *et al.*, 1998, pour revue) : la famille des MIPs. Cette famille comporte sept membres, mais leur fonction précise reste pour le moment indéterminée. Le seul effet biologique clairement démontré est l'effet sur la croissance des neurites en culture (Kits *et al.*, 1990), mais il est probable que ces molécules interviennent également dans différentes régulations dont la croissance, la reproduction et le métabolisme énergétique (Geraerts *et al.*, 1992).

En tout état de cause, ces différents effets biologiques n'ont jamais été suivis simultanément sur les mêmes animaux ni corrélés à leur cycle biologique (suivi de gamétogenèse, de croissance et du métabolisme énergétique). C'est cet aspect qui est pris en compte chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le cadre de cette étude. Chez cette espèce, la présence de molécules apparentées aux insulines/IGFs n'a encore jamais été clairement mise en évidence ; toutefois l'étude de la gestion des réserves énergétiques au cours du cycle de reproduction de *C. gigas* suggère fortement l'existence d'une régulation endocrine du métabolisme glucidique (Berthelin *et al.*, 2000 a,b) et des expériences récentes menées au laboratoire ont montré que l'insuline pourrait être impliquée dans cette régulation en augmentant l'entrée de glucose dans les cellules de réserve. En complément de cet effet biologique, en cours d'étude au laboratoire, les possibles effets de molécules de type insuline/IGF sur la croissance et la reproduction de *C. gigas* ont été suivis.

Ainsi, ce chapitre traite de la mise en évidence d'un effet physiologique de molécules apparentées aux insulines/IGFs au niveau des tissus impliqués dans la reproduction et la croissance (respectivement le tissu gonadique et le bord du manteau). Un suivi de l'effet biologique *in vitro* de l'IGF-1 recombinant humain (IGF-1 rh) sur les activités de prolifération cellulaire et de synthèse de protéines des cellules des tissus cibles a alors été effectué au cours du cycle biologique de *C. gigas*, parallèlement au suivi de la croissance et de la reproduction. Des récepteurs aux molécules endogènes ont ensuite été recherchés par déplacement de la liaison de l'IGF-1 rh à partir de membranes plasmiques de tissu gonadique, de bord du manteau et de palpes labiaux (cellules de réserves), afin de confirmer l'existence d'un signal de type insuline/IGF au niveau de ces tissus cibles.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel biologique.

L'ensemble des expériences est mené à partir d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* âgées de 3 ans (taille commerciale). Ces animaux proviennent des parcs ostréicoles de l'établissement "La Tatihou" situé à Saint-Vaast-la-Hougue (Normandie, Manche). A la réception, les huîtres sont maintenues en chambre froide puis traitées dans les 48 heures.

II.2. Histologie.

2.1. *Echantillonnage.*

Pour l'étude histologique, un échantillonnage d'un effectif de 10 huîtres a été réalisé aux périodes correspondant aux tests biologiques *in vitro*.

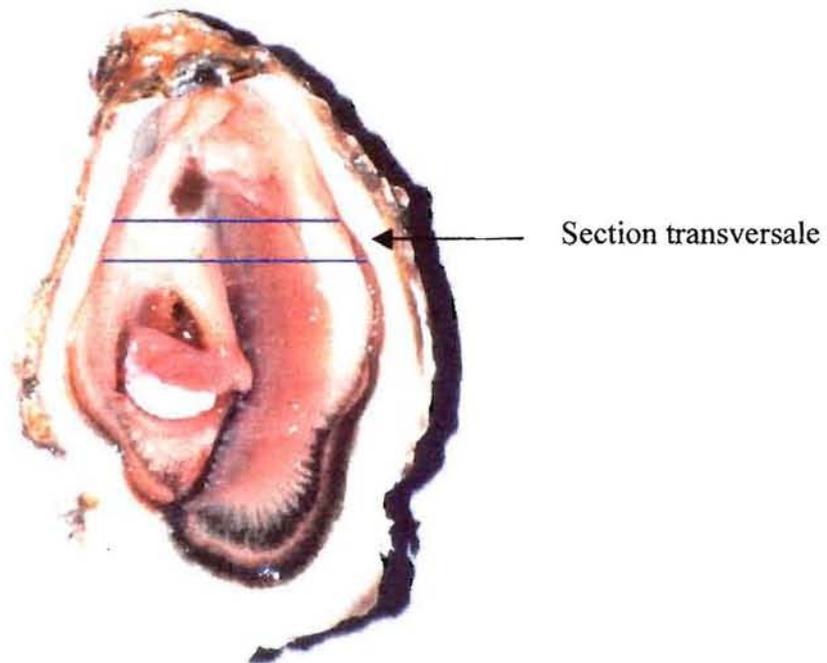
2.2. *Fixation des tissus et montage des lames.*

Pour chaque animal, une section transversale de 5 mm d'épaisseur est réalisée à partir de l'animal entier au niveau de la jonction palpes labiaux-branchies (**Figure II.1**). Les pièces sont fixées dans du liquide de Bouin (75% acide picrique à saturation, 20% formol, 5% acide acétique) pendant 48 heures, puis déshydratées dans des bains successifs d'éthanol (70%, 95% et 100%) avant d'être transférées dans du butanol pour au minimum une semaine. Les pièces sont alors incluses dans de la paraffine, et des coupes de 7 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome, puis déposées sur des lames et déplissées sur une platine chauffante. Les lames histologiques sont ensuite colorées selon la technique du trichrome Prenant-Gabe (Gabe, 1968), montées dans une résine de type Depex, et séchées pendant 48 heures à 37°C avant observation.

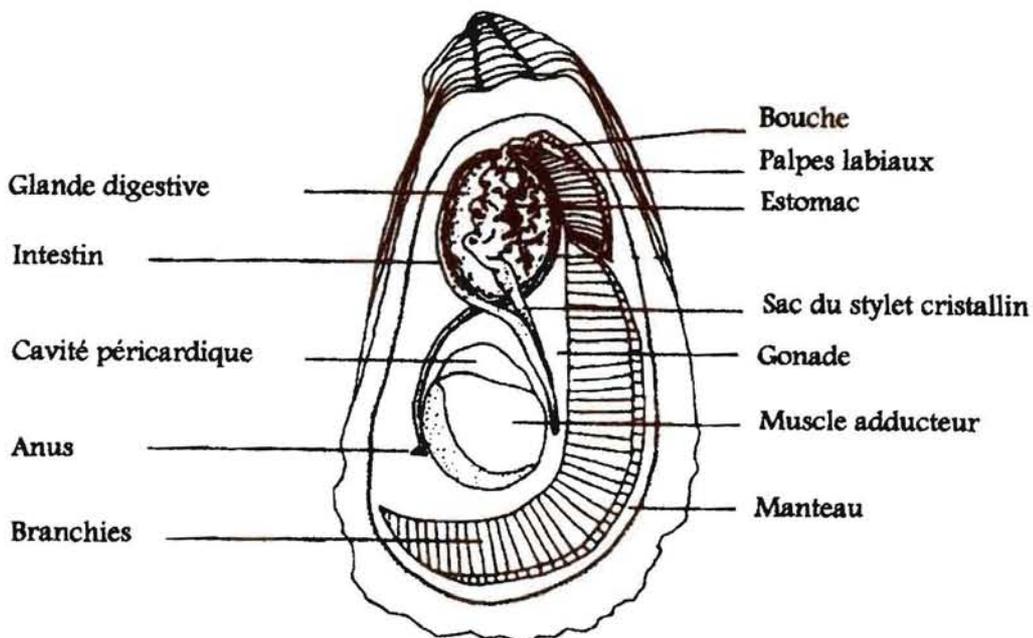
II.3. Préparation des suspensions cellulaires.

3.1. *Conditions de stérilité.*

La dissociation des cellules est effectuée en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire, et avec du matériel et des réactifs stérilisés par autoclavage ou par filtration sur filtre Millipore 0,2 µm.



a



b

Figure II.1. : Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

a : Localisation de la coupe transversale réalisée pour l'histologie.

b : Anatomie de l'huître.

3.2. Milieu de dissociation et de maintien des cellules.

Le milieu de dissociation et d'incubation des cellules est le milieu M-199 de Hanks (Sigma®), utilisé à une concentration de 1 M et supplémenté par 350 mM NaCl et 49 mM KCl afin d'en adapter l'osmolarité aux exigences des cellules de mollusques marins (1100 mOsm) (Cousserans, 1975). Le pH du milieu est ajusté à 7,4 (Lenoir, 1989) de façon à se situer dans la gamme de pH de l'hémolymphe de bivalves qui varie selon les espèces entre 7,2 et 7,8 (Bayne *et al.*, 1976). Le milieu ainsi modifié est filtré et conservé à 4°C. Avant utilisation, le milieu est additionné d'antibiotiques : 170 µM pénicilline G et 680 µM streptomycine (milieu D).

3.3. Prélèvement et dissociation des tissus.

Dès leur ouverture, les huîtres sont rincées à l'eau de mer autoclavée puis placées sur un lit de glace. Les bords du manteau sont disséqués et rincés à trois reprises à l'eau de mer. Le tissu gonadique qui recouvre la glande digestive est également prélevé. Les tissus subissent alors une dissociation mécanique aux ciseaux (**Figure II.2**).

Pour les bords du manteau, plus résistants, une dissociation supplémentaire par une enzyme lytique est réalisée en additionnant 0,1% (p/v) de pronase au milieu de dissociation D. La dissociation s'effectue à 15°C sous une agitation lente pendant 2 fois 30 minutes, avec renouvellement de la solution de dissociation. Après une filtration sur toile à bluter (diamètre des mailles : 100 µm), les cellules isolées sont recueillies et mises au culot par une centrifugation de 30 minutes à 80g (15°C).

Pour les cellules du tissu gonadique, dans la période d'octobre à mars (restructuration et développement maximal du tissu de réserve), une centrifugation supplémentaire à 600g pendant 30 minutes (15°C) est réalisée afin d'éliminer les cellules de réserve présentes dans la suspension.

Les culots de cellules dissociées sont finalement rincés dans 30 à 40 ml de milieu D et repris dans 1 ml de milieu D.

3.4. Dénombrement et estimation de la viabilité cellulaire.

La densité de la suspension de cellules dissociées est déterminée à l'aide d'un hémocytomètre de Thoma. Le volume final de chaque suspension cellulaire est alors ajusté de façon à obtenir la concentration cellulaire requise pour le test biologique *in vitro*, à savoir

10^7 cellules.ml⁻¹ pour les cellules de bord de manteau et 2.10^7 cellules.ml⁻¹ pour les cellules du tissu gonadique.

La viabilité des cellules dissociées est estimée par le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide, Sigma[®]) décrit par Mosmann (1983) et adapté aux cellules d'organismes marins par Coulon (1993). Ce test est basé sur la réduction de sels de tétrazolium jaune (MTT) en cristaux de formazan bleu sous l'action des déshydrogénases mitochondriales. La différence d'absorbance, mesurée au spectrophotomètre entre 570 et 630 nm, est proportionnelle à l'activité mitochondriale et donc au nombre de cellules vivantes mises en contact avec le réactif. Lors de chaque test biologique *in vitro*, la viabilité est estimée pour les cellules fraîchement dissociées et les cellules qui ont été soumises à l'incubation, de façon à évaluer le taux de survie des cellules à l'issue du test biologique. Ainsi, les cellules dissociées sont incubées durant 20 à 24 heures (Heude-Berthelin, 2000) en présence de 10% (p/v) MTT concentré à 5 mg/ml dans du milieu D. Le milieu réactionnel est ensuite additionné d'un volume équivalent d'isopropanol contenant 0,04 N HCl, de façon à dissoudre les cristaux de formazan formés. Après 30 minutes d'agitation vigoureuse et clarification du milieu par centrifugation (3 000g, 5 minutes), l'absorbance de l'échantillon est mesurée contre un témoin à 570 nm avec soustraction du bruit de fond à 630 nm.

II.4. Tests biologiques *in vitro*.

Les deux types de suspensions cellulaires (bord du manteau et tissu gonadique) sont chacun soumis à deux tests biologiques *in vitro* : l'incorporation de [¹⁴C]-acides aminés et l'incorporation de [³H]-thymidine.

4.1. *Préparation de l'IGF-1 recombinant humain (IGF-1 rh).*

L'IGF-1 recombinant humain (Sigma[®]) est repris dans 0,1 N d'acide acétique pour une concentration finale de 6.10^5 M, puis aliquoté et stocké à -70°C . Avant utilisation, l'IGF-1 rh est dilué en série dans du milieu D afin d'obtenir une gamme de concentrations finales comprise entre 10^{-13} et 10^{-7} M.

4.2. *Mesure de l'incorporation de [¹⁴C]-acides aminés dans les protéines.*

L'incorporation d'acides aminés marqués au ¹⁴C permet d'évaluer le métabolisme protéique à une période donnée reflétant ainsi l'activité de synthèse des cellules. Le test

biologique *in vitro* est réalisé au cours d'une incubation de 20 heures à 15°C, en présence d'un cocktail d'acides aminés marqués au ^{14}C (activité spécifique : 3,7 MBq/ml, ICN) à une concentration finale de 0,4 $\mu\text{Ci/ml}$.

4.3. Mesure de l'incorporation de [^3H]-thymidine dans l'ADN.

L'incorporation de thymidine tritiée permet une estimation de la synthèse d'ADN à une période donnée traduisant ainsi l'activité de prolifération des cellules. Le test biologique *in vitro* est réalisé au cours d'une incubation de 28 heures à 15°C, en présence de [^3H]-thymidine (activité spécifique : 20-40 Ci/mmmole, ICN) à une concentration finale de 4 $\mu\text{Ci/ml}$.

4.4. Réalisation des tests biologiques *in vitro*.

Le test biologique *in vitro* consiste à incuber 400 μl de cellules dissociées avec 50 μl de précurseur radioactif, [^{14}C]-acides aminés ou [^3H]-thymidine, et en présence de 50 μl des différentes concentrations d'IGF-1. Au terme de l'incubation, les cellules sont précipitées dans 1 ml de TCA (acide trichloroacétique) 10% (p/v) pendant 1 nuit à 4°C, puis les molécules néosynthétisées sont récupérées par centrifugation (3 000g, 10 minutes, 4°C). La radioactivité non incorporée est éliminée par un triple rinçage des culots avec 3 ml de TCA 10%. Les culots sont ensuite dissous dans 500 μl de 0,3 N KOH pendant 1 heure à 40°C. La mesure de la radioactivité s'effectue à partir de 250 μl de suspension dans, au minimum, 10 volumes de liquide de scintillation (Optiphase, Wallac[®]), et à l'aide d'un compteur bêta à scintillation (TriCarb, Packard[®]).

4.5. Validation des résultats : réplicats, témoins et analyse statistique.

Chacune des conditions du test biologique fait l'objet de 6 réplicats.

Une série de tubes témoins est réalisée par blocage du milieu d'incubation dès l'ajout des précurseurs radioactifs, afin de quantifier et de soustraire la part de radioactivité non issue de l'activité métabolique des cellules.

L'analyse statistique des suivis annuels (incorporation de base des cellules du bord du manteau et effet d'une concentration d'IGF-1 rh sur les synthèses d'ADN et de protéines des cellules de gonade et du bord du manteau) est effectuée à partir d'une ANOVA sur des données transformées en logarithme népérien et après avoir vérifié les conditions d'application de l'analyse de variance : normalité de la distribution (test de Kolmogorov-Smirnov) et équivariance (test de Levene) (Scherrer, 1984). Les tests sont réalisés à l'aide du logiciel STATISTICA (1997). L'analyse statistique de l'effet dose de l'IGF-1 rh sur les

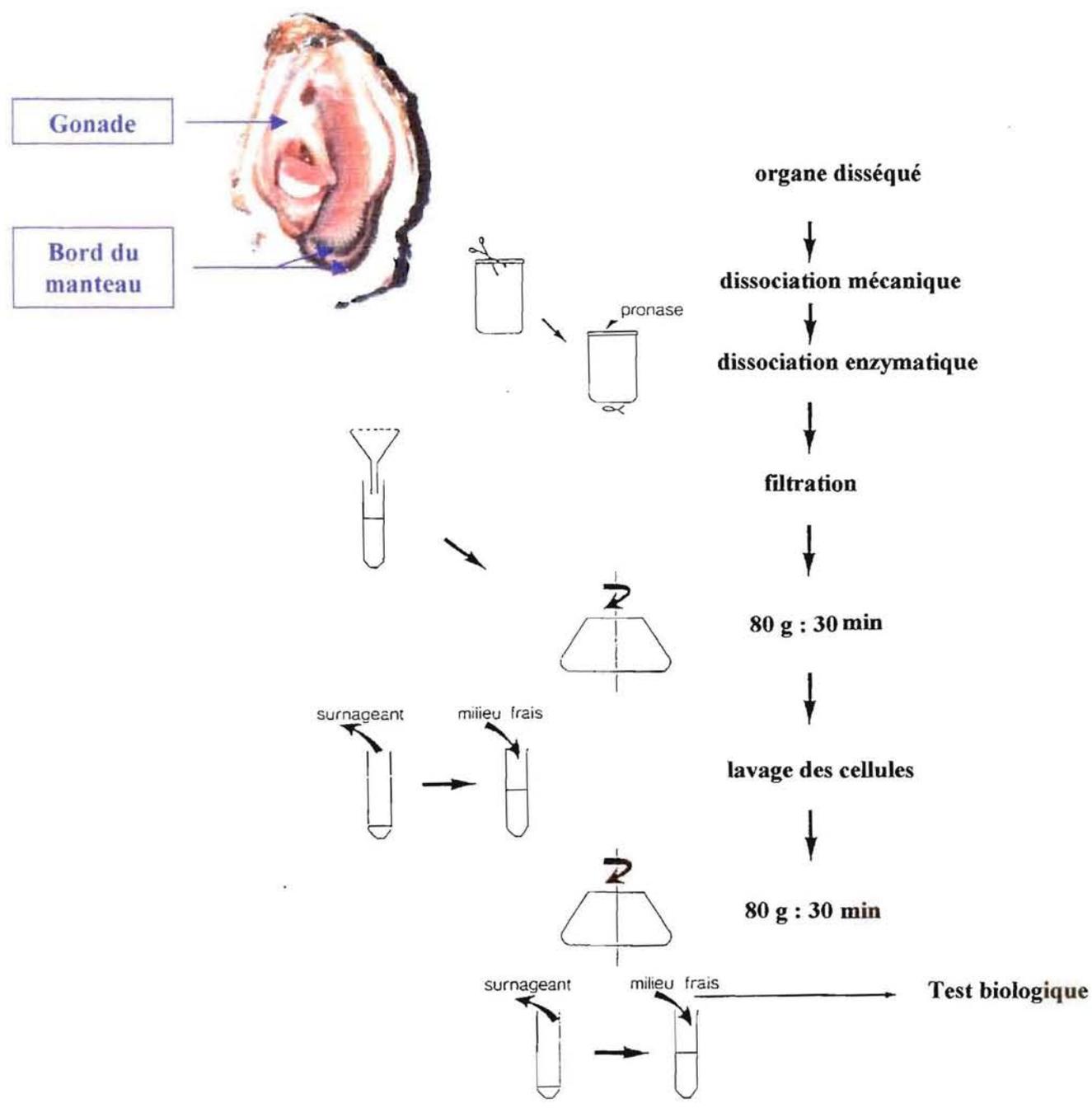


Figure II.2 : Principe des tests biologiques *in vitro*.

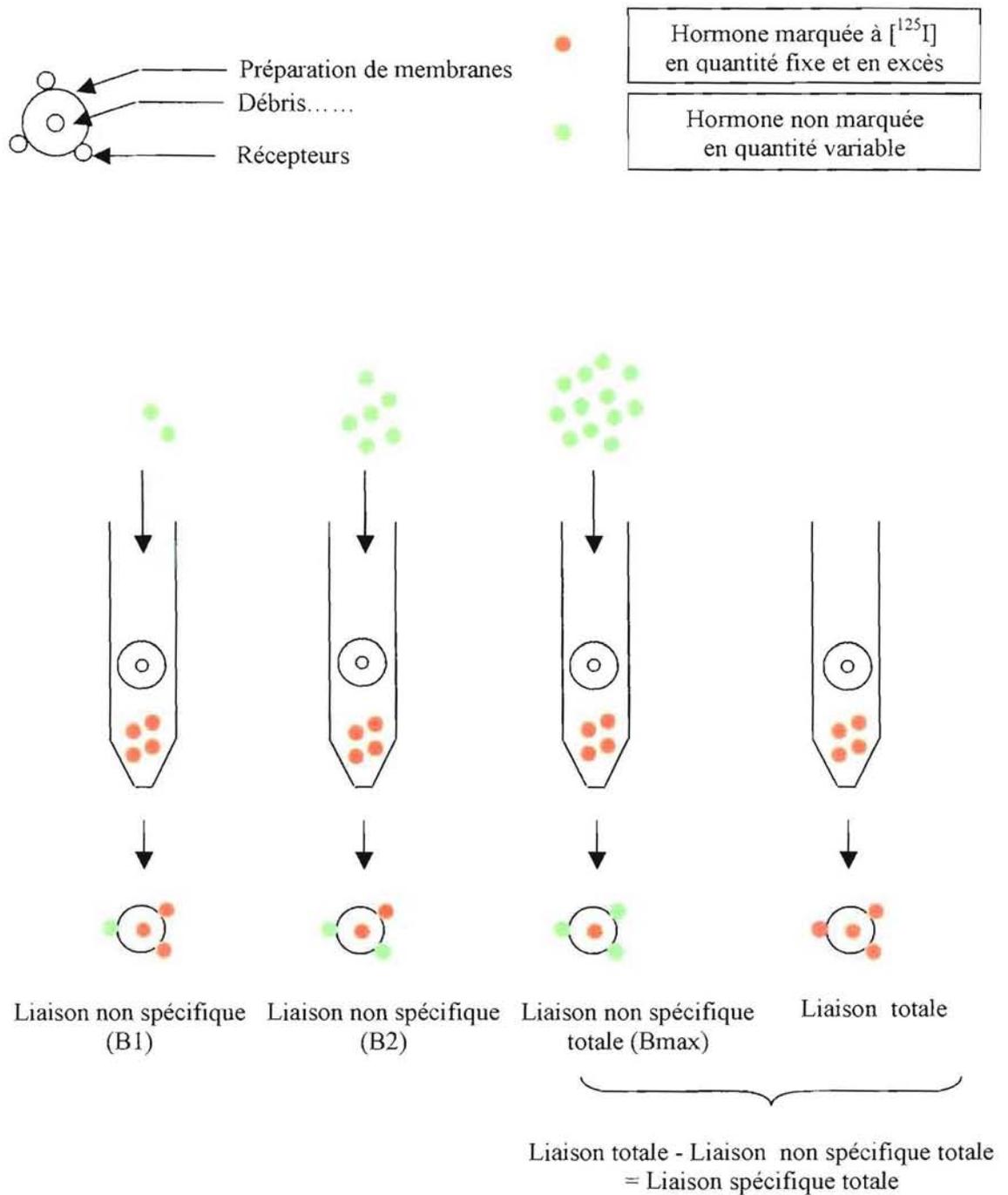


Figure II.3 : Principe de la technique du déplacement de la liaison d'une hormone marquée par une hormone non marquée (radiorécepteurs).

synthèses d'ADN et de protéines des cellules de gonade et du bord du manteau est effectuée à partir du test-t de Student.

II.5. Liaison de l'IGF-1 recombinant humain (IGF-1 rh).

5.1. *Préparation de membranes plasmiques.*

Dans une série d'expériences préliminaires, des préparations de membranes plasmiques d'animaux entiers sans glande digestive ont été préparées. Par la suite, des préparations de membranes plasmiques ont été réalisées à partir soit de bord du manteau, soit de gonade, soit de palpes labiaux.

L'ensemble des étapes de la préparation de membranes plasmiques est réalisé à 4°C afin de limiter la dénaturation des protéines.

Après dissection, les tissus sont abondamment rincés dans le tampon de préparation des membranes (100 mM Hepes, 100 mM TrizmaHCl, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 0,24 M sucrose), puis égouttés et pesés, avant d'être émincés finement aux ciseaux dans ce même tampon (6 ml de tampon par mg de tissu). La préparation est ensuite soumise à un broyage mécanique au potter électrique, centrifugée (1000g, 5 minutes, 4°C), et le surnageant contenant les fractions subcellulaires est filtré sur toile à bluter (mailles de 100 µm). Le filtrat est à nouveau centrifugé (30 000g, 30 minutes, 4°C) afin de recueillir les membranes plasmiques partiellement purifiées. Le culot repris à sec (sans addition de tampon) et aliquoté en tubes microfuges, est conservé à -70°C au maximum une semaine.

La quantité de protéines contenues dans les membranes plasmiques est déterminée par la méthode de dosage de Bradford (1976).

5.2. *Mesure de la liaison.*

La capacité de liaison de l'IGF-1 rh à un récepteur endogène potentiel est déterminée par la mesure du déplacement de la liaison de [¹²⁵I]-IGF-1 rh par de l'IGF-1 rh non radioactif, selon le principe de compétition entre ligands pour un même récepteur (**Figure II.3**). La liaison spécifique de l'hormone est estimée par soustraction de la liaison non spécifique à la liaison totale. La liaison non spécifique est obtenue en incubant une quantité fixe d'hormone marquée en présence d'un excès d'hormone froide. La liaison totale résulte de l'incubation d'une quantité fixe d'hormone marquée en l'absence d'hormone froide.

5.2.1. Quantité optimale de membranes.

La quantité optimale de membranes par tube est déterminée par la mesure de la liaison totale de l'hormone marquée [^{125}I]-IGF-1 rh (80 000 cpm/tube) à l'issue de l'incubation de l'hormone pendant 4 heures à 4°C (selon les données bibliographiques) avec des concentrations croissantes de membranes plasmiques (4, 7, 10 et 15 mg/ml).

5.2.2. Cinétique de la liaison.

La durée optimale de l'incubation est déterminée par la mesure de la liaison totale de l'IGF-1 rh marqué (80 000 cpm/tube) en présence de 4 mg/ml de protéines de préparation de membranes et pendant différents temps (30, 60, 90, 120, 180, 240 et 360 minutes).

5.2.3. Mesure de la liaison de l'IGF-1 rh.

Les membranes (100 μl de suspension de membranes diluée à 4 mg/ml dans un tampon 55 mM Hepes-Tris) sont incubées avec :

- 100 μl de [^{125}I]-IGF-1 rh (60 000 à 100 000 cpm/100 μl)
- 100 μl de doses croissantes d'IGF-1 rh (0 à 132,5 nM)
- 100 μl de tampon de réaction (40 mM Hepes-Tris, 6% BSA et 3 000 TIU d'aprotinine, Sigma[®]).

Après une incubation de 4 heures à 4°C, sous agitation circulaire modérée, 3 aliquots de 100 μl sont prélevés et distribués dans 500 μl de tampon de séparation froid (50 mM Hepes-Tris, 2% (p/v) de BSA). La séparation de l'hormone liée et de l'hormone libre est effectuée par centrifugation (10 000g, 10 minutes). Les culots sont rincés à 3 reprises par 500 μl de tampon de lavage (50 mM Hepes-Tris, 10% (p/v) de sucrose), puis comptés à sec dans un compteur gamma (Packard[®]).

5.2.4. Représentations de la mesure de la liaison.

5.2.4.1. Capacité de déplacement de la liaison totale.

L'aptitude de l'IGF-1 rh à déplacer la liaison de [^{125}I]-IGF-1 rh à des protéines de membranes plasmiques est estimée par la mesure de la liaison totale de [^{125}I]-IGF-1 rh en fonction de quantités croissantes d'IGF-1 rh non marqué (0 à 0,13 μM) entrant en compétition avec l'IGF-1 rh marqué.

5.2.4.2. *Représentation de Scatchard.*

Les caractéristiques qualitative et quantitative de la liaison sont déterminées d'après la représentation de Scatchard (1949) représentant le rapport hormone liée sur hormone libre en fonction de la quantité d'hormone liée. Le tracé obtenu permet de déterminer les constantes de dissociation et d'affinité du récepteur ainsi que le nombre de récepteurs par mg de protéines.

III. RESULTATS

III.1. Suivi histologique des variations saisonnières de la gonade.

L'étude histologique de la gonade d'huîtres de Saint-Vaast-la-Hougue est réalisée au cours du cycle annuel de reproduction en parallèle des tests biologiques *in vitro*. L'hétérogénéité de la gonade, composée de tubules gonadiques où se déroulent les différentes étapes de la gamétogenèse et de cellules vésiculeuses constituant le tissu de réserve, nous a conduit à suivre en même temps les évolutions qualitatives de la gamétogenèse et du tissu de réserve.

1.1. Evolution qualitative de la gamétogenèse.

Le suivi de la gamétogenèse est basée sur la nomenclature décrite par Lubet (1959) chez la moule *Mytilus edulis* et adaptée chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par Heude-Berthelin (2000).

La gamétogenèse se décompose schématiquement en 4 stades représentés sur la **figure II.4**. Le stade 0 correspond à une phase de repos sexuel au cours de laquelle les tubules gonadiques sont réduits à des îlots de gonies quiescentes (a et a'). Le stade I se caractérise par la reprise de la gamétogenèse initiée par les mitoses goniales (b et b'). Le stade II est associé à une phase de développement intense des gamètes. Les tubules gonadiques grossissent et envahissent progressivement la gonade. Dans la lignée mâle apparaissent des spermatocytes I puis II, des spermatides puis des spermatozoïdes (c'). Dans la lignée femelle, les ovocytes sont en période de vitellogenèse (c). Le stade III, de maturité sexuelle, se divise en sous-stades selon que les gamètes matures envahissent la gonade (III_A) (d et d'), ou bien soient émis dans le milieu extérieur (III_B), ou que les tubules gonadiques régressent à l'issue de l'émission d'ovocytes ou de la spermiation (III_D) conduisant au stade de repos sexuel. Dans certains cas, le sous-stade III_C traduisant l'initiation d'une nouvelle gamétogenèse peut être observé.

Le suivi annuel des échantillons histologiques a permis d'observer 6 périodes distinctes au cours de la gamétogenèse représentées en **figure II.6.a** et correspondant aux stades précédemment décrits. De mai à juillet, les tubules gonadiques envahissent

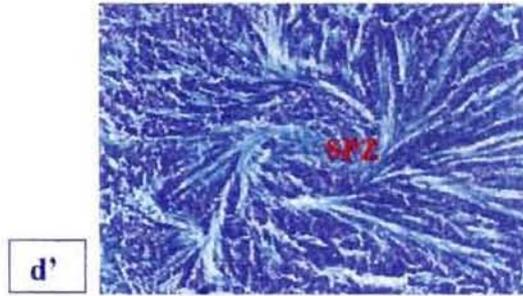
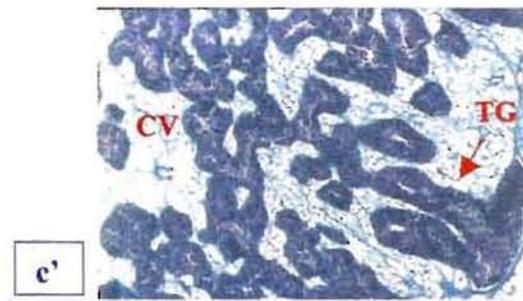
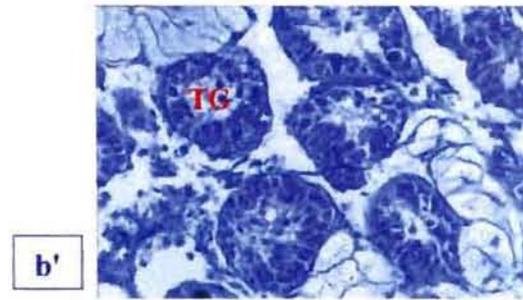
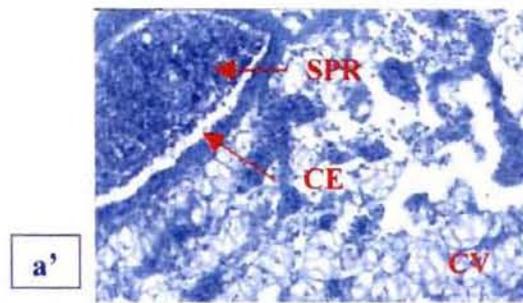
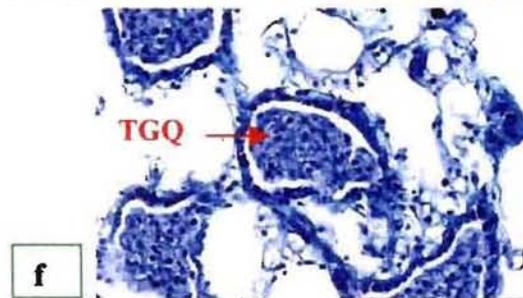
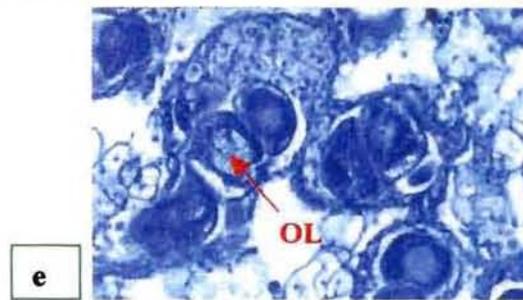
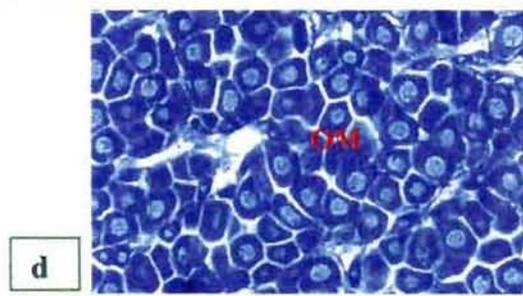
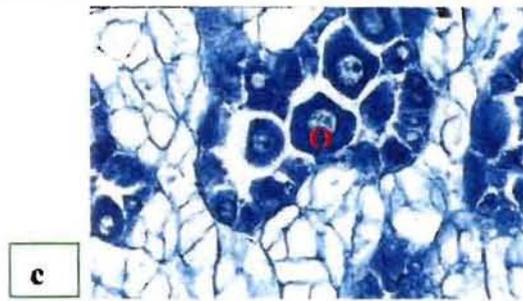
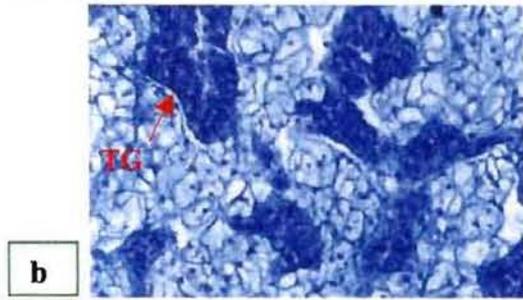
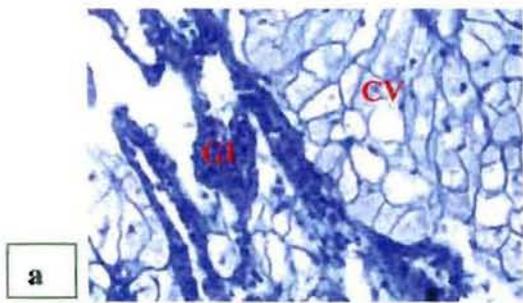


Figure II.4 : Gamétogenèse femelle (a → f) et mâle (a' → d') chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Objectif X 400.

a et a' : stade 0, de repos sexuel

b et b' : stade I, de reprise de la gamétogenèse

c et c' : stade II, de développement des tubules gonadiques et de vitellogenèse pour la gamétogenèse femelle

d et d' : stade IIIA, de maturation sexuelle

e : stade IIID, de lyse des ovocytes résiduels

f : stade IIID (fin) : de régression des tubules gonadiques

(CV : cellule vésiculeuse ; GI : gonie indifférenciée ; TG : tubule gonadique ; O : ovocyte, OM : ovocyte mature ; OL : ovocyte lytique ; TGQ : tubule gonadique quiescent ; SPR : spermatozoïdes résiduels ; CE : canal évacuateur des gamètes ; SPZ : spermatozoïdes)

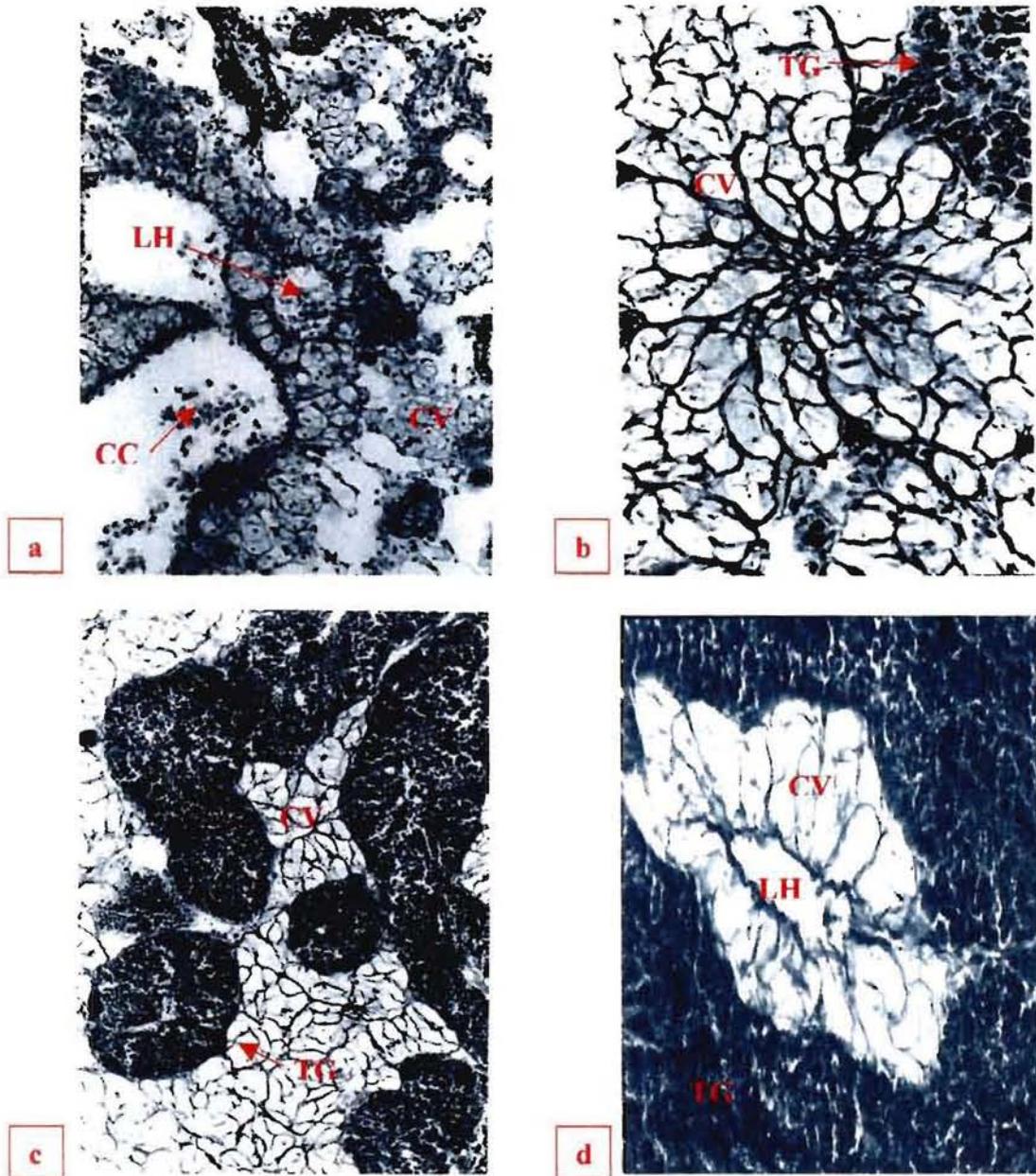


Figure II.5 : Tissu de réserve de la gonade au cours du cycle de reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

a : stade A, de restructuration du tissu de réserve. X 100.

b : stade B, de développement maximal du tissu de réserve. X 400.

c : stade C, de régression du tissu de réserve. X 100.

d : stade D, tissu de réserve réduit autour de lacunes hémocytaires. X 400.

(LH : lacune hémocytaire ; CC : cellule circulante ; CV : cellule vésiculeuse ; TG : tubule gonadique).

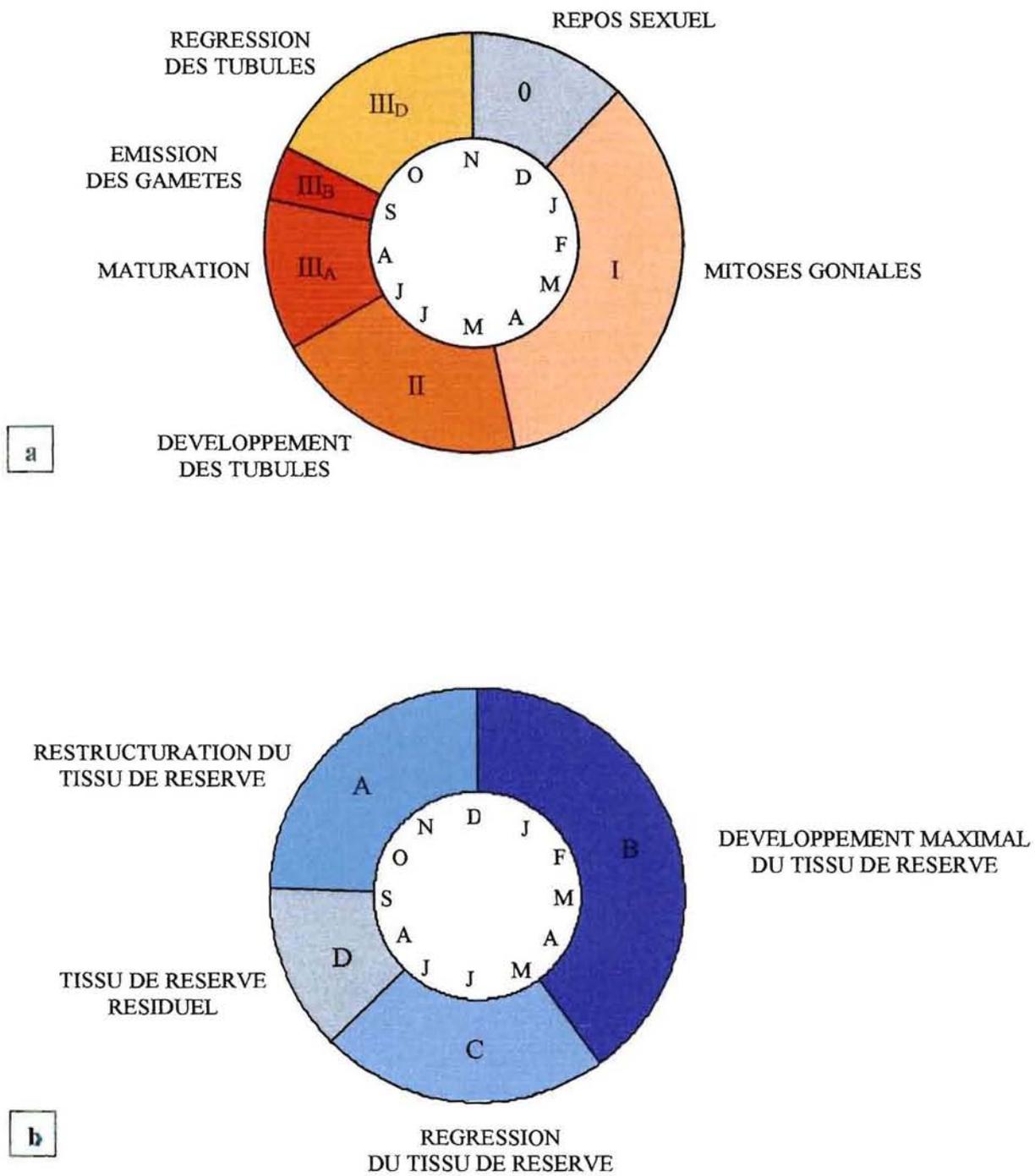


Figure II.6 : Evolutions de la gamétogenèse (a) et du tissu de réserve (b) au cours du cycle de reproduction de *Crassostrea gigas* (2000-2001) à Saint-Vaast-la-Hougue.

progressivement la gonade et les gamètes s'y développent de façon intense (stade II). Entre juillet et août, des gamètes matures sont observés et le tissu gonadique est majoritairement composé de tubules gonadiques (stade III_A). Des émissions de gamètes sont observées en septembre (stade III_B), mais peuvent avoir débutées dès le mois d'août (point non échantillonné). Dès septembre et jusqu'à la fin de novembre, des cellules circulantes apparaissent autour des lacunes hémocytaires et les gamètes non émis se résorbent (stade III_D). Entre novembre et décembre, les tubules gonadiques sont réduits à quelques cellules germinales quiescentes ; il s'agit du repos sexuel (stade 0). Puis en décembre, les mitoses goniales reprennent, et de décembre à avril, les gonies envahissent progressivement les tubules gonadiques (stade I). Dès le mois de mai, les gonies entrent en méiose et se différencient en spermatozoïdes ou en ovocytes au cours de la vitellogenèse (stade II).

1.2. Evolution qualitative du tissu de réserve.

L'analyse qualitative du tissu de réserve est décrite d'après les stades identifiés chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par Berthelin et collaborateurs (2000 a).

Le développement du tissu de réserve se décompose en 4 stades (**Figure II.5**). Le stade A correspond à une phase de restructuration du tissu de réserve après la ponte. Le stade B est le stade ultime du développement du tissu de réserve qui constitue alors un pavement uniforme. Le stade C est à l'inverse une phase de régression du tissu de réserve du fait du développement des tubules gonadiques, aboutissant au stade D traduisant un tissu de réserve extrêmement réduit.

Le suivi annuel des échantillons histologiques, réalisé aux dates exactes des mesures d'effets biologiques, relate une évolution du tissu de réserve (**Figure II.6.b**) similaire à celle décrite par Berthelin et collaborateurs (2000 a) pour des huîtres de la même origine. De mai à juillet, le tissu de réserve est en cours de régression (stade C) alors que le développement des tubules gonadiques se poursuit. Dès le mois de juillet et jusqu'à septembre, le tissu de réserve est réduit à quelques assises cellulaires autour des lacunes hémocytaires (stade D) du fait du développement maximal des tubules gonadiques. De septembre à décembre, la gonade est envahie de cellules circulantes et le tissu de réserve se restructure progressivement à partir des lacunes hémocytaires (stade A). De décembre jusqu'à avril, le tissu de réserve devient majoritaire et les lacunes hémocytaires plus rares (stade B).

III.2. Effets biologiques *in vitro* de l'IGF-1 rh sur les cellules de la gonade.

Pour tous les tests biologiques *in vitro* réalisés et analysés, la viabilité cellulaire est supérieure à 75%.

2.1. Suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses d'ADN.

Le profil annuel de l'effet biologique de l'IGF-1 rh sur l'incorporation de [³H]-thymidine par les cellules de la gonade a été suivi pour des concentrations variant de 10⁻¹² à 10⁻⁷ M. A 10⁻⁷ M, le suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur cette incorporation indique une activation significative de la synthèse d'ADN pour les mois de novembre, décembre et janvier (**Figure II.7.a**). Les activations, respectivement de 13%, 18% et 33%, sont statistiquement significatives par rapport à l'incorporation de base de [³H]-thymidine.

En novembre et en décembre, les activations sont essentiellement significatives que pour 10⁻⁷ M d'IGF-1 rh (**Figure II.8.a,b**). En revanche, en janvier, toutes les concentrations d'IGF-1 rh activent significativement l'incorporation de [³H]-thymidine par les cellules du tissu gonadique avec un maximum d'activation de 68% à 10⁻¹² M (**Figure II.8.c**).

Pour cette période hivernale où un effet activateur est observé, l'étude histologique montre que les divisions cellulaires concernent non seulement les cellules goniales (stade I) mais aussi les cellules de réserve (stade A) (**Figure II.9.b**). Aussi, pour préciser la cible exacte de l'effet de l'IGF-1 rh, un second test biologique a été réalisé après centrifugation rapide de la suspension de cellules de gonade, étape qui permet d'éliminer les cellules de réserve encore présentes dans la suspension cellulaire. Les résultats pour les mois de novembre, décembre et janvier sont présentés sur la **figure II.7.c**. L'effet biologique de l'IGF-1 rh sur les cellules goniales est alors confirmé puisqu'une activation significative de l'incorporation de [³H]-thymidine est obtenue en novembre (113%), en décembre (46%) et en janvier (19,5%).

2.2. Suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines.

Le profil annuel de l'effet biologique de l'IGF-1 rh sur l'incorporation de [¹⁴C]-acides aminés par les cellules de la gonade a été suivi pour des concentrations variant de 10⁻¹³ à 10⁻⁷ M. A 10⁻¹² M, l'effet de l'IGF-1 rh sur cette incorporation indique une activation

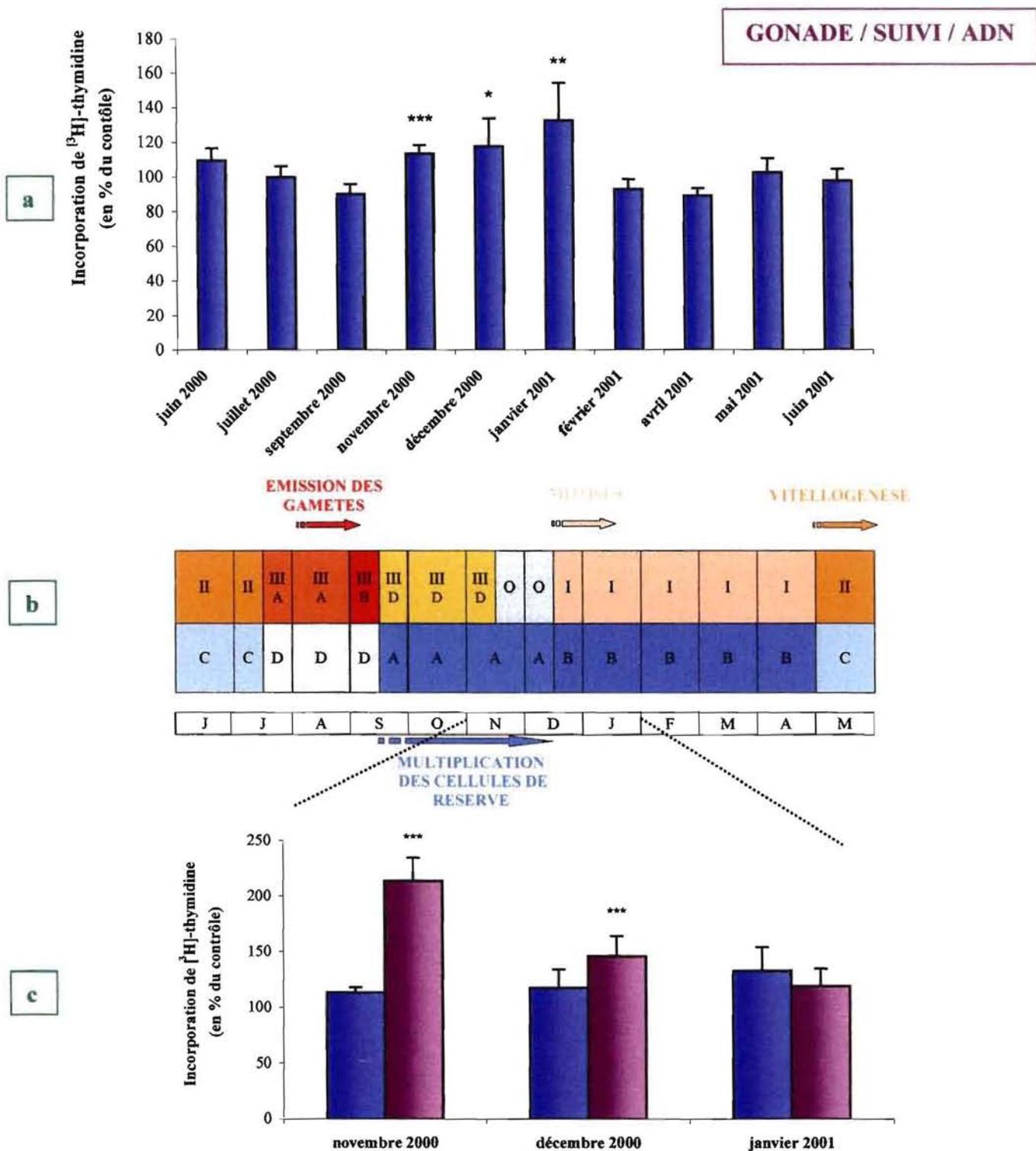


Figure II.7 : Effet biologique *in vitro* de l'IGF-1 rh sur l'activité de prolifération des cellules de la gonade.

a : Profil annuel de l'effet biologique de 10^{-7} M d'IGF-1 rh. Les données sont exprimées en % d'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine dans l'ADN par rapport à l'incorporation de base.

L'incorporation est significativement plus élevée pour les mois de novembre, décembre et janvier. (ANOVA, $n=46$, $F=1,24$).

b : Suivi histologique de la gamétogenèse et du tissu de réserve au cours du cycle de reproduction 2000-2001.

c : Analyse comparative de l'effet biologique de 10^{-7} M d'IGF-1 rh sur l'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine par les cellules de la gonade (en bleu) et les cellules germinales isolées par centrifugation (en prune). *La significativité est calculée d'après le test-t de Student : *** $p < 0,001$.*

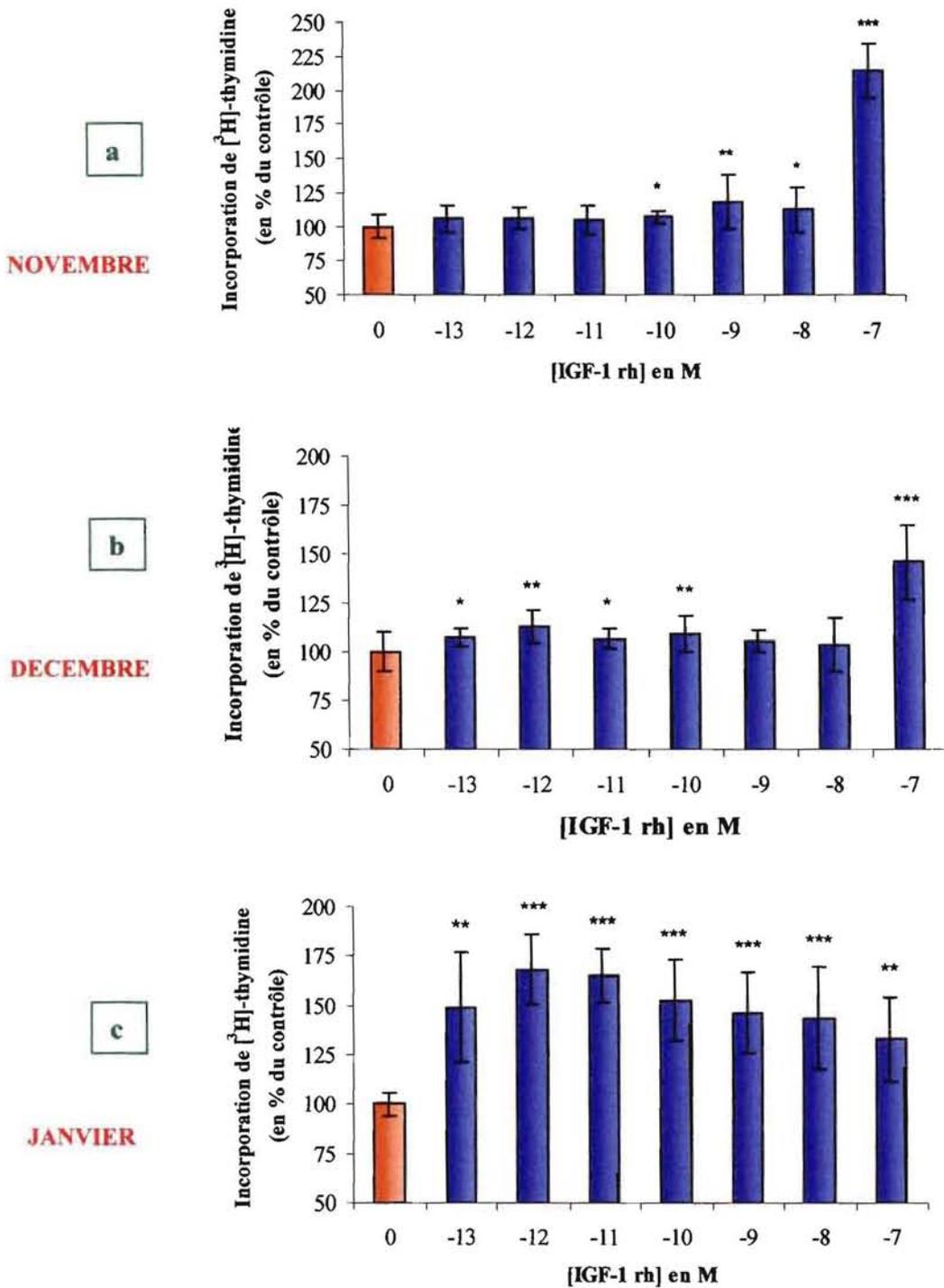


Figure II.8 : Effet de la gamme de concentration d'IGF-1 rh (10^{-12} à 10^{-7} M) sur l'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine par les cellules germinales.

Les données sont exprimées en % d'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine par rapport à l'incorporation de base, pour les mois de novembre (a), décembre (b) et janvier (c).

La significativité est calculée d'après le test-t de Student : *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,1$.

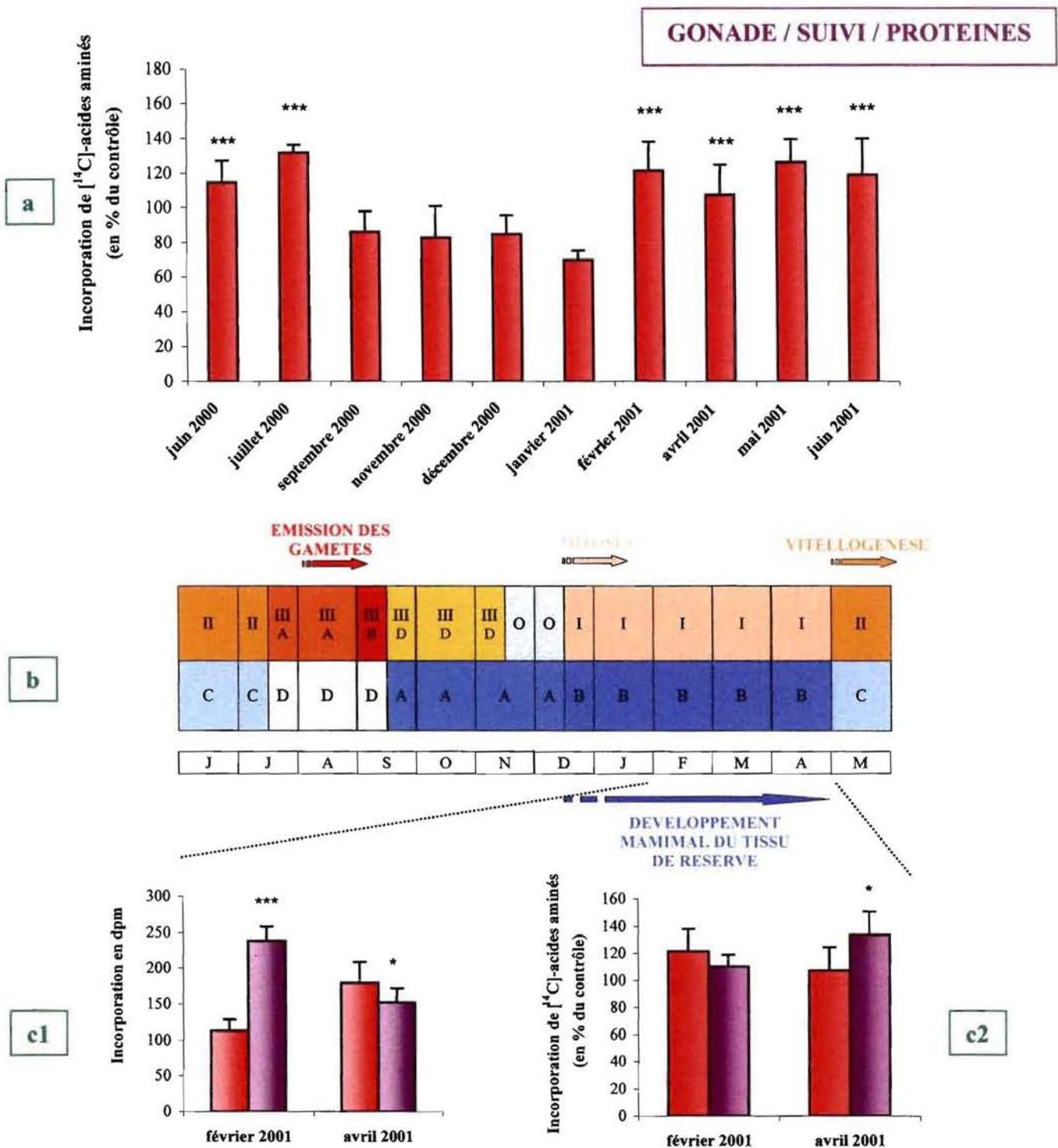


Figure II.9 : Effet biologique *in vitro* de l'IGF-1 rh sur l'activité de synthèse de protéines des cellules de la gonade.

a : Profil annuel de l'effet biologique de 10^{-12} M d'IGF-1 rh. Les données sont exprimées en % d'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ -acides aminés dans les protéines par rapport à l'incorporation de base. L'incorporation est significativement plus élevée pour les mois de février, avril, mai, juin et juillet. (ANOVA, $n=57$, $F=1,05$).

b : Suivi histologique de la gamétogenèse et du tissu de réserve au cours du cycle de reproduction 2000-2001.

c1 : Analyse comparative de l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ -acides aminés par les cellules de la gonade (en rouge) et les cellules germinales isolées par centrifugation (en prune). **c2** : Analyse comparative de l'effet biologique de 10^{-12} M d'IGF-1 rh sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ -acides aminés par les cellules de la gonade (en rouge) et les cellules germinales isolées par centrifugation (en prune). La significativité est calculée d'après le test-t de Student : * $p < 0,1$; *** $p < 0,001$

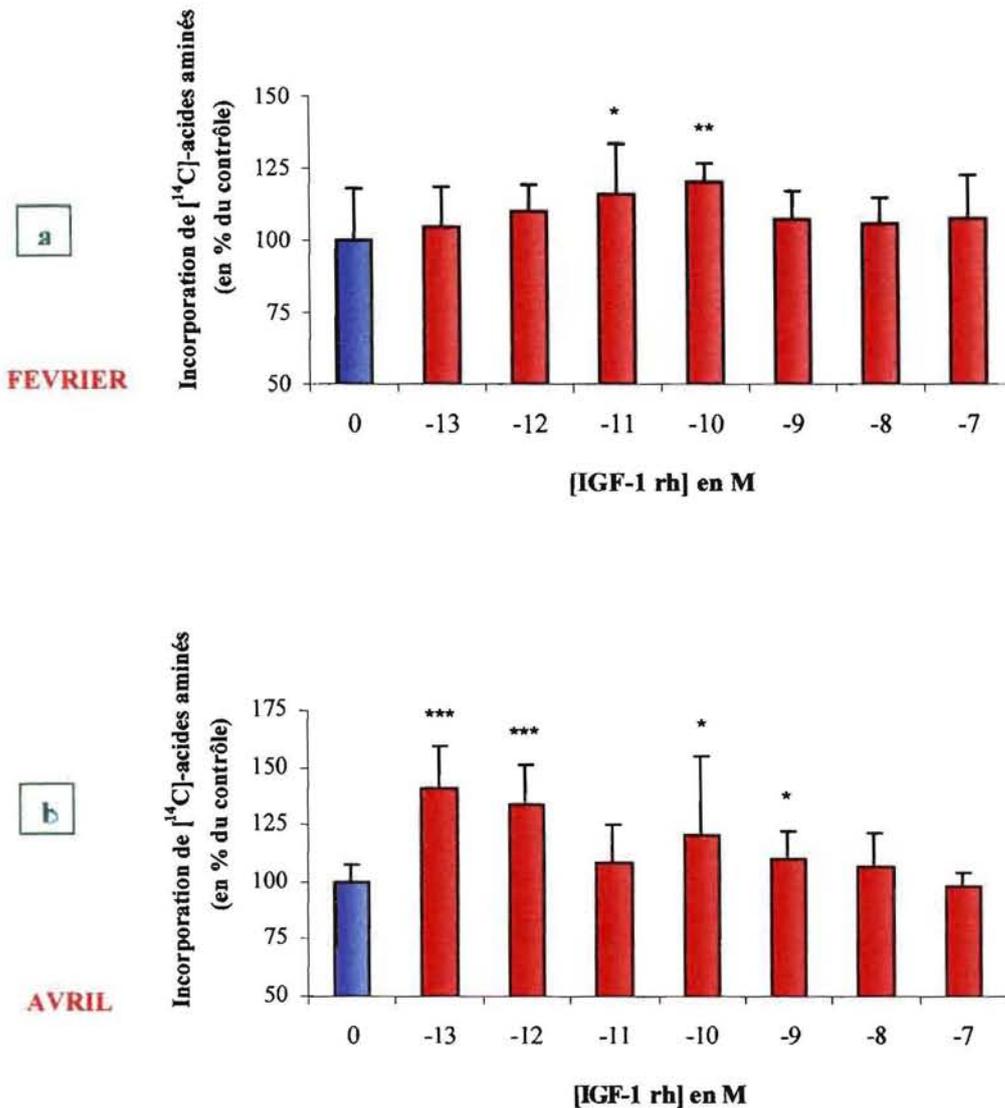


Figure II.10 : Effet de la gamme de concentration d'IGF-1 rh (10^{-13} à 10^{-7} M) sur l'incorporation de [¹⁴C]-acides aminés par les cellules germinales isolées par centrifugation.

Les données sont exprimées en % d'incorporation de [¹⁴C]-acides aminés par rapport à l'incorporation de base, pour les mois de février (a), et avril (b).

La significativité est calculée d'après le test-t de Student : *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,1$.

GONADE / EFFET DOSE / PROTEINES

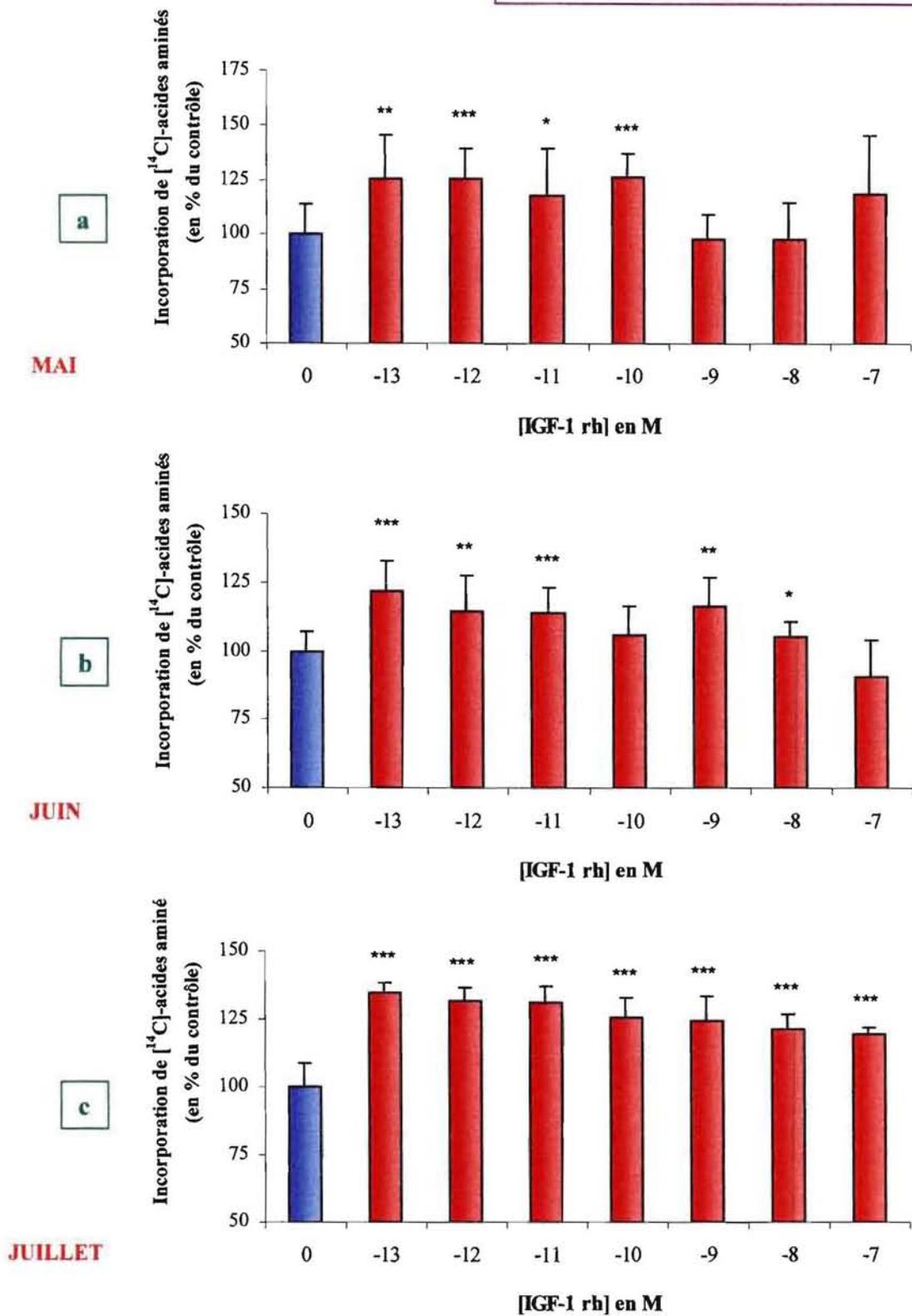


Figure II.11 : Effet de la gamme de concentration d'IGF-1 rh (10^{-13} à 10^{-7} M) sur l'incorporation de ^{14}C -acides aminés par les cellules de la gonade.

Les données sont exprimées en % d'incorporation de ^{14}C -acides aminés par rapport à l'incorporation de base, pour les mois de mai (a), juin (b) et juillet (c).

La significativité est calculée d'après le test-t de Student : *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,1$.

significative de la synthèse de protéines. Cette activation atteint 21% à la fin du mois de février, et pour les mois de mai, juin et juillet, elle est de 26%, 14% à 18% et 32% respectivement (**Figure II.9.a**).

En période hivernale et jusqu'au mois d'avril, les préparations de cellules germinales sont fortement contaminées par des cellules de réserve en phase de mise en réserve (stades A et B) (**Figure II.9.b**). Une étape supplémentaire de centrifugation a alors été effectuée pour les mois de février et avril (**Figure II.9.c**).

En février, l'incorporation d'acides aminés est essentiellement assurée par les cellules sexuelles (**Figure II.9.c1**). Les cellules de réserve, au début de leur phase de mise en réserve (stade A), incorporent peu. L'effet de l'IGF-1 rh (10^{-12} M), statistiquement pas différent entre les deux types de préparations de cellules, s'exerce donc bien sur les cellules sexuelles seules, avec une activation des synthèses de protéines de l'ordre de 10% (**Figure II.9.c2**). Une activation maximale de 20% est obtenue à une concentration de 10^{-10} M (**Figure II.10.a**).

En avril, les cellules de réserve, en pleine période de mise en réserve (stade B), incorporent plus d'acides aminés que les cellules sexuelles seules (**Figure II.9.c1**). Toutefois, l'effet de l'IGF-1 rh (10^{-12} M) est statistiquement orienté vers les cellules sexuelles, avec une activation des synthèses de protéines de 33% (**Figure II.9.c2**). Une activation maximale est de 41% est obtenue à une concentration de 10^{-13} M (**Figure II.10.b**).

Durant la période estivale (mai, juin et juillet), l'IGF-1 rh active les synthèses de protéines de manière dose-dépendante (**Figure II.11**). Au mois de juillet, en particulier, l'activation est significative pour toute la gamme de concentration d'IGF-1 rh (10^{-13} à 10^{-7} M), avec un maximum d'activation de 34% pour 10^{-13} M (**Figure II.11.c**).

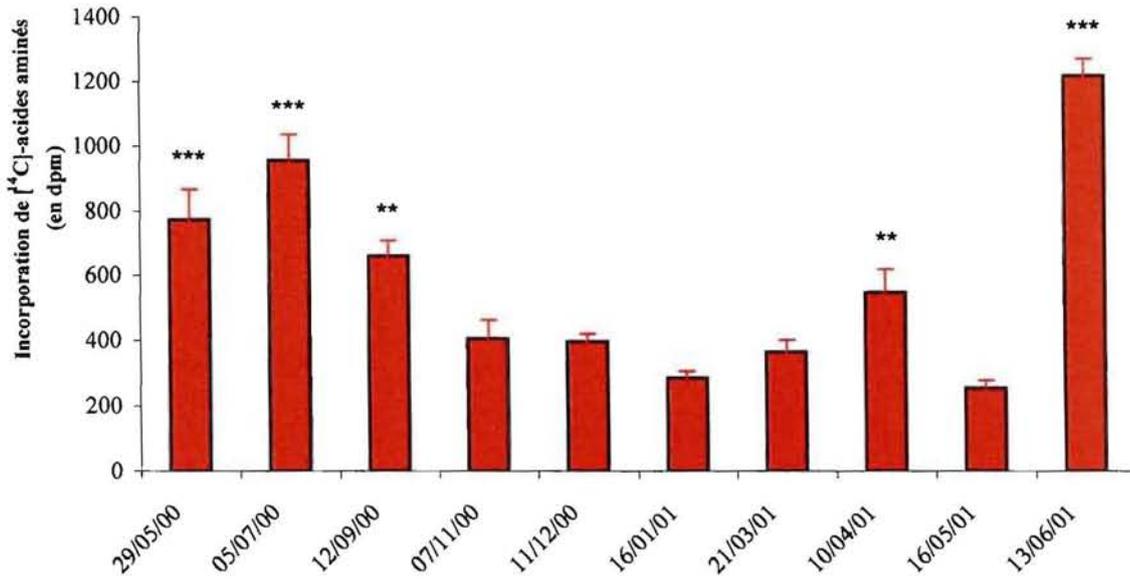
III.3. Effets biologiques *in vitro* de l'IGF-1 rh sur les cellules du bord du manteau.

3.1. *Suivi annuel des synthèses de protéines et d'ADN des cellules du bord du manteau.*

Le suivi annuel de l'incorporation de base de [14 C]-acides aminés est décrit en **figure II.12.a**. Les synthèses de protéines dans les cellules du bord du manteau augmentent de façon significative entre les mois de juin et de septembre, ainsi qu'au mois d'avril.

BM / INCORPORATION DE BASE

a



b

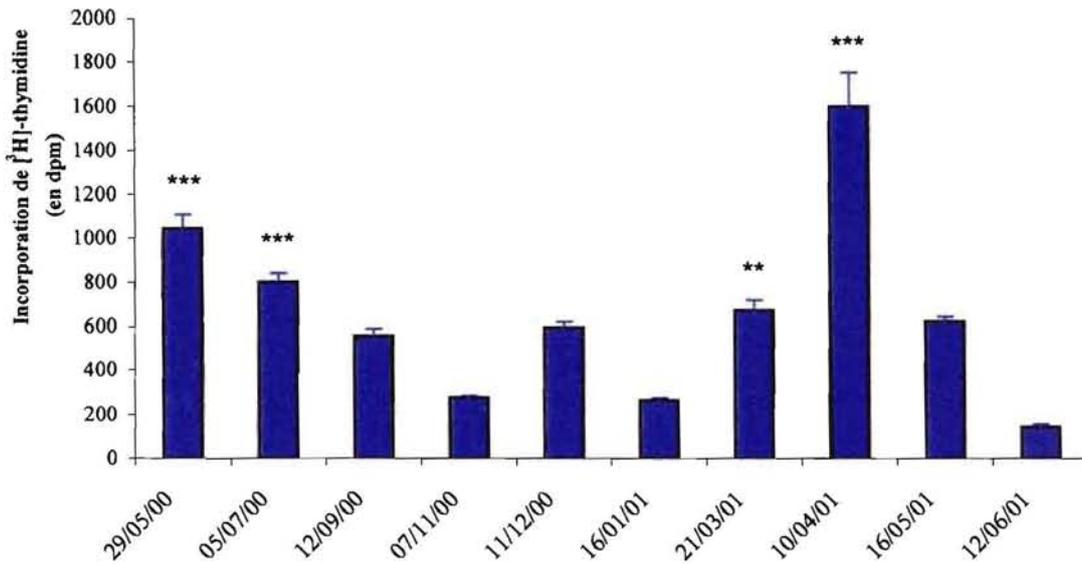


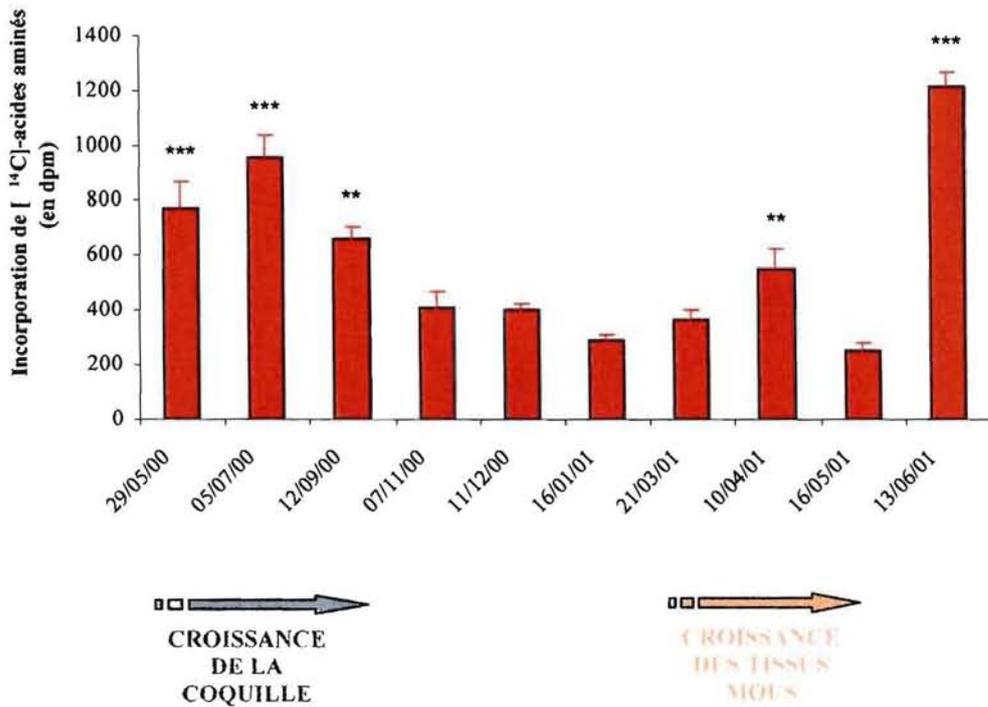
Figure II.12 : Profils annuels de l'incorporation de base de [¹⁴C]-acides aminés (a) et de [³H]-thymidine (b) par les cellules du bord du manteau de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Les données sont exprimées en dpm de radioactivité incorporée par 4.10^6 cellules et pour 1.10^6 dpm de radioactivité initiale. (dpm : désintégrations par minute)

L'incorporation de base de [¹⁴C]-acides aminés est significativement plus élevée pour les mois de juin, juillet, septembre et avril (ANOVA, $n= 56$, $F= 187,97$; *** $p<0,001$ et ** $p<0,05$).

L'incorporation de base de [³H]-thymidine est significativement plus élevée pour les mois de juin, juillet, mars, avril (ANOVA, $n= 59$, $F= 517,10$; *** $p<0,001$ et ** $p<0,05$).

a



b

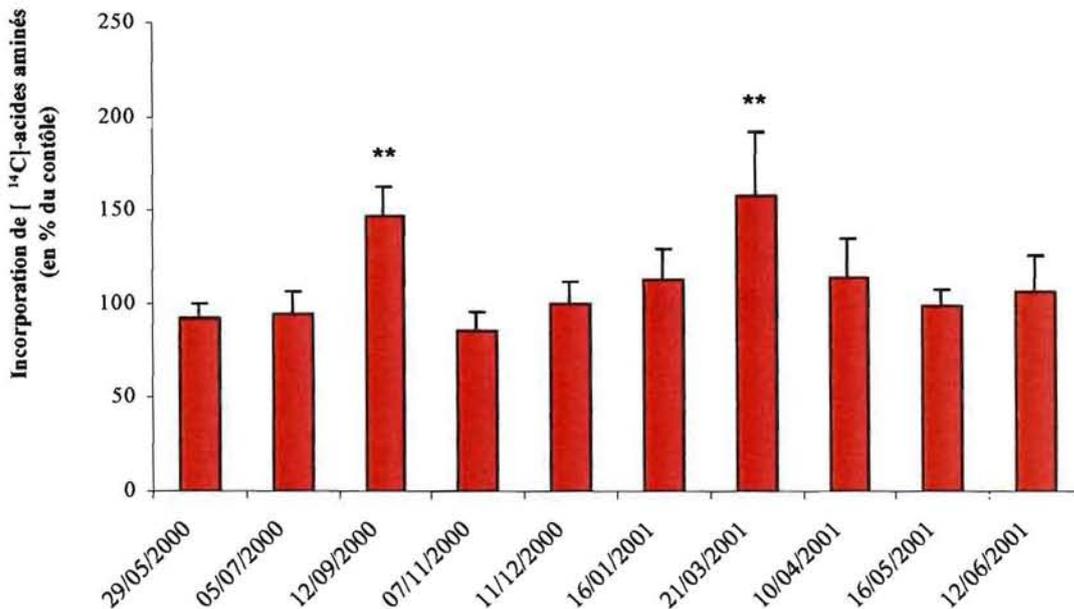
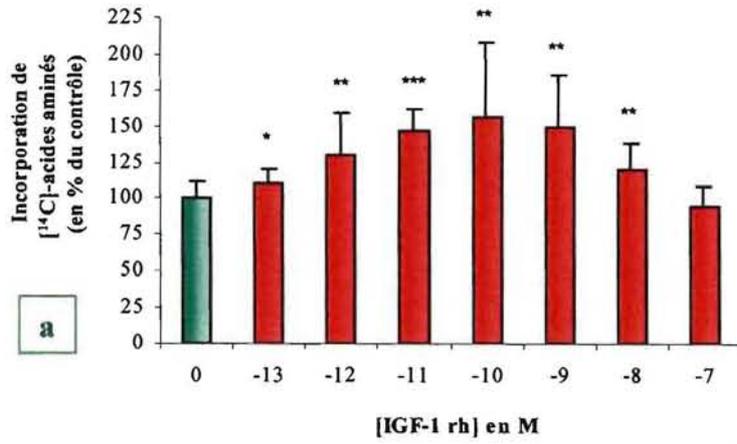


Figure II.13 : Effet biologique *in vitro* de l'IGF-1 rh sur l'activité de synthèse de protéines des cellules de bord du manteau.

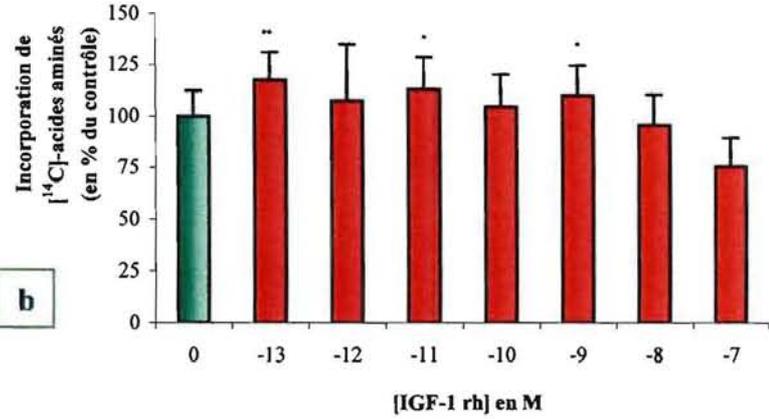
a : Suivi annuel de l'incorporation de base de $[^{14}\text{C}]$ -acides aminés par les cellules de bord du manteau. L'incorporation de base est significativement plus élevée pour les mois de juin, juillet, septembre et avril. (ANOVA, $n = 56$, $F = 187,97$; *** $p < 0,001$ et ** $p < 0,05$).

b : Suivi annuel de l'effet biologique de 10^{-11} M d'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines des cellules de bord du manteau. Les données sont exprimées en % d'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ -acides aminés par rapport à l'incorporation de base. L'incorporation est significativement plus élevée pour les mois de septembre et mars. (ANOVA, $n = 53$, $F = 9,38$; $p < 0,05$ **).

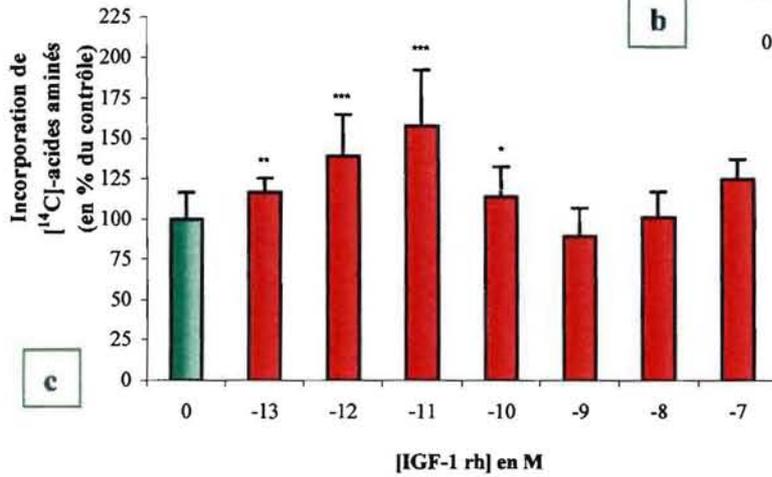
BM / EFFET DOSE / PROTEINES



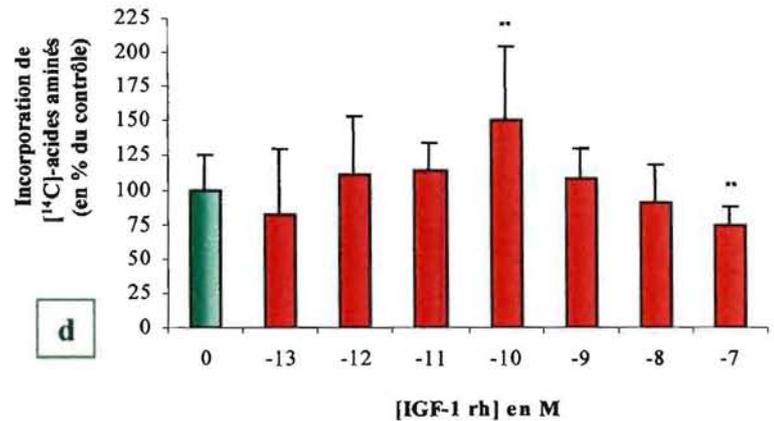
SEPTEMBRE



JANVIER



MARS

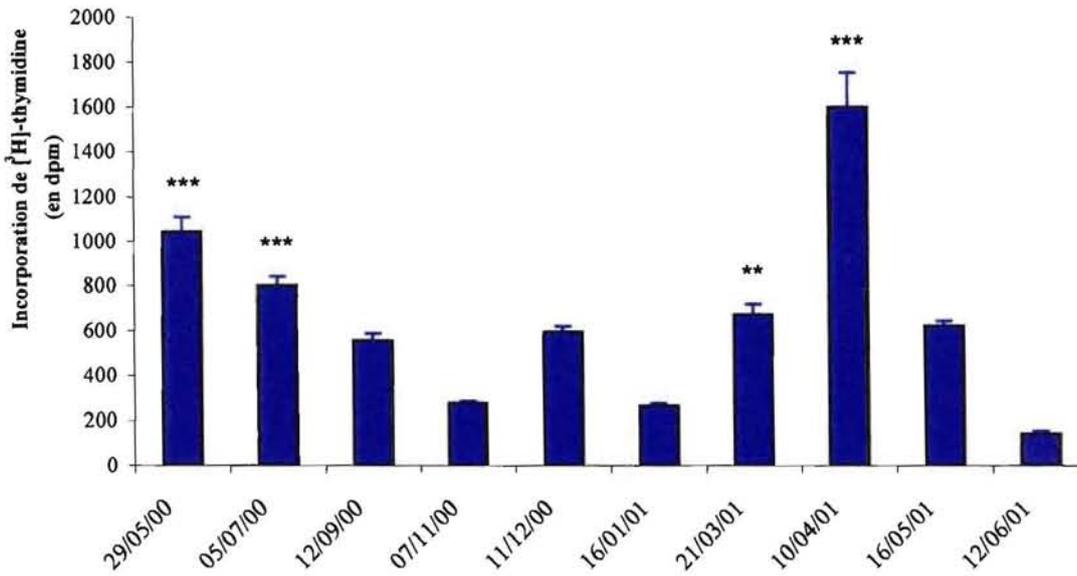


AVRIL

Figure II.14 : Effet de la gamme de concentration d'IGF-1 rh (10^{-13} à 10^{-7} M) sur l'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ -acides aminés par les cellules du bord du manteau.

Les données sont exprimées en % d'incorporation de $[^{14}\text{C}]$ -acides aminés par rapport à l'incorporation de base, pour les mois de septembre (a), janvier (b), mars (c), et avril (d). La significativité est calculée d'après le test-t de Student : *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,1$.

a



b

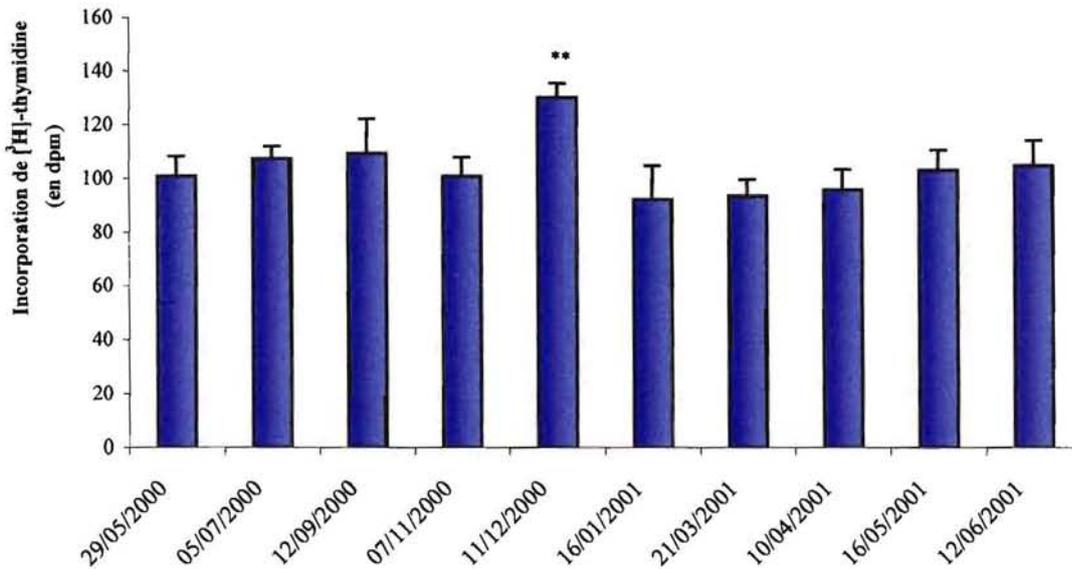


Figure II.15 : Effet biologique *in vitro* de l'IGF-1 rh sur l'activité la prolifération des cellules du bord du manteau.

a : Suivi annuel de l'incorporation de base de $[^3\text{H}]$ -thymidine par les cellules de bord du manteau. L'incorporation de base est significativement plus élevée pour les mois de juin, juillet, mars et avril (ANOVA, $n = 53$, $F = 9,38$; *** $p < 0,001$ et ** $p < 0,05$).

b : Suivi annuel de l'effet biologique de 10^{-7} M d'IGF-1 rh sur l'activité de prolifération des cellules de bord du manteau. Les données sont exprimées en % d'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine par rapport à l'incorporation de base. L'incorporation est significativement plus élevée pour le mois de décembre (ANOVA, $n = 45$, $F = 7,02$; $p < 0,05$ **).

Le suivi annuel de l'incorporation de base de [³H]-thymidine est décrit en **figure II.12.b**. La synthèse d'ADN dans les cellules du bord du manteau est significativement plus élevée pour les mois de juin et juillet, ainsi que pour les mois de mars et avril de l'année suivante. On obtient un profil similaire à celui de l'incorporation d'acides aminés avec un niveau élevé de synthèses en période estivale, et des synthèses en avril plus importantes toutefois pour l'ADN que pour les protéines.

3.2. Suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines

Le suivi annuel de l'effet de l'IGF-1 rh a été réalisé pour une gamme de concentration variant de 10⁻¹³ à 10⁻⁷ M. A 10⁻¹¹ M, le suivi annuel de l'effet de l'IGF-1 rh sur l'incorporation de [¹⁴C]-acides aminés par les cellules du bord du manteau indique deux périodes d'activation significative des synthèses de protéines : septembre et la période autour de mars (**Figure II.13.b**). Ces périodes correspondent aussi à une incorporation de base significative (**Figure II.13.a**).

En septembre, une activation significative de 47% est obtenue pour 10⁻¹¹ M (**Figure II.13.b**), mais l'effet activateur de l'IGF-1 rh est en fait significatif pour une gamme de concentration d'IGF-1 rh allant de 10⁻¹³ à 10⁻⁸ M, avec un maximum d'activation de 56% pour 10⁻¹⁰ M (**Figure II.14.a**).

En janvier, l'activation est significative dans la gamme de 10⁻¹³ M (18%) à 10⁻⁹ M (10%) (**Figure II.14.b**).

En mars, l'effet activateur de l'IGF-1 rh est obtenu pour des concentrations comprises entre 10⁻¹³ M, et 10⁻¹¹ M (ainsi que pour 10⁻⁷ M), avec un maximum d'activation de 57,5% à 10⁻¹¹ M (**Figure II.14.c**).

Enfin, au mois d'avril, seule la concentration de 10⁻¹⁰ M active significativement (51%) les synthèses de protéines des cellules du bord du manteau (**Figure II.14.d**).

3.3. Suivi de l'effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses d'ADN.

La **figure II.15.b** indique qu'à 10⁻⁷ M, seule concentration où des effets ont été observés, l'IGF-1 rh active significativement l'incorporation de [³H]-thymidine dans les cellules du bord du manteau au cours du mois de décembre (30%), alors que l'incorporation de base est peu élevée (**Figure II.15.a**).

III.4. Liaison de l'IGF-1 rh à des membranes de bord du manteau, de gonade et de palpes labiaux.

4.1. *Cinétique de la liaison.*

L'évolution de la liaison totale de [¹²⁵I]-IGF-1 rh à des membranes plasmiques d'animaux entiers a été suivie au cours d'une période d'incubation de 6 heures. La courbe obtenue indique une phase d'augmentation de la liaison totale entre 0 et 3 heures d'incubation, puis une phase de stagnation voire de légère diminution de la liaison totale lorsque l'incubation est prolongée de 3 à 6 heures (**Figure II.16.a**). Afin d'obtenir une liaison totale maximale, la durée de l'incubation a été fixée à 4 heures (240 minutes).

4.2. *Concentration optimale en protéines de membranes plasmiques.*

Pour des concentrations croissantes de protéines membranaires d'animaux entiers, variant de 0 à 15 mg.ml⁻¹, la proportion de la liaison non spécifique de [¹²⁵I]-IGF-1 rh évolue jusqu'à plus de 80% de la liaison totale (**Figure II.16.b**). Cette liaison augmente jusqu'à une concentration de protéines de 7 mg.ml⁻¹, puis tend à se stabiliser entre 7 et 15 mg.ml⁻¹ de protéines. La concentration optimale de protéines de membranes plasmiques a donc été fixée à 4 mg.ml⁻¹ afin de minimiser les liaisons non spécifiques de l'IGF-1 rh marqué.

4.3. *Capacité de déplacement de la liaison totale de [¹²⁵I]-IGF-1 rh par l'IGF-1 rh.*

La capacité de l'IGF-1 rh à déplacer la liaison de l'IGF-1 rh marqué au niveau de membranes plasmiques d'animaux entiers, de gonade, de bord du manteau et de palpes labiaux, est déterminée par la mesure du déplacement de la liaison totale de l'IGF-1 rh. La liaison totale est déplacée par des concentrations croissantes d'IGF-1 rh (0 à 0,5 μM) (**Figure II.16.c**). L'IGF-1 rh déplace la liaison totale de [¹²⁵I]-IGF-1 rh au niveau de chacune des préparations de membranes testées.

La liaison spécifique de l'IGF-1 rh a pu être déduite par calcul à partir des valeurs de déplacement. Ce calcul indique une plus grande spécificité pour l'IGF-1 rh au niveau des membranes d'animaux entiers (40%) que sur des membranes de gonade (29%), de bord du manteau (29%) ou de palpes labiaux (24%).

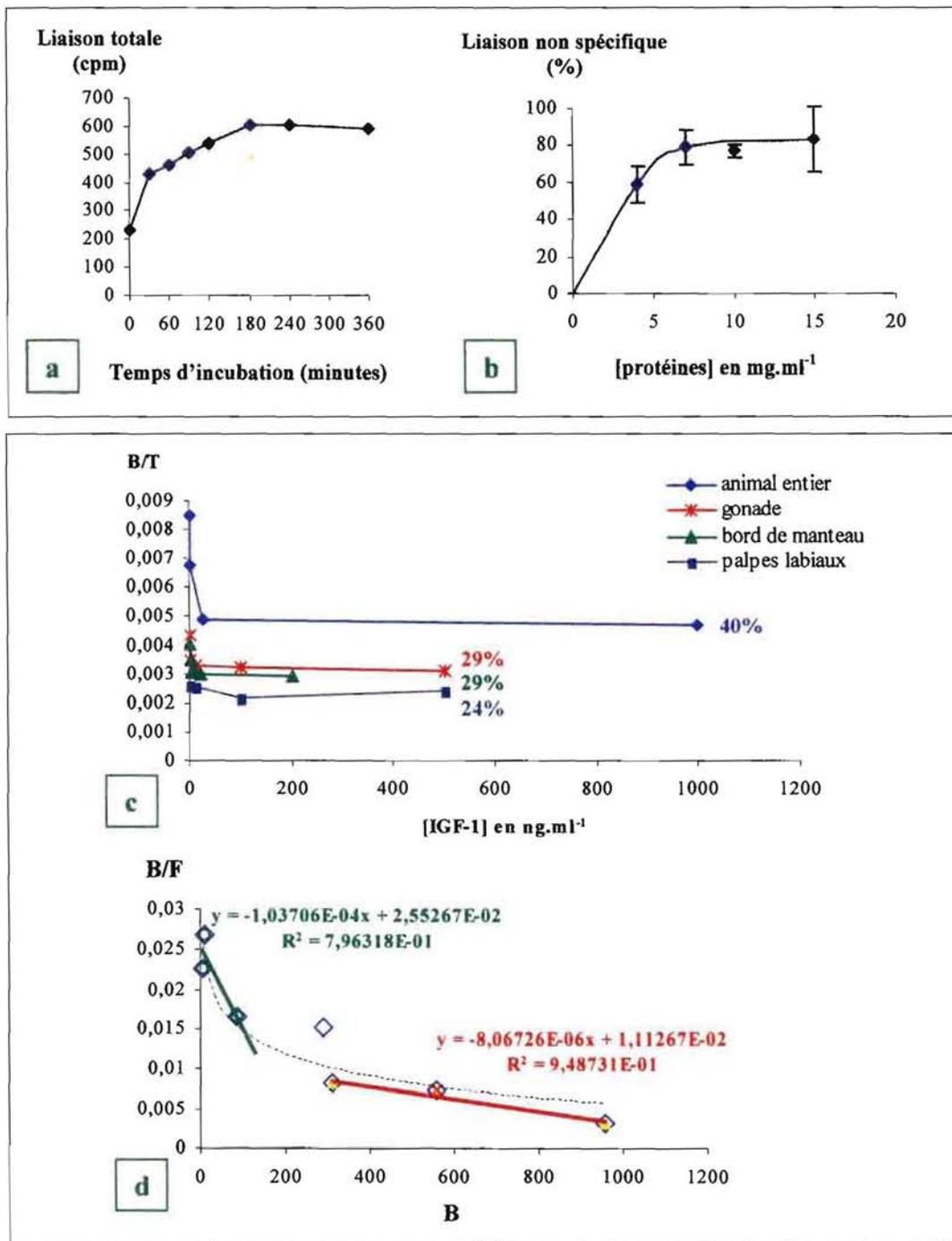


Figure II.16 : Etude de la liaison de $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-1 rh}$ à diverses préparations de membranes plasmiques.

- a :** Cinétique de la liaison totale à des membranes d'animal entier. L'incubation est réalisée sur 6 heures à 4°C et à partir de 4 mg/ml de protéines de membranes et 80 000 cpm/tube de $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-1 rh}$.
- b :** Détermination de la concentration optimale de protéines membranaires par mesure de la liaison non spécifique pour différentes concentrations de protéines (4, 7, 10 et 15 mg/ml). L'incubation est de 4 heures à 4°C en présence d'un excès d'IGF-1 non marqué (1 μM) et 80 000 cpm/tube de $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-1 rh}$.
- c :** Déplacement de la liaison totale au niveau de diverses membranes par des doses croissantes d'IGF-1 rh (0 à 3750 ng/ml) au cours d'une incubation de 4 heures à 4°C.
- d :** Représentation de Scatchard de la liaison de l'IGF-1 rh à des membranes d'animal entier (incubation de 4 heures à 4°C avec 4 mg/ml de protéines, 100 000 cpm/tube de $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-1 rh}$ et 0 à 100 nM d'IGF-1 rh). La courbe se décompose en deux composantes linéaires.

4.4. Représentation de Scatchard de la liaison de l'IGF-1 rh.

Le déplacement de la liaison de [¹²⁵I]-IGF-1 rh par l'IGF-1 rh à partir de membranes d'animaux entiers peut également être visualisé sous la forme d'une représentation de Scatchard (**Figure II.16.d**). La courbe obtenue, d'allure hyperbolique à concavité supérieure, peut être résolue en deux composantes linéaires dont les pentes représentent les constantes apparentes de dissociation et les intersections avec l'axe des abscisses, les capacités de liaison.

La première partie de la courbe (droite verte) définirait alors un site de forte affinité et de faible capacité présentant une constante de dissociation $K_d = 0,01$ nM et une capacité de liaison $B_{max} = 246$ fmol.mg⁻¹ de protéines. La seconde partie de la courbe (droite rouge) traduirait un site de plus faible affinité et de forte capacité de liaison présentant une $K_d = 0,12$ nM et un $B_{max} = 1380$ fmol.mg⁻¹ de protéines.

IV. DISCUSSION

Chez les Invertébrés, de nombreux travaux traitent de la mise en évidence physiologique de l'existence de molécules de la famille des insulines/IGFs et de leurs récepteurs. La plupart de ces études utilisent deux stratégies différentes : l'une consiste à rechercher un effet biologique de molécules hétérologues de la famille des insulines/IGFs sur des tissus cibles, et la seconde a pour objet de montrer l'existence d'un système ligand-récepteur. Aussi, ces deux approches ont été prises en compte dans le cadre de ce travail chez *C. gigas*, et elles ont permis de mettre en évidence l'implication de molécules apparentées à l'insuline au niveau des processus de croissance et de reproduction de l'huître creuse.

Les tests biologiques *in vitro* ont été réalisés à partir de cellules du bord du manteau et de cellules de gonade. Le bord du manteau est en effet une zone de croissance somatique et de formation de la coquille, ce qui se traduit par la stimulation des métabolismes associés à ces processus de croissance tels que la synthèse de protéines et la multiplication de cellules. La gonade représente, quant à elle, la zone de déroulement de la gamétogenèse qui se caractérise par une phase de prolifération des cellules goniales par mitoses successives, et par la synthèse de protéines lors du développement des tubules gonadiques et de la maturation des gamètes ainsi qu'au cours de la mise en réserve au niveau des cellules vésiculeuses.

L'effet biologique de l'IGF-1 recombinant humain (IGF-1 rh), molécule hétérologue exprimée de façon ubiquitaire et impliquée par voie endocrine mais aussi autocrine/paracrine dans la croissance et le développement chez les Vertébrés, a donc ainsi été recherché sur chacun de ces tissus, afin de mettre en évidence un effet potentiel de ce facteur de croissance sur les activités de prolifération cellulaire et de développement associées aux processus de croissance ou de reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Variations saisonnières de la gamétogenèse et du tissu de réserve.

Le suivi histologique de l'évolution qualitative du tissu gonadique, réalisé au cours de l'année 2000-2001, est tout à fait corrélé avec le cycle de reproduction obtenu en 1996-1997 par Berthelin (2000 a) pour des huîtres provenant du même parc ostréicole. Toutefois, on peut

noter un décalage chronologique des différents stades du développement gamétogénétique entre les deux cycles de reproduction. Le stade I (période de mitoses goniales) est plus long pour le suivi 2000-2001 (décembre à avril) par rapport au suivi 1996-1997 (décembre à février), ce qui entraîne le décalage de la période de développement des gamètes (stade II) qui se déroule alors de mai à juillet en 2001 contre février à juillet en 1997. La période de repos sexuel (stade 0) est quant à elle réduite par rapport à 1996 (novembre et décembre en 2000 contre octobre à décembre en 1996). Ces décalages relativement importants reflètent l'importance des conditions environnementales (température, nourriture...) dans le processus de reproduction. Néanmoins, ces données indiquent que chaque étape peut être rallongée ou raccourcie sans conséquence quant à la réussite de la gamétogenèse et surtout sur la période d'émission des gamètes ; la gonade est toujours pleine de gamètes matures fin juillet.

Ces différences observées dans le déroulement de la gamétogenèse entraînent également des variations de l'évolution du tissu de réserve de la gonade. En effet, la restructuration du tissu de réserve (stade A) a lieu après l'émission des gamètes (stade III_B) parallèlement à la régression des tubules gonadiques (stade III_D) et au repos sexuel (stade 0), c'est-à-dire de septembre à décembre en 2000. Toutefois, pour le suivi 1996-1997, cette phase de réorganisation de la gonade après la ponte se déroule au cours de la même période. En revanche, le stade B de développement maximal du tissu de réserve, qui s'effectue en même temps que la reprise de la gamétogenèse (stade I), est plus long pour le suivi 2000-2001 (décembre à mai) que pour le suivi 1996-1997 (décembre à février). En conséquence, la déstructuration du tissu de réserve (stade C) débute plus tardivement en 2001 et se déroule de mai à début juillet, parallèlement au développement des tubules gonadiques (stade II).

L'activité de reproduction saisonnière de *C. gigas* entraîne donc des fluctuations marquées du tissu de réserve. Ainsi, la proportion de cellules vésiculeuses constituant le tissu de réserve au niveau de la gonade varie largement selon le stade d'avancement de la gamétogenèse. En hiver, le tissu de réserve en restructuration envahit la gonade, ce qui se traduit par une forte proportion de cellules vésiculeuses par rapport aux cellules sexuelles dans les suspensions de cellules dissociées de gonade. Au cours de cette période, pour mesurer l'effet biologique de l'IGF-1 rh sur le métabolisme des cellules sexuelles, il est donc important d'éliminer les cellules de réserve. Cette séparation est réalisée par une centrifugation supplémentaire qui fait éclater les cellules de réserve dans les préparations de cellules dissociées et permet ainsi d'associer l'effet biologique potentiel de l'IGF-1 rh aux

cellules sexuelles seules. Par ailleurs, en période estivale, le développement des gamètes rend la centrifugation délicate (fragilité des ovocytes). Le dénombrement des cellules est alors difficile (nombreux spermatozoïdes mobiles) et de ce fait, le suivi du niveau de base des métabolismes étudiés ne peut pas être réalisé. Le suivi histologique de l'évolution du tissu gonadique au cours du cycle de reproduction est alors indispensable pour corrélérer les effets biologiques obtenus avec les stades de la gamétogenèse.

Réponses physiologiques des cellules de la gonade à l'IGF-1 rh.

Effet de l'IGF-1 rh sur la prolifération cellulaire.

L'activité de prolifération cellulaire, c'est-à-dire de synthèse d'ADN mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN néosynthétisé, des cellules de la gonade a été suivie à différentes périodes de cycle de reproduction et pour une large gamme de concentrations en IGF-1 rh s'étalant de 10^{-13} à 10^{-7} M. Le profil annuel d'incorporation de thymidine tritiée en présence d'IGF-1 rh (10^{-7} M) indique une activation de la synthèse d'ADN au cours des mois de novembre, décembre et janvier, avec un maximum d'activation de 33% en janvier. A cette période, les cellules du tissu germinal sont en phase d'initiation des mitoses goniales (stades O/I). Mais en hiver, la gonade, qui est un tissu mixte composé de tubules gonadiques et de tissu de réserve (cellules vésiculeuses), contient une forte proportion de cellules de réserve (stades A/B). L'effet activateur des mitoses peut alors s'exercer soit sur les cellules de réserve soit sur les cellules germinales. Pour préciser cet effet, l'étape supplémentaire de centrifugation a alors été réalisée pour la période hivernale allant de novembre à janvier, et qui correspond la fin de la restructuration du tissu de réserve et à son développement maximal. Les résultats de ce suivi hivernal indiquent à nouveau un effet activateur de l'IGF-1 rh sur la synthèse d'ADN pour les mois de novembre, décembre et janvier. Toutefois, cet effet activateur de l'IGF-1 rh sur la synthèse d'ADN est plus important pour les cellules sexuelles que pour la gonade dans son ensemble, atteignant pour 10^{-7} M d'IGF-1 rh un maximum de 113% en novembre (13% pour le tissu gonadique) et de 46% en décembre (18% pour le tissu gonadique). En janvier, après centrifugation, l'activation n'est pas statistiquement plus élevée pour les cellules sexuelles isolées (19,5%) que pour l'ensemble des cellules du tissu gonadique (33%). Ceci s'explique probablement par le fait qu'en janvier la proportion de cellules de réserve est négligeable.

L'IGF-1 rh semble donc jouer un rôle dans la prolifération des cellules germinales ou gonies pendant la phase de multiplication intense par mitoses successives (stade I). Cela est par ailleurs confirmé par le fait qu'aucun effet mitotique de l'IGF-1 rh n'est observé pour les cellules vésiculeuses au mois de septembre, alors que le tissu de réserve initie sa restructuration (stade A) probablement par des mitoses.

Cette activation des multiplications cellulaires par l'IGF-1 rh (10^{-7} M), plus importante en novembre qu'en décembre et janvier, pourrait refléter l'existence d'une régulation saisonnière de l'effet biologique de l'IGF-1 rh. Chez la truite *Salmo trutta*, le même type de variation saisonnière est observé. Maestro et collaborateurs (1999) attribuent cette régulation de l'effet biologique de l'IGF-1 rh (et plus généralement de toutes les molécules de la famille des insulines/IGFs) à une variation du nombre de récepteurs présents à la surface des cellules cibles. Chez l'huître, au mois de janvier, toute la gamme de concentrations d'IGF-1 rh est active sur la multiplication des cellules sexuelles, traduisant probablement ainsi une expression plus importante des récepteurs liant l'IGF-1 rh à la surface des cellules germinales. En effet, à cette période, tous les animaux sont au stade I de mitoses goniales. Par contre, en période de repos sexuel (novembre et décembre), peu favorable aux multiplications cellulaires, seule une forte concentration d'IGF-1 rh (10^{-7} M), à la limite des doses physiologiques décrites dans la littérature, induit un effet activateur important sur la multiplication cellulaire des gonies. Cette forte concentration active peut être associée à plusieurs éléments :

- En premier lieu, les expériences sont réalisées avec une molécule hétérologue. On peut alors s'interroger sur la spécificité et l'affinité de ces molécules, phylogénétiquement éloignées de la molécule endogène, pour les récepteurs impliqués dans la réponse physiologique. Chez l'amphioxus, les molécules hétérologues activent le récepteur unique à une forte concentration (de l'ordre de 10^{-5} M) du fait de la concentration physiologique élevée (10^{-7} M) de la molécule endogène apparentée à l'insuline (ILP) (Pashmforoush *et al.*, 1996). Toutefois, il convient de nuancer ce propos. En effet, chez les poissons, l'IGF-1 rh est hautement actif sur la prolifération des cellules de gonade de truite (Loir et Le Gac, 1994) et de roussette (Dubois et Callard, 1993), et présente une efficacité biologique proche de celle de l'IGF-1 recombinant de saumon (Moriyama *et al.*, 1993). De plus, chez les Invertébrés, les molécules apparentées à l'insuline, notamment la substance extraite de *Drosophila melanogaster* (Le Roith *et al.*, 1981), peuvent avoir des effets biologiques et une structure moléculaire plus proches de l'insuline de mammifères que ne

peuvent avoir les insulines d'organismes phylogénétiquement plus proches tels que les poissons et les oiseaux.

- La seconde explication possible fait intervenir le type de récepteur mis en jeu. Jusqu'à présent, chez les Invertébrés, un récepteur unique, capable de lier plusieurs molécules ligands, a été identifié chez *Lymnaea stagnalis* (Roovers *et al.*, 1995), *Drosophila melanogaster* (Petruzzelli *et al.*, 1986 ; Fernandez-Almonacid et Rosen, 1987 ; Ruan *et al.*, 1995), ou bien encore *Caenorhabditis elegans* (Kimura *et al.*, 1997). Dans notre étude, l'IGF-1 rh pourrait donc en fait non pas se lier à un récepteur de type IGF-1 mais plutôt à un récepteur unique de type insuline, ce qui expliquerait qu'une concentration élevée d'IGF-1 rh soit nécessaire pour induire un effet mitotique du fait d'une plus faible spécificité et affinité du récepteur à l'insuline pour l'IGF-1 que pour l'insuline.

- Par ailleurs, l'existence de plusieurs ligands, déjà démontrée chez quelques Invertébrés dont *Lymnaea stagnalis* (Smit *et al.*, 1998, pour revue), *Caenorhabditis elegans* (Grégoire *et al.*, 1998 ; Duret *et al.*, 1998 ; Kawano *et al.*, 2000), ou *Bombyx mori* (Nagasawa *et al.*, 1986 ; Kawakami *et al.*, 1989 ; Adashi *et al.*, 1989 ; Iwami *et al.*, 1990 ; Yoshida *et al.*, 1998), pouvant se lier à un récepteur unique, conduit probablement à des affinités différentes du récepteur vis-à-vis de ces divers ligands.

- Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'effet d'une forte dose d'IGF-1 rh sur l'activité de prolifération des gonies pourrait être que l'IGF-1 rh exerce une action de type paracrine/autocrine. Chez les poissons, une concentration de 10^{-6} M d'IGF-1 rh pourrait correspondre à un niveau d'action de type paracrine/autocrine, alors que les taux circulants sont de l'ordre de $10^{-9}/10^{-8}$ M (Niu *et al.*, 1993 ; Moriyama *et al.*, 1997). Chez de nombreuses espèces, de forts taux d'ARNm d'IGF-1 (Loir et Le Gac, 1994, 1996 ; Perrot *et al.*, 2000) ou d'IGF-2 (Perrot et Funkenstein, 1999) ainsi que des ARNm de récepteurs à l'IGF-1 (Le Gac *et al.*, 1996 ; Perrot *et al.*, 2000) s'expriment dans les spermatogonies et les cellules de Sertoli. Les molécules d'IGFs agissent donc comme des régulateurs autocrine/paracrine potentiels au niveau de la gonade mâle et peuvent agir directement sur les cellules germinales et/ou somatiques afin de stimuler leur prolifération.

Chez les Invertébrés, peu de données existent quant à l'implication de molécules de type insulines/IGFs dans les processus de la reproduction. Les transcrits des MIPs ont été localisés au niveau du système nerveux central de *Lymnaea stagnalis* (Smit *et al.*, 1998, pour revue), et une immunoréactivité aux anticorps anti-MIPB et anti-MIPC chez *Planorbarius corneus* (Sonetti *et al.*, 1992) et à l'anticorps anti-bombyxine-I chez *Locusta*

migratoria (Zachary *et al.*, 1988) est détectée au niveau des cellules neuroendocrines de leur système nerveux central. Par ailleurs, Gomot (1993) suggère qu'une partie du cerveau du mâle *Helix aspersa* est impliquée dans le contrôle de la spermatogenèse par la stimulation de l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules germinales, et qu'une autre partie du cerveau, dont les cellules sont connectées aux cellules des corps dorsaux, inhibe plutôt cette synthèse d'ADN.

Chez les Mollusques bivalves, quelques travaux préliminaires suggèrent une régulation des processus de reproduction par des molécules de type endocrine. Dans un premier temps, chez *Mytilus edulis*, il a été montré que seules les jeunes cellules germinales (ovogonies et spermatogonies) incorporent de la thymidine (Mathieu, 1987). Puis, dans un deuxième temps, chez *C. gigas*, Pazos et Mathieu (1999) ont montré que cette incorporation de thymidine par les cellules germinales peut être régulée par le GnRH, peptide régulateur de la reproduction connu chez les Vertébrés et identifié chez quelques Invertébrés comme *Lymnaea stagnalis* et *Helisoma trivolvis* (Young *et al.*, 1999) ou *Drosophila melanogaster* (Hauser *et al.*, 1998). Toutefois, à l'heure actuelle, l'effet de l'IGF-1 sur la synthèse d'ADN n'a pas encore été étudié, contrairement à l'effet de l'insuline sur la multiplication des cellules de gonade chez *Helix aspersa* (Monnier et Bride, 1995). Les doses actives sont alors de l'ordre de 10^{-8} - 10^{-9} M pour les cellules germinales d'animaux adultes, avec une activation de 69% de la synthèse d'ADN. De plus, chez *Helix aspersa* (Monnier et Bride, 1995) et *C. gigas* (Pazos, communication personnelles), la réponse physiologique présente des variations saisonnières probablement liées à la réceptivité des cellules selon le stade de développement de la gonade. D'ailleurs, l'effet du GnRH est certainement généré via un récepteur au GnRH, identifié chez *Pecten maximus* à partir d'expériences de radiorécepteurs (Pazos, communication personnelle) et en cours de caractérisation au laboratoire chez *C. gigas*, dont le niveau d'expression pourrait conditionner le taux de réponse biologique.

Effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines des cellules germinales.

L'effet biologique de l'IGF-1 rh sur la synthèse de protéines des cellules de la lignée germinale, mesurée par l'incorporation de [14 C]-acides aminés, a été suivi à différentes périodes du cycle de reproduction. La gamme de concentration d'IGF-1 rh testée est comprise entre 10^{-13} à 10^{-7} M. Le profil annuel de l'incorporation d'acides aminés par les cellules de la gonade sous l'effet de l'IGF-1 rh (10^{-12} M) indique une activation des synthèses de protéines

pour la période allant de février à juillet, avec un maximum d'activation de 32% en juillet. D'après le suivi histologique, ces synthèses de protéines pourraient être associées aux périodes de mitoses goniales et de croissance des gamètes. Or, à cette période, le tissu de réserve est très développé au sein de la gonade (stade B). Une étape supplémentaire de centrifugation a donc été réalisée afin de vérifier que l'activation des synthèses de protéines concerne bien les cellules germinales.

En février, l'effet biologique de l'IGF-1 rh est porté sur les cellules sexuelles isolées, lesquelles incorporent d'ailleurs naturellement plus d'acides aminés (sans effet d'IGF-1 rh), avec une activation des synthèses de protéines qui atteint 20% pour une concentration d'IGF-1 rh de 10^{-12} M. Cette activation pourrait être associée aux synthèses de protéines impliquées dans la restructuration des tubules gonadiques. Au mois d'avril, l'activation par l'IGF-1 rh des synthèses de protéines par les cellules sexuelles isolées est beaucoup plus importante, avec une gamme de concentrations actives d'IGF-1 rh plus large, de 10^{-13} à 10^{-9} M, et une activation maximale de 41% à 10^{-13} M. A cette date, le tissu de réserve est en cours de régression (stade C) alors que le volume du tissu germinal augmente, du fait, chez les femelles, de l'entrée des ovocytes en vitellogenèse (stade II). L'activation des synthèses de protéines s'amplifie ensuite pour une large gamme de concentration d'IGF-1 rh, au cours des mois de mai, juin et juillet, c'est-à-dire tout au long de la vitellogenèse, jusqu'à ce que les ovocytes parviennent à maturité. Or, au cours de cette période, les travaux de Heude-Berthelin (2000) ont montré que le développement intense des cellules germinales est associé à un taux important de protéines dans la gonade (**Annexe 1**). Cette élévation du contenu en protéines pourrait correspondre à une mise en réserve de protéines dans le cytoplasme ovocyttaire chez les individus femelles mais aussi de façon plus générale à la mise en place des tubules gonadiques.

Ainsi, il est donc probable que les synthèses de protéines, importantes au cours de la vitellogenèse, soient strictement régulées, et nos travaux montrent que les molécules de type insuline/IGF participent à cette régulation, puisque l'IGF-1 rh exerce sur ces synthèses un effet activateur de plus en plus prononcé d'avril à juillet (stade II). Par ailleurs, l'effet biologique de l'IGF-1 rh est obtenu pour de faibles concentrations indiquant une bonne réceptivité des cellules germinales à l'IGF-1 rh, lors de leur période de maturation.

Cet effet potentiel de l'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines associées à la vitellogenèse des cellules sexuelles est d'autant plus probable que l'existence et l'implication de molécules de type insuline/IGF ont déjà été décrites chez d'autres espèces.

Chez les Vertébrés, l'effet de l'IGF-1 sur la vitellogenèse est relativement bien décrit. Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 ont été localisés au niveau des ovocytes (Scavo *et al.*, 1991), et il a été démontré que l'insuline et l'IGF-1 stimulent la maturation des ovocytes qui s'accompagne de la synthèse de protéines et d'ARN, et de transport de glucose (Sadler et Maller, 1987 ; Miller, 1988, 1989 ; Janicot et Lane, 1989). De plus, de faibles concentrations d'IGF-1 ou de fortes concentrations d'insuline, du fait de la prédominance des récepteurs à l'IGF-1 au niveau des ovocytes, induisent la ré-initiation du cycle méiotique des ovocytes arrêtés au stade G₂, et par conséquence l'entrée des ovocytes en maturation (Hainaut *et al.*, 1991). De même, chez les poissons, la forte expression des IGFs au cours de la folliculogénèse suggère un rôle de ces facteurs de croissance dans la maturation des ovocytes. Les IGFs, et dans une moindre mesure l'insuline, régulent la croissance des cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte (Srivastava et van der Kraak, 1994), et également la vitellogenèse par stimulation de l'incorporation de vitellogénine au niveau des cellules folliculaires (Tyler *et al.*, 1987). Enfin, au cours du stade pré-ovulatoire, ces facteurs stimulent la stéroïdogénèse, qui conduit à la maturation finale des ovocytes notamment grâce à la synthèse par les cellules de la granulosa du stéroïde 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one qui induit la rupture de la vésicule germinative. Ces molécules ont une action de type paracrine/autocrine au cours de la vitellogenèse, du fait de l'expression d'ARNm de ligands et de récepteurs dans l'ovaire lui-même, mais aussi de type endocrine notamment en période pré-ovulatoire (Maestro *et al.*, 1999 ; Moriyama *et al.*, 1997). L'action des IGFs est régulée au cours de la vitellogenèse principalement par le nombre de récepteurs présents à la surface des cellules folliculaires (cellules de la granulosa ou de la thèque). Au cours de la vitellogenèse, le nombre de récepteurs diminue proportionnellement à la maturation folliculaire, puis augmente à nouveau au stade pré-ovulatoire sous l'action d'IGFs circulants (Kagawa *et al.*, 1994, 1995 ; Maestro *et al.*, 1997).

Chez les Invertébrés, les molécules de la famille des insulines /IGFs semblent également participer au processus de vitellogenèse.

Chez les Insectes, la présence de molécules apparentées à l'insuline a été démontrée au niveau de cellules neurosécrétrices de la femelle de la tique *Ornithodoros parkeri* pendant la pré-vitellogenèse (Zhu et Oliver, 1991). De même, chez la femelle du criquet migrateur *Locusta migratoria*, une substance immunoréactive à l'anticorps dirigé contre la bombyxine-I a été identifiée au niveau du complexe cerveau/*corpora cardiaca* des femelles en cours de maturation ovarienne (Zachary *et al.*, 1988). Ces données suggèrent donc, que chez les

Invertébrés, des molécules de type insuline/IGF synthétisées au niveau du système nerveux central seraient associées par voie endocrine aux processus de vitellogenèse. D'ailleurs, la bombyxine a également été détectée dans l'hémolymphe des femelles du ver à soie *Bombyx mori* (Saegusa *et al.*, 1992). Cependant, là encore, une action de type paracrine/autocrine de ces molécules n'est pas à exclure. En effet, la bombyxine, purifiée à partir du cerveau du ver à soie *Bombyx mori* (Nagasawa *et al.*, 1986) et qui appartient à la famille des insulines/IGFs (Jhoti *et al.*, 1987), est également produite dans les ovaires d'insectes (Fugo *et al.*, 1987), au niveau desquels des récepteurs à la bombyxine ont également été identifiés (Tanaka *et al.*, 1995 ; Fullbright *et al.*, 1997). La bombyxine semble donc être également impliquée dans les mécanismes de contrôle autocrine de la reproduction, et notamment dans les processus de développement ovarien (Kappler *et al.*, 1986 ; Orikasa *et al.*, 1993). D'ailleurs, chez le moustique *Aedes aegypti*, Graf et ses collaborateurs (1997) ont montré que l'insuline bovine agit sur les ovaires en stimulant la production d'ecdystéroïdes et la synthèse de protéines ovariennes. Cet effet biologique résulte probablement de l'interaction de l'insuline avec le récepteur de type insuline identifié dans les cellules nourricières et dans les cellules folliculaires qui entourent les ovocytes et qui sont la source principale d'ecdystéroïdes chez les femelles de *Aedes aegypti* et *Locusta migratoria* (Graf *et al.*, 1997 ; Helbling et Graf, 1998 ; Kappler *et al.*, 1986). L'ecdysone produite aurait pour fonctions, l'induction de la sécrétion de protéines de la membrane vitelline par les cellules folliculaires (Lin *et al.*, 1993), le maintien de la synthèse de vitellogénine, ainsi qu'un rôle dans la maturation ovarienne avec la séparation des follicules de l'ovocyte mature (Beckemeyer et Lea, 1980).

Chez les Mollusques, l'approche développée chez l'huître *C. gigas* constitue donc la première démonstration de l'implication de molécules de la famille de l'insuline/IGF dans le processus de vitellogenèse des cellules germinales.

*En conclusion, nos travaux montrent que l'IGF-1 rh exerce sur les cellules de la lignée germinale deux types d'effets biologiques complémentaires au niveau du cycle de reproduction : un effet sur la multiplication des cellules goniales et un effet sur la croissance et la maturation des gamètes notamment des ovocytes. De plus, l'IGF-1 rh exerce ces effets sur les cellules sexuelles de façon saisonnière ce qui traduit probablement une expression différentielle des récepteurs de type insuline/IGF au cours des processus de reproduction chez *C. gigas*.*

Réponses physiologiques des cellules du bord du manteau à l'IGF-1 rh.

Suivi des niveaux de base des synthèses de protéines et d'ADN.

Les incorporations d'acides aminés ou de thymidine permettent d'évaluer les niveaux de base de la synthèse de protéines ou de la multiplication des cellules du bord du manteau. Ces incorporations ont été suivies au cours du cycle biologique de *C. gigas*. La synthèse de protéines présente deux périodes de plus forte activité, l'une au mois d'avril et la seconde en période estivale (juin à septembre). L'activité de prolifération des cellules augmente également au cours de ces mêmes périodes. On peut cependant signaler qu'en avril, l'augmentation des multiplications cellulaires est plus marquée que l'augmentation des synthèses de protéines, alors qu'en période estivale, l'augmentation du métabolisme protéique est plus marquée que celle des multiplications cellulaires. Ces données ont été comparées au profil annuel de croissance pondérale journalière de la coquille (**Annexe 2**) réalisé à partir d'huîtres creuses de la côte normande (Dubois et Costil, communication personnelle). Il apparaît que la période estivale (juin à septembre) pour laquelle la synthèse de protéines est plus prononcée coïncide avec la période de plus forte croissance pondérale journalière de coquille. On peut donc supposer que l'activité de synthèse de protéines des cellules du bord du manteau est étroitement associée au mécanisme de formation de la coquille. La forte prolifération de cellules obtenue en avril correspond probablement, quant à elle, à la période de croissance somatique des cellules du bord du manteau, laquelle s'accompagne d'une activité de synthèse de protéines plus faible, dont certainement des protéines de structure pour les cellules en division. Cette hypothèse est par ailleurs étayée par les travaux de Walne et Mann (1975) sur des huîtres creuses *C. gigas* provenant des côtes du nord de la Grande-Bretagne. Ces huîtres se caractérisent par une croissance de chair (somatique) faible d'octobre à mars, puis très importante en avril, avant de décliner à partir de mai-juin, en relation avec la maturation de la gonade et la formation de la coquille de juin à septembre. La croissance de chair et la reproduction semblent donc être deux processus antagonistes, ce qui se traduit par un détournement des métabolites de la croissance au profit de la production de gamètes, comme cela a été décrit chez la limnée *Lymnaea stagnalis* (Geraerts, 1976 a et b).

Les cellules du bord du manteau participent donc à deux processus physiologiques indispensables à la croissance de l'huître, la croissance des tissus mous par une activité de prolifération cellulaire en avril, et la croissance de la coquille par une forte production de protéines en période estivale de pousse coquillière.

Effet de l'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines des cellules du bord du manteau .

L'effet biologique de l'IGF-1 rh sur le métabolisme protéique des cellules du bord du manteau a fait l'objet d'un suivi au cours du cycle biologique pour une gamme de concentration allant de 10^{-13} à 10^{-7} M.

Il est apparu que l'IGF-1 rh exerce un effet activateur à 10^{-11} M sur la synthèse de protéines au cours du mois de septembre (activation de 47%), et au cours des mois de janvier (13%), mars (57,5%) et avril (14%). En septembre, l'activation est en fait obtenue pour une large gamme de concentration avec une activation maximale de 56% pour 10^{-10} M d'IGF-1 rh. A cette date, le taux de croissance de la coquille est maximal. En janvier, l'activation reste faible quelle que soit la concentration en IGF-1 rh, alors que pour les mois de mars et avril, l'activation est plus importante, respectivement 57,5% et 51%, pour des concentrations allant de 10^{-12} à 10^{-10} . Toutefois, au mois d'avril, la synthèse de protéines est accompagnée d'une importante multiplication des cellules, et semble de ce fait plutôt être associée aux processus de croissance de la chair.

Chez *C. gigas*, l'IGF-1 rh semble ainsi stimuler les synthèses de protéines dans les cellules du bord du manteau en relation avec les processus de croissance de la chair (avril) et de formation de la coquille (septembre). Ces résultats sont par ailleurs en accord avec des travaux précédemment menés sur d'autres espèces d'Invertébrés.

Chez les Mollusques, les molécules de type insuline/IGF stimulent la croissance de nombreux types cellulaires (croissance des tissus mous). En effet, chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*, l'IGF-1 humain stimule l'incorporation de leucine tritiée dans les protéines synthétisées par les cellules du bord du manteau et de la glande digestive participant ainsi aux mécanismes de croissance et de régénération de ces tissus (Giard *et al.*, 1998). L'effet d'insuline de Vertébrés sur l'activation de la synthèse de protéines de cellules du bord du manteau a également été rapporté chez *Helisoma duryi* (Sevala *et al.*, 1993) et *Pecten maximus* (Giard *et al.*, 1998). Le métabolisme protéique d'autres types cellulaires tels que les hémocytes de l'ormeau *Haliotis tuberculata* est également activé par les molécules de la famille des insulines/IGFs (Lebel *et al.*, 1996).

Par ailleurs, chez *Lymnaea stagnalis* (van Minnen et Schallig, 1990), *Planorbarius corneus* (Sonetti *et al.*, 1992) et *Helix aspersa* (Gomot *et al.*, 1992), des

molécules de type insuline/IGF ont été mises en évidence par immunocytologie au niveau de cellules neurosécrétrices impliquées entre autre dans la croissance. Chez la limnée, ces molécules participeraient à la croissance des neurites donc au développement du système nerveux central (Kits *et al.*, 1990). Chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Chen *et al.*, 1996) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Grégoire *et al.*, 1998 ; Kawano *et al.*, 2000), ces substances seraient également impliquées dans le développement embryonnaire, larvaire, et de l'adulte, et notamment chez la drosophile dans la mise en place et le développement du système nerveux central (Pimentel *et al.*, 1996).

Chez les Mollusques, les molécules de type insuline/IGF interviennent également dans le processus de la formation de la coquille. En effet, chez la limnée *Lymnaea stagnalis*, Saleuddin et collaborateurs (1992) ont mis en évidence une stimulation de la croissance de la coquille par l'insuline porcine, et la stimulation par l'insuline porcine et l'IGF-2 de l'incorporation d'une grande quantité d'acides aminés dans le manteau pour des escargots à faible croissance (Saleuddin *et al.*, 1984). Les mécanismes de croissance de la coquille et la présence de molécules apparentées aux insulines/IGFs dans ces processus ont également été étudiés chez l'escargot *Helisoma duryi* (Kunigelis et Saleuddin, 1985 ; Saleuddin *et al.*, 1992 ; Sevala *et al.*, 1993). Les ganglions cérébroïdes d'un escargot à croissance rapide stimulent le taux de dépôt de la coquille d'escargots à croissance lente (Kunigelis et Saleuddin, 1985). Les cellules neurosécrétrices (MDCs) localisées au niveau de ces ganglions semblent d'ailleurs être impliquées dans les processus de réparation de la coquille, puisque la quantité de neurosécrétions fluctue en réponse aux dommages de la coquille (Dillaman *et al.*, 1976). Or les MDCs sont des homologues des LGCs de *Lymnaea stagnalis* qui produisent des molécules de type insuline/IGF (Saleuddin *et al.*, 1992). Une immunoréactivité à l'anticorps anti-insuline porcine a d'ailleurs été détectée au niveau des MDCs (Saleuddin *et al.*, 1992). De plus, l'hémolymphe d'*Helisoma duryi* contient des peptides apparentés à l'insuline et leur taux varie pendant la période de régénération ou de croissance de la coquille (Sevala *et al.*, 1993). Ces données suggèrent que des molécules de type insuline/IGF participent à la croissance et/ou à la régénération de la coquille d'*Helisoma duryi*. Elles agissent probablement au niveau des cellules périostracales et de l'épithélium externe du bord du manteau (Figure II.15), de façon à assurer la formation du périostracum et des composants protéiques de la coquille (Dogterom et Jentjens, 1980), ainsi que le maintien d'une forte concentration de protéine de liaison du calcium indispensable au transport du calcium de la cavité palléale vers le bord du manteau (Dogterom et Doderer, 1981).

Effet de l'IGF-1 rh sur la prolifération des cellules du bord du manteau.

Toutefois, si les résultats obtenus sur les cellules du bord du manteau de *C. gigas* montrent un effet activateur de l'IGF-1 rh sur les synthèses de protéines en période de croissance somatique, aucune activation significative de la multiplication des cellules du bord du manteau n'a été observée pour des concentrations d'IGF-1 rh allant de 10^{-13} M à 10^{-8} M. Seule la concentration d'IGF-1 rh de 10^{-7} M, permet d'obtenir quelques très faibles activations.

En juillet et en septembre, alors que le niveau de base de la synthèse d'ADN reste relativement important, une activation de l'ordre de 7 à 9,5% est observée. La multiplication de cellules à cette période pourrait refléter une activité de croissance somatique parallèle à la croissance de la coquille.

Une autre période d'activation de la prolifération des cellules du bord du manteau est obtenue au cours du mois de décembre (30%).

Ces résultats, significatifs pour le mois de décembre, ne permettent donc pas d'affirmer l'implication des molécules de la famille de l'IGF-1 dans le processus de prolifération cellulaire associé à la croissance (hyperplasie).

Dans la littérature, peu d'études rapportent un effet de molécules de type insuline/IGF sur les multiplications de cellules somatiques. Chez les Mollusques, seuls les travaux de Plisetskaya et Deyrup-Olsen (1987) sur la limace *Prophysaon foliatum* relatent le rôle de ces substances dans le processus de régénération de la queue.

En conclusion, l'étude de l'effet de l'IGF-1 rh sur les cellules du bord du manteau montre une nette implication des molécules de la famille des insulines/IGFs sur les synthèses de protéines associées à la période de forte croissance de la chair, ainsi qu'au cours de la période de formation de la coquille.

La mise en évidence d'un effet de l'IGF-1 rh sur les métabolismes associés aux processus de reproduction et de croissance, suggère donc l'existence de récepteurs capables de lier les molécules de cette famille chez l'huître *C. gigas*. De plus, la saisonnalité de ces effets biologiques pourrait refléter des variations du nombre de récepteurs exprimés à la

surface membranaire des cellules cibles, ainsi que des différences de spécificité et d'affinité entre récepteur(s) et ligand(s).

A l'heure actuelle, aucun ligand homologue n'a pu être identifié chez *C. gigas*, du fait de difficultés liées d'une part à son anatomie (présence d'une coquille fermée et difficultés à identifier et à prélever les centres nerveux) et d'autre part à la faible conservation de séquences chez les Invertébrés qui limite les possibilités de réaliser des sondes moléculaires. Aussi, pour confirmer l'existence et l'effet de molécules de la famille des insulines/IGFs chez l'huître, une alternative a consisté à identifier des récepteurs aux molécules de cette famille par la technique du déplacement de la liaison de l'IGF-1 rh au niveau des types cellulaires pour lesquels un effet biologique *in vitro* de l'IGF-1 rh a été obtenu.

Mise en évidence d'un récepteur liant l'IGF-1 rh.

La mise au point des conditions d'expérimentation a été effectuée à partir de membranes d'animaux entiers de façon à obtenir une liaison suffisamment élevée facilitant l'étude du déplacement de la liaison. Ce déplacement se déroule au cours d'une incubation de 4 heures effectuée à 4°C. Cette basse température permet de limiter la dégradation de l'IGF-1 rh ainsi que la régulation rétroactive ("down-regulation") des récepteurs due à la dégradation ou à l'internalisation du récepteur après la liaison du ligand, et entraîne de ce fait une formation limitée de liaison non spécifique. Le temps d'incubation de 4 heures permet d'obtenir un maximum de liaison spécifique sans dégradation du récepteur et du ligand. Des conditions d'expérimentation similaires sont par ailleurs retrouvées pour l'étude de récepteurs à l'insuline chez le saumon (Gutiérrez et Plisetskaya, 1991) et de récepteurs à l'insuline chez la tortue (Turyn *et al.*, 1986).

Des récepteurs capables de lier l'IGF-1 rh ont ensuite été recherchés au niveau de membranes plasmiques de cellules du bord du manteau et de gonade, ainsi qu'au niveau de membranes de cellules de palpes labiaux, pour lesquelles des effets de type insuline sur le métabolisme glucidique et notamment au niveau du transport du glucose dans la cellule ont été démontrés (Laisney, 2000). Un déplacement de la liaison de l'IGF-1 rh a été obtenu à partir de ces différents tissus. Les membranes des bords de manteau, de gonade et de palpes labiaux, présentent un taux de liaison spécifique similaire, respectivement 29%, 25% et 25%.

Une liaison spécifique du même ordre est retrouvée pour les récepteurs à l'IGF-1 dans les muscles de tortue (21%) (Párrizas *et al.*, 1995a), du cerveau de carpe (32%) (Leibush *et al.*, 1996b) et du tissu adipeux de truite (22,3%) (Planas *et al.*, 2000). Chez les Vertébrés inférieurs jusqu'aux amphibiens et les Invertébrés, le taux de liaison spécifique est généralement moins important pour l'insuline (autour de 10%) que pour l'IGF-1 (autour de 20%) (Hainaut *et al.*, 1991 ; Janicot *et al.*, 1991 ; Gutiérrez *et al.*, 1993 ; Párrizas *et al.*, 1995 a et b ; Baños *et al.*, 1997 ; Maestro *et al.*, 1997 ; Planas *et al.*, 2000).

Par ailleurs, la liaison spécifique de l'IGF-1 rh au niveau des membranes d'animaux entiers (40%) est plus importante que celles obtenues sur les préparations de membranes d'un organe isolé (25 à 29%). Cela peut être le reflet de variations saisonnières de la liaison spécifique au niveau des différentes préparations de membranes. En effet, la liaison spécifique des membranes d'animaux entiers a été obtenue au mois d'avril, période de vitellogénèse des cellules germinales et de croissance de la chair, ce qui se traduit probablement par une forte expression de récepteurs de type insuline/IGF-1. Les liaisons spécifiques ont été mesurées en janvier pour les membranes de bords de manteau et en octobre pour la gonade. Or, ces dates ne correspondent pas à des périodes de croissance somatique ou de gamétogénèse importantes. Quant à la liaison spécifique des palpes labiaux, celle-ci a été obtenue au mois de mars lorsque l'effet des molécules de type insuline/IGF diminue au niveau du tissu de réserve (Laisney, communication personnelle). Les expériences de déplacement de liaison de l'IGF-1 rh ne semblent donc pas avoir été réalisées pour les périodes où l'expression des récepteurs liant l'IGF-1 rh est la plus importante. Afin d'affiner cette première approche, il serait nécessaire de comparer les pourcentages de liaison spécifique sur animaux entiers ou sur organes isolés à partir d'un même lot d'animaux prélevés à la même date. Il conviendrait donc de reprendre ces expériences au cours d'un suivi saisonnier de la liaison spécifique de l'IGF-1 rh de façon à corrélérer le niveau de l'expression des récepteurs aux effets biologiques de l'IGF-1 rh observés sur ces différents tissus.

Néanmoins, les caractéristiques de la liaison de l'IGF-1 rh ont été précisées à partir de membranes d'animaux entiers pour lesquelles les plus fortes liaisons totale et spécifique ont été obtenues. Bien que le nombre de données mesurées soit insuffisant pour obtenir un tracé précis de la liaison, une représentation de Scatchard a tout de même été réalisée. D'après cette représentation, la liaison de l'IGF-1 rh se traduirait par une courbe décomposable en deux parties linéaires. Cette situation met en évidence l'existence de deux sites de liaison différents qui peuvent soit être portés par des récepteurs différents, soit être associés à un seul type de

récepteur capable de lier des ligands différents avec des affinités différentes. Chez les Vertébrés deux principaux types de récepteurs aux molécules de la famille des insulines/IGFs existent : le récepteur à l'insuline et le récepteur à l'IGF-1. Ces deux récepteurs peuvent lier les deux ligands mais présentent des affinités différentes selon qu'ils lient de l'insuline ou de l'IGF-1.

Chez les Invertébrés, la situation semble totalement différente puisque, chez toutes les espèces où les récepteurs ont été étudiés, un seul récepteur a été identifié, que ce soit chez les mollusques gastéropodes *Lymnaea stagnalis* (Roovers *et al.*, 1995) et *Biomphalaria glabrata* (Lardans *et al.*, 2001), chez les insectes *Drosophila melanogaster* (Fernandez-Almonacid et Rosen, 1987) et *Bombyx mori* (Lindstrom-Dinnetz et Iatrou, 1999), ou chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Kimura *et al.*, 1997). Or, chez *Lymnaea stagnalis* (MIPs), *Bombyx mori* (bombyxines) et *Caenorhabditis elegans* (ILPs), plusieurs molécules ligands ont été caractérisées ou purifiées. Par conséquent, le récepteur unique identifié chez ces espèces doit pouvoir lier ces différents ligands, qui peuvent être très divergents comme c'est le cas pour les MIPs. Le récepteur des Invertébrés pourrait donc présenter plusieurs sites de liaison avec probablement également des affinités différentes pour les ligands.

Chez *C. gigas*, l'existence sur un récepteur probablement unique, comme chez les autres Invertébrés, de deux sites de liaison d'affinités différentes, l'un de forte affinité et de faible capacité ($K_d = 0,01 \text{ nM}$ et $B_{\text{max}} = 246 \text{ fmol.mg}^{-1}$ de protéines) et l'autre de moins forte affinité et de forte capacité ($K_d = 0,12 \text{ nM}$ et $B_{\text{max}} = 1380 \text{ fmol.mg}^{-1}$ de protéines), confirmerait cette hypothèse. Toutefois, chez l'huître, les deux constantes de dissociation de la liaison de l'IGF-1 rh au récepteur sont du même ordre (10^{-11} - 10^{-10} M) et caractériseraient plutôt deux sites de liaison de forte affinité (Gutiérrez *et al.*, 1994). Le récepteur de *C. gigas* pourrait donc en fait lier avec une forte affinité des molécules différentes, ce qui là encore va dans le sens de l'existence de plusieurs ligands chez les Invertébrés.

D'ailleurs, la présence de ces deux sites de liaison d'affinités différentes peut être mise en parallèle avec les concentrations actives de l'IGF-1 rh lors des tests biologiques *in vitro*. En effet, l'IGF-1 rh et donc les molécules de type insuline/IGF semble exercer deux types d'effets biologiques mais à des concentrations différentes pouvant ainsi traduire l'existence de deux sites de liaison différents. Une forte concentration d'IGF-1 rh (10^{-7} M), nécessaire pour une activation de la prolifération des cellules, pourrait signifier une faible affinité de la liaison de l'IGF-1 rh au niveau du récepteur. Des concentrations d'IGF-1 rh beaucoup plus faibles (de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-11} M) activent les synthèses de protéines des cellules et pourraient correspondre à une affinité plus forte du récepteur pour l'IGF-1 rh.

Néanmoins, une autre explication peut être apportée quant à la présence de deux sites de liaison de forte affinité. En effet, si le récepteur présent chez *C. gigas* est un récepteur de type insuline, comme suggéré par les récepteurs précédemment identifiés chez les Invertébrés, il pourrait être soumis, de la même manière que les récepteurs à l'insuline de Vertébrés, à un phénomène de coopérativité négative. Ce mécanisme de protection empêche une réponse trop importante lorsque l'hormone est en excès. L'affinité du récepteur n'est alors pas fixe, diminuant parallèlement à l'augmentation du nombre de sites de liaison occupés. L'affinité est élevée lorsque la plupart des sites de liaison sont inoccupés et plus faible lorsque tous les sites sont occupés (De Myets et Roith, 1975). Dans ce cas de figure, il n'y aurait donc en fait qu'un seul site de liaison au niveau du récepteur unique comme démontré chez *Helix aspersa* (Saavedra *et al.*, 1989) et *Aplysia californica* (Jonas *et al.*, 1996). Cependant, ces résultats ne vont pas aller dans le sens de l'existence de plusieurs ligands (Smit *et al.*, 1998, pour revue ; Grégoire *et al.*, 1998 ; Duret *et al.*, 1998 ; Kawano *et al.*, 2000 ; Nagasawa *et al.*, 1986 ; Kawakami *et al.*, 1989 ; Adashi *et al.*, 1989 ; Iwami *et al.*, 1990 ; Yoshida *et al.*, 1998).

Le site de moins forte affinité est caractérisé par une $K_d = 0,12$ nM qui correspond aux données retrouvées dans la littérature. En effet, chez *Helix aspersa*, le récepteur de type insuline identifié au niveau des muscles et des ganglions cérébraux présente un site de liaison avec une affinité $K_d = 0,13$ et $0,14$ nM et une capacité de liaison $B_{max} = 157$ à 105 fmol.mg⁻¹ de protéines d'après Saavedra *et al.* (1989) et Leibush *et al.* (1996a). Chez les Vertébrés primitifs tels que la myxine, les récepteurs présentent une constante de dissociation qui varie de $0,06$ à $0,15$ nM au niveau du foie ou de $0,1$ à $0,28$ nM au niveau du cerveau (Drakenberg *et al.*, 1993). Chez la grenouille, le récepteur à l'insuline exprimé dans le muscle présente une $K_d = 0,16$ nM (Párrizas *et al.*, 1995a), et chez la carpe, le récepteur à l'insuline et le récepteur à l'IGF-1 du muscle squelettique ont des constantes de dissociation respectives de $0,15$ nM et $0,092$ nM (Baños *et al.*, 1997). Chez les Mollusques bivalves, seule une liaison de type IGF-1 a été rapportée au niveau des muscles de *Mytilus edulis* avec une $K_d = 0,35$ nM et $B_{max} = 85$ fmol.mg⁻¹ de protéines (Leibush *et al.*, 1996). Les constantes de cette liaison s'écartent toutefois sensiblement de celles obtenues chez *C. gigas* ou chez les Mollusques gastéropodes.

Le site de plus forte affinité obtenu chez *C. gigas*, soulève quant à lui des questions. En effet, ce site présente une très forte affinité ($K_d = 0,01$ nM, en première approximation) pour l'IGF-1 rh hétérologue, supérieure à l'affinité de l'IGF-1 pour les récepteurs de Vertébrés, où la K_d varie entre $0,8$ (ovocytes de xénope) et $0,13$ (cerveau de carpe) (Navarro

et al., 1999, pour revue). Il sera donc indispensable de reprendre ce premier essai de caractérisation de la liaison afin de préciser les constantes de ce site.

Toutefois, il n'en reste pas moins que ces premières données mettent en évidence l'existence d'un récepteur aux molécules de type insuline/IGF au niveau des tissus pour lesquels des effets biologiques de type IGF-1 ont été obtenus chez *C. gigas*. Toutefois, les caractéristiques de la liaison restent à confirmer et à affiner. Une étude plus approfondie du nombre de sites de liaison, de leur spécificité et de leur capacité de liaison, pourra notamment être réalisée à partir de récepteurs issus de sous-fractions cellulaires afin de disposer de récepteurs semi-purifiés. Le déplacement de la liaison de l'IGF-1 pourra également être envisagé à partir de plusieurs molécules ligands telles que l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2 de plusieurs espèces plus ou moins éloignées phylogénétiquement. A la suite de ces divers déplacements de liaison, une nouvelle représentation de Scatchard pourra être réalisée à partir d'un plus grand nombre de données, afin de caractériser plus finement l'affinité et la capacité des sites de liaison du récepteur présent chez *C. gigas*.

L'ensemble des données obtenues au cours de ce chapitre (effets biologiques et récepteurs) indique l'existence chez *C. gigas* d'un système ligand-récepteur de type insuline/IGF impliqué dans des processus de régulation multiples.

Chez les Vertébrés, l'insuline exerce des actions métaboliques à court terme tandis que l'IGF-1 intervient dans le contrôle de la croissance et du développement. Toutefois, les molécules d'insuline et d'IGF-1 peuvent également interagir avec l'un ou l'autre des récepteurs, avec des affinités différentes, en fonction du type de récepteur majoritaire, de la concentration des différents ligands, ou bien encore du tissu cible ou du stade de développement. Ainsi chez le xénope *Xenopus laevis*, l'IGF-1 peut interagir avec le récepteur à l'insuline lors des stades fœtal et post-natal et ainsi exercer des fonctions métaboliques (Janicot *et al.*, 1991). A noter que chez les mammifères, les effets mitogènes au niveau des stades précoces de développement sont assurés par un autre récepteur, le récepteur à l'IGF-2, dont l'émergence correspond à l'évolution des Vertébrés en mammifères (Drakenberg *et al.*, 1993).

Chez les poissons, amphibiens et reptiles, le récepteur à l'IGF-1 est plus abondant que le récepteur à l'insuline avec un ratio Rins/RIGF-1 inférieur à 1, contre 2 à 2,5 chez les mammifères et les oiseaux (Párrizas *et al.*, 1995a). Le récepteur à l'IGF-1 est également plus

spécifique et présente une plus grande affinité et une activité intrinsèque plus élevée que le récepteur à l'insuline de la même espèce ou des récepteurs à l'IGF-1 de Vertébrés plus évolués (Hainaut *et al.*, 1991 ; Gutiérrez *et al.*, 1993,1995 ; Párrizas *et al.*, 1995 a et b ; Navarro *et al.*, 1999 ; Planas *et al.*, 2000). Chez les Vertébrés inférieurs, le récepteur à l'IGF-1 assure d'ailleurs de nombreuses fonctions dont des actions métaboliques assurées plus tard dans l'évolution par le récepteur à l'insuline (Párrizas *et al.*, 1995a).

Récemment, chez les Invertébrés protostomiens, *Helix aspersa* et *Mytilus edulis*, une liaison de l'IGF-1 beaucoup plus importante que la liaison de l'insuline a été obtenue au niveau des muscles (Leibush *et al.*, 1996), suggérant ainsi une apparition précoce de récepteurs de type IGF-1 dans l'évolution (Navarro *et al.*, 1999).

Chez *C. gigas*, l'activation par l'IGF-1 rh des processus métaboliques associés à la reproduction et à la croissance (avec probablement d'importantes variations saisonnières), associée à la mise en évidence d'une liaison de type IGF, suggère l'existence de molécules de la famille des insulines/IGFs chez les bivalves. Ces molécules exerceraient alors des effets pléiotropes.

Ces données suggèrent donc que les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 ont subi des changements quantitatifs et qualitatifs, traduisant probablement également des changements qualitatifs de l'insuline et de l'IGF-1, au cours de l'évolution. Ces changements pourraient être liées à des modifications environnementales et physiologiques qui auraient conduit les molécules de type insuline/IGF à évoluer de la pléiotropie vers la spécialisation d'action que l'on observe chez les Vertébrés supérieurs.

Chapitre III :

**Caractérisation et expression
d'un récepteur homologue de type insuline**

I. INTRODUCTION

Jusqu'à présent, chez les Invertébrés, peu de molécules de la famille des insulines/IGFs ont été séquencées. Il s'agit chez les Insectes, des bombyxines de *Bombyx mori* (Nagasawa *et al.*, 1984, 1986 ; Adachi *et al.*, 1989 ; Iwami *et al.*, 1989 ; Kondo *et al.*, 1996 ; Tsuzuki *et al.*, 1997 ; Yoshida *et al.*, 1997, 1998) et de molécules apparentées aux bombyxines chez *Agrius convolvuli* (ABRPs) et *Samia cynthia ricini* (SBRPs) (Iwami *et al.*, 1996a ; Nagata *et al.*, 1999), et du LIRP chez *Locusta migratoria* (Lagueux *et al.*, 1990 ; Kromer-Metzger et Lagueux, 1994), chez les Mollusques, des molécules MIPs de *Lymnaea stagnalis* (Smit *et al.*, 1988 ; Smit *et al.*, 1998, pour revue) et d'une molécule apparentée à l'insuline chez *Aplysia californica* (Floyd *et al.*, 1999), et chez le nématode *Caenorhabditis elegans* des ILPs (Grégoire *et al.*, 1998 ; Kawano *et al.*, 2000).

Chez le Mollusque bivalve *Crassostrea gigas*, la mise en évidence d'effets biologiques de molécules de la famille des insulines/IGFs sur les métabolismes associés notamment à la reproduction et à la croissance, ainsi que d'une liaison de type IGF-1 au niveau des tissus cibles, suggèrent l'existence d'un système ligand-récepteur de type insuline/IGF. Toutefois, aucune molécule de la famille n'a encore pu être caractérisée chez *C. gigas* ni chez aucun autre bivalve, probablement du fait d'une importante divergence des molécules d'Invertébrés avec les molécules de Vertébrés mais également entre elles, rendant difficiles les stratégies d'identification et de purification basées sur l'utilisation de sondes moléculaires (mais aussi immunologiques).

En effet, si les molécules de type insuline d'Invertébrés partagent une remarquable conservation de la structure tertiaire des insulines/IGFs (formation d'un centre hydrophobe et repliement) et de l'organisation du précurseur, elles présentent par ailleurs une importante diversité au niveau de leur structure primaire comme l'attestent au niveau génétique les comparaisons entre séquences des familles de gènes multiples des Invertébrés. En outre, en parallèle de ces familles de gènes relativement divergents chez les Invertébrés, la présence exclusive d'un seul type de récepteur apparenté au récepteur à l'insuline semble se confirmer chez les différentes espèces étudiées. Ce récepteur unique, capable de lier des ligands multiples, serait impliqué dans une importante diversité de fonction. Ces données suggèrent donc que les différents ligands pourraient agir via plusieurs voies de signalisation, en se liant au récepteur unique avec des affinités différentes.

Comme pour les molécules ligands, peu de récepteurs aux molécules de type insuline/IGF ont été caractérisés chez les Invertébrés. A l'heure actuelle, seuls 8 récepteurs de type insuline ont été identifiés chez les Insectes, *Drosophila melanogaster* (Petruzzelli *et al.*, 1986 ; Nishida *et al.*, 1986 ; Ruan *et al.*, 1995), *Aedes aegypti* (Graf *et al.*, 1997) et *Bombyx mori* (Lindstrom-Dinnetz et Iatrou, 1997, non publié), les Mollusques, *Lymnaea stagnalis* (Roovers *et al.*, 1995) et *Biomphalaria glabrata* (Lardans *et al.*, 2001), le nématode *Caenorhabditis elegans* (Kimura *et al.*, 1997), le cnidaire *Hydra vulgaris* (Steele *et al.*, 1996), et le spongiaire *Geodia cydonium* (Schacke *et al.*, 1994).

Ces récepteurs présentent tous une relative conservation de séquence notamment au niveau de leur domaine catalytique à activité tyrosine kinase, impliqué dans l'autoactivation du récepteur et dans la transmission du signal. D'ailleurs, la plupart des études qui visent à caractériser les récepteurs de type insuline/IGF-1 sont basées sur cette homogénéité de séquences.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre réside en la caractérisation moléculaire d'un récepteur apparenté aux récepteurs à l'insuline et aux IGFs chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. A l'aide d'amorces oligonucléotidiques dégénérées déduites de régions consensuelles du domaine tyrosine kinase des récepteurs de la superfamille des insulines/IGFs, une RT-PCR a été réalisée sur des ARNm de différents tissus d'huître adulte. Un fragment de récepteur de type insuline, nommé CIR (*Crassostrea gigas* insulin receptor-related receptor), a ainsi été obtenu. Le précurseur de CIR a ensuite été recherché par différentes stratégies (5' et 3' RACE-PCR, criblage d'une banque d'ADNc). La séquence partielle du précurseur est ensuite analysée et comparée avec les récepteurs de type insuline identifiés chez les Invertébrés, le récepteur de type insuline de l'amphioxus et des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 de Vertébrés. Enfin, l'étude de l'expression du récepteur CIR a été réalisée pour divers tissus adultes et différents stades larvaires, afin d'aborder la fonction du récepteur CIR et donc des molécules apparentées aux insulines/IGFs chez *C. gigas*.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Caractérisation du précurseur du récepteur endogène.

1.1. *Animaux.*

Les huîtres adultes proviennent d'une exploitation ostréicole normande (Manche) et les larves en cours de développement de l'écloserie "SATMAR" de Barfleur (Manche). Les tissus adultes et les larves sont immédiatement congelés dans l'azote liquide puis conservés à -70°C en vue de l'extraction des ARN, ou bien fixés dans une solution de 1X PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,6 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5mM)/ paraformaldéhyde 4% en vue de l'hybridation *in situ*.

1.2. *Amorces oligonucléotidiques utilisées (5' → 3').*

Amorces dégénérées utilisées pour la RT-PCR

IR1 CTT YGG NAT GGT NTA YGA RGG
IR3 CGT CAT NCC RAA RTC NCC RAT YTT
(avec Y = C+T ; N = A+C+G+T ; R = A+G)

Amorces spécifiques utilisées pour la 5' et 3' RACE-PCR (Marathon)

Gsp1 GGG GGT TGC TAG GGA CCT GTA TGG TAA AG
Gsp2 CGT CAT GCC GAA GTC GCC AAT CTT GAC AG
NGsp1 TTG CTA GGG GTG GTC TCC GAC GGA CAG
NGsp2 GCC GTC AGC TAT TTC CCC TGC CAT TTG
AP1 CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
AP2 ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC

Amorces spécifiques utilisées pour contrôler le criblage de la banque d'ADNc de bord du manteau

β 1 GCT AGG GAC CTG TAT GGT AAA GGA GGG
 β 2 CCT CTT CCA CCG GTC GAT GCA TCC

Amorces spécifiques utilisées pour la 5'RACE-PCR

RT-CIR	ATC TCC CCT CCT TAA CC
CIR	GCA ACC CCT TCA TAC ACC ATA CC
NCIR	GAC CCT TGA CCT AGT TCA CGG
85CIR	GTG ATA TTG GAG AAT TTG CGG CG
AAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG
AUAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC

(avec I = Inosine)

Amorces utilisées pour le séquençage

"M13 Universal"	GTA AAA CGA CGG CCA GT
"M13 reverse"	CAG GAA ACA GCT ATG AC
β 3	GGT AAG GCG TTG TTA CCG G
β 4	GGA TTA CTA CCC TCC CGG C
β 6	GGA GGG TAG TAA TCC TCC CC
β 7	TTG AGT ACA TTG AGG AGG G

1.3. Extraction des ARN.

1.3.1. Extraction des ARN totaux.

1.3.1.1. Tissus adultes.

L'extraction des ARN totaux de tissus adultes est réalisée selon le protocole décrit par Chomcynski et Sacchi (1987). Les tissus, coupés en morceaux, sont broyés dans l'azote liquide. Afin de séparer les protéines et l'ADN, l'homogénat est repris dans 1 volume de solution dénaturante (isothiocyanate de guanidium 4 M, citrate de sodium 25 mM pH 7 et N-lauroylsarcosine 0,5% (p/v)) additionnée de β -mercaptoéthanol 0,7% (v/v), et dans 0,1 volume d'acétate de sodium 2 M pH 4, 1 volume de phénol saturé en eau non tamponné et 0,2 volume de chloroforme:alcool isoamylique (49:1). Après 15 minutes dans la glace, l'homogénat est centrifugé (10000g, 20 minutes, 4°C). La phase aqueuse est soumise à une seconde extraction au phénol:chloroforme:alcool isoamylique, identique à la précédente, afin d'améliorer la pureté des ARN, puis elle est précipitée dans un volume équivalent d'isopropanol pendant 60 minutes à -20°C. Après centrifugation (10000g, 20 minutes, 4°C), le culot d'ARN est repris dans un volume minimum (0,2%) d'eau traitée au DEPC (DiEthylPyroCarbonate) et précipité dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et

3 volumes d'éthanol 95% pendant 60 minutes à -70°C . Après centrifugation (10000g, 20 minutes, 4°C), le culot est rincé à l'éthanol 75% puis 95%, séché et remis en suspension dans un volume minimum (0,2%) d'eau DEPC.

1.3.1.2. Ovocytes et larves.

L'extraction des ARN totaux d'ovocytes et larves à différents stades de développement est réalisée dans du réactif TriReagent™ (Sigma®). Après broyage dans l'azote liquide, les ovocytes et les stades larvaires sont homogénéisés pendant 5 minutes à température ambiante dans du TriReagent (1 ml pour 100 mg de tissu) afin de dissocier les complexes nucléoprotéiques. Après l'ajout de 0,2 volume de chloroforme et centrifugation (12000g, 15 minutes, 4°C), deux phases sont observées : une phase aqueuse supérieure contenant les ARN et une phase organique contenant les protéines. A l'interphase se trouve l'ADN. La phase aqueuse est prélevée puis précipitée dans 0,5 volume d'isopropanol pendant 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation (12000g, 10 minutes, 4°C), le culot est rincé avec 1 volume d'éthanol 75% par centrifugation (7500g, 5 minutes, 4°C), séché puis repris dans de l'eau DEPC, préchauffée à 55°C - 60°C afin de faciliter la dissolution du culot.

1.3.2. Purification des ARN polyadénylés.

Les ARN polyadénylés sont purifiés à l'aide du kit "Dynabeads mRNA Direct™" (Dyna®). Ce système est basé sur l'hybridation de la queue poly(A⁺) des ARN messagers avec des amorces oligonucléotidiques de 25 déoxythymidines couplées à des billes magnétiques. Les ARN totaux, repris dans un tampon de lyse et de liaison (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, LiCl 0,5 M, EDTA 10 mM, DTT 5 mM), à raison de 500 µl de tampon pour 500 µg d'ARN totaux, sont mis en présence de billes magnétiques oligo-(dT) (500 µl de billes pour 500 µg d'ARN totaux). L'hybridation se déroule à température ambiante pendant 5 minutes. Les ARN couplés aux oligo-(dT) sont capturés à l'aide d'un support aimanté. Le surnageant contenant les ARN non polyadénylés est éliminé. Les billes magnétiques sont rincées à plusieurs reprises dans un tampon de lavage (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, LiCl 0,15 M, EDTA 1 mM). Les ARN polyadénylés sont élués des billes magnétiques au cours d'une incubation de 2 minutes à 65°C dans du tampon d'éluion (Tris-HCl 10 mM pH 7,5) et à l'aide du support aimanté afin de retenir les billes. Le surnageant, contenant les ARN poly(A⁺), est précipité à -70°C dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 3 volumes

d'éthanol 95%. Après centrifugation (14000g, 15 minutes), le culot est lavé à l'éthanol 70% puis 95%, séché et repris dans de l'eau DEPC.

1.4. Amplification par "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction" : RT-PCR.

1.4.1. Transcription inverse.

L'ADNc simple brin est obtenu à partir de 1 à 2 µg d'ARN polyadénylés ou bien de 5 µg d'ARN totaux. La synthèse est réalisée en présence de 200 unités d'une enzyme de transcription inverse, la M-MuLV RT (Promega) qui est une ADN polymérase ARN-dépendante dont l'activité RNase H a été supprimée pour favoriser la synthèse d'ADNc à partir de longues molécules d'ARN. Le volume réactionnel final de 25 µl comprend en outre 0,5 µg d'amorces (oligo(dT) ou spécifique), 25 unités de rRNasin ("recombinant Ribonuclease inhibitor") (Promega), 0,5 mM de chaque dNTP, et le tampon de réaction (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM). La polymérisation se déroule à 37°C pendant 90 minutes puis est stoppée par dilution du mélange réactionnel avec de l'eau bidistillée stérile de façon à obtenir de l'ADNc simple brin à la concentration souhaitée.

1.4.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

L'amplification par RT-PCR est réalisée directement à partir de l'ADNc simple brin, sans purification préalable. La réaction de PCR a lieu dans un volume final de 50 µl contenant 2 à 10 ng d'ADNc, 0,2 mM de chaque dNTP, 50 pmoles de chacune des deux amorces oligonucléotidiques, 2,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 9, 0,01% (v/v) de Triton X-100, et 1 unité de *Taq* ADN polymérase (Eurogentec®). Les produits de l'amplification sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose préparé à une concentration adaptée à la taille des fragments attendus, et dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, pH 8 et EDTA 1 mM) contenant du bromure d'éthidium (10 ng/ml).

1.5. Amplification par la technique de "Rapid Amplification of cDNA Ends - PCR" : RACE-PCR.

1.5.1. La technique de 5' et 3'RACE-PCR par l'ajout d'adaptateurs (kit "Marathon™ cDNA Amplification").

Cette technique est utilisée dans le kit "Marathon™ cDNA Amplification" (Clontech). Elle consiste à amplifier rapidement et simultanément les extrémités 5' et 3' d'un fragment. Elle se déroule en trois étapes : la synthèse d'ADNc double brin à partir d'ARN polyadénylés, la ligation d'adaptateurs aux extrémités des ADNc, et la réaction d'amplification de RACE-PCR proprement dite (**Figure III.1**).

1.5.1.1. Synthèse de l'ADNc.

Un mélange de 2 µg d'ARN polyadénylés de bord du manteau et de 10 pmoles d'amorces oligo(dT) est dénaturé à 70°C pendant 2 minutes afin d'éliminer les structures secondaires. L'amorce oligo(dT) est modifiée à son extrémité 3' de façon à s'hybrider au début de la queue poly(A⁺) de l'ARN polyadénylé matrice. L'élongation du premier brin d'ADNc est initiée lorsque le mélange ARN/oligo(dT) est additionné de 1 mM de chaque dNTP, 20 unités d'enzyme de transcription inverse (AMV-RT), et du tampon de réaction (Tris 50 mM pH 8,5, MgCl₂ 8 mM, KCl 30 mM, DTT 1 mM), dans un volume final de 10 µl. Après 60 minutes à 42°C, la polymérisation est stoppée dans la glace.

La synthèse du brin complémentaire repose sur la méthode décrite par Gubler et Hoffmann (1983). La totalité de la réaction de synthèse de l'ADNc simple brin est additionnée d'un cocktail d'enzymes composé de 1 unité de Rnase H (dégradation de l'ARN des hétéroduplex ARN/ADN), de 24 unités d'ADN polymérase I (synthèse des fragments complémentaires au premier brin d'ADNc à partir des amorces ARN générées par la RNase H), et de 4,8 unités d'ADN ligase d'*Esheria coli* (ligation des fragments complémentaires néosynthétisés par l'ADN polymérase I). A ce mélange, sont ajoutés 0,2 mM de chaque dNTP et le tampon de réaction (KCl 0,1 M, sulfate d'ammonium 10 mM, MgCl₂ 5 mM, β-NAD 150 µM, Tris 20 mM pH 7,5, 0,05 mg/ml d'albumine de sérum de veau). Après une incubation de 90 minutes à 16°C, l'ADNc double brin obtenu est traité en présence de 10 unités de T4 ADN polymérase pendant 45 minutes à 16°C, de façon à générer des extrémités à bouts francs. L'ADNc est purifié par une extraction au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) suivie d'une extraction au chloroforme:alcool isoamylique (24:1), puis

précipité dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 3 volumes d'éthanol 95%. Après centrifugation (14000g, 15 minutes), le culot est lavé à l'éthanol 80%, séché, puis repris dans 10 µl d'eau bidistillée stérile.

1.5.1.2. "Ligation" des adaptateurs.

La ligation d'adaptateurs aux extrémités à bouts francs de l'ADNc s'effectue à 16°C pendant 12 heures. Elle est réalisée sur la moitié de l'ADNc précédemment obtenu, en présence de 20 pmoles d'adaptateurs, du tampon de ligation (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, PEG 5%), et de 400 unités de T4 ADN ligase.

1.5.1.3. Amplification génique *in vitro*.

L'amplification est réalisée à partir de 1/10^{ème} de la banque d'ADNc préparée ci-dessus, avec une amorce spécifique du fragment d'ADNc connu (amorce sens Gsp1 pour la RACE en 3' et amorce antisens Gsp2 pour la RACE en 5') et une amorce spécifique de la séquence de l'adaptateur. Pour chacune des deux réactions de RACE (5' et 3' RACE), le mélange réactionnel contient, dans un volume final de 50 µl, 10 pmoles d'amorce API spécifique de l'adaptateur, 10 pmoles d'amorce spécifique du gène, 0,2 mM de chaque dNTP, du tampon de réaction (Tricine-KOH 40 mM, KOAc 15 mM, Mg(OAc)₂ 3,5 mM, BSA 3,75 µg/ml, Tween-20 0,005% (v/v), Nonidet-P40 0,005% (v/v)), et de 1 µl du mélange d'ADN polymérase "Advantage[®] 2" (activité "proofreading") (Clontech). L'amplification se déroule dans les conditions suivantes : 1 cycle (94°C/30 secondes), 5 cycles (94°C/5 secondes et 72°C/4 minutes), 5 cycles (94°C/30 secondes et 70°C/4 minutes), et 35 cycles (94°C/30 secondes et 63°C/4 minutes). Les produits de l'amplification sont visualisés sur un gel d'agarose à 1%. En présence de "smears" une seconde réaction d'amplification est effectuée avec des amorces internes ("Nested-PCR"). L'amplification est réalisée à partir de l'amplification précédente diluée au 1/10^{ème}, avec 10 pmoles de l'amorce interne AP2 spécifique de l'adaptateur, 10 pmoles de l'amorce interne spécifique du gène (NGsp1 pour la 3'RACE et NGsp2 pour la 5'RACE), le tampon de réaction et les enzymes du "Advantage[®] 2 Polymerase Mix". Les conditions de l'amplification sont alors légèrement plus stringentes : 1 cycle (94°C/1 minute), 5 cycles (94°C/30 secondes et 72°C/4 minutes), 5 cycles (94°C/30 secondes et 70°C/4 minutes), et 30 cycles (94°C/20 secondes et 65°C/4 minutes). Les produits de l'amplification sont visualisés sur un gel d'agarose à 1,5%.

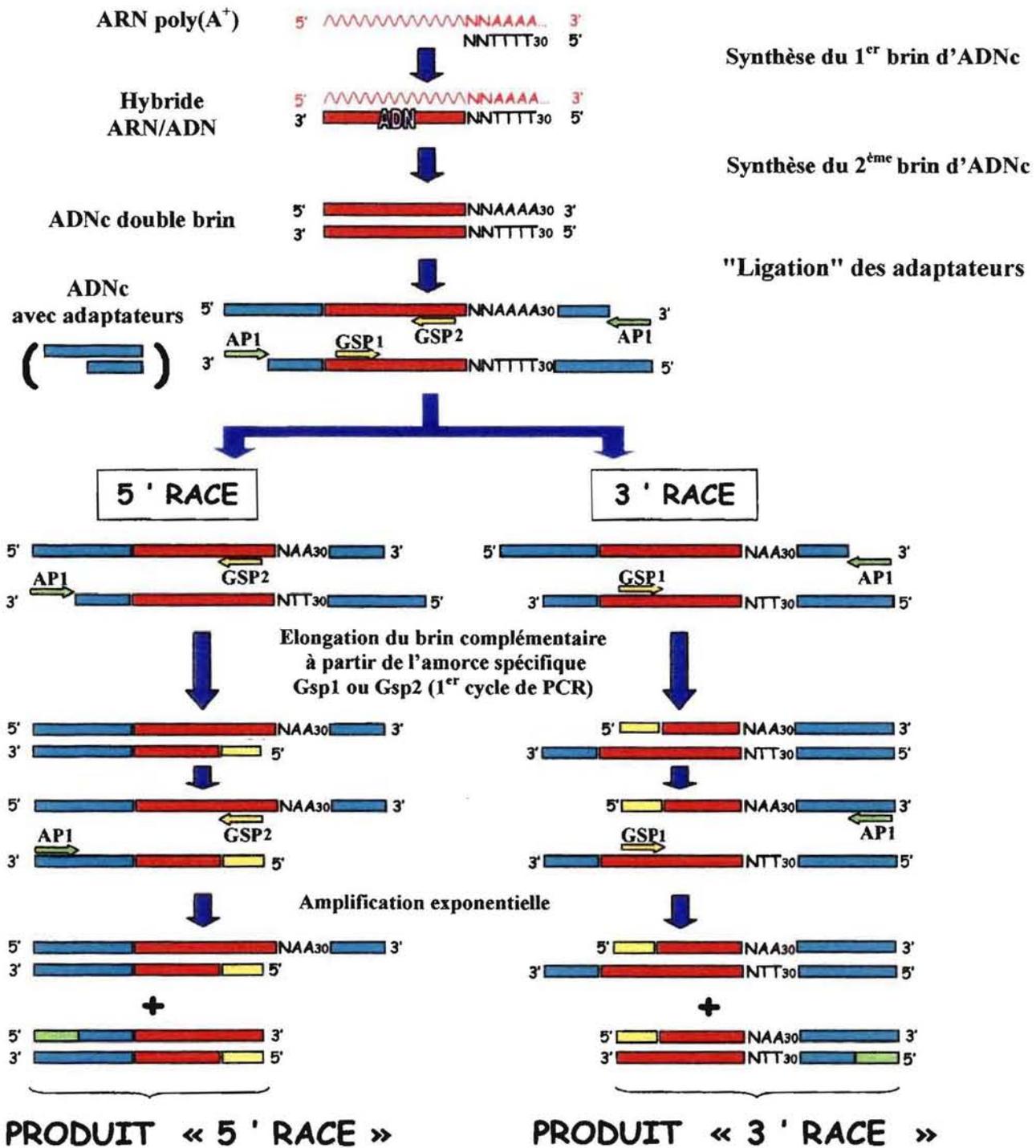


Figure III.1 : Principe de la technique de RACE-PCR d'après le "Marathon cDNA Amplification Kit" (Clontech).

API (Adaptator primer) : amorce spécifique de l'adaptateur.
 GSP1 et GSP2 (Gene Specific Primer) : amorces spécifiques du gène d'intérêt.
 [NNTTTT₃₀] : amorce oligonucléotidique modifiée pour la transcription inverse.

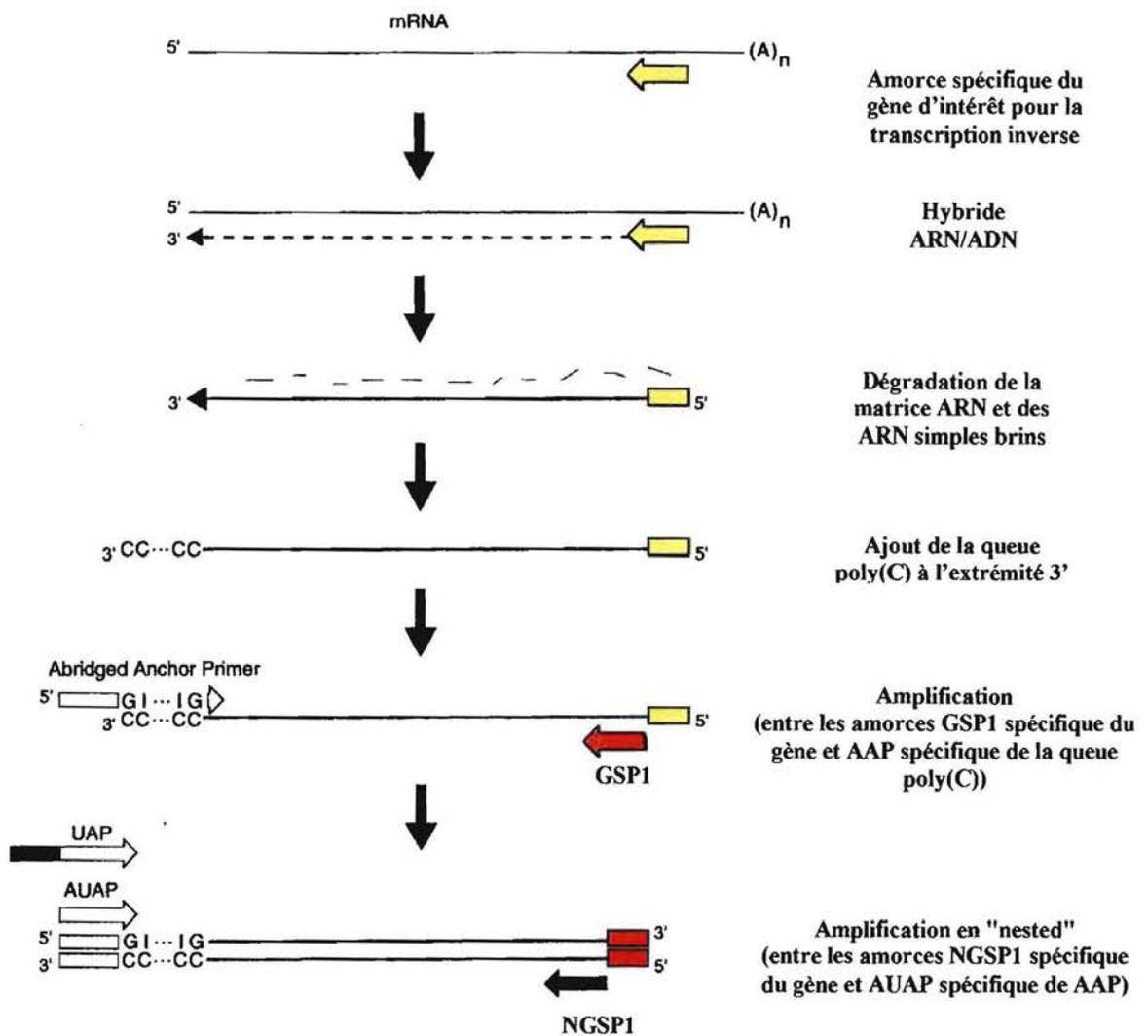


Figure III.2 : Principe de la 5'RACE-PCR (GibcoBRL®).

GSP ("Gene Specific Primer") : amorces spécifiques du gène d'intérêt.

AAP ("Abridged Anchor Primer") : amorce spécifique de la queue poly(C).

AUAP ("Abridged Universal Amplification Primer") : amorce spécifique de l'amorce AAP (pour la réamplification).

1.5.2. La technique de 5'RACE-PCR par l'ajout en 3' d'une queue polycytidinée.

Cette méthode consiste à réaliser la synthèse d'ADNc simples brins auxquels, après purification, est ajoutée une queue polycytidinée à l'extrémité 3' (Frohmann *et al.*, 1988). L'amplification s'effectue entre une amorce spécifique de l'extrémité 5' du fragment d'ADNc connu, située en amont de l'amorce utilisée pour la transcription inverse, et une amorce spécifique de la séquence de la queue polycytidinée. Cette stratégie est développée à partir du kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0" (GibcoBRL®) (Figure III.2).

1.5.2.1. Transcription inverse.

La synthèse d'ADNc simple brin résulte de la transcription inverse de 1 µg d'ARN polyadénylés ou de 2 µg d'ARN totaux, par 200 unités de "SuperScript™ II RT" (GibcoBRL®) en présence de 2,5 pmoles d'amorce spécifique (CIR ou RT-CIR). La réaction a lieu dans un volume final de 25 µl additionné de 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de chaque dNTP, 10 mM de DTT, et du tampon de réaction (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM). La transcription se déroule à 50°C pendant 60 minutes, puis l'enzyme est dénaturée à 70°C pendant 15 minutes. La synthèse de l'ADNc simple brin achevée, l'ARN des hybrides ARN:ADN ainsi que l'ARN simple brin sont éliminés par l'action conjointe des RNases H et T1 au cours d'une incubation de 30 minutes à 37°C.

1.5.2.2. Purification de l'ADNc simple brin.

L'ADNc est purifié à l'aide d'une "cartouche" GlassMax™ ("GlassMax DNA Isolation Spin Cartridge Procedure", GibcoBRL®). En présence d'un agent chaotropique, l'iodure de sodium, les ADNc de taille supérieure à 200 nucléotides se fixent à la membrane de silice de la cartouche, et le tampon, les nucléotides, les enzymes et les oligonucléotides sont éliminés par centrifugation (13000g, 20 minutes). La cartouche est rincée à 4 reprises dans du tampon de lavage, puis de l'éthanol 70%. L'ADNc, purifié, est alors élué par centrifugation (13000g, 20 minutes) en présence de 50 µl d'eau bidistillée stérile préchauffée à 65°C.

1.5.2.3. Synthèse de la queue polycytidinée.

Une queue polycytidinée est ajoutée par la "terminal déoxynucléotidyl transférase" (TdT, GibcoBRL[®]) à l'extrémité 3' des ADNc, afin de créer une région sur laquelle s'hybridera une amorce sens lors de l'étape d'amplification. Cette réaction de "tailing" est réalisée sur 10 µl d'ADNc purifié, dans un milieu réactionnel contenant 10 mM de Tris-HCl pH 8,4, 25 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂ et 0,2 mM de dCTP, et se déroule à 94°C pendant 3 minutes. La réaction de synthèse est initiée lorsque la TdT est ajoutée. Au terme d'une incubation de 10 minutes à 37°C, l'enzyme est inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 minutes.

1.5.2.4. Amplification génique *in vitro*.

L'amplification est réalisée sur 10 µl d'ADNc polycytidiné avec une amorce sens spécifique du transcrit (CIR ou NCIR ou RT-CIR ou 85CIR) et une amorce antisens AAP riche en G lui permettant de se fixer à la queue polycytidinée (en 3' de l'ADNc). Le milieu réactionnel de 50 µl final contient également 20 pmoles de chaque amorce, 0,2 mM de chaque dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, le tampon de réaction (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM), et 2,5 unités de Goldstar *Taq* ADN polymérase (Eurogentec[®]). L'amplification se déroule au cours de 40 cycles (94°C/1 minute ; 50°C/1 minute ; 72°C/3 minutes) et l'élongation des fragments est achevée au cours d'une ultime étape à 72°C pendant 7 minutes. Les produits de l'amplification sont visualisés sur un gel d'agarose à 1,5%. Après une première amplification par CIR, une seconde amplification est réalisée sur 0,5 µl de l'amplification précédente avec les amorces nichées NCIR (antisens) et AUAP (sens) spécifique de l'adaptateur. Les conditions d'amplification restent identiques à celles de la première PCR, avec cependant 2,5 mM de MgCl₂ et 10 pmoles de chaque amorce. Les produits de l'amplification sont visualisés sur un gel d'agarose à 1,5%.

1.6. Criblage d'une banque d'ADNc de bord de manteau.

La banque d'ADNc de bord du manteau a été préalablement préparée au laboratoire à l'aide du kit "ZAP-cDNA[®] synthesis" (Stratagène) dans le vecteur λ "Uni-ZAP[®] XR". Le protocole suivi pour le criblage de la banque Lambda ZAPII d'ADNc comporte plusieurs étapes : la titrage et l'étalement des phages de la banque, le transfert des phages sur

une membrane de nylon, l'hybridation des membranes avec une sonde nucléique radioactive, et l'excision *in vivo* des bactériophages recombinants (**Figure III.3**).

1.6.1. Préparation de la souche bactérienne hôte.

Cinquante millilitres de milieu de culture liquide LB (peptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), pH ajusté à 7 avec NaOH 1 M), contenant 10 mM de MgSO₄ et 0,2% (p/v) de maltose sontensemencés avec la souche bactérienne XLI Blue MRF' (*E. coli*). La culture est réalisée pendant une nuit à 30°C. Après centrifugation (500g, 15 minutes), le culot de bactéries est remis en suspension dans un volume adéquat de MgSO₄ 10 mM, de façon à obtenir une DO₆₀₀ égale à 0,5. Les bactéries sont conservées à 4°C.

1.6.2. Titrage de la banque de phages.

Un aliquot de 10 µl de phages de la banque est dilué en série dans la solution SM (MgSO₄ 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, gélatine 0,01% (p/v)). Dix microlitres de chaque dilution de phages sont ensuite mis en contact avec 300 µl de bactéries XLI pendant 15 minutes à 37°C, pour permettre l'adsorption des phages sur les bactéries. A ce mélange de sont additionnés 3 ml de LB top-agar à 65°C (LB et agarose 0,7% (p/v)), et le tout est étalé sur des boîtes de LB agar (LB et agar 1,5% (p/v)). Après séchage, les boîtes, inversées, sont incubées une nuit à 37°C. A l'apparition des plages de lyse des bactéries hôtes, les boîtes sont transférées à 4°C. Les plages de lyse sont alors dénombrées et le titre de la banque est calculé. Le titrage effectué, 6 boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre sontensemencées comme précédemment à raison de 50 000 phages par boîte et placées la nuit à 37°C.

1.6.3. Transfert des plages de lyse sur membrane.

Les plages de lyse sont transférées par simple contact de 5 minutes sur une membrane de nylon (GeneScreen Plus, Dupont NEN®). L'ADN phagique adsorbé aux membranes est alors dénaturé pendant 5 minutes par capillarité dans une solution contenant 0,5 M de NaOH et 1,5 M de NaCl, puis neutralisé deux fois 3 minutes dans une solution contenant 1 M de Tris-HCl pH8 et 1,5 M de NaCl. Les membranes sont ensuite rincées dans du 2X SSC (NaCl 0,3 M, citrate de sodium 30 mM, pH 7 ajusté à l'acide citrique), et placées à 80°C pendant 2 heures pour fixer l'ADN.

1.6.4. Marquage de la sonde.

Le marquage est réalisé par la technique de "random priming" (amorçage au hasard) en utilisant le kit "NEBlot[®]" (Biolabs[®]). La sonde est un fragment d'ADNc double brin, issu de la 3'RACE-PCR, linéarisé après digestion du plasmide recombinant par EcoRI ou PstI/SacII. Cent nanogrammes d'ADN digéré sont dénaturés pendant 5 minutes à 95°C, puis placés dans la glace. La synthèse des brins complémentaires aux ADNc s'effectue à partir de octadéoxyribonucléotides aléatoires, hybridés au hasard sur la matrice d'ADNc, par l'action du fragment de klenow de l'ADN polymérase I, en présence d'un mélange de dATP, dTTP, dGTP, et de 50 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3 000 Ci/mme). L'élongation entre les amorces, qui permet l'incorporation du dCTP radioactif, se déroule pendant 2 heures à 37°C. Les nucléotides non incorporés sont éliminés par filtration du mélange réactionnel sur colonne de Sephadex[®] G50.

1.6.5. Hybridation des acides nucléiques avec une sonde radioactive.

Les membranes sont préhybridées au minimum 3 heures à 65°C dans un tampon de préhybridation/hybridation composé de 6X SSC, 5X Denhardt's (BSA 0,1% (p/v), Ficoll 400 0,1% (p/v), PVP 0,1% (p/v)), SDS 0,5% (p/v), et additionné extemporanément de 0,5 mg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé. L'hybridation est réalisée dans le même milieu auquel on ajoute la sonde nucléique purifiée et dénaturée, à raison de $2 \cdot 10^6$ cpm/ml de milieu. L'hybridation se déroule à 65°C pendant 16 heures. Les membranes sont ensuite soumises à 4 lavages successifs de 15 minutes à 65°C chacun, dont 2 dans du 2X SSC, puis du 2X SSC/SDS 0,1% (p/v), et enfin du 0,1X SSC. La révélation est effectuée par autoradiographie dans une cassette avec écrans intensifiants pendant une journée à -70°C. A l'issue de ce premier criblage, les phages qui correspondent aux plages de lyse présentant un marquage positif sont prélevés et remis en suspension dans 500 µl de SM et 15 µl de chloroforme (bactéricide). Un second criblage est alors réalisé selon le même protocole sur les phages sélectionnés (plusieurs dilutions de phages).

1.6.6. Excision *in vivo*.

Au terme du criblage secondaire, les phages correspondants à une plage de lyse positive et isolée, sont soumis à une excision *in vivo*. Deux cent cinquante microlitres d'une culture de bactéries XL1 blue MRF', amenée par du MgSO₄ 10 mM à une DO₆₀₀ égale à 1, sont coinfectés (37°C, 15 minutes ; puis dans 3 ml de LB à 37°C pendant 3 heures) par

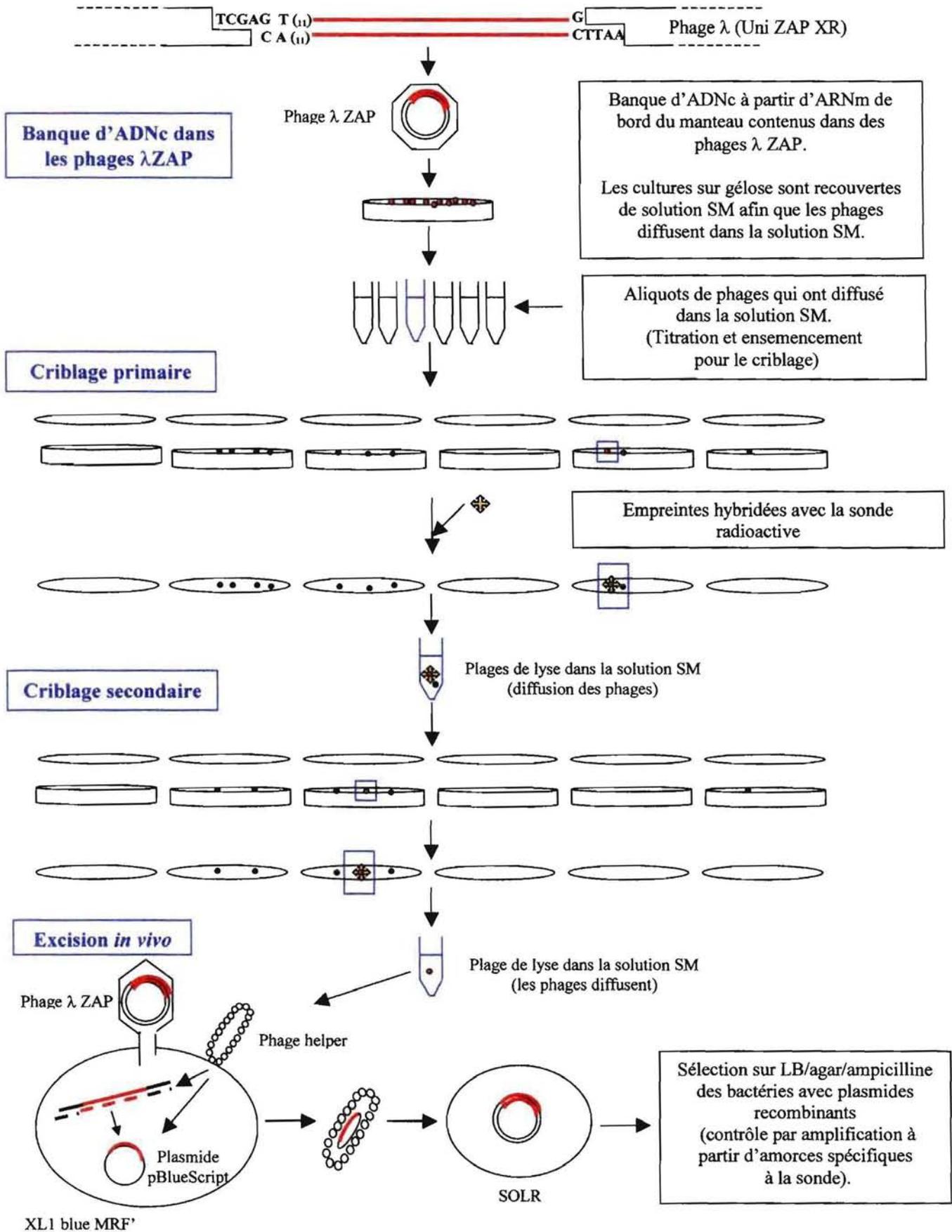


Figure III.3: Principe du criblage d'une banque d'ADNc préparée dans un vecteur λ ZAP ("ZAP-cDNA[®] synthesis" (Stratagène)).

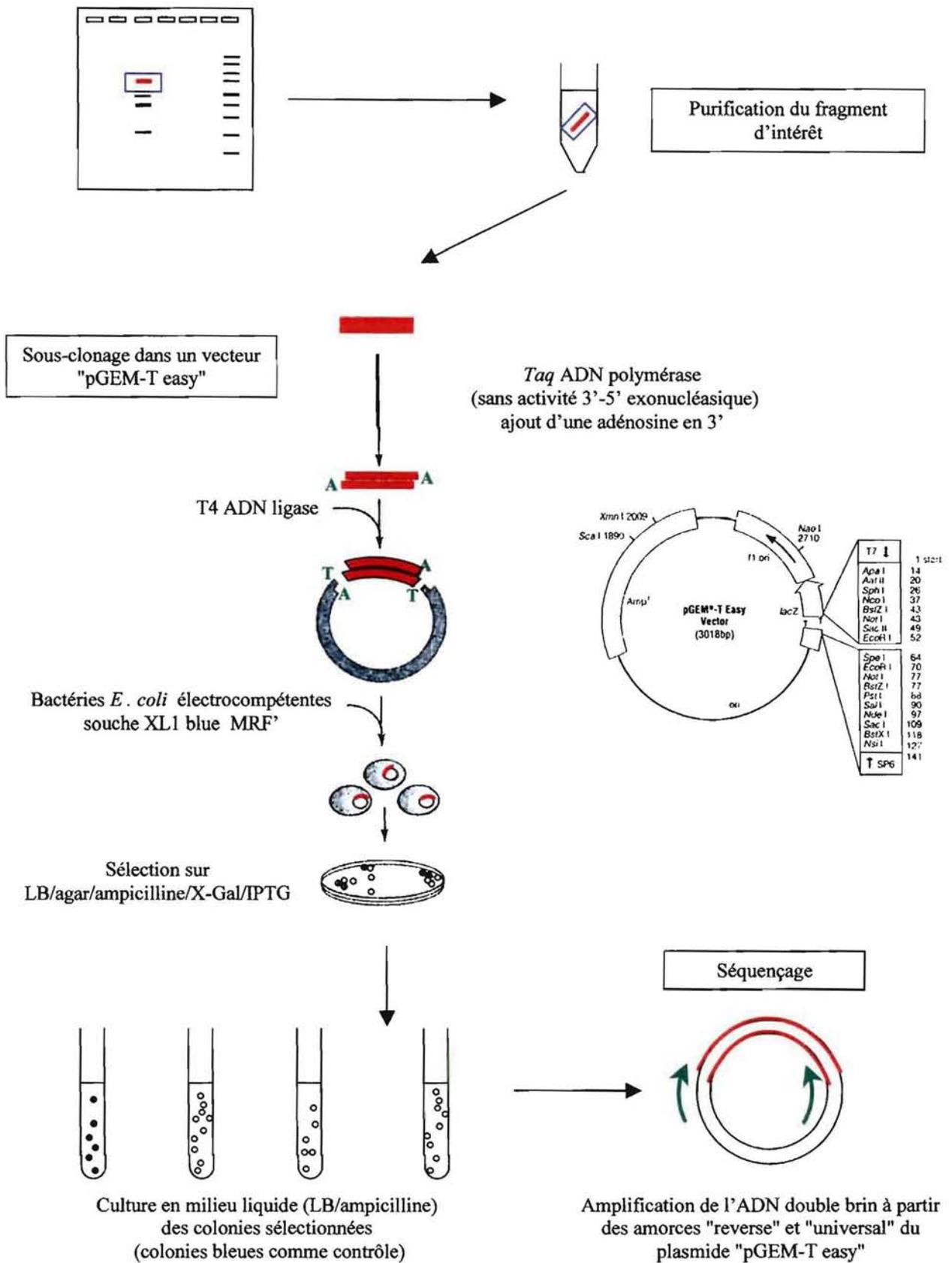


Figure III.4 : Principe du séquençage des fragments d'ADN purifiés, amplifiés puis sous-clonés dans le vecteur plasmidique "pGEM-T easy".

250 µl de phages sélectionnés (préalablement repris dans 500 µl de solution SM) et par 1 µl de phage M13 "helper" ("ExAssist helper phage") (Stratagène). Les protéines impliquées dans la réplication de ce phage "helper" reconnaissent l'origine de réplication et le signal de fin de réplication situés de part et d'autre de l'insert, et induisent ainsi la réplication *in vivo* de l'insert et de la séquence du plasmide pBlueScript SK(-) contenue dans la construction du phagemide. Le fragment simple brin synthétisé est circularisé et empaqueté sous forme de phage filamenteux libéré hors de la bactérie. Afin d'isoler les phages recombinants, une souche de bactéries *E. coli* (SOLR) est infectée par des dilutions successives de phages (37°C, 15 minutes). Ces bactéries sont résistantes à une infection par le phage lambda et ne permettent pas la réplication du phage "helper". De plus, les bactéries SOLR, infectées par le phage, permettent la duplication de l'ADN simple brin (forme répliquative double brin) et ainsi la reconstitution du plasmide pBlueScript. Les bactéries sont ensuite étalées sur LB/ agar 1,5 %/ ampicilline (50 µg/ml), afin de s'assurer de la sélection des colonies contenant le plasmide pBlueScript recombinant, lequel possède le gène de résistance à l'ampicilline, et ainsi de procéder à l'extraction de l'ADN plasmidique recombinant.

1.7. Séquençage des produits d'amplification et des fragments sous-clonés.

Les fragments d'ADNc obtenus par PCR sont visualisés et purifiés à partir d'un gel d'agarose puis sous-clonés dans un vecteur plasmidique. Des bactéries sont ensuite transfectées avec les plasmides recombinants afin qu'ils s'y multiplient, et une minipréparation plasmidique est effectuée pour chaque clone en vue du séquençage du fragment d'ADNc inséré (**Figure III.4**).

1.7.1. Purification des fragments d'ADNc à partir du gel d'agarose.

Les fragments d'ADNc sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose de concentration variable (selon la taille des fragments d'intérêt) et dans du tampon TAE. Les bandes retenues sont prélevées à l'aide d'un scalpel et l'ADN est extrait de l'agarose à l'aide du kit "NucleoSpin Extract" (Macherey Nagel). L'ADN est élué dans 50 µl de tampon d'éluion (Tris-HCl 5 mM, pH 8,5).

1.7.2. Sous-clonage de l'ADN dans un vecteur plasmidique.

Le sous-clonage de l'ADNc purifié est réalisé dans le vecteur "pGEM[®]-T Easy" à l'aide du kit "pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems II" (Promega). Pour cela, le vecteur est linéarisé au niveau d'un site de clonage multiple par l'enzyme de restriction EcoRV et est additionné d'un résidu thymidine en 3' du site de coupure. L'ADN à cloner est majoritairement flanqué d'une adénosine à son extrémité 3' sous l'action de la *Taq* ADN polymérase sans activité 3'-5' exonucléasique. La ligation est réalisée à 4°C, pendant au moins 1 nuit, dans un volume final de 5 µl comprenant l'ADN purifié (0,5 à 1,5 µl), le vecteur (25 ng), le tampon de ligation (Tris-HCl 30 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0,1 mM) et 1,5 unités de T4 ADN ligase (Promega). Le mélange de ligation est ensuite dessalé sur une colonne d'agarose 1% (p/v) et de glucose 0,1 M, dans laquelle un puits est formé (Atrazhev et Elliot, 1996). La totalité du mélange de ligation, complété à 20 µl avec de l'eau bidistillée stérile, est déposée dans le puits et le tout est placé dans la glace pendant 90 minutes. Après ce dessalage, le mélange de ligation est récupéré par pipetage dans le puits.

1.7.3. Transformation de bactéries électrocompétentes.

Des bactéries *E. coli* de la souche XL1 blue MRF' sont rendues compétentes à l'électroporation. Deux cent cinquante millilitres de LB sontensemencés avec 10 µl d'une culture fraîche de bactéries XL1 blue MRF', puis incubés à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ comprise entre 0,7 et 1. La culture est ensuite brusquement refroidie dans la glace, puis centrifugée (4000g, 15 minutes, 4°C). Les bactéries sont, à deux reprises, remises en suspension dans 50 ml de glycérol 10% froid et centrifugées. Un dernier lavage est effectué dans 10 ml de glycérol 10% froid. Les bactéries sont finalement reprises dans 1 ml de glycérol 10% et aliquotées en fractions de 40 µl stockées à -70°C. Les aliquots de bactéries rendues compétentes à l'électroporation peuvent être utilisés pendant plusieurs semaines.

La transformation est réalisée avec la totalité du mélange de ligation dessalé pour un aliquot de bactéries électrocompétentes. Après 45 secondes dans la glace, le mélange ligation/bactéries est inséré dans une cuve à électroporation et est soumis à un choc électrique de 18 KVolts/cm. Les bactéries sont immédiatement remises en suspension dans 500 µl de milieu LB glucosé (LB et glucose 20 mM) et incubées à 37°C pendant 1 heure sous agitation douce. La totalité de la suspension bactérienne est ensuite étalée sur des boîtes de Pétri LB/agar 1,5% (p/v)/ampicilline (50 µg/ml)/tétracycline (12 µg/ml), en présence de 15 µl de X-Gal 200 mM (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside) et de 20 µl d'IPTG

200 mM (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside). Après 24 heures de culture à 37°C, les clones positifs blancs (l'insert rend le gène de la β -galactosidase non fonctionnel) sont prélevés et remis en culture en milieu liquide (LB/ampicilline/tétracycline) une nuit à 4°C.

1.7.4. Extraction de l'ADN plasmidique.

L'ADN plasmidique est extrait à partir de 1,5 à 3 ml d'une culture de clones recombinants, à l'aide du kit "FlexiPrep™" (Amersham Biosciences). Le culot bactérien, obtenu après centrifugation (14000g, 30 secondes), est repris dans une solution isotonique contenant de la RNase I (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, Rnase I 80 μ g/ml), et est soumis à une lyse cellulaire alcaline (NaOH 0,2 M, SDS 1% (p/v)). Les débris cellulaires (ADN chromosomique, protéines...) sont précipités dans une solution d'acétate de potassium (acétate de potassium 3 M, acide acétique 5 M), tandis que le surnageant contenant l'ADN plasmidique est précipité par 0,7 volume d'isopropanol. Après centrifugation (14000g, 10 minutes), le culot d'ADN plasmidique est dissout dans une solution de Sephaglas™ FP afin que l'ADN s'adsorbe aux billes de verre qu'elle contient. Après centrifugation (10000g, 15 minutes), le culot ADN-billes est lavé dans une solution de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, NaCl 0,2 M, additionnée d'éthanol 60%, puis dans de l'éthanol 70%. L'ADN est élué des billes de verre par centrifugation (14000g, 1 minute) dans 50 μ l d'un tampon de faible force ionique (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) ou de l'eau bidistillée.

1.7.5. Séquençage automatique.

L'ADN plasmidique purifié est séquencé à l'aide du kit "ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction version I" (Applied Biosystems), d'après la technique des didéoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977). Les didéoxynucléotides sont couplés à une structure, composée d'une molécule de 6-carboxyfluorescéine et d'une molécule de dichlororhodamine, qui porte un radical variable selon le didéoxynucléotide et dont le spectre d'émission se situe à des longueurs d'ondes différentes (dichloro[R6G] pour ddATP, dichloro[ROX] pour ddCTP, dichloro[R110] pour ddGTP, dichloro[TAMRA] pour ddTTP). La réaction de séquençage consiste à réaliser une synthèse de l'ADN inséré dans le plasmide, avec incorporation des ddNTPs fluorescents, à partir d'une amorce spécifique au fragment ou d'une amorce située de part et d'autre du site de multiclonaage (universelle ou "reverse"). A l'ADN (jusqu'à 500 ng) sont ajoutés l'amorce (3,2 pmoles), et le "Big-Dye" comprenant de la *Taq* ADN polymérase (ADN polymérase AmpliTaq®FS, Perkin Elmer), le

tampon de l'enzyme, du $MgCl_2$ et les ddNTPs. La polymérisation est effectuée sur 30 cycles ($94^{\circ}C/25$ secondes ; $50^{\circ}C/15$ secondes ; $60^{\circ}C/4$ minutes). Le mélange réactionnel est ensuite précipité dans NaOAc 3 M, pH 4,6/éthanol 95%, et le culot obtenu est séché et repris dans un tampon de dépôt en vue d'être analysé sur gel de polyacrylamide 6%/urée 7 M et par le système ABIprism 377 (Applied Biosystems).

1.8. Analyses informatiques des séquences.

1.8.1. Interrogation de banques de données.

Les séquences nucléotidiques ou protéiques sont comparées à différentes banques de données (EMBL, Genbank, Swissprot) à l'aide du logiciel FASTA (Pearson et Lipman, 1988) (http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/fasta_in.pl).

1.8.2. Analyse des séquences.

L'alignement et les degrés d'homologie des séquences sont générés à l'aide du logiciel BioEdit version 5.0.6 (Hall, 1999) et à partir du programme CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). L'analyse phylogénétique du récepteur CIR est obtenue par la méthode de parcimonie à partir de l'alignement généré par le logiciel CLUSTAL W. La validation de l'arbre est réalisée par "bootstrapping" (fixé à 250) à l'aide des logiciels Seqboot, Protpars, Neighbor et Consense (Felsenstein, 1989). Le profil d'hydrophobicité de la séquence du précurseur de CIR est réalisé par le programme PROTSCALE (<http://expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>), selon la méthode décrite par Hopp et Woods (1981). La recherche de motifs caractéristiques des molécules de la famille est réalisée par comparaison avec la banque de motifs PROSITE (Hofmann *et al.*, 1999) (<http://www.expasy.org/prosite/> ou http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/signpt_in.pl).

II.2. Expression du récepteur CIR.

2.1. *Amorces oligonucléotidiques utilisées.*

Amorces utilisées pour le "contrôle actine".

ACTR GCC ACT TGA TGG CCA GAA GG
ACTF CTA TGT AGG AGA CGA GGC CC

2.2. *Amplification par RT-PCR.*

Afin d'étudier l'expression du transcrit du récepteur CIR au cours du développement larvaire et chez l'huître adulte, des amplifications géniques *in vitro* sont réalisées à partir d'ARN rétrotranscrits de divers tissus adultes ainsi que de différents stades de développement larvaire. L'extraction des ARN totaux puis des ARN polyadénylés, et leur transcription en ADNc sont effectuées comme décrit dans les paragraphes 1.2 et 1.3.

Une première amplification est réalisée à partir d'ARNm rétrotranscrits de tissus adultes et de 50 pmoles de chacune des deux amorces dégénérées (IR1 et IR3, voir paragraphe 1.1), en présence de MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, du tampon de l'enzyme et de 1 unité de Goldstar *Taq* ADN polymérase (Eurogentec). L'amplification est achevée au terme de 40 cycles (95°C/1 minute ; 52°C/1 minute ; 72°C/1 minute). Les fragments amplifiés sont visualisés sur un gel d'agarose à 1,8%.

Une seconde réaction d'amplification est effectuée à partir d'ARNm rétrotranscrits de tissus adultes et de différents stades du développement larvaire. L'amplification est réalisée à partir d'amorces spécifiques (β 1 et β 2) du transcrit du récepteur CIR. Le milieu réactionnel de 50 μ l se compose de 10 ng d'ADNc, de 25 pmoles de chaque amorce, de 2,5 mM de MgCl₂, de 0,2 mM de dNTPs, du tampon de l'enzyme et de 1 unité de Goldstar *Taq* ADN polymérase (Eurogentec). L'amplification se déroule sur 45 cycles (95°C/1 minute ; 58°C/30 secondes ; 72°C/1 minute). Les fragments sont visualisés sur un gel d'agarose à 1,5%.

Parallèlement à l'amplification du transcrit, l'amplification par les amorces ACTF et ACTR d'un fragment d'actine, présent dans les tissus adultes et larvaires de façon ubiquitaire, sert de contrôle positif de la qualité des ARNm et à estimer les variations d'expression. Ce contrôle actine s'effectue sur le même volume d'ADNc que pour l'amplification du transcrit, avec 10 pmoles de chaque amorce, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, le tampon de l'enzyme et 1 unité de Goldstar *Taq* ADN polymérase (Eurogentec).

L'amplification est réalisée en 20 cycles (95°C/1 minute ; 60°C/1 minute ; 72°C/1 minute). Les produits des différentes amplifications sont visualisés sur gel d'agarose à 1,5%.

2.3. Northern blotting.

2.3.1. Marquage de la sonde (voir le paragraphe 1.5).

2.3.2. Séparation des ARN sur gel dénaturant et transfert sur membrane.

Le "Northern blotting" est réalisé à partir de 2 µg d'ARN polyadénylés extraits de larves à différents stades de développement ou de tissus adultes. Après une dénaturation de 10 minutes à 70°C en présence de 33% (v/v) de formamide déionisée, 33% (v/v) de formaldéhyde, 1X MOPS (MOPS 20 mM pH 7, NaOAc 2 mM pH 5,2, EDTA 1 mM pH 8) et 0,5 mg/ml de bromure d'éthidium, les ARN sont déposés sur un gel d'agarose à 1,5% dans un tampon 1X MOPS/formaldéhyde 1% (v/v), et soumis à un champ électrique de 60 Volts. Les marqueurs de taille sont les ARN ribosomiques 16S et 23S d'*Escherichia coli* (Sigma[®]) et des marqueurs de poids moléculaire (jusqu'à 10 kb) de fragments d'ARN (Sigma[®]). A l'issue de l'électrophorèse, les ARN sont transférés sur une membrane de nylon (GeneScreen Plus, Dupont NEN[®]) par capillarité avec du tampon 20X SSC pendant au minimum 16 heures. La membrane est rincée dans du 2X SSC puis séchée à 80°C pendant 2 heures, pour favoriser la fixation des ARN.

2.3.3. Hybridation.

La membrane est préhybridée dans une solution de préhybridation/hybridation CHURCH (NaH₂PO₄ 0,25 M, Na₂HPO₄ 0,25 M, EDTA 2 mM, héparine 0,2 mg/ml, additionnés extemporanément de SDS 7% (p/v) et d'ARN de transfert 5 µg/ml), en présence de 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé. La préhybridation se déroule à 65°C pendant 18 heures. La membrane est ensuite hybridée dans le même tampon additionné de la sonde radioactive, préalablement dénaturée 10 minutes à 95°C, à raison de 2.10⁶ dpm/ml de tampon, pendant 35 heures à 65°C. La membrane est rincée deux fois dans du 2X SSC (15 minutes, 65°C), une fois dans du 2X SSC/SDS 0,1% (p/v) (15 minutes, 65°C), puis une fois dans du 0,1X SSC/SDS 0,1% (p/v) (10 minutes, 65°C). La révélation est réalisée par une acquisition de 3 jours au "Cyclone" (Packard).

2.4. Hybridation *in situ*.

2.4.1. Synthèse des sondes ARN sens et antisens.

Afin de localiser le transcrite codant le récepteur CIR, des sondes ARN sens et antisens sont synthétisées par transcription *in vitro* à partir du plasmide obtenu par 3'RACE-PCR. Le plasmide pGEM-T Easy possède les promoteurs des ARN polymérase SP6 et T7 de part et d'autre de son site de clonage multiple. La sonde sens est obtenue après digestion du plasmide par SphI et transcription par l'ARN polymérase SP6, et la sonde antisens après digestion du plasmide par PstI et transcription par l'ARN polymérase T7.

Les ribosondes sont synthétisées séparément dans un volume final de 20 µl, à partir de 1 µg de plasmide linéarisé et en présence de 10 unités d'ARN polymérase, dans un milieu réactionnel contenant 0,25 mM de chaque nucléotide (ATP, CTP, GTP), 50 µl de [$\alpha^{33}\text{P}$]-UTP (2 000 ci/mmmole), 50 unités de Rnasin (fournisseur), 10 mM de DTT, et le tampon de transcription (Tris-HCl 40 mM pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, spermidine 2 mM). Après une incubation à 37°C pendant 1 heure, 1 unité de DNase I "RNase free" est ajoutée, et l'incubation est prolongée de 15 minutes.

Pour faciliter la pénétration ultérieure des ribosondes dans les tissus, une hydrolyse alcaline ménagée est réalisée, réduisant ainsi la taille des sondes à des fragments de 100 nucléotides. L'hydrolyse consiste à ajouter un volume de NaHCO₃ 80 mM/Na₂CO₃ 120 mM, et est effectuée à 60°C pendant 83 minutes (durée calculée d'après la formule : $t = (L_i - L_f) / k * L_i$; où L_i = longueur initiale de la sonde en kb, L_f = longueur moyenne finale désirée en kb, k = constante de scission soit 0,11 scission/kb/minute). Les ribosondes sont ensuite purifiées sur colonne de Sephadex G50 (Nick™ Columns, Sephadex™ G50 DNA Grade, Amersham Biosciences) afin d'éliminer les nucléotides non incorporés. Les ARN sont élués avec du tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 7,5, DTT 10 mM, SDS 0,1% (p/v)). Des fractions de 150 µl sont collectées en sortie de colonne et la radioactivité est comptée sur un aliquot de chaque fraction (1/100^{ème} de volume) en présence de 3 ml de liquide scintillant. Les fractions correspondant au pic d'élution de la sonde radioactive sont rassemblées puis précipitées dans 0,1 volume d'acétate d'ammonium 6 M pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol 100%, en présence de 10 µg d'ARNt de levure. Le culot, rincé à l'éthanol 80% puis 100%, est séché et repris dans 0,1 M de DTT à raison de 1.10⁶ dpm/µl, puis dans 9 volumes de tampon d'hybridation (formamide déionisée 50% (v/v), Tris-HCl

0,2 M pH 7,5, EDTA 5 mM pH 7,5, 1X Denhardt's, Na₂HPO₄ 95% 0,1 M/NaH₂PO₄ 5% pH 8, sulfate de dextran 10% (p/v), 500 µg/ml d'ARNt de levure).

2.4.2. Fixation des tissus et montage des lames.

Les tissus sont fixés dans une solution de 1X PBS additionné de paraformaldéhyde 4% (p/v), pendant une nuit à 4°C. Les pièces sont ensuite déshydratées par des bains successifs de 1X PBS (30 minutes, 4°C), de solution saline (NaCl 145 mM ; 30 minutes, 4°C), de solution saline:éthanol 100% (1:1) (30 minutes, température ambiante), puis par des concentrations croissantes d'éthanol (70%, 85%, 95%, 100%). L'éthanol est ensuite remplacé par deux bains de toluène de 30 minutes chacun. Les pièces sont alors imprégnées dans trois bains de paraffine (3 fois 20 minutes, 60°C), avant l'inclusion définitive dans la paraffine. Après cette inclusion, les blocs sont placés quelques minutes à 4°C afin de faciliter la coupe au microtome. Des coupes sériées de 7 µm d'épaisseur sont réalisées et dépliées à la surface de l'eau d'un bain-marie sans remous maintenu à 46°C. Les pièces sont ensuite récupérées sur des lames traitées préalablement à l'HCl 37% (puis éthanol 100%, eau bidistillée et placées à 150°C pendant 5 minutes) et au TESPA 2% (3-aminopropyltriéthoxysilane, Sigma®) afin de limiter le décollement des pièces. Les lames montées avec les coupes de tissus sont séchées sur une platine chauffante à 20°C puis stockées à 4°C en présence de dessicant.

2.4.3. Prétraitement et hybridation des coupes.

Ces étapes sont réalisées d'après le protocole de Kintner et Melton (1987). Les coupes sont déparaffinées dans deux bains successifs de xylène de 10 minutes, puis rapidement réhydratées dans des bains d'éthanol (100%, 95%, 70%, 40% ; 1 minute chacun). Après élimination de l'éthanol par un lavage dans du 1X PBS, les coupes sont post-fixées pendant 20 minutes dans du 1X PBS/paraformaldéhyde 4% (p/v), puis rincées dans du 2X SSPE (NaCl 360 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, EDTA 2 mM pH 7,4). Afin de faciliter la pénétration des sondes dans les tissus, les coupes sont traitées pendant 30 minutes à 37°C avec 3 µg/ml de protéinase K en solution dans Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, EDTA 10 mM, puis pendant 15 minutes à température ambiante par HCl 0,2 N. Les liaisons aspécifiques de la sonde sont inhibées par une étape d'acétylation dans une solution de triéthanolamine 0,1 M pH 8 contenant 0,25% d'acide acétique anhydre. Au terme de ce traitement, les lames sont rincées dans du 2X SSPE, puis, juste avant le dépôt des sondes, dans de l'eau DEPC.

L'hybridation est effectuée sur les lames égouttées, par dépôt de 18 µl de sonde par lame, répartis entre les différentes coupes. Une lamelle est déposée, recouvrant l'ensemble des coupes sans bulles d'air, et les lames sont incubées horizontalement dans une boîte en atmosphère humide pendant une nuit à 50°C.

2.4.4. Autoradiographie et révélation des lames.

Ces étapes sont réalisées d'après le protocole de Wilkinson *et al.* (1987). A l'issue de l'hybridation, les lames sont plongées dans du 5X SSC, DTT 10 mM pendant 30 minutes à 55°C, afin de décoller les lamelles. Un premier lavage stringent (30 minutes, 55°C) est effectué dans une solution de formamide 50% (v/v), 2X SSC, DTT 10 mM. Après trois rinçages (10 minutes, 37°C) dans du tampon NTE (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 5 mM), l'excès de sonde est éliminé par un traitement à la RNase A (20 µg/ml dans du NTE ; 30 minutes à 37°C), suivi d'un rinçage dans du NTE (15 minutes, 37°C). Un second lavage stringent est réalisé dans les mêmes conditions que le premier. Les lames sont ensuite rincées dans du 2X SSC (15 minutes, température ambiante) puis du 0,1X SSC (15 minutes, température ambiante), avant d'être déshydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes diluées dans de l'acétate d'ammonium 0,3 M.

En chambre noire, les lames sont délicatement plongées dans une émulsion photographique (Ilford K5 Nuclear Track) préalablement fondue à 42°C et diluée dans du glycérol 2% (v/v). Après séchage à l'air libre pendant une nuit, les lames sont placées dans des boîtes d'autoradiographie hermétiques contenant du dessicant pendant un mois à 4°C.

La révélation des lames s'effectue par un bain dans du révélateur Kodak D19 (2 minutes), puis dans un mélange d'acide acétique 1%/glycérol 1% (1 minute), et par une fixation dans du thiosulfate de sodium 30% (2 minutes). Après deux lavages dans de l'eau bidistillée (10 minutes chaque), quelques coupes sont colorées au bleu de toluidine et mises à sécher. Les préparations sont finalement déshydratées, plongées dans du toluène (2 fois 10 minutes) puis montées au Depex.

III. RESULTATS

III.1. Caractérisation du précurseur de CIR.

1.1. Amplification par RT-PCR d'un ADNc partiel de récepteur de type insuline/IGF.

L'approche par RT-PCR est basée sur la présence au niveau de la sous-unité β des récepteurs de la famille des insulines/IGFs d'un domaine catalytique à activité tyrosine kinase particulièrement bien conservé au cours de l'évolution. A partir de l'alignement de plusieurs séquences protéiques du domaine tyrosine kinase (TK), et en particulier du récepteur à l'insuline humain et du récepteur de type insuline de drosophile, deux amorces oligonucléotidiques dégénérées (sens, IR1 et antisens, IR3) ont été préparées pour les zones à forte homologie en acides aminés (Roovers *et al.*, 1995) (**Figure III.5**). L'amplification génique *in vitro* est réalisée sur 10 ng d'ADNc de divers tissus adultes d'huître au cours de 40 cycles (95°C, 1 minute ; 50°C, 1 minute ; 72°C, 1 minute). Deux fragments de tailles estimées à 380 et 480 paires de bases (pb) sont amplifiés. Après purification, sous-clonage et séquençage, les fragments s'avèrent être finalement constitués de 387 et 475 pb (**Figures III.6.a et III.8.a**).

Le fragment de 387 pb code pour 129 résidus en acides aminés (**Figure III.6.b**). Cette séquence s'avère s'apparenter à celles de la famille des protéines de choc thermique, les "Heat Shock Proteins" (HSP/HSC) (**Figure III.7**). L'obtention d'une séquence complète a ensuite été entreprise, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire IFREMER de Montpellier DRIM, et fait l'objet d'une publication traitant de la caractérisation de la première "Heat Shock Cognate Protein" (HSC72) d'huître creuse *Crassostrea gigas* (Gourdon *et al.*, 2000).

Le fragment de 475 pb code pour 158 résidus en acides aminés (**Figure III.8.b**) qui correspondent à une séquence partielle de domaine TK de récepteurs de type insuline/IGF. Cette séquence présente une forte homologie avec le récepteur à l'IGF-1 de turbot *Scophthalmus maximus* (*Sm* IGF-1R) (66,5%), le récepteur de type insuline de limnée *Lymnaea stagnalis* MIPR (66%), et une homologie un peu plus faible avec le récepteur de type insuline DAF-2 du nématode *C. elegans* (42%) (**Figure III.9**). La séquence du récepteur de *C. gigas* ainsi mise en évidence a été nommée CIR (*C. gigas* insulin receptor-related receptor).

$\alpha 1$ et $\alpha 3$

HsInsR MNLTRLHE E M S V I E H Q L L M F K T R P E D --- F R D L S F F K I M I T D Y L L L F V Y G E S L K D L F P N I T V I R G S R L F N V A L V I F
HsIGFIR NDYQQLKR E M T V I E G Y H L L I S K A -- E D --- Y R S Y R F F K T V I T E Y L L L F V A G E S L G D L F P N I T V I R G W K L F Y N V A L V I F
BlInsR NRVSNLRQ E M T V I E G Y Q L L I D F A E E Q D --- Y S G L A F P N V E I T D Y F L L Y V R G T N L S E L F P N I A V I R G T N L F N V A L V I F
LsMIPR SSMDNFKL E M T V I E G S R S L F E L K A L D --- F R H L S F P D R E I T D Y L I M Y V Y G E T L S K L F P N I A I F P R E L S N S Y A I V M Y
BgInsR M-LDNFNL R M T V I E G N F T V D A T N S Q N G I Y A I E D L S F P E R E I S D H L I V Y R N K T S F K K L F P N I R V I R G Q H L F D V Y S L V I Y
DmInsR M V S H F N Q E M T V I E G F L D L I N D A S P L N --- R - S F F K T E V T D Y I I I Y V T G H S L S K I F P N I S V I R G N K L D G I A L V V Y

HsInsR E M V H L K E L G Y N L M N T S V F I E K N E L C Y L A I D S R I L D S - V E D N H I V L N K D D N E E G D - I P G T A K G K T N C P A T V I N G Q F -
HsIGFIR E M T N L K D I G Y N I R N T P A T P I E K A D L C Y L S T V D S L I L D A - V S N N Y I V G N K P P - K E G D - L P G T M E E K P M C E K T T I N N E Y -
BlInsR E M L D M Q K I G Y S Q N T S V F I E K P N L C Y L D I D S F I A E S G Y S N N F I V D N R E E - E E V N - F P G R C R - - - - - I K H P V L -
LsMIPR E M R D I Q D L S V N R T S M G V L T K F K L Y I E T I N W T Q I G V S D P E A R R F I N N K E Q - - - P N - S K D E C Q - - - - -
BgInsR E N N D I Q E T L I N D V G M S V P I S N F K L C Y A D I T N W T Q L G V E E L - V Y I Y D N S K Q P - - - P - V R S N C E - - - - -
DmInsR S N F D L M D L H K R S T S G V F I E K H K L C Y D R I D W L E I A E N E S Q L V V L T E N G K E K E S L S K P G E I R I E E G H D N T A I E G E L N

$\alpha 4$

HsInsR ----- V E R W T H S H K V C P T I K S - H G C T A E G L H S E L E N S Q P D D - P T K V A C R N F Y L D G R V E T P P P Y H F Q D W R
HsIGFIR ----- N Y R W T T N R K M C P S T G K - R A C T E N N E H P E L S S A P D N - D T A V A C R H Y Y Y A G V V P A P P N T R E F E G W R
BlInsR ----- Q D L W A E E H K V C P E S L G - N C R D G I S G H E N I G D G P - T - E R D V A C K Y F V H N G E L I Q P P D T Q Y K D R R
LsMIPR ----- S K R W T Y S D K G L N C Q K E N T Y C M E N G S H D Y I G K V P M N - P D E F S C K E V Q F N N T R P Q P G T K F L N R R
BgInsR ----- P R N W S Y D Q K G F T C S K A N Q G C M A N G A H E Y C L G K G P T - - A E D Y S C K Y V S F N N S L S E P A T R Y K G R R
DmInsR A S C Q L H N N R R L A N S K L K T C K P E K R N - - N C I D E H T S Q D L G V I D K N G N E S I S E R N V S F N N I M D S K G Y Q F D S - P

HsInsR V N F S F Q D L H H K C K N S R R Q G C H Q Y V I H N N K I P E T S G Y T M N - - - - - S N L L T P L G - P P V H L L E G E K T I D S V T S Q E L R G
HsIGFIR V D R D F A N I L S - - - - - A E S D S E G F V I H D G E M Q E T S G F I R N G - - - - - S Q S M Y I P E G - P P V E E E K K T I D S V T S Q M L Q G
BlInsR I T E E E P N T T N - - - - - S V W K L H H R K I P E T S G Y T T D I - - - - - N N P R L T E E G - Q P S K G - - - - - G L V D S L A A Q R F R G
LsMIPR L T D K E L A L T N D P D G N T P K L L D G E K G E P S L Y T Q N Y S V G D S K D N K N L S Q V K R Q - L P E H G - - - - - L E I N N I Q D A H K L K E
BgInsR L T D R E L S L P Y Q S - G K A P M L L V G E K G E P S Q V F Y T Q N Y T I R E L K E - K N Y N E V K T G - F H E S G - - - - - L E V Q S A E D A L N L Q G
DmInsR V T A N E I T L T K - - - - - F E T N S V Y S G I P Y N G Q I T H T G Y Q K S - - - - - E N K R M E P P G G K D E S S - - - - - G L I D S L E R A R E F H G

$\alpha 2$

HsInsR C T V I N - - - S I N R G G - - - N N I A A E A N L G L I E E I S G Y L K I R R S Y A V S I S F F K R L R G E T L E I G N - - - - - Y S F Y A L L Q N
HsIGFIR C T I F K - - - N L N R R G - - - N N I A S E N F M G L I E V T G Y V K I R H S A V S I S F L A N R L L G E E Q L E G N - - - - - Y S F Y V L T Q N
BlInsR C T I I E - - - E K S R G G - - - D N I D E E E N I G L I E E G H Y V A I V R S Y A V I D D L S K R R G I Q K E N G - - - - - Y A F Y V L T R N
LsMIPR C S K I S - - - P L K Q M S G - - - S N V A Q E K S I G N I R E V T E T I H I K R S Y A V T I H F A N I Q I G S K V P S S E T Q E G Q S F S L F L M I T N
BgInsR C T K I S - - - D T K L R S T - S K V E E T K G L G N I E I T Q S F A R Q S Y A K T Y L S Q Y G T E I P K D S T K S D E - - - F T L L H N L
DmInsR C T I I T T E P T I S K R E S G A H M D E K Y G L A A V H K Q S S L M V H L T Y G L K S I K F S T E S G D P P M D A D K - - - - - Y A L Y V L T R D

HsInsR R Q I W D W S - K H N L T T T Q K L F F H Y P K L S E H K M E E V S G T K G R Q E R N - D I A L K T M D F A S E N E L K F S Y I R T S F D K I L R W E P
HsIGFIR Q Q I W D W - H R N L T I K A K Y F A F P K L V S E Y R M E E V T G T K G R Q S K G - D I N T R N M E R A S E S D V H F T S T T S K N R I I T W H R
BlInsR E K I F D W D - R T D I T I D E K L F F H F P K L R H V L T M V D K V G L P E H A I T D T D I S T L T M D Q A Q S F S R E I E E I N T S K D M I L R W S E
LsMIPR Q E L F P E E Q M K K I L N G Y V H D G Q P H T K E F L S H L N L S E A Q S - - - S I S S I S H C R P E K H D N V T V E K I A H N A A I L A W N K
BgInsR Y D L F P E E Q M K K I K I H R L V I H N R N L Y K Q D F V S H L N L T F N P D - - - G I S T M T M D Q R P M K E F I N I S V T V Y S H T S V V L R W D K
DmInsR D E L G P N - - - Q T F I R K G V F F H F P K L V S T N Q L L P M L A S K P K F F E K S D E G A D S M N F G S G T A V N V T L Q S V G A N S A S L N V T T

IR1

HsInsR R E L Q G S F G M V Y E G N A R D I I K G - - - E A E T R V A V T V V N E S A S L R I E R I E N E A S V M I G T C H S V V R L L G V K G Q T L V M E L A H
HsIGFIR R E L Q G S F G M V Y E G V A K G V V K D - - - E P E T R V A I K T V N E A S M R E R I E I N E A S V M E E N C H H V V R L L G V Q G Q T L V I N E L T R
BlInsR R E L Q G S F G M V Y E G E A K D V V K D - - - E P M V S V A V T V V N E S A S I R I E R I E I N E A S V M I T N C H H V V K I L M S V K G Q T L V M E L A L
LsMIPR K E L Q G S F G M V Y E G V A K G I R D D - P N E E I P V A V T V V N I R S F S R R E T L K A T T M E H C H H V V K I L L G V T G Q A L V M E L A L
BgInsR R E L Q G S F G M V Y E G I A K G L R D D D P E E E I P V A V T V V N E R N F T D T Q E I N E A T I M A F H C H H V V K I L L G V R A H Y Y V M E L P L
DmInsR A P L Q G S F G M V Y E G I L K S F P P N - - - G V D R E A I N T V I N E N T D R E R T N T L S A S V M E E D T Y H V V R L L G C R G Q A L V M E L A K K

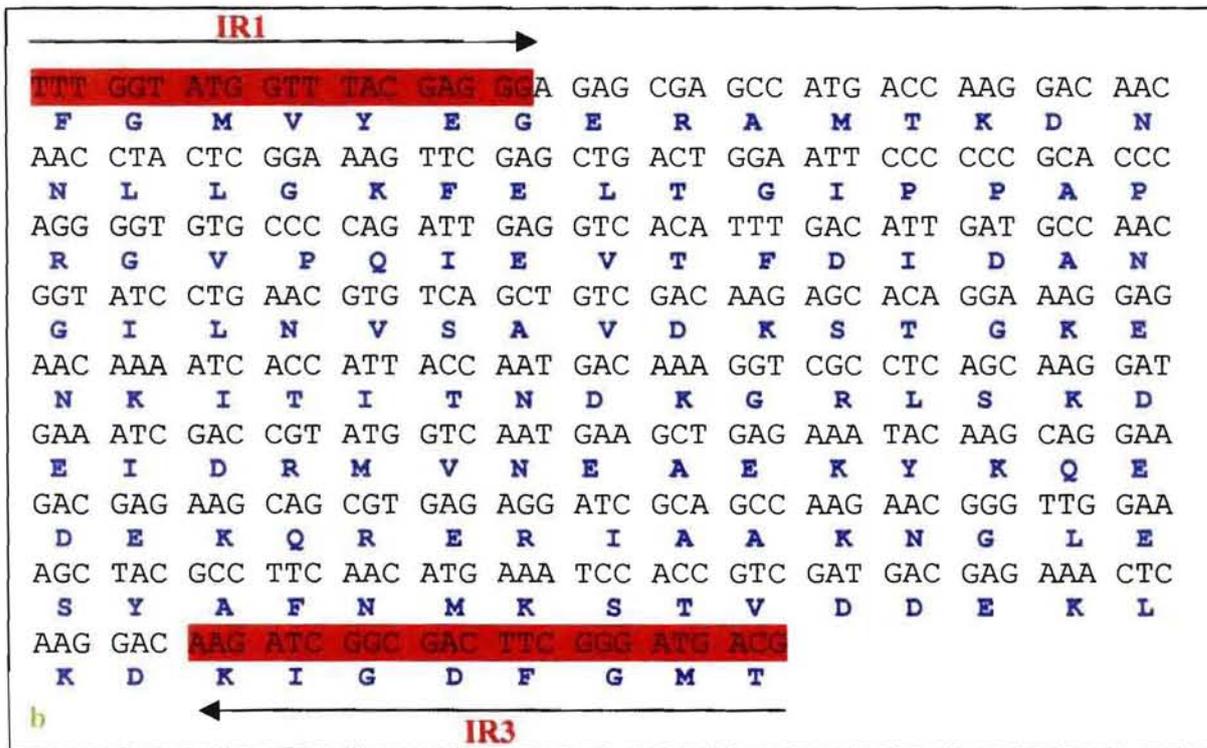
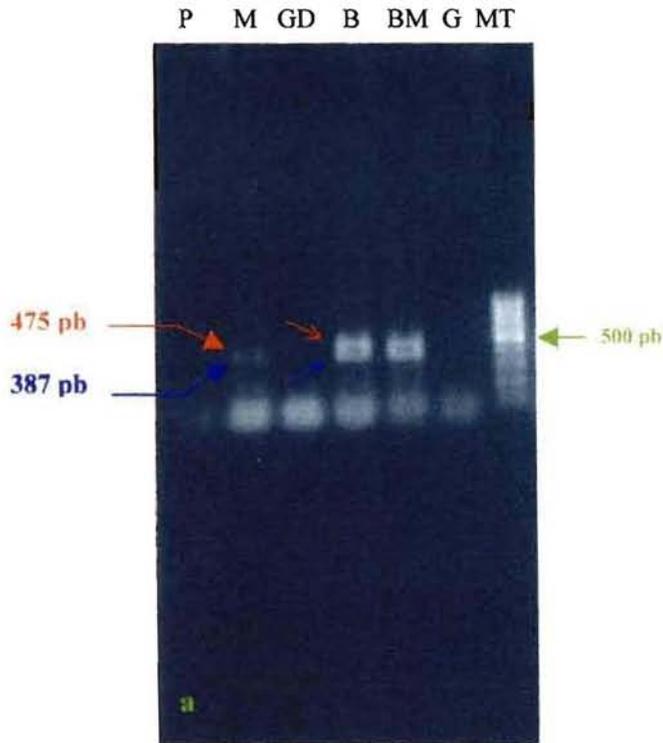
HsInsR G D L S F I R S L R P - - - - - E A E N N P G R P - - - - - P T L Q E M I W A A E I A D G M A Y I N A K F V H R D L A A N C M V
HsIGFIR G D L S F I R S L R P - - - - - E M E N N P V L A - - - - - P T S L S K M I W A G E I A D G M A Y I N A N F V H R D L A A N C M V
BlInsR G D L N F I R H R P E E D V G L S D S P A S N E A K N S P F A E N D N D L - - - - - P T F K D I I W A G V I A C R M S Y L A A K F V H R D L A C N C M V
LsMIPR G D L N F I R G H R P - - - - - D E D H P G V M - - - - - P H L L D I L W A G E I A D G M A Y I A D K F V H R D L A A N C M V
BgInsR G D L T A L Q L R P - - - - - D E E H P F A T - - - - - P T L L E I L W A G E I A D G M A Y I A D K F V H R D L A A N C M V
DmInsR G D L S F I R A H R P - - - - - E E R D E A M M T Y L N R I G V T G N V Q P T Y G R I Y W A I E I A D G M A Y I A A K F V H R D L A A N C M V

IR3

HsInsR A H D F V K I G D F G M T R D I Y E T D Y Y R K G G M L L P V R W M A P E S L K D V F T T S I M W S F G V V L W E I T S A E Q P Y C L S N E Q L K F V M D
HsIGFIR A E D F V K I G D F G M T R D I Y E T D Y Y R K G G M L L P V R W M S P E S L K D V F T T Y S I V W S F G V V L W E I A T L A E Q P Y C L S N E Q L R F V M E
BlInsR A Q E R V K I G D F M T R D I Y E T D Y Y R K G G M L L P V R W M S P E S L K V G V F T S Q S I V W S Y G V V L W E M A T L A S Q Y G K N E E V L K F V I D
LsMIPR S E E R V K I G D F G M T R D I Y E T D Y Y R K G G M L L P V R W M A P E S L K D V F T S L S I V W S Y G V V W M E M V T L A P Y Q C L S N E E V V K F I S D
BgInsR A G E R V K I G D F G M T R D I Y E T D Y Y R K G G M L L P V R W M A P E S L K D V F S S M E I C W S F G V V L W E M V T L A P Y Q C L S N E E V V R E V T D
DmInsR A D D L V K I G D F G M T R D I Y E T D Y Y R K G G M L L P V R W M P E S I P D W Y S S A S V F S F G V V L W E M A T L A P Y Q C L S N F Q V L R Y I D

HsInsR G G Y L Q F D N F E R V T D L M R M Q F N P K M P T F
HsIGFIR G G L L K F D N F D M L F E L N R M Q Y N P K M A P S F
BlInsR G G M L E K E G F E N K L Y D L M K L O N Q Y R Q S M P T F
LsMIPR G Y I M E L P E N F N E M A Y L M C H A K K P N Q P T F
BgInsR G H V M E I P E N F P E E M A F L M F L W E R R P N K P T F
DmInsR G G V M E R E E N F D F L H K L M C R W H R R S S A P S F

Figure III.5: Localisation des amorces dégénérées $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ au niveau de la sous-unité α , et des amorces dégénérées IR1 et IR3 au niveau du domaine tyrosine kinase de la sous-unité β . HsInsR et HsIGF-IR : *Homo sapiens* ; BlInsR : *Branchiostoma lanceolatum* ; LsMIPR : *Lymnaea stagnalis* ; BgInsR : *Biomphalaria glabrata* ; DmInsR : *Drosophila melanogaster*.



Figures III.6 : Amplification par RT-PCR : caractérisation d'un fragment *Hsp/Hsc*.

a : Profil de l'amplification réalisée à partir d'ADNc de divers tissus d'huître adulte et à l'aide des amorces dégénérées IR1 et IR3.

P : palpes labiaux, M : muscle (adducteur postérieur), GD : glande digestive, B : branchies, BM : bord du manteau, G : Gonade, MT : marqueurs de taille (100 à 1000 pb) (Eurogentec).

b : Séquences nucléotidique et protéique du fragment *Hsp/Hsc* obtenu à l'issue de l'amplification par les amorces dégénérées sens IR1 et antisens IR3.

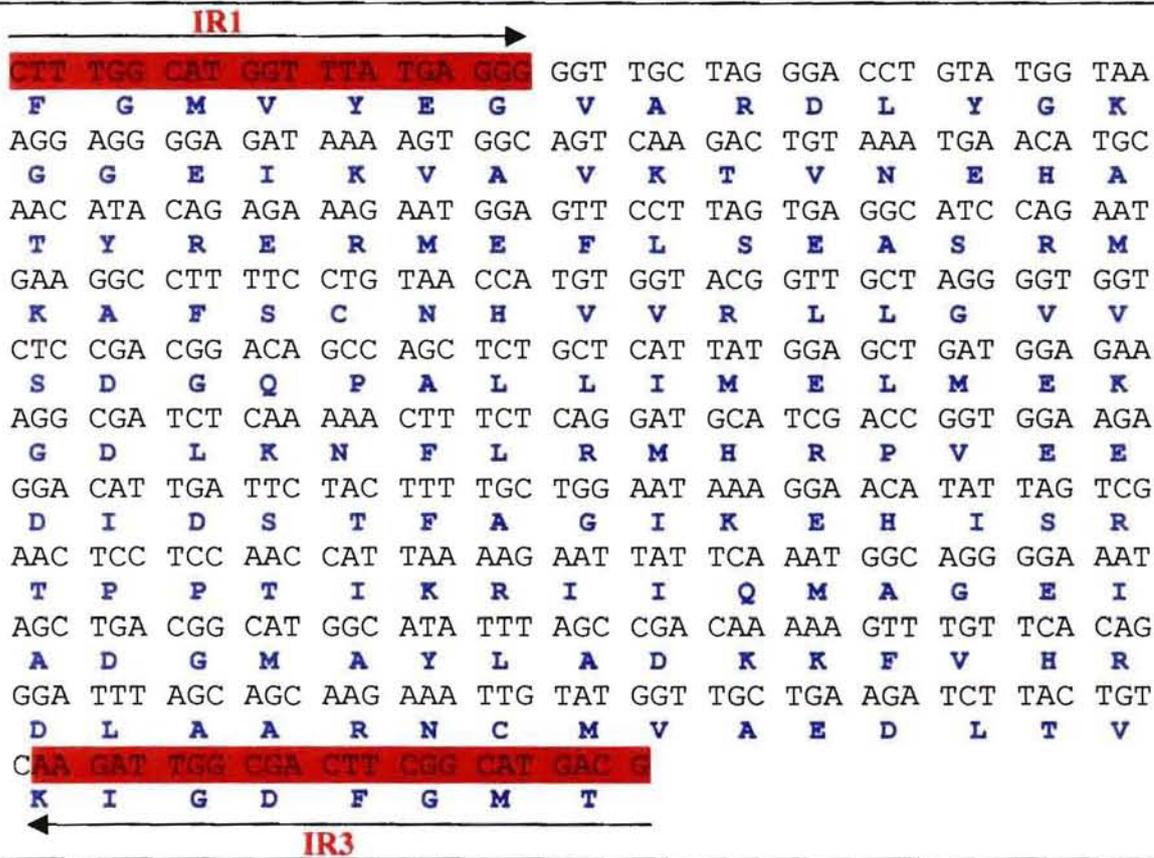
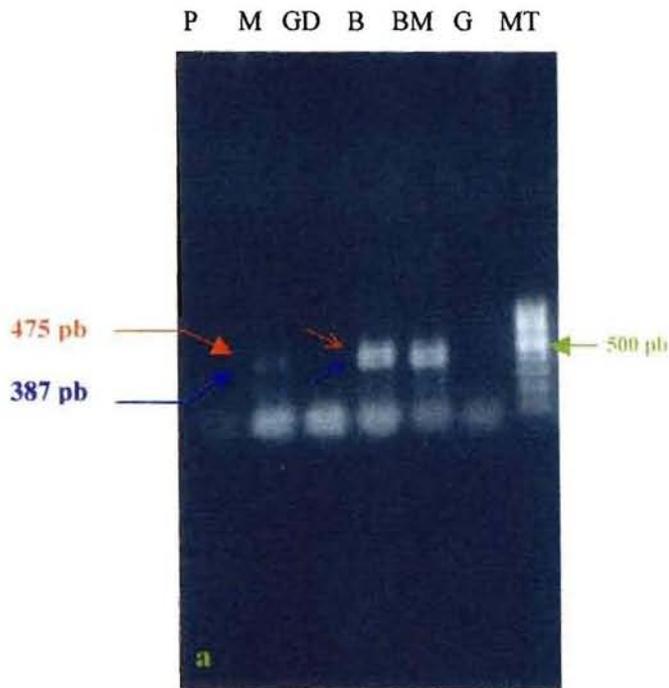


Figure III.8 : Amplification par RT-PCR : première étape de la caractérisation du précurseur CIR.

a : Profil de l'amplification réalisée à partir d'ADNc de divers tissus d'huître adulte et à partir des amorces dégénérées IR1 et IR3. P : palpes labiaux, M : muscle (adducteur postérieur), GD : glande digestive, B : branchies, BM : bord du manteau, G : Gonade, MT : marqueurs de taille (100 à 1000 pb) (Eurogentec).

b : Séquences nucléotidique et protéique du fragment CIR obtenu à l'issue de l'amplification par les amorces dégénérées sens IR1 et antisens IR3.

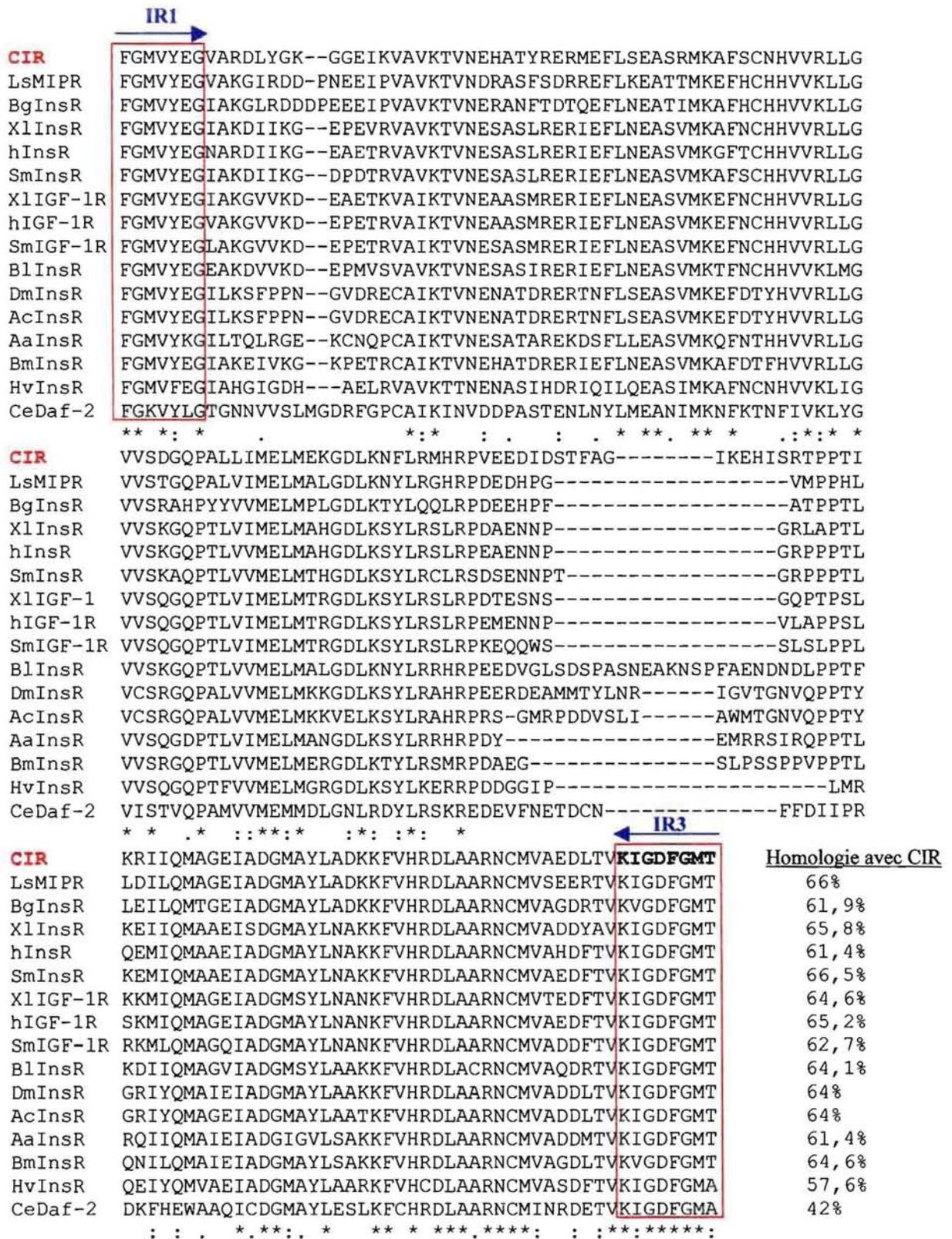


Figure III.9 : Aligement de la séquence protéique CIR avec des séquences du domaine tyrosine kinase de récepteurs de type insuline/IGF-1.

LsMIPR : récepteur de type insuline de *Lymnaea stagnalis* ; BgInsR : récepteur de type insuline de *Biomphalaria glabrata* ; XlInsR : récepteur à l'insuline de *Xenopus laevis* ; hInsR : récepteur à l'insuline de *Homo sapiens* ; SmInsR : récepteur à l'insuline de *Scophthalmus maximus* ; XlIGF-1R : récepteur à l'IGF-1 de *Xenopus laevis* ; hIGF-1R : récepteur à l'IGF-1 de *Homo sapiens* ; SmIGF-1R : récepteur à l'IGF-1 de *Scophthalmus maximus* ; BlInsR : récepteur de type insuline de *Branchiostoma lanceolatum* ; DmInsR : récepteur de type insuline de *Drosophila melanogaster* ; AcInsR : récepteur à l'insuline de *Aplysia californica* ; AaInsR : récepteur de type insuline de *Aedes aegypti* ; BmInsR : récepteur de type insuline de *Bombyx mori* ; HvInsR : récepteur de type insuline de *Hydra vulgaris* ; CeDaf-2 : récepteur de type insuline de *Caenorhabditis elegans*.

La caractérisation du précurseur de CIR est poursuivie par RT-PCR à partir d'amorces dégénérées désignées au niveau de la sous-unité α qui contient les domaines de liaison du ligand. Malgré une plus faible homologie de séquence, deux couples d'amorces oligonucléotidiques ($\alpha 1/\alpha 2$ et $\alpha 3/\alpha 4$) ont été déduits de l'alignement protéique de séquences de la sous-unité α de récepteurs de la famille (voir **Figure III.5**). De nombreux fragments ont alors été amplifiés puis séquencés (données non présentées), mais aucun ne correspond à des séquences répertoriées dans les banques de données.

1.2. Caractérisation du précurseur.

1.2.1. 5' et 3' RACE-PCR ("Marathon").

A partir de la séquence partielle du précurseur de CIR obtenue par RT-PCR, deux couples d'amorces spécifiques Gsp1 (amorce sens)/Gsp2 (amorce antisens) pour la première amplification, et NGsp1 (amorce sens) / NGsp2 (amorce antisens) pour l'amplification en "nested", sont synthétisés. Ces amorces ont été utilisées pour rechercher par la technique du "Marathon" les séquences en 5' et en 3' du fragment de RT-PCR. L'amplification réalisée à partir d'une banque d'ADNc de bord du manteau conduit à l'obtention d'au moins 6 fragments d'ADNc en 3' du fragment de RT-PCR, de tailles approximatives comprises entre 800 et 2000 pb (**Figure III.10.a**). Les fragments de 1300 et 2000 pb (6,1 et 2) sont extraits et à nouveau séparés sur gel afin de bien les individualiser (**Figure III.10.b**) en vue d'être sous-clonés. Les clones sont contrôlés par extraction des plasmides au phénol/chloroforme. Les plasmides recombinants sont alors séquencés dans un premier temps à partir des amorces "reverse" et universelle du site de multi-clonage du plasmide pour déterminer les extrémités 5' et 3' du fragment inséré, puis à partir des amorces spécifiques sens et antisens. Un fragment de 3'RACE de 1155 pb (soit 874 pb supplémentaires du côté 3' du fragment de RT-PCR) est obtenu.

1.2.2. Criblage d'une banque d'ADNc.

La séquence de 3'RACE, extraite du vecteur plasmidique par digestion enzymatique (EcoRI ou PstI/SacII), est utilisée comme sonde pour le criblage de 300 000 clones de phages d'une banque d'ADNc de bord du manteau titrée à 8.10^9 pfu/ml (nombre de plages de lyse formées). Le criblage primaire aboutit à la sélection d'un spot de plages de lyse

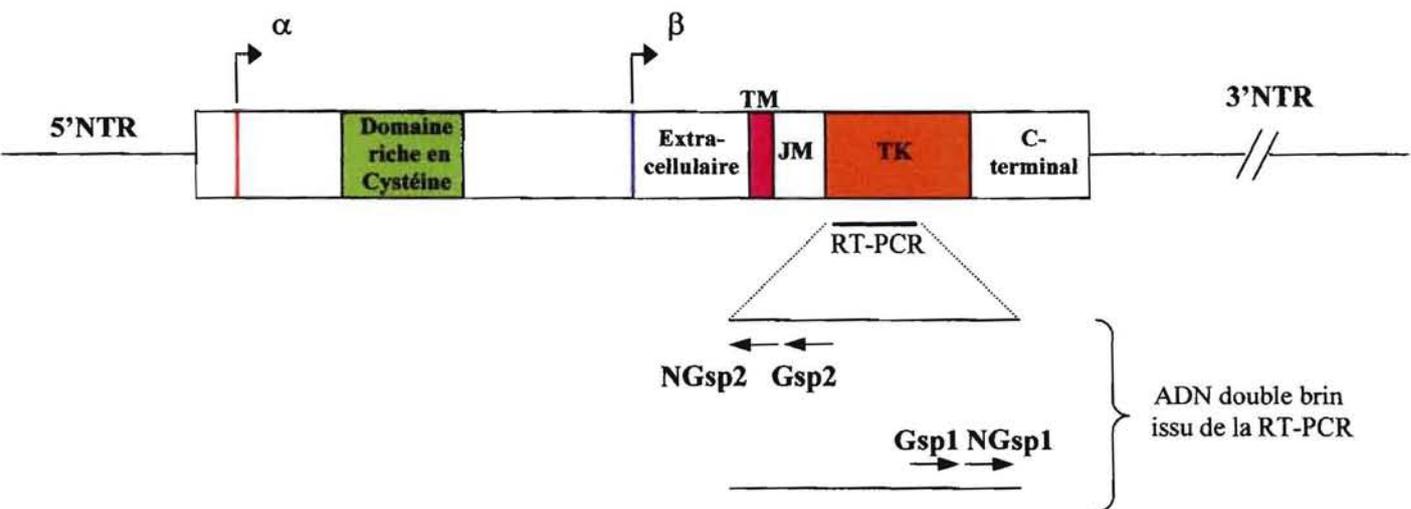
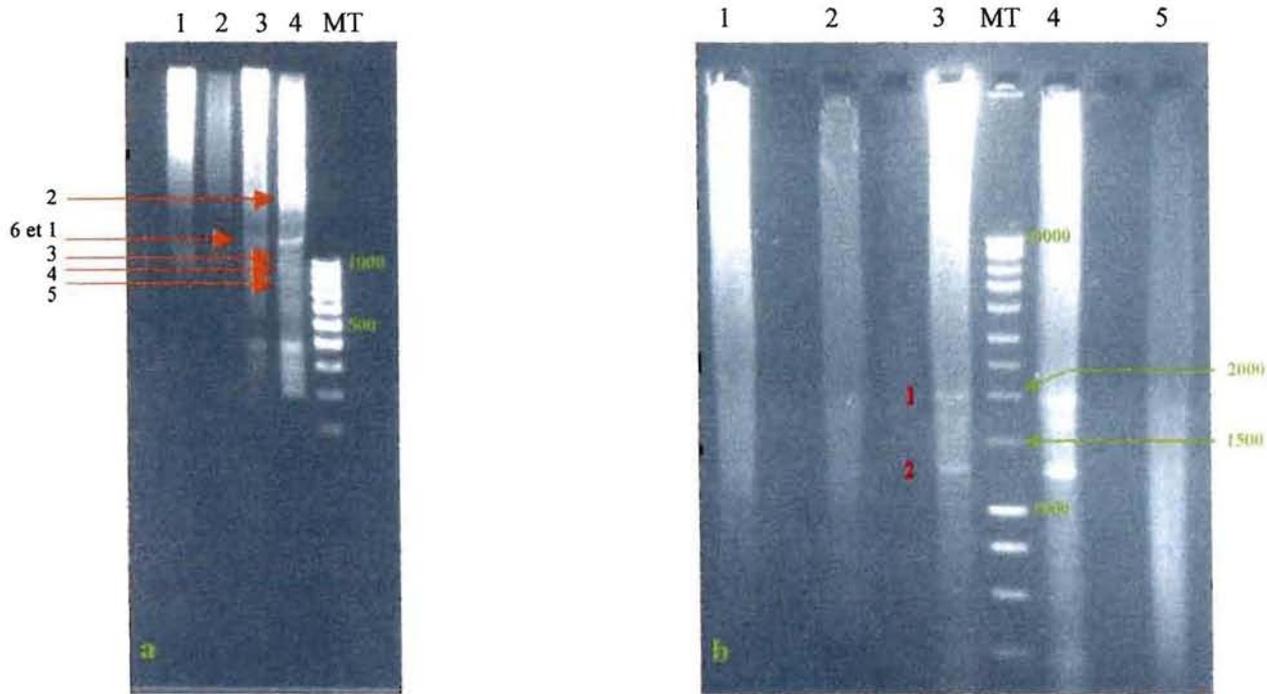


Figure III.10 : Technique du "Marathon cDNA Amplification" : seconde étape de la caractérisation du précurseur de CIR.

a : Profil de l'amplification en "nested" réalisée avec les amorces NGsp2 (puits 1 et 2) et NGsp1 (puits 3 et 4) à partir de $\frac{1}{2}$ (puits 1 et 3) ou de $\frac{1}{10^{\text{ème}}}$ (puits 2 et 4) de la précédente amplification par Gsp1 (3'RACE-PCR) et Gsp2 (5'RACE-PCR).

b : Contrôle de la purification des fragments de 3'RACE-PCR. Les puits 3 et 4 (migration des fragments amplifiés et purifiés 1 et 6) permettent de visualiser des fragments de tailles estimées à 2000 pb (1) et 1300 pb (2).

Les amorces (Gsp et NGsp) sont spécifiques du fragment de RT-PCR précédemment obtenu.

MT : marqueurs de taille (100 à 1000 pb) (Eurogentec).

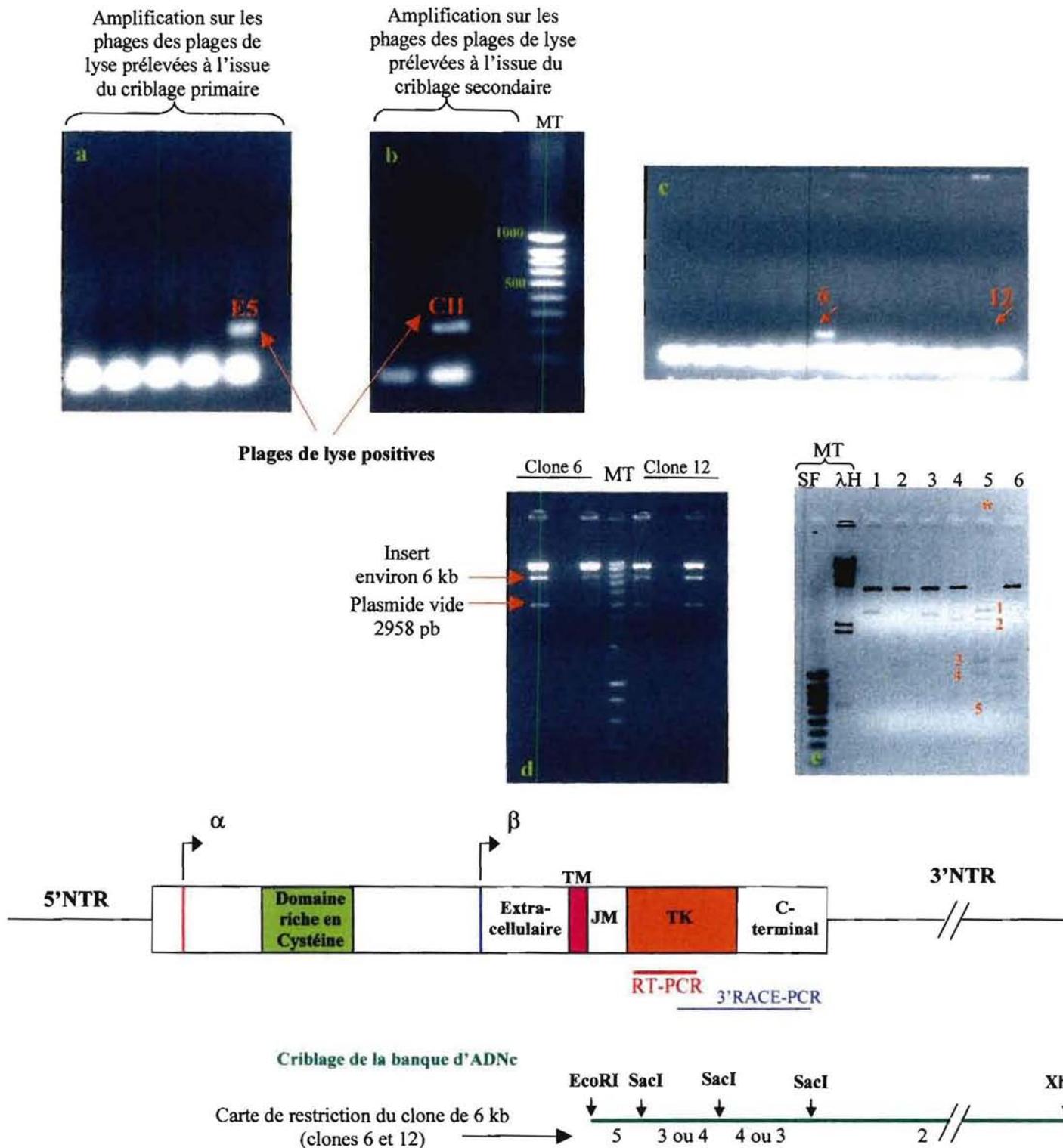
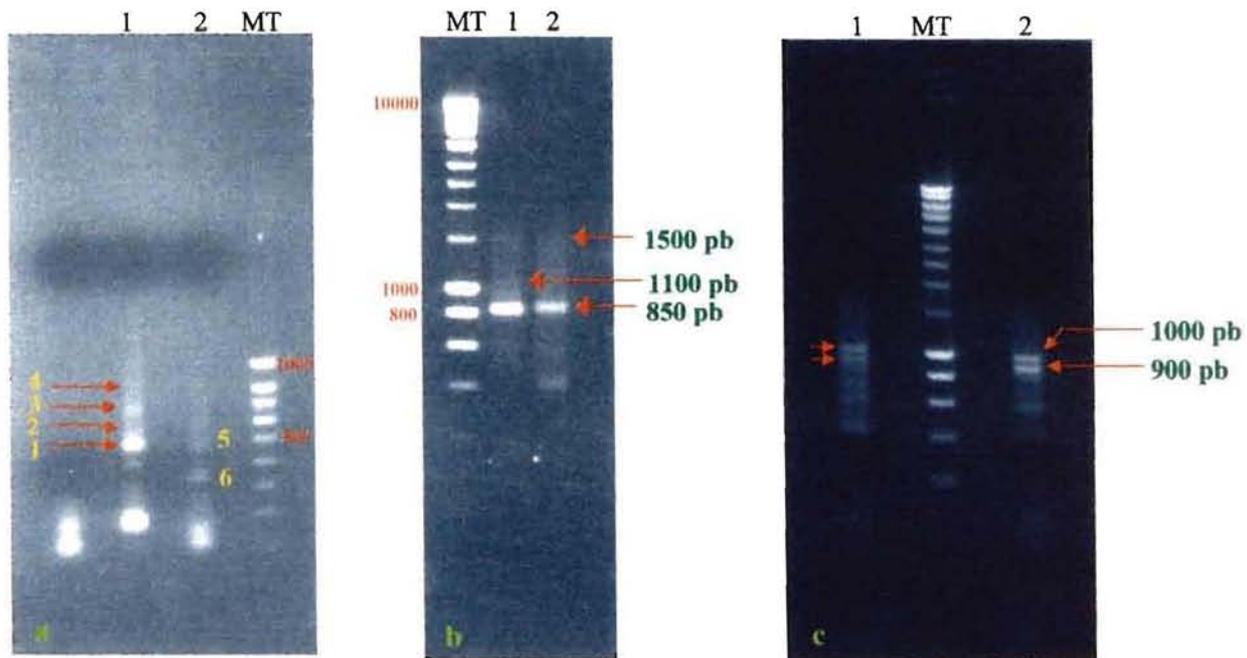


Figure III.11 : Criblage d'une banque d'ADNc de bord du manteau : troisième étape de la caractérisation du précurseur CIR.

- a et b : Contrôle des phages issus des criblages primaire (a) et secondaire (b) de la banque (sonde issue de la 3'RACE-PCR) par amplification à partir des amorces $\beta 1$ et $\beta 2$ spécifiques de CIR.
- c : Contrôle des clones issus de l'excision *in vivo* des phages de la plaque de lyse CII par amplification à partir des amorces spécifiques $\beta 1$ et $\beta 2$.
- d : Taille de l'insert des clones 6 et 12 déterminée par digestion enzymatique par XhoI/EcoRI.
- e : Digestion des clones par EcoRI/XhoI (1), EcoRI/SacI (2), EcoRI/EcoRV (3), EcoRV/XhoI (4), XhoI/SacI (5), EcoRV/SacI (6). La double digestion XhoI/SacI * est totale avec 5 fragments générés (1 à 5) de tailles respectives approximatives de 3000 pb, 2500 pb, 1500 pb, 1000 pb et 750 pb. MT : marqueurs de taille de 100-1000 et de 100-10000 pb (Eurogentec).



➡ clone de 480 pb

➡ clone de 1100 pb

➡ en cours

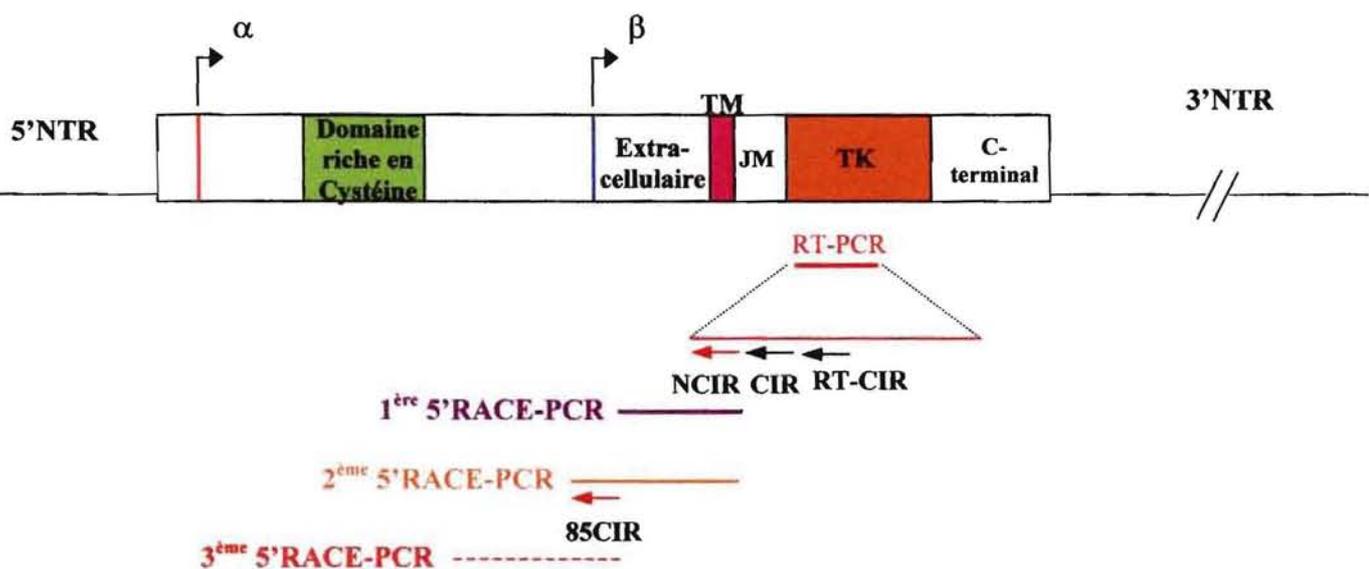


Figure III.12 : Profils des amplifications de 5'RACE-PCR : quatrième étape de la caractérisation du précurseur CIR.

- a : Amplification en "nested" par l'amorce NCIR d'1 μ l de l'amplification d'ARN polyadénylés (1) ou d'ARN totaux (2) rétrotranscrits par l'amorce RT-CIR et amplifiés par CIR.
- b : Amplification réalisée à partir d'ARN polyadénylés de bord du manteau rétrotranscrits à partir d'amorces aléatoires ("random primers", Promega). La reverse transcription est effectuée à une température de 50°C (1) ou à 40°C (2). L'amplification est réalisée à partir de l'amorce RT-CIR puis en "nested" à partir de l'amorce NCIR.
- c : Amplification réalisée par l'amorce 85CIR, à partir des ADNc précédemment obtenus (rétrotranscription par les amorces aléatoires).

MT : marqueurs de taille de 100-1000 et de 100-10 000 pb (Eurogentec).

E5 (contrôlé par amplification par les amorces $\beta 1$ et $\beta 2$ spécifiques du précurseur de CIR) (**Figure III.11.a**). Le criblage secondaire réalisé à partir des phages de ce spot permet d'isoler une plage de lyse positive nommée CII (**Figure III.11.b**). Après excision *in vivo* des phages de la plage de lyse CII, la présence de plasmides recombinants est contrôlée par amplification par les amorces $\beta 1$ et $\beta 2$ (pour éliminer d'éventuelles plages de lyse contaminantes) (**Figure III.11.c**). Deux clones (6 et 12) contenant un insert correspondant au précurseur de CIR sont isolés. La taille de l'insert, environ 6 kb, est déterminée par digestion enzymatique par les enzymes de restriction XhoI et EcoRI. (**Figure III.11.d**). La carte de restriction de l'insert est établie par double digestion XhoI/SacI (**Figure III.11.e**). Six fragments de tailles approximatives de 3000 (plasmide linéarisé), 2500, 1500, 1000, 750 pb sont obtenus. Les 4 derniers sont purifiés puis sous-clonés. Un contrôle des clones positifs est effectué par digestion enzymatique par SacI pour les clones des fragments de 750, 1000 et 1500 pb, et par XhoI/SacI pour les clones du fragment de 2500 pb. Seuls les inserts de 2500 et 1500 pb ont pu être sous-clonés. Le fragment estimé à 2500 pb est réellement constitué de 2448 pb codant pour la fin de l'extrémité 3' non traduite (3'NTR) du précurseur de CIR (**Figure III.13**). Le fragment estimé à 1500 pb correspond à une séquence de 1140 pb codant pour la fin du domaine transmembranaire (TM) jusqu'aux 48 premiers acides aminés du domaine C-terminal du précurseur de CIR (**Figure III.13**). A partir des séquences de 2448 pb et de 1140 pb, des amorces spécifiques antisens et sens sont préparées afin de poursuivre ultérieurement le séquençage complet du clone d'environ 6 kb.

1.2.3. 5'RACE-PCR.

A partir de l'extrémité 5' de la séquence disponible, des amorces spécifiques sont synthétisées dans le but de poursuivre la caractérisation en 5' de la séquence du précurseur.

La première amplification de 5'RACE-PCR est effectuée sur des ARN totaux de bord du manteau rétrotranscrits à partir de l'amorce CIR, et sur des ARN polyadénylés et des ARN totaux de bord du manteau rétrotranscrits à partir de l'amorce spécifique RT-CIR. Une ré-amplification par une amorce interne (NCIR) est réalisée sur les ADNc rétrotranscrits à partir de l'amorce spécifique RT-CIR (**Figure III.12.a**). Six fragments sont obtenus, mais seuls les fragments 1 et 6 de 480 pb (taille réelle de 450 pb) ont pu être caractérisés.

La seconde réaction de 5'RACE-PCR est effectuée avec les amorces RT-CIR puis NCIR sur des ARN polyadénylés de bord du manteau rétrotranscrits à partir d'amorces aléatoires. Un fragment de 1100 pb (taille réelle de 1058 pb) a été séquencé (**Figure III.12.b**).

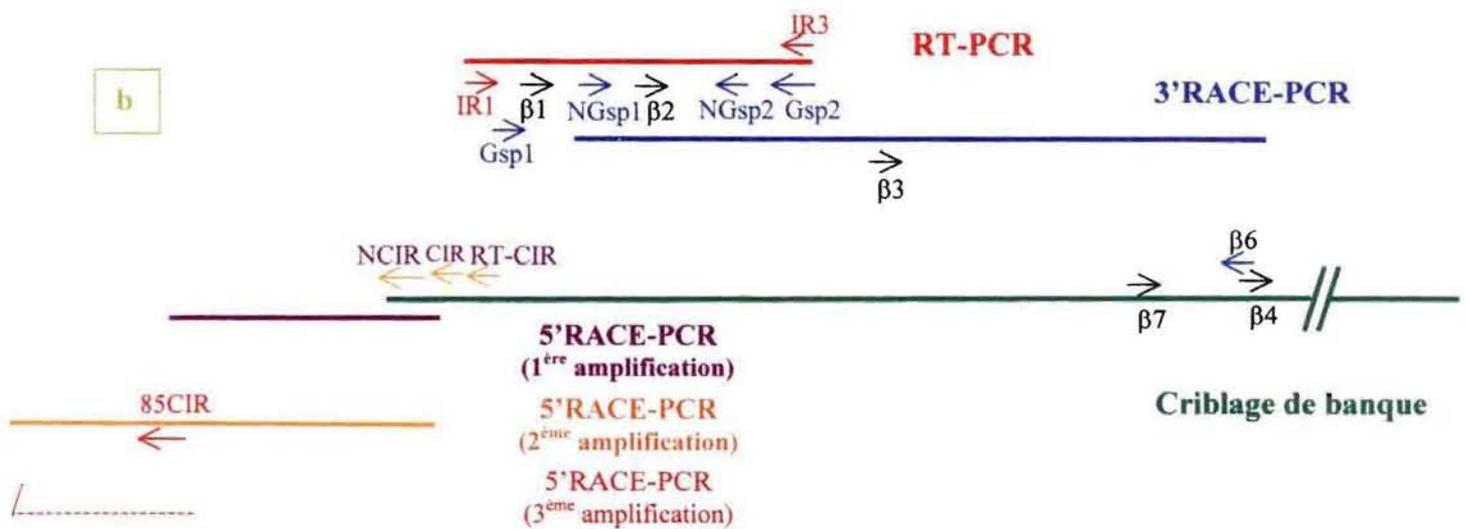
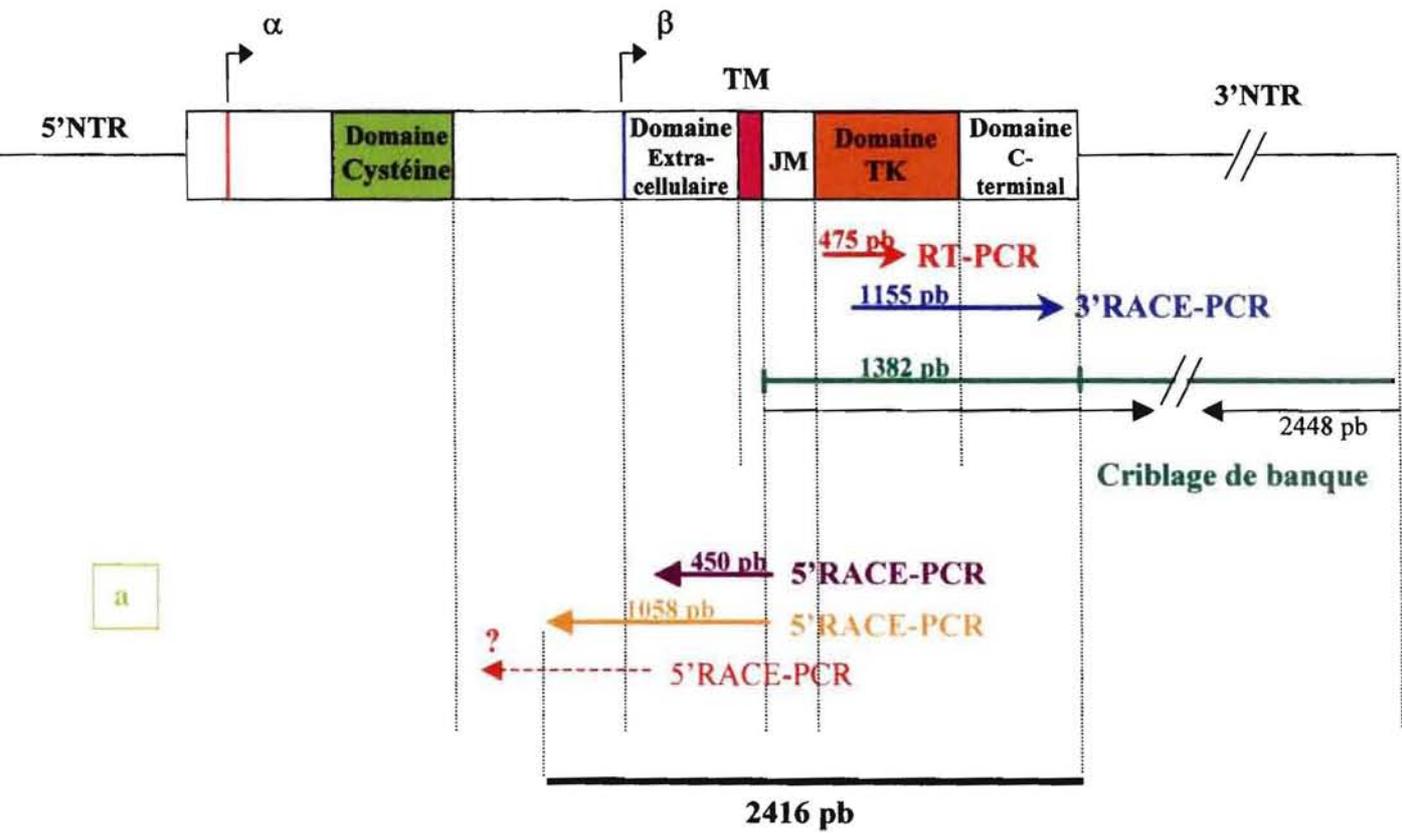


Figure III.13 : Etapes de la caractérisation du précurseur de CIR (a) et schéma de la stratégie de séquençage (b).

R N V I S A Q C S E C Q S E E I Q S	18
CGC AAT GTG ATT TCT GCC CAG TGC TCT GAA TGT CAA AGT GAA GAA ATT CAA TCA	54
S E G K G G E T L F K K N R R K F S	36
AGC GAG GGT AAA GGA GGG GAG ACG CTG TTT AAA AAG AAT CGC CGC AAA TTC TCC	108
N I T L P T N L P L K P N P T L R R	54
AAT ATC ACT CTT CCC ACC AAT CTA CCG CTG AAG CCA AAC CCA ACC CTA CGG AGA	162
Q E A R R Y S R E A S L P Y N A S A	72
CAA AGG GCG CGG AGG TAC AGT CGC GAG GCG TCA TTA CCA TAC AAC GCC TCC GCT	216
V N G L K I N L S D S E E N D T D V	90
GTG AAC GGA CTA AAG ATC AAC TTG AGT GAT TCT GAA GAG AAC GAC ACC GAT GTT	270
V N E T E K D L P F N R V I V Q T P	108
GTC AAT GAA ACA GAG AAA GAC CTC CCT TTC AAC AGA GTC ATA GTA CAG ACG CCC	324
V Q K N D M S Y I I S N L G H F Q D	126
GTG CAG AAG AAC GAC ATG AGT TAC ATT ATC AGT AAC TTG GGC CAC TTT CAG GAC	378
Y R I E V I A C Q E R D P R D P A K	144
TAC AGA ATC GAG GTG ATA GCA TGT CAG GAG CGA GAC CCG CGG GAT CCA GCC AAA	432
I K L C S I R A I S L G R T L P D K	162
ATA AAG CTG TGC AGC ATC CGT GCT ATT TCA CTA GGT CGA ACC CTG CCT GAC AAA	486
N A D N I D P K T I K I Y K M S N K	180
AAT GCT GAT AAC ATT GAT CCA AAA ACT ATT AAA ATT TAC AAA ATG AGC AAC AAG	540
T G E V I V Y W E E P K E P N G L I	198
ACA GGG GAG GTG ATC GTG TAT TGG GAA GAA CCT AAG GAA CCG AAT GGT CTT ATC	594
L S Y D I Q Y I K V M K D V K P N T	216
TTA AGC TAC GAT ATC CAG TAC ATC AAA GTT ATG AAA GAT GTG AAA CCG AAT ACC	648
L C V P H L K Y K K I G G Y K L Q K	234
CTG TGT GTA CCT CAT CTG AAG TAC AAG AAG ATA GGC GGC TAC AAA CTC CAG AAG	702
L D P G N Y S V Q I R A I S L A F T	252
TTG GAT CCA GGG AAC TAC TCC GTA CAG ATC CGG GCC ATC TCC CTG GCC TTC ACA	756
T N Y T E P R Y F V V S A P T T T A	270
ACC AAC TAC ACA GAG CCC AGA TAC TTT GTT GTG TCT GCC CCA ACG ACC ACT GCC	810
H W P P E T T A V D D E G U U L A	288
CAT TGG CCA CCT GAG ACC ATC ATC GCT GTC ACA GTA TCG GGG GTC CTC CTC CTA	864
L D I V V I G V W E I A R S R F K K	306
ATC CTC ATT GTG GTC ATC GGC GTG TGG TTC ATC GCC CGC AGC AGA TTC AAG AAA	918
I P D R P D F T S I N P D Y E H Y N	324
ATT CCT GAC AGA CCC GAC TTC ACT TCT ATC AAC CCT GAT TAC GAG CAT TAC AAT	972
P D E W E V E R D K I Q L I R E L G	342
CCT GAT GAG TGG GAA GTG GAG CGT GAC AAG ATT CAA CTC ATC CGT GAA CTA GGT	1026
Q G S F G M V R E G V A R D L R G K	360
CAA GGG TCA TTT GGT ATG GTG TAT GAA GGG GTT GCT AGG GAC CTG TAT GGT AAA	1080
G G E I K V A V K T V N E H A T R	378
GGA GGG GAG ATA AAA GTG GCA GTC AAG ACT GTA AAT GAA CAT GCA ACA TAC AGA	1134
E R M E F L S E A S R M K A F S C N	396
GAA AGA ATG GAG TTC CTT AGT GAA GCA TCC AGA ATG AAG GCC TTT TCC TGT AAC	1188
H V V R L L G V V S D G Q P A L L I	414
CAT GTG GTA CGG TTG CTA GGG GTG GTC TCC GAC GGA CAG CCA GCT CTG CTC ATT	1242

M E L M E K G D L K N F L R M H R P 432
ATG GAG CTG ATG GAG AAA GGC GAT CTC AAA AAC TTT CTC AGG ATG CAT CGA CCG 1296

V E E D I D S T F A G I K E H I S R 450
GTG GAA GAG GAC ATT GAT TCT ACT TTT GCT GGA ATA AAG GAA CAT ATT AGT CGA 1350

T P P T I K R I I Q M A G E I A D G 468
ACT CCT CCA ACC ATT AAA AGA ATT ATT CAA ATG GCA GGG GAA ATA GCT GAT GGC 1404

M A L A D K K F V H R 486
ATG GCA TAT TTA GCC GAC AAA AAG TTT GTT CAC AGG GAT TTA GCA GCA AGA AAT 1458

C E D L T V K I A 504
TGT ATG GTT GCT GAA GAT CTT ACT GTC AAA ATT GCT GAT TTT GGC ATG ACA AGA 1512

D I E T D R K G G K A L L 522
GAC ATA TAT GAG ACT GAT TAC TAC AGA AAG GGA GGT AAG GCG TTG TTA CCG GTG 1566

S L K D G I F T S L S D 540
AGA TGG ATG GCT CCT GAG TCC CTG AAG GAC GGT ATA TTC ACC AGT CTG TCA GAC 1620

V W S G V V L W E M A T L A A Q P 558
GTA TGG TCG TAT GGT GTG GTG TTG TGG GAG ATG GCT ACC CTA GCC GCC CAG CCC 1674

Q G L S N E E V L R V L N G R V 576
TAC CAG GGA CTG TCC AAT GAG GAG GTC CTG AGA TAC GTG TTA AAC GGT CCG GTC 1728

M E K P E D C P D R L F E L M Q K C 594
ATG GAG AAA CCC GAG GAC TGT CCA GAC AGA CTG TTT GAG TTA ATG CAA AAA TGT 1782

W R R P K Q R P T F K E I L E E L 612
TGG CGC TAC AGA CCA AAA CAA AGA CCA ACC TTC AAG GAG ATT CTA GAG GAG TTG 1836

V P E L D P S F A N K S Y F F S D E 630
GTG CCA GAG CTG GAC CCA TCG TTC GCT AAC AAG TCA TAC TTT TTC AGT GAT GAA 1890

N K Q D S L E Y I E E G D E D M D E 648
AAT AAA CAA GAC TCG CTT GAG TAC ATT GAG GAG GGT GAT GAG GAT ATG GAC GAG 1944

S K T P F I Q N E D E C D M K G A E 666
TCA AAA ACT CCT TTT ATT CAA AAT GAG GAT GAA TGT GAC ATG AAA GGG GCG GAG 1998

G G V D L P E L P D Q D I D D D I D 684
GGG GGC GTG GAC CTC CCA GAG CTC CCA GAC CAA GAT ATT GAT GAC GAT ATA GAC 2052

L G E D Y Y P P G Y Q E A Q H S Y Q 702
CTC GGG GAG GAT TAC TAC CCT CCC GGC TAT CAG GAA GCA CAG CAT TCG TAT CAG 2106

N G E L F P E L R I D K V N N V L Y 720
AAC GGG GAG TTG TTC CCC GAG CTG AGG ATT GAT AAA GTG AAT AAT GTG TTG TAT 2160

S R P Q A D K L M L N G T E P C D C 738
TCT CGT CCA CAA GCG GAC AAG CTG ATG CTG AAT GGC ACC GAG CCT TGT GAC TGC 2214

I L T Q E P N P D S H P D Q R F S S 756
ATT CTC ACG CAG GAG CCG AAC CCC GAT TCT CAC CCG GAT CAG CGG TTC AGT TCT 2268

C S N P Y S A I G S S D D S K D S S 774
TGT TCC AAT CCC TAC AGT GCA ATA GGT TCA AGT GAC GAT AGC AAG GAC AGC TCA 2322

K S S S S Y A Q M N G V H I A N G 792
AAA AGT TCC AGT AGC AGT TAC GCT CAA ATG AAC GGC GTC CAT ATT GCG AAC GGA 2376

H I A M H H L K T T K C * 805
CAT ATT GCC ATG CAT CAC TTA AAA ACG ACA AAA TGC TAG 2415 GTGTTATATTTTCCTCATT

CTTCCCCCTTCATAGTCATGTCTTAaGATAGATGTTATTGTGATCTCATTTTTACCaTATGTCATTGTTTCCATCATCTGA
ACTGtCAGTTTTATGAAAATTCTTTCCATGTGTGTTGACAGTAGTCAACTCATCAGACTTGGTCAAATAGGAAATACGTTGG

a

ATTCATGTTTTCCAACCTTGTGGTTTTCTTTTTTTTTGTCAGGTGAGAATGCTATGGGGCGTGGGTTGAAACATGTTGAATGT
 ATGATTACATTGAGCTCTGTTGAATATCTCAGTCCCATGTTGATGACAGATCTTTGATGTTTTTTGAGATTAATTTTATGAAC
 TGATTTATTTTTACCAATTAGTATAATGTNGAAGGNTTATTCT //

//ATTTTGAAGTCGGATTTAATTTGATCTTGCATTTCAAGCATTATTTAATATTAATTTCTAGAATTTCTCTAC
 CTTTATGCCAATTTAGAAAAGAATTTTCTTGTAAAGATTTTGTGAAAATCTCTACATAACAATGTTAGTATAT
 TTAGTGCCAAGTGTGCTGCATTACACAGATGTTTCTTATCCAAGACAAGAGATGGTCTACCATCTCCCCTCAGT
 TAGGAACACGGTCTGGTTTGGACTAAGCAACATTCCTTACATTATTTCTCAGTACAGGTCCCTGCCACCTCATA
 ATGTACATTTGCGGAGTCAAGGTTTTGATATTGACTGAGTGATACAGAGCAGTGTGATAGAAGAGGCCAAATGT
 GTCCAAACGAATAAAAGCATAATTTATGAAATATTTAATATGGCATTGTGATTCACTGGTTGGTTGTTAATCAT
 TTTGAAAACAGGAGAGACAAAAAGATTGTGTATGATACTTTGTTGAATGGTTTTTAAATGACCTTAGGAAGAGTAA
 AGAAATTTTTGTTGTTTTTCAAATGATTTCTTTGAAATTAATGCAGACCCGTTTTGACATTTTTTTCCCTACT
 GGCATTTATTGTTACATATCTTACATGAAATCATGCAGATATAACAAGGAGACCAAATTAGTGAGTGATTACATC
 ATGTCTATTTATATCTGTCATTATTATGTAGAAGTAACCTCTCGCTCTCTCTGGGTTTGTCCGTACCTCGGTCTC
 TCATCTGCAAACCTCTCTCGCTGCTCATCAATTATTGGTGGCAGATTGTTGAACTTCTAGCCAATCAAAAACCTGC
 TATGAAAAAATGGAGAGGTGGTTGGGGGGTCAATCACTGCCAAGCAATTAAGGGACAGATAAGGTGATGTGTAA
 TGGGGTATTCCATGCATTAGAAAATTAATGCACTTTGTGAACACGTAATCAGTCACCAGATTCAATTTTTTTTTTA
 TTTATTTAAATGTTCTCATTGTTTTAAGTGATTTCTTCTAATTTCTAAATATTTTAGAATAATGCTATCGAAAC
 ACAGAGTTTCAGATATGGTTCAAGATAAAAATAAGACATTTCTTTTTAAACTTTATTTAAACTAAGCCTACAGCA
 GATGAAGGGCACACATTGTGTTGATCATAAGAGACATGCCTGTATTATNTATGTTTCTACC TCTTCTCGTACAC
 ATATATTTATTGTTGTCATACGGGACTAATGCATTTCACTTCCAATAGGTGGTCTTTGGAATTTTTTAAGTTAA
 CAAAACATCTGTCATTTCAACAACATGAAATCTTGGGGATTTTTTTTTATTTGAAGATGGGTTGTTAAGAAAATG
 AAGGCATTCATAATTTATGTTTTAAAAGGGAACAATTTTTGCTTACTTTTTATTCTTTTTAATTTTTTACTGAATT
 GGTTAGATATTTTCACAATTTTATAATTGATTTAAATAAGGTATTCATTTTCAATTTACCAGGTATTTTATGCA
 TTACACAGAACTGATAGTCAATAAAGTGTGCTATATGNAATAGAAATGTCCATGTAATTGCATGCTATAAAA
 ATCATTTATAGAAAAGAATTTTAAAGATATTAACAAAATCAATACTTGGAGAAACATTTCTGTACCCTTTTG
 TGTTTACTATTTATTTAGGGAAACCAAATTTTTATTACACAATTTTCAGGCAGTTTCATACTAGACAGGATTTT
 ATATACAATTTACATCCATATTTAAATGTTTCTTGAATGATTCAGCAACTGATGACATTGTTGTCAGTACTGAAA
 ATATGTGTACATTTTATTACATACAAACTATGTTATGTGAGATTGATGAGTGACTGGATATATATGATTGA
 CGAGAAGTAAATGTGTGTGGTGTGGATGTGGTGAATGTGAAACAGAAGCTCTGTCATATTTCTAGTTCTTCTGTAT
 TCAAAAATAAAATTCGAAGTACAAAATTTGATATAAGTTGTAATTTATTTATTTTCCCATCTTTTTATTGG
 TTTTGAAGCAGTACTGATCAGAGATTATCAAAGATTCATTAATTTATTTTAAAAATCTTTTTTTCAATTT
 TTTTTTAAATTTTATGAAATATAATTTATTTCAAATGATATTTTGTAAACAGTGATAAATGTTTTGGAGTAAATC
 TGCTAAGAAATGTGTTTCTGGAAGCCTAGAAGTATGCTGGTCTGATTCAGTGCTGTATACACAGATGAGTATTTAT
 TAAAAACGGAATCAGCTCTGTGGTTCAATTTATACTGTTGTCTGTTGATCACATGACCATATAGTCGTTTCATTTG
 ATTCAGTGGCATTGTCATTGGGCTGTACATACTGCATTCATTTTTGTAGCTTTTGCCTACCAACCAAAGTAC
 AAAAAATGATTGTGTA **AATAAA** AAGCGAGTCAT **AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

b

Figure III.14 : Séquence nucléotidique et séquence protéique de l'ADNc partiel codant pour le récepteur CIR de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

a : Séquence nucléotidique et séquence protéique de CIR.
 Le site de clivage protéolytique tétrabasique est surligné en rouge (le second site potentiel de clivage est figuré par des acides aminés colorés en rouge), le domaine transmembranaire en [] et le domaine tyrosine kinase est encadré par des pointillés. Les cystéines de la sous-unité α ainsi que les sites de N-glycosylation sont colorés en bleu. Les sites d'internalisation du récepteur activé, de fixation de l'ATP, de liaison de l'IRS-1, le site majeur d'autophosphorylation, et le motif de liaison de protéines à domaines SH2 sont surlignés en jaune. Les motifs caractéristiques des protéines à tyrosines kinases de la famille des Rins/RIGF-1 sont surlignés en []. Les motifs de phosphorylation par la protéine kinase C sont encadrés en vert clair et les motifs de phosphorylation par la caséine kinase II sont colorés en vert. Les résidus tyrosyl du domaine TK sont surlignés en rouge et les résidus tyrosyl du domaine C-terminal sont colorés en rouge.

b : Séquence nucléotidique de l'extrémité C-terminale de la région 3' non traduite (3'NTR) correspondant à la queue poly(A⁺) du précurseur de CIR.

Les séquences de ces deux clones ont la même origine sur la séquence connue du précurseur CIR, à savoir l'extrémité 5' du domaine tyrosine kinase, et permettent de remonter via le domaine transmembranaire et le site de clivage protéolytique de 156 pb jusqu'à la fin de l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité α du précurseur (**Figure III.13**).

Une troisième amplification de 5'RACE-PCR est alors réalisée sur les ARN polyadénylés de bord du manteau rétrotranscrits à partir d'amorces aléatoires, mais avec cette fois-ci les amorces spécifiques 85CIR et 85NCIR désignées au niveau de l'extrémité 5' de la séquence de l'insert du clone issu de la seconde amplification de 5'RACE-PCR. Deux fragments de tailles estimées à 900 et 1000 pb sont obtenus et en cours d'analyse (**Figure III.12.c**).

1.3. Analyse de la séquence partielle du précurseur de CIR.

1.3.1. Séquence nucléotidique.

La stratégie de séquençage utilisée (**Figure III.13**) conduit à la caractérisation d'une séquence codante de 2416 nucléotides et des extrémités de la région 3' non traduite (3'NTR) (**Figure III.14**). La séquence 3'NTR représente 4 à 4,5 kb dont les 2448 nucléotides de l'extrémité 3' incluant la queue polyadénylée ont été séquencés. La queue poly(A⁺), composée de 18 résidus adénosine, est précédée d'un site de polyadénylation nucléaire (AATAAA) localisé 11 nucléotides en amont (**Figure III.14.b**).

1.3.2. Séquence protéique.

L'analyse de la séquence partielle du précurseur de CIR indique l'existence d'une seule phase ouverte de lecture. Elle représente une séquence peptidique de 804 acides aminés (**Figure III.14.a**). Par analogie avec les séquences de récepteurs de type insuline/IGF-1 précédemment caractérisés chez de nombreuses espèces de Vertébrés et d'Invertébrés, cette séquence correspond à la région carboxy-terminale de la sous-unité α et à la totalité de la sous-unité β (**Figure III.13**).

Les deux sous-unités pourraient être clivées au niveau d'un site potentiel de clivage protéolytique de 4 acides aminés **[R-R-Q-R]**, conservé et aligné avec les séquences de Vertébrés et contenant une séquence dibasique, situé 52 résidus en aval du début de la séquence connue. Un second site potentiel de clivage pourrait être **[K-K-N-R-R-K]**.

La sous-unité α incomplète comporte pour l'instant 56 résidus, parmi lesquels 2 sites potentiels de N-glycosylation, [N-I-T] et [N-P-T], et deux résidus cystéine conservés.

La sous-unité β complète représente 748 résidus et comporte 5 domaines structuraux caractéristiques des récepteurs de type insuline/IGF-1.

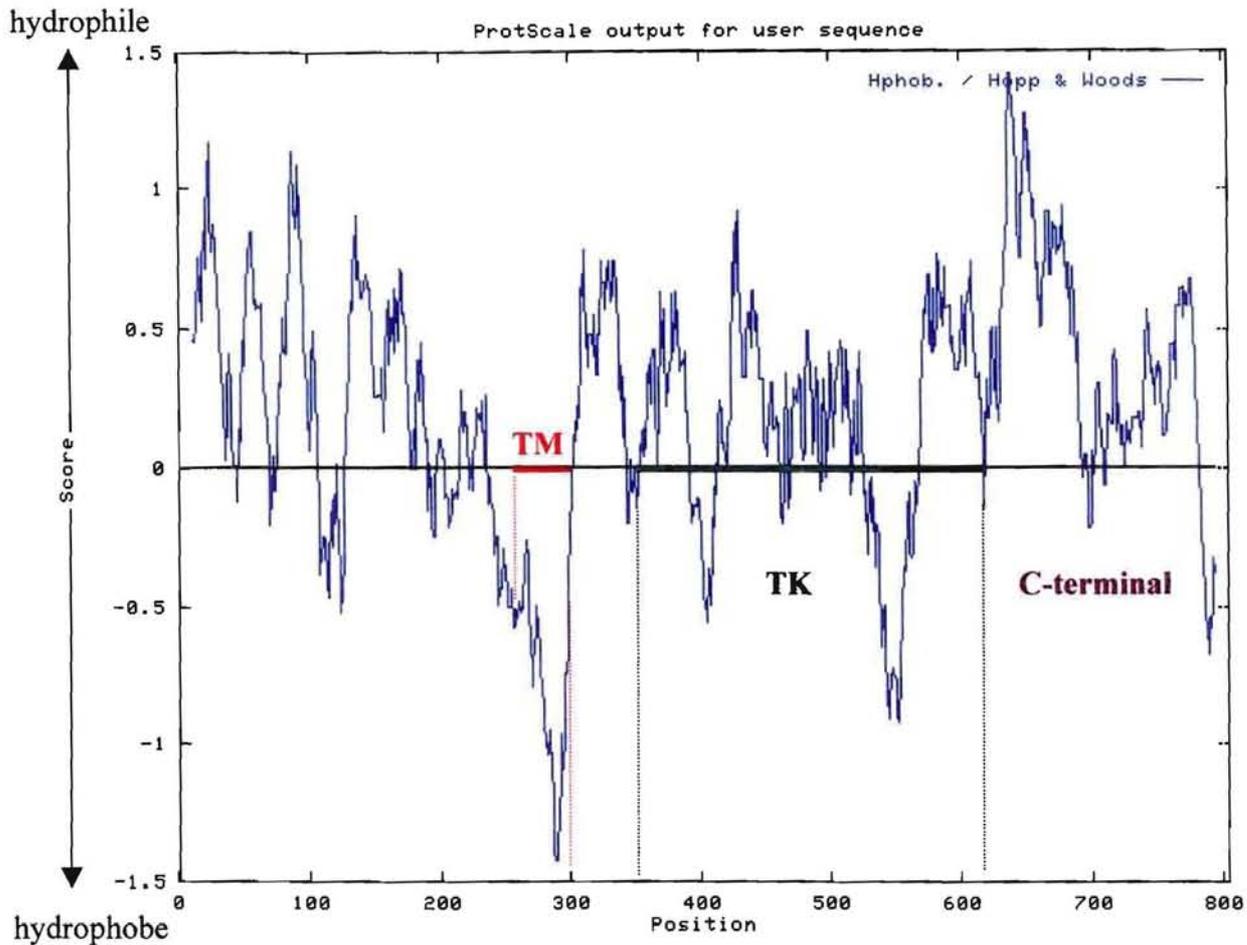
- La région extracellulaire de la sous-unité β , comprise entre le site potentiel de clivage protéolytique des deux sous-unités et le domaine transmembranaire, est caractérisée par la présence de 7 sites de N-glycosylation [N-X-S] ou [N-X-T].

- Le domaine transmembranaire, composé de 24 acides aminés, pour l'essentiel de caractère hydrophobe (**Figure III.15**), est susceptible de ce fait de s'organiser en hélice α . Il est immédiatement suivi en sa partie carboxy-terminale d'un triplet d'acides aminés hydrophiles [R-S-R] qui constitue un signal de fin de transfert à l'origine de l'ancrage de la chaîne β dans la membrane lors de la biosynthèse du récepteur.

- Le domaine juxtamembranaire de caractère hydrophile est composé de 38 résidus (**Figure III.15**), dont le motif [N-P-X-Y] qui représente un signal potentiel d'internalisation du récepteur activé.

- La principale caractéristique de la sous-unité β réside en la présence d'un domaine catalytique à activité tyrosine kinase (TK) qui se compose de 288 acides aminés dont 11 résidus **tyrosine** et notamment le motif [Y-X-X-X-Y-Y], site majeur de l'autophosphorylation et donc de l'activation du récepteur. Le domaine TK, du fait de sa fonction, comporte également un site potentiel de liaison de l'ATP [G-Q-G-S-F-G-X-V-X₁₉-K] responsable de la fixation de l'ATP et de l'autophosphorylation des résidus tyrosine du fait du transfert de groupements phosphoryles, et une séquence potentielle de liaison de la protéine d'ancrage IRS-1, substrat des résidus tyrosine phosphorylés, [I-A-D-G-M-A-Y-L-A-D-K-K-F]. Le domaine TK comporte également deux motifs caractéristiques des protéines kinases [D-F-G] et [A-P-E], deux motifs indicateurs de la spécificité du domaine TK pour les substrats des résidus tyrosyl phosphorylés [D-L-A-A-R-N] et [P-V-R-W-M-A-P-E] (Hanks *et al.*, 1988), ainsi que deux motifs "signatures" des récepteurs TK de classe II [M-T-R] et [M-V-A] (Jonas *et al.*, 1996). Le domaine TK comporte également 5 motifs [S/T-X-R/T] de phosphorylation par la protéine kinase C et 6 motifs [S/T-X-X-D/E] de phosphorylation par la caséine kinase II, dont 3 motifs chevauchant.

- La sous-unité β s'achève par un dernier domaine caractéristique, le domaine carboxy-terminal, de 199 résidus dont une forte proportion d'acides aminés de nature



1	11	21	31	41	51		
1	RNVISAQCSE	CQSEEIQSSE	GKGGETLFKK	NRKFNSNITL	PTNLPLKPNP	TLRRQRARRY	60
61	SREASLPYNA	SAVNLKINL	SDSEENDTDV	VNETEKDLPF	NRVIVQTPVQ	KNDSYIISN	120
121	LGHFQDYRIE	VIACQERDPR	DKAKIKLCSI	RAISLGRITL	DKNADNIDPK	TIKIYKMSNK	180
181	TGEVIVYWEE	PKEPNGLILS	YDIQYIKVMK	DVKPNTLCVP	HLKYKKIGGY	KLQKLDPGNY	240
241	SVQIRAIsla	FTNYTEPRY	FVVSAPTtTA	HWPPETIIAV	TVSGVLLLIL	IVVIGVWFIA	300
301	RSRPFKIPDR	PDFTSINPDY	EHYNPDEWEV	ERDKIQLIRE	LGQGSFGMVY	EGVARDLYGK	360
361	GGEIKVAVKT	VNEHATYRER	MEFLSEASRM	KAFSCNHVVR	LLGVVSDGQP	ALLIMELMEK	420
421	GDLKNFLRMH	RPVEEDIDST	FAGIKEHISR	TPPTIKRIIQ	MAGEIADGMA	YLADKKFVHR	480
481	DLAARNCMVA	EDLTVKIADF	GMTRDIYETD	YYRKGKALL	PVRWMAPEsl	KDGIFTSLSD	540
541	VWSYGVVLWE	MATLAAQPYQ	GLSNEEVLRy	VLNGRVMEKp	EDCPDRLFEL	MQKCWRYPK	600
601	QRPTFKEILE	ELVPELDPSF	ANKSYFFSDE	NKQDSLEYIE	EGDEDMDESK	TPFIQNEDEC	660
661	DMKGAEGGVD	LPELPDQDID	DDIDLGEDYy	PPGYQEAQHS	YQNGELFPPEL	RIDKVNNVLY	720
721	SRPQADKLML	NGTEPCDCIL	TQEPNPDShP	DQRFSSCSNP	YSAIGSSDDs	KDSSKSSSSS	780
781	YAQMNGVHIA	NGHIAMHHLK	TTKc				

Figure III.15 : Profil d'hydrophobicité de la séquence protéique partielle du précurseur CIR.

Le profil d'hydrophobicité est généré par le programme ProtScale (<http://expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) d'après la méthode décrite par Hopp et Woods (1981). En abscisses, la position des acides aminés, et en ordonnées, le score d'hydrophobicité calculé. La région rouge représente le domaine transmembranaire hydrophobe, suivi du domaine juxtamembranaire hydrophile, et la région verte représente le domaine tyrosine kinase, suivi du domaine C-terminal hautement hydrophile.

hydrophile (plus de 50%) (**Figure III.15**). Ce domaine renferme également 9 résidus **tyrosine** dont certains représentent des sites potentiels de phosphorylation, et le dernier, contenu dans le motif [Y-X-X-M], participe à l'élaboration d'un excellent site de liaison pour les protéines à domaines SH2 et donc à la transmission du signal. De plus, ce domaine comporte 2 motifs de phosphorylation par la protéine kinase C [S/T-X-R/T] et 2 motifs de phosphorylation par la caséine kinase II [S/T-X-X-D/E], qui doivent probablement également jouer un rôle dans la signalisation.

1.4. Comparaison de la séquence protéique du précurseur de CIR avec les séquences de récepteurs de type insuline/IGF-1 d'Invertébrés et de Vertébrés.

La séquence CIR incomplète est alignée avec les séquences tronquées (pour un alignement plus proche) des récepteurs de type insuline de deux mollusques gastéropodes, *Lymnaea stagnalis* (LsMIPR) et *Biomphalaria glabrata* (BgInsR), d'insectes, *Drosophila melanogaster* (DmInsR), *Bombyx mori* (BmInsR) et *Aedes aegypti* (AaInsR), d'un cnidaire, *Hydra vulgaris* (HvInsR), et d'un nématode, *Caenorhabditis elegans* (CeDAF-2) (**Figure III.16**). A noter que l'alignement ne tient pas compte des séquences de récepteurs de type insuline identifiées chez les spongiaires (Schäcke *et al.*, 1994 ; Skorokhod *et al.*, 1999) pour cause de séquences incomplètes au niveau de la sous-unité β . La séquence CIR est également alignée avec les séquences tronquées (pour un alignement plus proche) du récepteur de type insuline de l'amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* (BlInsR), des récepteurs à l'insuline (XlInsR) et à l'IGF-1 (XlIGF-1R) du xénope *Xenopus laevis*, des récepteurs à l'insuline (SmInsR) et à l'IGF-1 (SmIGF-1R) du turbot *Scophthalmus maximus*, et des récepteurs à l'insuline (HsInsR) et à l'IGF-1 (HsIGF-1R) de l'homme *Homo sapiens* (**Figure III.17**).

La séquence du précurseur de CIR présente une homologie globale plus importante avec les séquences de récepteurs de Vertébrés (de 38,9% avec SmIGF-1R à 41,2% avec XlInsR et 41% avec BlInsR et SmInsR) qu'avec les séquences de récepteurs d'Invertébrés (de 27,7% avec CeDAF-2 à 38,9% avec LsMIPR et BmInsR) (**Figures III.16.b et III.17.b**). En outre, le précurseur de CIR semble plus homologue aux récepteurs à l'insuline de xénope et de turbot qu'aux récepteurs à l'IGF-1 ; respectivement 41,2% et 41% contre 39,8% et 38,9%. Mais cette tendance ne se confirme pas vis à vis des récepteurs humains à l'insuline (40,1% d'homologie) et à l'IGF-1 (40,5% d'homologie).

CIR RNVISAQCSE-CQSEEQSSEGKGG---TLKKNRRKFSNITLPTNLP-LKPNPT--LR
LsMIPR --SNCKCPK-SKEEMDESRRKREIE---MYD...CKRYDKLP-DEVDLN--FD
BgInsR ----CCRCPM-SQEQLTTESQKRQVE---VH...CKRYDKLP-EEVDNT--LA
DmInsR ---GDCKCVEGSKKTSSQEYDDRKVQAG-ME...PNIRKSKNGSSDKSDGAE
BmInsR ---GVCACKEEAKPSLRFSTRAEERVD SIN...RKSERVN--PKIHKS--ID
AaInsR ---NYCKAPTSGGSTGTIDVTDKENQ---I...KNPLL...DKT----
HvInsR YCNISCVUDE-EKENSKAIKADREAHNFVE...KNKFSYR--NKNKS----
CeDAF-2 -GCCSCSAIEESSEQNKKRPPMSAIESSA...LDE...PRDTMRVRSIEDANRVS

CIR -----RQRARRYSREASLP-----YNASAVNGLKINLSDS
LsMIPR -----GMNLPQLVEMN-----YN--SSETS DR
BgInsR -----HLSIDFLVEHSDSKLLW---QELTNSGYNETHLN--ETLVVDT
DmInsR GAALDSNAIPNGGAT-NPSRRRRDVALEPELDD---VEGSVLLRHVRSITDDTDAFFEK
BmInsR G-----TSKVKRSVDHSLN-----SMLVKLTE---N
AaInsR -----TRRKRSTNLL-----FPNTE---NK
HvInsR -----PPKIDFSKN-----IS-----LILS
CeDAF-2 EELEKAEN-----LGKAPKTLGGKKPLIHIS--KKKPSS--SSTSTPAPTIASMYA

CIR EENDTDVVMETEKDLFPNRV-----IVQTPVQKNDMSYIISNLGHFQDYRIEVIACQ--
LsMIPR IEVFPNYVIENTSDLANLTE-----IVKEVVVYGTTEVTLNLEHFSEYSIEVIACQ--
BgInsR LEGETTI IQGISNYSNPYP-----TIMEVEVYFATEVTLTNLDHFSEYSIEVIACH--
DmInsR DDENTYKDEEDLSSNKQFYE-----VFAKELPPNQTDFVFEKLRHFTRYAIFVVACR--
BmInsR NSPRPGLNYSNITDDEGYVK-----SLYYELDGSTRTLTVKNMRHFTWYTVNIWACR--
AaInsR KNDTDRRTEKVK-DEPYQ-----YIFNATNETSITFPLSYFNHYSLYVFKIRACRHP
HvInsR NKILTSTSTVTQAKIEIE-----EPKVTVNGNIFSYVISGLDYFEDYELKVCGET--
CeDAF-2 LTRKPTTVPGTRIRLYEIEYPLPGSWAINVSALALDNSYVIRNLKHYTLVAISLSACQN-

CIR ----ERDPRDPAKIKLCSIRAIISLGRTPDK-NADNIDPKTIKIYKMSNKTGEVIVYW-E
LsMIPR ----DYNEKVL--KLCSIRAITFERTKDSY-AADMINETTVDTEIETNFTGNVFIKW-E
BgInsR ----ETNTNISGAKYCSIRAITLGITHPNW-RQDKINESSIEIEVETNYTGRVFIKW-D
DmInsR EEIPSEKLRDTSFKKSLCSYDVTVFQTTKRKKFADIVMDLKVDLEHANNTEPATFSLGR
BmInsR -NKDLNETDPVYAENWCSVRAYNFRTLELP-NADVSNFQVEIMPANKTLPEVNVTW-E
AaInsR GDPPAPSVRLVDVELACGNEVFENFRTPKKEGADDIPPESILIEEQSNNTQRQIRVQW-K
HvInsR -----VVGCRPSSTINLDCGIVQARTGVNLTADNLDKMRVQVQLDSYNISW-I
CeDAF-2 -----MTVPGASCSISHRAGALKRTHIT-DIDKVLNETIEWRFMNSQ-QVNVTW-D

CIR EPKEPNGLILSYDIQYIKVMKD-VKP---NTLCVPHLKYKKI-GGYKLQKLDPGNYSVQI
LsMIPR SPTSPNGLILKYLLWYKQENLVP---QTICITRQEYLKN-LGYKLTRLEPNWTFKI
BgInsR SPPNPNGLIMSYIVYKQENAVG---TQLCLTRQEYLKN-HGYRMKLDYGNFTFKI
DmInsR HQLDPNGEIVTYEVAYKLQKPDQVE---EKKCIPAADFNQT-AG-YLIKLEGLYSFRV
BmInsR PPLNPNGFVAVNVHYSRIEDSAQGPVGLQSCITVDDYEANGHGYVLKTLSPGNYSVKV
AaInsR EPSKPNGPVIVKVVYQYRVDLESVSS---TDICIRYSSFNQT-RGALLTKLEPNYSIRV
HvInsR APHKPNVAVILKYEISIRYALDK-----DALVICRPGYLPT---YIIRKSRFGNYVAKI
CeDAF-2 PPTEVNGGIFGYVVKLKSVDGSIVM---TRCVGAKRGYSTRNQGVLFQNLADGRYFVSV

CIR RAISLAFTTNYTEPRYFVVSAPTTTAHWPPETIIAVTVSG-VLLLILIVVIGVWFIARSR
LsMIPR SAISLAENSSFTLERFFIVRPPDPSSNTLLIVAVLAFVGLTVSLIVACVYKQKIR
BgInsR GTLSLAGNKTFTSEKFFILPKPPGDDSNLLLIVGLVVGICCAIMIVGIAVVLYRQKIL
DmInsR RANSIAGYGFTEVEHIKVEPPPS---YAKVFFWLLGIGLAFLIVSLFGYVCYLHK-RKV
BmInsR TPITVSGAGNVSEIYVFI PERVSE--SGHAWAWGVGAGGVVLLVGAAVVYARRGLMS
AaInsR MATTIAGDGAPSAARYVLIKDDSD---MGTTLIWLGLTIVIFLCSVGF-VAFYWK-YRY
HvInsR RAISPAGNGSWTEEIHFKVAELSVTKNNQLIIGIISAVSAVIVALLVFILLYMFLHRKL
CeDAF-2 TATSVHGAGPEAESDPVVMTPG---FFTVEIILGMLLVFLILMSIAGCIIYYYIQVRY

CIR FKKIP---DRPDTSNPDYEHYNPDEWEVERDKIQLIRELGGGSFGMVYEGVARDIIGK
LsMIPR SDDMT---VISRNMNYVPSEILYISDEWEVDRDKIKLIKELGGGSFGMVYEGVAKGIRDD
BgInsR PTGTT---VISPNANYVPSEHVNLDEWEVSRDKIRLIRELGGGSFGMVYEGIAKGLRDD
DmInsR PSNDL---HMNTEVNPYASMQYIPDDWEVLRNIIQLAPLGGGSFGMVYEGILKSFPPN
BmInsR HAEAS---KLFASVNPYVPTVYVPDEWEVTRDSIHFIRELGGGSFGMVYEGIAKEIVKG
AaInsR MSKQI---RMYPEVNPYAGVQYKVDDEWEVERNHI IQLEELGGGSFGMVYKGIILTQLRGE
HvInsR EKDVQGVLYASVNPYMNKSEVYIPDEWELNREKIELIRELGGGSFGMVYEGIAHGIGDH
CeDAF-2 GKKVKALSDFMQLNPEYCVDNKYNADDWELRQDDVVLGQQCGEGSFGKVYLG TGNNVVS

CIR --GGEIKVAVKTVNEHATRERMEFLSEASRMKAFSCNHVVRLGCVSDGQPALLIMELM
LsMIPR -PNEEIPVAVKTVNDRASFSDRREFLKEATTMKEFHCHHVVKLLGVVSTGQPALVIMELM
BgInsR DPEEEIPVAVKTVNERANFTDTQEFLEATIMKAFHCHHVVKLLGVVSTGQPALVIMELM
DmInsR --GVDRECAIKTVNENATDRERTNFLSEASVMKEFDTYHVVRLLGVCVSRGQPALVIMELM
BmInsR --KPETRCAIKTVNEHATDRERIEFLNEASVMKAFDTFHVVRLGCVVSRGQPALVIMELM
AaInsR --KCNQPCAIKTVNESATAREKDSFLLEASVMKQFNTHHVVRLLGVVSTGQPALVIMELM
HvInsR ---AELRVAVKTTNENASIHDRIQI LQEASIMKAFNCNHVVVKLLGVVSTGQPALVIMELM
CeDAF-2 MGDRFGPCAIIKINVD DPASTENLNYLMEANIMKNFKTNFIVKLYGVISTVQPAMVMMEMM

CIR EKGD LKNFLRMHRPVEED--IDSTFAGIKEHISRTPTTIKRIIQMAGEIADGMA LADKR
LsMIPR ALGD LKNYLGRHRPDED-----HPGVMPHLLDILQ MAGEIADGMAYLADKK
BgInsR PLGD LKTYLQQLRPDEE-----HPFATPPTLLEILQMTGEIADGMAYLADKK
DmInsR KKGDLKSYLRAHRPEERDEAMMTYLNRI GVTGNVQPPTYGRIYQMAIEIADGMAYLAACK
BmInsR ERGD LKTYLRSMPD-----AEGSLPSS-PPVPPTLQNILQMAIEIADGMAYLSAKK
AaInsR ANGDLKSYLRRHRPD-----YEMRRSIR---QPPTLRQIIQMAIEIADGIGVLSAKK
HvInsR GRGD LKSYLKERPPD-----GGIPLMRQEIYQMAIEIADGMAYLAARK
CeDAF-2 DLGNLRDYLRSKREDE-----VFNETDCNFFDIIPRDKFHEWAAQICDGMAYLES LK

CIR FVHRDLAARNCMVAEDLTVKIA DFGMTRDIETD R KGGKALLPVRWMAPE SLKDGIFT
LsMIPR FVHRDLAARNCMVSEERTVKIG DFGMTRDIYETDYR KGGK GMLPVRWMAPE SLKDGVFT
BgInsR FVHRDLAARNCMVAGDRTVKVGD FGMTRD VYETDYR KGGK GMLPVRWMAPE SLKDGVFS
DmInsR FVHRDLAARNCMVADDLTVKIG DFGMTRDIYETDYR KGT KGLLPVRWMPPE SLRDLGVYS
BmInsR FVHRDLAARNCMVAGDLTVKVG DFGMTRDIYETDYR KGT KGLM PVRWMSPE SLKDGVFS
AaInsR FVHRDLAARNCMVADDMTVKIG DFGMTRDIYETDYR KGT KGLPVRWMAPE SLKDGIFS
HvInsR FVHCDLAARNCMVASDFTVKIG DFGMARDIYERNYYR KDGK SLLPVRWMAPE SLKDGIFS
CeDAF-2 FCHRD LAARNCMINRDET VKIG DFGMARDLFYHDYR KPSGKRMM PVRWMSPE SLKDGKFD

CIR SLSDVWSGVVLWEMATLAAQF QGLSNEEVLRVLNG-RVMEKPEDCPDRLFELMQKCW
LsMIPR SLSDVWSYGVVWEMVTLAAQPYQGLSNEEVVKFISDG-YIMELPENCPNEMAYLMQHCW
BgInsR SMSDCWSFGVVLWEMVTLAAQPYQGLSNEEVVRFVTDG-HVMDIPENCPPEMAFLMRLCW
DmInsR SASDVFSFGVVLWEMATLAAQPYQGLSNEQVLRVVIDG-GVMERPENCPDFLHKLMQRCW
BmInsR SSSDAWSYGVVLWEMATLAMQPYQGLSNEQVLRVVEG-GVMERPENCPDRLYELMRACW
AaInsR SSSDVFSYGVVLWEMATLASQPYQGLTNDQVLRVVIDG-GVMERPENCPDNLNLMRRCW
HvInsR TASDVWSFGVVLWEICTLASQPYQKTNQVLRVVIDG-GHLDYPEGCDYQLREFMSLCW
CeDAF-2 SKSDVWSFGVVLVEMVTLGAQPYIGLSNDEV LNYIGMARKVKKPECCENYWKVMKMCW

CIR RRPKQRPTFEKILEELVPELD-PSFANKSFFSDENKQD-----SLEI
LsMIPR AKKPNQRPTFKAIIE LLPKLK-PSFEKVSFFTSGGGHTDGAG-----EG--TLAEP
BgInsR ERRPNKRPTFKAVIKFLLPKLK-SSFEKVSFSSGSDTHDGAGPGNIELFEG--TLELI
DmInsR HHRSSARPSFLDIIA LEPQCPNSQFKEVSFHSEAGLQHREKERKERNQLDAFAAVPLD
BmInsR THRPSARPTFLQLVADLVPHAM-PFRHRSEFFHSPQ-----GQEL
AaInsR QHRPTARPTFMEIISELLPDAS-PHFQDVAFNSQD-----ALDML
HvInsR HRDPKMRPSFLEIVHVLNEVD-DDFVMVSFHEMKR-----KALEDI
CeDAF-2 RYSPRDRPTFLQLVHLLAAEAS-PEFRDLSFVLTDNQMILDDSE-----ALDLD

CIR E-----EGDEDMEDESKTPFIQNEDECDMKAEG-----GVD-----
LsMIPR EGSDSSSINSLSCEGAAAPRQSLTPCGGGQFKSSTHFNGGSHT---LDEGVDRRET---
BgInsR ERREDATSINSFCIEGAAAPKQSSLPQSNAEGNSQFGITETVFQ---FDDELVP-----
DmInsR QDLQ-----DREQQEDATTPLRMGDQQNSSLDQPPE SPIAMVDDQGSHPFSL
BmInsR ALQR-----SALDEEQELPEVDVGAVATGSVSNLFGVS-----GRLASWVR---
AaInsR RGQH-----QTVIID EATTPLRPGDDHD-----EPPGED-----DDLVGHG---
HvInsR MKSES-----IKSDA TMSDGTKGDGNMQNMLSR SQNR-----KSAIEKS---
CeDAF-2 DIDDTDMN---DQVVEVAPDVENVEVQSDSERRNTDSIPLKQFKTIPPINATTSHSTISI

CIR -LPELP--DQD-----I--D-DDID-----
LsMIPR ILNGVDDGDEDEAAG----RSLSEFGEDLDDSSRPF-----
BgInsR -LGM DNEDDEEDC-----FISEFGDDVDDSSQPF-----
DmInsR PSGFIASSTPDG-----QTVMATAFQNI PAAQGDISATVVPDADALDGDGRGEIYD
BmInsR ELSSLRSRGSDD-----AAAEPLQPLPPP-----
AaInsR -EGHIGDVGTDD-----EFSMEMENTS-----
HvInsR -KERLSISSLD SG-----TVEK DANDTP-----
CeDAF-2 DETPMKAKQREGS-----LDEEALMNHSGGPS-----

CIR -----LGED PPG QEAQH-----
 LsMIPR -----MSDDFI PPVMTRQPL-----
 BgInsR -----MPESHTSSVNPRQPLS-----
 DmInsR PSPKCAELPTSRSGSTGGGKLSG---E--QHLLPRKGRQPTIMSSSMPDDVIGG-----
 BmInsR -----TSPAPILAPAP-----
 AaInsR -----HLVRNNARWP-----
 HvInsR -----EEIPKKKKRP-----
 CeDAF-2 -----DAEVRT AGDGD VERDVREND-----

CIR -----S Q-NG-----ELFPELRIDKVNVL SRP
 LsMIPR -----LSHQSNNGDSNVRNSGLIELKPLINKDKRPGGLSSPRL
 BgInsR -----H-----QSHHSNGSEASLHNSGLIEMKPLIKKEKSRGSPSPKQ
 DmInsR -----SSLQPSTAFFTTSSNASSHTGRPSLKKTIVADSVRANKAN
 BmInsR -----AIKGPNG
 AaInsR -----RSVR-----
 HvInsR -----RSKRNSAVDSNACETKP
 CeDAF-2 -----VPTRRNTGASTSS TGG

CIR -----QADKMLNGTEPCDCILTQEPNPD-----
 LsMIPR N-----ARSNPFSE IGH PPTLTTELETNG-----N
 BgInsR -----TIIPRPVE LDHGPPTLEMKPDPRS-----
 DmInsR FINRHL N--HKRTGSNASHKSNASAPSTSSNTNLTSHPVAMGNLGTIESGGSGSAGS
 BmInsR -----VLRDHSARFRN-----
 AaInsR -----HTR-----
 HvInsR -----MLRVES--L DNHDAPS--EN-----
 CeDAF-2 GP-----CLTNRGGSNERGAGFGEAVRLTDGVGSG-----H

CIR ---HPDQRFSSCSNP SAIGSSDDSKDSSKSSSS---S---AQM-----
 LsMIPR QSSHNNNSFELMTPDPLKSGPASESSNGVSSSSWRPKPILKLPNLN-----QAR
 BgInsR -SLPQNNPFSTSTADPLRLGPHNTIASSNLPGLVSRPNLRLPVLSPPTTGFKIVSQHN
 DmInsR TGTPRF TTPSATPGGGSGMAISDNPN RLLEDSIASEQATILTTSSPNP EMMHPPTSL
 BmInsR -----
 AaInsR -----
 HvInsR -----MQ GDTVPGKSDLMHPETNRELRLSEIF GKPIPV-----
 CeDAF-2 LNDDD VEKEISSMDTRRSTGASSSS GVPQTNWSGNRGAT TSKAQQAATAAAAAA

CIR -----GVHIANGHIAMHHLKTT
 LsMIPR VGDS-----VGCLCLTLGTRINIVKPIETV
 BgInsR SGDNTDAGRQDKPPSG-----QPIVTHPAAPLANLVHFENELESP
 DmInsR VSTNPN MPMNETP-----VQMAGVTISHNPN QPMQAPLNAR
 BmInsR -----
 AaInsR -----
 HvInsR -----
 CeDAF-2 LQQQQN-----GGRGDRLTQLPGTGHLQST

CIR KC-----
 LsMIPR RP-----ETN---TIR-----LKPPHPML--I
 BgInsR QATGLSLPDQH SSTPSAIATTNSSDGSKESTKSSSESFLRNLGTNGHI LPPQIDIGQP
 DmInsR QSQSSSDEDENEQEEDDEDEDDDDVDDEHVEHIKMERMPLSRPRQRALPSKTQPPRSRSVTK
 BmInsR -----
 AaInsR -----
 HvInsR -----
 CeDAF-2 RGGQDGD IETEPKN RNNGSPSRNGNSRDI FNGRSAFGENEHLIEDNEHHPLV-----

CIR -----
 LsMIPR WSTLKMVLVL-----
 BgInsR HANLIHVLLLLKHVKGNKV-----
 DmInsR RENLLRIPTPESERQEPETDPTCLKRTGCDRRVRQGLHHPMDSSEGRNR EL
 BmInsR -----
 AaInsR -----
 HvInsR -----
 CeDAF-2 -----

CIR -----CSEEQSEEIQSSEGGGETLFFKNRRKFSNITLPTN-----LPLKPNP-
BlInsR -----CCECPKSEDEIRIEEE-EAAFQOEFENELNNYHK-----RENET
XlInsR -----CCPCPKTEFQIQKEQD-ESAFRKTFFENLNEFIP-----RP---
XlIGFIR -----YCACPKTEAEKAEKD-EAEYRKVFENFLNSFVP-----RP---
SmInsR -----CCACPKTDNQLKKEQE-EIEYRKTFFENLNESES-----RP---
SmIGFIR -----CCPCPKSVEDLEAEAA-DASYRKVFENFLNSFTP-----RPP---
HsInsR -----CCSCPKTDSQILKELE-ESSFRKTFFEDLNVFVPRKTSSTGAEDPRP---
HsIGFIR -----CCACPKTEAEKQAEKE-EAEYRKVFENFLNSFVP-----RP---

CIR -TLRQRARRYSRASLPYNASAVNG-----LKINLSDSEENDTDVVNETEKDLPFNRI
BlInsR RAGRRLRRLPVTARPFYSNQTVNVT-----LPSTNRTVPPTPTPNPNPQ----
XlInsR --VRKRRDLFGVANGTLPDPVTAPP-----LFNVSSSTRAPDEPEPKI----
XlIGFIR --NRRRRLDVLAVGNSTVTSYEKNST-----TEDFSNFSDSERDDIEYPF----
SmInsR --SRRRRLSVGVANATQLPNFLTTPVS-----LSFGSTTATPDEDEDDEGSK----
SmIGFIR --DRRRRLDLFGFANSTHSRRHRLHTNSSHVPPHQAAGNNSSTTAEPEQADREFEF----
HsInsR --SRKRRSLGDVGNVTVAVPTVAA-----FPNTSSTSVPTSPEEHR----
HsIGFIR --ERKRRDVMQVANTTMSRSRNTT-----AADTYNITDPEELETEYPF----

CIR VQTPVQKNDMSYIISNLGHFQDYRIEVIACQERDPRDPAKIKLCSIRAIISLGFITLPDKNA
BlInsR LETTVWN-EHMVVLTLGRHFSEYIEVIAQN-----ADAAVG-CSGSAVELARTQADDSA
XlInsR YSQVWFK-ESVLISGLKHFYRRIEIHACN-----HELMSG-CSVAAYVNARTMPEATA
XlIGFIR YETKVDYKWERTVISNLQPFLLYRIDIHSCN-----HEAEKLGCSASNFFVARTMPAAGA
SmInsR VELKVFLK-ESTVISNLHHFTSYKIEIMACN-----HPTDLKRCSMATYVSARTMPEEKA
SmIGFIR MEQAVS---ERVQIFDLQPFVYRIDIHACN-----RQVQR--CSAAEFVFSRTKPAEKA
HsInsR PFEKVVNK-ESLVISGLRHFYRIELQACN-----QDTPEERCSVAAYVSARTMPEAKA
HsIGFIR FESRVDNK-ERTVISNLRPFLLYRIDIHSCN-----HEAEKLGCSASNFFVARTMPAEGA

CIR ENIDPKTIKIYKMSNKTGEVIVYWEEPKENGLIILSYDIQYIKVMKD---VKPNTLCVPH
BlInsR ENI-PGNITVVEI--KEDMAKLYWPKPDSNSMVVHNIYKKLGSDFNYEQQEPKQVEN
XlInsR TKV-VGPITYEYV--EPNIIHLKWQEPKDPNGLIVLYEVHYSRVGG---IEEVITCVSQ
XlIGFIR LDI-PGIVNTKEE--DDGVIFLWPEPLRPNGLIILMYEIEYKHQGE---VHR--ECVSR
SmInsR DEI-PGPVTHEIVTAEAPYVLKWNTPRSNGLIILYEVFYRKVGD---TEVHTACVSR
SmIGFIR LDI-PGQVTWEG---HEDWVFLRWPEPPHNRLLVLMYEIKFKLAAE---TEKH-ECVSG
HsInsR LDI-VGPVTHEIF--ENNVLHLMWQEPKDPNGLIVLYEVSYRRYG---DEELHLCVSR
HsIGFIR LDI-PGPVTWEPR--PENSIFLKWPEPENPNGLIILMYEIKVGSQVE---DQR--ECVSR

CIR LKYKKIGSYKLQKLDPGNYSVQIRAIISLAFTTNYTEPRYFVVSAPTT-TAHWPPETIIAV
BlInsR FKFLQSQGYTISNLVAGNYSVRFRTSIFAGNGSWSNYVTFFVEEEDTSPDPQDPQQQVPV
XlInsR KQYNTDKGKLRVLTGPNYSVKIRATSLAGNGSWTEQAYFQVPDHP--HSN--IVKIIITG
XlIGFIR QDYRKNGGKLVRLPPGNYSQAQVAISLYGNGSWTEMVSFCVCLKPD-VRNNILQMVVAI
SmInsR PAYLKLGGTKLSLVQPGNYSVVRVATSLAGNGSFTATTYFFMPNPD---PG--LIWIVIG
SmIGFIR QTYQNQRGVRLSNLSPGHYSVVRVATSLAGNGSWTNAVLDLYVAER---YEN-VLYAMIFI
HsInsR KHFALERCRIRGLSPGNYSVVRIRATSLAGNGSWTEPTYFYVTDYLDVPSN--IAKIIIG
HsIGFIR QEYRKYGAKINRLNPGNYTARIQATSLGNGSWTDPVFFYVQAKTG-YEN-FIHLIIIAL

CIR TVSG-----VLLLLIVVIGVWFIAISRFFKKIP--DRPDFTSINPEYEHYN-----
BlInsR SIMIGMGVGFSLLLILAVIFGIWYCTKKRFGDKQMPNGVLYASVNPYMSSD-----DVY
XlInsR PLIA-----VFLLLIVL-VYCVVQKKKDAEGP--AGPLYTSSNPEYLSAS-----EYV
XlIGFIR PLAL-----SFLLVGIIISIVCFVFKKRNNSRLG-NGVLYASVNPYFSAA-----EMV
SmInsR PVIC-----FILLFVGGGVFWIFKQTEGP--TGPLIASSNPEYISAN-----DVY
SmIGFIR PLAI-----ILFICLLVTMLVVLNKKRNSDRLG-NGVLYASVNPYFSAA-----EMV
HsInsR PLIF-----VFLFVIGSIYFLFKRQPDGP--LGPLYASSNPEYLSASDVFPSCSVY
HsIGFIR PVAV-----LLIVGGIVIMLYVFFHKKRNSRLG-NGVLYASVNPYFSAA-----DVY

CIR -PDEWEVEPDKIQLLRELGGSGFGMVYEGVARDLYGKGGGEIKVAVKTVNEHATYRERMEF
BlInsR VPDEWEVPREKITLLRELGGSGFGMVYEGEAKDVVKDEPMVSVAVKTVNESASIRERIEF
XlInsR IPDEWEVPRDKINLLRELGGSGFGMVYEGIAKDIKGEPEVRVAVKTVNESASLRERIEF
XlIGFIR VPDKWEVPREKITMNLRELGGSGFGMVYEGIAKGVVKDEAETKVAIKTVNEAASMRERIEF
SmInsR VPDEWEVPREKITVLRELGGSGFGMVYEGIAKDIKGDPTRVAVKTVNESASLRERIEF
SmIGFIR VPDEWEVAREKIALLRELGGSGFGMVYEGIAKGVVKDEPETRVAIKTVNESASMRERIEF
HsInsR VPDEWEVSRKITLLRELGGSGFGMVYEGNARDIKGEAETRVAVKTVNESASLRERIEF
HsIGFIR VPDEWEVAREKITMSRELGGSGFGMVYEGVAKGVVKDEPETRVAIKTVNEAASMRERIEF

CIR LSEASRMKAFSCNHVVRLLGVVSDGQFALLIMELMEKGD LKNFLMRHPVEEDIDS----
BlInsR LNEASVMKTFNCHHVVKLMGVVSKGQFTLVVMEELMALGDLKNYLRHRPEEDVGLSDSPA
XlInsR LNEASVMKAFNCHHVVRLLGVVSKGQFTLVIMELMAHGD LKSYLRSLRPPD-----
XlIGFIR LNEASVMKEFNCHHVVRLLGVVSKGQFTLVIMELMTRGD LKSYLRSLRPPD-----
SmInsR LNEASVMKAFSCHHVVRLLGVVSKAQFTLVVMEELMTHGD LKSYLRCLFSD-----
SmIGFIR LNEASVMKEFNCHHVVRLLGVVSKGQFTLVIMELMTRGD LKSYLRSLRPPK-----
HsInsR LNEASVMKGFTHHVVRLLGVVSKGQFTLVVMEELMAHGD LKSYLRSLRPE-----
HsIGFIR LNEASVMKEFNCHHVVRLLGVVSKGQFTLVIMELMTRGD LKSYLRSLRPE-----

CIR TFAGIKEHISR----TPPTIKRIIQMAGEIADGMAYIADKKEVHRDLAARNCMVAEDLTV
BlInsR SNEAKNSPFAENDNDLPPTFKDIIQMAGVADGMSYLAAKKEVHRDLACRNCMV AQDRTV
XlInsR ---AENNP-GR----LAPTLKEIIQMAAEISDGMAYLNAAKKEVHRDLAARNCMVAEDYAV
XlIGFIR ---TESNS-GQ----PTFSLKMIQMAAGEIADGMSYLNANKKEVHRDLAARNCMVTEDEFTV
SmInsR ---SENNPTGR----PPPTLKEMIQMAAEIADGMAYLNAAKKEVHRDLAARNCMVAEDFTV
SmIGFIR ---EQQWS-SL----SLPPLRKMQLQMAAQIADGMAYLNANKKEVHRDLAARNCMVAEDFTV
HsInsR ---AENNP-GR----PPPTLQEMIQMAAEIADGMAYLNAAKKEVHRDLAARNCMVAEDFTV
HsIGFIR ---MENN-PL----APP SLSKMIQMAAGEIADGMAYLNANKKEVHRDLAARNCMVAEDFTV

CIR KIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMAPESLKDG VFTSLSDVWSYGVVWEMATLA
BlInsR KIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPESLKDG VFTSQSEVWSYGVVWEMATLA
XlInsR KIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPESLKDG VFTAFSDVWSFGVVLWEITSLA
XlIGFIR KIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPESLKDG VFTTNSCVWSFGVVLWEIATLA
SmInsR KIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMAPESLKDG VFTPHSDCWSFGVVLWEISTLA
SmIGFIR KIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPESLKDG VFTTHSDVWSFGVVLWEISTLA
HsInsR KIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMAPESLKDG VFTTSSIMWSFGVVLWEITSLA
HsIGFIR KIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPESLKDG VFTTYSEVWSFGVVLWEIATLA

CIR AQPYQGLSNEEVLPYVLRVMEKPEDCFDRIFE LMQKQWRYRPKQRPTKEILEELVPE
BlInsR SQPYQGLSNEEVLFKVIDGGMLEKPEGCFNKLYDLMKLCWQYRQSMRPTLEIVEILSPE
XlInsR EQPYQGLSNEQVLFVMDGSLDHPENCFPRLHSLMQMCWQYNPKMRPTLEIIDMLKDD
XlIGFIR EQPYQGLSNEQVLRVMEGLLEKFDNCFDMLFELMRMCWQFNPKMRPTLEIISIKDE
SmInsR EQPYQGLSNEQVLFVMDGYLDRPENCFERMHS LMQMCWQYNPKMRPTLEIIEMLRED
SmIGFIR EQPYQGLSNEQVVRVMEGLLEKFDNCFDMLFELMRMCWQFNPKMRPTLEIISLKDDE
HsInsR EQPYQGLSNEQVLFVMDGYLDQDNCFERVTDLMRMCWQFNPKMRPTLEIVNLKDD
HsIGFIR EQPYQGLSNEQVLRVMEGLLDKFDNCFDMLFELMRMCWQYNPKMRPTLEIISIKEE

CIR LDPSFANKSFFSDENKQDSLEIEEGDEDMDESKTPFIQNEDECDMKGAEGGVDLPPEL
BlInsR LQAHFNEVSFHSLDNHG-----REP--LEMD-----D-VA
XlInsR LRPSFQDVSFSDENKP-----PETDDLEID-FE---NMESTP
XlIGFIR LDPGFKEVSFFSSEENKP-----PDTEELDLE-AE---NMESIP
SmInsR LHPSFQEVSFSSXENKV-----PETEEFDLD-LD---NMESIP
SmIGFIR LEPSFKDSSFFSADNKP-----VDDPQVHQDKMD---SVDDVP
HsInsR LHPSFPEVSFFHSEENKA-----PESELEME-FE---DMENVP
HsIGFIR MEPGFREVSFSSSEENKL-----PEPEELDLE-PE---NMESVP

```

CIR      DQDIDDDIIDLGEDTTPPG-----EQEAQHSQNGELFPELRIDKVNNVLSRPQADKLM
BlInsR  -----LDS-----GADTETEM-----
XlInsR  -----LDP-----SSCSLRDQ-----
XlIGFIR -----LDP-----SCALQNS-----EHHAG-
SmInsR  -----LDP-----SSSQREE-----
SmIGFIR -----LPPSSTQPQQSPVPQQTPPPPSSEAPPAPSLSPSSPSSPCTSTAAMDQASG
HsInsR  -----LDR-----SSHCQREE-----
HsIGFIR -----LPSA-----SSSLPLP-----DRHSG-

CIR      LNGTHPCDCILTQEPNPDSDHPDQRFSSCSNPESAIGSSDDSKDSSKSSSSSAQMNNGVHI
BlInsR  -----PSGSEFSS-----T-----PSPPSETPSSHMMNGSHP
XlInsR  -----SSRTN-----IEEHIPTHMMNGR-
XlIGFIR -----HKSENGPG--VVVLR-----ASFDERQPTAHMMNGR-
SmInsR  -----SLGRDSGP--LGGLR-----GNIEHVPTTHMMNGK-
SmIGFIR ASGNGLSGPASHAAGSGLGTSAGVAMC-----PSLEELPPTAHMMNGR-
HsInsR  -----AGGRDGGG--SLGFK-----RSIEEHIPTHMMNGK-
HsIGFIR -----HKAENGGP--GVLVLR-----ASFDERQPTAHMMNGR-

CIR      ANGHIAMHHLKTKC
BlInsR  QNGSMNLRIPKSTLC
XlInsR  -KNGRILSLPRSSPS
XlIGFIR -KNERALPLPQSSAC
SmInsR  -KNGRILSLPRSSPS
SmIGFIR -KNERAMPLPQSSAC
HsInsR  -KNGRILTLPRSNPS
HsIGFIR -KNERALPLPQSSSTC

```

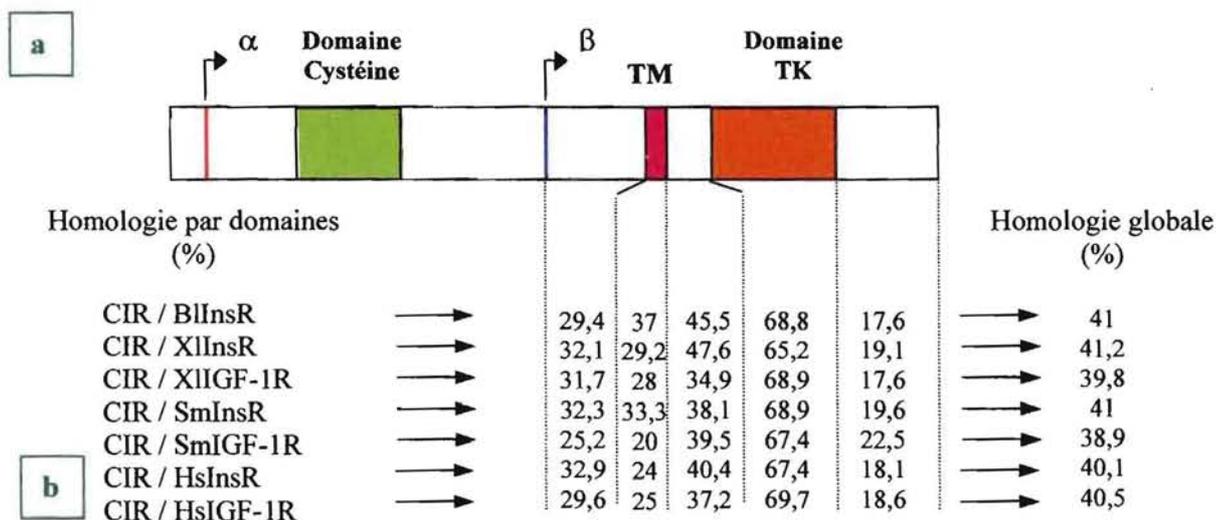


Figure III.17: Alignement et homologie de la séquence protéique partielle de CIR avec des séquences de récepteurs de la famille de l'insuline/IGF-1 de Vertébrés.

a : Alignement global des séquences protéiques par le programme ClustalW du logiciel BioEdit.

BlInsR : *Branchiostoma lanceolatum* ; XlInsR et XlIGF-1R : *Xenopus laevis* ; SmInsR et SmIGF-1R : *Scophthalmus maximus* ; HsInsR et HsIGF-1R : *Homo sapiens*.

En rouge, acides aminés présentant 100% d'identité, et en bleu, acides aminés présentant 100% de similitude. Les sites de N-glycosylation et le domaine transmembranaire sont soulignés, les régions caractéristiques ainsi que le site de clivage protéolytique sont surlignés en jaune, et les résidus tyrosine du domaine C-terminal sont surlignés en rouge et rose. Les résidus du site potentiel de liaison de l'insuline sont surlignés en bleu clair.

b : Pourcentages d'homologie globale et par domaine entre la séquence CIR et les séquences de Vertébrés.

En comparant ces homologies dans les 5 domaines structuraux caractéristiques de la sous-unité β des récepteurs de la famille Rins/RIGF-1, il apparaît que le domaine le plus conservé est le domaine catalytique à activité tyrosine kinase. L'homologie dans cette région semble plus importante avec les séquences d'Invertébrés (69,8% avec LsMIPR et même 70,4% avec BmInsR) qu'avec les séquences de Vertébrés (de 65,2% avec XIInsR à 69,7% avec HsIGF-1R). Le domaine juxtamembranaire présente une homologie équivalente avec les séquences d'Invertébrés (de 35,7% avec CeDAF-2 à 47,6% avec BgInsR) et de Vertébrés (de 34,9% avec XIIGF-1R à 47,6% avec XIInsR). Le domaine extracellulaire de la sous-unité β atteste également d'une homologie de séquence semblable avec les séquences d'Invertébrés (de 24,2% avec CeDAF-2 à 33,9% avec LsMIPR) et les séquences de Vertébrés (de 25,2% avec SmIGF-1R à 32,9% avec HsInsR). Le domaine transmembranaire semble mieux conservé avec les séquences de Vertébrés (de 20% avec SmIGF-1R à 37% avec BInsR) que les séquences d'Invertébrés (de 19,2% avec AaInsR à 32,1% avec CeDAF-2). Le domaine le moins conservé est le domaine C-terminal, et davantage chez les Invertébrés (de 12,4% avec DmInsR à 19,1% avec BmInsR) que chez les Vertébrés (de 17,6% avec BInsR et XIIGF-1R à 22,5% avec SmIGF-1R). Le domaine tyrosine kinase est donc particulièrement bien conservé au sein de la famille des Rins/RIGF-1, alors que le domaine C-terminal est la région la moins homologue.

L'alignement détaillé des séquences (**Figures III.16.a et III.17.a**) indique que :

- Le site de clivage protéolytique est conservé entre la séquence de CIR et les séquences de Vertébrés. Chez les Invertébrés, ce site apparaît plus divergent avec une séquence à 4 acides aminés dont deux résidus basiques chez *C. gigas*, *B. glabrata*, les insectes et *C. elegans*, une séquence tribasique chez *L. stagnalis*, et une séquence riche en résidus basiques mais sans motif dibasique chez *H. vulgaris*.

- La sous-unité α du précurseur de CIR, incomplète, ne semble pas s'aligner avec le domaine potentiel de liaison de l'insuline situé à l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité α des séquences de Vertébrés. La séquence de *C. gigas* ne présente même pas quelques résidus constitutifs du site potentiel de liaison de l'insuline, contrairement aux séquences des autres récepteurs de type insuline d'Invertébrés. Par ailleurs, les deux sites potentiels de N-glycosylation de la sous-unité α de la séquence de CIR ne sont pas retrouvés au niveau des séquences de Vertébrés, à l'exception de la séquence de l'amphioxus (BInsR) avec un seul

site potentiel de N-glycosylation aligné avec la séquence de CIR. Chez les Invertébrés, seules les séquences de la drosophile et de l'hydre comportent aussi 2 sites potentiels de N-glycosylation.

- Les homologies observées au niveau des 5 domaines structuraux de la sous-unité β sont liées à la conservation de motifs caractéristiques des protéines kinases et notamment des protéines kinases à tyrosine (Hanks *et al.*, 1988).

Le domaine extracellulaire de la sous-unité β , qui se caractérise chez *C. gigas* par la présence de 7 sites potentiels de N-glycosylation, présente une certaine variabilité en nombre mais aussi en position de ces sites, avec une diminution du nombre de sites chez les Vertébrés. Le nombre de sites potentiels de N-glycosylation varie de 8 chez *B. glabrata*, à 7 chez *C. gigas*, *L. stagnalis*, *B. mori* et *A. aegypti*, à 6 chez le prochordé *B. lanceolatum*, et de 2 à 5 chez les Vertébrés. La seule exception est la séquence de drosophile *D. melanogaster* qui ne comporte que 3 sites potentiels de N-glycosylation.

Le domaine transmembranaire, homogène en longueur et en localisation, présente cependant une séquence légèrement plus longue chez l'amphioxus. Chez les Invertébrés, ce domaine indique une certaine variabilité de la séquence "tribasique" qui lui succède.

Le domaine juxtamembranaire comporte, chez les Invertébrés, un motif unique d'internalisation du récepteur activé [N-P-X-Y], qui apparaît toutefois légèrement différent au niveau des séquences de Mollusques gastéropodes (*L. stagnalis* et *B. glabrata*). En revanche, chez les Vertébrés, mais aussi l'hydre d'eau douce *H. vulgaris*, deux sites d'internalisation [N-P-X-Y] et [G-X-L-Y] sont présents.

Le domaine tyrosine kinase est le domaine structural qui présente le plus grand nombre de séquences caractéristiques des récepteurs de la famille Rins/RIGF-1 ([D-F-G], [A-P-E], [D-L-A-A-R-N], [P-V-R-W-M-A-P-E], [M-T-R], [M-V-A], [Y-X-X-X-Y-Y] et [G-Q-G-S-F-G-X-V-X₁₉-K]) conservées chez les Vertébrés et les Invertébrés. Seul le motif potentiel de liaison de la protéine substrat IRS-1 [I-A-D-G-M-A-Y-L-A-D-K-K-F] apparaît légèrement divergent parmi toutes les séquences alignées. Le domaine tyrosine kinase comporte toutefois davantage de résidus tyrosyl pour les séquences de récepteurs de type insuline d'Invertébrés (*C. elegans* (14 tyrosines), *D. melanogaster* (13 tyrosines), *C. gigas* (11 tyrosines), *L. stagnalis* et *B. mori* (10 tyrosines), *B. glabrata*, *A. aegypti* et *H. vulgaris* (9 tyrosines)) et de l'amphioxus (10 tyrosines), que pour les séquences des récepteurs de Vertébrés (7 à 9 tyrosines). Par contre, le nombre de sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine kinase II, apparaît semblable entre la séquence de *C. gigas*

(5 et 6) et les séquences de Vertébrés (4 à 5 et 6 à 7), et beaucoup plus variable pour les séquences des autres Invertébrés.

Enfin, le domaine C-terminal, peu conservé, présente un nombre de tyrosines très divergent chez les Invertébrés, variant de 1 résidu tyrosyl chez *A. aegypti* à 9 chez *C. gigas* et 14 chez *D. melanogaster*, mais qui reste globalement plus important que le nombre de tyrosine des séquences de Vertébrés (2 à 5 tyrosines). Ces résidus tyrosyls peuvent être intégrés dans un motif consensus [Y-X-X-M/L] de liaison de protéines à domaines SH2 ou PTB, retrouvé chez *C. gigas*, *H. vulgaris* et les Vertébrés (1 motif), l'amphioxus (2 motifs), *C. elegans* (3 motifs) et *D. melanogaster* (4 motifs). Le domaine C-terminal possède également plusieurs motifs de phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine kinase II, là encore, globalement plus nombreux chez les Invertébrés (1 à 9 et 1 à 9) que chez les Vertébrés (1 à 2 et 2 à 4). A noter également que la séquence du précurseur CIR se termine par un acide aminé cystéine, comme les séquences des récepteurs à l'IGF-1 et la séquence du récepteur unique de l'amphioxus, alors que les séquences de récepteurs à l'insuline s'achèvent par un acide aminé sérine et les séquences de récepteurs de type insuline d'Invertébrés par un acide aminé variable (L/V/H).

1.5. Arbre phylogénétique.

L'alignement des différentes séquences de récepteurs Rins/RIGF-1 de Vertébrés et d'Invertébrés a permis d'établir une représentation en phénogramme par parcimonie présentant une origine commune aux séquences de Vertébrés et aux séquences d'Invertébrés (**Figure III.18**). L'ancêtre A est l'origine commune à la séquence d'amphioxus (BIInsR), à partir de laquelle ont divergé les deux groupes Rins et RIGF-1 chez les Vertébrés, et aux séquences d'Invertébrés. Chez les Invertébrés, cet ancêtre commun est à l'origine du groupe des Mollusques avec une séparation bivalves et gastéropodes (B), et d'un groupe moins défini qui réunit les insectes, un cnidaire et un nématode.

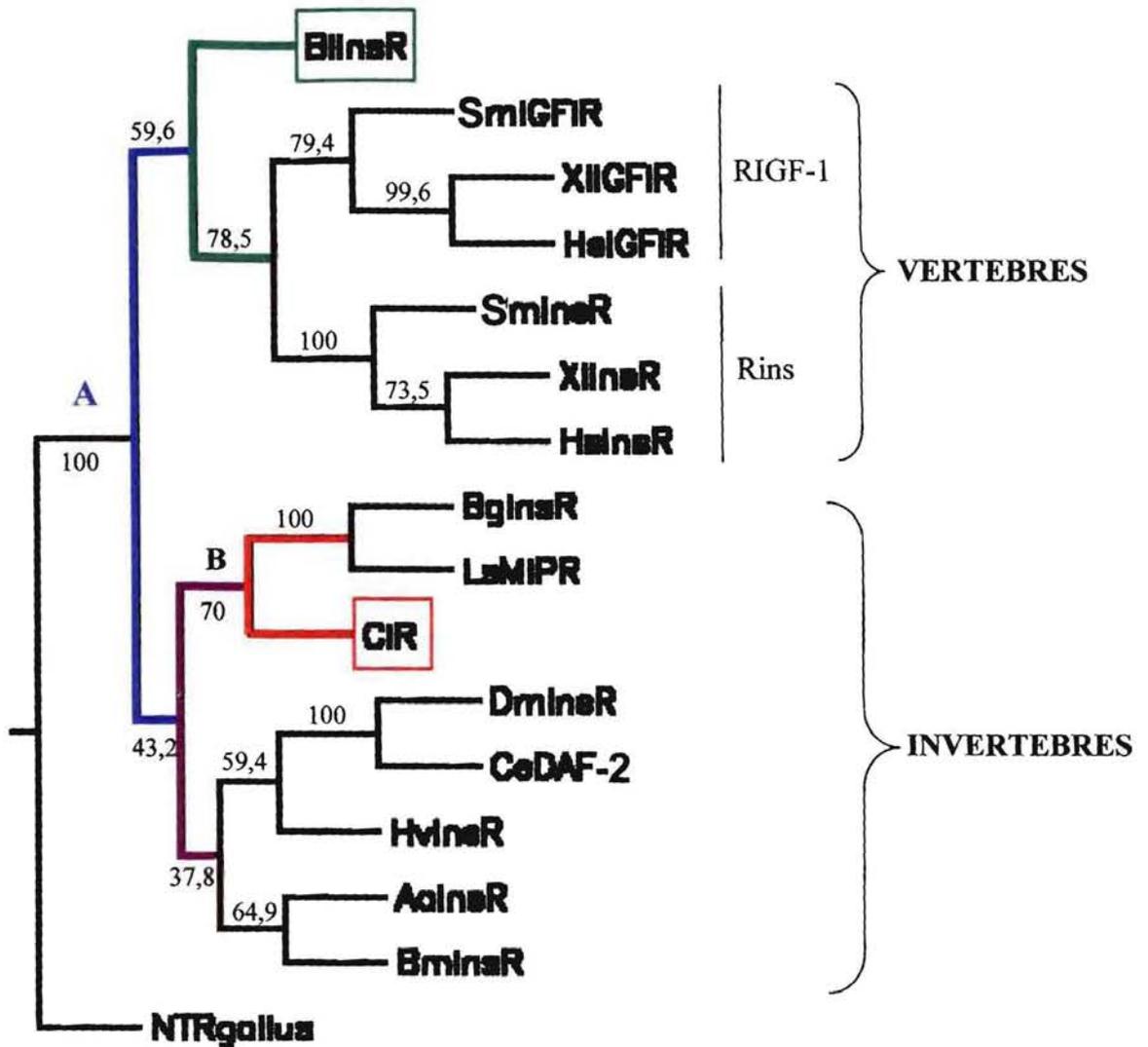


Figure III.18 : Analyse phylogénétique de CIR avec différents récepteurs de la famille des insulines/IGFs.

Cet arbre a été généré par le programme PHYLIP à partir des alignements de séquences issus de CLUSTAL W d'après la méthode de parcimonie.

BIInsR : *Branchiostoma lanceolatum* ; **XIInsR** et **XIIGF-1R** : *Xenopus laevis* ; **SmInsR** et **SmIGF-1R** : *Scophthalmus maximus* ; **HsInsR** et **HsIGF-1R** : *Homo sapiens* ; **LsMIPR** : *Lymnaea stagnalis* ; **BgInsR** : *Biomphalaria glabrata* ; **DmInsR** : *Drosophila melanogaster* ; **BmInsR** : *Bombyx mori* ; **AaInsR** : *Aedes aegypti* ; **HvInsR** : *Hydra vulgaris* ; **CeDAF-2** : *Caenorhabditis elegans* ; **NTRgallus** : récepteur NT-3 de poulet (racine de l'arbre).

Les valeurs de "bootstrapping" (fixé à 250) sont données pour chaque nœud du phénogramme.

II.2. Localisation et expression du messager de CIR.

2.1. Détection par "Northern blotting".

La technique du "Northern blotting" a été réalisée à partir d'ARN polyadénylés de différents stades de développement larvaire, de tissus adultes et d'ovocytes en fin de vitellogenèse (**Figure III.19**). Un signal d'hybridation est obtenu pour les pistes correspondant aux ovocytes, et plus faiblement pour le stade larvaire D et le bord du manteau. L'hybridation étant réalisée avec le fragment obtenu en 3'RACE-PCR, correspondant à une séquence partielle du domaine TK très conservé dans la famille Rins/RIGF-1, il est probable que l'unique bande détectée traduise la présence d'un seul transcrite de CIR. De plus, il semblerait, du fait de la distance de migration du signal, que le transcrite soit de grande taille, probablement supérieure à 10 kb (au-delà du marqueur de poids moléculaire).

2.2. Analyse qualitative de l'expression de l'ARNm de CIR par RT-PCR

Deux approches par RT-PCR ont été utilisées afin d'établir un profil d'expression du messager de CIR. La première amplification a été effectuée à partir des amorces dégénérées IR1/IR3 sur des ARN poly(A⁺) de divers tissus adultes, de l'ADN génomique d'huître et de l'ADNc du stade larvaire pédivéligère (**Figure III.20.a**). Deux fragments, CIR et HSC/HSP, sont amplifiés au niveau des tissus adultes. La seconde réaction de RT-PCR a été réalisée avec les amorces β 1 et β 2 spécifiques du précurseur de CIR pour rechercher la présence du messager de CIR à différents stades de développement larvaire, dans divers tissus adultes dont la gonade en période de mitoses, et dans des ovocytes en fin de vitellogenèse (**Figure III.20.b**). De plus, en parallèle de l'amplification de la séquence CIR, une amplification du messager de l'actine a été réalisée afin d'attribuer un caractère semi-quantitatif à l'amplification du fragment de CIR. Le transcrite du précurseur de CIR s'exprime au niveau de tous les tissus adultes avec une légère prépondérance au niveau des branchies, de la glande digestive, des palpes labiaux et de la gonade en période de vitellogenèse. Concernant la gonade, l'amplification est plus importante en période de mitoses, et encore plus forte s'il s'agit de gonade femelle en vitellogenèse (ovocytes). Au niveau du développement larvaire, une expression différentielle du transcrite apparaît selon le stade de développement. Une augmentation graduelle de l'expression du transcrite est observée du stade

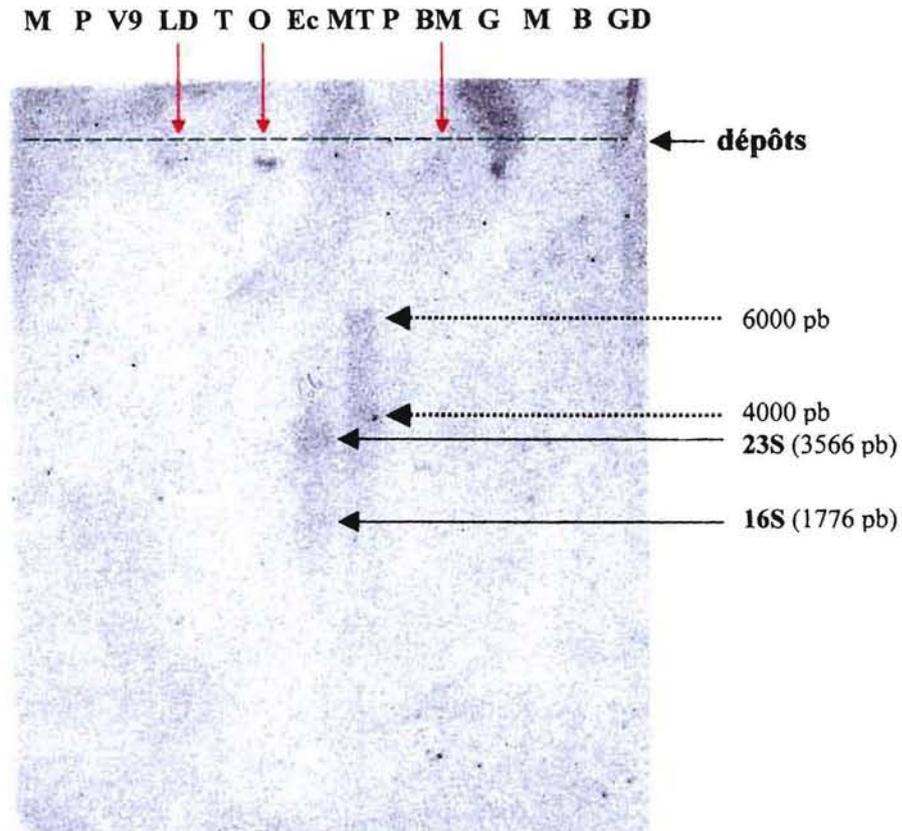


Figure III.19 : Analyse de l'ARN codant pour le précurseur CIR par "Northern blotting".

Deux microgrammes d'ARN poly(A⁺) de divers stades larvaires ou de tissus adultes sont séparés sur un gel dénaturant à 1,5% d'agarose, transférés sur une membrane de nylon puis hybridés avec le fragment de 3'RACE-PCR (1155 pb) marqué au [α^{32} P]dCTP. Une acquisition est réalisée au "Cyclone" (Packard) après une autoradiographie de 3 jours.

M : larves métamorphosées ; **P** : larves pédivéligères ; **V9** : larves véligères de 9 jours ; **LD** : Larves D ; **T** : larves trochopores ; **O** : Ovocytes ; **P** : palpes labiaux ; **BM** : bord du manteau ; **G** : Gonade ; **M** : muscle ; **B** : branchies ; **GD** : glande digestive ; **Ec** : ARN ribosomiques 13S et 26S d'*Escherichia coli* ; **MT** : marqueurs de taille 0-10 kb (Sigma).

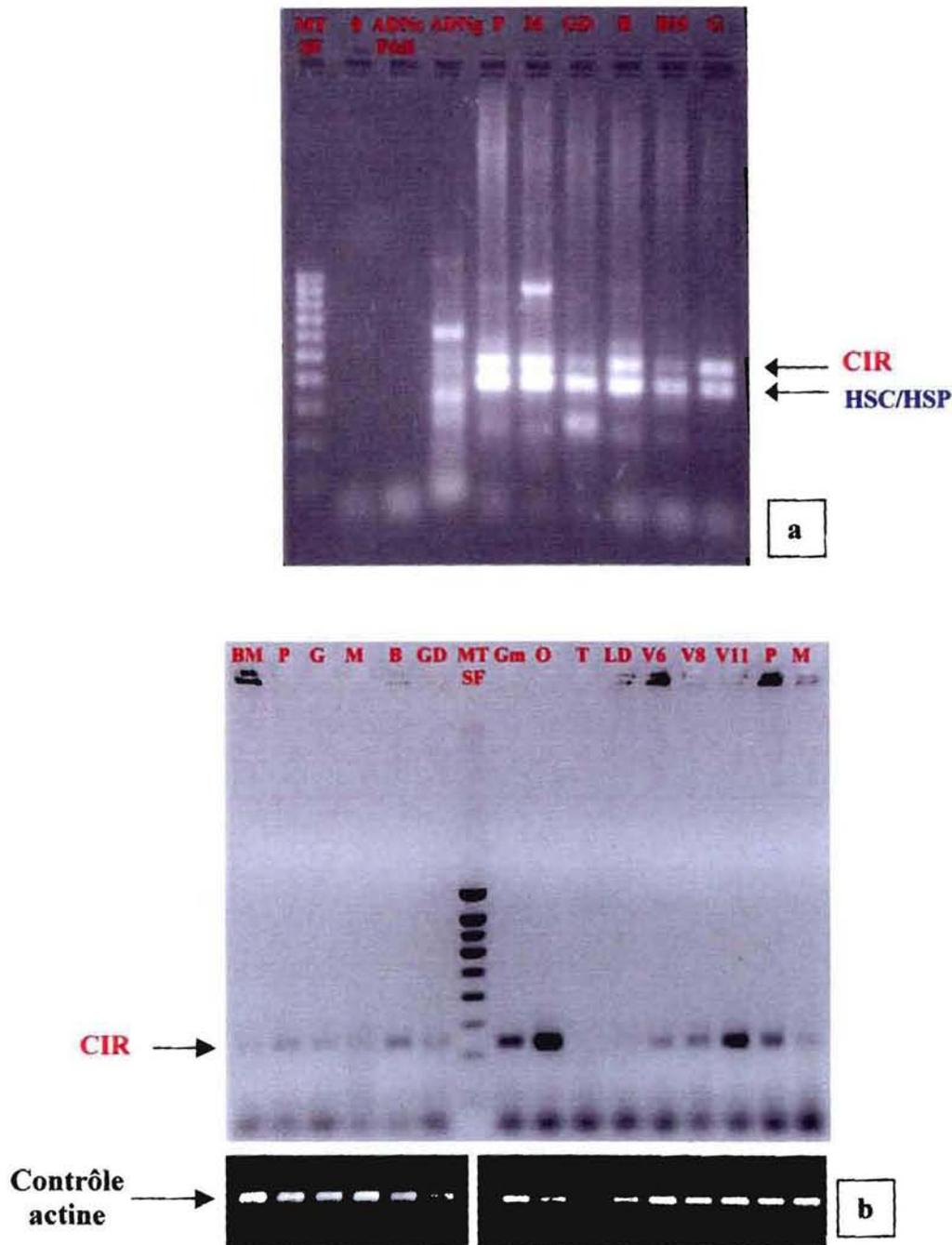


Figure III.20 : Analyse qualitative et semi-quantitative de l'expression du messenger de CIR par RT-PCR.

a : Amplification par les amorces dégénérées IR1 et IR3 du messenger de CIR à partir d'ADNc de larves pédivéligères, d'ADN génomique d'huître, d'ADNc de divers tissus adultes (Palpes labiaux, Muscle, Glande Digestive, Branchies, Bord du Manteau et Gonade). Amplification en parallèle du messenger codant pour une protéine de type HSC/HSP.

b : Amplification par les amorces spécifiques du précurseur CIR, $\beta 1$ et $\beta 2$, du messenger de CIR à partir de divers ADNc de tissus adultes (Bord du Manteau, Palpes labiaux, Gonade prélevée en avril, Muscle, Branchies, Glande digestive, Gonade en mitose et ovocytes) et de larves à différents stades de développement (Trochophore, Larves D, Vélières de 6 jours, Vélières de 8 jours, Vélières de 11 jours, Pédivéligères et Métamorphosées).

Un contrôle de la reverse transcription des ARNm en ADNc (qualité et quantité d'ARNm) est réalisée par amplification du messenger de l'actine.

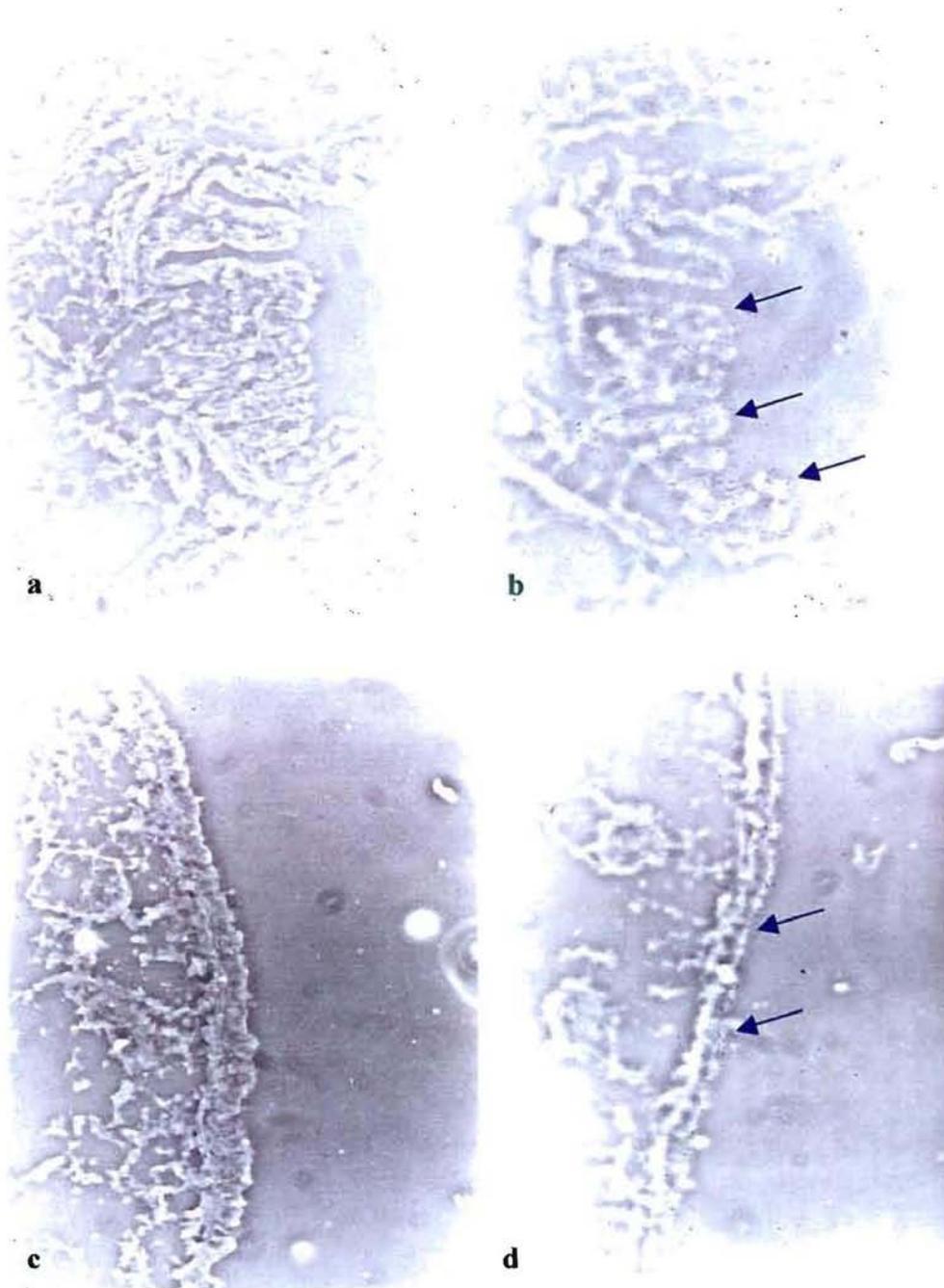


Figure III.21 : Localisation par Hybridation *In Situ* (HIS) des messagers du précurseur CIR (agrandissement x160).

L'hybridation *in situ* est réalisée grâce aux sondes ARN sens et antisens synthétisées par transcription *in vitro* à partir de la séquence de 3'RACE-PCR puis marquées au $[\alpha^{33}\text{P}]\text{dUTP}$.

a et **b** : Hybridation *in situ* au niveau du sillon périostracal du bord du manteau.
a : Hybridation avec la sonde ARN sens (contrôle) ; **b** : Hybridation avec la sonde ARN antisens.

c et **d** : Hybridation *in situ* au niveau de l'épithélium externe du manteau.
c : Hybridation avec la sonde ARN sens (contrôle) ; **d** : Hybridation avec la sonde ARN antisens.

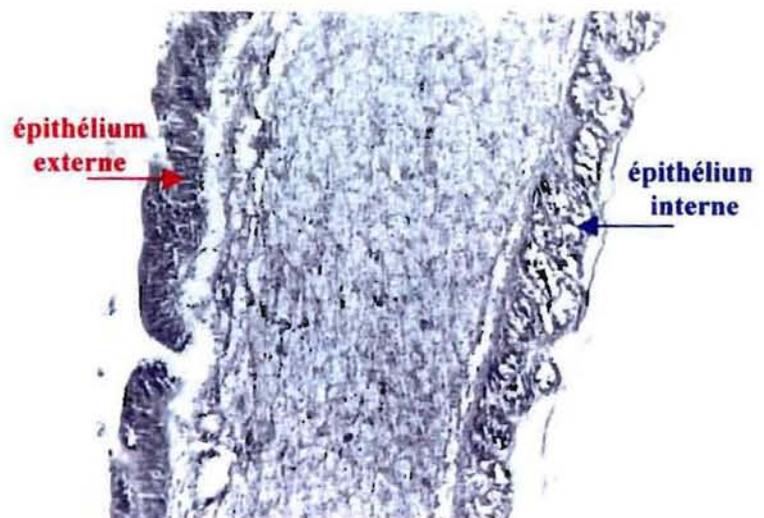
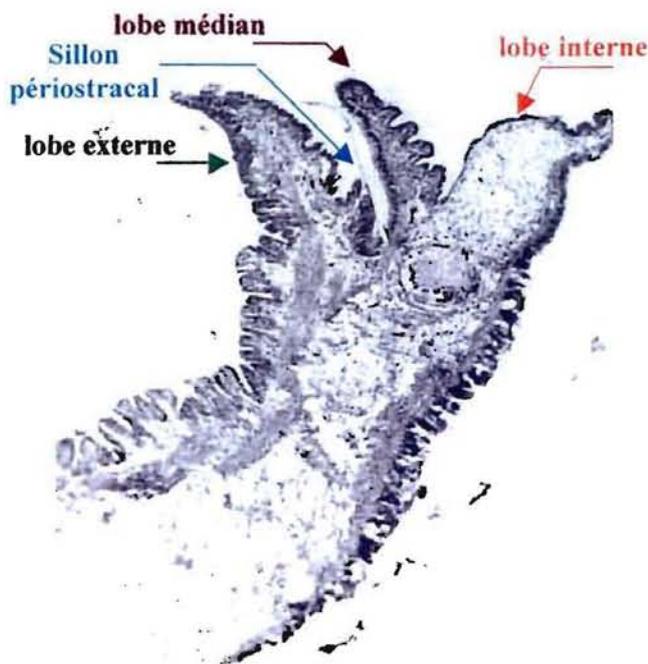
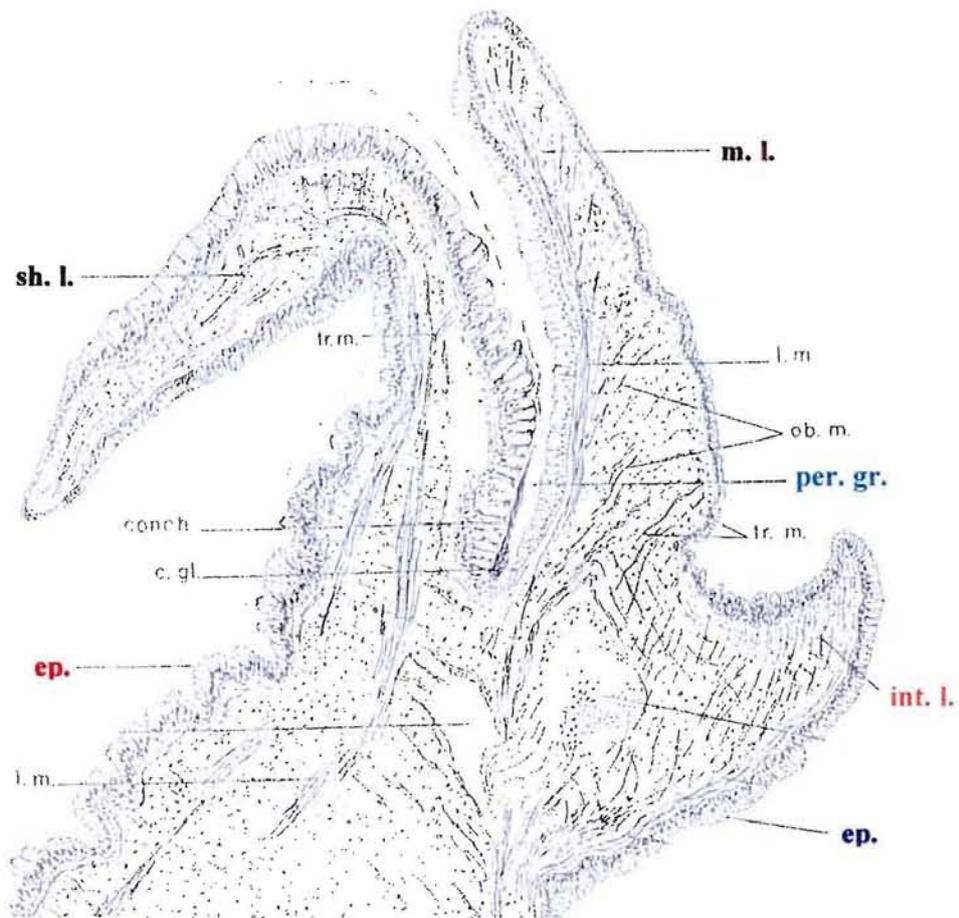


Figure III.22 : Coupe transversale du bord du manteau et de l'épithélium du manteau.
(schéma issu de Galtsoff, 1964 ; photos d'histologie : agrandissement x110).

Le bord du manteau est composé de trois lobes. Le lobe externe se prolonge par l'épithélium externe du manteau et le lobe interne se prolonge par l'épithélium interne du manteau.
Lobe externe (ou de la coquille) (sh.l) ; lobe médian (m.l) ; lobe interne (int.l) ; épithélium (ep.) ; sillon périostracal (per.gr) ; muscles longitudinaux (l. m), obliques (ob.m) et transversaux (tr.m) ; glande périostracale (ou à conchyoline) (c.gl.) ; dépôt de conchyoline (conch.).

larve D au stade véligère 11 jours après la fécondation, suivie d'une diminution jusqu'à la métamorphose.

2.3. Localisation des sites d'expression par Hybridation *In Situ* (HIS).

La technique de l'hybridation *in situ* permet non seulement de détecter un ARNm donné mais aussi et surtout de préciser le ou les types cellulaires au niveau desquels il s'exprime. Au cours de ces expériences, des sondes ARN radioactives correspondant à la séquence du fragment de 3'RACE-PCR ont été utilisées. La spécificité du signal est déterminée en soustrayant le marquage non spécifique issu de l'hybridation de la ribosonde sens au marquage obtenu après hybridation de la ribosonde antisens. Les hybridations ont été effectuées sur des coupes transversales sériées d'huîtres adultes afin de cribler le plus grand nombre de tissus, ainsi que sur des coupes de différents stades larvaires. Les diverses étapes de l'hybridation étant relativement drastiques, seules quelques coupes d'huîtres adultes ont finalement pu être analysées (décollement des pièces de tissus). Après 27 jours d'autoradiographie, un marquage spécifique est obtenu sur les coupes passant par du bord du manteau, et plus précisément au niveau de la corne externe du bord trilobé du manteau et de l'épithélium externe du manteau (**Figures III.21 et III.22**). Pour les autres tissus, très abîmés après les différentes étapes de l'hybridation, les quelques cellules restantes n'ont pas permis la détection d'ARNm de CIR.

IV. DISCUSSION

Les récepteurs aux molécules de la famille de l'insuline/IGF-1, étudiés chez les Vertébrés, ont également été caractérisés chez quelques Invertébrés, et notamment chez deux Mollusques gastéropodes *Lymnaea stagnalis* (Roovers *et al.*, 1995) et *Biomphalaria glabrata* (Lardans *et al.*, 2001). Les récepteurs identifiés chez ces deux espèces présentent une bonne conservation de séquence avec les récepteurs de Vertébrés, et plus particulièrement au niveau du domaine catalytique à activité tyrosine kinase.

Cette large distribution et conservation des récepteurs de type insuline/IGF-1 (Rins/RIGF-1) dans l'ensemble du règne animal suggère donc l'existence de récepteurs de la famille chez d'autres mollusques, et en particulier chez le Mollusque bivalve *Crassostrea gigas*.

Caractérisation d'un ADNc partiel du précurseur de CIR.

Ainsi, une approche de RT-PCR a été réalisée à partir d'amorces dégénérées choisies au sein du domaine tyrosine kinase, les mêmes que celles précédemment utilisées par Roovers et collaborateurs (1995) pour le clonage du récepteur des MIPs de limnée (LsMIPR). Une séquence partielle d'ADNc codant un récepteur de type insuline/IGF-1 a ainsi été caractérisée chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. La séquence obtenue présente entre 42% d'homologie avec le récepteur de type insuline du nématode *Caenorhabditis elegans* (CeDAF-2) et 66% d'homologie avec le récepteur de la limnée (LsMIPR) chez les Invertébrés, et 66,5% avec le récepteur à l'insuline de turbot *Scophthalmus maximus* chez les Vertébrés. Cette relative homogénéité entre la séquence du récepteur CIR et les séquences de mollusque gastéropode mais aussi de Vertébrés confirme la remarquable conservation des récepteurs de la famille Rins/RIGF-1 au cours de l'évolution.

La caractérisation complète du précurseur de CIR a ensuite été entreprise par l'utilisation de techniques diverses (5' et 3'RACE-PCR, criblage de banque). A l'issue de la stratégie de séquençage employée, une séquence nucléotidique codante de 2416 pb, de même que les extrémités 5' et 3' de la région en 3' non traduite (3'NTR) du messager du récepteur CIR, ont été caractérisées. La longue région 3'NTR, avec une taille approximative de 4 à 4,5 kb, représentait donc certainement une importante contrainte quant à l'efficacité du

criblage de banque ou à la réussite de la 5'RACE-PCR du Marathon, ces stratégies étant toutes les deux basées sur la transcription inverse des ARNm à partir de la queue polyadénylée (poly(A⁺)).

Structure de la séquence protéique.

L'ADNc partiel du précurseur de CIR présente une phase ouverte de lecture de 804 acides aminés qui comprend la région carboxy-terminale de la sous-unité α et l'ensemble de la sous-unité β du récepteur CIR.

- La sous-unité α , dont les 56 derniers résidus ont été identifiés, et la sous-unité β sont séparées par un site potentiel de clivage protéolytique contenant une séquence dibasique. La structure et la position de ce site de clivage chez *C. gigas* sont semblables à celles observées chez le nématode *C. elegans*, les Insectes (*D. melanogaster*, *B. mori* et *A. aegypti*), le prochordé *B. lanceolatum*, et les Vertébrés, mais relativement divergents de ce qui a été décrit chez les Mollusques gastéropodes *Lymnaea stagnalis* et *Biomphalaria glabrata*, ou chez l'hydre *Hydra vulgaris*. En effet, chez la limnée, le site de clivage est une séquence tribasique qui ne permet pas le clivage des sous-unités α et β par une endoprotéase classique de type furine (Watanabe *et al.*, 1992). D'ailleurs, Smit et ses collaborateurs (1994) ont récemment cloné une endoprotéase apparentée à la furine, mais de structure différente, qui pourrait être impliquée dans le clivage de sites tribasiques. Chez l'hydre *Hydra vulgaris*, le site potentiel de clivage ne possède même pas de séquence dibasique ce qui suggère soit l'absence de clivage entre les deux sous-unités soit un clivage par une endoprotéase spécifique (Steele *et al.*, 1996). En ce qui concerne la position du site de clivage chez *Lymnaea stagnalis* et *Biomphalaria glabrata*, il semble être localisé plus en N-terminal par comparaison aux autres espèces. La conséquence de cette position plus en amont est que la région contenant le second site potentiel de liaison de l'insuline décrit chez les Vertébrés se trouve intégrée au début de la sous-unité β , ce qui traduit probablement une modification de la liaison du ligand au niveau du récepteur chez les gastéropodes. De plus, chez la limnée, l'identification de ligands multiples (les MIPs) présentant de fortes divergences par rapport aux insulines de Vertébrés mais également entre eux, suggère fortement l'existence de plusieurs sites de liaison différents sur le récepteur unique, avec des affinités différentes pour les divers MIPs (Roovers *et al.*, 1995). D'ailleurs, les ligands MIP de la limnée, bien que présentant une importante similarité de

structure avec les insulines de Vertébrés, ne possèdent pas le domaine de liaison au récepteur décrit chez les Vertébrés, mais présentent en revanche des séquences de liaison au récepteur particulières (Smit *et al.*, 1991). Chez les Insectes, la situation est intermédiaire car le site potentiel de liaison de l'insuline de Vertébrés est partiellement retrouvé au niveau de la sous-unité α (Adachi *et al.*, 1989), et semble fonctionnel puisque chez la drosophile *Drosophila melanogaster* le récepteur de type insuline peut lier des insulines de Vertébrés (Fernandez-Almonacid et Rosen, 1987). Chez *C. gigas*, l'analyse de la séquence disponible dans la région concernée montre que, bien que le site de clivage soit présent comme chez les Vertébrés, la séquence du second site potentiel de liaison de l'insuline de Vertébrés est absente, comme chez les gastéropodes pour lesquels le ou les ligands potentiels pourraient être relativement différents de l'insuline de Vertébrés.

- La sous-unité β du récepteur CIR se compose de 748 résidus soit une taille comparable à celle du récepteur de l'amphioxus (743 résidus), mais supérieure à celles des récepteurs de Vertébrés (620 résidus pour HsInsR et SmInsR, 627 résidus pour HsIGF-1R et 680 résidus pour SmIGF-1R) et inférieure à celles des récepteurs d'Invertébrés (853 résidus pour HvInsR, 872 résidus pour LsMIPR, 969 résidus pour BgInsR et 1064 résidus pour DmInsR). Cette sous-unité s'organise en 5 domaines structuraux majeurs dont les caractéristiques sont globalement identiques à celles décrites pour les récepteurs de la famille des Rins/RIGF-1. On distingue ainsi chez *C. gigas*, par ordre décroissant de conservation, les domaines tyrosine kinase, juxtamembranaire, extracellulaire, transmembranaire et C-terminal.

Le domaine tyrosine kinase présente une homologie de 68,8% avec BInsR, 69,7% avec HsIGF-1R, 69,8% avec LsMIPR et jusqu'à 70,4% avec BmInsR. Cette importante conservation s'explique par la présence au niveau de sa séquence de tous les résidus invariants décrits chez les protéines kinases ainsi que des motifs indicateurs de la spécificité des protéines kinases à tyrosine (Hanks *et al.*, 1988). Le domaine TK contient également les motifs qui permettent de caractériser les protéines tyrosine kinase de la famille des Rins/RIGF-1 (Yarden et Ullrich, 1988 ; Jonas *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'analyse des résidus tyrosyl potentiellement impliqués dans l'activation des récepteurs nous a conduit à appréhender les mécanismes de signalisation. Le récepteur CIR comporte 11 tyrosines dont 6 conservées par rapport aux Vertébrés et à la plupart des Invertébrés (sauf *Caenorhabditis elegans*, *Hydra vulgaris* et *Aedes aegypti*). En particulier, trois tyrosines parmi les 6 sont retrouvées en position identique dans le site majeur de l'autophosphorylation des récepteurs

(sauf chez *Caenorhabditis elegans*) et une tyrosine est localisée au niveau du site de liaison de la protéine d'ancrage IRS-1. Toutefois, les résidus tyrosyl restants, conservés ou pas, sont certainement aussi impliqués dans l'activation du récepteur ainsi que dans la transmission du signal. Chez les Vertébrés, le nombre de tyrosine est à peu près constant (7 à 9 résidus, voir 10 résidus chez l'amphioxus), alors que chez les Invertébrés, leur nombre, souvent plus élevé, et plus variable (de 14 chez *C. elegans* à 9 chez *B. glabrata*, *A. aegypti* et *H. vulgaris*), traduit probablement une activation plus diversifiée et plus importante des récepteurs chez les Invertébrés que chez les Vertébrés. Par ailleurs, la présence chez *C. gigas*, comme chez les autres espèces d'Invertébrés et de Vertébrés, de motifs de phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine kinase II confirme la complexité de la régulation de la transduction du signal.

Le domaine juxtamembranaire est le domaine le plus conservé après le domaine TK, avec une homologie de 40,4% avec HsInsR, 45,5% avec BIIInsR et de 47,6% avec XIInsR et BgInsR. Chez toutes ces espèces, le domaine juxtamembranaire comporte un motif consensus [N-P-X-Y] impliqué dans deux fonctions antagonistes, la phosphorylation de la protéine d'ancrage IRS-1 qui active la cascade de signalisation (White *et al.*, 1988 ; Myers *et al.*, 1994a, 1996, 1998) et l'internalisation du récepteur activé (Backer *et al.*, 1992 ; Hsu *et al.*, 1994). Ce motif est cependant légèrement modifié chez les mollusques gastéropodes *Lymnaea stagnalis* et *Biomphalaria glabrata* [N-X-N-Y]. Chez les Vertébrés et l'hydre *Hydra vulgaris*, un second site d'endocytose du récepteur activé est présent, ce qui suggère un potentiel de régulation rétroactive du complexe récepteur-ligand ("down-regulation") plus important chez ces espèces. Ce site additionnel impliqué dans la régulation rétroactive du complexe ligand-récepteur n'est pas retrouvé chez la plupart des Invertébrés, y compris *C. gigas*, ce qui suggère des différences de comportement des récepteurs du point de vue de cette régulation.

Le domaine extracellulaire présente une homologie de 32,9% avec HsInsR et de 33,9% avec LsMIPR. Chez *C. gigas*, ce domaine se caractérise par la présence de 7 sites potentiels de N-glycosylation. Le nombre et la position de ces sites varient d'une espèce à l'autre. Toutefois, les sites potentiels sont en général plus nombreux chez les Invertébrés. Ces sites de N-glycosylation impliqués dans l'activation et l'autophosphorylation de la protéine kinase pourrait être à l'origine d'un potentiel de signalisation plus diversifié pour les récepteurs d'Invertébrés.

Le domaine transmembranaire, présente un niveau de conservation plus important avec les espèces de Vertébrés (37% d'homologie avec BIIInsR) qu'avec les espèces d'Invertébrés (28,6% d'homologie avec LsMIPR et 32,1% d'homologie avec CeDAF-2). Néanmoins, le

profil d'hydrophobicité réalisé à partir de la séquence de CIR confirme la conservation du caractère hydrophobe de ce domaine.

Le domaine C-terminal est la région la moins conservée, avec une homologie comprise entre 12,4 et 19,1% avec les espèces d'Invertébrés et entre 17,6 à 22,5% avec les espèces de Vertébrés. Il contient un nombre important d'acides aminés aspartate et glutamate (42 résidus soit 22%) et glycine et proline (22 résidus soit 12,6%), ce qui lui confère une nature très hydrophile, caractéristique commune de l'extrémité C-terminale chez les Vertébrés comme chez les Invertébrés.

Ce domaine est également riche en résidus sérine et thréonine (27 sur 199 résidus soit 13,6%) dont plus de la moitié (54%) sont répartis sur une courte séquence de 26 acides aminés. Ces résidus sont susceptibles d'être des sites de phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine kinase II. Or, chez *C. gigas*, 7 motifs de phosphorylation par la protéine kinase C (2 dans le domaine C-terminal) et 8 motifs de phosphorylation par la caséine kinase II (2 dans le domaine C-terminal) sont observés dans la région cytoplasmique. Plesneva et collaborateurs (2001) suggèrent d'ailleurs qu'une protéine kinase C atypique appelée PKC zéta, identifiée chez le mollusque *Anodonta cygnea*, pourrait participer de façon directe à la transmission du signal de molécules de type insuline/IGF. Cette protéine kinase serait alors impliquée dans l'atténuation du signal (Considine et Caro, 1993). D'ailleurs, chez l'homme, il a été démontré que la phosphorylation par la protéine kinase C diminue la liaison du ligand au récepteur et par conséquent diminue l'activité tyrosine kinase (Anderson et Olefsky, 1991).

La région C-terminale se caractérise également par la présence de nombreux résidus tyrosyl, 9 chez *C. gigas*, dont un est inclus dans un motif consensus susceptible de recruter directement par phosphorylation des protéines à domaines SH2 [Y-X-X-M/L]. La présence de ce motif semble confirmer que la transmission du signal pourrait impliquer, comme chez les Vertébrés, des protéines à domaines SH2. D'ailleurs, de tels motifs sont également retrouvés au nombre de 2 chez l'amphioxus (Pashmforoush *et al.*, 1996) et chez certains Invertébrés comme la drosophile *Drosophila melanogaster* et le nématode *Caenorhabditis elegans*. Chez ces deux Invertébrés, le domaine C-terminal, plus long, comporte respectivement 14 et 11 tyrosines dont certaines sont intégrées dans des sites potentiels de phosphorylation et notamment des sites consensus (4 chez la drosophile et 3 chez le nématode) directement impliqués dans la liaison de protéines à domaines SH2 (Ruan *et al.*, 1995 ; Kimura *et al.*, 1997). Chez les autres espèces d'Invertébrés, les acides aminés tyrosine sont également relativement nombreux mais généralement non intégrés à un tel motif. Ces motifs consensus sont par ailleurs largement retrouvés dans les séquences de récepteurs à d'autres facteurs de

croissance tels que l'EGF ("Epidermal Growth Factor") et le PDGF ("Platelet-Derived Growth factor") (Cantley *et al.*, 1991).

La région C-terminale, de par sa longueur, pourrait également être à l'origine de différentes possibilités de voies de transduction du signal. Chez *C. gigas*, le domaine C-terminal est constitué de 199 acides aminés. De façon générale, ce domaine C-terminal est toujours plus long chez les Invertébrés, jusqu'à 506 acides aminés chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, que chez les Vertébrés où il représente environ 100 acides aminés. Chez la drosophile, Fernandez et ses collaborateurs (1995) ont d'ailleurs montré que le récepteur de type insuline s'exprime sous deux isoformes, l'une correspondant au récepteur avec une extension C-terminale maximale de 506 acides aminés ($\alpha_2(\beta170)_2$) et l'autre au récepteur avec une extension C-terminale tronquée ($\alpha_2(\beta90)_2$). L'isoforme ($\alpha_2(\beta170)_2$) aurait un potentiel de signalisation plus large, puisqu'elle semble pouvoir activer simultanément trois voies de signalisation : la voie Ras/MAP kinases (impliquée dans des effets mitogènes), la voie PI-3 kinase (impliquée dans le métabolisme notamment glucidique) et la voie p70S6 kinase (impliquée dans l'activation de facteurs de transcription). L'isoforme ($\alpha_2(\beta90)_2$), plus courte, n'aurait elle conservé que la capacité d'activer la voie Ras/MAP kinases. Cette différence s'expliquerait par une diminution, dans la forme tronquée, du nombre de motifs consensus de liaison de protéines à domaines SH2 ou PTB. Ce mode d'action directe des extrémités C-terminales sur les protéines de signalisation à domaines SH2 diffère de celui décrit chez les Vertébrés où le signal est médié par un intermédiaire, la protéine substrat du récepteur à l'insuline (IRS-1).

En fait, chez la drosophile, la situation semble plus complexe :

- l'extrémité C-terminale semble en effet pouvoir assurer elle-même une fonction similaire à celle de la protéine d'ancrage IRS-1 (Fernandez *et al.*, 1995 ; Ruan *et al.*, 1995), comme c'est également le cas chez le nématode *C. elegans* (Kimura *et al.*, 1997).

- mais une signalisation indirecte via des molécules de type IRS reste néanmoins possible puisqu'un motif consensus [N-P-N-Y], accolé en N-terminal du motif [Y-X-X-M] et capable de lier des molécules d'IRS-1, a été récemment mis en évidence. D'ailleurs, une molécule homologue à l'IRS-1 a récemment été identifiée chez la drosophile, et elle semblerait interagir avec le domaine tyrosine kinase par l'intermédiaire du domaine de liaison de l'IRS-1 afin de réguler les mécanismes de la croissance (taille, nombre et métabolisme des cellules) (Böhni *et al.*, 1999 ; Poltilove *et al.*, 2000). L'extension C-terminale via son interaction avec une molécule de type IRS-1 serait alors impliquée dans la survie cellulaire, et

le domaine tyrosine kinase assurerait le contrôle de la prolifération cellulaire (Marin-Hincapie et Garofalo, 1999).

- en outre, l'existence de molécules de type IRS-1 chez la drosophile suggère la possibilité d'une interaction directe de cette protéine d'ancrage avec le domaine tyrosine kinase. Marin-Hincapie et Garofalo (1999) ont d'ailleurs suggéré que l'interaction de l'IRS-1 avec l'extension C-terminale serait plutôt impliquée dans la survie cellulaire alors que l'interaction de l'IRS-1 avec le domaine tyrosine kinase assurerait le contrôle de la prolifération cellulaire.

De la même manière, chez le nématode *C. elegans*, le récepteur CeDaf-2 présente une importante extension C-terminale de fonction analogue à l'IRS-1 de Vertébrés et un nombre élevé de résidus tyrosine contenus dans des motifs consensus [Y-X-X-M/T/N]. Ainsi, il interagirait avec des protéines de signalisation associées à des changements métaboliques, à la maturation de la lignée germinale, et au signal d'une sénescence normale, telles que AGE-1-PI-3 kinase impliquée dans le signal du développement (Kimura *et al.*, 1997). Par ailleurs, une molécule analogue à l'IRS-1 a récemment été caractérisée par Wolkow et ses collaborateurs (2001).

Chez les Invertébrés, la présence d'un important domaine C-terminal comportant de nombreux résidus tyrosine et des sites, souvent chevauchants, de phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine kinase II traduit probablement l'existence d'une régulation complexe de la signalisation par le récepteur.

Chez *C. gigas*, l'absence de motif consensus [N-P-N-Y] en amont du site unique [Y-X-X-M] d'interaction avec des protéines à domaines SH2, suggère qu'aucune interaction entre le domaine C-terminal et des protéines de type IRS-1 n'est possible. En revanche, le récepteur CIR possède un motif consensus de liaison de protéines à domaines SH2 ainsi qu'un site de liaison de la protéine d'ancrage au niveau du domaine tyrosine kinase, comme décrit chez les Vertébrés.

Chez les Vertébrés, l'avantage sélectif de l'utilisation exclusive d'une signalisation via des protéines de type IRS-1 n'est pas encore élucidé, mais ces protéines pourraient être une façon d'amplifier le signal, en éliminant les contraintes stœchiométriques rencontrées par les récepteurs qui recrutent directement les protéines de signalisation, et en se partageant entre plusieurs récepteurs (Yenush *et al.*, 1996). De plus, l'existence de nombreuses protéines IRS et IRS-like fournit probablement une diversité de signalisation supplémentaire (Yenush *et al.*, 1996).

En conclusion, la caractérisation de la séquence partielle du récepteur CIR et l'analyse comparative de cette séquence par rapport aux récepteurs de la famille Rins/RIGF-1 identifiés chez les Vertébrés et les Invertébrés, suggèrent que ce récepteur unique, comme ceux d'Invertébrés :

- pourrait lier des ligands divergents des insulines de Vertébrés,
- peut stimuler plusieurs voies de signalisation (Ras/MAPkinase, PI-3 kinase, p70S6 kinase...) du fait de la formation de complexes stables avec les protéines de signalisation à domaines SH2 ou PTB,
- peut exercer un contrôle complexe de la transduction du signal à partir des sites de N-glycosylation du domaine extracellulaire, des sites de phosphorylation à résidus tyrosine des domaines tyrosine kinase et C-terminal, et des sites de phosphorylation à résidus sérine et thréonine du domaine C-terminal.

Ce récepteur CIR de *C. gigas* semble tenir une position intermédiaire entre les récepteurs d'Invertébrés et de Vertébrés, si on se réfère aux alignements de séquences qui indiquent une meilleure conservation de séquence avec les séquences de Vertébrés mais aussi et surtout avec celle de l'amphioxus. Néanmoins, le récepteur CIR possède un domaine C-terminal plus long que celui des Vertébrés avec de nombreux résidus tyrosyl supplémentaires susceptibles de former des complexes stables avec des protéines de signalisation, ce qui est également le cas de certains récepteurs d'Invertébrés (*Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*). Ce récepteur unique de *C. gigas* semble donc pouvoir participer à de nombreuses voies de signalisation, alors que chez les Vertébrés ces différentes fonctions sont réparties entre les récepteurs à l'insuline et les récepteurs à l'IGF-1.

Hypothèse évolutive.

L'ensemble de ces données peut être corrélé à la théorie évolutive des récepteurs et des ligands de la famille des insulines/IGFs admise depuis la caractérisation d'un récepteur unique chez un prochordé, l'amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* (Pashmforoush *et al.*, 1996), et de deux molécules ligands distinctes chez un tunicier, l'ascidie *Chelyosoma productum* (Mc Rory et Sherwood, 1997). La diversification de l'insuline et d'un protoIGF se serait donc produite très tôt au cours de l'évolution (avant l'apparition des tuniciers), par duplication, et les deux lignées de gènes séparées se sont maintenues au cours de l'évolution des prochordés jusqu'aux Vertébrés, soit une évolution distincte d'environ 650 millions d'années. Le

récepteur de l'amphioxus (ILPR ou BInsR) serait quant à lui un homologue d'une forme ancestrale et se serait dupliqué au moment de la transition prochordés/Vertébrés, il y a 550 millions d'années, pour aboutir aux deux types de récepteurs (récepteurs à l'insuline et aux IGFs) qui existent chez les Vertébrés. Ces deux types de récepteurs se seraient alors spécialisés dans la liaison d'un type de ligand et dans la transduction du signal approprié.

Chez les Vertébrés primitifs, l'émergence de gènes séparés pour l'insuline et les IGFs, ainsi que pour leurs récepteurs, est probablement la conséquence d'un avantage sélectif qui résulte de l'obtention d'hormones plus spécialisées dans la régulation de la croissance (IGFs) ou de l'activité métabolique (insuline) (Pashmforoush *et al.*, 1996). Des poissons aux Vertébrés supérieurs, cette spécialisation de fonction s'est accrue par la duplication du gène des IGFs en IGF-1 et IGF-2, et davantage encore avec l'apparition du récepteur à l'IGF-2 à l'émergence des mammifères, conduisant ainsi au contrôle des activités métaboliques par l'insuline, de la croissance et du développement par l'IGF-1 et du développement embryonnaire et fœtal par l'IGF-2 (Daughaday et Rotwein, 1989).

Chez les Invertébrés, le récepteur ancestral a probablement subi de nombreuses mutations conduisant à différents types de récepteurs, mais toujours uniques au sein de chaque espèce. Ce récepteur aurait conservé la capacité de liaison de ligands multiples et d'activation de voies de signalisation multiples.

L'analyse de l'alignement de séquences, et de l'arbre évolutif déduit de ces alignements, confirment cette hypothèse. En effet, on retrouve qu'un ancêtre commun aurait évolué pour donner, dans un cas, le gène du récepteur unique de l'amphioxus qui se serait ensuite dupliqué pour aboutir aux groupes des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 de Vertébrés, et dans l'autre cas, pour donner le groupe relativement divergent des récepteurs uniques de type insuline/IGF d'Invertébrés. Nos résultats suggèrent que les domaines tyrosine kinase et C-terminal joueraient un rôle essentiel dans la divergence entre les séquences de récepteurs d'Invertébrés, voire de Vertébrés. En effet, le domaine C-terminal est le domaine le moins conservé, ce qui témoigne probablement d'une pression de sélection plus élevée dans ce domaine par rapport aux autres domaines structuraux. Or, chez les Invertébrés, le domaine C-terminal semble, parallèlement à une augmentation de sa taille, être responsable d'un grand nombre de fonctions de signalisation. Au cours de l'évolution, on observe une tendance à la réduction de la partie C-terminale, parallèlement à une spécialisation de fonction, ce que confirme d'ailleurs l'expérience de Fernandez et collaborateurs (1995) sur les récepteurs de drosophile tronqués qui perdent une partie de leurs voies de signalisation. Chez les Vertébrés,

le domaine C-terminal, de taille plus réduite et homogène, et qui ne diffère que légèrement entre les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1, traduit une plus grande stabilité structurale et fonctionnelle des récepteurs.

Expression du récepteur de type insuline/IGF chez C. gigas.

L'approche par "Northern blotting" a révélé que le transcrite du récepteur CIR est probablement de grande taille, supérieure à 10 kb, ce qui pourrait correspondre aux données décrites dans la littérature. En effet, si chez certains Invertébrés les transcrits sont uniques et de petite taille, *Hydra vulgaris* (4,8 kb) et *Biomphalaria glabrata* (5,6 kb), chez d'autres espèces, les récepteurs s'expriment sous la forme de plusieurs transcrits, dont un majoritaire est de grande taille, comme chez la drosophile (8,6 et 11 kb) (Ruan *et al.*, 1995) ou le moustique *Aedes aegypti* (7,5 et 8,5 kb) (Graf *et al.*, 1997). Chez l'amphioxus, un seul transcrite de 7,5 kb est exprimé (Pashmforoush *et al.*, 1996), alors que généralement, chez les Vertébrés, les récepteurs à l'insuline sont exprimés sous la forme de plusieurs transcrits, dont un, le plus grand, est majoritaire, et les récepteurs à l'IGF-1 sous la forme d'un transcrite unique de grande taille. Ainsi, chez le turbot la taille des transcrits est de 4, 7 et 11 kb pour le récepteur à l'insuline (Eliès *et al.*, 1999) et 13 kb pour le récepteur à l'IGF-1 (Eliès *et al.*, 1996 ; Duval, 2000), et chez l'homme 8,6 et 11 kb pour le récepteur à l'insuline (Ullrich *et al.*, 1986) et 11 kb pour le récepteur à l'IGF-1 (Lévy *et al.*, 1995).

Les variations de taille des transcrits semblent être principalement dues à des changements de taille des 3'NTRs ainsi, éventuellement, qu'à la présence ou l'absence de polyadénylation (Goldstein et Kahn, 1989 ; Eliès *et al.*, 1998 ; Groigno *et al.*, 1996, 1999 ; Greene et Chen, 1999 a et b). Par ailleurs, les 5' et 3'NTRs sont généralement de taille importante pour les transcrits des récepteurs de facteurs de croissance (EGF, PDGF,...) et les molécules potentiellement impliquées dans la prolifération cellulaire (oncoprotéines, facteurs de transcription) (Kosak, 1986, 1987). La présence de la queue poly(A⁺), et donc d'une longue 3'NTR, est d'ailleurs impliquée dans la stabilité des messagers (Lewis *et al.*, 1995, pour revue). En effet, l'addition de la queue poly(A⁺) est généralement associée à une traduction active de l'ARNm, et la variation de l'état de polyadénylation de l'ARNm (adénylé ou pas), souvent observée au cours du développement, pourrait représenter une forme de régulation de la traduction et donc de l'expression des protéines (Eliès, 1997). Chez *C. gigas*, la 3'NTR représenterait 4 à 4,5 kb ce qui est sensiblement supérieur à la 3'NTR de la drosophile

Drosophila melanogaster (environ 3 kb) (Garofalo et Rosen, 1988) et du moustique *Aedes aegypti* (environ 3 kb) (Graf *et al.*, 1997), mais reste inférieur aux 3'NTRs des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 de Vertébrés (plus de 5 kb) (Lévy *et al.*, 1995 ; Eliès *et al.*, 1996, 1998). Chez la drosophile, le développement embryonnaire précoce s'avère être largement sous contrôle d'ARNm d'origine maternelle préalablement stockés dans les ovocytes (Petruzzelli *et al.*, 1986 ; Garofalo et Rosen, 1988). La stabilité de ces ARNm maternels est associée à l'addition de la queue poly(A⁺) pendant la maturation ovocytaire. Ces ARNm sont alors activés et restent poly(A⁺) pendant la fertilisation et les premiers événements du développement embryonnaire (établissement et/ou maintien des axes de polarité embryonnaire, induction mésodermique de la gastrulation, induction neuronale et mise en place du système nerveux central) (Fernandez *et al.*, 1995). Chez les poissons (turbot et truite arc-en-ciel) et les amphibiens (xénope), les transcrits polyadénylés du récepteur à l'IGF-1, probablement d'origine maternelle, semblent également assurer une expression précoce des récepteurs jusqu'au milieu de l'embryogenèse, alors que les transcrits zygotiques trouvés chez l'adulte diffèrent soit par une déadénylation soit par une modification de leur région 3'NTR (Eliès *et al.*, 1996 ; Groigno *et al.*, 1996, 1999 ; Greene et Chen, 1999 b). Le récepteur à l'insuline, quant à lui, semble être en permanence polyadénylé (Eliès *et al.*, 1999). Cette différence de statut de polyadénylation suggère que le récepteur à l'IGF-1 est principalement actif au cours du développement embryonnaire et larvaire, alors que le récepteur à l'insuline s'exprime tout au long de la vie de l'animal, ce qui reflète tout à fait les différences de fonctions entre ces deux types de molécules.

Localisation de l'expression.

Chez *C. gigas*, le récepteur CIR est exprimé au cours du développement larvaire ainsi que dans tous les tissus adultes. Cependant, le niveau d'expression du transcrit CIR varie largement au cours du développement larvaire, puis chez l'adulte, d'un tissu à l'autre. De par ce profil d'expression ubiquitaire, le récepteur CIR apparaît donc être un récepteur multifonctionnel.

- Par sa localisation et sa forte expression au niveau des tissus impliqués dans la mise en réserve de glycogène (mais aussi de protéines et de lipides) (palpes labiaux, glande digestive, branchies, muscle et manteau), le récepteur CIR pourrait effectivement intervenir dans la régulation du métabolisme glucidique. Différents effets biologiques de molécules de

type insuline/IGF ont d'ailleurs été mis en évidence au niveau de ce métabolisme chez les Invertébrés (Marques et Falkmer, 1976 ; Plisetskaya *et al.*, 1978, 1979 ; Madar *et al.*, 1979 ; Rusakov et Kasakov, 1979). Et, chez *C. gigas*, il a été montré que l'insuline porcine active l'entrée de glucose dans les cellules vésiculeuses d'huître, et donc l'incorporation de glucose dans le glycogène (Laisney, 2000). En outre, dans le chapitre précédent de notre étude, une liaison de type insuline/IGF a pu être mise en évidence au niveau des palpes labiaux.

- L'expression du récepteur au niveau d'organes en constante régénération (glande digestive et branchies) ou en croissance continue (manteau et bord du manteau) suggère également un rôle potentiel du récepteur CIR dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaire. L'expression du récepteur au niveau du bord du manteau peut d'ailleurs être corrélée avec la liaison de type insuline/IGF et les effets biologiques décrits dans le chapitre précédent, et qui témoignent de l'implication de molécules de la famille des insulines/IGFs et de leurs récepteurs dans les processus de croissance des tissus mous et de la coquille de l'huître. En outre, par la technique de l'hybridation *in situ*, des transcrits du récepteur CIR ont pu être précisément localisés au niveau de la corne externe du bord du manteau, siège de la synthèse des protéines assurant la formation de la couche externe de la coquille (péριοstracum), ainsi qu'au niveau de l'épithélium externe du manteau impliqué dans l'élaboration de la couche interne de la coquille (**Figure III.22**).

- Le récepteur CIR semble également fortement exprimé dans la gonade, d'une part la gonade en période de mitoses, suggérant à nouveau le rôle du système ligand-récepteur dans la prolifération goniale, et d'autre part dans la gonade femelle en vitellogenèse, ce qui traduit là encore l'implication de ce système ligand-récepteur dans la phase de maturation ovocytaire. Cette spécificité d'expression est d'ailleurs en complet accord avec la mise en évidence d'une liaison de type insuline/IGF au niveau du tissu gonadique et surtout avec les effets biologiques précédemment décrits, qui témoignent de l'implication de molécules de la famille des insulines/IGFs dans la prolifération des cellules germinales par mitoses successives et dans le développement et la maturation des gamètes femelles. Du reste, chez les insectes, *Aedes aegypti* (Riehle et Brown, 1999) et *Bombyx mori* (Lindstrom-Dinnetz et Iatrou, 1997), les récepteurs de type insuline ont été caractérisés à partir d'ovaires, et leur niveau d'expression est augmenté dans les cellules folliculaires (Helbling et Graf, 1998), qui représentent la principale source d'ecdystéroïdes chez les insectes (Kappler *et al.*, 1986), et au niveau des cellules nourricières impliquées dans la maturation des ovocytes (Helbling et Graf, 1998 ; Garofalo et Rosen, 1988).

- Enfin, le récepteur CIR s'exprime de manière différentielle au cours du développement larvaire. Une importante localisation d'ARNm de récepteur CIR est observée au niveau des ovocytes en fin de vitellogenèse. Un suivi de l'évolution de l'expression des ARNm du récepteur CIR au cours de la vitellogenèse, ainsi que de leur statut de polyadénylation au cours du développement embryonnaire, permettrait de préciser la stabilité et l'activité de ces messagers à ce stade de développement très précoce. Après la fécondation, le transcrit s'exprime de façon graduellement plus forte du stade larve D au stade véligère 11 jours (c'est-à-dire au cours des stades précoces du développement larvaire) puis son expression décline jusqu'à la métamorphose. Le niveau d'expression maximal, au stade véligère 11 jours, alors que se mettent en place les principaux organes et le système nerveux central, traduit l'implication de molécules de la famille des insulines/IGFs dans les processus de différenciation tissulaire, et peut-être également leur implication dans le métabolisme glucidique associé à ces bouleversements tissulaires (dépense énergétique). La métamorphose, au cours de laquelle certains organes larvaires se résorbent ou dégénèrent, tandis que d'autres se réorientent ou se réorganisent, et qu'enfin certains organes se différencient à partir de tissus encore indifférenciés, semble en revanche représenter un ensemble de processus physiologiques peu dépendants de molécules de type insuline/IGF, et qui ne s'accompagnent donc pas d'une expression importante du récepteur CIR. Ces résultats peuvent être comparés à ceux décrits chez d'autres Invertébrés : chez la drosophile, le récepteur de type insuline est également fortement exprimé au cours du développement embryonnaire (Petruzzelli *et al.*, 1986 ; Chen *et al.*, 1996), et semble notamment être impliqué dans la prolifération cellulaire et/ou avoir un rôle trophique au cours de la neurogenèse (Fernandez *et al.*, 1995). Les ARNm de récepteur de drosophile stockés dans les ovocytes semblent donc bien représenter un pool d'ARNm de récepteurs transmis par la mère afin d'être traduits au cours des premiers stades de développement embryonnaire et larvaire (Petruzzelli *et al.*, 1986 ; Garofalo et Rosen, 1988).

L'étude de la localisation et de l'expression du récepteur CIR confirme ainsi l'implication de molécules apparentées aux insulines/IGFs et de leurs récepteurs uniques dans de multiples fonctions chez C. gigas, comme chez les Invertébrés en général, telles que le métabolisme glucidique, la reproduction, la croissance et le développement des tissus adultes et larvaires, assurées chez les Vertébrés par plusieurs types de récepteurs.

Les récepteurs de type insuline/IGF des espèces d'Invertébrés auraient donc évolué séparément à partir d'une molécule ancestrale commune au récepteur unique de type insuline du prochordé *Branchiostoma lanceolatum* (amphioxus). Chez les Vertébrés, cette molécule ancestrale est à l'origine des récepteurs à l'insuline et aux IGFs, alors que chez les Invertébrés, les récepteurs sont des molécules uniques qui assurent seules de multiples fonctions biologiques. Cette pléiotropie d'effets biologiques, qui se traduit également par un vaste profil d'expression, pourrait être attribuée :

- au domaine C-terminal très peu conservé entre les espèces Vertébrés et Invertébrés. Au niveau des récepteurs d'Invertébrés, le domaine C-terminal peut lier directement ou indirectement via une molécule d'ancrage de type IRS-1 de nombreuses molécules de la cascade de signalisation. Au cours de l'évolution, ce domaine, qui participe à la transmission du signal biologique du ligand, aurait subi de nombreuses mutations conduisant à la perte la pléiotropie et à la spécialisation fonctionnelle des récepteurs vis-à-vis des ligands.

- à une activation importante des récepteurs qui résulte probablement de la présence de nombreux sites potentiels d'autophosphorylation (tyrosine) au niveau des domaines tyrosine kinase et C-terminal, de nombreux sites de N-glycosylation du domaine extracellulaire, et d'une endocytose du récepteur activé ("down-regulation") moins importante. Néanmoins, comme chez les Vertébrés, la signalisation est soumise à une régulation complexe probablement issue de la phosphorylation de résidus sérine et thréonine au niveau du domaine C-terminal.

- à la présence de molécules ligands différentes qui pourraient être issues de familles de gènes comme chez la limnée. Ces molécules, relativement divergentes des molécules de type insuline/IGF de Vertébrés mais aussi entre elles, pourraient s'exprimer de façon différentielle, selon le tissu, le cycle biologique, et le stade de développement de l'organisme, et compenser ainsi l'absence de spécialisation des récepteurs de type insuline chez les Invertébrés.

Conclusion Générale et Perspectives

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence l'existence d'un système insuline/IGF chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* et de préciser ses fonctions biologiques. En effet, ces molécules interviennent chez de nombreux Invertébrés dans la régulation de processus physiologiques tels que la reproduction, la croissance, et de façon plus générale dans la régulation du métabolisme glucidique, lipidique et protéique, en agissant par voie endocrine et/ou paracrine/autocrine. Or, des travaux antérieurs réalisés sur les bivalves ont démontré l'existence de mécanismes de régulation stricte de ces processus physiologiques, même si les régulateurs homologues n'ont pas encore pu être identifiés à ce jour.

L'effet biologique de l'IGF-1 recombinant humain a donc été recherché chez *C. gigas* au cours d'un cycle biologique sur deux types de tissus cibles : la gonade, pour évaluer l'effet de l'IGF-1 rh sur la reproduction, et le bord du manteau, zone de croissance active. Les tests biologiques *in vitro* réalisés sur les cellules germinales indiquent que des molécules de type insuline/IGF exercent un effet activateur sur la prolifération des cellules goniales (augmentation des synthèses d'ADN) ainsi que sur le développement et la maturation des gamètes (augmentation des synthèses de protéines). Sur les cellules dissociées de bord du manteau, ces molécules sont impliquées dans le métabolisme protéique associé à la croissance des parties molles mais également à la formation de la coquille (ce qui a d'ailleurs été confirmé par l'hybridation *in situ*).

Ces effets pléiotropes, sur des types cellulaires multiples, d'une molécule issue d'un organisme phylogénétiquement très éloigné suggèrent l'existence de molécules de la même famille chez *C. gigas* et la multiplicité de leurs effets biologiques. Ils indiquent également que les voies de transduction du signal déclenchées par la liaison du ligand chez *C. gigas* sont analogues à celles décrites chez les Vertébrés.

Les activations significatives obtenues avec une molécule même hétérologue attestent également de l'intérêt de cette famille de molécules pour la mise au point de milieux de culture cellulaire adaptés aux bivalves, et il apparaît que la disponibilité du ligand homologue serait particulièrement avantageuse dans cette optique.

Une saisonnalité très marquée des effets biologiques de l'IGF-1 rh sur la reproduction et la croissance a également été observée. Cette saisonnalité peut être à l'origine de la difficulté à reproduire les effets activateurs d'une expérience à l'autre, à quelques semaines d'intervalle. Les programmes actuels de cryopréservation des cellules cibles (hémocytes, cellules germinales, cellules de réserve, cellules du manteau) devraient cependant permettre

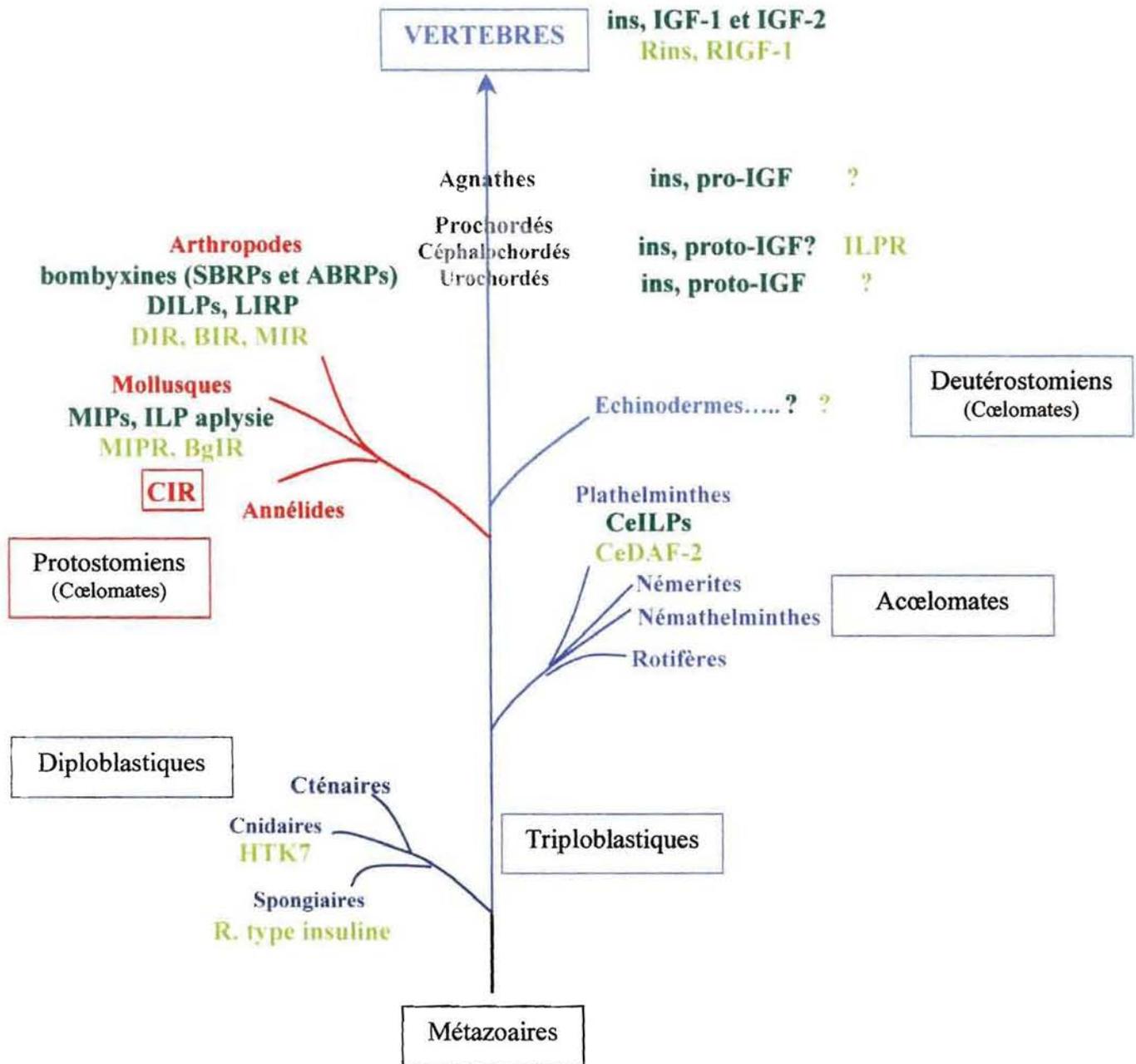


Figure 1 : Répartition phylogénétique des molécules du système insuline/IGF (ligands et récepteurs).

Bombyxines : molécules de type insuline chez *Bombyx mori* ; SBRPs : molécules de type insuline chez *Samia cynthia ricini* ; ABRPs : molécules de type insuline chez *Agrius convolvuli* ; DILPs : molécules de type insuline chez *Drosophila melanogaster* ; LIRP : molécule de type insuline chez *Locusta migratoria* ; MIPs : molécules de type insuline chez *Lymnaea stagnalis* ; ILP aplysie : molécule de type insuline chez *Aplysia californica* ; CeILPs : molécules de type insuline chez *Caenorhabditis elegans*.

ILPR : récepteur de type insuline de l'amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* ; DIR : récepteur de type insuline de *Drosophila melanogaster* ; MIR : récepteur de type insuline de *Aedes aegypti* ; BIR : récepteur de type insuline de *Bombyx mori* ; MIPR : récepteur de type insuline de *Lymnaea stagnalis* ; BgIR : récepteur de type insuline de *Biomphalaria glabrata* ; CIR : récepteur de type insuline de *Crassostrea gigas* ; CeDAF-2 : récepteur de type insuline de *Caenorhabditis elegans* ; HTK7 : récepteur de type insuline de *Hydra vulgaris*.

de s'affranchir de cet effet de saisonnalité. Il sera alors possible de disposer tout au long de l'année de lots congelés de cellules homogènes et de sensibilité optimale aux facteurs, ce qui facilitera considérablement l'utilisation des tests biologiques *in vitro* et la purification de molécules régulatrices homologues.

Cette saisonnalité est la conséquence d'une variation de réceptivité des cellules cibles, probablement associée à une variation de l'expression des récepteurs liant l'IGF-1 rh à la surface des cellules des tissus cibles.

L'existence de ces récepteurs a d'ailleurs été montrée par le déplacement de la liaison de l'IGF-1 rh à partir de différents tissus cibles, mais également par la caractérisation d'un récepteur de type insuline chez *C. gigas*. Ce récepteur homologue semble relativement conservé avec les récepteurs de Vertébrés mais aussi avec les récepteurs de type insuline d'Invertébrés décrits dans la littérature. La caractérisation complète du récepteur par la technique de 5'RACE-PCR devra être achevée ; elle permettra de parfaire la recherche d'homologie et de séquences consensus dans le domaine de liaison du ligand et de préciser les alignements avec les séquences répertoriées dans les banques de données. Mais, d'ores et déjà, les régions caractéristiques de la famille des récepteurs aux molécules de type insuline/IGF ont été identifiées. D'un point de vue phylogénique, la caractérisation de cette séquence permet d'étendre la répartition de ces récepteurs à la classe des Mollusques bivalves et donc de suggérer l'existence d'un "proto-récepteur" chez des organismes plus primitifs, comme a d'ailleurs été émise l'hypothèse de la présence d'un "proto-ligand" (arbre de la répartition phylogénétique des ligands et des récepteurs).

La caractérisation du domaine catalytique à activité tyrosine kinase et la mise en évidence de séquences de fonctionnalité déterminée (sites de phosphorylation et de liaison de protéines de signalisation) confirment la participation du récepteur homologue à de nombreuses voies de transduction du signal, équivalentes à celles décrites dans la littérature. Ce récepteur est donc potentiellement impliqué dans plusieurs fonctions biologiques, ce qui se traduit d'ailleurs par un large profil d'expression du récepteur dans les tissus responsables du métabolisme énergétique, de la reproduction et de la croissance des adultes, ainsi que des différentes étapes du développement des larves.

Aux vues de cette expression ubiquitaire, et notamment au cours du développement des larves, il sera intéressant de préciser les variations de l'expression du récepteur du

système insuline/IGF, par exemple par la technique de PCR en temps réel, ce qui permettra de confirmer et d'affiner les effets biologiques obtenus. L'expression de ce marqueur, associée à d'autres facteurs comme l'expression du TGF- β , pourrait constituer à terme un moyen de caractériser des souches sélectionnées.

Enfin, la disponibilité de la séquence du récepteur de type insuline de *C. gigas* permettrait d'envisager la production en grande quantité du récepteur homologue dans un système d'expression eucaryote (cellules d'Insectes utilisées au laboratoire) assurant les différents mécanismes de maturation post-traductionnelle de la protéine (à savoir le clivage protéolytique du pro-domaine et des deux sous-unités, la formation de ponts disulfures, la N-glycosylation, la dimérisation et l'adoption de la conformation spatiale adéquate). Grâce à la surexpression à la surface de cellules cibles (ovocytes par exemple) de cette protéine recombinante correctement maturée, il serait envisageable de rechercher le ou les ligands du système insuline/IGF de *C. gigas*. Cela nécessitera la mise au point préalable d'un test biologique fiable qui permettra de sélectionner les fractions de tissus positives. Le test biologique pourrait être basé sur la phosphorylation d'une protéine de signalisation spécifique à la cascade de transduction du signal des molécules d'insuline/IGF, ou sur la production de messagers secondaires, ou bien encore basé sur le déplacement par les différentes fractions de la liaison aux récepteurs recombinants d'une molécule de type insuline/IGF marquée.

L'obtention et la production par le même système de molécules de type insuline/IGF serait alors un atout majeur pour la mise au point de modèles de cultures de cellules. D'un point de vue appliqué, ces modèles permettraient d'étudier l'impact de facteurs environnementaux, écotoxicologiques ou alimentaires sur la physiologie de l'huître et ainsi d'optimiser la production et la croissance des huîtres creuses *Crassostrea gigas*.

Bibliographie

-A-

- Abbott, A.M., Bueno, R., Pedrini, M.T., Murray, J.M., and Smith, R.J. 1992. Insulin-like growth factor-I receptor gene structure. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10759-10763.
- Abdraba, A.M. 1999. Partial characterization of insulin-like peptide(s) in *Otala lactea* (Mollusca : Pulmonata) and involvement in the brain in protein and polysaccharide synthesis by the mantle. *Ph. D thesis, York University, Toronto*.
- Abdraba, A.M., and Saleuddin, A.S.M. 2000 a. Localization and immunological characterization of insulin-like peptide(s) in the land snail *Otala lactea* (Mollusca : Pulmonata). *Can. J. Zool.*, **78**, 1515-1526.
- Abdraba, A.M., and Saleuddin A.S.M. 2000 b. Protein synthesis *in vitro* by mantle tissue of the land snail *Otala Lactea* : possible insulin-like peptide function. *Can. J. Zool.*, **78**, 1527-1535.
- Adachi, T., Takiya, S., Suzuki, Y., Iwani, M., Kawakami, A., Takahashi, S.Y., Ishizaki, H., Nagasawa, H., and Suzuki, A. 1989. cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, **264** (13), 7681-7685.
- Anderson, C.M., and Olefsky, J.M. 1991. Phorbol ester-mediated protein kinase C interaction with wild-type and COOH-terminal truncated insulin receptors. *J Biol Chem.*, **266** (32), 21760-21764.
- Atrazhev, A.M., and Elliot, J.F. 1996. Simplified desalting of ligation reactions immediately prior to electroporation into *E. coli*. *Biotechniques*, **21**, 1024.

-B-

- Backer, J.M., Shoelson, S.E., Weiss, M.A., Hua, Q.X., Cheatham, R.B., Haring, E., Cahill, D.C., and White, M.F. 1992. The insulin receptor juxtamembrane region contains two independent tyrosine/beta-turn internalisation signals. *J. Cell, Biol.*, **118** (4), 831-9.
- Baños, N., Baro, J., Castejon, C., Navarro, I., and Gutiérrez, J. 1998. Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regul. Pept.*, **77**, 55-62.
- Baños, N., Moon, T.W., Castejon, C., Gutiérrez, J., and Navarro, I. 1997. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding in fish red muscle : regulation by high insulin levels. *Regul. Pept.*, **68**, 181-187.
- Bayne, B.L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In M. Wiley (ed.): "*Estuarine Process*", Academic press, 432-448.
- Beckemeyer, E.F., and Lea, A.O. 1980. Induction of follicle separation in the mosquito by physiological amounts of ecdysterone. *Science*, **209**, 810-821.
- Berthelin, C., Kellner, K., and Mathieu M. 2000 a. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 136-145.

Berthelin, C., Kellner, K., and Mathieu M. **2000 b**. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West coast of France). *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, **125**, 359-369.

Blundell, T.L., and Humbel, R.E. **1980**. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature*, **287**, 781-786.

Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B.F., Beckingham, K., and Hafen, E. **1999**. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homologue of vertebrate IRS1-4. *Cell*, **97** (7), 865-875.

Bradford, M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K., and Vanfleteren, J.R. **2001**. Insulin-like signaling, metabolism, stress resistance and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.*, **122**, 673-693.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. **2001**. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.*, **11** (4), 213-221.

-C-

Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kappeler, R., and Soltoff, S. **1991**. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, **64** (2), 281-302.

Cao, C., and Brown, M.R. **2001**. Localization of insulin-like peptide in brains of two flies. *Cell Tissue Res.*, **304** (2), 317-321.

Chan, S.J., Emdin, S.O., Kwok, S.C.M., Kramer, J.M., Falkner, S., and Steiner, D.F. **1981**. Messenger RNA sequence and primary structure of preproinsulin in primitive Vertebrate, the Atlantic Hagfish. *J. Biol. Chem.*, **256**, 7595-7602.

Chan, S.J., Cao, Q-P., and Steiner, D.F. **1990**. Evolution of the insulin superfamily: cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cDNA from amphioxus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9319-9323.

Chan, S.J., Cao, Q-P., Nagamatsu, S., and Steiner, D.F. **1993**. Insulin and insulin-like growth factor genes in fishes and other primitive chordates. In Hochachka and Mommsen (eds.): "*Biochemistry and molecular biology of fishes*", Vol. 2, New York: Elsevier Science Publishers, 407-417.

Chen, C., Jack, J., and Garofalo, R.S. **1996**. The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology*, **137** (3), 846-856.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.

Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C.F., and Roth, J. 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J Biol Chem.*, **262** (13), 6238-6247.

Comps, M., et Duthoit, J.L. 1976. Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (Lmk.). *C. R. Acad. Sc. Paris, Série D*, **283**, 1595-1596.

Considine, R.V., and Caro, J.F. 1993. Protein kinase C: mediator or inhibitor of insulin action? *J. Cell. Biochem.*, **52**, 8-13.

Coulon, I. 1993. Mise au point d'un système contrôlé de culture de cellules de cœur d'huître *Crassostrea gigas*. Application au test de la toxicité des produits chimiques en milieu aquatique. *Thèse de Doctorat*, Institut National Agronomique Paris-Grignon.

Cousserans, F. 1975. Recherches sur la culture de cellules de mollusques marins et sur l'emploi de ces systèmes cellulaires en pathologie marine. *Thèse de Doctorat*, Université de Montpellier.

-D-

Daughaday, W.H., and Rotwein, P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger, ribonucleic acid and gene structure, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.*, **10**, 68-91.

Davidson, J.K., Falkmer, S., Mehrotra, B.K., and Wilson, S. 1971. Insulin assays and light spectroscopical studies of digestive organs in prostomian and deuterostomian species and in coelenterates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **17**, 388-401.

De Myets, P., and Roth, J. 1975. Cooperativity in ligand binding : a new graphic analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66** (4), 1118-1125.

De Meyts, P., Bianco, A.R., and Roth, J. 1976. Site-site interactions among insulin receptors. *J. Biol. Chem.*, **251** (7), 1877-1888.

de Pablo, F., Chambers, S.A., and Ota, A. 1988. Insulin-related molecules and effects in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.*, **130**, 304-310.

Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G.G., Hubbard, R.E., and Korber, F. 1989. Molecular structure of insulin : the insulin monomer and its assembly. *Br Med Bull.*, **45** (1), 4-18.

de With, N.D., Li, K.W., Jimenez, C.R., Vonk, N., Dreisewerd, K., Hillenkamp, F., Karas, M., and Geraerts, W.P.M. 1997. Intracellular degradation of C-peptides in molluscan Neurons Producing Insulin-Related Hormones. *Peptides*, **18** (6), 765-770.

Dillaman, R.M., Saleuddin, A.S.M, and Jones, G.M. 1976. Neurosecretion and shell regeneration in *Helisoma duryi* (Mollusca : Pulmonata). *Can. J. Zool.*, **54**, 1771-1778.

Dogterom, A.A., and Doderer, A. 1981. A hormone dependent calcium-binding protein in the mantle edge of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Calcif. Tissue Res.*, **33**, 505-508.

- Dogterom, A.A., and Jentjens, T. 1980. The effect of the growth hormone of the pond snail *Lymnaea stagnalis* on periostracum formation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **66A**, 687-690.
- Drakenberg, K., Sara, V.R., Falkmer, S., Gammeltoft, S., Maake, C., and Reinecke, M. 1993. Identification of IGF-1 receptors in primitive vertebrates. *Regul. Pept.*, **43**, 73-81.
- Dubois, W., and Callard, G.V. 1993. Culture of intact sertoli/germ cell units and isolated sertoli cells from *Squalus testis*. II. Stimulatory effects of insulin and IGF-I on DNA synthesis in premeiotic stages. *J. Exp. Zool.*, **267**, 233-244.
- Duguay, S.J., Chan, S.J., Mommsen, T.P., and Steiner, D.F. 1995. Divergence of insulin-like growth factor I and II in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. *FEBS Lett.*, **371**, 69-72.
- Duret, L., Guex, N., Peitsch, M.C., and Bairoch, A. 1998. New insulin-like proteins with atypical disulfide bond pattern characterized in *Caenorhabditis elegans* by comparative sequence analysis and homology modeling. *Genome Res.*, **8**, 348-353.
- Duval, H. 2000. Caractérisation des différentes composantes du système IGF chez un poisson évolué, le turbot *Psetta maxima*. *Thèse de doctorat*, Université de Rennes I.

-E-

- Ebberink, R.H.M., Smit, A.B., and Van Minnen, J. 1989. The insulin family: evolution of structure and function in Vertebrates and Invertebrates. *Biol. Bull.*, **177**, 176-182.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.-H., Masiarz, F., Kan, Y.W., Goldfine, I.D., Roth, R.A., and Rutter, J. 1985. The human insulin receptor cDNA : the structural basis for hormone- activated transmembrane signalling. *Cell*, **40**, 747-758.
- Eliès, G. 1997. Récepteur aux IGF de type I et récepteur à l'insuline chez le turbot (*Scophthalmus maximus*) : clonage des ADNc et caractérisation des ARN messagers. *Thèse de doctorat*, Université de Rennes I.
- Eliès, G., Groigno, L., Wolff, J., Boeuf, G., and Boujard, D. 1996. Characterization of the Insulin-like growth factor type I receptor messenger in two teleost species. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **124**, 131-140.
- Eliès, G., Groigno, L., Wolff, J., Boeuf, G., and Boujard, D. 1998. Cloning of the IGF-1 receptor cDNA of turbot (*Scophthalmus maximus*) Messenger expression and polyadenylation status. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **839**, 513-4.
- Eliès, G., Duval, H., Bonnac, G., Wolff, J., Boeuf, G., and Boujard, D. 1999. Insulin and Insulin-like growth factor-1 receptors in an evolved fish, the turbot : cDNA cloning and mRNA expression. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **158**, 173-185.
- Ellsworth, D.L., Hewett-Emmett, D., and Li, W-H. 1994. Evolution of base composition in the insulin and insulin-like growth factor genes. *Mol. Biol. Evol.*, **11** (6), 875-885.

-F-

Falkmer, S., Cutfield, J.F., Cutfield, S.M., Dodson, C.G., Gammeltoft, S., Marques, M., Peterson, J.D., Steiner, D.F., Sundby, F., Emdin, S.O., Havu, N., Ostberg, Y., and Winbladh, L. 1975. Comparative endocrinology of insulin and glucagon production. *Chem. Zool.*, **7**, 219-243.

F.A.O. 1999. *FAO Fisheries circular N. 818 Rev. 11 "Aquaculture Production Statistics"*.

Fantl, W.J., Johnson, D.E., and Williams, L.T. 1993. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 453-81.

Fawell, S., and Lenard, J. 1988. A specific insulin receptor and tyrosine kinase activity in the membranes of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155** (1), 59-65.

Felsenstein, J. 1989. PHYLIP : phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics*, **5**, 164-166.

Fernandez, R., Tabarin, D., Azpiazu, N., Frasch, M., and Schlessinger, J. 1995. The *Drosophila* insulin receptor homolog : a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signalling potential. *EMBO J.*, **14** (14), 3373-3384.

Fernandez-Almonacid, R., and Rosen, O.M. 1987. Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor. *Mol. Cell. Biol.*, **7** (8), 2718-2727.

Finch, C.E., and Ruvkun, G. 2001. The genetics of ageing. *Annu. Rev. Hum. Genet.*, **2**, 435.

Floyd, P.D., Li, L., Rubakhin, S.S., Sweedler, J.V., Horn, C.C., Kupfermann, I., Alexeeva, V.Y., Ellis, T.A., Dembrow, N.C., Weiss, K.R., and Vilim, F.S. 1999. Insulin prohormone processing, distribution, and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *J. Neurosci.*, **19** (18), 7732-7741.

Franchini, A., and Ottaviani, E. 1992. Intestinal cell types in the freshwater snail *Planorbarius corneus* : histochemical, immunocytochemical and ultrastructural observations. *Tissue Cell*, **24**, 387-396.

Fritsch, H., van Noorden, S., and Pearse, A.G. 1976. Cytochemical and immunofluorescence investigations on insulin-like producing cells in the intestine of *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.*, **165**, 365-369.

Frohman, M.A., Dush, M.K., and Martin, G.R. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8998-9002.

Fugo, H., Chen, J.H., Nakajima, M., Nagasawa, H., and Suzuki, A. 1987. Neurohormones in developing embryos of the silkworm *Bombyx mori* : the presence and characteristics of prothoracicotropic hormones. *J. Insect Physiol.*, **33**, 245-248.

Fullbright, G., Lacy, E.R., and Büllesbach, E.E. 1997. The prothoracicotropic hormone bombyxin has specific receptors on insect ovarian cells. *Eur. J. Biochem.*, **245**, 774-780.

-G-

Gabe, M. 1968. Techniques histologiques. Masson et C^{ie} eds, Paris-VI.

Galloway, S.M., and Cutfield, J.F. 1988. Insulin-like material from the digestive tract of the tunicate *Pyura pachydermatina* (Sea Tulip). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **69**, 105-113.

García Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M., and Sánchez de Jiménez, E. 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.*, **358**, 95-100.

Garcia, J.V., Stoppelli, M.P., Thompson, K.L., Decker, S.J., and Rosner, M.R. 1987. Characterization of a *Drosophila* protein that binds both epidermal growth factor and insulin-related growth factors. *J. Cell Biol.*, **105**, 449-456.

Garofalo, R.S., and Rosen, O.M. 1988. Tissue localization of *Drosophila melanogaster* insulin receptor transcripts during development. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1638-1647.

Gems, D., and Partridge L. 2001. Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 287-292.

Geraerts, W.P.M. 1976 a. Control of growth by neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **29**, 61-71.

Geraerts, W.P.M. 1976 b. The role of the lateral lobes in the control of growth and reproduction in the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **29**, 97-108.

Geraerts, W.P.M. 1992. Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **86**, 433-444.

Geraerts, W.P.M., Smit, A.B., Li, K.W., and Hordijk, P.L. 1992. The Light Green Cells of *Lymnaea* : A neuroendocrine model system for stimulus-induced expression of multiple peptide genes in a single cell type. *Experimentia*, **48**, 464-473.

Giard, W., Lebel, J-M., Boucaud-Camou, E., and Favrel, P. 1998. Effects of Vertebrate growth factors on digestive gland cells from the mollusc *Pecten maximus L.*: an *in vitro* study. *J. Comp. Physiol.*, **168B**, 81-86.

Goldstein, B.J., and Kahn, C.R. 1989. Analysis of mRNA heterogeneity by ribonuclease H mapping application to the insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 664-669.

Goldstein, B.J., Muller-Wieland, D., and Kahn, R. 1987. Variation in insulin receptor messenger ribonucleic acid expression in human and rodent tissues. *Mol. Endocrinol.*, **1**, 759-766.

Goltzene, F., Holder, F., Charlet, M., Meister, M., and Oka, T. 1992. Immunocytochemical localization of Bombyx-PTTH-like molecules in neurosecretory cells of the brain of the migratory locust, *Locusta migratoria*. A comparison with neuroparsin and insulin-related peptide. *Cell Tissue Res.*, **269** (1), 133-40.

- Gomot, P. 1993. Studies on the control of spermatogenic DNA synthesis by the mesocerebrum in the snail *Helix aspersa*. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **13** (5), 517-527.
- Gomot, A., Gomot, L., Marchand, C.R., Colard, C., and Bride, J. 1992. Immunocytochemical localization of insulin-related peptide(s) in the central nervous system of the snail *Helix aspersa* Müller : involvement in growth control. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **12** (1), 21-32.
- Gomot, A., and Gomot, L. 1995. Neurohormonal control of body and shell growth of the snail *Helix*. In Allemand D. and Cuif J.-P. (eds.): "Biomineralization 93." Bulletin de l'Institut Océanographique, **14** (2), 141-149.
- Gourdon, I., Gricourt, L., Kellner, K., Roch, P., and Escoubas, J.-M. 2000. Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc72) from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *DNA sequence*, **11** (3-4), 265-270.
- Graf, R., Neuenschwander, S., Brown, M.R., and Ackermann, U. 1997. Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, **6** (2), 151-163.
- Greene, M.W., and Chen, T.T. 1999 a. Characterization of teleost Insulin Receptor Family Members. I : Developmental expression of insulin receptor messenger RNAs in Rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **115**, 254-269.
- Greene, M.W., and Chen, T.T. 1999 b. Characterization of teleost Insulin Receptor Family Members. II : Developmental expression of insulin-like growth factor type I receptor messenger RNAs in Rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **115**, 270-281.
- Gregoire, F.M., Chomiki, N., Kachinskas, D., and Warden, C. 1998. Cloning and developmental regulation of a novel member of the insulin-like gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **249** (2), 385-390.
- Grimme, S., Höning, S., von Figura, K., and Schmidt, B. 2000. Endocytosis of insulin-like growth factor II by a mini-receptor based on repeat 11 of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J. Biol. Chem.*, **275** (43), 33697-33703.
- Grizel, H., Comps, M., Cousserans, F., Bonami, J.R., et Vago, C. 1974. Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *C. R. Acad. Sc. Paris, Série D*, **279**, 783-784.
- Groigno, L., Bonnef, G., Wolff, J., Joly, J., and Boujard, D. 1996. Insulin-like growth factor I receptor messenger expression during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Endocrinology*, **137** (9), 3856-63.
- Groigno, L., Richard-Parpaillon, L., and Boujard, D. 1999. Expression patterns of insulin receptor mRNA during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Mech. Dev.*, **86**, 151-154.
- Gubler, U., and Hoffman, B.J. 1983. A simple and very efficient method for generating complementary DNA libraries. *Gene*, **25**, 263-269.

Guan, K.L. 1994. The mitogen activated protein kinase transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell. Signal.*, **6** (6), 581-589.

Gutiérrez, J., and Plisetskaya, E.M. 1991. Insulin binding to liver plasma membranes of Coho salmon during smoltification. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **82**, 466-475.

Gutiérrez, J., Párrizas, M., Carneiro, N., Maestro, J.L., Maestro, M.A., and Planas, J. 1993. Insulin and IGF-1 receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries : changes with reproductive cycle. *Fish Physiol. Biochem.*, **11** (1-6), 247-254.

Gutiérrez, J., Párrizas, M., Maestro, M.A., Navarro, I., and Plisetskaya, E.M. 1995. Insulin and IGF-I binding and tyrosine kinase activity in fish heart. *J. Endocrinol.*, **146**, 35-44.

-H-

Hainaut, P., Kowalski, A., Giorgetti, S., Baron, V., and Van Obberghen, E. 1991. Insulin and insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) receptors in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry*, **273**, 673-678.

Hall, T.A. 1999. Bioedit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **41**, 95-98.

Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.

Hauser, F., Sondergaard, L., Grimmelhuijzen, C.J. 1998. Molecular cloning, genomic organization and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to gonadotropin-releasing hormone receptors for Vertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249** (3), 822-828.

Helbling, P., and Graf, R. 1998. Localization of the mosquito insulin receptor homolog (MIR) in reproducing yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*). *J. Insect Physiol.*, **44**, 1127-1135.

Heude-Berthelin, C. 2000. Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. *Thèse de Doctorat*, Université de Caen.

Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., and Bairoch, A. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 215-219.

Hopp, T.P., and Woods, K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3824-3828.

Hrzenjak, M., Kobrehel, D.D., Levanat, S., Jurin, M., and Hrzenjak, T. 1993. Mitogenicity of the earthworm's (*Eisenia foetida*) insulin-like proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **104B** (4), 723-729.

Hsin, H., and Kenyon, C. 1999. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature*, **399**, 362-366.

Hsu, D., Knudson, P.E., Zapf, A., Rolband, G.C., and Olefsky, J.M. 1994. NPXY motif in the insulin-like growth factor-I receptor is required for efficient ligand-mediated receptor internalization and biological signaling. *Endocrinology*, **134** (2), 744-749.

Humbel, R.E. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 445-462.

Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R.G. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.*, **20** (6), 761-787.

-I-

Ishizaki, H. and Suzuki, A. 1984. I.8 Prothoracicotropic hormone of *Bombyx mori*. In Hoffmann and Porchet (eds.): "Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones", Berlin-Heidelberg, Springer Verlag Eds., 63-77.

Ishizaki, H., and Suzuki, A. 1988. An insect brain peptide as a member of insulin family. *Horm. Metabol. Res.*, **20**, 426-429.

Iwami, M., Kawakami, A., Ishizaki, H., Takahashi, S.Y., Adachi, T., Suzuki, Y., Nagasawa, H., and Suzuki, A. 1989. Cloning of a gene encoding bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of silkworm *Bombyx mori* with prothoracicotropic activity. *Dev. Growth Differ.*, **31** (1), 31-37.

Iwami, M., Adachi, T., Kondo, H., Kawakami, A., Suzuki, Y., Nagasawa, H., Suzuki, A., and Ishizaki, H. 1990. A novel family C of the genes that encode bombyxin, an insulin-related brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori* : isolation and characterization of gene C-1. *Insect Biochem.*, **20**, 295-303.

Iwami, M., Furuya, I., and Kataoka, H. 1996 a. Bombyxin-related peptides: cDNA structure and expression in the brain of the hornworm *Agrius convolvuli*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **26** (1), 25-32.

Iwami, M., Tanaka, A., Hano, N., and Sakurai, S. 1996 b. Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization. *Experientia*, **52** (9), 882-887.

-J-

Janicot, M., Flores-Riveros, J.R., and Lane, M.D. 1991. The Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-1, and IGF-2 in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.*, **266** (15), 9382-9391.

Janicot, M., and Lane, M.D. 1989. Activation of glucose uptake by insulin and insulin-like growth factor I in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86** (8), 2642-2646.

Jhoti, H., McLeod, A.N., Blundell, T.L., Ishizaki, H., Nagasawa, H., and Suzuki, A. 1987. Prothoracicotropic hormone has insulin-like tertiary structure. *FEBS Lett.*, **219** (2), 419-425.

Jonas, E.A., Knox, R.J., Kaczmarek, L.K., Schwartz, J.H., and Solomon, D.H. 1996. Insulin receptor in *Aplysia* neurons : characterization, molecular cloning, and modulation of ion currents. *J. Neurosci.*, **16** (5), 1645-1658.

Jones, J.I., and Clemmons, D.R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.*, **16** (1), 3-34

-K-

Kagawa, H., Kobayashi, M., Hasegawa, Y., and Aida, K. 1994. Insulin and insulin-like growth factors I and II induce final maturation of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **95** (2), 293-300.

Kagawa, H., Moriyama, S., and Kawauchi, H. 1995. Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of the red seabream, *Pagrus major*. *Gen Comp Endocrinol.*, **99** (3), 307-315.

Kahn, C.R., White, M.F., Shoelson, S.E., Backer, J.M., Araki, E., Cheatham, B., Csermely, P., Folli, F., Goldstein, B.J., Huertas, P., Rothenberg, P.L., Saad, M.J.A., Siddle, K., Sun, X.J., Wilden, P.A., Yamada, K., and Kahn, S.A. 1993. The insulin receptor and its substrate: Molecular determinants of early events in insulin action. *Rec. Prog. Hormone Res.*, **48**, 291-339.

Kappler, C., Goltzené, F., Lagueux, M., Hetru, C., and Hoffmann, J.A., 1986. Role of the follicle cells and the oocytes in ecdysone biosynthesis and esterification in vitellogenic females of *Locusta migratoria*. *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.*, **9**, 17-34.

Kawakami, A., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A., and Ishizaki, H. 1989. Structure and organization of four clustered genes that encode bombyxin, an insulin-related brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6843-6847.

Kawano, T., Ito, Y., Ishiguro, M., Takuwa, K., Nakajima, T., and Kimura, Y. 2000. Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **273** (2), 431-436.

Kellner-Cousin, K., Mialhe, E., and Mathieu, M. 1994. Identification of insulin-like peptides in cerebral ganglion neurosecretory cells of the mussel *Mytilus edulis*. *Tissue Cell*, **26** (6), 891-899

Khan, H.R., Griffond, B., and Saleuddin A.S.M. 1992. Insulin-like peptide(s) in the central nervous system of the snail *Helisoma duryi*. *Brain Res.*, **580**, 111-114.

Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., and Ruvkunt G. 1997. Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **277**, 942-946.

Kimura-Kawakami, M., Iwami, M., Kawakami, A., Nagasawa, H., Suzuki, A., and Ishizaki, H. 1992. Structure and expression of bombyxin-related peptide genes of the moth *Samia cynthia ricini*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **86** (2), 257-68.

Kintner, C.R., and Melton, D.A. 1987. Expression of *Xenopus* N-CAM RNA in ectoderm is an early response to neural induction. *Development*, **99**, 311-325.

Kits, K.S., de Vries, N.J., and Ebberink, R.H.M. 1990. Molluscan insulin-related neuropeptide promotes neurite outgrowth in dissociated neuronal cell cultures. *Neurosci. Lett.*, **109**, 253-258.

Kondo, H., Ino, M., Suzuki, A., Ishizaki, H., and Iwami, M. 1996. Multiple gene copies for bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*: structural signs for gene rearrangement and duplication responsible for generation of multiple molecular forms of bombyxin. *J. Mol. Biol.*, **259** (5), 926-937.

Kostecka, Z., and Blahovec, J. 1999. Insulin-like growth factor binding proteins and their functions (Minireview). *Endocr. Regul.*, **33**, 90-94.

Kozak, M. 1986. Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell*, **47**, 481-483.

Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrates messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8125-8128.

Kozak, M. 1991. An analysis of Vertebrate mRNA sequences : intimations of translational control. *J. Cell. Biochem.*, **115**, 887-903.

Kromer-Metzger, E., and Lagueux, M. 1994. Expression of the gene encoding an insulin-related peptide in *Locusta* (Insecta, Orthoptera). Evidence for alternative promoter usage. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 427-434.

Kunigelis, S.C., and Saleuddin, A.S.M., 1985. Studies on the *in vitro* formation of periostracum in *Helisoma duryi* : the influence of brain. *J. Comp. Physiol.*, **155B**, 177-183.

Kuno, S.I., Mitsunaga-Nakatsubo, K., Nagura, T., and Yasumasu, I. 1994. Changes in insulin-binding capacity of the plasma membrane fraction during culture *in vitro* of cells derived from micromeres of 16-cell-stage sea urchin embryos. *Dev. Growth Differ.*, **36** (3), 289-298.

Kuno, S.I., Nagura, T., and Yasumasu, I. 1994. Insulin-induced outgrowth of pseudopodial cables from cultured micromere-derived cells isolated from sea urchin embryos at the 16 cell stage, with special reference to the insulin-receptor. *Dev. Growth Differ.*, **36** (2), 165-175.

-L-

Laisney, J. 2000. Etude du métabolisme du glycogène et du transport du glucose dans la cellule vésiculeuse chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. D.E.A. *Physiologie des Invertébrés*, Université Paris VI.

Lagueux, M., Lwoff, L., Meister, M., Goltzené, F., and Hoffmann, J. 1990. cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 249-254.

- Lakshmi, Y.U., Radha, Y., Hille-Rehfeld, A., von Figura, K., and Kumar, N.S. 1999. Identification of the putative mannose 6-phosphate receptor protein (MPR 300) in the Invertebrate *Unio*. *Biosci.*, **19** (5), 403-409.
- Lardans, V., Coppin, J.F., Vicogne, J., Aroca, E., Delcroix, M., and Dissous, C. 2001. Characterization of an insulin receptor-related receptor in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1510**, 321-329.
- Laureys, G., Barton, D.E., Ullrich, A., and Francke, U. 1988. Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse. *Genomics*, **3** (3), 224-229.
- Le Gac, F., Loir, M., Le Bail, P.Y., and Ollitrault, M. 1996. Insulin-Like Growth Factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.*, **44**, 23-35.
- Lebel, J.M., Giard, W., Favrel, P., and Boucaud-Camou, E. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell*, **86**, 67-72.
- Leevers, S.J. 2001. Growth control: Invertebrates insulin surprises! *Curr. Biol.*, **11** (6), R209-R212.
- Leibush, B., Bayraktaroglu, E., Maestro, M.A., Baños, N., Navarro, I., and Gutiérrez, J. 1996 a. IGF-I and insulin binding in molluscs. (abstract). *Ann. Endocrinol.* **57** (4) (Suppl. 28).
- Leibush, B., Párrizas, M., Navarro, I., Lappova, Y., Maestro, M.A., Encinas, M., Plisetskaya, E.M., and Gutiérrez, J. 1996 b. Insulin and insulin-like growth factor-I receptors in fish brain. *Regul. Pept.*, **61**, 155-161.
- Lelong, C. 1999. Caractérisation et expression du facteur mGDF, un facteur de croissance de la superfamille des TGF-beta chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, au cours du développement et chez l'adulte. *Thèse de Doctorat*, Université de Rennes I.
- Lelong, C., Mathieu, M., and Favrel, P. 2000. Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-b superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 3986-3993.
- Lelong, C., Mathieu, M., and Favrel, P. 2001. Identification of a new bone morphogenetic protein-related members in Invertebrates. *Biochimie*, **83**, 423-426.
- LeRoith, D., Lesniak, M.A., and Roth, J. 1981. Insulin in Insects and Annelids. *Diabetes*, **30**, 70-76.
- LeRoith, D., Kavsan, V.M., Koval, A.P., and Roberts, C.T., Jr. 1993. Phylogeny of the insulin-like growth factor (IGFs) and receptors: a molecular approach. *Mol. Reprod. Dev.*, **35**, 332-338.
- LeRoith, D., Adamo, M., Werner, H., and Roberts, C.T., Jr. 1995 a. Molecular and cellular biology of the insulin-like growth factors. In Weintraub B.D. (ed.): "Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations". New York: Raven Press, 181-193.

- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and Roberts, C.T. 1995 b. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocr. Rev.*, **16**, 2, 143-163.
- Lévy, J.R., Hannah, S., Mooney, R.L., Hug, V., and Stevens, W. 1995. Sequence and functional characterization of the terminal exon of the human insulin receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1263**, 253-257.
- Lewis, J.D., Gunderson, S.I., and Mattaj, I.W. 1995. The influence of 5' et 3' end structures on pre-mRNA metabolism. *J. Cell Sci.*, **19**, 13-19.
- Li, K.W., Geraerts, W.P.M., and Joosse, J. 1992. Purification and Sequencing of Molluscan Insulin-Related Peptide II from the Neuroendocrine Light Green Cells in *Lymnaea stagnalis*. *Endocrinology*, **130** (6), 3427-3432.
- Li, K.W., and Geraerts, W.P.M. 1992. Isolation and chemical characterization of a novel insulin-related neuropeptide from the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Eur. J. Biochem.*, **205**, 675-678.
- Li, K.W., Geraerts, W.P.M., Ebberink, R.H.M., and Joosse, J. 1992 a. Purification and sequencing of molluscan insulin-related peptide I (MIP I) from the neuroendocrine light green cells of *Lymnaea stagnalis*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **85**, 141-150.
- Li, K.W., Geraerts, W.P.M., Van Loenhout, H., and Joosse, J. 1992 b. Biosynthesis and Axonal Transport of Multiple Molluscan Insulin-Related Peptides by the Neuroendocrine Light Green Cells of *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **87**, 79-86.
- Lin, Y., Hamblin, M.T., Edwards, M.J., Barillas-Mury, C., Kanost, M.R., Knipple, D.C., Wolfner, M.F., and Hagedorn, H.H. 1993. Structure, expression and hormonal control of genes from the mosquito, *Aedes aegypti*, which encode proteins similar to the vitelline membrane proteins of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, **155**, 558-568.
- Lindstrom-Dinnetz, I., and Iatrou, K. 1997. Cloning and functional characterization of an insulin receptor-like mRNA expressed in the silkworm ovary. Non publié, Genbank, numéro d'accès AF025542.
- Loir, M., and Le Gac, F. 1994. Insulin-like factor-I and -II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogonia and spermatocytes. *Biol. Reprod.*, **51** (6), 1154-1163.
- Lubet, P. 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. *Rev. Trav. I.S.T.P.M.*, **23** (3), 387-548.

-M-

- Madar, I., Sildan, N., Pora, E.A., and Hernandez, L. 1979. *In vitro* effect of insulin on the glucose uptake by isolated mantle pieces of *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Rev. Roum. Biol. - Biol. Anim.*, **24** (1), 41-43.

Maestro, M.A., Mendez, E., Parrizas, M., and Gutierrez, J. 1997. Characterization of Insulin and Insulin-Like Growth Factor-I ovarian receptors during the reproductive cycle of carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Reprod.*, **56**, 1126-1132.

Maestro, M.A., Mendez, E., Planas, J.V., and Gutierrez, J. 1999. Dynamics of insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) ovarian receptors during maturation in the brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiol. Biochem.*, **20**, 341-349.

Mamula, P.W., and Goldfine, I.D. 1992. Cloning and characterization of the human insulin-like growth factor-I receptor gene 5'-flanking region. In Liebert, M.A.; Inc. (eds.): "*DNA and Cell Biology 11*", 43-50.

Marchand, C.R., and Colard, C. 1992. Presence of cells and fibers immunoreactive toward antibodies to different peptides or amine in the digestive tract of the snail *Helix aspersa*. *J. Morphol.*, **207**, 185-190.

Marin-Hincapie, M., and Garofalo, R.S. 1999. The carboxyl terminal extension of the *Drosophila* insulin receptor homologue binds IRS-1 and influences cell survival. *J. Biol. Chem.*, **274** (35), 24987-24994.

Marques, M., and Falkmer, S. 1976. Effects of mammalian insulin on blood glucose level, glucose tolerance, and glycogen content of musculature and hepatopancreas in a gastropod mollusk, *Strophocheilus oblongus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **29**, 522-530.

Maruyama, K., Nagasawa, H., Isogai, A., Tamura, S., Ishizaki, H., and Suzuki, A. 1990. Synthesis of bombyxin-IV, an insulin-like heterodimeric peptide from the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides*, **11**, 169-171.

Maruyama, K., Nagasawa, H., Isogai, A., Ishizaki, H., and Suzuki, A. 1992 a. Determination of disulfide bond arrangement in bombyxin-IV, an insulin superfamily peptide from the silkworm, *Bombyx mori*, by combination of thermolysin digestion of natural peptide and selective synthesis of disulfide bond isomers. *J. Protein Chem.*, **11** (1), 13-20.

Maruyama, K., Nagata, K., Tanaka, M., Nagasawa, H., Isogai, A., Ishizaki, H., and Suzuki, A. 1992 b. Synthesis of bombyxin-IV, an insulin superfamily peptide from the silkworm, *Bombyx mori*, by stepwise and selective formation of three disulfide bridges. *J. Protein. Chem.*, **11** (1), 1-12.

Masumura, M., Satake, S., Saegusa, H., and Mizoguchi, A. 2000. Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **118** (3), 393-399.

Mathieu, M. 1987. Etude expérimentale des contrôles exercés par les ganglions nerveux sur la gamétogenèse et les processus métaboliques associés chez la moule *Mytilus edulis* (L.) (mollusque lamellibranche). *Thèse de Doctorat*, Université de Caen.

McRory, J.E., and Sherwood, N.M. 1997. Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. *DNA Cell Biol.*, **16** (8), 939-949.

Miller, D.S. 1988. Stimulation of RNA and protein synthesis by intracellular insulin. *Science*, **240** (4851), 506-509.

Miller, D.S. 1989. Stimulation of protein synthesis in stage IV *Xenopus* oocytes by microinjected insulin. *J Biol Chem.*, **264** (18), 10438-10446.

Monnier, Z., and Bride, M. 1995. *In vitro* effects of methionine-enkephalin, somatostatin and insulin on cultured gonadal cells of the snail *Helix aspersa*. *Experientia*, **51**, 824-829.

Mori, K. 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, **53**, 361-369.

Moriyama, S., Duguay, S.J., Conlon, J.M., Duan, C., Dickhoff, W.W., and Plisetskaya, E.M. 1993. Recombinant Coho salmon insulin-like growth factor I expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 205-211.

Moriyama, S., Shimma, H., Tagawa, M., and Kagawa, H. 1997. Changes in plasma insulin-like growth factor-I levels in the precociously maturing Amago salmon, *Oncorhynchus masou ishikawai*. *Fish Physiol. Biochem.*, **17**, 253-259.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and toxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.

Müller, W.E.G., Skorokhod, A., and Müller, I.M. 1999. Receptor tyrosine kinase, an autapomorphic character of metazoa : identification in marine sponges. *Acta Biologica Hungarica*, **50**, 395-411.

Muthukumar, G., and Lenard, J. 1991. A preproinsulin-like pseudogene from *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **82**, 275-283.

Myers, M.G., Grammer, T.C., Wang, L.M., Sun, X.J., Perce, J.H., Blenis, J., and White, M.F. 1994. Insulin receptor substrate-1 mediates phosphatidylinositol 3'-kinase and p70S6k signalling during insulin, insulin-like growth factor-1, and interleukin-4 stimulation. *J. Biol. Chem.* **269** (46), 28783-9.

Myers, M.G., Zhang, Y., Aldaz, G.A., Grammer, T., Glasheen, E.N., Yenush, L., Wang, L.M., Sun, X.J., Blenis, J., Pierce, J.H., and White, M.F. 1996. YMXM motifs and signaling by an Insulin Receptor Substrate-1 molecule without tyrosine phosphorylation sites. *Mol. Cell. Biol.*, **16** (8), 4147-4155.

Myers, M.G., Jr., Mendez, R., Shi, P., Pierce, J.H., Rhoads, R., and White, M.F. 1998. The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J. Biol. Chem.*, **273** (41), 26908-26914.

-N-

Nadimpalli, S.K., Yerramalla, U.L., Hille-Rehfeld, A., and von Figura, K. 1999. Mannose 6-phosphate receptors (MPR 300 and MPR 46) from a teleostean fish (trout). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **123** (3), 261-265.

Nagamatsu, S., Chan, S.J., Falkmer, S., and Steiner, D.F. 1991. Evolution of the insulin gene superfamily. Sequence of a preproinsulin-like growth factor cDNA from the Atlantic hagfish. *J. Biol. Chem.*, **266** (4), 2397-2402.

Nagasawa, H., Kataoka, H., Hori, Y., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Guo, F., Zong, X.C., Mizoguchi, A., and Fujishita, M. 1984. Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **53**, 143-152.

Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, Ak., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y., Suzuki, At., Takahashi, S.Y., and Ishizaki, H. 1986. Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5840-5843.

Nagata, K., Maruyama, K., Kojima, K., Yamamoto, M., Tanaka, M., Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Ishizaki, H., and Suzuki, A. 1999. Prothoracicotropic activity of SBRPs, the insulin-like peptides of the saturniid silkworm *Samia cynthia ricini*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **266** (2), 575-578.

Navarro, I., Leibush, B., Moon, T.W., Plisetskaya, E.M., Baños, N., Mendez, E., Planas, J.V., and Gutierrez, J. 1999. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon : the evolution of their receptors. *Comp. Biochem. Physiol.*, **122B**, 137-153.

Nishida, Y., Hata, M., Nishizuka, Y., Rutter, W.J., and Ebina, Y. 1986. Cloning of a *drosophila* cDNA encoding a polypeptide similar to the human insulin receptor precursor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **141** (2), 474-481.

Niu, P.D., Perez-Sanchez, J., and Le Bail, P.Y. 1993. Development of protein binding assay for teleost insulin-like growth factor (IGF-like) : relationships between growth hormone (GH) and IGF-like in the blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum. *Fish Physiol. Biochem.*, **11**, 380-391.

-O-

Oliveira, A.A.E., Elenir, A.A.O. Machado, T.O.L., Gomes, M.V., Neto, X.J., Pereira, C.A., Vierira, H.J.G., Frenandez, S.V.K., and Javier-Filho, J. 1999. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Protein Peptide Lett.*, **6**, 15-21.

O'Neil, G.S., Falkner, S., and Thorndyke, M.C. 1986. Insulin-like immunoreactivity in the neural ganglia of the Ascidian *Ciona intestinalis*. *Acta Zoologica*, **67**, 147-153.

Orchard, I., Loughton, B.G. 1980. A hypolipaeic factor from the corpus cardiacum of locusts. *Nature*, **286**, 494-496.

Orikasa, C., Yamauchi, H., Nagasawa, H., Suzuki, A., and Nagata, M. 1993. Induction of oocyte-nurse cell differentiation in the ovary by the brain during the initial stage of oogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **28**, 303-311.

-P-

Párrizas, M., Maestro; M.A., Baños, N., Navarro, I., Plánas, J., and Gutiérrez, J. 1995 a. Insulin/IGF-I binding ratio in skeletal and cardiac muscles of vertebrates : a phylogenetic approach. *Am. J. Physiol.*, **269**, R1370-R1377.

- Párrizas, M., Plisetskaya, E.M., Plánas, J., and Gutiérrez, J. 1995 b. Abundant insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **98**, 16-25.
- Pashmforoush, M., Chan, S.J., and Steiner, D.F. 1996. Structure and expression of the insulin-like peptide receptor from *Amphioxus*. *Mol. Endocrinol.*, **10**, 857-866.
- Pazos, A.J., Mathieu, M. 1999. Effects of five natural Gonadotropin-Releasing Hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad : stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **113**, 112-120.
- Pearson, W.R., and Lipman, D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2444-2448.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., and Chew, K.K. 1981. Some relationships between gametogenetic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Washington State. *J. Shellfish Res.*, **1** (1), 9-16.
- Perrot, V., and Funkenstein, B. 1999. Cellular distribution of insulin-like growth factor II (IGF-II) mRNA and hormonal regulation of IGF-I and IGF-II mRNA expression in rainbow trout testis (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, **20**, 219-229.
- Perrot, V., Borisovna, E., Gozes, Y., Chan, S.J., and Funkenstein, B. 2000. Insulin-like Growth Factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization. *Biol. Reprod.*, **63**, 229-241.
- Pertseva, M.N., Plesneva, S.A., Kuznetsova, L.A., Shpakov, A.O., and Derkach, K.V. 1996. On the tyrosine kinase mechanism of the novel effect of insulin and insulinlike growth factor I. Stimulation of the adenylyl cyclase system in muscle tissues. *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 1867-1874.
- Petruzzelli, L., Herrera, R., Arenas-Garcia, R., Fernandez, R., Birnbaum, J., and Rosen, O.M. 1986. Isolation of a *Drosophila* genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin receptor and detection of the phosphorylated *Drosophila* receptor with an anti-peptide antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 4710-4714.
- Pierce, S.B., Costa, M., Wizotskey, R., Devadhar, S., Homburger, S.A., Buchman, A.R., Ferguson, K.C., Heller, J., Platt, D.M., Pasquinelli, A.A., Liu, L.X., Doberstein, S.K., and Ruvkun, G. 2001. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev.*, **15**, 672-686.
- Pimentel, B., de la Rosa, E.J., and de Pablo, F. 1996. Insulin acts as an embryonic growth factor for *Drosophila* neural cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226** (3), 855-861.
- Planas, J.V., Mendez, E., Banos, N., Capilla, E., Castillo, J., Navarro, I., and Gutiérrez, J. 2000. Fish insulin, IGF-I and IGF-II receptors : A phylogenetic approach. *Amer. Zool.*, **40**, 223-233.
- Plánas, J.V., Mendez, E., Baños, N., Capilla, E., Navarro, I., and Gutiérrez, J. 2000. Insulin and IGF-I receptors in trout adipose tissue are physiologically regulated by circulating hormone levels. *J. Exp. Biol.*, **203**, 1153-1159.

- Plesneva, S.A., Shpakov, A.O., Kuznetsova, L.A., and Pertsave, M.N. 2001. A dual role of protein kinase C in insulin signal transduction via adenylyl cyclase signalling system in muscle tissues of Vertebrates and Invertebrates. *Biochem. Pharmacol.*, **61** (10), 1277-1291.
- Plisetskaya, E., Kazakov, V.K., Slotitskaya, L., and Leibson, L.G. 1978. Insulin-producing cells in the gut of freshwater bivalve molluscs *Anodonta cygnea* and *Unio pictorum* and the role of insulin in the regulation of their carbohydrate metabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **35**, 133-145.
- Plisetskaya, E., Slotitskaya, L.P., and Leibson, L.G. 1979. Participation of insulin in metabolic regulation in marine bivalve mollusks. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **15** (3), 243-248.
- Plisetskaya, E.M., and Deyrup-Olsen, I. 1987. An insulin-like substance in the blood of the slug *Prophysaon foliolatum* (Arionidae) in the course of tail regeneration. *Comp. Biochem. Physiol.*, **87A** (3), 781-783.
- Plisetskaya, E.M., Pollock, H.G., Elliott, W.M., Youson, J.H., and Andrews, P.C. 1988. Isolation and structure of lamprey (*Petromyzon marinus*) insulin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **69**, 46-55.
- Plisetskaya, E.M., Fabbri, E., Moon, T.W., Gutiérrez, J., Ottolenghi, C. 1993. Insulin binding to isolated hepatocytes of Atlantic salmon and Rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.*, **11** (1-6), 401-409.
- Poltilove, R.M.K., Jacobs, A.R., Haft, C.R., Xu, P., and Taylor, S.I. 2000. Characterization of *Drosophila* Insulin Receptor Substrate. *J. Biol. Chem.*, **275** (30), 23346-23354.
- Poncet, J.-M., Serpentine, A., Thiebot, B., Villers, C., Bocquet, J., Boucaud-Camou, E., and Lebel, J.-M. 2000. *In vitro* synthesis of proteoglycans and collagen in primary cultures of mantle cells from the nacreous mollusc, *Haliotis tuberculata* : a new model for *in vitro* study of molluscan extracellular matrix. *Mar. Biotechnol.*, **2** (4), 387-398.
- R-**
- Reinecke, M. 1981. Immunohistochemical localization of polypeptide hormones in endocrine cells of the digestive tract of *Branchiostoma lanceolatum*. *Cell Tissue Res.*, **219**, 445-456.
- Reinecke, M., Betzler, D., Drakenberg, K., Falkmer, S., and Sara, V.R. 1993. Occurrence of members of the insulin superfamily in central nervous system and digestive tract of protochordates. *Histochemistry*, **99**, 277-285.
- Reinecke, M., Maake, C., Falkmer, S., and Sara, V.R. 1993. The branching of insulin-like growth factor I and insulin : an immunohistochemical analysis during phylogeny. *Regul. Pept.*, **48**, 65-76.
- Reinecke, M., and Collet, C. 1998. The phylogeny of the insulin-like growth factors. *Int. Rev. Cytol.*, **183**, 1-94.

Reinecke, M., Eppler, E., David, I., and Georges, D. 1999. Immunohistochemical evidence for the presence, localization and partial coexistence of insulin, insulin-like growth factor I and relaxin in the protochordate *Ciona intestinalis*. *Cell Tissue Res.*, **295**, 331-338.

Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., and Maffart, P. 1994. Herpes viruses associated with mortalities among Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France - Comparative study. *Revue Méd. Vét.*, **145** (10), 735-742.

Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., Chollet, B., and Maffart, P. 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.*, **145**, 735-742.

Riehle, M.A., and Brown, M.R. 1999. Insulin stimulates ecdysteroid production through a conserved signalling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 855-860.

Robitzki, A., Schroder, H.C., Ugarkovic, D., Pfeifer, K., Uhlenbruck, G., and Muller, W.E.G. 1989. Demonstration of an endocrine signalling circuit for insulin in the sponge *Geodia cydonium*. *EMBO J.*, **2**, 2905-2909.

Roovers, E., Vincent, M.E., van Kesteren, E., Geraerts, W.P.M., Planta, R.J., Vreugdenhil, E., and van Heerikhuizen, H. 1995. Characterization of a putative molluscan insulin-related peptide receptor. *Gene*, **162**, 181-188.

Rusakov, Y.I., and Kazakov, V.K. 1979. Preparation of insulin-like substance from mollusks and antiserum against it. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **15** (6), 535-537.

Ruan, Y., Chen, C., Cao, Y., and Garofalo, R.S. 1995. The *Drosophila* insulin receptor contains a novel carboxyl-terminal extension likely to play an important role in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **270** (9), 4236-4243.

-S-

Saavedra, J.M., Juorio, A.V., Shigematsu, K., and Pinto, J.E.B. 1989. Specific insulin binding sites in snail (*Helix aspersa*) ganglia. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **9** (2), 273-279.

Sadler, S.E., and Maller, J.L. 1987. In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. Stimulation by insulin and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem.*, **262** (22), 10644-10650.

Saegusa, H., Mizoguchi, A., Kitahara, H., Nagasawa, H., Suzuki, A., and Ishizaki, H. 1992. Changes in titer of bombyxin-immunoreactive material in hemolymph during the postembryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.*, **34** (5), 595-605.

Sakuma, M., Onodera, H., Suyemitsu, T., and Yamasu, K. 1997. The protein tyrosine kinases of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Zool. Sci.*, **14**, 941-946.

- Saleuddin, A.S.M., and Wilbur, K.M. 1983. In Wilbur, K.M. (eds.): "The Mollusca." Vol 4, Physiology, Part 1. Academic Press.
- Saleuddin, A.S.M., and Kunigelis, S.C. 1984. Neuroendocrine control mechanisms in shell formation. *Am. Zool.*, **24**, 911-916.
- Saleuddin, A.S.M., Sevala, V.M., Sevala, V.L., Mukai, S.T., and Khan, H.R. 1992. Involvement of mammalian and insulin-like peptides in shell growth and shell regeneration in Molluscs. *Hard tissue mineralization and demineralization*, 149-169.
- Sanders, B. 1983 a. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* : 1. Insulin immunoreactivity. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **50**, 366-373.
- Sanders, B. 1983 b. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* : 2. Insulin-like biological activity. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **50**, 374-377.
- Satake, S., Masumura, M., Ishizaki, H., Nagata, K., Suzuki, A., and Mizoguchi, A. 1997. Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **118** (2), 349-357.
- Sauber, F., Reuland, M., Ries, E., Holder, F., and Charlet, M. 1990. Presence of bombyxin-like molecules in the brain of *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Invertebr. Repro. Dev.*, **17** (2), 123-126.
- Scatchard, G. 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. New York Acad. Sci.*, **51**, 660-672.
- Scavo, G., Shuldiner, A.R., Serrano, J., Dashner, R., Roth, J., and De Pablo, F. 1991. Genes encoding receptors for insulin and insulin-like growth factor I are expressed in *Xenopus* oocytes and embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6214-6218.
- Schäcke, H., Schroder, H.C., Gamulin, V., Rinkevich, B., Müller I.M., and Müller, W.E. 1994. Molecular cloning of a tyrosine kinase gene from the marine sponge *Geodia cydonium* : a new member belonging to the receptor tyrosine kinase class II family. *Mol. Membr. Biol.*, **11** (2), 101.
- Scherrer, B. 1984. Biostatistique. Morin G. (ed.), Montréal Paris Casablanca, 850.
- Schot, L.P.C., Boer, H.H., Swaab, D.F., and Noorden, S.V. 1981. Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* with antisera raised to biologically active peptides of Vertebrates. *Cell Tissue Res*, **216**, 273-291.
- Seino, S., and Bell, G.I. 1989. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 312-316.
- Seino, S., Seino, M., and Bell, G.I. 1990. Human insulin-receptor gene. Partial sequence and amplification of exons by polymerase chain reaction. *Diabetes*, **39** (1), 123-128.

- Serpentini, A., Ghayor, C., Hebert, V., Galéra, P., Pujol, J.-P., Boucaud-Camou, E., and Lebel, J.-M. 2000. *De novo* synthesis and identification of collagen transcripts in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool.*, **287**, 275-284.
- Sevala, V.M., and Loughton, B.G., 1992. Insulin-like peptides during oogenesis and embryogenesis in *Locusta migratoria*. *Invertebr. Repro. Dev.*, **21** (3), 187-192.
- Sevala, V.M., Sevala V.L., and Saleuddin, A.S.M. 1993. Hemolymph insulin-like peptides (ILP) titers and the influence of ILP and mammalian insulin on the amino acid incorporation in the mantle collar *in vitro* in *Helisoma* (Mollusca). *Biol. Bull.*, **185**, 140-148.
- Sevala, V.M., Sevala V.L., Kunigelis, S.C., and Saleuddin, A.S.M. 1993. Circadian timing of a daily rhythm of hemolymph insulin-like peptide titers in *Helisoma* (Mollusca). *J. Exp. Zool.*, **226**, 221-226.
- Sevala, V.M., Sevala, V.L., and Loughton, B.G. 1993. Insulin-like molecules in the beetle *Tenebrio molitor*. *Cell Tissue Res*, **273**, 71-77.
- Shier, P., and Watt, V.M. 1989. Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J. Biol. Chem.*, **264** (25), 14605-14608.
- Siddle, K. 1992. The insulin receptor and type I IGF receptor: comparison of structure and function. *Prog. Growth Factor Res.*, **4** (4), 301-320.
- Skorokhod A., Gamulin, V., Gundacker, D., Kavsan, V., Müller, I.M., and Müller, W.E.G. 1999. Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. *Biol. Bull.*, **197**, 198-206.
- Smit, A.B., Vreugdenhil, E., Ebberink, R.H.M., Geraerts, W.P.M., Klootwijk, J., and Joesse, J. 1988. Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*, **331**, 535-538.
- Smit, A.B., Geraerts, W.P.M., Meester, I., van Heerikhuizen, H., and Joesse, J. 1991. Characterization of a cDNA clone molluscan insulin-related peptide II of *Lymnaea stagnalis*. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 699-703.
- Smit, A.B., Thijsen, S.F.T., Geraerts, W.P.M., Meester, I., van Heerikhuizen, H., and Joesse, J. 1992. Characterization of a cDNA clone encoding molluscan insulin-related peptide V of *Lymnaea stagnalis*. *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, **14**, 7-12.
- Smit, A.B., van Marle, A., van Elk, R., Bogerd, J., van Heerikhuizen, H., and Geraerts, W.P.M. 1993. Evolutionary conservation of the insulin gene structure in Invertebrates : cloning of the gene encoding molluscan insulin-related peptide III from *Lymnaea stagnalis*. *J. Mol. Endocrinol.*, **11**, 103-113.
- Smit, A.B., Spijker, S., Nagle, G.T., Knock, S.L., Kurosky, A., and Geraerts, W.P. 1994. Structural characterization of a *Lymnaea* putative endoprotease related to human furin. *Febs. Lett.*, **343**, 27-31.
- Smit, A.B., Spijker, S., van Minnen, J., Burke, J.F., De Winter, F., van Elk, R., and Geraerts, W.P.M. 1996. Expression and characterization of molluscan insulin-related peptide VII from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, **70** (2), 589-96.

Smit, A.B., van Kesteren, R.E., Li, K.W., van Minnen, J., Spijker, S., van Heerikhuizen, H., and Geraerts, W.P.M. 1998. Towards understanding the role of insulin in the brain: lessons from insulin-related signaling systems in the Invertebrate brain. *Prog. Neurobiol.*, **54**, 35-54.

Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P. et Gouletquer, P. 1999. Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron : étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquat. Living Resour.*, **12** (2), 131-143.

Sonetti, D., van Heumen, W.R.A., and Roubos, E.W. 1992. Light- and electro-microscopic immunocytochemistry of a molluscan insulin-related peptide in the central nervous system of *Planorbarius corneus*. *Cell Tissue Res*, **267**, 473-481.

Srivastava, R.K., and van Der Kraak, G. 1994. Regulation of DNA synthesis in goldfish vitellogenic ovarian follicles by hormones and growth factors. *J. Exp. Zool.*, **270**, 263-272.

Statistica®. 1997. StatSoft, Inc.

Steele, R.E., Lieu, P., Mai, N.H., Shenk, M.A., and Sarras Jr, M.P. 1996. Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homolog suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in *Hydra*. *Dev. Genes. Evol.*, **206**, 247-259.

Steiner, D.F., Chan, S.J., Welsh, J.M., and Kwok, S.C.M. 1985. Structure and evolution of the insulin gene. *Annu. Rev. Genet.*, **19**, 463-484.

Stewart, C.E., and Rotwein, P. 1996. Growth, differentiation, and survival: Multiple physiological functions for Insulin-like Growth Factors. *Physiol. Rev.*, **76**, 1005-1026.

Stuart, C.A. 1988. Characterization of a novel insulin receptor from Stingray Liver. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7881-7886.

Suzuki, T., Yoshinaka, R., Mizuta, S., Funakoshi, S., and Wada, K. 1991. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Cell Tissue Res.*, **266**, 75-82.

-T-

Tanaka, M., Kataoka, H., Nagata, K., Nagasawa, H., and Suzuki, A. 1995. Morphological changes of BM-N4 cells induced by bombyxin, an insulin-related peptide of *Bombyx mori*. *Regul. Pept.*, **57**, 311-318.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW : improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrice choice. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4673-4680.

Thorpe, A., and Duve, H. 1984. Insulin- and glucagon-like peptides in insects and molluscs. *Mol. Physiol.*, **5**, 235-260.

Tsuzuki, S., Masuta, T., Furuno, M., Sakurai, S., and Iwami, M. 1997. Structure and expression of Bombyxin E1 gene: a novel family gene that encodes bombyxin-IV, an insect insulin-related neurosecretory peptide. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol.*, **117** (3), 409-416.

Turyn, D., da Silva, R.S.M., Marques, M., and Dellacha, J.M. 1986. Characterization of the insulin-binding sites in turtle thyroid microsomes. *J. Endocrinol.*, **108**, 157-162.

Tyler, C., Sumpter, J., and Bromage, N. 1987. the hormonal control of vitellogenic uptake into cultured oocytes of the rainbow trout. In "*Proc. 3rd Int. Reproductive Physiology of Fish*", pp. 142", Memorial University Press, St-John's, Newfoundland.

-U-

Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.-C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M., and Ramachandran, J. 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, **313**, 756-761.

Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., Jacobs, S., Francke, U., Ramachandran, J., and Fujita-Yamaguchi, Y. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure : comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.*, **5**, 2503-2512.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.*, **61**, 203-212.

Upton, F.Z., Chant, S.J., Steiner, D.F., Wallace, J.C., and Ballard, F.J. 1993. Evolution of the Insulin-like Growth Factor Binding Proteins. *Growth Regul.*, **3**, 29-32.

-V-

van Minnen, J., and Schallig, H.D.F.H. 1990. Demonstration of insulin-related substances in the central nervous systems of pulmonates and *Aplysia californica*. *Cell Tissue Res*, **260**, 381-386.

van Noorden, S., Fritsch, H.A.R., Grillo, T.A.I., Polak, J.M., and Pearse, A.G.E. 1980. Immunocytochemical staining for vertebrate peptides in the nervous system of a gastropod mollusc. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **40**, 375-376.

-W-

Walne, P.R., and Mann, R. 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Proc. 9th Europ. Mar. Biol. Symp.*, 587-607.

Watanabe, T., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Nagahama, M., Murakami, K., and Nakayama, K. 1992. Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **267**, 12, 8270-4.

White, M.F., Shoelson, S.E., Keutmann, H., and Kahn, C.R. 1988. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.*, **263** (6), 2969-2980.

Wijdenes, J., Schluler, N.C., Gomot, L., and Boer, H.H. 1987. In the snail *Helix aspersa* the gonadotropic hormone-producing dorsal bodies are under inhibitory nervous control of putative growth hormone-producing neuroendocrine cells. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **68** (2), 224-229.

Wilden, P.A., Kahn, C.R., Siddle, K., and White, M.F. 1992. Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J. Biol. Chem.*, **267** (23), 16660-16668.

Wilkinson, D.G., Bailes, J.A., Champion, J.E., and McMahon, A.P. 1987. A molecular analysis of mouse development from 8 to 10 days *post coitum* detects changes only in embryonic globin expression. *Development*, **99**, 493-500.

Wolkow, C., Hu, P., Tewari, M., Vidal, M., and Ruvkun, G. 2001. IRS and p55 orthologous adaptor proteins function in the *C. elegans* *daf-2*/insulin-like signaling pathway. Non publié, Genbank, numéro d'accèsion : AY064245.

-Y-

Yang-Feng, T.I., Francke, U., and Ullrich, A. 1985. Gene for human insulin receptor : localization to site on chromosome 19 involved in pre- β -cell leukaemia. *Science*, **228**, 728-731.

Yarden, Y., and Ullrich, A. 1988. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 443-478.

Yenush, L., Fernandez, R., Myers, M.G., Jr., Grammer, T.C., Sun, X.J., Blenis, J., Pierce, J.H., Schlessinger, J., and White, M.F. 1996. The *Drosophila* insulin receptor activates multiple signaling pathways but requires insulin receptor substrate proteins for DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, **16** (5), 2509-2517.

Yoshida, I., Tsuzuki, S., Abdel Salam, S.E., Ino, M., Korayem, A.M., Sakurai, S., and Iwami, M. 1997. Bombyxin F1 gene : structure and expression of a new bombyxin family gene that forms a pair with bombyxin B10 gene. *Zoolog. Sci.*, **14** (4), 615-622.

Yoshida, I., Moto, K., Sakurai, S., and Iwami, M. 1998. A novel member of a bombyxin gene family : structure and expression of a bombyxin G1 gene, an insulin-related peptide gene of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*, **208** (7), 407-410.

Young, K.G., Chang, J.P., and Goldberg, J.I. 1999. Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction. *J. Comp. Neurol.*, **404** (4), 427-437.

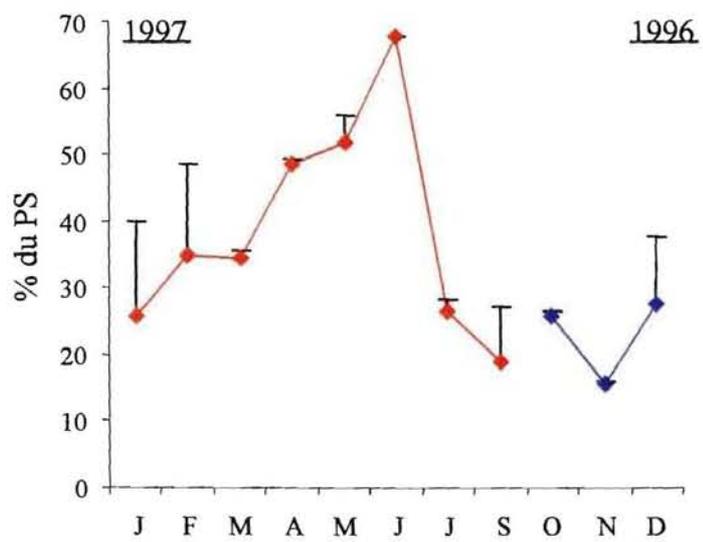
-Z-

Zachary, D., Goltzene, F., Holder, F.C., Berchtold, J.P., Nagasawa, H., Suzuki, A., Misoguchi, H., Ishizaki, H., and Hoffmann, J.A. 1988. Presence of bombyxin (4K-PTTH)-like molecules in neurosecretory granules of brain-*corpora cardiaca* complexes of *Locusta migratoria*; developmental aspects. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.*, 14, 1-10.

Zhu, X.X., and Olivier, J.H., Jr, 1991. Immunocytochemical localization of an insulin-like substance in the synganglion of the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari : Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 13, 153-159.

Annexes

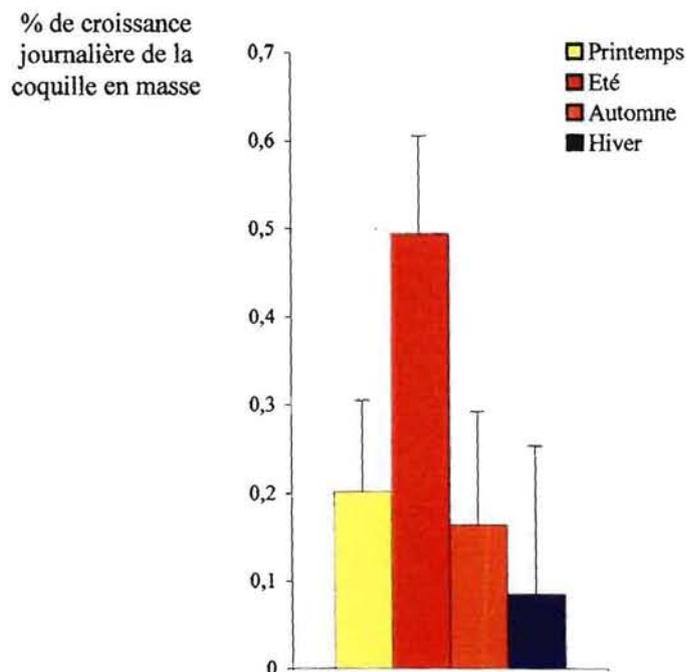
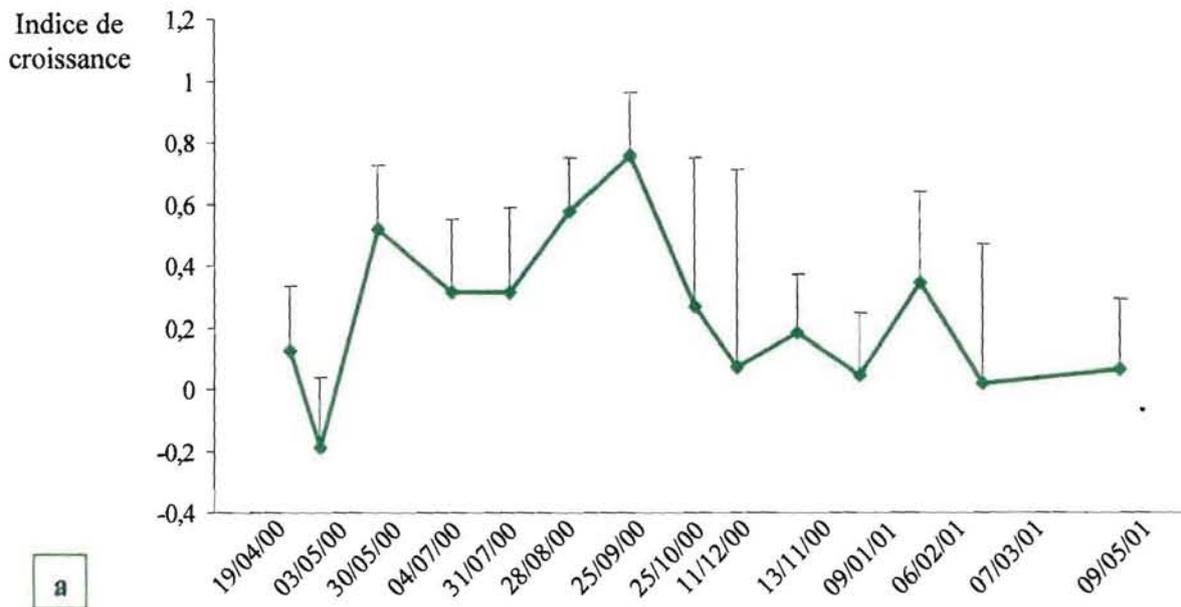
Annexe 1 : Evolution de la quantité de protéines dans la gonade d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* de Saint-Vaast-la-Hougue (suivi 1997-1996 ; Heude-Berthelin, 2000).



Annexe 2 : a : Profil annuel de la croissance pondérale journalière de la coquille d'huître creuse *Crassostrea gigas* de la Baie des Veys (suivi 2000-2001).

b : Saisonnalité de la croissance de la coquille d'huître creuse *Crassostrea gigas* de la Baie des Veys (2000).

(données fournies par Dubois et Costil, 2001)



- RESUME / SUMMARY -

Implication des molécules du système insuline/IGF dans la croissance et la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : effets biologiques *in vitro* d'un ligand hétérologue (IGF-1 recombinant humain), caractérisation et expression d'un récepteur homologue de type insuline.

L'ostréiculture française repose essentiellement sur l'exploitation d'une seule espèce, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Face aux difficultés rencontrées par la profession, une meilleure compréhension de la reproduction et de la croissance de ces animaux s'avère essentielle.

L'implication de molécules de la famille des insulines/IGFs dans la régulation de ces processus physiologiques a été recherchée chez *C. gigas* : l'effet biologique de l'IGF-1 recombinant humain (IGF-1 rh) a été suivi au cours d'un cycle biologique sur des cellules de gonade et de bord du manteau, tissus cibles de la reproduction et de la croissance somatique et coquillière chez l'huître : - L'IGF-1 rh stimule les proliférations cellulaires dans la gonade en période de multiplication des cellules germinales (68% à 10^{-12} M) et active les synthèses de protéines des cellules germinales lors de la période de développement et de maturation des gamètes (41% à 10^{-13} M). - L'IGF-1 rh stimule les synthèses protéiques des cellules de bord du manteau en période de croissance des parties molles de l'huître (57,5% à 10^{-11} M) et de pousse coquillière active (56% à 10^{-10} M). Ces données indiquent que des molécules de type insuline/IGF seraient impliquées dans le contrôle de la reproduction et de la croissance chez *C. gigas*.

L'effet saisonnier de molécules de type insuline/IGF peut être associé à une expression différentielle des récepteurs spécifiques de ces molécules. L'existence de ces récepteurs a été mise en évidence chez *C. gigas* par le déplacement de la liaison de l'IGF-1 rh au niveau des différents tissus cibles. De plus, la caractérisation d'un récepteur homologue de type insuline a été réalisée par une approche de biologie moléculaire. Ce récepteur présente une relative conservation avec les autres récepteurs de la famille. Il s'exprime de façon ubiquitaire chez l'adulte, son niveau d'expression variant selon les tissus, et présente une expression différentielle au cours du développement larvaire.

Involvement of molecules belonging to the insulin/IGF system in growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : *in vitro* biological effects of human recombinant IGF-1, characterisation and expression of an homologous insulin-like receptor.

Oyster rearing along the French Atlantic coastline relies upon a single species, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In this context, understanding of reproduction and growth processes would be useful to cope with the difficulties coming upon the profession - spawn obtention, summer mortalities, epizootic risks and growth problems.

Involvement of some molecules belonging to insulin/IGF superfamily in regulation of growth and reproduction has been investigated in *C. gigas*. *In vitro* biological effects of human recombinant IGF-1 (IGF-1 rh) on gonadic and mantle edge cells - which are target tissues to oyster reproduction, somatic growth and shell growth - have been followed up during an annual cycle: - IGF-1 rh stimulates cell proliferation during germinal cells multiplication stage (68% at 10^{-12} M). It also activates germinal cells protein synthesis during gametes development and maturation (41% at 10^{-13} M). - IGF-1 rh stimulates mantle edge cells protein synthesis during oyster soft tissues growth (57,5% at 10^{-11} M) and active shell growth (56% at 10^{-10} M). These results indicate that *C. gigas* reproduction and growth may be under partial control of some insulin/IGF-like molecules.

Insulin/IGF-like seasonal effect on those biological processes can be associated with differential expression of their specific receptors. In *C. gigas*, the occurrence of such a receptor has been enlightened studying the shift of IGF-1 rh binding to its target tissues. Furthermore, a homologous insulin-like receptor has been characterised using a molecular biology approach. This receptor presents a relative conservation when compared to other members of the family. Its expression is ubiquitous during adult stage even though expression level is tissue specific. The receptor also shows a differential pattern of expression during larval development.

MOTS CLES : Bivalves, *Crassostrea*, Reproduction (Régulation), Croissance (Régulation), Facteurs de croissance, Insuline, Récepteurs-Hormones, Evolution moléculaire.
