Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physiologie et Biologie des Organismes – Populations -Interactions

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Identification de voies neuroendocriniennes du contrôle de la physiologie chez l'huître *Crassostrea gigas* par la caractérisation fonctionnelle de couples ligands/récepteurs

Présentée et soutenue par
Julie SCHWARTZ

Thèse soutenue publiquement le 25 janvier 2019 devant le jury composé de		
Mme FABIOUX Caroline	Maître de Conférences, HDR, Institut Universitaire Européen de la Mer, Brest	Rapporteur
M. TOSTIVINT Hervé	Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris	Rapporteur
Mme CORPOREAU Charlotte	Cadre de recherche, IFREMER, Brest	Examinateur
Mme SCHOOFS Liliane	Professeur, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven	Examinateur
M. HENRY Joël	Professeur, Université de Caen Normandie, Caen	Examinateur
M. FAVREL Pascal	Professeur, Université de Caen Normandie, Caen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Pascal FAVREL, UMR BOREA

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Avant-propos

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'École doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE), dans l'Unité Mixte de Recherche Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques (UMR BOREA, MNHN, CNRS 7208, UPMC, IRD 207, UCN, UA), dans le laboratoire de l'Université de Caen Normandie.

Ces travaux ont été cofinancés par l'Union Européenne dans le cadre du programme opérationnel FEDER/FSE 2014-2020 et par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR 14CE02 0020) dans le cadre du projet international NEMO (NEuropeptides of Marine Organisms).

Les figures ont été réalisées grâce aux images de Servier Medical Art.

Liste des communications

Communications orales :

- Congrès « Comparative of European Endocrinologists 2018 », Glasgow, 19-22 août 2018
- Dans le cadre du programme FADEx Ocean (French American Doctoral Exchange), présentation à l'Institut d'océanographie Scripps, Université de San Diego, États-Unis, 24 mai 2018
- Dans le cadre du programme FADEx Ocean, présentation au Museum d'histoire naturelle, Paris, France, 20 octobre 2018
- Workshop « Development, reproduction and evolution in marine organisms », Keelung, Taiwan, 25-29 juillet 2016

Communications écrites (posters):

- Congrès « Comparative of European Endocrinologists 2018 », Glasgow, 19-22 août 2018
- Dans le cadre du programme FADEx Ocean (French American Doctoral Exchange), à l'Institut d'océanographie Scripps, Université de San Diego, États-Unis, 24 mai 2018
- Dans le cadre du programme FADEx Ocean (French American Doctoral Exchange), présentation à l'Université de Corvallis, États-Unis, 21-22 mai 2018
- Congrès RegPep « International Regulatory Peptide Society », Rouen, France, 12-14 juillet

Articles :

- Publié : Dubos MP, Zels S, Schwartz J, et al (2018) Characterization of a tachykinin signalling system in the bivalve mollusc Crassostrea gigas. Gen Comp Endocrinol 266:110-118. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.05.003
- Publié : Schwartz J, Dubos MP, Pasquier J, et al (2018) Emergence of a cholecystokinin/sulfakinin signalling system in Lophotrochozoa. Sci Rep 8:16424. doi: 10.1038/s41598-018-34700-4
- En cours de soumission : Schwartz J, Réalis-Doyelle E, Dubos MP, Lefranc B, Leprince J, Favrel P. Characterization of an evolutionarily conserved calcitonin signaling system in a lophotrochozoan, the Pacific oyster (Crassostrea gigas)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur Pascal FAVREL de m'avoir choisie pour réaliser cette thèse. Merci pour vos conseils et votre expertise scientifique.

Je remercie également Pascal SOURDAINE de m'avoir accueillie au sein du laboratoire BOREA. Je tiens également à remercier grandement Sylvie DUFOUR de m'avoir donné l'opportunité de vivre ces belles aventures Taïwanaise et Américaine.

Je remercie le Docteur Caroline FABIOUX et le Professeur Hervé TOSTIVINT d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse. Je remercie également le Professeur Liliane SCHOOFS, le Docteur Charlotte CORPOREAU et le Professeur Joël HENRY d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie Céline ZATYLNY-GAUDIN pour tous ses conseils, son aide dans de nombreuses expériences et son soutien.

Je tiens à remercier Romain GUINAMARD de m'avoir aidée lorsque je suis arrivée seule à Caen. Je remercie aussi Laurent SALLÉ pour sa bienveillance à mon égard, tous ses compliments et son humour prévisible. Merci à René ROUET pour tous ces bons moments passés lors des séances de travaux pratiques de physiologie animale. Merci à Thomas HOF pour son accueil. Merci à tous les quatre pour ses six mois passés avec vous.

Je remercie Sylvie CLAEYSEN de m'avoir suivie depuis mon master 2, d'avoir été disponible pour faire partie de mon comité de suivi de thèse et d'être toujours de bons conseils. Je remercie également Muriel BARDOR et Yannick ARLOT d'avoir également accepté de faire partie de mon comité de suivi. Merci également à Eva.

J'adresse également mes remerciements à Marie-Pierre pour son investissement, sa générosité, sa grande aide et ses calendriers… Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi !

Je remercie également Béatrice pour son aide dans la réalisation des coupes histologiques. Merci à Jérôme LEPRINCE et Benjamin LEFRANC pour la synthèse

des neuropeptides. Merci à Myriam, Catherine, Sandra, Fabienne et Christophe pour leur aide au quotidien.

Un merci tout particulier à Bertrand qui nous a apporté sa bonne humeur chaque jour aux alentours de 17H et pas que. Je tiens également à remercier Albane qui a été une stagiaire parfaite !

Merci également à Benoît pour ses conseils et Julien pour toutes nos discussions.

Je remercie tous les doctorants que j'ai pu croiser au sein du laboratoire : Valérie pour son aide avant mon départ à Taïwan, Alexis pour son humour toujours de bon goût, mon collègue Alexandre pour tous ses conseils et son aide, Baptiste pour son aide et son humour, Charles pour nous avoir fait découvrir la cuisine végane, Maxime de nous avoir faire rire malgré lui, Maëva pour son aide et ses conseils pendant la rédaction, Daniel pour sa bonne humeur, Coralie, Quentin et Louis. Merci également à Mélanie pour sa gentillesse.

Merci à Jérôme et toutes ses histoires qui nous auront fait beaucoup rire dans ce bureau. Merci à Stéphanie pour ses conseils, sa gentillesse et toutes ces boulettes de papier partagées. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec la belle Cloé et Camille. Merci à Lorane pour toutes ces nombreuses et agréables discussions dos à dos ! Merci beaucoup à Floriane, la sagesse de ce bureau pour tous ces prénoms écorchés. Un grand merci à Aurore avec qui j'ai partagé tous ces moments de thèse, merci pour ton soutien, ton aide et ton amitié. Une grande pensée pour Laura avec qui nous nous sommes produites dans de nombreuses salles de concert : culture cellulaire, biologie moléculaire…tu nous as manqué durant cette dernière année de thèse. Une pensée également pour Maïté et Gérard.

Merci à Emilie pour ta bonne humeur et ton aide précieuse ! Merci à Christiane pour ces moments de Zumba ! Et comment ne pas parler de Zumba sans évoquer Aurore… Ce fut un plaisir de partager ces rares moments de sport avec toi ! Je suis contente de t'avoir rencontrée et d'être tata de la belle petite Ambre, fruit de ton amour avec le sympathique et souriant Jean-Philippe!

Un grand merci à mes amis Bénédicte, Laëtitia et Richard que je vois certes moins souvent mais que je n'oublie pas pour autant.

Un immense merci à mes parents Annie et Claude et à mon oncle Gérard pour tout ce qu'ils ont fait pour moi depuis toujours, je ne les remercierai jamais assez. Merci à Roxy, Samy, Mickey, Goldy et Goldy, Tomy, Roucky, Perle, Lena, Lou, Lilou, Princesse, Mirka, Lola, Carla, Capucine, Rose, Baghera, Flora et Vanille pour leur amour.

Un très grand merci à Nini d'être un frère bienveillant, aimant et protecteur. Merci également à sa chérie Laëtitia pour tous ces bons moments passés ensemble.

Un très grand merci à mon Rudolf pour ton amour et de m'avoir suivie en Normandie loin de ta ville natale de Montpellier si chère à tes yeux. Merci pour ton soutien et tout ce que tu as fait pour moi avant et pendant cette thèse. Merci également à ta famille Aude, Arnaud, Renan, Emeline, Amaury, Mélissa, Guilhem et Alexandra pour leur accueil et pour ces moments.

Ma dernière pensée s'adresse à mes grands-parents qui nous manquent un peu plus chaque jour.

Table des matières

Introduction générale 17
1. L'huître 17
1.1 Présentation du modèle biologique 17
1.1.1 Modèle d'intérêt économique 17
1.1.2 Modèle d'intérêt phylogénétique 18
1.2 Écologie de l'huître creuse 19
1.3 Biologie et anatomie de l'huître creuse adulte 20
1.4 La reproduction de l'huître 22
1.5 Système nerveux de l'huître 26
1.5.1 Les neurotransmetteurs 29
1.5.2 Le système nerveux périphérique 30
2 Les neuropeptides 31
2.1 Synthèse des neuropeptides 32
2.2 Évolution des neuropeptides 34
3 Les Récepteurs Couplés aux Protéines G ou RCPGs 38
3.1 Structure des RCPGs 39
3.2 Classes et familles de récepteurs 40
3.3 Classification des protéines G 48
3.4 Fixation du ligand et activation des protéines G 50
3.5 États conformationnels multiples 51
3.6 Oligomérisation 55
3.6.1 Les dimères obligatoires 55
3.6.2 Changement de signalisation cellulaire 56
3.7 La transactivation 57
3.8 Signalisation biaisée 59
3.9 Activation intracellulaire 59
3.10 Endocytose 61
4 Récepteurs identifiés chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* 62
5 « Déorphanisation » des récepteurs par endocrinologie inverse 67
5.1 Différentes méthodes de « déorphanisation » 67
5.2 Méthode de « déorphanisation » utilisée au cours de la thèse 70
6 Objectifs de la thèse 73

Chapitre I : identification d'une voie de signalisation de type cholécystokinine/sulfakinine chez l'huître *Crassostrea gigas* 799

1 Découverte de la CCK et de la gastrine 799

2 Biosynthèse de la CCK et de la gastrine 80

3 Effets physiologiques de la gastrine 82

4 Effets physiologiques de la CCK 83

5 Récepteurs à la CCK et à la gastrine 84

6 Voies de transduction du signal activées par les CCKRs 85

7 Homologues de la CCK et de la gastrine chez les amphibiens 88

8 Homologues de la CCK et de la gastrine chez les Téléostéens 88

9 Homologues de la CCK et de la gastrine chez les Urochordés 89

10 Homologues de la CCK et de la gastrine chez les Protostomiens 89

10.1 Homologues chez les Ecdysozoaires 89

10.1.1 Chez les arthropodes : les sulfakinines 89

10.1.2 Chez les nématodes : NLP-12 91

10.2 Homologues chez les Lophotrochozoaires 92

10.2.1 Chez l'huître 92

Article 96

10.2.2 Discussion 119

Chapitre II : identification d'une voie de signalisation de type calcitonine/ « Diuretic Hormone » 31 chez l'huître *Crassostrea gigas* 123

1 Découverte de la calcitonine 123

2 Biosynthèse de la calcitonine 125

3 Les récepteurs à la calcitonine et au CGRP 127

4 Homologues de la CT chez les Téléostéens 129

5 Homologues de la CT chez les Céphalochordés, les Urochordés, les Hémichordés et les Echinodermes: 131

6 Homologues de la CT chez les Protostomiens 132

6.1 Homologues chez les Ecdysozoaires 132

6.1.1 Homologues de la CT chez les arthropodes : « Diuretic Hormone 31 » (DH31) 132

6.1.2 Chez les nématodes : 136

6.2 Homologues chez les Lophotrochozoaires 136

6.2.1 Chez l'huître 138

Article 142

6.2.2 Discussion 189

Chapitre III : identification d'une voie de signalisation de type dopamine chez l'huître *Crassostrea gigas* 193
1 Découverte de la dopamine 193
2 Biosynthèse de la dopamine 194
3 Les récepteurs à la dopamine et le rôle de la dopamine 196
4 La dopamine et ses récepteurs au sein des Protostomiens 200
5 Récepteurs à la dopamine, à l'octopamine et à la tyramine 201
6 Rôle de la dopamine, octopamine et tyramine chez les Protostomiens 204
6.2 La dopamine, l'octopamine et la tyramine chez les Lophotrochozoaires 207
6.2.1 Chez l'huître 207
6.2.2 Identification d'une voie de type dopamine chez l'huître *Crassostrea gigas* 212
Discussion et conclusion générale 225
1 Perte et spécificité des systèmes neuropeptidergiques chez différents taxons 225
2 Comment identifier des récepteurs homologues chez l'huître? 226
3 Implication des couples neuropeptides/récepteurs dans la physiologie de l'huître 234
4 Conclusion 236
Annexes 243
Références bibliographiques 263

Table des figures et tableaux

Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant la divergence entre la lignée des Protostomiens et la lignée des Deutérostomiens. _____ 18
Figure 2 : Cycle de développement de l'huître *Crassostrea gigas*._____ 20
Figure 3 : Anatomie interne des principaux organes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* adulte. __ 21
Figure 4 : Représentation schématique d'un cycle annuel de gamétogenèse et de mise en réserve énergétique._____ 25
Figure 5 : Coupes histologiques d'aire gonadique de *Crassostrea gigas* adultes. _____ 25
Figure 6 : Localisation des ganglions viscéraux de *Crassostrea gigas.* _____ 27
Figure 7 : Représentation des cellules nerveuses du ganglion viscéral d'*Ostrea edulis.* _____28
Figure 8 : Schéma du système nerveux de *Crassostrea virginica*._____ 30
Figure 9 : Schéma simplifié du système nerveux de l'huître *Crassostrea virginica*._____ 31
Figure 10 : Synthèse et maturation des neuropeptides._____ 34
Figure 11 : Représentation bidimensionnelle schématique d'un RCPG._____ 39
Figure 12 : Classification GRAFs. _____ 422
Figure 13 : Représentation schématique de la signalisation cellulaire induite par les différentes protéines G recrutées par les RCPGs._____ 49
Figure 14 : Cycle d'activation des protéines G. _____ 50
Figure 15 : Modèle d'activation à deux états conformationnels. _____ 511
Figure 16 : Représentation schématique de l'effet obtenu par un agoniste entier et partiel. _____ 522
Figure 17 : Dynamique conformationnelle et fonctionnelle à trois états des RCPGs. _____ 522
Figure 18 : Modèle de modulation allostérique._____ 533
Figure 19 : Modulation allostérique de la réponse biologique induite par un agoniste orthostérique.544
Figure 20 : Représentation schématique d'un dimère obligatoire $GABA_BR1/GABA_BR2$._____ 566
Figure 21 : Représentation schématique d'un dimère D1R/D2R entraînant un changement de signalisation cellulaire._____ 566
Figure 22 : Transactivation dépendante du ligand._____ 588
Figure 23 : Transactivation indépendante du ligand. _____ 588
Figure 24 : Représentation schématique de la signalisation biaisée. _____ 59
Figure 25 : Représentation de l'activation intracellulaire._____ 60
Figure 26 : Désensibilisation des RCPGs grâce aux « G protein-coupled receptor kinase » ou GRK. 62
Figure 27 : Différentes stratégies de « déorphanisation »._____ 69
Figure 28 : Principe de la « déorphanisation » d'un RCPG grâce à la protéine Gα16. _____ 71
Figure 29 : Principe de la recherche des principales protéines G endogènes impliquées dans le couplage au RCPG d'intérêt._____ 72
Figure 30 : Biosynthèse de la CCK. _____ 81
Figure 31 : Biosynthèse de la gastrine. _____ 82
Figure 32 : Effets de la CCK et de la gastrine._____ 84
Figure 33 : Expression différentielle et affinité des CCKRs avec la CCK._____ 85
Figure 34 : Principales voies de signalisation stimulées lors de l'activation des CCKR. _____ 87
Figure 35 : Voies de maturation des gènes humains de la CT et de l'AM. _____ 1255
Figure 36 : Structure de la préproCT. _____ 1266
Figure 37 : Rôle des RAMP et de la RCP sur CTR et le CLR._____ 1288
Figure 38 : Hypothèse de duplication et de perte de la CT chez les Bilatériens. _____ 1377
Figure 39 : Schémas représentant les conditionnements salins d'huîtres._____ 13939
Figure 40 : Voie de biosynthèse des catécholamines._____ 1955
Figure 41 : Synthèse de la libération et de la recapture de dopamine. _____ 1966
Figure 42 : Voie de biosynthèse des catécholamines menant à la formation de la tyramine et de l'octopamine. _____ 2000

Figure 43 : Arbre phylogénétique représentant les différentes familles de récepteurs à la dopamine, octopamine et tyramine chez les Deutérostomiens et les Protostomiens. _____ 2133
Figure 44 : Intensité de signal (en RFU) émise suite à l'administration des différentes catécholamines avec et sans expression du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1._____ 2144
Figure 45 : Courbes effet dose représentant l'activation du récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 par la dopamine et la tyramine._____ 2155
Figure 46 : Expression (en RPKM) de Cragi-DOPR.2.1.1 au cours du développement de l'huître. 2166
Figure 47 : Expression différentielle du gène codant le récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 (qPCR) au sein des différents tissus de l'huître adulte. _____ 2177
Figure 48 : Expression différentielle du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 en fonction des différents stades de gamétogenèse mâle et femelle. _____ 2188
Figure 49 : Expression (qPCR) du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 au sein des bords de manteau (BM), du manteau (M), des branchies (Br) et des ganglions viscéraux (GV) chez les huîtres témoins et conditionnées dans une eau dont la salinité a été abaissée de manière brutale. _____ 2200
Figure 50 : Méthode de « déorphanisation » à grande échelle. _____ 2333
Figure 51 : Schéma général de l'étude d'une voie de signalisation chez l'huître *Crassostrea gigas*. _____ 23939

Annexes

Annexe 1 : Séquences nucléotidiques des récepteurs Cragi-CCKR1 et Cragi-CCKR2. _____ 244
Annexe 2 : Séquence nucléotidique du précurseur des neuropeptides Cragi-CCK1 et Cragi-CCK2. 245
Annexe 3 : Séquences nucléotidiques des récepteurs Cg-CT-R, Cragi-CTR2, Cragi-CTR3 et Cragi-RCP. _____ 249
Annexe 4 : Séquence nucléotidique du récepteur Cragi-DOPR.2.1.1. _____ 250

Tableau 1 : Neuropeptidome de l'huître *Crassostrea gigas*. _____ 37
Tableau 2 : Séquences en acides aminés des peptides de type gastrine/CCK/SK identifiés et caractérisés chez les différentes espèces. _____ 944
Tableau 3 : Séquences en acides aminés des peptides de type CT/DH31 identifiés et caractérisés chez les différentes espèces._____ 14040
Tableau 4 : Résumé des voies de signalisation impliquées lors de l'activation des D_1R-like et D_2R-like : localisation des récepteurs et fonctions physiologiques associées. _____ 1988
Tableau 5 : Principaux agonistes et antagonistes sélectifs des différents types de récepteurs à la dopamine. _____ 1999
Tableau 6 : Récepteurs à la dopamine, octopamine et tyramine chez les Protostomiens._____ 2033
Tableau 7 : Expression du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 au sein des branchies, du bord de manteau, du manteau et des ganglions viscéraux chez des huîtres témoins et conditionnées dans de l'eau dont la salinité a progressivement été diminuée. _____ 2199

Liste des abréviations

AC : Adénylate Cyclase

Ach : Acétylcholine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AKH : Adipokinetic Hormone

AM : Adrénomédulline

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique Messager

AVP : Arginine-Vasopressine

BLAST : Basic Local Alignment search Tool

CALCR : Calcitonine Receptor

CCK : Cholécystokinine

CCKR : Cholecystokinin Receptor

CCK-AR : Cholecystokinin Alimentary Receptor

CCK-BR : Cholecystokinin Brain Receptor

CCK/SK : Cholécystokinine/Sulfakinine

CCP-I: Calcitonine Carboxy Terminal Peptide ou Katacalcine

CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide

CHO : Chinese Hamster Ovary

CLR : Calcitonin Like Receptor

COMT : Catéchol-O-Méthyl Transférase

CRD : Cystine-Rich Domain

CRF : Corticotropin-Releasing-Factor

CRSP : Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide

CT : Calcitonine

CTR : Calcitonin Receptor

CRISP-Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR associated protein 9

DA : Dopamine

DAG : Diacylglycérol membranaire

DAT : Dopamine Active Transporter

DINeR : The Database for Insect Neuropeptide Research

DH : Diuretic Hormone

DLR : Dopamine Like Receptor

DOP : Dopamine

DOX : Doxazosin Mesylate

DR : Dopamine Receptor

EC 50 : Concentration Effective médiane (Half Maximal Effective Concentration)

ECD : Ecdystéroïde

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EGF : Facteur de croissance épidermique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

FAK : Focal Adhesion Kinase

FSH : Follicle Stimulating Hormone Hormone

GABA : Acide γ-aminobutyrique

GIP : Gastric Inhibitory Peptide

GigaTON : Gigas TranscriptOme pipeliNe

GFP : Green Fluorescent Protein

GMPc : Guanosine Monophosphate Cyclique

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone

GPCR : G Protein-coupled Receptor

GRK : G Protein-coupled Receptor Kinase

GRP : Gastin-Releasing Peptide

GTP : Guanosine Triphosphate

GV : Ganglions viscéraux

HB-EGF : Heparin-binding EGF

HEK : Human Embryonic Kidney

HPLC : High Pressure liquid Chromatography

HVA : Homovanillic Acid

IAPP : Islet Amyloid Peptide

IMAO : Inhibiteur de la Mono-Amine Oxydase

INDR : Invertebrate Dopamine Receptors

IP3 : Inositol 3-Phosphate

IM : Intermédine

JAK : Janus Kinase

LH : Luteinizing Hormone

Log : Logarithme

LPS : Lipopolysacharide

MAO : Mono-Amine Oxydase

MAP : Mitogen Activated Proteins

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

µM : Nanomolaire

MMP : Métalloprotéases Matricielles

NfκB : Nuclear Factor-Kappa B

nM : Nanomolaire

N-PCT : amino-procalcitonine

NO : Nitric Oxide

NOS : Nitric Oxide Synthase

OctαRs : α-adrenergic-like octopamine receptors

OctβRs: β-adrenergic-like octopamine receptors

PAR-1 : Protein Activated Receptor

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCT : Procalcitonine

PDF : Pigment-Dispersing Factor

PDFR : Pigment-Dispersing Factor Receptor

PI : Phosphatidylinositol

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PLC : Phospholipase C

PDE : Phosphodiestérase

pH : potentiel Hydrogène

PK : Protéine Kinase

PNMT : Phényléthanolamine-N-méthyltransférase

PZ : Pancréozymine

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RAMP : Receptor activity Modifying Protein

RCP : Receptor Component Protein

RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G

RE : Réticulum Endoplasmique

REG : Réticulum Endoplasmique Granulaire

RNAseq : Ribonucleic Acid Sequencing

RPKM : Reads Per Kilobase Million

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SK : Sulfakinine

SKR : Sulfakinine Receptor

SNC : Système Nerveux Central

sNPF : short Neuropeptide F

SOD : Superoxyde dismutase

SRP : Particule de reconnaissance du Signal (Signal Recognition Particle)

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

TACR ou TKR : Récepteur à la Tachykinine

TAR : Récepteurs aux traces amines

TK : Tachykinine

TK : Tyrosine Kinase

TKR : Tyrosin-Kinase Receptor

TM : Transmembranaire

TMPS : Triple Membrane Passing Signal

TSH : Thyréostimuline

TyrR : Tyramin Receptor

UTR : Untranslated Transcribed Region

VIP : Peptide Intestinal Vasoactif

Introduction générale

Introduction générale

La physiologie regroupe l'étude des fonctions permettant à un organisme de se maintenir en vie. Ces fonctions sont réparties en grandes fonctions et comprennent la nutrition (incluant la digestion, la respiration, la circulation et l'excrétion), la reproduction (incluant la croissance et le développement), les fonctions de relation permettant à l'organisme de percevoir les *stimuli* venant du milieu extérieur (comprenant la sensibilité, la motricité et la protection) et les fonctions de corrélation internes permettant de réguler l'ensemble des fonctions énoncées grâce au système nerveux et au système neuroendocrinien. Le système nerveux agit à travers les nerfs et se traduit par la libération de neurotransmetteurs au contact des cellules cibles. Le système neuroendocrinien agit à travers le système circulatoire, permettant ainsi le transport des neurohormones jusqu'aux cellules cibles distantes. Les neurotransmetteurs et les neurohormones et se couplent à des récepteurs en vue d'une réponse physiologique. Ces récepteurs, sont des récepteurs canaux, des récepteurs tyrosine kinase et majoritairement des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Les couples neuropeptides/récepteurs sont très étudiés au sein des Vertébrés mais peu de données sont disponibles chez les Protostomiens, exceptés chez les Ecdysozoaires, faisant de l'huître *Crassostrea gigas* un animal modèle.

1. L'huître

1.1 Présentation du modèle biologique

1.1.1 Modèle d'intérêt économique

Avec une production de plus de 200 000 tonnes en 2015-2016, la conchyliculture représente la principale ressource aquacole française. L'espèce la plus cultivée est l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* également appelée huître japonaise (98 %, contre 2 % d'huître plate *Ostrea edulis*). Cette espèce a été introduite en France et dans de nombreux autres pays du monde dans les années 70 après la quasi-disparition de l'espèce indigène *Ostrea edulis* suite à deux épizooties et l'éradication de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* infectée par un iridovirus. En Normandie, 125 000 tonnes d'huîtres creuses ont été produites en 2015-2016, permettant ainsi à la France de couvrir 82 % de la production européenne (Rapport FranceAgriMer http://www.cnc-france.com).

1.1.2 Modèle d'intérêt phylogénétique

L'huître creuse *Crassostrea gigas*, appartient aux Lophotrochozoaires, comprenant les animaux présentant une larve de type trochophore (Eutrochozoaires) et les animaux possédant un organe rétractile participant à la fonction d'alimentation, le lophophore (Lophorates). Elle appartient à l'embranchement des mollusques, à la classe des bivalves, à l'ordre des filibranches et à la famille des ostréidés.

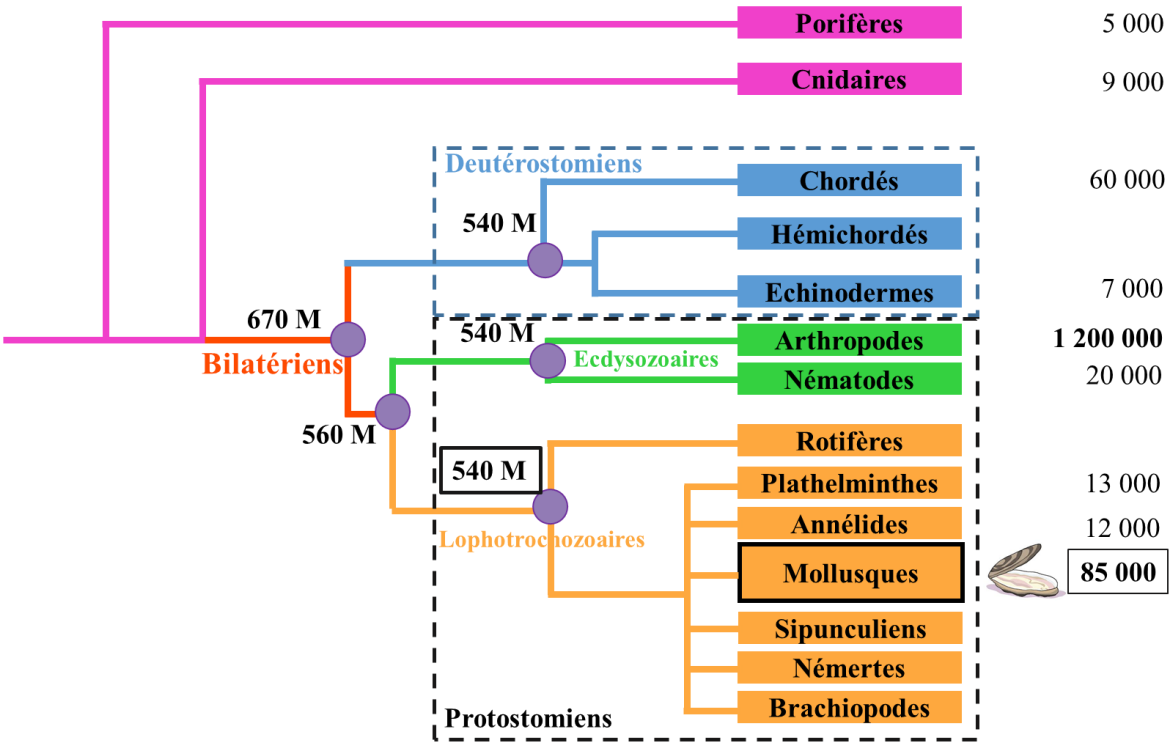


Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant la divergence entre la lignée des Protostomiens et la lignée des Deutérostomiens. Les chiffres à droite de l'arbre phylogénétique indiquent le nombre d'espèces par phylum. Adaptée de (Grimmelikhuijzen and Hauser 2012).

Les Lophotrochozoaires constituent le troisième clade des animaux bilatériens. Les Bilatériens se sont divisés en deux groupes : les Deutérostomiens et les Protostomiens, il y a environ 670 millions d'années (Figure 1). La principale différence entre ces deux groupes réside dans le devenir du blastopore pendant la phase embryonnaire. En effet, chez les Deutérostomiens, le blastopore devient l'anus et la bouche apparaît secondairement, alors que chez les Protostomiens, l'apparition de la bouche se fait en premier et celle de l'anus est plus tardive. Les Deutérostomiens sont des animaux très étudiés, et ce, en raison de la présence des Vertébrés au sein de ce groupe. Concernant le groupe des Protostomiens, celui-ci se divise en deux clades : les Protostomiens ecdysozoaires et les Protostomiens lophotrochozoaires. Le clade des Protostomiens ecdysozoaires est relativement bien étudié car il comprend entre autres les Arthropodes et les Nématodes intégrant respectivement des espèces modèles telles que

Drosophila melanogaster et *Caenorhabditis elegans*. Néanmoins, malgré la parution de récentes données génomiques, le clade des Protostomiens lophotrochozoaires comprenant principalement les Mollusques, les Annélides et les Plathelminthes reste bien moins étudié.

Les Mollusques représentent à eux seuls le second phylum comprenant le plus grand nombre d'espèces du règne animal (85 000 espèces de mollusques comparées aux 1 200 000 espèces d'arthropodes) et ont une origine évolutive très ancienne (Grimmelikhuijzen and Hauser 2012). En effet, des études portant sur le génome mitochondrial de *Crassostrea gigas* et de la moule *Mytilus edulis* montrent une divergence entre ces deux espèces de mollusques datant d'environ 500 millions d'années (Ren et al. 2010). Aussi, si l'on considère que l'ancêtre commun aux Mollusques, Annélides et Plathelminthes remonte à 540 millions d'années, alors il peut être suggéré qu'une diversification animale s'est manifestée très tôt chez les Lophotrochozoaires. Toutefois, l'évolution sur le plan moléculaire du phylum des Mollusques reste encore peu étudiée alors qu'il représente un grand intérêt pour comprendre les divergences sur le plan biologique et évolutif chez les Protostomiens. Par conséquent, l'étude de la neuroendocrinologie chez le mollusque *Crassostrea gigas* devient alors pertinente afin d'enrichir les données sur la régulation des grandes fonctions physiologiques au sein des Protostomiens.

1.2 Écologie de l'huître creuse

L'huître *Crassostrea gigas* occupe au cours de son cycle de développement deux biotopes successifs. Durant les stades embryonnaires et larvaires l'huître est planctonique et ce, jusqu'à la fixation de l'animal afin de subir la métamorphose (Figure 2). Après la métamorphose, les huîtres juvéniles et adultes sont benthiques et vivent fixées sur des substrats majoritairement durs dans des zones littorales. L'huître creuse est un animal euryhalin et eurytherme c'est-à-dire, capable de vivre dans des milieux de salinité et de températures variés. Cette grande adaptabilité lui permet de vivre dans de nombreux océans et mers à travers le monde.

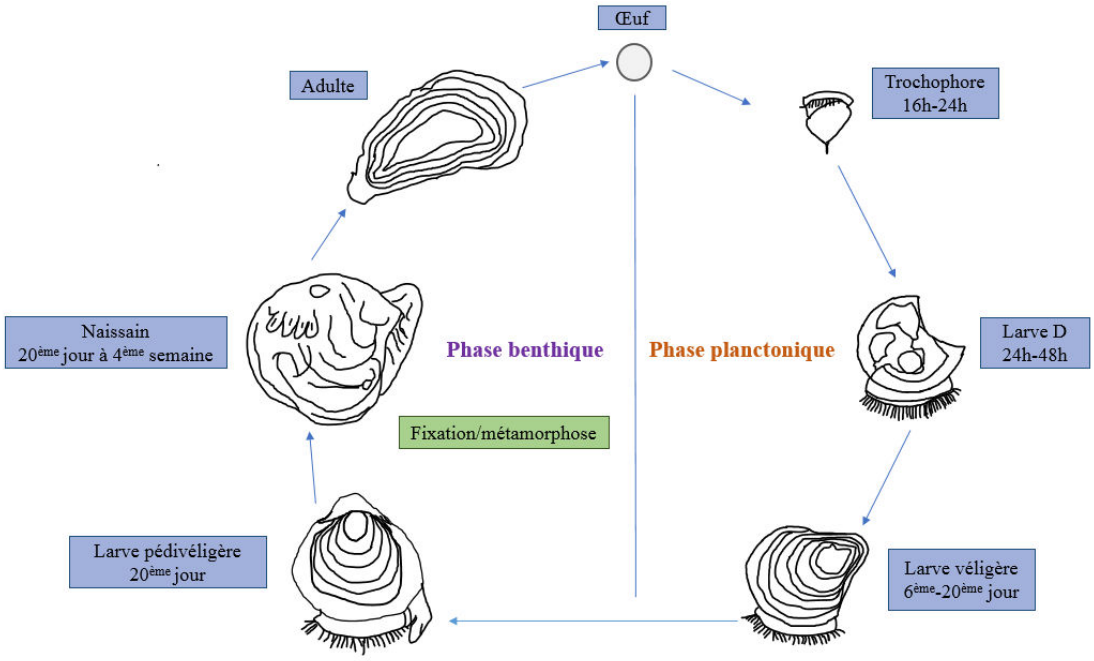


Figure 2 : Cycle de développement de l'huître *Crassostrea gigas*. Adaptée de www.francenaissain.com.

1.3 Biologie et anatomie de l'huître creuse adulte

Les huîtres sont des animaux à corps mou comprimé latéralement et renfermé dans une coquille à deux valves asymétriques articulées autour d'une charnière et maintenues par un muscle adducteur puissant composé d'une partie antérieure et d'une partie postérieure, permettant l'ouverture et la fermeture de la coquille. Cette coquille est composée de trois couches : la couche la plus externe ou périostracum formée de protéines tannées non minéralisées, la couche intermédiaire composée de prismes verticaux de carbonate de calcium reposant sur une matrice protéique de conchyoline et la couche interne ou nacre constituée de cristaux d'aragonite empilés de manière horizontale et d'une matrice organique peu abondante. La partie molle de l'animal est composée de différents organes et est contenue dans la valve inférieure (gauche) et creuse de l'huître (Figure 3). Cette partie molle est enveloppée dans le manteau dont les deux lobes sont soudés près de la charnière et forment un renflement, le capuchon céphalique. Le bord du manteau est fortement pigmenté et est constitué de trois lobes : le lobe externe, le lobe médian et le lobe interne. Le bord du manteau est composé de cellules impliquées dans la formation du périostracum et des matrices organiques des deux couches minéralisées de la coquille. De plus, le repli médian du bord du manteau a un rôle sensoriel et le repli interne est composé de muscles. Le manteau est constitué de deux lobes et est riche en organes sensoriels composés de cils à l'origine d'un courant d'eau entre les valves. Au creux du manteau, se trouve

la cavité palléale qui est une cavité ventrale spécifique des Mollusques dans laquelle baignent les branchies et où débouchent l'anus et l'orifice génital. Cette cavité est remplie par de l'eau de mer, permettant ainsi à l'animal de résister à de grandes périodes d'émersion. La masse céphalique des huîtres est seulement représentée par la bouche et les quatre palpes labiaux ciliés dont la fonction est de trier et d'orienter les particules alimentaires vers l'orifice buccal.

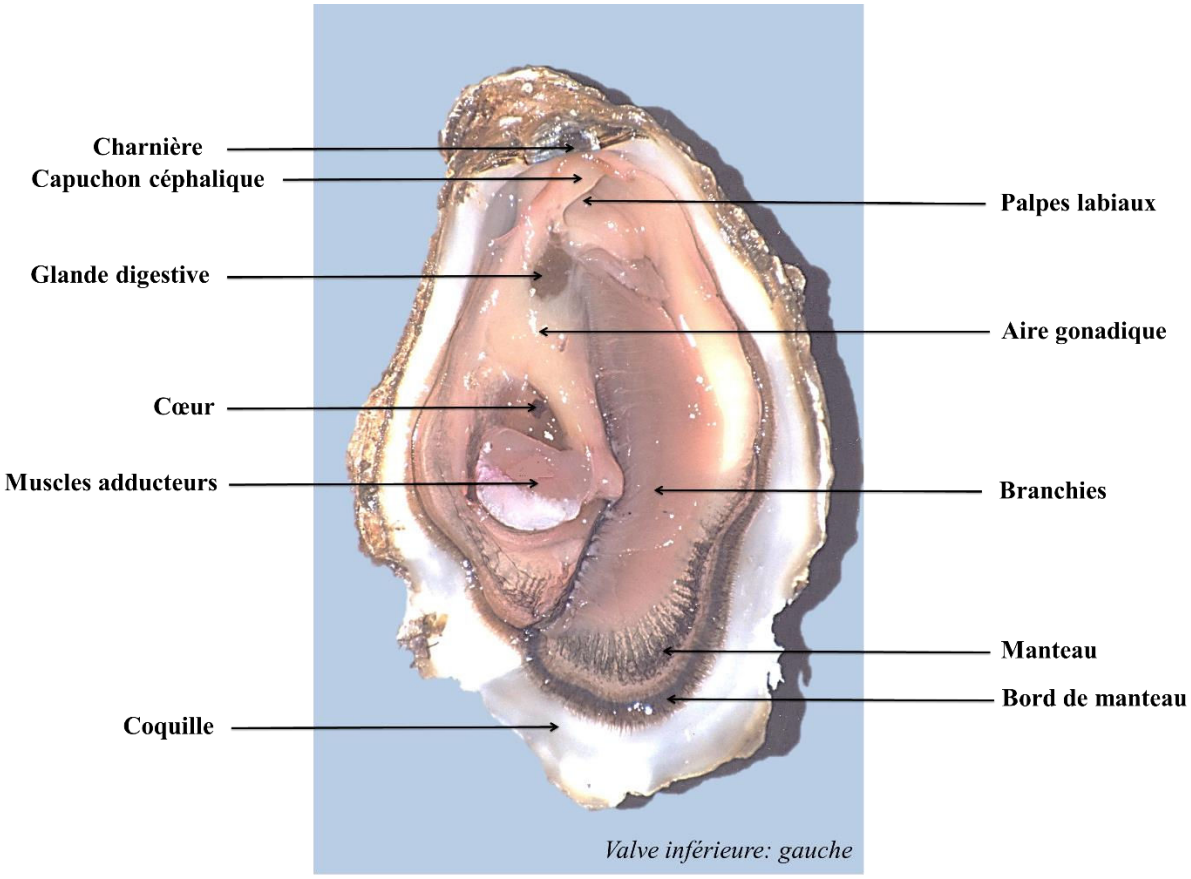


Figure 3 : Anatomie interne des principaux organes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* adulte. La valve droite a été ôtée et le pan droit du manteau excisé.

La fonction de respiration est assurée par deux paires de branchies lamellaires, soudées au manteau à leur base et s'étendant depuis l'anus jusqu'aux palpes labiaux. En plus de leur rôle dans la fonction respiratoire, elles participent à la fonction de nutrition. En effet, leurs filaments ciliés créent un courant d'eau permanent qui assure un apport continu en oxygène et l'approvisionnement de l'animal en particules alimentaires. Ces particules sont alors retenues par le mucus recouvrant les branchies et transportées grâce aux battements des cils vibratiles jusqu'aux palpes labiaux qui les dirigent vers la bouche de l'animal.

Le système digestif de l'huître est composé de la bouche, d'un court œsophage, de l'estomac, de l'intestin, de la glande digestive et de l'anus. L'estomac forme un long cæcum comprenant le stylet cristallin constitué d'une matrice protéique à forte teneur en enzymes digestives. Il agit

également comme un pilon dont la fonction est de broyer les particules alimentaires contre la partie chitineuse abrasive de l'estomac, le bouclier gastrique. L'estomac est en communication directe avec la glande digestive au niveau de laquelle s'effectuent la digestion extra et intracellulaire et l'absorption des nutriments. Cette glande est constituée de nombreux diverticules digestifs entourant l'estomac et les replis de l'intestin. Celui-ci forme une large boucle dont la partie rectale est localisée contre le muscle adducteur. Le trajet complet d'un aliment au sein de ce tube digestif dure entre 80 et 150 minutes.

L'huître possède un système circulatoire impliqué dans le transport des nutriments, de l'oxygène et des déchets métaboliques, partiellement clos, de type lacunaire. En effet, le liquide circulant, l'hémolymphe n'est pas seulement confinée aux vaisseaux et au cœur mais peut également pénétrer au sein des tissus et de sinus cœlomiques. Situé en avant du muscle adducteur dans la cavité péricardique, le cœur est constitué de deux oreillettes et d'un ventricule. Il a pour rôle de pomper l'hémolymphe et de la diriger vers la masse viscérale et le muscle adducteur dans lequel le système veineux la recrute afin de la conduire vers les branchies et le rein. L'hémolymphe contient des cellules appelées hémocytes qui interviennent dans la défense et la réponse immunitaire.

Le système d'excrétion de l'huître est assuré par le rein formé par une glande tubulaire contenue dans le sinus rénal, localisé sous le muscle adducteur au niveau de la zone péricardique. Le système reproducteur comprend l'aire gonadique composée de la gonade incluant les tubules gonadiques contenant les gamètes et le tissu conjonctif vésiculeux, et le tissu de réserve, permettant le stockage du glycogène. L'aire gonadique est un organe non permanent puisque sa structure varie fortement au cours du cycle de reproduction de l'huître.

1.4 La reproduction de l'huître

En zone tempérée, le cycle de reproduction de l'huître dure une année avec une maturation des cellules germinales qui commence en hiver et se termine en été avec leur émission dans l'eau de mer. L'huître creuse est un hermaphrodite à tendance protandre de type alternatif irrégulier, ce qui implique le changement irrégulier de son sexe entre deux cycles de reproduction. Toutefois, il est observé un nombre plus important d'huîtres mâles jeunes. Malgré ces inversions de sexe, peu d'individus sont des hermaphrodites simultanés c'est-à-dire présentant des tubules gonadiques comprenant à la fois des gamètes mâles et femelles. Le déterminisme du sexe est encore peu connu chez l'huître *Crassostrea gigas* mais il semblerait être régi par différents facteurs environnementaux et génétiques.

Le premier développement gonadique s'effectue dès la première année de vie de l'huître. La gamétogenèse se déroule de façon centripète au sein des tubules gonadiques dont le diamètre augmente au fur et à mesure de la maturation des cellules germinales de l'animal. Lorsque cette maturité est atteinte, les gamètes seront émis depuis les canaux évacuateurs dans l'eau, la fécondation de l'animal étant externe. Lors de la phase de maturité sexuelle, la gonade occupe une place telle, qu'elle devient l'organe le plus volumineux de l'animal au détriment du tissu de réserve. En effet, celui-ci renferme les principales ressources énergétiques de l'animal et son développement est inversement corrélé à la progression de la gamétogenèse. Ainsi, lors de chacune des reprises d'une gamétogenèse active, ces réserves énergétiques seront mobilisées afin de soutenir l'effort reproducteur de l'animal et permettre le développement des tubules gonadiques ainsi que la formation des gamètes.

De ce fait, le cycle de gamétogenèse de l'huître ainsi que le cycle de formation du tissu de réserve suivent un cycle annuel, décomposé en quatre stades (Lubet 1959; Berthelin et al. 2000) (Figures 4 et 5) :

- Stade 0 : correspondant au stade de repos sexuel. Il a lieu en automne et perdure jusqu'au début de l'hiver. Lors de ce stade, les tubules gonadiques sont extrêmement petits et ne présentent que quelques cellules germinales souches. La gonade est très réduite et le sexe de l'huître ne peut donc pas être déterminé.

- Stade 1 : correspondant au stade de divisions cellulaires. Il se déroule durant l'hiver et dure jusqu'au printemps. Lors de ce stade, les cellules germinales souches prolifèrent et se différencient en gonies de type spermatogonies ou ovogonies rentrant à leur tour en phase de multiplication intense. Par conséquent, les tubules gonadiques commencent à se développer bien que leur taille reste limitée.

- Stade 2 : correspondant au stade de différenciation cellulaire. Il a lieu pendant le printemps. Durant ce stade, les cellules germinales sont en phase de maturation, ce qui entraîne un fort développement des tubules gonadiques. Chez le mâle, les spermatogonies se différencient en spermatocytes primaires qui, entrent en méiose afin de donner successivement naissance à des spermatocytes secondaires puis à des spermatides et spermatozoïdes. Chez la femelle, les ovogonies se différencient en ovocytes primaires qui, entrent en méiose mais restent bloqués en prophase I jusqu'à leur explusion dans l'eau de mer et leur fécondation.

- Stade 3 : correspondant au stade de maturité sexuelle. Il se déroule à partir de la fin du printemps jusqu'à la fin de l'été et est divisé en quatre parties :

- Le stade 3A, se déroulant sur une période allant de la fin du printemps jusqu'au début de l'été et durant lequel les tubules gonadiques sont emplis de spermatozoïdes et/ou d'ovocytes matures. Toutefois, quelques cellules pas encore matures peuvent être observées durant ce stade.
- Le stade 3B, correspondant au stade d'émission des gamètes dans le milieu extérieur et se déroulant pendant l'été. À ce stade, tous les gamètes sont matures et sont acheminés depuis les tubules gonadiques vers des canaux génitaux localisés au niveau de la surface de l'aire gonadique. Les gamètes sont ensuite transportés jusqu'au gonoducte grâce aux mouvements des cils des cellules épithéliales des canaux, à partir duquel ils sont émis. Selon les conditions environnementales, l'émission des gamètes dans le milieu extérieur peut être totale, partielle ou bien nulle.
- Le stade 3C, correspondant à de possibles nouvelles émissions de gamètes.
- Le stade 3D, correspondant à la régression des tubules gonadiques après la dernière émission des gamètes et la résorption des gamètes non émis. Ce stade conduit progressivement au stade 0 de repos sexuel.

En ce qui concerne le cycle de formation du tissu de réserve, celui-ci est décomposé selon les stades suivants (Lubet 1959; Berthelin et al. 2000) :

- Stade A : correspondant au stade 0 de repos sexuel. Il correspond à la multiplication des cellules stockant le glycogène et donc à la reconstitution du tissu de réserve.

- Stade B : correspondant au stade 1 de gamétogenèse. Durant ce stade le tissu de réserve est à son développement maximal et est majoritaire dans l'aire gonadique.

- Stade C : correspondant au stade 2 de gamétogenèse. Il correspond à la forte régression du tissu de réserve due à la forte consommation du glycogène stocké lors des stades précédents.

- Stade D : correspondant au stade 3 de gamétogenèse lors de la maturité sexuelle. À ce stade, la taille du tissu de réserve est réduite à son maximum, permettant aux tubules gonadiques d'être présents en large majorité.

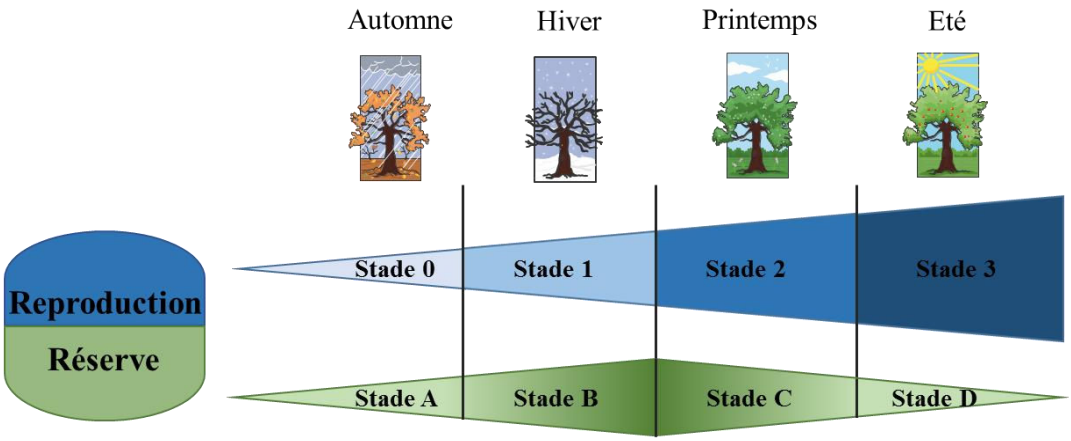


Figure 4 : Représentation schématique d'un cycle annuel de gamétogenèse et de mise en réserve énergétique.

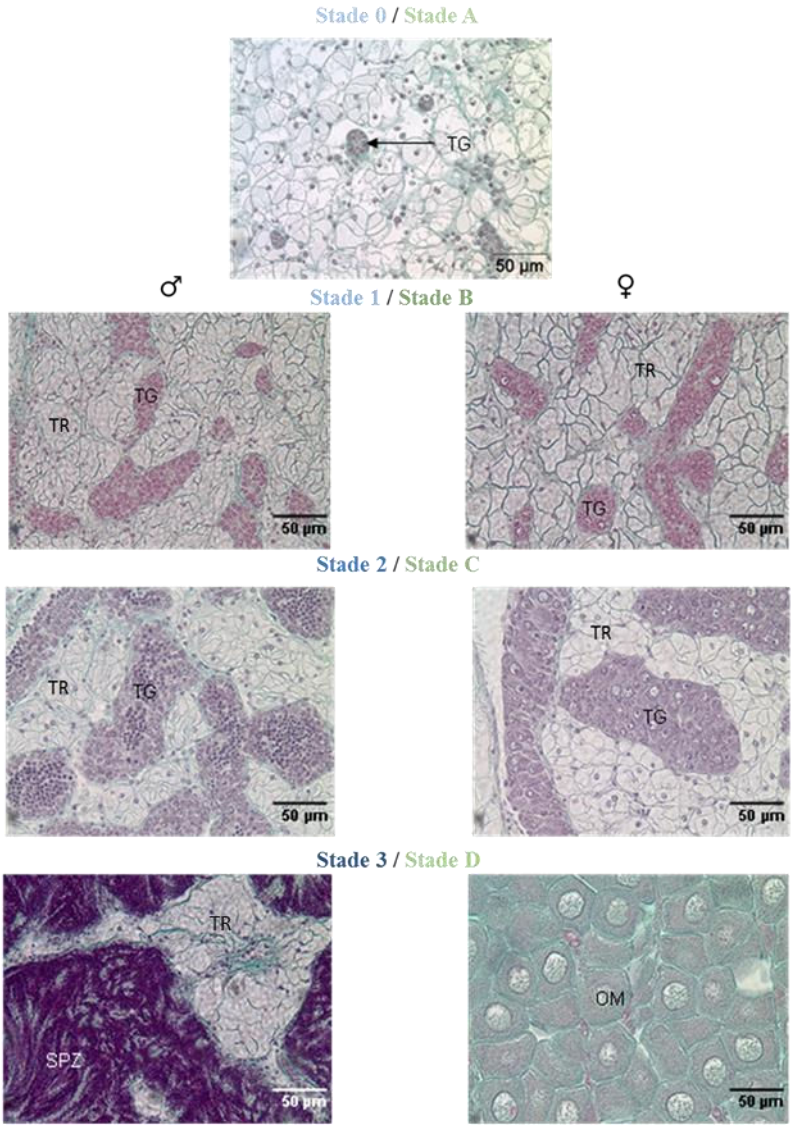


Figure 5 : Coupes histologiques d'aire gonadique de *Crassostrea gigas* adultes colorées au trichrome de Prenant-Gabe. Les individus sont triés selon leur sexe et leur stade de gamétogenèse (0 à 3) et de mise en réserve (A à D). Les tubules gonadiques (TG) sont colorés en violet et le tissu de réserve (TR) en beige. SPZ : spermatozoïde, OM : ovocyte mature. (Hanquet Dufour et Kellner communication personnelle).

1.5 Système nerveux de l'huître

Chez l'huître, comme cela est le cas chez les autres invertébrés et les vertébrés, la fonction de reproduction ainsi que l'ensemble des fonctions physiologiques sont régulées par le système nerveux. Ce système nerveux joue le rôle de centre intégrateur de l'ensemble des paramètres physiologiques de l'animal mais également des paramètres environnementaux. Chez l'huître, le système nerveux n'est pas centralisé, il est réduit et est composé de deux ganglions viscéraux fusionnés, positionnés à la jonction des muscles adducteurs, et de ganglions cérébroïdes très régressés, situés à la jointure des palpes labiaux, de part et d'autre de l'œsophage (Galtsoff 1964). Il est à noter que la description du système nerveux a été effectuée par Galstoff chez l'huître *Crassostrea virginica* mais est applicable chez *Crassostrea gigas* du fait de la très grande ressemblance morphologique entre ces deux espèces.

Anatomie des ganglions

Les ganglions sont formés d'un noyau central ou neuropile constitué de faisceaux serrés de fibres nerveuses et de cellules nerveuses éparses et, d'un cortex composé de plusieurs couches de soma de cellulaires nerveux. Cette disposition donne aux ganglions de l'huître une ressemblance avec les matières grises et blanches du système nerveux central (SNC) des vertébrés. La partie ventrale du ganglion faisant face à la chambre épibranchiale est recouverte d'une couche unicellulaire d'épithélium. De plus, ces ganglions sont entourés d'une couche de tissu conjonctif formant une gaine externe.

Les ganglions viscéraux

Les ganglions viscéraux innervent la partie postérieure du manteau, le muscle adducteur, les branchies, le cœur, la gonade et l'intestin. Ils intègrent également des informations provenant des organes sensoriels du manteau (Figures 6 et 8).

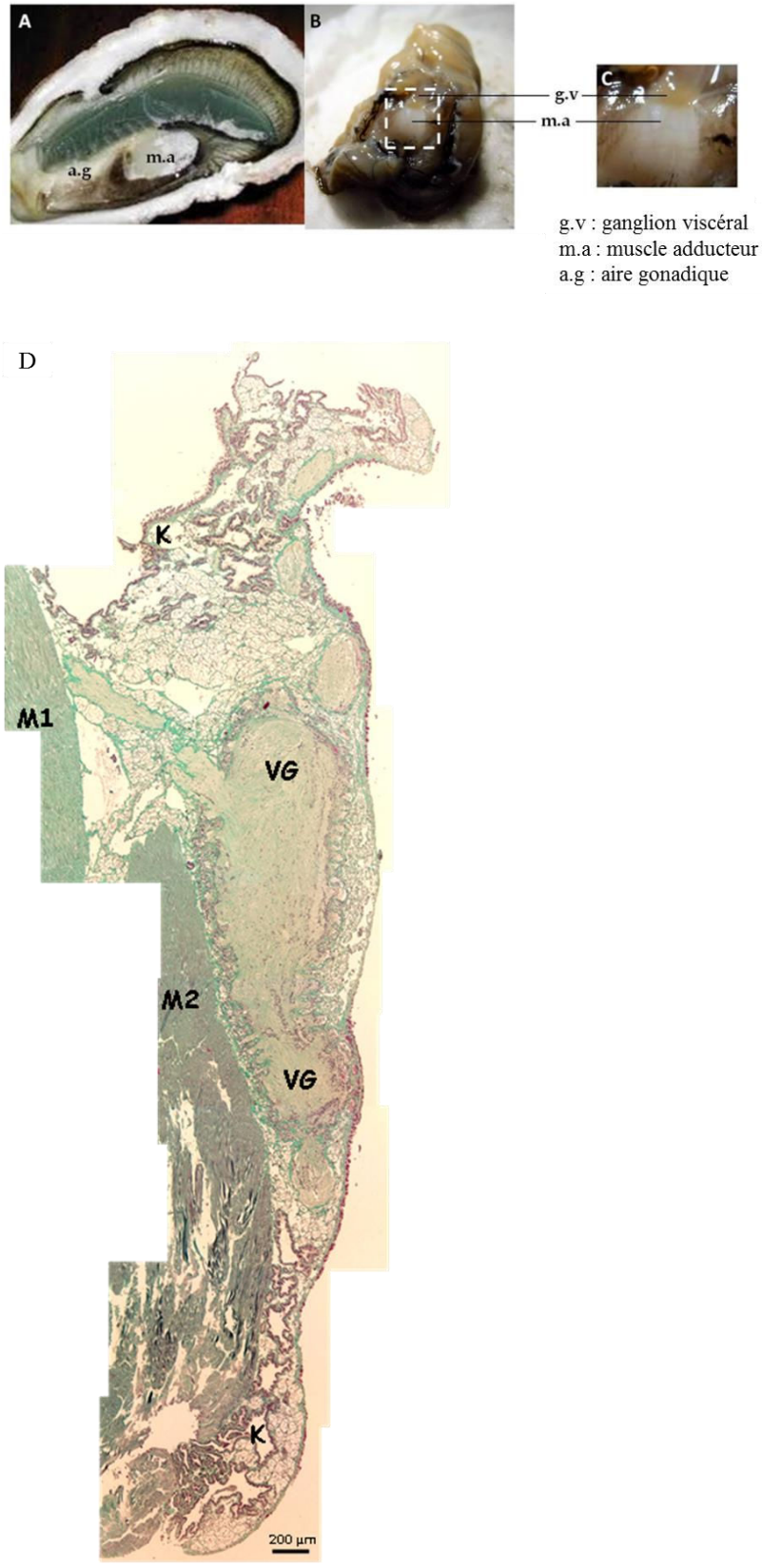


Figure 6 : Localisation des ganglions viscéraux de *Crassostrea gigas*. A : photographie d'huître ouverte ; B et C : vues latérales du muscle adducteur et des ganglions viscéraux (Kellner communication personnelle) ; D : coupe transversale de ganglion viscéral de *Crassostrea gigas* colorée au trichome de Prenant-Gabe (Badariotti et Favrel, communication personnelle). Le ganglion viscéral est localisé à proximité du muscle adducteur et du tissu rénal. VG: ganglion viscéral, M 1/2: muscle adducteur lisse et strié, K : rein.

Les ganglions cérébroïdes

Les ganglions cérébroïdes sont de très petite taille et sont responsables de l'innervation de la partie antérieure du manteau ainsi que de celle des palpes. Les deux ganglions cérébroïdes sont reliés entre eux par la commissure cérébrale qui s'arque au-dessus de la bouche (Figure 8).

Les connectifs cérébroviscéraux

Les deux paires de ganglions viscéraux et cérébroïdes sont reliées entre elles grâce à des connectifs cérébroviscéraux permettant le transfert des informations de manière bidirectionnelle (Figure 8). Tout comme les ganglions viscéraux, ces connectifs sont constitués d'une couche épaisse de grandes cellules nerveuses entourant un neuropile divisé en plusieurs faisceaux. Toutefois, il n'y a pas de gainage bien développé autour des connectifs mais, seulement de petites cellules de tissu conjonctif disposées le long de la périphérie du ganglion.

Les cellules nerveuses

Les cellules nerveuses de l'huître sont en forme de poire depuis lesquelles partent une, deux ou plusieurs excroissances donnant naissance à de fines fibrilles entrant dans le neuropile et se compactant à d'autres fibres nerveuses pour former des faisceaux (Figure 7). Selon le nombre d'excroissances, les cellules sont appelées unipolaires, bipolaires ou bien multipolaires. Il est à noter que les cellules unipolaires sont beaucoup plus abondantes que les cellules bipolaires et multipolaires. La taille de chaque type cellulaire varie. En effet, les cellules multipolaires sont généralement les cellules dont la taille est la plus importante. Chez les bivalves et par conséquent chez l'huître, aucune cellule apolaire, c'est-à-dire sans excroissance, n'a été retrouvée.

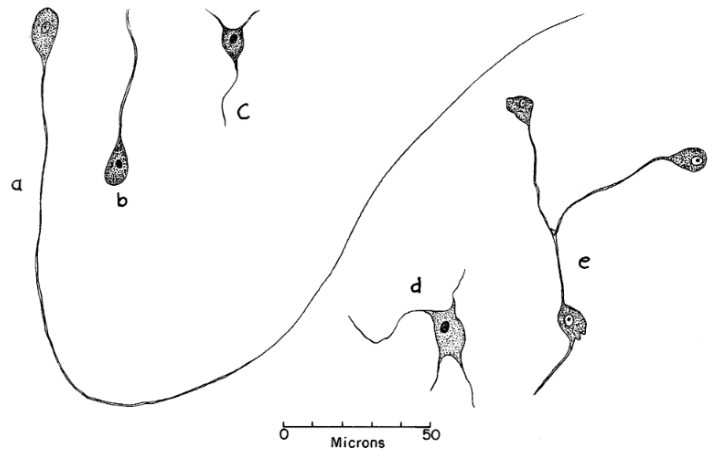


Figure 7 : Représentation des cellules nerveuses du ganglion viscéral d'*Ostrea edulis. a et b : cellules unipolaires, c et d : cellules multipolaires, e : cellules multipolaires. D'après* (Galtsoff 1964).

Les cellules neurosécrétrices

Chez l'huître, comme chez de nombreux bivalves, il existe des cellules neurosécrétrices correspondant à de petits neurones caractéristiques des ganglions cérébraux et viscéraux. La quantité de sécrétion présente dans ces cellules varie selon les saisons et le cycle de gamétogenèse.

Les cellules gliales

L'axone des cellules nerveuses et neurosécrétrices est souvent entouré de cellules gliales jouant un rôle de soutien et de protection. Chez l'huître, les seules cellules gliales observées sont des cellules en forme de fuseau.

Le SNC et les organes communiquent à travers deux types de régulation. La première implique un contrôle nerveux se traduisant par la libération de neurotransmetteurs au contact des cellules cibles ; tandis que la seconde implique le système circulatoire permettant de transporter les médiateurs sécrétés par les neurones, les neurohormones, au niveau des aires neurohémales jusqu'aux cellules cibles distantes.

1.1.3 Les neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs sont des médiateurs chimiques libérés par les corpuscules nerveux terminaux des neurones présynaptiques dans une fente synaptique. Ces médiateurs se lient à des récepteurs postsynaptiques et provoquent une brève modification du potentiel de membrane de la cellule cible. Ces récepteurs sont de deux sortes : des récepteurs ionotropes et des récepteurs métabotropes. Les récepteurs ionotropes appelés aussi récepteurs canaux, sont le plus souvent constitués de 4 à 5 sous-unités protéiques distinctes qui traversent la membrane plasmique afin de former un canal ionique. En l'absence de neurotransmetteur, ce canal est fermé. Toutefois, la fixation d'un neurotransmetteur au récepteur canal va permettre son ouverture et entraîner une réponse rapide et brève. Les médiateurs chimiques se liant à des récepteurs de type ionotrope sont des acides aminés et des amines tels que l'acétylcholine (ACh), le GABA (acide γ-aminobutyrique) et le glutamate et également certains peptides comme par exemple les FMRFamide. Les neurotransmetteurs de type acides aminés et amines peuvent également se lier à des récepteurs métabotropes, c'est-à-dire des RCPGs. À l'inverse des récepteurs ionotropes, l'activation des récepteurs métabotropes induit des réponses postsynaptiques plus lentes, plus durables et plus variées comme c'est le cas des récepteurs de la dopamine. Ces récepteurs de la dopamine sont décrits dans le chapitre III de ce manuscrit.

Le système nerveux périphérique, en particulier par l'intermédiaire des nerfs, assure la circulation des informations nerveuses à travers l'organisme.

1.1.4 Le système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique s'étend dans tout l'organisme de l'huître par le biais des nerfs du muscle adducteur, des nerfs branchiaux, des nerfs palléaux antérieurs, latéraux et postérieurs, du nerf circumpalléal et des nerfs labiaux (Figure 8). Ces nerfs sont fins, non pigmentés et intégrés dans le tissu conjonctif.

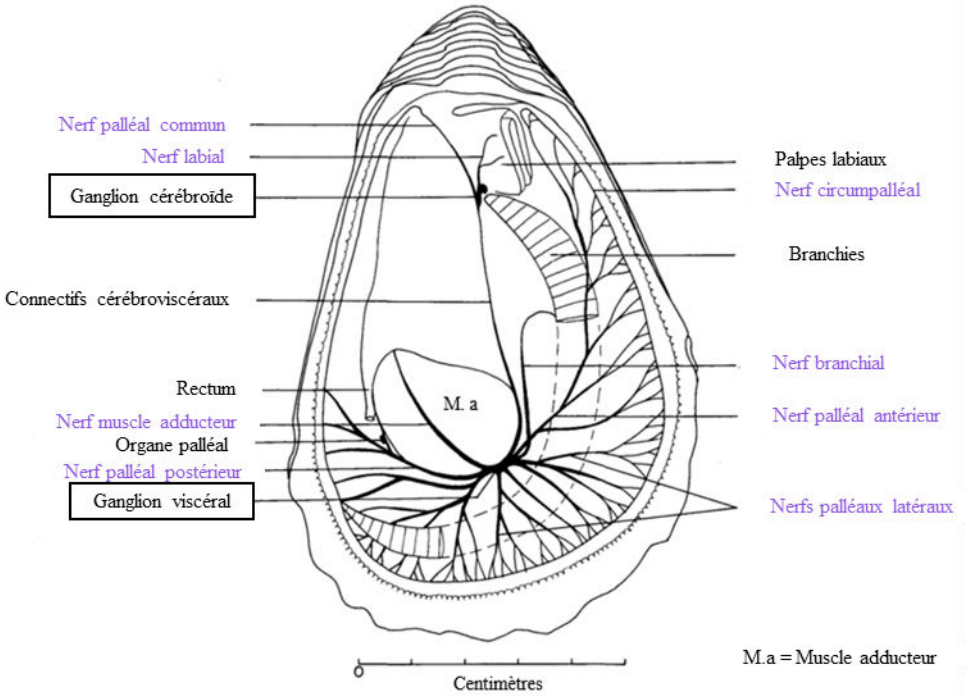


Figure 8 : Schéma du système nerveux de *Crassostrea virginica*. La commissure cérébrale n'est pas visible. Les nerfs sont écrits en violet et les ganglions encadrés en noir. Modifiée depuis (Galtsoff 1964).

Les nerfs liés aux ganglions viscéraux

Les ganglions viscéraux donnent naissance à de nombreux nerfs (Figure 9). Parmi eux, se trouvent les nerfs palléaux antérieurs qui passent dans le rein, traversent le péricarde et innervent la partie centrale du manteau. Les nerfs latéraux palléaux quant à eux, sont composés de plusieurs branches dont celle intérieure est divisée en de nombreux petits nerfs établissant le contact avec le nerf circumpalléal. Le nerf palléal postérieur quant à lui, traverse le muscle adducteur, l'organe palléal, le rectum et se divise en plusieurs terminaisons nerveuses au niveau du manteau. De plus, deux nerfs branchiaux de forme convexe innervent les branchies de part et d'autre du corps de l'huître. Enfin, des nerfs innervent le muscle adducteur.

Les nerfs liés aux ganglions cérébroïdes

Les ganglions cérébroïdes donnent naissance un nombre limité de nerfs (Figure 9). Parmi ces nerfs, le plus important est le nerf circumpalléal dont le tronc nerveux est large et s'étend de manière parallèle au bord du manteau (Figure 8). Il permet d'innerver les tentacules et possède également des connexions avec le nerf palléal commun et les nerfs radiaux présents au sein du manteau. Ce nerf circumpalléal permet également d'établir des connexions avec les ganglions viscéraux. Il existe également des nerfs labiaux qui permettent d'innerver les quatre palpes labiaux.

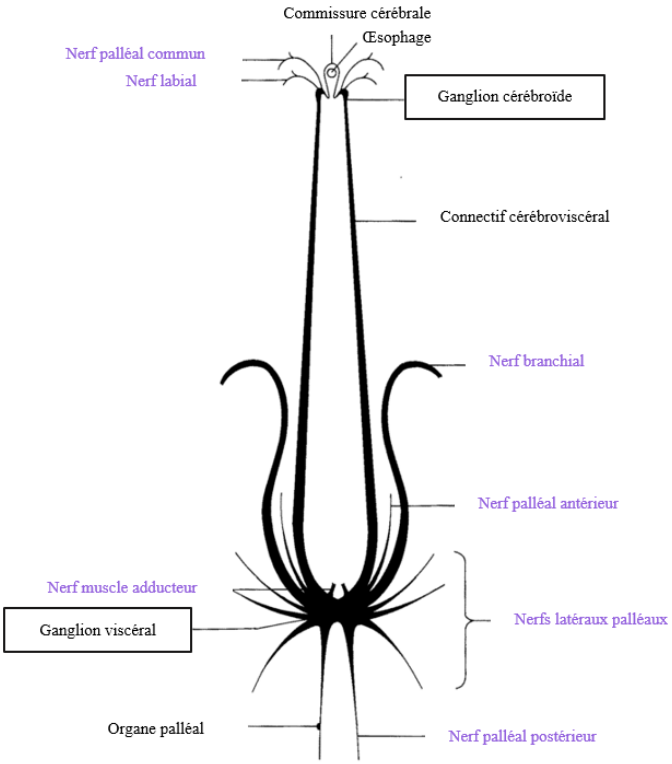


Figure 9 : Schéma simplifié du système nerveux de l'huître *Crassostrea virginica*. Modifiée d'après (Galtsoff 1964).

Le SNC de l'huître envoie également des informations *via* le système circulatoire vers des cellules cibles distantes. Ce transfert d'informations se fait grâce à la libération de neurohormones au niveau des aires neurohémales. Parmi les neurohormones, se classent la majorité des neuropeptides.

2 Les neuropeptides

Les neuropeptides représentent une classe diversifiée de molécules de signalisation neuronale régulant les processus physiologiques et comportementaux des animaux. Ils sont apparus très tôt au cours de l'évolution animale puisque présents chez les placozoaires qui sont dépourvus

de cellules neuronales (Jekely 2013; Smith et al. 2014; Varoqueaux and Fasshauer 2017). Les neuropeptides sont définis comme des chaînes d'acides aminés de longueur limitée, libérées par les neurones et exerçant un effet sur les cellules cibles. Ils sont formés à partir de précurseurs de protéines appelés prépropeptides comprenant entre 100 à 250 résidus d'acides aminés. Ces prépropeptides sont le plus souvent biologiquement inactifs et sont synthétisés par les ribosomes situés au niveau du réticulum endoplasmique. Une série d'étapes protéolytiques spécifiques à la séquence permet ensuite la libération de peptides bioactifs plus petits. La fin de l'action physiologique des neuropeptides n'est pas due à des mécanismes de réabsorption synaptique comme cela est souvent le cas pour les neurotransmetteurs classiques mais, due à une dégradation. Cette dégradation est lente et les neuropeptides sont persistants dans le milieu extracellulaire, ce qui permet une action pouvant aller d'une période de quelques secondes à quelques minutes. Ce processus est médié par des protéases extracellulaires qui sont ancrées au niveau des membranes cellulaires.

2.1 Synthèse des neuropeptides

Les prépropeptides présentent en position N-terminale un peptide signal constitué de vingt à trente acides aminés majoritairement hydrophobes impliqués dans l'adressage spécifique du précurseur en cours de synthèse à la membrane du réticulum endoplasmique granulaire (REG). Les interactions moléculaires qui s'engagent entre le peptide signal, la particule de reconnaissance du signal (SRP) et le récepteur de SRP, conduisent à l'ancrage du ribosome traduisant le précurseur au complexe de translocation. Cette étape permet au prépropeptide en cours d'élongation d'être transféré dans la lumière du REG. Pendant ce transfert, une "signal peptidase" clive le peptide signal (Figure 10). Au sein du REG, le prépropeptide peut subir un certain nombre de modifications co-traductionnelles comme la N-glycosylation, ou post-traductionnelles, telles que l'adoption d'une structure tri dimensionnelle, la formation de ponts disulfures, l'hydroxylation éventuelle de certains résidus et le contrôle qualité. Dans le REG, le futur neuropeptide n'est encore qu'au stade de propeptide. Lors de son transfert dans l'appareil de Golgi de la face *cis* à la face *trans*, le propeptide va subir des glycosylations complémentaires ainsi que des clivages protéolytiques séquentiels. En effet, la furine, qui est une protéase, clive le propeptide au niveau des sites de type R/KXXR/K (Hosaka et al. 1991). Ce clivage permet la séparation du neuropeptide en deux domaines distincts dont les peptides pourront éventuellement être empaquetés différentiellement (Wan Li et al. 1994) et donc sécrétés sous l'influence de différents stimuli voire au niveau de terminaisons axonales distinctes. D'autres protéases, les prohormones convertases entrent en jeu afin de cliver les propeptides au niveau

de résidus dibasiques de type KR, RR, RK, KK (Smeekens and Steiner 1990) ou au niveau de résidus monobasiques (R ou K), ce qui conduit à la production de peptides biologiquement actifs et à des peptides intercalaires, les peptides cryptiques, qui seront le plus souvent dégradés. Toutefois les peptides cryptiques non dégradés peuvent être biologiquement actifs et être impliqués dans des fonctions spécifiques différentes de celles jouées par les autres peptides matures issus du même précurseur (Autelitano et al. 2006).

De plus, comme c'est le cas avec l'insuline chez certains poissons (Conlon et al. 1988), des exopeptidases peuvent agir sur les extrémités N- et C-terminales des peptides. Une modification post-traductionnelle importante peut avoir lieu au sein du compartiment golgien, il s'agit de l'amidation C-terminale des peptides. L'amidation implique deux enzymes la "Peptidyl glycine hydroxylase" et la "Peptidyl hydroxyglycine N-C lyase". Cette étape conduit à la transformation d'une glycine C-terminale en carboxyamide, ce qui constitue une protection contre les carboxypeptidases et contribue à l'augmentation de la durée de vie du peptide après sa sécrétion. Les peptides matures sont ensuite acheminés par les vésicules de sécrétion au niveau des terminaisons des axones. Au sein de ces vésicules, certains peptides dont l'acide aminé N-terminal est une glutamine sont susceptibles de subir une pyroglutamination menant à la formation d'un pyroglutamate N-terminal servant de protection contre l'activité des aminopeptidases. Les peptides matures générés à partir d'un précurseur sont de séquence et de longueurs variables. Les précurseurs dits multipeptidiques peuvent renfermer de nombreuses copies de séquences de peptides proches ou identiques alors que, d'autres précurseurs, ne renferment qu'un voire deux peptides biologiquement actifs. Contrairement à d'autres familles de protéines, la diversité des neuropeptides produits au sein d'un organisme est telle, qu'elle est difficilement appréciable par la simple analyse bioinformatique des données génomiques et transcriptomiques. En effet, la recherche par Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de séquences orthologues dans les bases de données est complexe car, dans la majorité des cas, seul un motif bien limité du peptide bioactif est responsable de la fonction et est conservé au cours de l'évolution. Ce motif est très court (moins de 10 acides aminés), ce qui rend les analyses peu efficaces. Afin de pallier ce problème, il est nécessaire de coupler une approche bioinformatique à une analyse peptidique d'extraits de systèmes nerveux par spectrométrie de masse. Dans le cas de l'huître, cette recherche a été effectuée à partir d'extraits de ganglions viscéraux et a donné lieu à la publication d'un répertoire relativement exhaustif des neuropeptides exprimés chez l'huître, le neuropeptidome (Stewart et al. 2014). Ce répertoire est composé de précurseurs codant pour plus de 300 peptides bioactifs. Ces peptides prédits ont

été annotés sur la base de leur homologie de séquence avec les peptides d'autres espèces. Toutefois, comme évoqué précédemment, les annotations restent avant tout informatives au vu de la faible portion d'acides aminés conservés dans les séquences au cours de l'évolution.

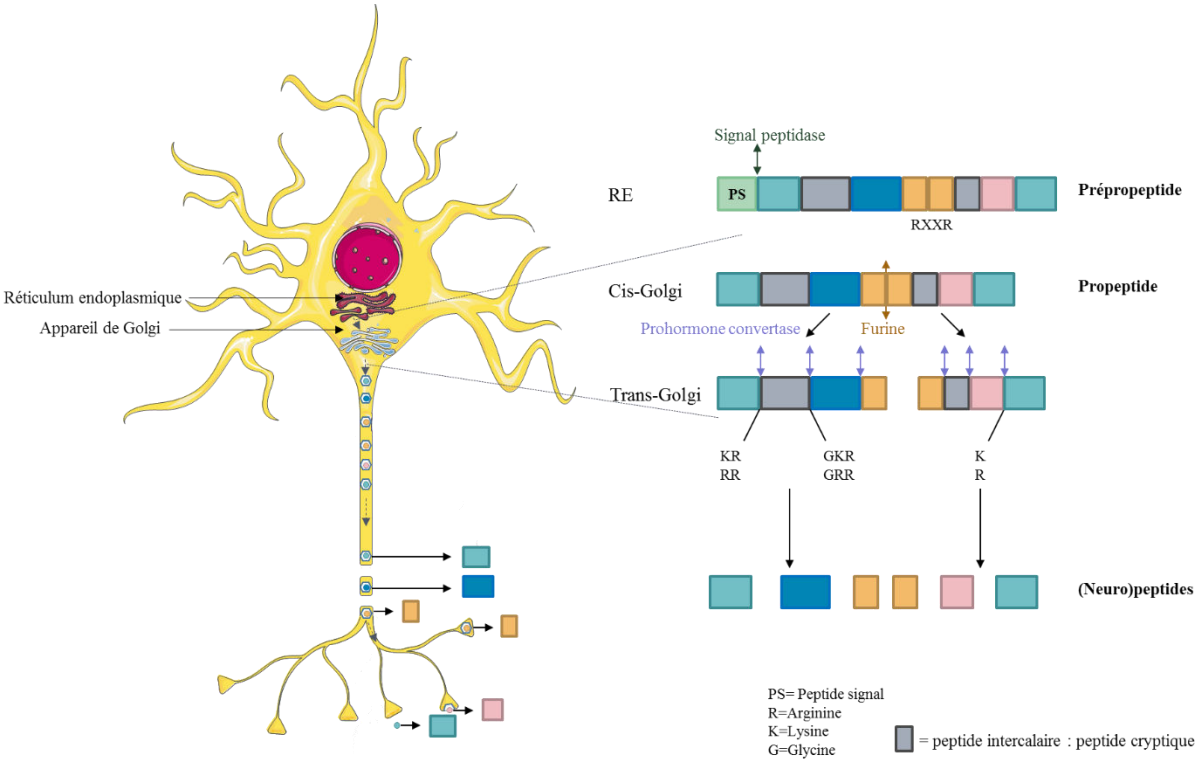


Figure 10 : Synthèse et maturation des neuropeptides. À gauche, transport intracellulaire des protéines du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi dans un neurone. Les neuropeptides sont transportés dans des vésicules recouvertes de clathrine vers l'axone puis libérés par exocytose. A droite, représentation d'un prépropeptide subissant plusieurs clivages afin de donner des neuropeptides. Le résidu glycine (G) en amont de ces sites indique une amidation du neuropeptide mature.

2.2 Évolution des neuropeptides

La démonstration de l'évolution ancestrale des neuropeptides a émergé avec l'identification moléculaire des neuropeptides de Protostomiens. En effet, chez les insectes, les premières recherches se sont intéressées à l'« Adipokinetic Hormone » ou AKH (Stone and Mordue 1976) et à la proctoline (Brown 1975). Ces neuropeptides sont impliqués respectivement dans la mobilisation de l'énergie pendant les activités consommatrices d'énergie telles que le vol ou la locomotion et, dans la contraction intestinale. Chez les mollusques, les premières études ont porté sur le peptide cardioexcitateur FMRFamide découvert au sein des ganglions de la palourde *Macrocallista nimbosa* (Price and Greenberg 1977). Des études ont montré qu'un antiserum dirigé contre le FMRFamide de mollusques a permis de marquer les neurones et les fibres nerveuses du SNC de plusieurs espèces, à savoir, de la limnée *Lymnaea stagnalis*, des insectes *Leptinotarsa decemlineata* et *Periplaneta americana*, du poisson *Poecilia latipinna* et d'un mammifère modèle, la souris (Boer et al. 1980). Ces observations mettent en évidence le

fait qu'un même antisérum a la capacité d'entraîner une immunoréaction chez plusieurs espèces d'invertébrés et de vertébrés, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle les peptides ont une large distribution au sein de la classification des êtres vivants. En effet, cette hypothèse découle d'études (Donk et al. 1978; Lips et al. 1978) montrant que le rat et l'homme synthétisent des prohormones de séquence identique, notamment en ce qui concerne la calcitonine (CT). De plus, des recherches ont entre autres montré qu'à l'inverse, des anticorps dirigés contre l'insuline de bovin avaient la capacité de provoquer l'immunoréaction des cellules médianes neurosécrétrices du cerveau de l'insecte *Calliphora vomitoria*. L'hypothèse d'une conservation des peptides au sein de l'évolution a par la suite été confirmée par les premiers séquençages de neuropeptides d'invertébrés. En effet, par exemple, deux neuropeptides apparentés à la gastrine/cholécystokinine (CCK) des vertébrés, la leucosulfakinine I (Nachman et al. 1986b) et la leucosulfakinine II (Nachman et al. 1986a), ont été identifiés à partir d'extraits de tête de l'insecte *Leucophaea maderae*. Ces neuropeptides partagent avec la gastrine et la CCK des vertébrés des homologies de séquence ainsi que la fonction d'activité myotrope intestinale. Les peptides de type vasopressine/ocytocine ont également fait l'objet de recherches chez les insectes et les mollusques puisque, des peptides de cette famille ont été découverts respectivement dans les ganglions suboesophagiens et thoraciques de *Locusta migratoria* (Proux et al. 1987) et, dans le venin d'escargots marins du genre *Conus* (Cruz et al. 1987). Plus récemment, le séquençage des génomes du nématode *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998), de l'arthropode *Drosophila melanogaster* (Adams et al. 2000) et de l'homme (Lander et al. 2001) a permis d'améliorer la compréhension de l'évolution des systèmes neuropeptidergiques entre les invertébrés et les vertébrés et a rendu possible l'étude des premiers couples neuropeptides/récepteurs. En effet, du fait de la faible homologie de séquences existante entre les ligands des différents taxons, il est difficile de retracer l'histoire évolutive des ligands. Aussi, grâce à des tests d'activation ligand(s)/récepteur(s), il a pu être montré que chez *Drosophila melanogaster*, un récepteur orthologue du récepteur à la GnRH de chordés lie l'AKH qui ne présente que de subtiles homologies de séquence avec le GnRH (Staubli et al. 2002; Park et al. 2002). Ceci montre qu'à travers l'étude des récepteurs, il est possible de retracer l'histoire co-évolutive des ligands et de leurs récepteurs associés. D'autres exemples illustrent bien l'intérêt d'étudier les récepteurs afin de mieux comprendre l'évolution des systèmes neuropeptidergiques.

En effet, la séquence du récepteur à la drosulfakinine (DSK-R1), homologue fonctionnel de la leucosulfakinine chez *Drosophila melanogaster*, a pu être identifiée au sein du génome sur la

base d'homologies de séquences avec les récepteurs à la CCK, CCKR1 et CCKR2 de vertébrés. Ce récepteur a ensuite été cloné et des tests fonctionnels ont permis de caractériser le couple drosulfakinine 1/DSK-R1 (Kubiak et al. 2002). De la même manière, deux récepteurs potentiels à la gastrine/CCK/sulfakinine (SK) ont pu être identifiés au sein du génome de *Caenorhabditis elegans* sur la base d'homologie de séquences avec DSK-R1 et avec des récepteurs à la CCK de mammifères. Grâce à la méthode d'endocrinologie inverse (qui fait l'objet d'une partie détaillée au sein de cette thèse) ces deux récepteurs, nommés CKR-2a et CKR-2b, ont permis d'identifier parmi une banque de peptides de *Caenorhabditis elegans* propre au laboratoire d'étude, deux peptides CKI et CKII, comme étant des homologues des CCKs de mammifères et des SKs d'insectes (Janssen et al. 2008).

Ainsi, les différentes méthodes d'endocrinologie inverse ont permis d'accroître les connaissances sur les voies de signalisation et ce grâce à l'étude de couples neuropeptides/récepteurs. Ces recherches nécessitent de disposer de banques de données permettant d'identifier des récepteurs mais aussi des neuropeptides potentiels. Ainsi, en ce qui concerne ce travail de thèse sur les Lophotrochozoaires, les premiers neuropeptidomes, correspondant aux répertoires complets des neuropeptides, ont été prédits chez le mollusque *Lottia gigantea* (Veenstra 2010) et chez les annélides *Helobdella robusta* et *Capitella teleta* (Veenstra 2011). Des études plus récentes couplant des analyses des données transcriptomiques et de spectrométrie de masse ont permis d'identifier l'ensemble des 98 neuropeptides de l'annélide *Platynereis dumerilii* (Conzelmann et al. 2013) ainsi que les neuropeptides des mollusques *Sepia officinalis* (Zatylny-Gaudin et al. 2016), *Pinctata fucata* et *Crassostrea gigas* (Tableau 1) (Stewart et al. 2014) et *Patinopecten yessoensis* (Zhang et al. 2018).

Il est à noter qu'une base de données publique « The Database for Insect Neuropeptide Research » (DINeR) regroupant les séquences de 50 familles de neuropeptides de plus de 400 espèces d'insectes a été très récemment mise en ligne (Yeoh et al. 2017). Elle permet de faciliter les recherches en ciblant les neuropeptides par nom, espèce et fonction.

Depuis l'émergence de l'ensemble de ces bases de données, de nombreuses études ont permis de caractériser un nombre considérable de couples neuropeptides/récepteurs chez les Protostomiens et Deutérostomiens. De vastes analyses phylogénétiques (Park et al. 2002; Janssen et al. 2010; Jekely 2013; Mirabeau and Joly 2013; Elphick et al. 2018) ont montré que les neuropeptides et leurs récepteurs associés ont coévolué depuis l'ancêtre commun des Bilatériens. Ces récepteurs sont des RCPGs.

Tableau 1 : Neuropeptidome de l'huître *Crassostrea gigas* modifié d'après (Stewart et al. 2014).

Nom du gène et séquences peptidiques *Ac-Acétylation p-Pyroglumatation*	Nombre de peptides codés par le précurseur	Taille peptide signal (en acides aminés)	Correspondance chez les vertébrés
Cg-AKH			
Cg-AKH pQVSFSTNWGSamide (1)	1	21	GnRH
Cg-APGWa	7	20	
Cg-Achatin	2	23	
Cg-Achatin-like peptide	2	19	
Cg-Allatotropin	1	23	
Cg-Allatostatin B	10	23	
Cg-Allatostatin C	1	27	
Cg-Buccalin	13	25	
Cg-Bursicon α 1	1	18	
Cg-Bursicon β	1	19	
Cg-CT/CGRP/DH31 1			
Cragi-CT1A TFTQREACALSLNVDICTEKYIEETADHQSKLQNLIEGNPamide (2)	1	23	CT/CGRP
Cragi-CT1B SCTLNAYHCQTSEYAGLTDLYNYLNSNASPamide (2)	1		
Cg-CT/CGRP/DH31 2			
Cragi-CT2A ETQERQIKLCRGMGPNNHPCGLTSFDVRNV (2)	1	20	
Cragi-CT2B TCAVELGGACRTEWASAIADQYYYLMGPHGPamide (2)	1		
Cg-CCAP	1	22	
Cg-CCK/SK			
Cragi-CCK1 p-QGAWDYDYGLGGGRFamide (3)	1	25	Gastrine/CCK
Cragi-CCK2 FDYNFGGGRWamide (3)	1		
Cg-Cerebrin	1	22	
Cg-Conopressin	2	30	Vasopressine/ocytocine
Cg-Elevenin	2	26	
Cg-ELH	6	21	
Cg-FFamide	4	23	
Cg-FCAP	16	21	
Cg-FMRFamide	16	24	RFamide
Cg-GGN	2	27	
Cg-GnRH			
Cg-GnRH-a QNYHFSNGWQPamide (4)	1	23	GnRH
Cg-GnRH-G QNYHFSNGWQPG (4)	1		
Cg-GPB5	2	19	
Cg-GPA2	2		GPA2
Cg-LASGLVa	11	26	
Cg-LFRYa	2	25	
Cg-LFRFa			
Cg-LFRFa1 GSLFRFamide (5)	2	23	RFamide
Cg-LFRFa2 GALFRFamide (5)	1		
Cg-LFRFa3 SSLFRFamide (5)	1		
SVDNEKPHTPFRFamide	1		
SVDNEKPHTPFRFGREEEDEI	1		
Cg-LRFNVa	11	20	
Cg-Luqin or cardioexcitory peptide	2	29	
Cg-Mytilus Inhibtory Peptides	8	23	
Cg-Myomodulin	10	19	
Cg-NKY	1	27	
Cg-NPF	2	22	
Cg-NPYamide 1	1	24	
Cg-NPYamide 2	1	22	
Cg-Opioid	6	15	Opioïde
Cg-Pedal Peptide	18	27	
Cg-Pedal peptide 2	26	22	
Cg-Pedal peptide 3	11	33	
Cg-PFG$_{x}$amide	11	20	
Cg-PKYMDT	3	23	
Cg-RxIamide	7	23	
Cg-sCAP/ Pyrokinin	4	21	
Cg-Tachykinin			
Cragi-TK1 FGFAPMRamide (6)	1	22	Tachykinine
Cragi-TK2 ARFFGLRamide (6)	1		
Cragi-TK3 FRFTALRamide (6)	1		
FNNDVEFPLVRNN	1		
Cg-Wx$_{3}$Yamide	4	24	

Les peptides en jaune ont été identifiés dans les banques de données et ajoutés aux peptides déjà présents dans la publication. Les peptides en bleu ont été identifiés en spectrométrie de masse et ceux encadrés d'un trait épais font l'objet de cette thèse (2 et 3) et/ou ont fait l'objet de publications : (1) (Li et al. 2016; Dubos et al. 2017), (3) (Schwartz et al. 2018), (4) (Bigot et al. 2012), (5) (Bigot et al. 2014) et (6) (Dubos et al. 2018).

3 Les récepteurs couplés aux Protéines G ou RCPGs

L'évolution des organismes pluricellulaires est étroitement liée à la capacité qu'ont leurs cellules de communiquer entre elles et avec le milieu environnant. Cette communication passe par différents types de molécules (hormones, neurotransmetteurs, facteurs de croissance, cytokines) provenant du milieu intérieur mais également par des messages venant de l'environnement (phéromones, molécules du goût, lumière, sons). L'intégration de ces nombreux stimuli permet aux organismes de coordonner l'ensemble de ses activités grâce à des récepteurs. Ces récepteurs sont pour la plupart membranaires (à l'exception des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes) et appartiennent à un petit nombre de familles de protéines : les récepteurs canaux, les récepteurs à activité guanylate cyclase, les récepteurs à activité tyrosine kinase et sérine/thréonine kinase, les récepteurs des cytokines activant des tyrosines kinases (Jak et Fyn kinases) et les RCPGs. La superfamille des RCPGs constitue le regroupement de récepteurs le plus nombreux comprenant plusieurs centaines de membres répartis dans des classes/familles différentes. Ces récepteurs forment la superfamille qui a su le mieux s'adapter au cours de l'évolution à la reconnaissance de molécules de communication de structures très variées (ions, photons, molécules aromatiques diverses comme celles constituant les odeurs, acides aminés et dérivés, nucléotides, nucléosides, lipides, peptides, neuropeptides, protéines...) (Bockaert 1995). Du fait de l'objectif de cette thèse, un intérêt tout particulier sera porté à l'étude de ces récepteurs.

En raison de leur structure, les RCPGs sont également appelés récepteurs à 7 domaines transmembranaires, récepteurs heptahélicaux ou encore récepteurs « Serpentine-like ». Ils sont capables de lier une grande diversité de ligands endogènes et exogènes permettant la régulation et la coordination de la majorité des grandes fonctions physiologiques telles que la reproduction, l'immunité, le développement, la croissance, la nutrition et le comportement. Il est estimé que 80 % des hormones et des neurotransmetteurs connus agissent *via* des RCPGs (Birnbaumer et al. 1990). Après fixation du ligand sur le récepteur, celui-ci change de conformation, rendant possible son couplage avec un ou plusieurs membres de la famille des protéines G hétérotrimériques. Ces protéines alors activées, transmettent l'information reçue par les récepteurs à des effecteurs intracellulaires comme des enzymes, des kinases et des canaux ioniques. La modulation de l'activité de ces effecteurs influe alors sur le taux de seconds messagers produits ou libérés, ce qui permet une réponse cellulaire aux différents stimuli.

3.1 Structure des RCPGs

L'ensemble des récepteurs de la superfamille des RCPGs présente une architecture moléculaire commune comprenant une chaîne polypeptidique simple mais de longueur variable, qui traverse la bicouche lipidique sept fois, formant les sept domaines transmembranaires (Figure 11). Chacun de ces sept domaines hydrophobes (I à VII) possède une structure en hélice α et est relié au domaine transmembranaire suivant soit par une boucle extracellulaire (e1, e2, e3), soit par une boucle intracellulaire (i1, i2, i3). Les hélices α sont étroitement accolées et définissent une fente centrale diédrique étroite et profonde de 20Å. En amont du premier domaine transmembranaire, se situe un domaine extracellulaire du côté N-terminal qui est souvent glycosylé. À l'opposé, un domaine intracytoplasmique présent à la partie C-terminale fait suite au septième domaine transmembranaire. Cette partie contient plusieurs sites putatifs de phosphorylation impliqués dans les phénomènes de désensibilisation et d'internalisation du récepteur.

De plus, ces récepteurs peuvent être sujets à d'autres modifications post-traductionnelles telles que, du côté extracellulaire, la formation de ponts disulfures entre les chaînes latérales de deux résidus cystéine des boucles e1 et e2 et du côté intracellulaire à des acylations par des composés lipidiques membranaires formant ainsi une pseudo-quatrième boucle i4.

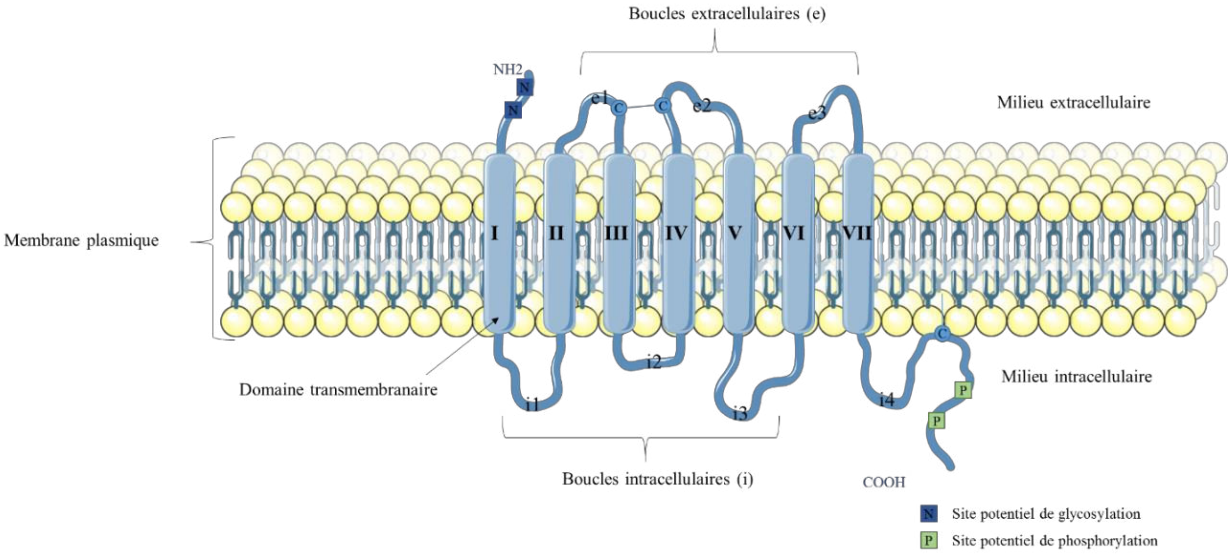
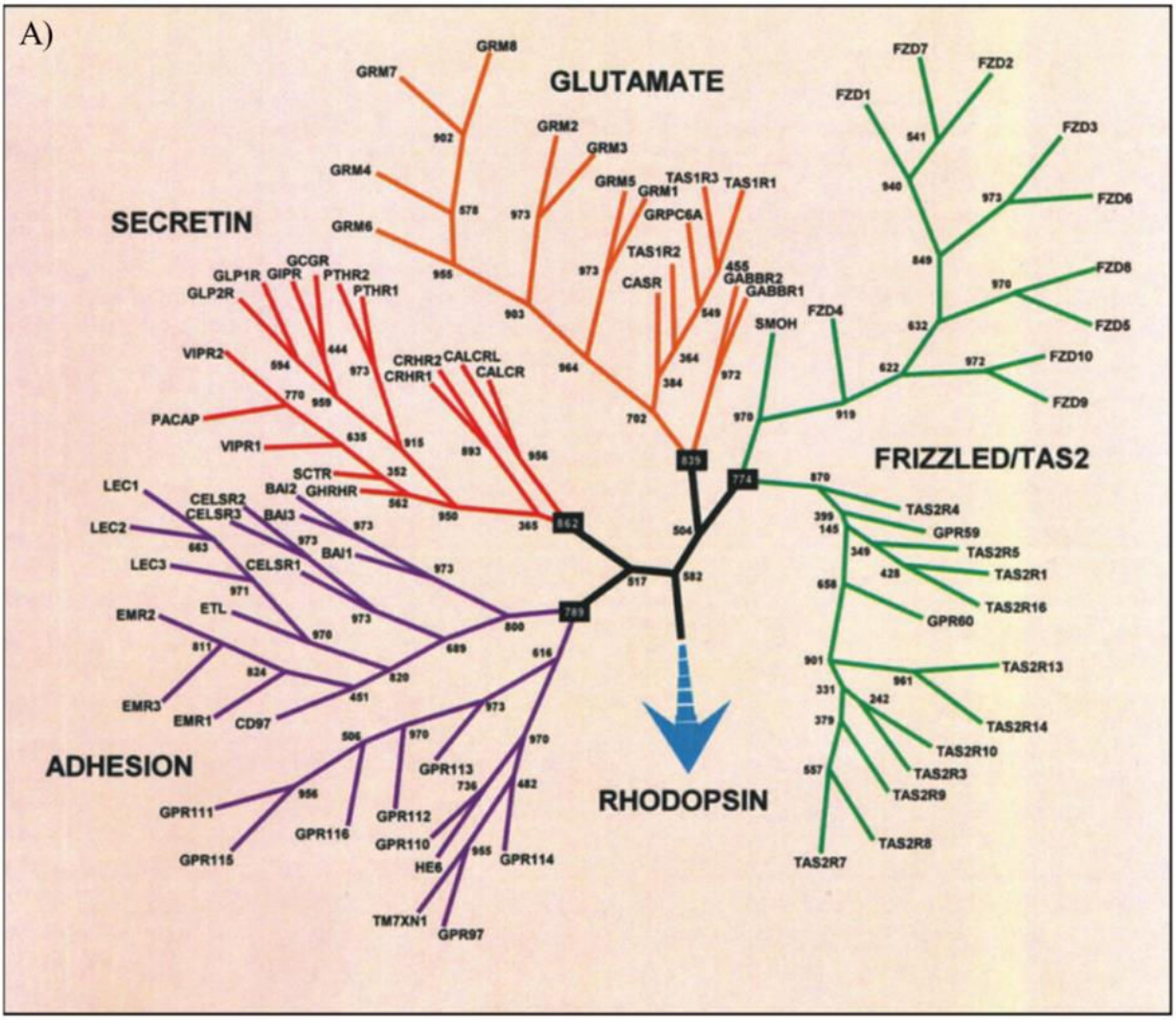


Figure 11 : Représentation bidimensionnelle schématique d'un RCPG. C : cystéine.

Malgré une architecture commune, les récepteurs de familles différentes possèdent des structures diverses. Toutefois, les membres d'une même famille présentent des homologies de séquences significatives.

3.2 Classes et familles de récepteurs

Le nombre et la diversité importante des RCPGs nécessitent une classification. Bien que difficile, plusieurs nomenclatures se basant sur différents critères ont été proposées. La classification établie par Attwood et Frindlay (1994) et Kolakowski (1994) se base sur l'analyse des séquences primaires de nombreux RCPGs de vertébrés, d'invertébrés, de champignons et des archaebactéries ainsi que sur la nature des divers ligands. Elle se compose de 6 classes (de A à F) dont trois sont majoritaires (A B et C) et trois sont minoritaires (D, E et F). La classification émise par Fredriksson (Fredriksson 2003) se base sur l'analyse phylogénétique de plus de 800 séquences de RCPGs humains et répartit les récepteurs en 5 familles : **G**lutamate (correspondant à la classe C de la classification A-F), **R**hodopsine (classe A), **A**dhésion (classe B), **F**rizzled/Taste2 (classe F) et **S**écrétine (classe B) formant ainsi la classification "**GRAFS**" (Figure 12). La principale différence entre le système de classification A-F et le système GRAFS est la division de la classe B en deux familles : la famille Sécrétine et la famille Adhésion. Cette séparation a été établie d'après la constatation que ces deux familles possèdent des histoires évolutives distinctes (Hu et al. 2017). De plus, la classification GRAFS se basant sur des critères phylogénétiques stricts, quelques récepteurs humains n'ont pu être classés dans ces sous-groupes et forment ensemble le groupe "Autres récepteurs à 7TM" (« Other 7TM receptors ») (Schiöth and Fredriksson 2005). Toutefois, il serait possible de placer ces "autres" récepteurs dans l'une des principales familles en se basant seulement sur une similarité de séquences.


A)
GLUTAMATE
SECRETIN
FRIZZLED/TAS2
ADHESION
RHODOPSIN
GRM8
GRM7
GRM2
GRM3
GRM4
GRM6
GRM5
GRM1
TAS1R3
TAS1R1
GRPC6A
TAS1R2
CASR
GABBR2
GABBR1
GLP1R
GIPR
GCGR
PTHR2
PTHR1
GLP2R
VIPR2
PACAP
VIPR1
CRHR2
CRHR1
CALCRL
CALCR
SCTR
GHRHR
BAI2
BAI3
BAI1
LEC1
LEC2
LEC3
CELSR2
CELSR3
CELSR1
EMR2
ETL
EMR3
EMR1
CD97
GPR111
GPR115
GPR116
GPR112
GPR110
GPR113
HE6
TM7XN1
GPR97
GPR114
FZD7
FZD2
FZD1
FZD3
FZD6
FZD8
FZD5
FZD10
FZD9
FZD4
SMOH
TAS2R4
GPR59
TAS2R5
TAS2R1
TAS2R16
GPR60
TAS2R13
TAS2R14
TAS2R10
TAS2R3
TAS2R9
TAS2R8
TAS2R7

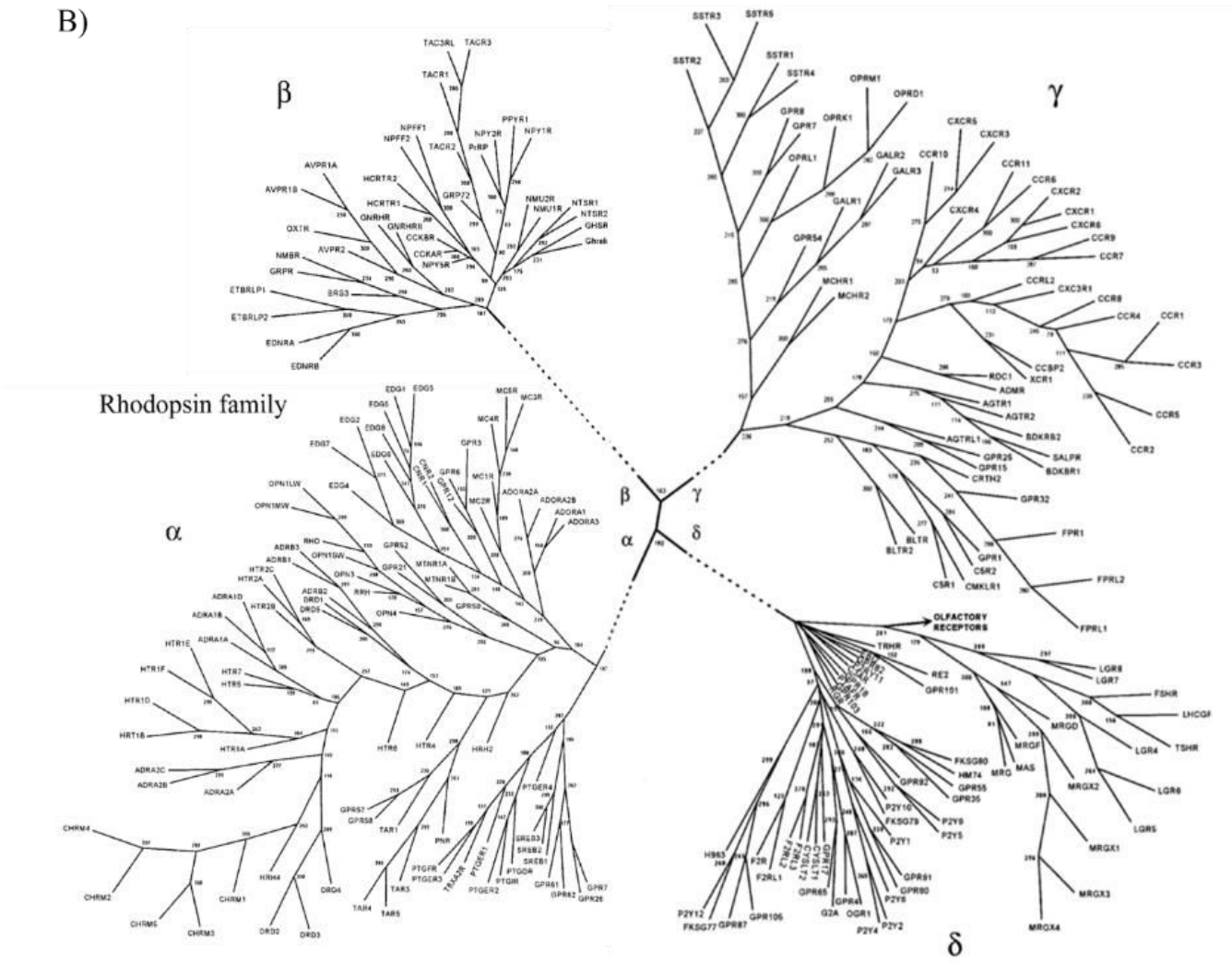


Figure 12 : Classification GRAFs. Relations phylogénétiques entre les RCPGs dans le génome humain (A) et au sein de la famille Rhodopsine humaine (B). L'arbre est calculé selon la méthode de parcimonie maximale sur 1 000 (A) et 300 (B) réplicats. D'après (Fredriksson 2003).

- **La classe A ou famille des récepteurs de type Rhodospine**

Cette classe est la plus vaste et la plus étudiée. Elle représente environ 80 % des RCPGs humains soit près de 700 récepteurs et comprend les récepteurs liant des amines biogènes, des peptides, des protéines, des rhodopsines, des molécules olfactives, des acides gras et des nucléotides. La longueur de ces récepteurs varie entre 290 et 951 acides aminés et la plupart sont composés de 310 à 470 acides aminés (Mirzadegan et al. 2003). Les membres de cette classe ou famille partagent plusieurs caractéristiques attestant de leur origine commune. Parmi ces caractéristiques, la présence d'un pont disulfure formé par des résidus cystéines entre les boucles e2 et e3, la présence du motif NSxxNPxxY dans le domaine transmembranaire 7 (TM7) et l'existence du motif DRY ou D(E)-R-Y(F) à la frontière entre le TM3 et la boucle i2. Cependant, quelques récepteurs de cette classe ne présentent pas ces motifs communs mais

partagent avec les autres membres de la famille "Rhodospin-like" des régions conservées. Il a été montré que les motifs de séquences conservés jouent un rôle important dans l'activation des RCPGs. En effet, le motif DRY / D(E)-R-Y(F) sert à stabiliser la conformation inactive du récepteur à travers une liaison ionique conservée en position Glu6.40 (selon la nomenclature du système Ballesteros−Weinstein (Ballesteros and Weinstein 1995)), constituant ainsi le blocage ionique du récepteur.

Le premier récepteur de la superfamille des RCPGs à avoir été cloné est le récepteur à la rhodospine bovine (Nathans and Hogness 1983), donnant son nom à la classe A ou famille "rhodospin-like". De plus, il est également le premier RCPG dont la structure tridimensionnelle ait été établie par cristallographie (Palczewski 2000), ce qui en fait un récepteur de référence. En effet, la structure cristalline a permis de déterminer de manière précise l'emplacement des domaines TMs au sein du récepteur à la rhodopsine, permettant ainsi de pouvoir prédire l'emplacement des domaines TM d'autres récepteurs de classe A grâce à un alignement de séquences et notamment des motifs NSxxNPxxY et DRY / D(E)-R-Y(F). En outre, ces récepteurs de classe A se distinguent des autres classes par un domaine N-terminal extracellulaire généralement plus court. Chez les récepteurs des autres familles, ce domaine N-terminal extracellulaire est fortement impliqué dans la liaison du ligand à son récepteur. Par conséquent, il a été supposé que les ligands se lient à une cavité entre les domaines TM des récepteurs de classe A, voire sur les boucles extracellulaires comme c'est le cas pour la plupart des récepteurs de peptides (Schiöth and Fredriksson 2005). Toutefois, les récepteurs de type LHR (« Luteinizing Hormone Receptor »), FSHR (« Follicle Stimulating Hormone Receptor »), TSHR (« Thyroid-Stimulating Hormone Receptor ») et LGR (« Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein-Coupled Receptor ») lient des hormones glycoprotéiques uniquement au niveau des domaines N-terminaux extracellulaires. En effet, ces domaines sont plus longs que ceux des récepteurs de classe A et possèdent des motifs riches en leucine.

Bien que l'ensemble des récepteurs de cette famille partagent des liens phylogénétiques étroits, ils sont capables de lier une multitude de ligands différents. Aussi, les auteurs de la classification GRAFS ont réalisé une étude approfondie du génome humain, permettant ainsi de diviser la famille "Rhodopsin-like" en quatre groupes nommés α, β, γ et δ. Le groupe α inclut les récepteurs des amines, et quelques récepteurs des peptides et des prostaglandines. Le groupe β regroupe les récepteurs liant uniquement des peptides. Le groupe γ contient divers récepteurs dont de nombreux récepteurs de peptides tels que les chimiokines et certains récepteurs se liant aux neuropeptides comme les somatostatines, les galanines et les opioïdes. Le dernier groupe δ

englobe les récepteurs olfactifs, les récepteurs de purine et les récepteurs des glycoprotéines. Outre la division en quatre groupes, la famille "Rhodopsin-like" est également subdivisée en treize sous-groupes (Fredriksson 2003).

Ainsi, le groupe α est sous-divisé en cinq branches :

- Les récepteurs à la prostaglandine (8 récepteurs à la prostaglandine : PTGERs et 7 récepteurs orphelins).

- Les récepteurs aux amines biogènes (les récepteurs à la sérotonine : HTRs, les récepteurs à dopamine DRDs, les récepteurs muscariniques CHRMs, les récepteurs histaminergiques : HRHs, les récepteurs adrénergiques : ADRs, les récepteurs des traces amines : TARs et quelques récepteurs orphelins).

- Les récepteurs aux opsines (le récepteur à la rhodospine : RHO, les récepteurs des pigments visuels coniques OPN1SW, OPN1LW, OPN1MW, le récepteur à la peropsine : RRH, récepteur à l'encéphalopsine OPN3, le récepteur à la mélanopsine : OPN4 et le récepteur du rétinal couplé aux protéines G : RGR).

- Les récepteurs à la mélatonine : MTNR1A, MTNR1B et le récepteur orphelin GPR50.

- Les MECA récepteurs (les récepteurs à la mélanocortine : MCRs, les récepteurs de la différenciation endothéliale couplés aux protéines G : EDGRs, les récepteurs des cannabinoïdes : CNRs, les récepteurs de liaison à l'adénosine : ADORAs et les récepteurs orphelins : GPR3, GPR6 et GPR12).

Le groupe β n'est pas différencié en plusieurs branches mais regroupe 36 récepteurs. Il inclut les récepteurs à l'hypocrétine : HCRTRs, aux neuropeptides FF : NPFFRs, à la tachykinine : TACR, à la CCK : CCKR, au neuropeptide Y : NPYR, à l'endothéline EDNR et ETBRLP1/2, au GRP (« Gastrin Releasing Peptide ») : GRPR, à la neuromédine B : NMBR, à la bombésine utérine : BRS3, à la neurotensine : NTSR, aux sécrétagogues d'hormone de croissance GHSR, à la neuromédine NMUR, à la libération de thyrotropine TRHR, à la ghréline, à l'arginine-vasopressine : AVPR, à la gonadotropine (ou « Gonadotropin-Releasing Hormone ») : GnRHR, à l'ocytocine : OXTR et un récepteur orphelin GRP72.

Le groupe γ est réparti en trois branches :

- Les récepteurs SOG (les récepteurs à la galanine : GALRs, le récepteur GPR54 liant un RF-amide, les récepteurs de la somatostatine : SSTRs, les récepteurs aux opioïdes : OPRs, les récepteurs GPR7 et GPR8 liant le neuropeptide W).

- Les récepteurs MCH.

- Les récepteurs de la chimiokine (les récepteurs aux chimiokines : CCRs, et CXCRs, les récepteurs à l'angiotensine AGTRs et à la bradykinine BDKRBs et un nombre important de récepteurs orphelins).

Le groupe δ est composé de quatre branches :

- Les récepteurs de type MAS (le récepteur à l'oncogène MAS1 et les MAS-related receptors MRGs et MGRXs).

- Les récepteurs aux glycoprotéines (les récepteurs aux hormones glycoprotéiques : FSHR, TSHR, LHCGR (CG : choriogonadotropine) et des récepteurs comprenant des motifs répétés riches en leucine « Leucine leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor » (LGRs), la branche des récepteurs de la purine (récepteurs des peptides formylés FPR, les récepteurs P2Y des nucléotides extracellulaires et un large nombre de récepteurs orphelins).

- Les récepteurs olfactifs (environ 460 récepteurs).

- **La classe B ou familles des récepteurs de type Sécrétine et de type Adhésion**

La classe B est selon la classification GRAFS, séparée en deux familles : la famille des récepteurs de type Sécrétine et la famille des récepteurs d'Adhésion. En effet, des études ont montré que les récepteurs d'Adhésion possèdent une histoire évolutive différente des récepteurs de type Sécrétine (Bjarnadóttir et al. 2004), ce qui a amené les auteurs à séparer ces deux familles.

Cependant, bien qu'ayant des histoires évolutives distinctes, les deux familles partagent des similarités structurelles. Ainsi, l'ensemble des récepteurs de la classe B présentent un domaine N-terminal extracellulaire riche en cystéine et ont pour particularité de posséder dans la boucle e1, un acide aspartique hautement conservé à la jonction avec le domaine TM 2 (Kristiansen 2004). Les récepteurs présentent également un pont disulfure formé par des résidus cystéines entre la boucle e2 et la boucle e3.

Famille de récepteurs de type Sécrétine

Les récepteurs de type Sécrétine ont pour particularité de lier les neuropeptides tels que ceux de type CT, l'hormone parathyroïdienne, le peptide intestinal vasoactif (VIP) et le glucagon. Ces récepteurs présentent un domaine N-terminal relativement long souvent compris entre 60 et 80 acides aminés et comprenant de nombreux résidus cystéines formant des ponts disulfures. Ce domaine N-terminal est également important car il contient le domaine de liaison des ligands comme cela a été montré pour le récepteur liant le VIP (VIPR), le récepteur à la sécrétine, le récepteur au glucagon, le récepteur au glucagon-like peptide-1 (GLP1R), le récepteur à l'hormone parathyroïdienne (PTHR), le récepteur à la corticolibérine (CRHR) et pour le récepteur liant le facteur neurotrophique « Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide » (PACAPR) (Bjarnadóttir et al. 2004). Toutefois, il semblerait que pour l'ensemble de ces peptides, le domaine de liaison situé en N-terminal ne soit pas suffisant et que des interactions supplémentaires aient lieu au niveau des boucles extracellulaires (Gether 2000).

Famille de récepteurs de type Adhésion

La famille des récepteurs de type Adhésion est composée chez l'homme de 33 membres agissant au niveau des cellules embryonnaires et larvaires, des cellules de l'appareil reproducteur, des neurones, des leucocytes et dans les tumeurs.

De manière générale, les récepteurs de cette famille possèdent un long domaine N-terminal contenant un fort pourcentage en résidus sérine et thréonine pouvant être des sites de O-glycosylation ainsi qu'un site protéolytique (GPS) proximal à la première hélice transmembranaire. Il est à noter que les récepteurs de type Adhésion possèdent plusieurs domaines semblables au facteur de croissance épidermique (EGF) au sein du domaine N-terminal, ce qui a valu aux récepteurs de type Adhésion d'être nommés EGF-TM7 lors de leur découverte (McKnight and Gordon 1996).

- **La classe C ou famille des récepteurs de type Glutamate**

Cette classe regroupe chez l'homme les 8 récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), les deux variants du récepteur de l'acide γ-aminobutyrique $GABA_A$ et $GABA_B$, le récepteur de détection du calcium (CASR) et les récepteurs gustatifs de type 1 (TAS1). Cette classe inclut également les récepteurs phéromones. L'ensemble des récepteurs de cette classe possède un long domaine N-terminal extracellulaire comprenant le site de liaison des ligands ainsi qu'une troisième boucle intracellulaire très courte. Les récepteurs de cette classe présentent également au début de la première boucle intracellulaire une thréonine et une proline à des positions relativement bien conservées, une proline au début de la boucle e1, une sérine dans le domaine TM III, une proline, une asparagine, un glutamate, une alanine et une lysine dans la boucle e3 et une proline ainsi qu'une lysine à la fin du domaine TM IV. De plus, tout comme les récepteurs des classes A et B, les récepteurs de la classe C possèdent un pont disulfure entre les boucles e2 et e3 (Schiöth and Fredriksson 2005; Zhang et al. 2012b).

- **La classe D**

Cette classe comprend les récepteurs liant les phéromones d'accouplement de la levure.

- **La classe E**

Cette classe inclut les récepteurs de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc).

- **La classe F / récepteurs Frizzled/Smoothened**

Cette classe inclut les récepteurs frizzled (nom se référant à la forme enroulée et entortillée du ligand Wnt) (Schiöth and Fredriksson 2005) impliqués dans le contrôle du devenir, de la prolifération et de la polarité des cellules au cours du développement des métazoaires en régulant les signaux des glycoprotéines de type Wnt (Schulte and Wright 2018). Ces récepteurs, identifiés à l'origine chez *Drosophila melanogaster*, ont également été retrouvés chez le champignon *Spizellomyces punctatus*, chez le protozoaire *Dictyostelium discoideum* (Song et al. 2006; Krishnan et al. 2012), chez les métazoaires primitifs tels que les éponges *Suberites domuncula* et *Amphimedon queenslandica* et l'hydre *Hydra vulgaris,* chez *Caenorhabditis elegans* et chez les vertébrés. Les récepteurs de cette famille présentent un long domaine N-terminal composé de plus de 200 acides dont de nombreux résidus cystéine (« Cysteine-Rich Domain » CRD) forment des ponts disulfures. Ce domaine CRD est nécessaire et suffisant à la liaison des molécules Wnt aux récepteurs frizzled (Huang and Klein 2004). Il est à noter que le gène smoothed (smo) impliqué dans la voie de signalisation Hedgehog, et intervenant dans

l'organogenèse durant le développement embryonnaire, est apparenté aux gènes frizzled et fait partie intégrante de cette classe F.

3.3 Classification des protéines G

Il existe deux classes principales de protéines G : les protéines G cytoplasmiques et les protéines G hétérotrimériques. Ces dernières sont associées aux RCPGs et sont impliquées dans la transduction du signal intracellulaire. Les protéines G hétérotrimériques appartiennent à la superfamille des GTPases, présentes depuis les bactéries jusqu'aux vertébrés (Morris and Malbon 1999) et jouant divers rôles au sein de la régulation cellulaire. Les protéines G sont composées de trois sous-unités : α, β et γ formant ainsi un hétérotrimère. Ces protéines sont classées selon la nature de leur sous-unité α, déterminant ainsi la voie cellulaire induite par l'activation des RCPGs. Il existe 6 grandes familles de sous-unités α et par conséquent, 6 classes de protéines G (Figure 13) :

- Gαs, qui active l'adénylate cyclase (AC) conduisant à une augmentation de la concentration en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui permet l'activation de la protéine kinase A (PKA) sérine/thréonine spécifique et modifie l'activité de certains canaux ioniques.

- Gαi, qui a une action inverse à la protéine Gαs en inhibant la libération d'AMPc.

- Gαq/11, qui active la phospholipase Cβ (PLCβ). La PLCβ hydrolyse le phosphatidyl 4,5-biphosphate (PIP2) membranaire donnant du diacylglycérol membranaire (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3). Le DAG active la protéine kinase C (PKC) et l'IP3 active les canaux calciques IP3-dépendants présents dans la membrane, induisant ainsi la libération de calcium dans le cytoplasme.

- Gα12/13, qui activent de petites GTPases cytosoliques, les Rho contrôlant le remodelage du cytosquelette *via* l'activation des kinases Rock.

- Gαolf, qui est associée aux récepteurs olfactifs et active l'AC tout comme la protéine Gαs.

- Gαt ou transducine, uniquement activée par la rhodopsine. Elle active la phosphodiestérase (PDE) conduisant à une baisse du taux intracellulaire de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), à la fermeture des canaux sodiques GMPc dépendants et à une hyperpolarisation de la membrane.

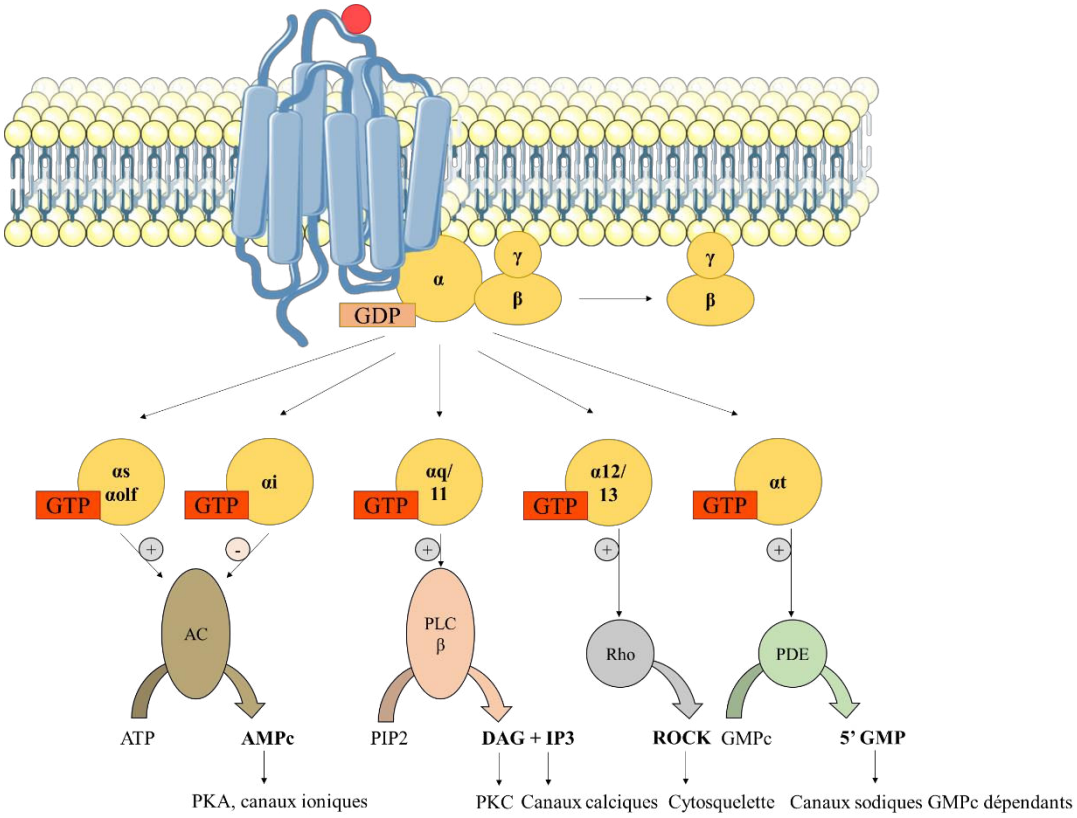


Figure 13 : Représentation schématique de la signalisation cellulaire induite par les différentes protéines G recrutées par les RCPGs. AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique; PKA protéine kinase : A ; PLCβ : phospholipase C β; PIP2 : phosphatidyl 4,5-biphosphate ; DAG : diacylglycérol membranaire ; IP3 : inositol triphosphate ; PKC : protéine kinase C ; PDE : phosphodiestérase ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; GMP : guanosine monophosphate.

Bien qu'il existe plusieurs sortes de sous-unités α, toutes se caractérisent par :

- un site d'interaction avec le récepteur

- un site de liaison avec le GDP (guanosine diphosphate) ou le GTP

- la propriété de devenir active et de déclencher une action spécifique suite à la fixation du GTP

- une activité GTPasique intrinsèque.

De plus, tout comme pour la sous-unité α, il existe différents types de sous-unités β et γ pouvant participer à la modulation du signal en activant différents canaux (sodiques, calciques, potassiques), des enzymes et des kinases. Aussi, différentes combinaisons des sous-unités α, β et γ vont permettre de créer une grande diversité de protéines G aboutissant à une large spécificité de signalisation intracellulaire. D'autre part, un récepteur activé peut reconnaître différentes sous-unités α, ce qui entraîne l'activation de plusieurs voies au sein d'une même cellule et peut provoquer différentes actions.

3.4 Fixation du ligand et activation des protéines G

La fixation d'un agoniste sur le récepteur entraîne un changement conformationnel du récepteur (Figure 14). Ce changement de conformation permet le couplage du récepteur à la sous-unité α de la protéine G inactive. Cette interaction récepteur-protéine G, entraîne la diminution de l'affinité de la sous-unité α pour le guanosine diphosphate, ce qui favorise son remplacement par du guanosine triphosphate (GTP), présent de manière abondante dans les cellules. Activée par sa liaison au GTP, la sous-unité α se dissocie du récepteur et des sous-unités β et γ, formant ainsi les complexes Gα-GTP et Gβγ. Ces complexes modulent l'activité de toute une variété d'effecteurs (enzymes, canaux, transporteurs…), enclenchant ainsi une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à une réponse biologique. La signalisation prend fin grâce à l'activité GTPase intrinsèque de Gα qui conduit à la reformation de l'hétérotrimère inactif: Gαβγ.

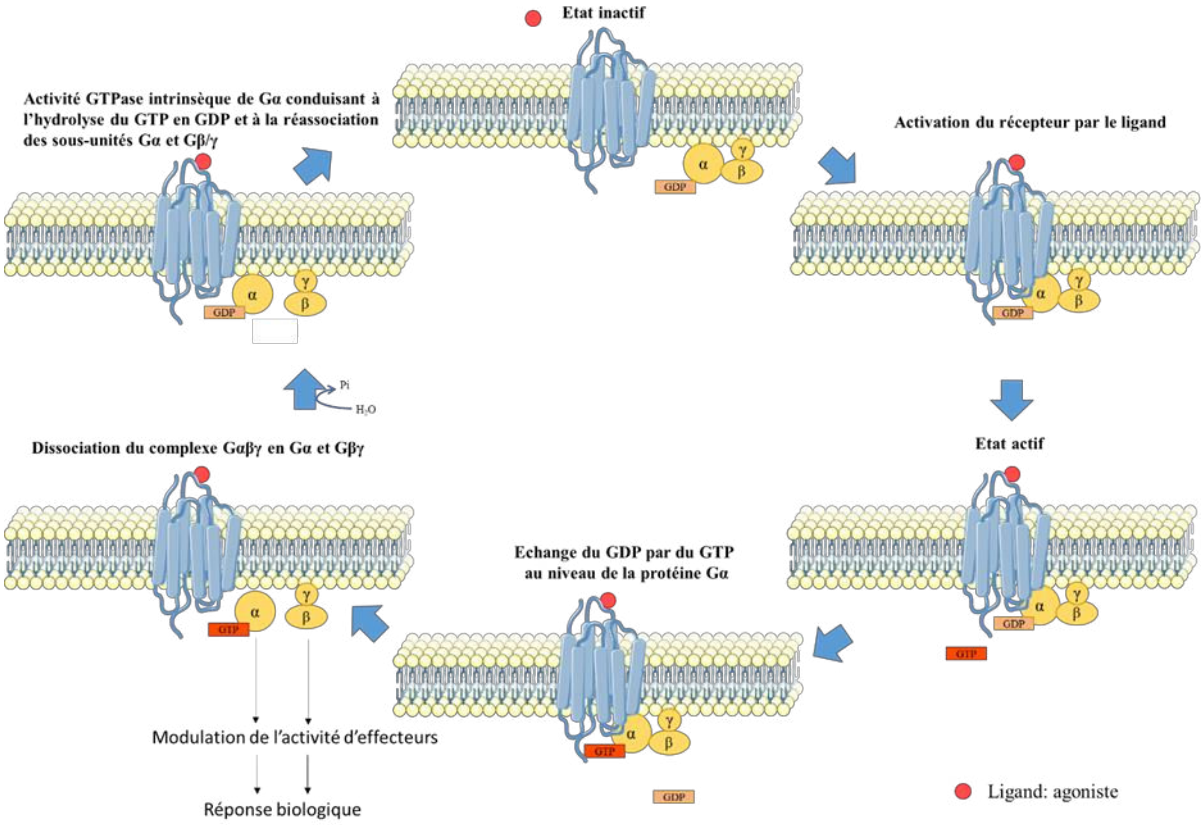


Figure 14 : Cycle d'activation des protéines G.

Ce mode de fonctionnement apparaît comme relativement simple mais est en réalité un peu plus complexe. En effet, les travaux des dernières décennies ont démontré l'existence de régulations allostériques et de phénomènes d'oligomérisation des récepteurs permettant de mieux comprendre la plasticité des récepteurs face à la grande diversité de ligands et de voies de signalisation. Ces différentes avancées sont décrites dans les parties suivantes.

3.5 États conformationnels multiples

Les RCPGs peuvent osciller spontanément entre deux états conformationnels : un état actif et un état inactif. Ces deux états ont des propriétés de liaison et de fonctions différentes (Figure 15). La liaison d'un ligand à une des deux conformations s'effectue selon des critères d'affinité et sous contrôle cinétique, et déplace l'équilibre en faveur de cet état. En effet, les ligands peuvent être de type agoniste, c'est-à-dire qu'ils stabilisent la conformation active du récepteur, de type agoniste inverse, qui, au contraire, stabilisent la conformation inactive ou bien de type antagoniste qui, n'affectent pas l'équilibre conformationnel initial (Galzi and Ilien 2012).

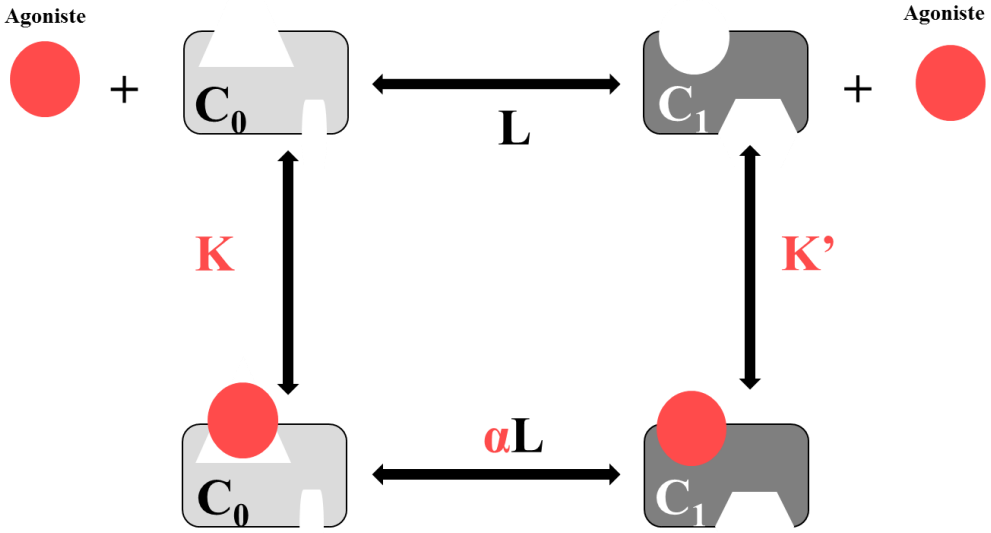


Figure 15 : Modèle d'activation à deux états conformationnels. Le récepteur peut adopter deux conformations: inactive représentée par C0 ou active représentée par C1. L'équilibre spontané entre ces états conformationnels est régi par la constante d'isomérisation L = [C0]/[C1]. Un agoniste distingue les deux états sur le plan de l'affinité (constantes de dissociation à l'équilibre K ou K'). Il occupe préférentiellement la conformation active pour laquelle il présente la meilleure affinité et déplace l'équilibre entre C0 et C1. L'efficacité intrinsèque α du ligand (rapport d'affinité α = K'/K) se conjugue à la constante d'isomérisation pour définir le nouvel équilibre entre C1 et C0 (α × L). Un agoniste (K' < K ; α < 1 ; αL < L) déplace l'équilibre en faveur de l'état C1. Un agoniste inverse (K' > K ; α> 1 ; αL > L) privilégie l'état inactif C0 alors qu'un antagoniste (K = K') n'affecte pas l'équilibre conformationnel initial. Adaptée d'après (Galzi and Ilien 2012).

La réponse maximale obtenue pour un effet pharmacologique varie selon l'activité intrinsèque de chacun des agonistes. En effet, un agoniste est dit entier ou pur lorsqu'il produit un effet maximal alors qu'un agoniste partiel, est dans l'incapacité de produire l'effet maximal obtenu par les agonistes entiers de ce même récepteur (Figure 16).

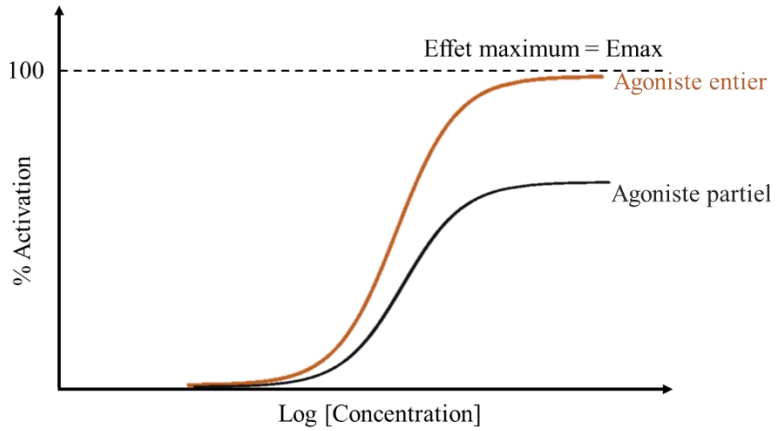


Figure 16 : Représentation schématique de l'effet obtenu par un agoniste entier et partiel.

Dans les deux cas, l'état actif est stabilisé, ce qui entraîne la formation d'un complexe de signalisation ternaire comprenant : le récepteur activé, l'agoniste et la protéine G hétérotrimérique. De plus, il est à noter que le récepteur peut s'isomériser de manière spontanée en un état actif en l'absence de ligand et, interagir avec les protéines G, afin de former un complexe de signalisation binaire (Roth 2016). Cet état actif spécifique est qualifié d'activité constitutive. De plus, il existe plusieurs états conformationnels actifs : l'état précoce et l'état tardif (Figure 17).

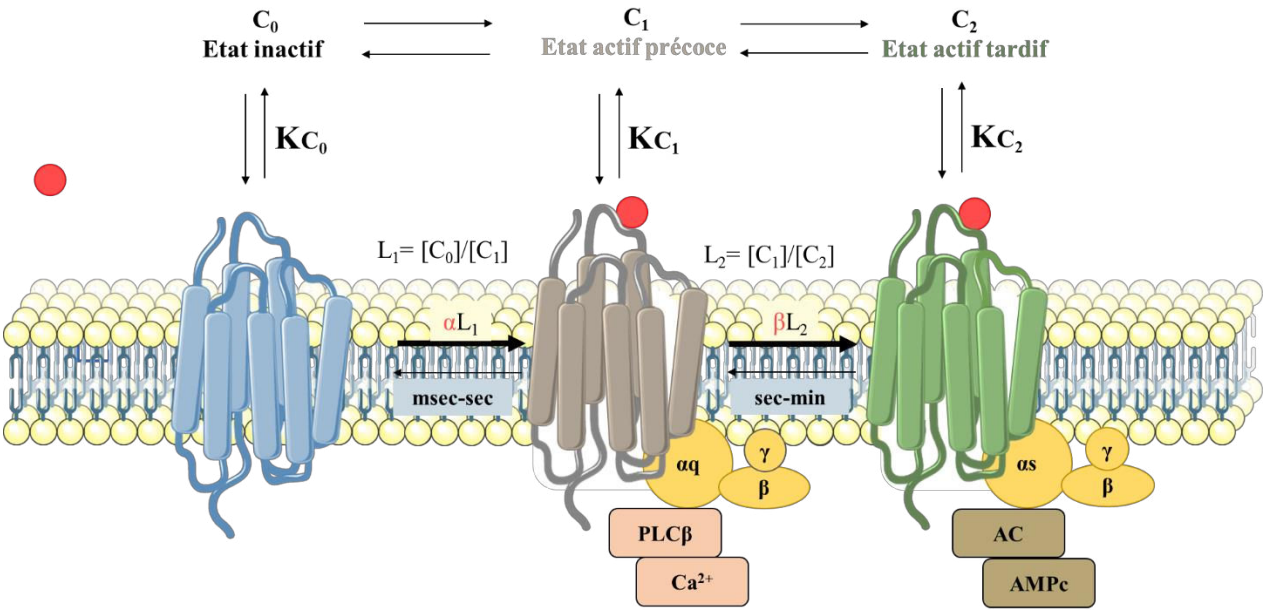


Figure 17 : Dynamique conformationnelle et fonctionnelle à trois états des récepteurs couplés aux protéines G. Le récepteur oscille entre trois états conformationnels : l'état inactif C_0, l'état actif C_1 précoce et l'état actif tardif C_2. L'équilibre entre ces trois états est régi par les constantes d'isomérisation L_1 et L_2. La liaison de l'agoniste est caractérisée par une phase initiale rapide conduisant à la stabilisation ($\alpha L1$) de l'état C_1 d'affinité intermédiaire, c'est l'état actif précoce. Une seconde phase de liaison plus lente est ensuite observée. Elle correspond à l'isomérisation des complexes C_1L en complexes C_2L de plus haute affinité, c'est l'état actif tardif. PLCβ : phospholipase Cβ ; AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique. Adaptée d'après (Galzi and Ilien 2012).

Ces états sont stabilisés de manière différentielle par les ligands et sont discriminés par des partenaires de signalisation intracellulaire différents, comme des protéines G. Ce phénomène permet ainsi d'expliquer le fait que plusieurs protéines G sont capables d'interagir avec un seul et même récepteur.

Les ligands, qu'ils soient de type agoniste ou antagoniste, peuvent se lier à deux sites différents du récepteur : le site orthostérique et le site allostérique (Figure 18). Le site orthostérique représente le site actif du récepteur sur lequel les ligands endogènes se fixent. Découvert plus tardivement, le site allostérique constitue un site distinct du site actif. De ce fait, les antagonistes sont dits compétitifs lorsqu'ils se lient sur le site orthostérique et non compétitif lorsqu'ils se lient au site allostérique du récepteur.

La fixation d'un ligand sur le site allostérique entraîne la modulation de la réponse fonctionnelle induite par le ligand fixé sur le site orthostérique.

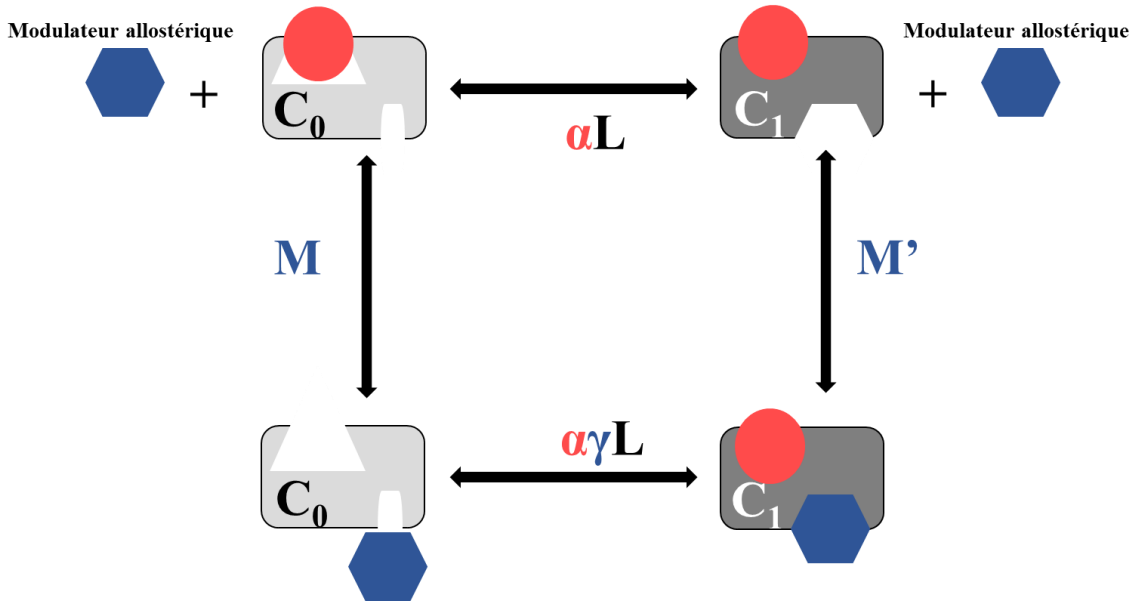


Figure 18 : Modèle de modulation allostérique. Un modulateur allostérique peut se lier de manière préférentielle (constantes de dissociation à l'équilibre M ou M') à l'une des deux conformations ci-dessus. Pour M' < M, le modulateur est qualifié de modulateur allostérique positif (PAM) et pour M' > M, il est appelé modulateur allostérique négatif (NAM). Le modulateur allostérique conjugue son efficacité intrinsèque γ (rapport M'/M) à celle de L pour modifier l'équilibre entre C_0 et C_1 selon le produit L × γ. La présence d'un agoniste modifie la valeur de l'équilibre entre C_0 et C_1 selon le produit α × γ × L. Ce schéma illustre le cas d'un PAM. Cette figure illustre le cas d'un modulateur positif (γ < 1) qui renforce l'activation du récepteur à protéine G par l'agoniste. Adaptée d'après (Galzi and Ilien 2012).

De manière générale, les composés allostériques sont classés en modulateurs allostériques positifs et négatifs selon l'effet des composés sur la signalisation du ligand endogène (Figure 19). Il est à noter que les propriétés modulatrices d'un composé allostérique sont spécifiques du ligand orthostérique et que la diversité des ligands endogènes d'un même récepteur peut amener à différentes réponses. Les modulateurs allostériques peuvent permettre de modifier les

propriétés de puissance et d'efficacité de liaison du ligand orthostérique de façon dissociée ou conjointe. La propriété de puissance s'appuie sur celle de l'affinité. En effet, plus l'affinité d'un composé pour un récepteur est grande, plus sa puissance est élevée. L'efficacité de liaison quant à elle, est la propriété d'un composé à fournir l'effet maximal d'activation d'un récepteur.

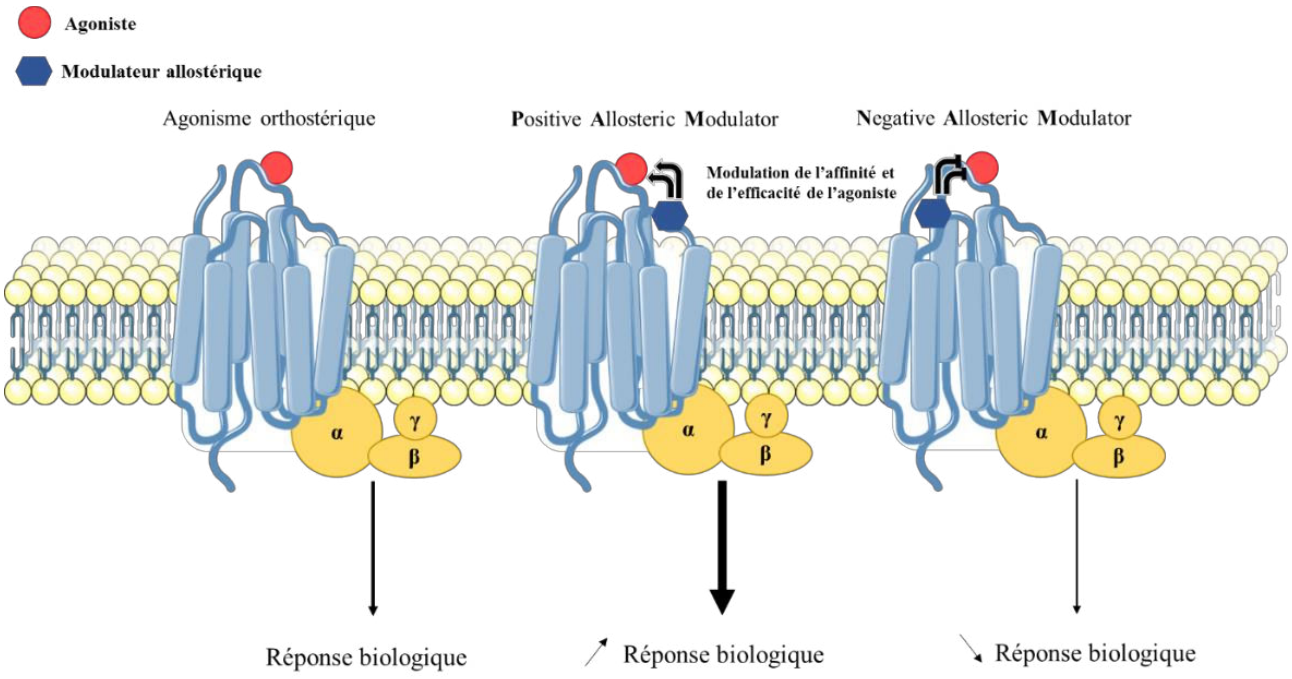


Figure 19 : Modulation allostérique de la réponse biologique induite par un agoniste orthostérique. Les PAM (Positive Allosteric Modulator) permettent d'augmenter l'efficacité et/ou l'affinité de l'agoniste orthostérique. À l'inverse, les NAM (Negative Allosteric Modulator) permettent de diminuer l'efficacité et/ou l'affinité de l'agoniste orthostérique. Adaptée depuis (Wootten et al. 2013).

Il existe différents types de modulateurs allostériques. Parmi les modulateurs naturels, peuvent être cités les ions zinc qui participent à la modulation positive du récepteur β2-adrénergique, le cholestérol, qui module la fonctionnalité de nombreux récepteurs mais aussi un ensemble de protéines accessoires appelées GIPs (GPCR-interacting proteins). Ces GIPs comprennent entre autres les protéines RAMPs (Receptor Activity Modifying Proteins) qui contribuent au trafic des récepteurs vers la membrane plasmique ainsi qu'à la pharmacologie de plusieurs RCPGs, les RCPs (Receptor Component Proteins) qui en s'associant avec le dimère RCPG/RAMP, permet d'optimiser la transduction du signal, et les arrestines, impliquées entre autres dans les mécanismes de désensibilisation (Bockaert et al. 2004). De plus, les récepteurs eux-mêmes peuvent se comporter comme des modulateurs allostériques en formant des homo/hétérodimères. En effet, dans ces dimères, chacun des monomères transfère de l'information vers l'autre monomère afin de conférer de nouvelles propriétés à l'ensemble.

L'ensemble des nouveaux modes d'activation des RCPGs découverts ces dernières années est traité dans la partie suivante. Il est à noter que les protéines RAMP et RCP font l'objet d'une description plus complète dans le chapitre II de cette thèse.

3.6 Oligomérisation

Les RCPGs peuvent s'associer entre eux afin de former des dimères. L'association de récepteurs identiques donne lieu à des dimères appelés homodimères et, celle de récepteurs différents, à des dimères nommés hétérodimères. Outre ces différentes associations, il existe deux grandes catégories de dimères : des dimères dits obligatoires et des dimères permettant le couplage à différentes protéines que la monomérisation ne permet pas.

3.6.1 Les dimères obligatoires

Certains récepteurs ne sont fonctionnels qu'en l'état de dimère. C'est le cas du récepteur de type B de l'acide γ-aminobutyrique ($GABA_BR$) qui est un hétérodimère obligatoire puisque, le récepteur $GABA_BR1$ doit s'associer au récepteur $GABA_BR2$ afin de générer une réponse cellulaire (Figure 20). En effet, seul le récepteur $GABA_BR1$ possède le site de liaison au GABA au sein du grand domaine extracellulaire appelé "Venus Flytrap" mais, il n'a pas la capacité de transduire le signal. Pour cela, il a besoin d'interagir avec le récepteur $GABA_BR2$ qui, peut se coupler aux protéines G. De plus, lorsqu'il est exprimé seul, le récepteur $GABA_BR1$ est maintenu au sein du réticulum endoplasmique et ne peut être adressé à la surface cellulaire en raison d'une séquence de rétention RSR présente au niveau de la queue en C-terminal qui, empêche le récepteur de progresser dans l'appareil de Golgi. Toutefois, lors de la formation de l'hétérodimère $GABA_BR1/GABA_BR2$, cette séquence de rétention est masquée et le récepteur $GABA_BR1$ peut s'exprimer à la membrane plasmique (Pin et al. 2004, 2009).

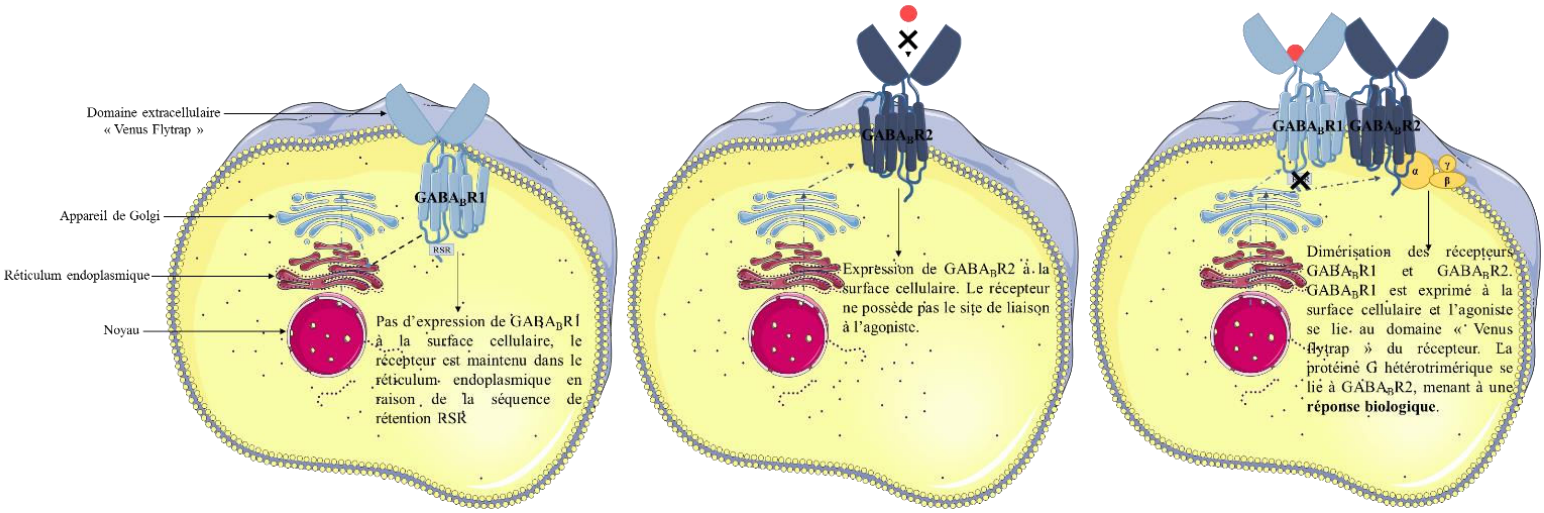


Figure 20 : Représentation schématique d'un dimère obligatoire GABA$_B$R1/GABA$_B$R2. Adaptée de (Pin et al. 2009)

D'autres RCPGs sont capables de fournir une réponse cellulaire à l'état de monomère mais, leurs dimérisations permettent de diversifier leurs voies de signalisation.

3.6.2 Changement de signalisation cellulaire

Le récepteur de la dopamine D1R lorsqu'il est sous la forme de monomère, se couple à une protéine Gαs, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire. Le récepteur à la dopamine D$_2$R, quant à lui, se couple à une protéine Gαi, ce qui à l'inverse, entraîne une diminution de la concentration en AMPc dans la cellule. De manière intéressante, l'hétérodimère D$_1$R/D$_2$R formé par ces deux récepteurs permet la transduction du signal à travers une protéine de type Gαq (Lee et al. 2004) (Figure 21).

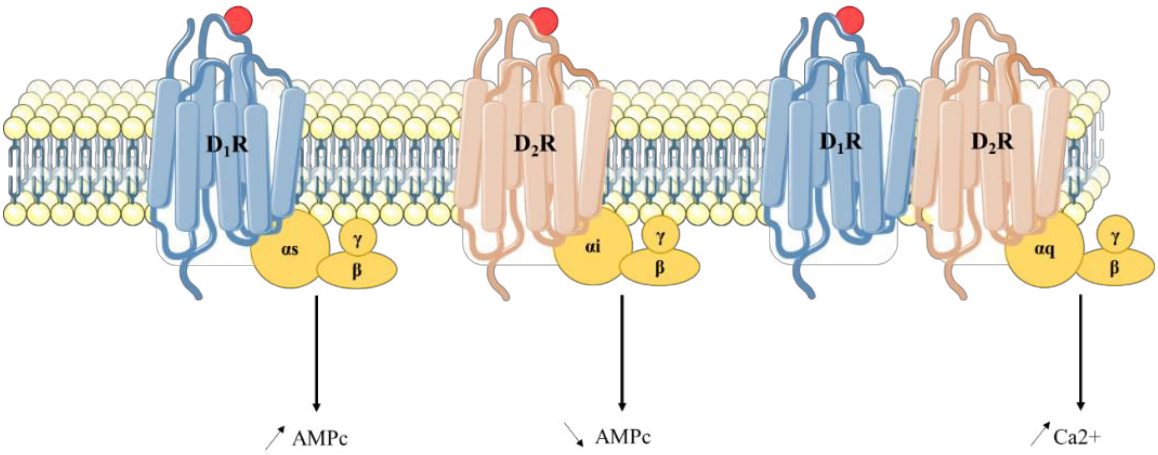


Figure 21 : Représentation schématique d'un dimère D$_1$R/D$_2$R entraînant un changement de signalisation cellulaire.

Les dimères de RCPG peuvent également induire un couplage *via* la β-arrestine 2. Ainsi, le récepteur aux opioïdes μ (μOR) lorsqu'il est sous forme de monomère, transduit le signal à travers les protéines G. Cependant, l'hétérodimérisation de μOR avec le récepteur δ aux

opioïdes (δOR) entraîne le recrutement de la β-arrestine 2. De plus, la dimérisation peut entraîner un antagonisme fonctionnel comme c'est le cas avec le récepteur D1R et le récepteur A1 à l'adénosine (A1R). En effet, les agonistes de A1R favorisent la formation de l'hétérodimère A1R/D1R, ce qui induit le découplage du récepteur D1R avec la protéine Gαs et réduit la libération de l'AMPc (Wang et al. 2018).

Les RCPGs peuvent également participer à la régulation de l'activité d'autres types de récepteurs à travers le mécanisme de transactivation.

3.7 La transactivation

En effet, les RCPGs peuvent interagir avec d'autres récepteurs membranaires comme les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) et plus précisément avec le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) (Figure 22). Les études menées à ce sujet ont montré que différents mécanismes pouvaient amener à la transactivation de l'EGFR par les RCPGs. En effet, cette transactivation peut être médiée par deux voies différentes : une voie ligand-dépendante et une voie indépendante du ligand. Dans la voie ligand-dépendante, la stimulation d'un RCPG par un agoniste entraîne une signalisation cellulaire conduisant à l'activation des protéines kinases Src. Une fois activées, les protéines Src promeuvent l'expression des métalloprotéases matricielles (MMPs) qui, permettent le clivage protéolytique du proligand en un ligand capable de se lier et de transactiver le RTK. L'exemple le plus classique est l'activation de l'EGFR par un ligand endogène comme l'EGF lié à l'héparine (HB-EGF), issu du clivage du pro HB-EGF. La liaison de l'HB-EGF à l'EGFR permet d'activer la croissance et la différenciation cellulaire. Pour que la transactivation ait lieu, il faut que le signal généré par la liaison de l'agoniste au RCPG passe trois fois la membrane plasmique. De ce fait, cette voie ligand-dépendante est également appelée la voie "triple membrane passing signal" ou TMPS (Cattaneo et al. 2014).

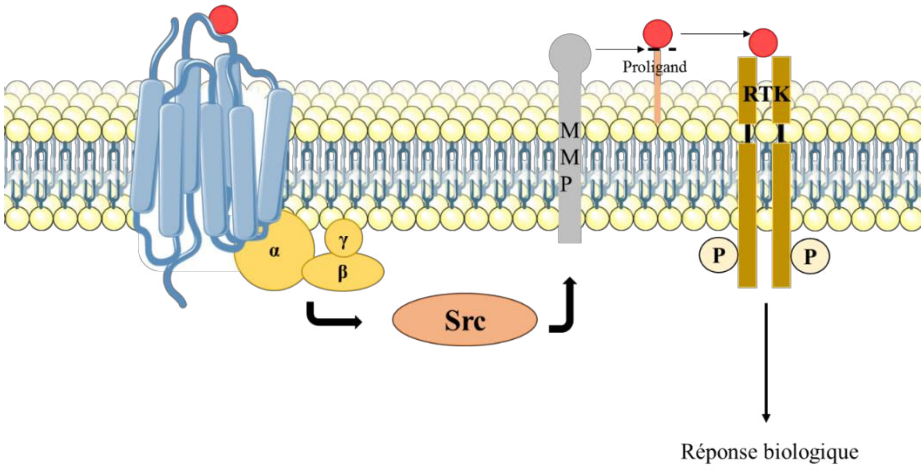


Figure 22 : Transactivation dépendante du ligand. MMP : métalloprotéases matricielles ; RTK : récepteur à activité tyrosine kinase. Adaptée de (Cattaneo et al. 2014).

En revanche la voie indépendante du ligand n'a pas besoin de l'activation de l'EGFR par un agoniste. Ainsi, les études menées ont mis en évidence deux modèles de transactivation indépendante du ligand : la phosphorylation directe de l'EGFR dans le cytoplasme par la protéine kinase Src et l'activation de l'EGFR par la formation d'un dimère RCPG/EGFR (Wang 2016; Wang et al. 2018) (Figure 23).

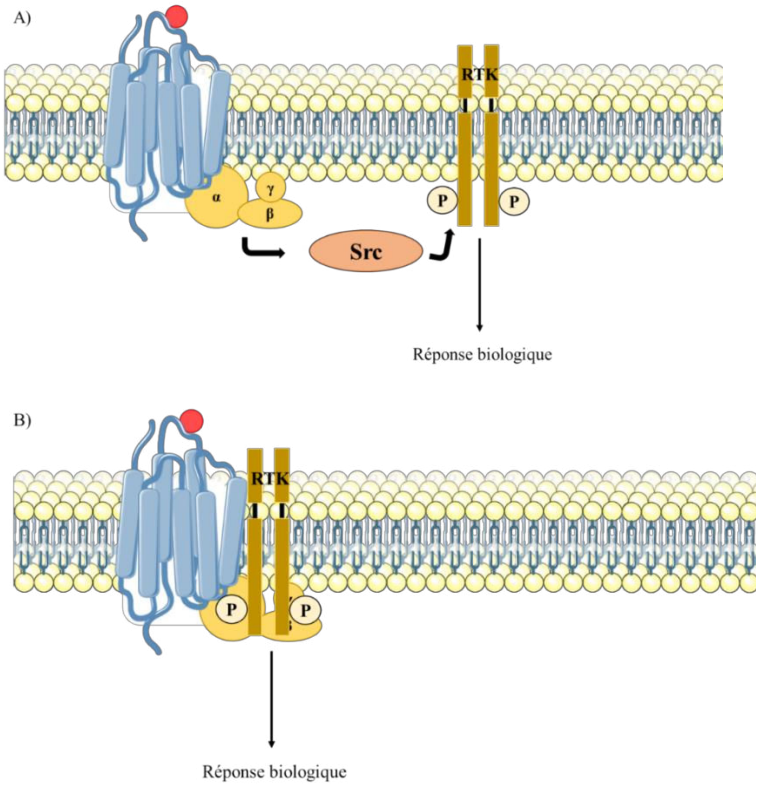


Figure 23 : Transactivation indépendante du ligand. A) le récepteur tyrosine-kinase (RTK) est phosphorylé par la protéine kinase Src, B) le RTK est activé par la formation du dimère RCPG/RTK.

Les recherches de ces dernières années ont montré que la signalisation n'était pas seulement dépendante des protéines G mais qu'elle pouvait être médiée par les β-arrestines ; c'est le concept de signalisation biaisée.

3.8 Signalisation biaisée

Lorsque les RCPGs sont activés par des ligands, ils peuvent activer soit la signalisation cellulaire dépendante de la protéine G, soit la signalisation dépendante de la β-arrestine (Figure 24). Ainsi, ces deux voies de signalisation sont souvent distinctes spatialement et temporellement et, induisent des effets physiologiques uniques. Par exemple, l'activation du récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT1R) par son ligand, induit une vasoconstriction puissante et augmente la pression artérielle *via* la signalisation dépendante des protéines G alors que, l'activation de la voie β-arrestine, induit des effets bénéfiques comme des effets anti-apoptotiques (Wang et al. 2018).

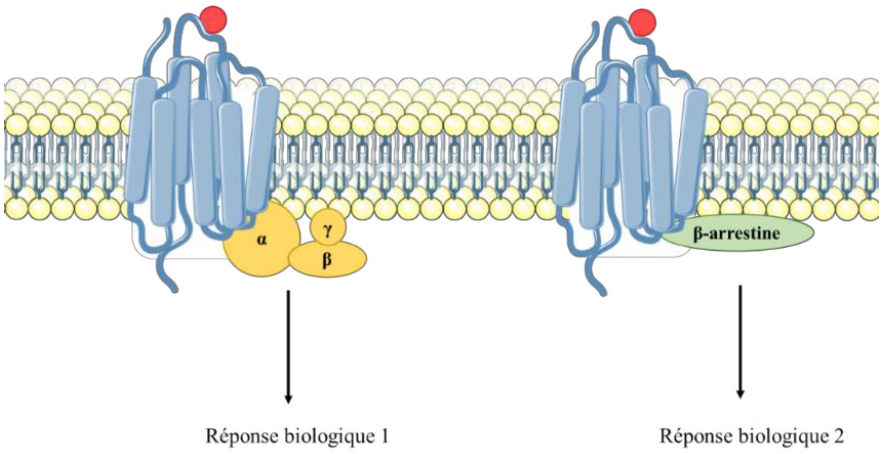


Figure 24 : Représentation schématique de la signalisation biaisée.

L'ensemble des mécanismes évoqués précédemment traite de l'activation des RCPGs à la surface cellulaire. Toutefois, des recherches indiquent que certains RCPGs peuvent être activés dans les endosomes et déclencher des effets spécifiques.

3.9 Activation intracellulaire

Cette activation intracellulaire peut se produire selon deux hypothèses (Figure 25). Premièrement, le couple ligand/RCPG peut continuer à transduire un signal après son internalisation dans des vésicules recouvertes de clathrine en vue du recyclage du récepteur seulement ou de la dégradation du couple ligand/récepteur. Deuxièmement, les RCPGs peuvent être localisés dans différents organites et activer une signalisation intracellulaire.

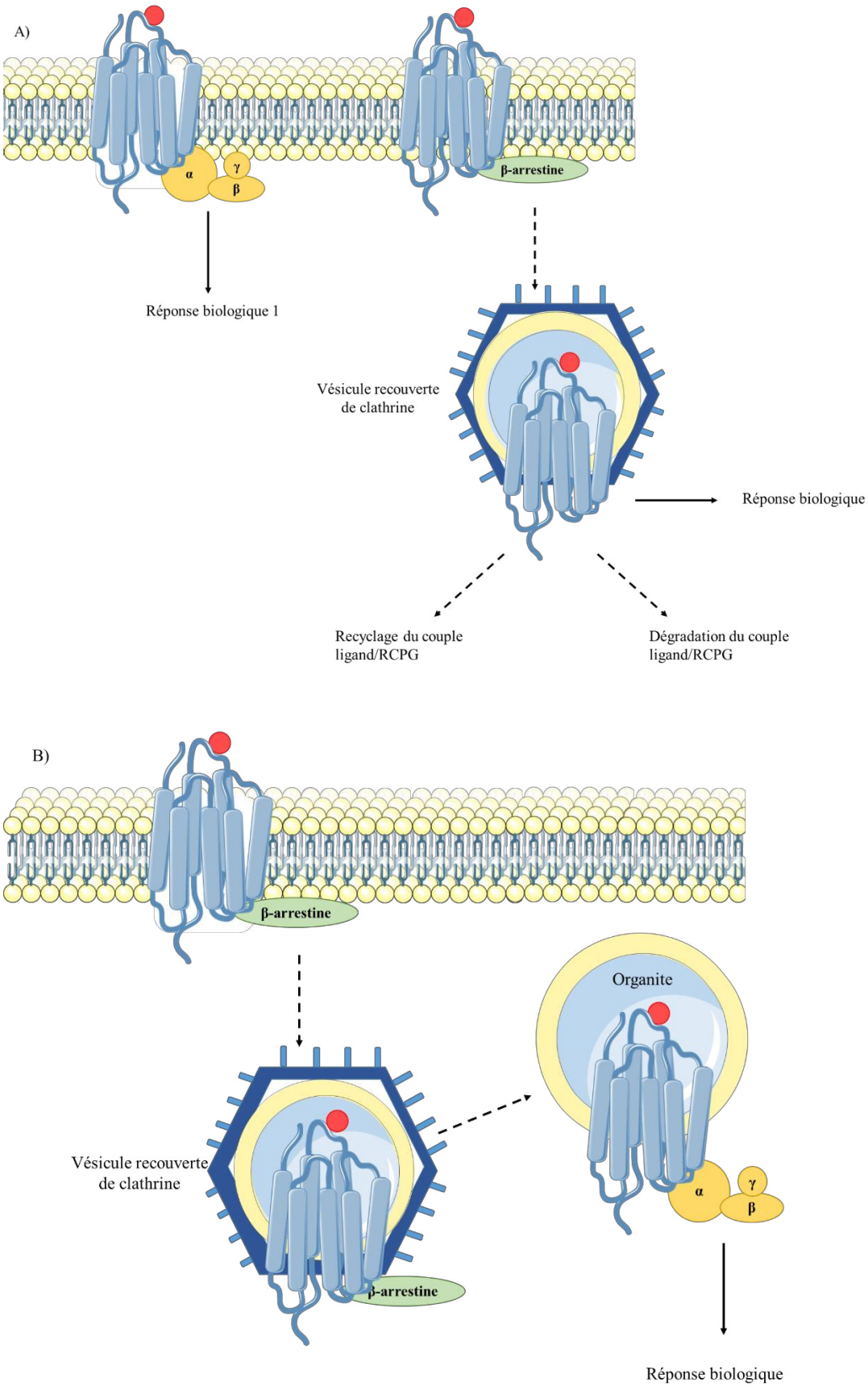


Figure 25 : Représentation de l'activation intracellulaire. A) transduction du signal après internalisation dans une vésicule recouverte de clathrine, B) transduction du signal depuis un organite.

Ainsi, alors que les premières études concluaient que l'internalisation des RCPGs avait uniquement pour but de désensibiliser les récepteurs et d'ainsi mettre fin à la signalisation intracellulaire, des études plus récentes ont montré que l'internalisation du récepteur adrénergique β2 (β2-AR) était responsable de l'activation des protéines kinases ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1/2) (Little et al. 2016).

De manière générale, après stimulation, les RCPGs sont rapidement internalisés dans des compartiments intracellulaires issus de la membrane plasmique grâce au mécanisme d'endocytose.

3.10 Endocytose

L'endocytose des RCPGs se produit lors de la désensibilisation des RCPGs (Figure 26). En effet, la désensibilisation est un phénomène de régulation essentiel permettant de contrôler la durée de l'activation cellulaire induite par un RCPG et ce, afin d'empêcher les effets toxiques dus à sa stimulation prolongée.

La première étape du phénomène de désensibilisation est la phosphorylation des RCPGs par des sérine-thréonine kinases. En effet, les messagers secondaires issus de la transduction du signal, activent les protéines kinases A ou C qui, phosphorylent les récepteurs, indépendamment de leurs conformations active ou inactive. D'autres kinases, les GRK ou "G protein-coupled receptor kinase" sont responsables de la phosphorylation des RCPGs uniquement lorsque ces récepteurs sont en conformation active. L'ensemble de ces phosphorylations peut soit altérer le couplage entre les récepteurs et les protéines G ou bien, favoriser la translocation des β-arrestines vers les récepteurs. Une fois phosphorylés, les récepteurs sont le plus souvent internalisés dans les endosomes et ont un devenir variable. En effet, ils seront soit recyclés, soit dégradés.

Au sein des endosomes, le pH est acide, ce qui favorise la dissociation entre le récepteur et son ligand. Ainsi, les récepteurs peuvent reprendre leur conformation initiale avant activation et, être déphosphorylés par des phosphatases du type de la protéine phosphatase 2A afin d'être recyclés vers la membrane plasmique comme cela est le cas du récepteur à la GnRH, du récepteur opioïde μ et du récepteur β2-adrénergique. Toutefois, d'autres récepteurs comme le récepteur PAR-1 (Protease-Activated Receptor-1) de la thrombine ou encore le récepteur opioïde δ, sont à l'inverse dirigés vers les lysosomes afin d'être dégradés (Scott et al. 2004; Park et al. 2016).

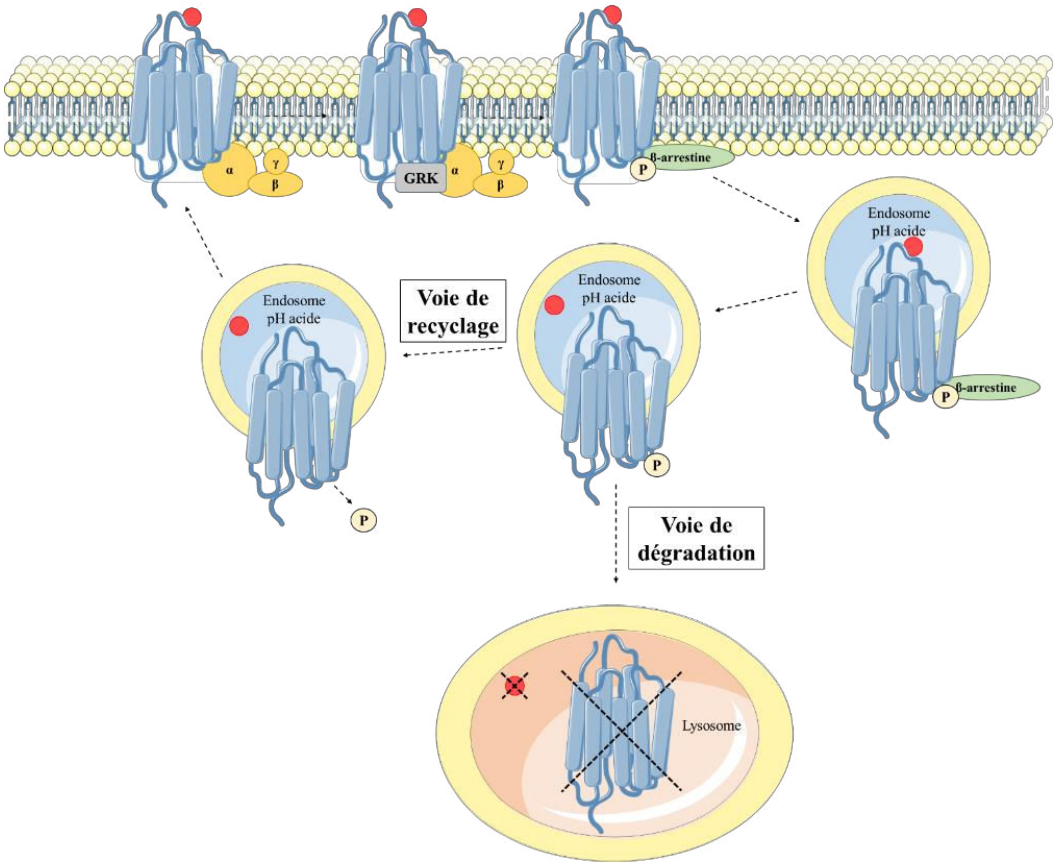


Figure 26 : Désensibilisation des RCPGs grâce aux « G protein-coupled receptor kinase » ou GRK. Le couple ligand/récepteur pourra être soit dégradé soit recyclé. Adaptée d'après (Scott et al. 2004).

4 Récepteurs identifiés chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, plusieurs récepteurs ont déjà été identifiés et fait l'objet d'études. Avant que les données génomiques et transcriptomiques de l'huître ne soient disponibles, des séquences d'amorces d'oligonucléotides dégénérés ont été déduites d'après les similarités existantes entre différents RCPGs de vertébrés et d'invertébrés. Par ce moyen, un certain nombre de transcrits codant pour des RCPGs a pu être cloné par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) :

- Cg-CT-R est le premier récepteur caractérisé par cette méthode. Il présente des homologies de séquence avec les récepteurs à la CT décrits chez les vertébrés. L'hormone CT est impliquée dans la régulation du métabolisme du calcium chez les vertébrés (Dubos et al. 2003). De plus, chez les arthropodes, l'homologue fonctionnel de la CT est l'hormone diurétique (ou « Diuretic Homone ») DH31 (Zandawala 2012). Aussi, les recherches ont mené l'équipe à s'intéresser à l'expression du gène codant le récepteur au sein des branchies, du bord de manteau et du manteau d'huîtres ayant subi un stress salin. Les différences d'expression obtenues au sein des branchies d'huîtres

témoins et exposées au stress, ont permis de suggérer l'implication de ce récepteur dans la régulation ionique et dans les processus de biominéralisation de la coquille. Depuis la parution des données génomiques et transcriptomiques de l'huître (Fleury et al. 2009; Zhang et al. 2012a; Riviere et al. 2015), il est désormais possible d'avoir accès aux séquences d'un grand nombre de récepteurs encore orphelins de l'huître. Aussi, l'étude approfondie de ces bases de données a permis d'identifier d'autres récepteurs potentiels de la CT/DH31. L'étude de certains de ces récepteurs a été menée durant cette thèse et fait l'objet du chapitre II.

- Cg-LGRB est le second récepteur identifié et étudié chez *Crassostrea gigas*. Il appartient à la branche δ de famille A des RCPGs et est caractérisé par des séquences riches en leucine (LGR). Ce récepteur est exprimé principalement dans la glande digestive et serait impliqué dans le contrôle des changements cytologiques impliquant la différenciation de cellules souches en cellules digestives fonctionnelles (Herpin et al. 2004). Chez *Drosophila melanogaster*, l'orthologue DLGR2 de type B est activé par le bursicon qui est responsable du tannage et du déclenchement de la sclérotisation de la cuticule mais également de l'expansion des ailes pendant la phase finale de la métamorphose. Cette fonction d'expansion suggère que le bursicon peut jouer un rôle dans la signalisation cellulaire générale (Mendive et al. 2005). De ce fait, il est fortement envisageable que le récepteur Cg-LGRB de *Crassostrea gigas* puisse lier un neuropeptide orthologue au bursicon de drosophile, lequel a été récemment identifié chez l'huître (Stewart et al. 2014).

- Les Cg-GnRH-Rs (Cg-GnRH related receptors) ont ensuite fait l'objet d'études chez *Crassostrea gigas*. Ce sont des RCPGs homologues des récepteurs au GnRH des vertébrés (Rodet et al. 2005, 2008). Chez les vertébrés, le GnRH est une neurohormone gonadotrope clé impliquée dans la régulation de la fonction de reproduction. En effet, elle est responsable de la sécrétion de la FSH et de la LH. Chez l'huître *Crassostrea gigas*, l'épissage alternatif d'un seul ARN prémessager permet d'obtenir différents transcrits codant pour des homologues des récepteurs du GnRH de vertébrés. En effet, l'utilisation exclusive de l'exon E1 ou E2 mène à la synthèse des récepteurs de type I ou à diverses formes de récepteurs de type II qui se distinguent par leur région N-terminale extracellulaire potentiellement impliquée dans la liaison du ligand (Rodet et al. 2008). Ces récepteurs sont exprimés de manière différentielle selon les tissus : les

transcrits des récepteurs de type I sont exprimés essentiellement dans la gonade alors que les transcrits de type II le sont aussi bien dans la gonade que dans d'autres tissus non liés à la reproduction (muscle, branchies…).

La publication d'une banque de données génomiques de l'huître *Crassostrea gigas*, Gigasdatabase (Fleury et al. 2009), regroupant 80 000 séquences indépendantes, a permis de faciliter la recherche *in silico* de récepteurs d'intérêt. Grâce à ces nouvelles données, un nouveau récepteur orphelin de l'huître a pu être identifié et des ligands potentiels (Stewart et al. 2014) ont pu être testé grâce à la méthode d'endocrinologie inverse qui sera abordée dans la partie suivante (Beets et al. 2011). Ce récepteur est le suivant :

- Cg-sNPFR-like (sNPF : short Neuropeptide F), phylogénétiquement proche des récepteurs sNPFRs des arthropodes (Bigot et al. 2014). Chez les arthropodes, les récepteurs sNPFRs sont activés par les neuropeptides F courts impliqués dans une large variété de processus physiologiques : comportement alimentaire, stress osmotique et métabolique, régulation de la locomotion, reproduction et contrôle de la libération d'hormones. Ces neuropeptides ont pour caractéristique commune de partager la séquence RF-amide en position C-terminale (Nässel et al. 2008). Aussi, grâce à l'approche d'endocrinologie inverse, l'activation du récepteur de *Crassostrea gigas* Cg-sNPFR-like par trois peptides potentiels de type RFamide (GSLFRFamide, SSLFRFamide et GALFRFamide) a pu être testée. Les résultats ont montré que l'ensemble de ces peptides active le récepteur de manière dose-dépendante avec une concentration efficace médiane (EC_{50}) de l'ordre du micromolaire. De plus, il a été montré que le gène codant le récepteur est exprimé de manière plus importante au sein des ganglions viscéraux des femelles par rapport aux ganglions des mâles et, est exprimé de manière plus abondante chez les huîtres non nourries. De manière intéressante, ce gène est exprimé de manière maximale au début de la gamétogenèse, lorsque l'activité de stockage des réserves est à son paroxysme. Aussi, cette voie de signalisation semble jouer un rôle dans la coordination entre les fonctions de reproduction et de stockage d'énergie et ce, en favorisant le stockage au détriment de la reproduction.

Face à la profusion de données transcriptomiques, il a paru intéressant de créer une nouvelle base de données complète accessible au public. Pour cela, 2 204 millions de reads obtenus à partir de 114 banques de RNA-seq accessibles au public et utilisant tous les stades de développement embryo-larvaire, organes adultes, tissus d'huîtres exposées à différents

stresseurs environnementaux incluant les métaux lourds, température, salinité et exposition à l'air, ont été assemblés en 56 621 contigs et déposés dans la base GigaTON (Gigas TranscriptOme pipeliNe, www.ngspipelines-sigenae.toulouse.inra.fr) (Riviere et al. 2015). Cette base propose une interface permettant l'extraction des informations sur l'annotation, le niveau d'expression, les UTRs, l'épissage et le polymorphisme, et l'ontologie génique de chacun des contigs, facilitant ainsi la recherche *in silico* de récepteurs orphelins. De ce fait, le projet GigaTON constitue la base de données transcriptomiques la plus complète à ce jour sur les invertébrés marins. D'autre part, des études complémentaires ont été effectuées dans le but de proposer le répertoire complet et annoté des neuropeptides de l'huître (Stewart et al. 2014), facilitant ainsi la recherche ciblée de neuropeptides d'intérêt. Grâce à ces nouvelles bases de données, le récepteur suivant a pu être étudié :

- Cragi-TKR, dont les ligands les tachykinines (TKs) constituent une grande famille de peptides cérébraux et intestinaux conservés sur le plan évolutif chez les animaux bilatériens. Chez les mollusques, bien que les neuropeptides TKs-like aient déjà été identifiés il y a plus de deux décennies, peu d'informations sur leur fonction et leur voie de signalisation étaient disponibles. Aussi, grâce à la méthode d'endocrinologie inverse, l'activation du récepteur Cragi-TKR par les trois peptides potentiels (Cragi-TK1 FGFAPMRamide, Cragi-TK2 : ARFFGLRamide, Cragi-TK3 : FRFTALRamide) identifiés au sein du neuropeptidome de l'huître *Crassostrea gigas* a pu être étudiée (Dubos et al. 2018). Les résultats ont montré que chacun des neuropeptides active le récepteur avec un EC50 de l'ordre du nanomolaire. De plus, l'activation du récepteur est sensible à la substitution des différents acides aminés du peptide Cragi-TK2 par une alanine (technique utilisée afin de déterminer la contribution d'un résidu spécifique). Les résultats ont également montré que le gène codant Cragi-TKR est exprimé de manière ubiquitaire au sein des différents tissus adultes de l'huître avec une expression maximale dans les ganglions viscéraux. En outre, cette expression est d'autant plus importante lorsque les huîtres sont nourries, suggérant ainsi le rôle de la voie signalisation Cragi-TK/Cragi-TKR dans la régulation alimentaire chez l'huître *Crassostrea gigas*. D'autre part, l'expression différentielle du précurseur codant pour l'ensemble des peptides Cragi-TKs au cours du cycle de gamétogénèse, suggère l'implication de cette même voie dans la régulation de la reproduction de l'huître.

- Grâce aux nouvelles données génomiques et transcriptomiques et à l'utilisation de l'endocrinologie inverse, l'activation des récepteurs : Cg-GnRHRII-L, Cg-GnRHII-S et Cg-GnRHR par le neuropeptide d'huître *Crassostrea gigas* AKH (pQVSFSTNWGS-amide) a été testée (Li et al. 2016) des années après les premières publications (Rodet et al. 2005, 2008) . En effet, chez les Protostomiens, l'AKH fait partie de la liste des ligands potentiels des récepteurs de GnRH avec la GnRH-like, la corazonine et l'AHK/corazonine-related peptide (ACP) et est un régulateur clé de la mobilisation d'énergie chez les insectes. De plus, des recherches au sein de plusieurs bases de données, ont permis d'identifier deux nouveaux récepteurs potentiels de l'AKH : Cg-AKHR2 et Cg-AKHR1D. Il est à noter que le récepteur Cg-AKHR1D correspond au quatrième variant d'épissage du récepteur Cg-AKHR1 ; les trois premiers Cg-AKHR1A, Cg-AKHR1B et Cg-AKH1C étant les récepteurs nommés respectivement GnRHRII-L, Cg-GnRHII-S et Cg-GnRHR (Rodet et al. 2008). Les tests fonctionnels ont permis de montrer que deux de ces récepteurs, Cg-AKHR1A et Cg-AKHR1B sont activés par l'AKH d'huître. Une seconde étude (Dubos et al. 2017) a permis de compléter les connaissances sur cette voie de signalisation chez l'huître. En effet, les expériences en spectrométrie de masse ont permis de confirmer la structure primaire de Cg-AKH dans des extraits de ganglions viscéraux. De plus, il a pu être montré que le précurseur codant pour Cg-AKH est exprimé principalement au sein de ces ganglions mais, à des niveaux très faibles par rapport au gène codant le GnRH de l'huître. Toutefois, alors que l'AKH est connu chez les arthropodes pour son rôle dans la mobilisation de l'énergie, aucune expression différentielle significative du gène codant le Cg-AKH n'est observée entre des huîtres à jeun depuis 4 semaines et des huîtres nourries. De la même manière, aucune différence d'expression n'a été observée au cours du cycle de gamétogenèse pourtant étroitement lié à la mise en réserve du glycogène chez l'huître. Aussi, il est possible que l'AKH puisse jouer un rôle différent de celui de la régulation énergétique chez l'huître.

Bien que les banques de données génomiques et transcriptomiques de l'huître permettent de faciliter la recherche de RCPGs orphelins, les homologies de séquence entre les RCPGs de vertébrés et d'invertébrés déjà « déorphanisés » ou prédits, ne suffisent pas toujours à identifier un RCPG d'intérêt. De plus, comme évoqué précédemment, il existe une telle disparité entre les ligands de vertébrés et ceux de Lophotrochozoaires, qu'il est difficile de prédire les ligands d'un RCPG chez l'huître. Toutefois, des études globales de co-évolution ligands/RCPGs, ont

permis de prédire des correspondances entre les peptides de vertébrés et d'arthropodes (Jekely 2013; Mirabeau and Joly 2013). En effet, ces études ont montré que les systèmes peptidergiques comprenant un ou des peptides et leur(s) récepteur(s), n'étaient pas spécifiques aux différents phyla mais que ces systèmes partageaient une origine remontant à l'ancêtre commun des Bilatériens. Ainsi, plusieurs récepteurs de la branche β de la famille Rhodopsine (notamment les récepteurs à la CCK/SK qui font l'objet du chapitre I de cette thèse) partagent une organisation commune des gènes avec la présence d'un intron à une position spécifique identique conservée chez les Deutérostomiens et les Protostomiens. De plus, il a été montré que des caractéristiques sont conservées au sein de plusieurs familles de précurseurs de neuropeptides (notamment CCK/SK et CT/DH31). Ces caractéristiques comprennent entre autres la position des peptides au sein de la séquence du précurseur, la position des gènes par rapport à d'autres (synténie), les résidus clés, la présence de paires de résidus cystéines dans les séquences des peptides AVP et CT/DH31. Il est à noter que la synténie peut parfois être difficile à réaliser selon la qualité d'assemblage des génomes, comme cela est souvent le cas chez les Lophotrochozoaires.

Toutefois, l'ensemble de ces informations permettent d'apporter une aide importante dans la recherche de couples peptide(s)/récepteur(s). De ce fait, après avoir établi des couples potentiels, il est nécessaire de tester l'activation des différents RCPGs par les ligands putatifs et ce, grâce à la méthodologie d'endocrinologie inverse.

5 « Déorphanisation » des récepteurs par endocrinologie inverse

5.1 Différentes méthodes de « déorphanisation »

Les RCPGs forment la plus grande famille de récepteurs de surface cellulaire et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Leurs premiers ligands ont été identifiés bien avant que leurs récepteurs associés ne le soient et surtout, lorsque le concept de récepteur était encore controversé (Rang 2006). Ces tous premiers ligands sont l'adrénaline, la sérotonine, l'acétylcholine et la morphine pour ne citer qu'eux. Bien que durant deux décennies de nombreux récepteurs aient été clonés, certains récepteurs dont les ligands n'avaient pas pu être identifiés, ont été nommés récepteurs "orphelins". Afin de pouvoir "déorphaniser" ces récepteurs, c'est-à-dire identifier leurs ligands, une stratégie a été mise en place, la pharmacologie inverse également appelée endocrinologie inverse.

Cette stratégie repose sur l'expression des récepteurs dans un système hétérologue. Un ensemble composé de ligands potentiels est ensuite criblé contre le récepteur étudié dont l'activation est mesurée. Plusieurs stratégies d'endocrinologie inverse ont été mises en place (Figure 27) :

- Une première stratégie, appelée "tissue extract-based approach" consiste à tester des extraits de tissus d'animaux sur des cellules surexprimant un récepteur orphelin. Les extraits induisant une activation du récepteur sont fractionnés progressivement par chromatographie liquide à haute performance jusqu'à ce que le composé actif soit extrait et caractérisé. Cependant, cette méthode nécessite l'utilisation d'un ligand stable et suffisamment concentré pour être détecté. De plus, il est possible que le récepteur ne soit pas activé par son ligand endogène du fait de l'absence de celui-ci au sein de l'extrait de tissu étudié. En effet, le ligand recherché peut être synthétisé dans un autre tissu de l'animal ou seulement lors de conditions spécifiques telle que l'inflammation. Toutefois, cette méthode est utile lorsque la nature des ligands potentiels est inconnue et ne peut être prédite par des analyses phylogénétiques portant sur les récepteurs ou lorsque le neuropeptidome de l'organisme étudié n'est pas connu. (Meunier et al. 1995; Sakurai et al. 1998; De Jong-Brink et al. 2001)
- Une deuxième stratégie appelée "library-based approach" nécessite d'avoir accès à une banque de ligands ou bibliothèque (Civelli et al. 2001). Il existe dans le commerce de nombreuses collections de molécules conçues pour le criblage (Gordon 2007). Ces bibliothèques essaient de couvrir autant de classes chimiques actives connues que possibles tels des peptides, protéines, lipides, médicaments, composés bioactifs et produits chimiques de synthèse. Ces bibliothèques sont ensuite mises en contact avec une vaste bibliothèque de récepteurs orphelins exprimés dans des systèmes hétérologues. L'avantage de cette technique par rapport à la première est qu'elle ne nécessite pas la mise en œuvre de techniques de séparation. Toutefois, ces bibliothèques comprennent principalement des molécules actives chez l'homme et les mammifères modèles, limitant ainsi la « déorphanisation » de récepteurs d'autres espèces. Cependant, cette méthode peut être appliquée sur ces modèles lorsque le laboratoire possède sa propre collection de ligands (Janssen et al. 2008).

- Une troisième stratégie appelée “in silico-based approach” nécessite l’identification de ligands potentiels dans une base de données déjà établie tel qu’un neuropeptidome (Huang 2005). Ces ligands sont ensuite synthétisés et leur activité est testée sur des récepteurs orphelins exprimés dans des lignées cellulaires (Dubos et al. 2018). Au vu de la caractérisation du neuropeptidome chez l’huître, cette stratégie a été adoptée dans le cadre de cette thèse afin d’identifier des couples neuropeptide(s)/récepteur(s).

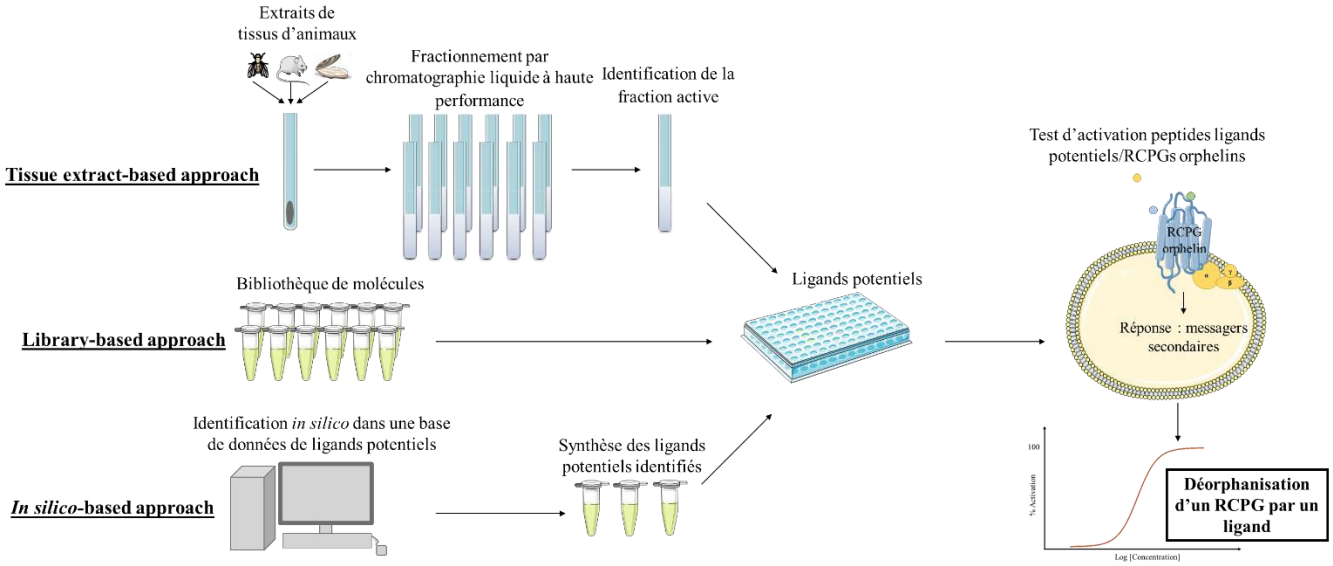


Figure 27 : Différentes stratégies de « déorphanisation » pouvant être mises en place. Adaptée de (Beets et al. 2011).

Ces trois approches nécessitent l’expression du RCPG d’intérêt, *via* une construction plasmidique contenant l’ADN complémentaire (ADNc) codant le RCPG orphelin en aval d’un promoteur fonctionnel, dans des systèmes d’expression hétérologue. En effet, ces systèmes ont pour avantage de permettre une expression importante de protéines recombinantes à la surface des cellules. Divers systèmes d’expression peuvent être utilisés tels que les lignées cellulaires de mammifères immortalisées, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les ovocytes et les mélanophores de *Xenopus laevis*. Bien que chacune des méthodes permette de caractériser les RCPGs orphelins, la méthode la plus couramment utilisée consiste à exprimer les récepteurs d’intérêt dans des cellules de mammifères. En raison de leur facilité d’utilisation, ces cellules sont majoritairement des cellules HEK (Human Embryonic Kidney) et CHO (Chinese Hamster Ovary). L’activation du RCPG par son ligand potentiel est déterminée grâce à la mesure de la concentration des messagers secondaires. Cette mesure est réalisée grâce à des protéines bioluminescentes sensibles au calcium comme l’æquorine ou à des indicateurs de calcium fluorescents comme le Fluo-4.

5.2 Méthode de « déorphanisation » utilisée au cours de la thèse

Afin d'identifier des couples neuropeptide(s)/récepteur(s), la première stratégie adoptée vise à déterminer la mobilisation de calcium intracellulaire grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. Cette première étape permet de rendre compte de l'activation du récepteur d'intérêt par un neuropeptide candidat.

Afin de garantir des taux élevés d'expression et de traduction du récepteur, une séquence consensus Kozak est ajoutée à l'extrémité 5' de la séquence codant pour le récepteur d'intérêt qui est ensuite clonée dans un vecteur d'expression de type pcDNA. Dans ce projet de thèse, deux vecteurs d'expression ont été utilisés: pcDNA3.1 (Invitrogen) et pTarget (Promega). Dans la mesure où il est difficile de présumer du couplage de la protéine G endogène d'un récepteur orphelin sur la seule information de sa séquence, il est impossible de prédire les voies de signalisation secondaires (par exemple calcium ou AMPc) modulés par l'activation du RCPG par le ligand potentiel.

Aussi, pour pallier ce problème, des protéines G de la famille Gαq (par exemple, Gα15 murine ou Gα16 humaine utilisée dans le cadre de cette thèse) peuvent être coexprimées avec le RCPG d'intérêt dans les cellules (Figure 28). Ces protéines se couplent à la grande majorité des RCPGs (Offermanns and Simon 1995) et leur activation induit la libération de calcium qui peut être détectée en chargeant les cellules avec un colorant sensible au calcium comme le Fluo-4 direct avant le test fonctionnel. Il est à noter que dans des conditions de repos cellulaire, le signal fluorescent émis par le Fluo-4 est négligeable. Cependant, lors de l'activation du récepteur par son ligand, le calcium libéré entraînera l'émission d'un signal très important, rendant le ratio bruit de fond/signal très faible. L'excitation du Fluo-4 se produit à 488 nm et la fluorescence d'émission est mesurée à 525 nm. Afin de mesurer la libération de calcium, différents fluorimètres peuvent être utilisés comme le lecteur de plaques d'imagerie par fluorescence (FLIPR), le NOVOstar ou dans le cadre de cette thèse, la FlexStation (FlexStation 3). Ces différents appareils ont pour avantage de permettre simultanément l'ajout des ligands et la détection du signal Fluo-4 émis lors de l'activation du récepteur.

En présence d'une activation, l'objectif du travail est de déterminer quel type de protéine G se couple de manière endogène au récepteur.

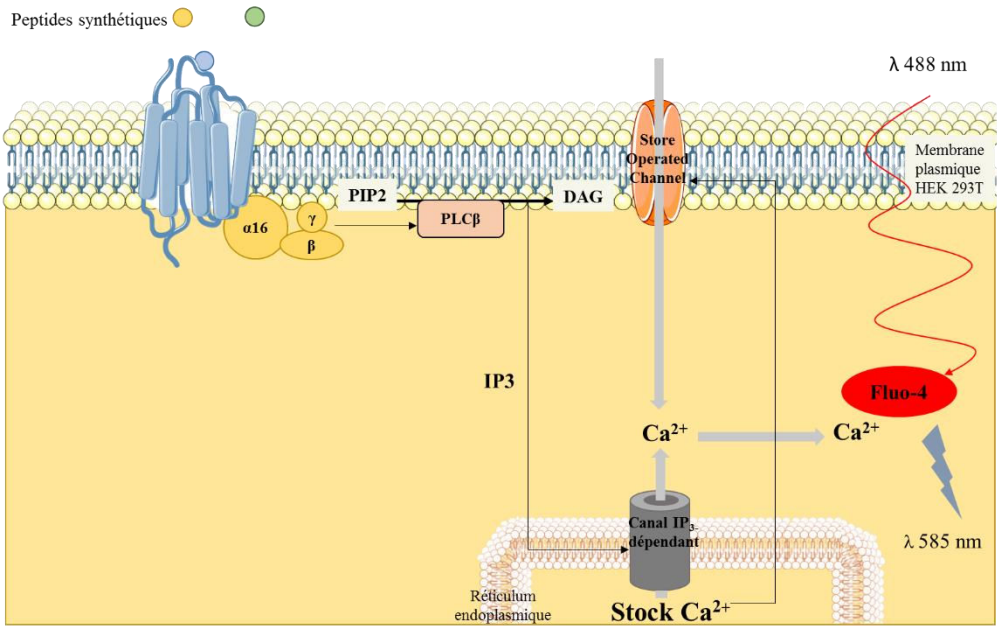


Figure 28 : Principe de la « déorphanisation » d'un RCPG grâce à la protéine Gα16. IP3 : inositol 3-phosphate, PLCβ : phospholipase C β; PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; DAG : diacylglycérol.

En effet, après avoir identifié un couple neuropeptide/récepteur, l'étape suivante consiste à déterminer le type de voie secondaire activé par la liaison du neuropeptide à son récepteur. Pour cela, le récepteur d'intérêt est exprimé dans la cellule de mammifère en absence de protéine Gα16. Ainsi, la mobilisation de calcium intracellulaire induite par l'activation du récepteur par son ligand, ne dépend pas du couplage de la protéine Gα16 au récepteur d'intérêt mais du couplage d'une protéine Gαq endogène. Dans le cas où le RCPG activé induit une augmentation de calcium intracellulaire uniquement lorsque la protéine Gα16 est présente, cela signifie que d'autres types de protéine G sont impliqués dans le couplage au récepteur. Pour connaître le type de protéine G concerné, Gαs ou Gαi, des tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) peuvent permettent de mesurer les niveaux d'AMPc grâce à l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement l'AMPc intracellulaire. La méthode employée lors de cette thèse utilise une sonde luminescente, appelée GloSensorTM (Promega®). Cette sonde est composée d'une forme mutante de la luciférase issue de l'insecte *Photinus Pyralis*, dans laquelle la sous-unité régulatrice de la PKA comportant le site de liaison de l'AMPc, a été insérée. La liaison de l'AMPc induit un changement conformationnel se traduisant par un rapprochement des deux domaines de la luciférase menant à une émission de lumière proportionnelle à la quantité de sonde « activée ». Cette méthode permet d'évaluer le couplage des protéines Gαs et Gαi au récepteur d'intérêt. Toutefois, pour les besoins de cette thèse, seul le couplage de la protéine de type Gαs au RCPG d'intérêt a été investigué (Figure 29).

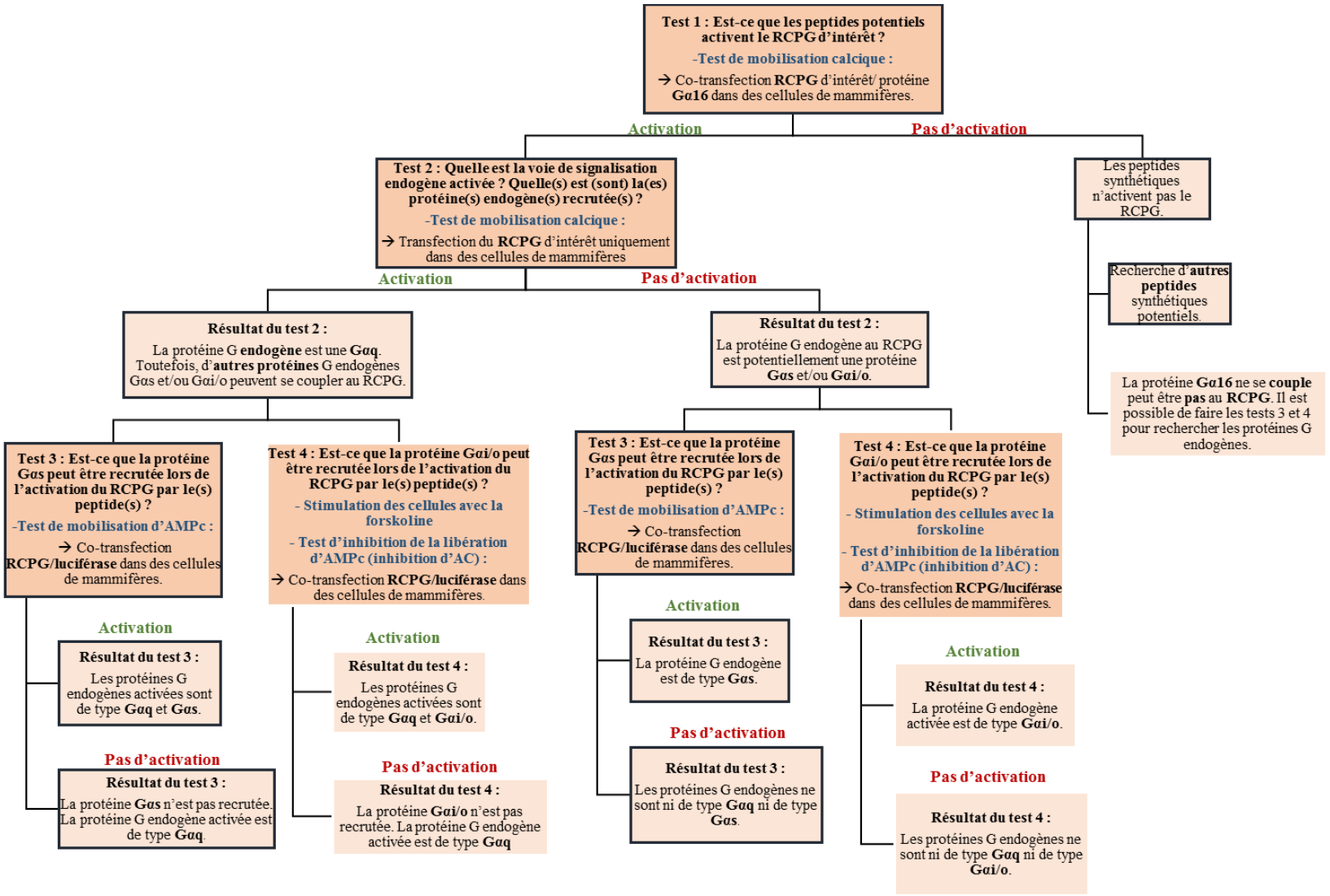


Figure 29 : Principe de la recherche des principales protéines G endogènes impliquées dans le couplage au RCPG d'intérêt. Les rectangles entourés d'un contour noir représentent les différentes étapes effectuées lors de cette thèse.

6 Objectifs de la thèse

L'objectif de cette thèse est de caractériser de manière fonctionnelle des couples neuropeptide(s)/récepteur(s) impliqués dans la physiologie de l'huître. En effet, la grande majorité des récepteurs de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sont dits orphelins, c'est-à-dire sans ligands associés connus. Afin de permettre la « déorphanisation » de ces RCPGs, la méthode d'endocrinologie inverse a été employée. Cette méthode permet d'identifier des ligands de récepteurs orphelins en éprouvant l'activité d'un panel de ligands potentiels sélectionnés parmi les neuropeptides caractérisés au sein du neuropeptidome de l'huître *Crassostrea gigas*.

Ce neuropeptidome a été réalisé grâce à des recherches *in silico* couplées à des analyses d'extraits de ganglions viscéraux en spectrométrie de masse. L'ensemble de ces analyses a permis de prédire un répertoire relativement exhaustif de neuropeptides, c'est-à-dire de ligands potentiels de RCPGs orphelins. L'ensemble de ces neuropeptides a été annoté d'après des homologies de séquences avec des ligands déjà caractérisés chez d'autres espèces comme l'homme ou la drosophile. Cependant, ces homologies sont relativement faibles, ce qui rend les annotations peu informatives mais utiles et nécessaires afin de présélectionner les ligands présentant un intérêt d'étude.

Pour ce travail de thèse, trois grandes voies de signalisation ont été étudiées chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : la voie gastrine/CCK/SK, la voie CT/CGRP (« Calcitonin Gene-Related Peptide »)/DH31 (« Diuretic Hormone ») ainsi que la voie dopamine, constituant les trois chapitres de cet ouvrage.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des recherches menées en endocrinologie qui s'intéressent à l'histoire évolutive de couples ligands/récepteurs ainsi qu'à leurs fonctions physiologiques associées depuis l'ancêtre commun des Bilatériens. Ainsi, pour répondre à cette vaste problématique, de nombreuses recherches ont été menées chez les espèces deutérostomiennes avec pour principaux modèles d'études : l'homme, le rat et la souris. Chez les Protostomiens, bien qu'un nombre important d'expérimentations ait été mené chez les Ecdysozoaires *via* l'étude des espèces *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*, peu de recherches ont été effectuées chez les Lophotrochozoaires. Toutefois, grâce à l'émergence de données transcriptomiques et génomiques disponibles chez l'huître *Crassostrea gigas*, l'étude des voies neuroendocriniennes chez les Lophotrochozoaires est désormais facilitée.

Par ailleurs, une meilleure connaissance des voies neuroendocriniennes à l'origine du contrôle de la physiologie chez l'huître permet de mieux comprendre comment cet organisme particulièrement résiliant, peut faire face à de nombreuses contraintes environnementales et s'adapter afin de survivre.

Chapitre I :

Identification d'une voie de signalisation de type cholécystokinine/sulfakinine chez l'huître Crassostrea gigas

Chapitre I : identification d'une voie de signalisation de type cholécystokinine/sulfakinine chez l'huître *Crassostrea gigas*

La caractérisation du neuropeptidome de l'huître creuse *Crassostrea gigas* a permis d'identifier de manière relativement exhaustive le répertoire des neuropeptides (Stewart et al. 2014). Au sein de celui-ci, deux neuropeptides présentent des homologies de séquence avec les peptides appartenant à la famille de la cholécystokinine ou CCK (Stewart et al. 2014; Zatylny-Gaudin and Favrel 2014), comprenant la gastrine des mammifères, la cæruléine et la phyllocæruléine des amphibiens, la cionine de *Ciona intestinalis* et les sulfakinines (SKs) des arthropodes. Toutefois, ces homologies sont subtiles et seulement quelques résidus sont conservés. Face à la difficulté d'identifier des peptides de même famille chez les différentes espèces, il apparaît comme nécessaire de s'intéresser à leurs récepteurs. En effet, les RCPGs liant les peptides d'une même famille sont phylogénétiquement apparentés (Jekely 2013; Mirabeau and Joly 2013) et de ce fait, possèdent des domaines de séquences homologues (Johnsen 1998) et des caractéristiques communes. Ainsi, les récepteurs aux peptides de type CCK/SK, les CCKRs/SKRs, partagent une organisation génomique particulière, puisque les gènes codant les récepteurs possèdent un intron présent à une position spécifique conservée au cours de l'évolution (Mirabeau and Joly 2013). C'est sur la base de ces homologies et de ces caractéristiques que des récepteurs potentiels à la CCK/SK d'huître ont pu être identifiés au sein des banques de données transcriptomiques (Riviere et al. 2015). Parmi ces CCKRs/SKRs d'huître potentiels, des expériences préliminaires avaient permis de cloner l'un d'eux. Aussi, cette thèse propose de compléter ces premiers travaux en étudiant la voie de signalisation CCK/SK chez l'huître.

1 Découverte de la CCK et de la gastrine

La CCK a été découverte en 1928 par Ivy et Oldberg dont les expériences réalisées sur des chiens, ont montré que le mucus de la partie haute de l'intestin grêle contenait une substance qui, déversée dans le courant sanguin, favorisait la contraction de la vésicule biliaire (Ivy and Oldberg 1928). Plus tard, en 1943, les expériences menées par Harper et Raper, ont montré que des extraits intestinaux de porc contenaient une hormone, distincte de la sécrétine, capable de

stimuler la sécrétion d'enzymes pancréatiques suite à une administration en intraveineuse (Harper and Raper 1943). Cette hormone fut désignée dans un premier temps sous le nom de pancréozymine (PZ). Puis, les recherches entreprises par Mutt et Jorpes en 1971, ont permis d'isoler un polypeptide long de 33 acides aminés possédant les propriétés décrites aussi bien pour la CCK que pour la PZ (Mutt and Jorpes 1971). Ces expériences ont donc montré que la CCK et la PZ étaient une seule et même hormone renommée alors « cholécystokinine-pancréozymine » (CCK-PZ). Par la suite, l'hormone sera appelée plus simplement CCK. Bien que la CCK fût dans un premier temps décrite au niveau du tube digestif, d'importantes quantités de cette hormone furent découvertes dans les cellules endocrines de la muqueuse intestinale et dans le SNC et périphérique (Dockray et al. 1978).

Le séquençage de la CCK révéla qu'elle est structurellement proche d'une autre hormone, la gastrine (Larsson and Rehfeld 1977; Mutt 1994).

En 1905, Edkins a montré l'existence d'une substance extraite de la muqueuse gastrique stimulant la sécrétion d'acide gastrique et distincte de l'histamine (Edkins 1905). Toutefois, ce n'est qu'en 1962 que la gastrine fût isolée à partir de la muqueuse antrique de porc par Gregory et Tracy (Gregory et al. 1964).

2 Biosynthèse de la CCK et de la gastrine

Grâce aux techniques de biologie moléculaire, la structure du produit de la traduction de l'ARNm de la CCK primaire a été déterminée. Chez l'homme, un ARNm de 345 nucléotides code pour un précurseur de 115 acides aminés, produit d'un gène situé sur le chromosome 3 (Massoubre et al. 2002). Ce précurseur comprend un peptide signal de 20 acides aminés, la CCK-83 et un domaine C-terminal. (Figure 30) Au cours de la maturation, le domaine C-terminal est clivé, la phénylalanine est amidée et différentes formes de CCK (CCK-58, CCK-33, CCK-22, et CCK-8) peuvent être générées par clivage protéolytique de la CCK-83. Les formes CCK-83, CCK-58, CCK-33, CCK-22 et CCK-8 sont présentes dans le plasma et la forme CCK-8 est également exprimée au sein du système nerveux (Beinfeld 2003; Rehfeld et al. 2007).

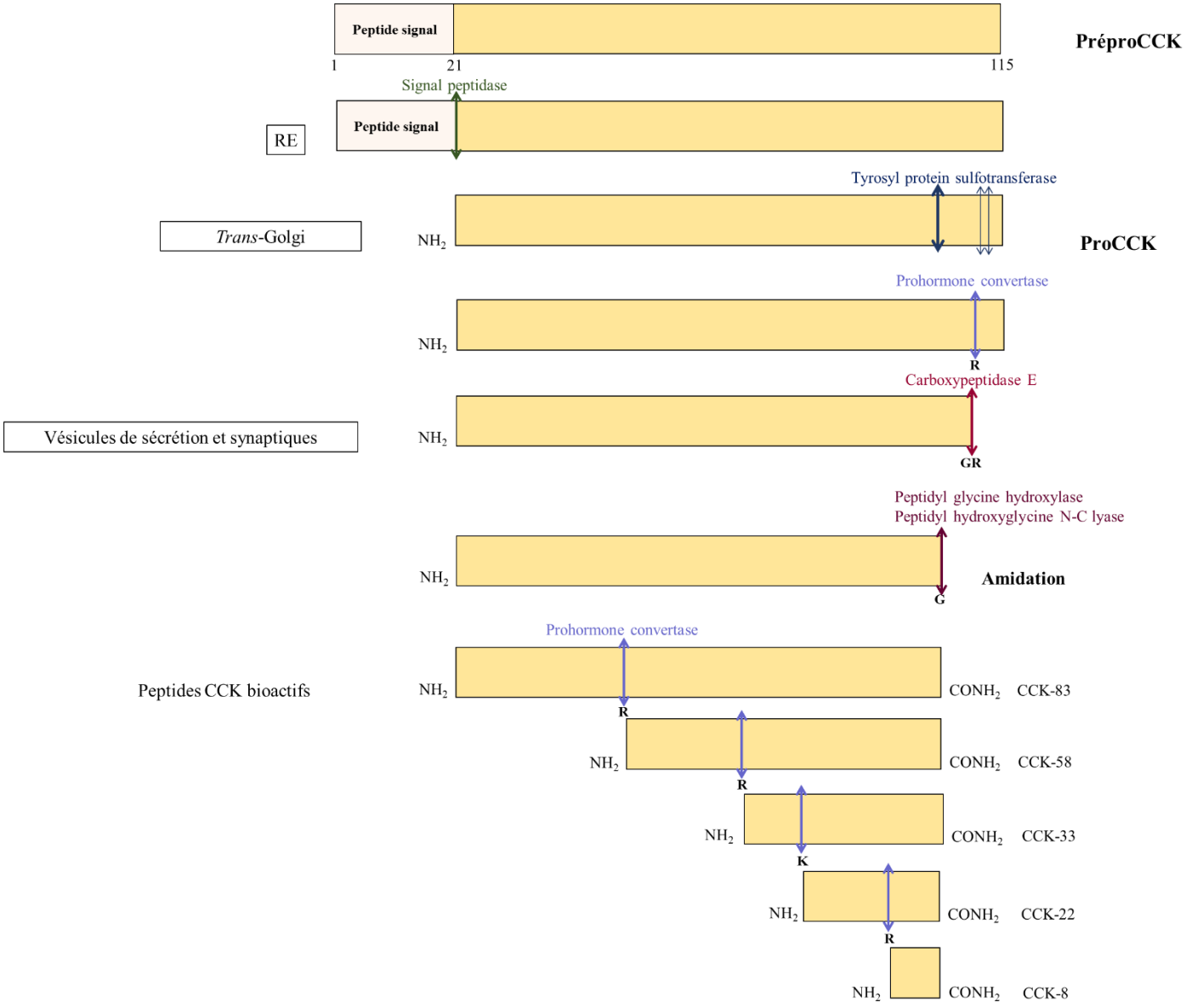


Figure 30 : Biosynthèse de la CCK. L'emplacement de la tyrosine conservée lors de la maturation est indiqué par une flèche violette épaisse. RE: réticulum endoplamisque. Adaptée de (Rehfeld et al. 2007).

Il existe des similarités de séquences et de structure entre les propeptides de la CCK et de la gastrine. En effet, les peptides actifs résultant de ces deux propeptides sont amidés au niveau d'une phénylalanine et les tyrosines peuvent être sulfatées par la « tyrosyl protein sulfotransferase ». Ces particularités communes ont permis de suggérer que ces deux propeptides ont évolué depuis un même ancêtre commun (Johnsen 1998).

En effet, chez l'homme, un ARNm de 303 nucléotides code un précurseur, la préprogastrine, de 101 acides aminés, produit d'un gène situé sur le chromosome 17. Au cours de la maturation du précurseur, le domaine C-terminal est clivé, la phénylalanine est amidée et différentes formes de gastrine (gastrine-34 et gastrine-17) peuvent être générées par différents clivages protéolytiques (Figure 31). Il est à noter que la séquence de la gastrine 17, également appelée

gastrine I, possède une tyrosine qui, lorsqu'elle est sulfatée donne lieu à la gastrine II (Rehfeld et al. 2007).

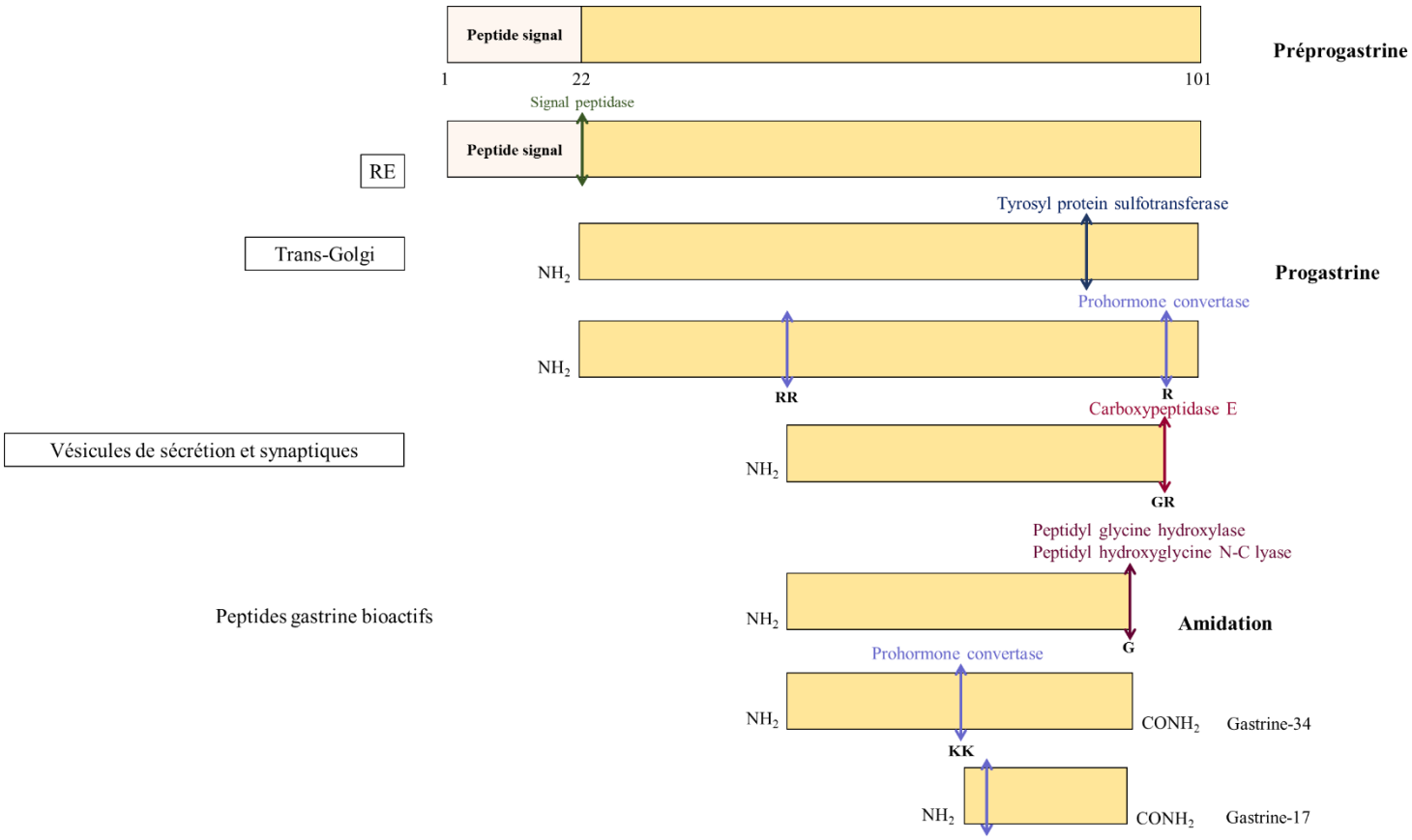


Figure 31 : Biosynthèse de la gastrine. L'emplacement de la tyrosine est indiqué par une flèche violette épaisse. RE: réticulum endoplasmique. Adaptée de (Rehfeld et al. 2007).

Bien que les biosynthèses de la CCK et de la gastrine présentent des similarités, leurs effets physiologiques leur sont propres.

3 Effets physiologiques de la gastrine

La sécrétion de la gastrine est stimulée dans un premier temps *via* le système nerveux autonome par le GRP (Gastrin-Releasing Peptide), en réponse à différents signaux sensoriels (olfactifs gustatifs, tactiles et thermiques) avant, pendant et après la prise alimentaire. Sa sécrétion par les cellules G de l'antre pylorique est ensuite entretenue et amplifiée par l'arrivée des aliments dans l'estomac, de manière locale par voie réflexe impliquant les plexus nerveux et par le système nerveux autonome. Il est à noter que la sécrétion de gastrine peut être stimulée par l'action de la caféine, l'alcool et les protéines absorbées. Une fois produite, la gastrine entraîne la stimulation de la sécrétion d'acide chlorhydrique et de pepsinogène par respectivement, les cellules pariétales et principales de la région fundique de l'estomac (Clos 2012).

La gastrine a également une action trophique (Dufresne et al. 2006). En effet, elle stimule la prolifération et la différenciation des cellules de la muqueuse gastrique et intestinale. Ce rôle trophique a été mis en évidence pour la première fois chez des patients atteints de gastrinôme (syndrome de Zollinger-Ellison) présentant des hypertrophies de la muqueuse gastrique entraînant une hypersécrétion acide (Zollinger and Ellison 1955).

La sécrétion de la gastrine est ensuite inhibée par un rétrocontrôle local initié par l'acide chlorhydrique *via* les cellules à somatostatine lorsque le suc gastrique atteint un taux d'acidité suffisamment élevé (pH ≈ 2) et par un rétrocontrôle *via* la libération d'hormones dites « entérogastrones ». Ces hormones comprennent la sécrétine, le GIP (Gastric Inhibitory Peptide) et la CCK et sont libérées lors de l'arrivée des nutriments dans l'intestin.

4 Effets physiologiques de la CCK

La concentration plasmatique en CCK augmente après la prise alimentaire. En effet, la CCK est sécrétée par les *cellules I* localisées dans le duodénum et les premières anses jéjunales sous l'effet de l'arrivée de peptones, d'acides aminés, d'acides gras à longue chaîne et d'acide chlorhydrique dans la lumière intestinale. En synergie avec la sécrétine, la CCK stimule la sécrétion d'enzymes pancréatiques. De plus, la CCK stimule la contraction de la vésicule biliaire, ce qui entraîne la libération de la bile au sein du duodénum (Rehfeld et al. 2007) (Figure 32). La CCK stimule également la motilité gastrique et intestinale et entraîne le relâchement du cardia et du muscle sphincter de l'ampoule hépato-pancréatique (ou sphincter d'Oddi). La CCK possède aussi une action trophique et est considérée comme un régulateur physiologique de la croissance du pancréas. Elle participe également à stimuler la sécrétion de la calcitonine, de l'insuline et du glucagon. La CCK est également synthétisée au sein du SNC et participe à l'induction de la satiété. En effet, il a été montré que l'administration de CCK diminue la prise alimentaire (Gibbs et al. 1973) par l'activation du CCK1R (Kopin et al. 1999). Ainsi la CCK agirait au niveau périphérique en tant que modulateur des sécrétions digestives et des muscles gastro-intestinaux et au niveau central, *via* la transmission d'informations par le nerf vague au noyau du tractus solitaire. L'information atteint ensuite l'hypothalamus qui permet de réguler l'appétit (Smith et al. 1981; Rehfeld 2017).

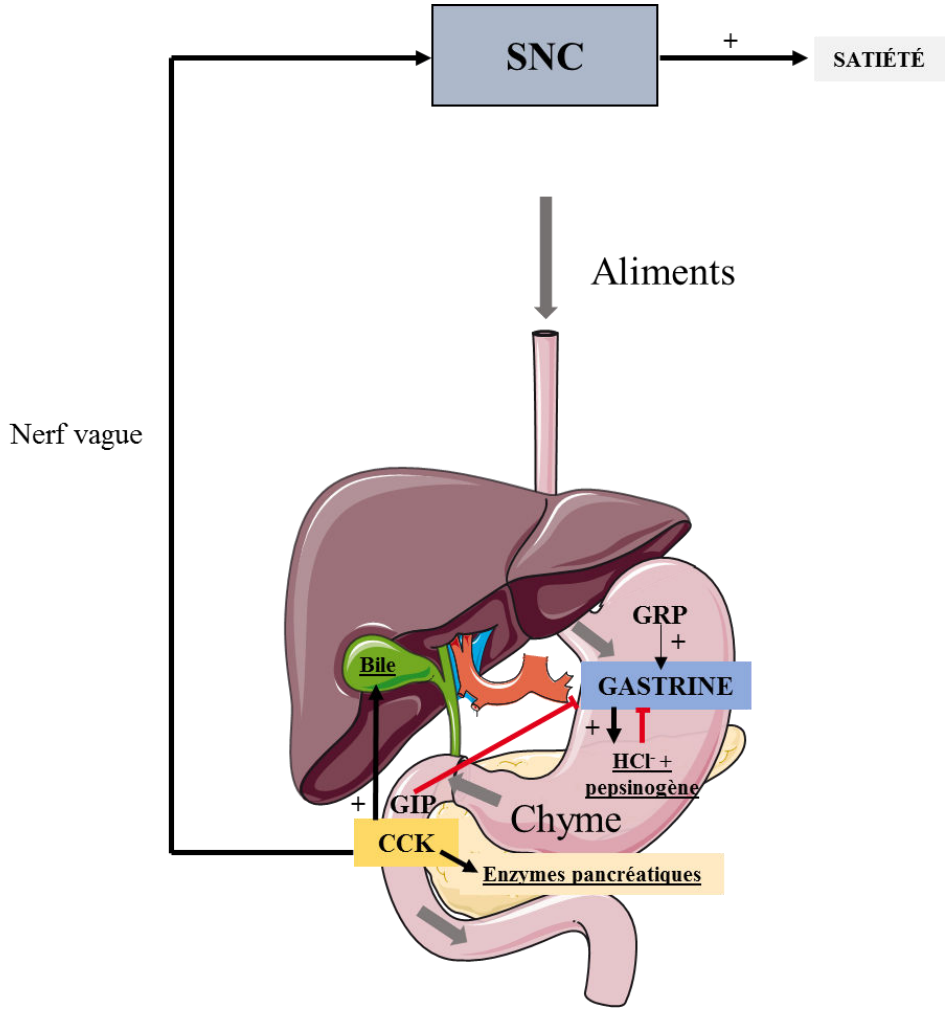


Figure 32 : Effets de la CCK et de la gastrine. Les flèches grises représentent le trajet du bol alimentaire. Les flèches noires représentent l'action activatrice du GRP (*Gastrin-Releasing Peptide*), de la gastrine et de la CCK sur respectivement, la libération de la gastrine, de l'acide chlorhydrique (HCl^-) et du pepsinogène, des enzymes pancréatiques et de la bile. La CCK promeut également le phénomène de satiété. Les flèches rouges représentent l'action inhibitrice de l'HCl^-, du pepsinogène et du GIP (*Gastrin Inhibitory Peptide*) sur la libération de gastrine. SNC : système nerveux central.

5 Récepteurs à la CCK et à la gastrine

Les récepteurs à la CCK et à la gastrine appartiennent à la superfamille des RCPGs et plus précisément à la famille des récepteurs de type Rhodopsine. Chez les vertébrés, deux récepteurs nommés dans un premier temps CCK-AR (A pour *alimentary*) et CCK-BR (B pour *brain*) puis CCK1R et CCK2R ont été identifiés. Le récepteur CCK1R intervient dans la contraction de la vésicule biliaire, le relâchement du sphincter d'Oddi, la sécrétion d'enzymes pancréatiques et l'inhibition de la sécrétion d'acide gastrique *via* la somatostatine. De plus, le CCK1R est présent au niveau de l'hypophyse antérieure, du plexus myentérique (ou d'Auerach) impliqué dans la motricité intestinale et dans le mésencéphale (Figure 33). Le récepteur CCK2R est présent au niveau du cerveau et de manière importante au sein des îlots pancréatiques (Rehfeld 2017). Le récepteur CCK1R montre une spécificité 500 fois plus importante pour la CCK que pour la

gastrine. De manière intéressante, le peptide CCK a une affinité entre 500 et 1000 fois supérieure pour ce récepteur lorsqu'il est sous sa forme sulfatée. Le second récepteur, CCK2R, présente la capacité de lier avec une affinité quasi-similaire de l'ordre du nanomolaire la CCK et la gastrine sous leurs formes sulfatées et non sulfatées (Silvente-Poirot and Wank 1996; Wank 1998; Fourmy et al. 2002).

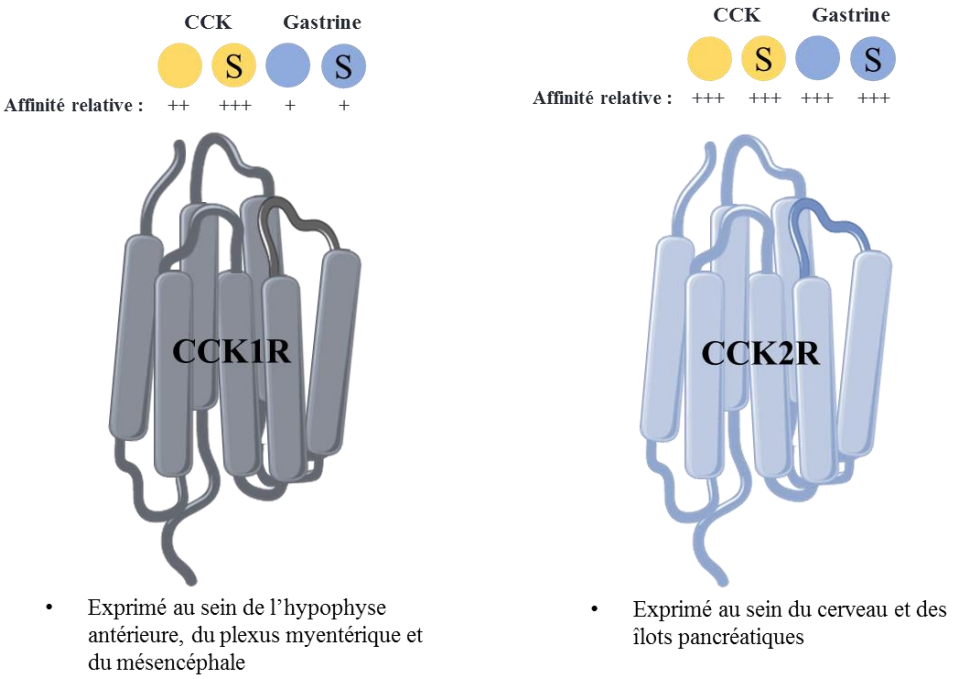


Figure 33 : Expression différentielle et affinité des CCKRs avec la CCK (ligand jaune) et la gastrine (ligand bleu). S : sulfaté.

6 Voies de transduction du signal activées par les CCKRs

L'activation des deux types de récepteurs CCK1R et CCK2R entraîne le recrutement d'une protéine de type Gαq/11 et par conséquent, l'augmentation du taux de calcium intracellulaire. L'activation de CCK1R peut également activer l'AC *via* le couplage du récepteur à une protéine Gαs. En effet, dans les cellules acineuses pancréatiques, l'activation du récepteur par la CCK induit une augmentation du taux d'AMPc (Marino et al. 1993) (Figure 34). Par ailleurs, l'activation de CCK1R par la CCK entraîne l'augmentation de l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS) produisant la NO. Par conséquent, cette production *via* l'activation de la guanylate cyclase cytosolique mène à l'augmentation de la concentration en GMPc intracellulaire impliquée dans la prolifération cellulaire (Cordelier et al. 1997) et la protection de la muqueuse gastrique (West et al. 2003). L'activation des deux récepteurs active la voie des MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) liés à de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et la migration cellulaire. De plus, l'activation de CCK1R et CCK2R semblerait

promouvoir la voie Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) qui est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la survie, la synthèse protéique et l'adhésion (Dufresne et al. 2006). L'activation des récepteurs active également des protéines kinases de l'adhérence focale, les FAK (*Focal Adhesion Kinase*) ainsi que leurs protéines associées (p125-FAK, p130Cas et paxilline) (Garcia et al. 1997; Yu et al. 2004). De plus, des tests *in vivo* et *in vitro* ont montré que le CCK2R active la voie JAK2/STAT3 (Janus kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) (Ferrand et al. 2005). Ce mécanisme met en jeu l'activation de la protéine Gαq et nécessite la présence du domaine NPXXY (Figure 1 article « Emergence of a cholecystokinin/sulfakinin signalling system in Lophotrochozoa ») localisé à la fin du TM7. Cette voie de signalisation participe à la croissance (Dufresne et al. 2006).

Par ailleurs, l'activation des CCK1R et CCK2R active les petites GTPases responsables de la prolifération et de l'action antiapoptotique de la gastrine (Stepan et al. 2004) et, de la sécrétion d'amylase (Bi and Williams 2005). Au sein des cellules du muscle lisse de l'intestin, de fortes concentrations de CCK activent également les protéines Gα12/13 ainsi que les RhoA. De plus, de très fortes concentrations de CCK induisent l'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor-Kappa B) qui régule les processus inflammatoires pouvant causer des pancréatites chez les rats (Han and Logsdon 1999). Par ailleurs, au sein des cellules épithéliales gastriques, l'activation de CCK2R entraîne l'expression des gènes proinflammatoires telle l'interleukine-8 (Hiraoka et al. 2001). Enfin, l'activation de ce même récepteur entraîne la transactivation des récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGF) (Guo et al. 2002).

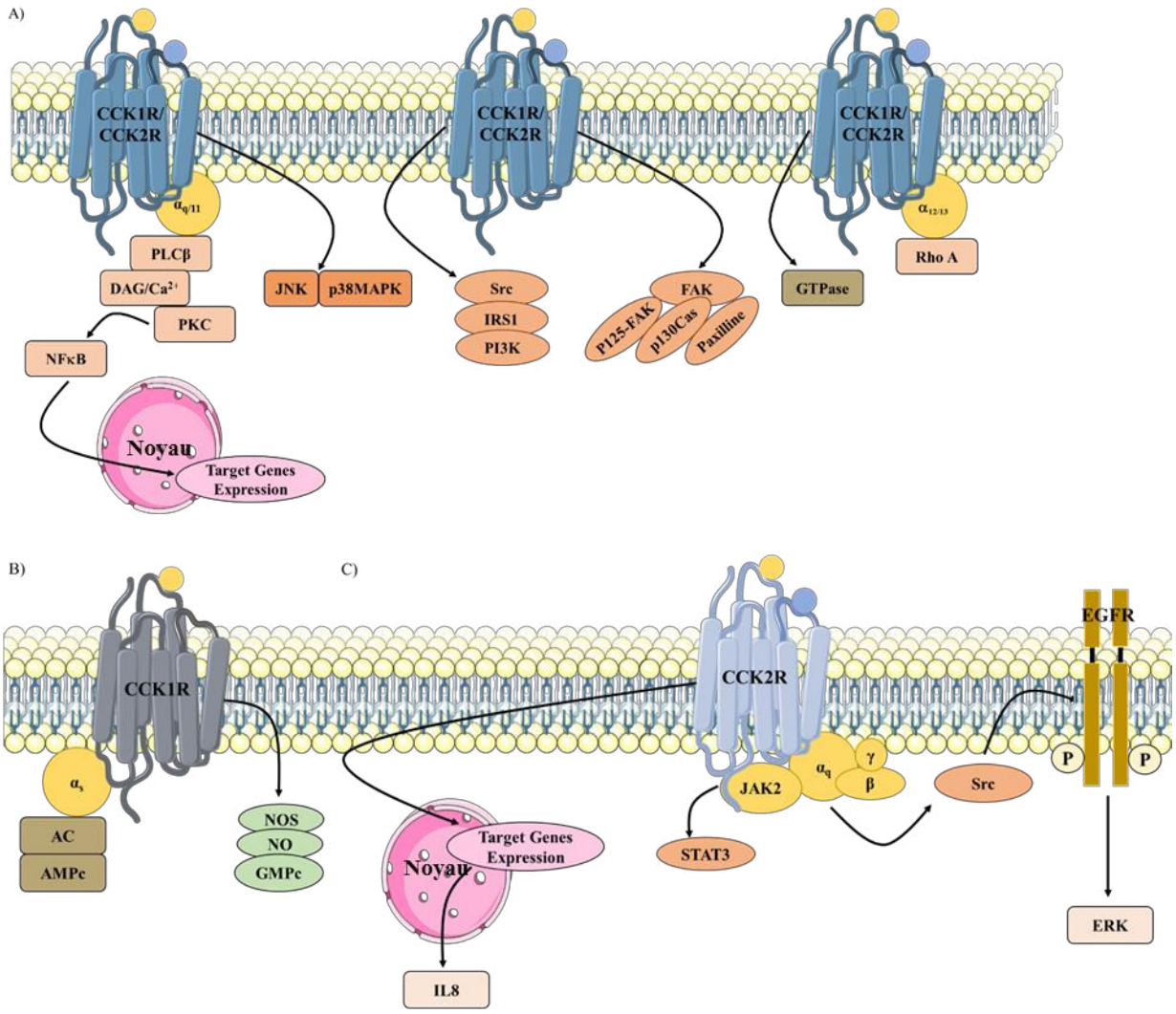


Figure 34 : Principales voies de signalisation stimulées lors de l'activation des CCKR. A) voies communes stimulées par l'activation de CCK1R et CCK2R, B) voies stimulées lors de l'activation de CCK1R et C) voies stimulées lors de l'activation de CCK2R. PLCβ : phosopholipase β ; DAG : diacylglycérol ; Nuclear Factor-Kappa B : NFκB ; PKC : protéine kinase C ; JNK : c-Jun N-terminal kinases ; p38MAPK : p38Mitogen-activated protein kinases ; IRS1 : insulin receptor substrates 1 ; PI3K : phosphatidylinositol 3-kinases ; FAK : focal adhesion kinase ; GTP : guanosine triphosphate ; JAK : janus kinase ; STAT signal transducers and activators of transcription ; AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; NO : oxyde nitrique, NOS : oxyde nitrique synthase ; GMP : guanosine monophosphate ; IL8 : interleukine 8 ; EGF : facteur de croissance épidermique ; EGFR : récepteur au facteur de croissance épidermique. Adaptée de (Dufresne et al. 2006).

Ainsi, la CCK et la gastrine ont fait l'objet de nombreuses études chez les mammifères. De plus, chez les amphibiens, deux homologues de la CCK et de la gastrine ont été identifiés.

7 Homologues de la CCK et de la gastrine chez les amphibiens

Des extraits de peau de grenouille de l'espèce *Hyla caerulea* ont permis de mettre en évidence un décapeptide entraînant la contraction de la vésicule biliaire et des muscles lisses et stimulant les sécrétions acides au sein de l'estomac ainsi que la sécrétion d'enzymes pancréatiques. Ce polypeptide fut nommé cæruléine en raison de l'espèce *Hyla caerulea* chez qui il fut découvert (Anastasi et al. 1967).

Chez l'espèce de grenouille sud-américaine *Phyllomedusa sauvagii*, un nonapeptide de type cæruléine appelé phyllocæruléine a également été découvert dans des extraits de peau. Ce peptide possède les mêmes propriétés physiologiques que la cæruléine et partage avec celle-ci un même heptapeptide en C-terminal ainsi qu'un résidu pyroglutaminé du côté N-terminal (Anastasi et al. 1969). De même, la cæruléine et la phyllocæruléine possèdent chacune un résidu tyrosine tous deux sulfatés. De plus, ces deux peptides d'amphibiens possèdent des fonctions physiologiques communes ainsi que des similarités de séquences avec la CCK et la gastrine de mammifères. En effet, ces peptides possèdent la séquence Y(x)GWMDFamide terminale (Tableau 2).

8 Homologues de la CCK et de la gastrine chez les Téléostéens

Chez le poisson rouge *Carassius auratus*, un peptide de type CCK a été identifié. Le gène codant ce peptide est exprimé au niveau du tractus gastro-intestinal, de l'hypophyse et du cerveau. De plus, des expériences d'hybridation *in situ* ont montré la présence d'ARNm au sein de l'hypothalamus, suggérant ainsi la possible implication de la CCK dans la régulation du comportement alimentaire (Peyon et al. 1998). De manière intéressante, chez *Tetraodon nigroviridis* et *Paralichthys olivaceus* deux gènes codant deux CCK (CCK1 et CCK2) et un gène codant la gastrine ont été identifiés (Kurokawa et al. 2003). Des analyses phylogénétiques et de synténie effectuées chez les vertébrés, ont montré que la CCK et la gastrine ont divergé depuis un gène ancestral commun il y a plus de 500 millions d'années. Toutefois, une deuxième copie de CCK a été générée suite au troisième évènement de duplication du génome (3R) survenue chez les téléostéens (Dupré and Tostivint 2014).

9 Homologues de la CCK et de la gastrine chez les Urochordés

Un octapeptide de structure proche de la CCK et de la gastrine a été identifié chez l'ascidie *Ciona intestinalis* (Johnsen and Rehfeld 1990). La séquence de ce neuropeptide nommé cionine présente deux résidus tyrosine pouvant être sulfatés. De ce fait, la cionine est le premier peptide identifié de la famille gastrine/CCK à être disulfaté. Par la suite, deux récepteurs CioR1 et CioR2 présentant des homologies de séquences avec les récepteurs CCKRs ont été caractérisés (Sekiguchi et al. 2012). De manière intéressante, les tests d'activation ont montré que les concentrations de cionine nécessaires à l'activation de CioR1 et CioR2 sont plus faibles lorsque le peptide est disulfaté. De plus, les formes monosulfatées n'activent les récepteurs qu'avec des concentrations importantes de cionine et la forme non sulfatée, n'active pas les récepteurs. Cette observation suggère ainsi que les CioRs semblent être plus proches du récepteur CCK1R que du CCK2R de vertébrés.

La CCK, la gastrine et leurs homologues, ne sont pas seulement présents chez les Deutérostomiens puisque des peptides phylogénétiquement apparentés ont été identifiés chez les Protostomiens.

10 Homologues de la CCK et de la gastrine chez les Protostomiens

10.1 Homologues chez les Ecdysozoaires

10.1.1 Chez les arthropodes : les sulfakinines

Les premiers travaux visant à identifier des peptides de la famille des gastrine/CCK chez les arthropodes reposaient sur la caractérisation de peptides immunoréactifs vis-à-vis d'anticorps spécifiques de CCK de vertébrés. Ainsi des études d'immunocytochimie ont montré la présence de peptides immunoréactifs dans les systèmes nerveux d'insectes (Kramer et al. 1977; Dockray et al. 1981).

Par la suite, le premier neuropeptide de type gastrine/CCK a été isolé depuis des extraits de tête de cafard. Il a été nommé leucosulfakinine en raison de l'espèce chez qui il a été découvert, *Leucophaea maderae* et, de la présence d'un motif sulfaté sur un résidu tyrosine. De plus, ce neuropeptide présente une plus forte similarité de séquences avec la gastrine II (Nachman et al. 1986b). Un second peptide proche des gastrine/CCK a été isolé chez la même espèce. Il s'agit de la leucosulfakinine II. De manière intéressante, la séquence de ce peptide partage plus de ressemblances avec la CCK qu'avec la leucosulfakinine. Néanmoins, les deux

leucosulfakinines possèdent une activité analogue à la gastrine et à la CCK de vertébrés, puisque toutes deux exercent une activité myotrope chez le cafard (Nachman et al. 1986a, Nachman et al. 1986b). Suite à la découverte des SKs chez le cafard, deux SKs ont été identifiées chez *Drosophila melanogaster* (Nichols et al. 1988). Ces deux drosulfakinines DSK-I and DSK-II sont synthétisées au niveau des neurones IPCs (Insulin-Producing Cells*)* du système nerveux central et induisent la sensation de satiété (Söderberg et al. 2012). De plus, des études ont montré que DSK-I sous sa forme sulfatée augmente la fréquence cardiaque chez la larve, la pupe et chez l'adulte; alors que sous sa forme non sulfatée, le peptide augmente la fréquence cardiaque seulement chez la larve. Concernant DSK-II, les formes sulfatées et non-sulfatées, induisent l'augmentation de la fréquence cardiaque chez la larve et l'adulte (Nichols et al. 2009).

Deux récepteurs DSK-RI et DSK-RII (Kubiak et al. 2002; Nässel and Williams 2014) ont été identifiés et les tests d'activation ont montré que les concentrations nécessaires à l'activation de DSK-RI étaient plus faibles lorsque DSK-I est sulfaté (Kubiak et al. 2002).

Chez le cafard *Periplaneta americana*, deux peptides ont été isolés : la périsulfakinine, qui est un peptide sulfaté, et un autre peptide dont la séquence est identique à celle de la leucosulfakinine II non sulfatée. De façon intéressante, seule la périsulfakinine agit sur la contraction du rectum (Veenstra 1989).

Par la suite, différentes expériences ont permis d'identifier plusieurs peptides de type SK chez plusieurs espèces de criquet. Chez *Locusta migratoria*, la locusulfakinine ou Lom-SK a été isolée depuis des extraits de cerveau de 9000 animaux. Ce neuropeptide est amidé et stimule la contraction du rectum (Schoofs et al. 1990). En outre, l'injection de Lom-SK sulfatée chez adultes mâles (Zels et al. 2015) et chez les larves de *Schistocerca gregaria* inhibe la prise de nourriture (Wei et al. 2000). Chez le criquet méditerranéen *Gryllus bimaculatus*, deux peptides nommés GrybiSKI et GrybiSKII ont été identifiés. Ces peptides partagent les caractéristiques communes de la famille gastrine/CCK à savoir, la présence d'un résidu tyrosine sujet à sulfatation et une phénylalanine terminale potentiellement amidée (Meyering-Vos and Müller 2007a). En outre, GrybiSKI et GrybiSKII ont un rôle d'inhibiteur de la prise alimentaire (Meyering-Vos and Müller 2007b). Chez l'abeille *Apis mellifera*, deux peptides ApimeSKI et ApimeSKII ont été identifiés par homologies de séquences et leur présence a été confirmée par spectrométrie de masse (Hummon et al. 2006).

Les peptides callisulfakinine I et II et neosulfakinine I et II ont été identifiés respectivement chez les mouches *Calliphora vomitoria* et *Neobellieria bullata* (Fónagy et al. 1992; Duve et al. 1995). Il est à noter que la callisulfakinine I et la neosulfakinine I ont des séquences identiques à celle de la drosulfakinine DSK-I.

Chez le coléoptère *Tribolium castaneum*, l'activation des récepteurs Trica-SKR1 et Trica-SKR2 par le peptide Trica-SK stimule la libération d'AMPc et de Ca^{2+} intracellulaire (Zels et al. 2014). Les expériences d'ARN interférent ont montré que la diminution de l'expression des gènes codant pour le peptide et les récepteurs, induit une augmentation de la prise alimentaire (Yu et al. 2012; Yu and Smagghe 2014).

D'autres peptides de type SK ont également été identifiés chez les crustacés. Ainsi, les premières études ont montré la présence de peptides immunoréactifs dans les systèmes nerveux de plusieurs crustacés (Favrel et al. 1987; Turrigiano and Selverston 1989). Par la suite, trois peptides Pem SKI, Pem SKII et Pem SKIII, qui est une forme tronquée de Pem SKII, ont été purifiés depuis des extraits de SNC de la crevette tigrée *Penaeus monodon* (Johnsen et al. 2000). De plus, deux peptides Pev-SKI et Pev-SKII ont été isolés depuis des extraits de système nerveux de l'espèce *Litopenaeus vannamei*. Comme cela est le cas pour la cionine, le neuropeptide Pev-SKI présente également deux résidus tyrosine sujets à sulfatation (Torfs et al. 2002).

10.1.2 Chez les nématodes : NLP-12

Deux peptides NLP-12a (Neuropeptide-Like Protein 12a, également nommé CKI pour cholécystokinine de *Caenorhabditis elegans*) et NLP-12b (ou CKII) ont été identifiés comme étant les ligands endogènes des récepteurs CKR-2a et CKR-2b chez *Caenorhabditis elegans* (Janssen et al. 2008). L'activation des récepteurs par les peptides entraîne la libération de Ca^{2+} intracellulaire. De manière intéressante, NLP-12a et NLP-12b ont une affinité similaire pour CKR-2a et CKR-2b et les peptides non-sulfatés ont une affinité légèrement supérieure pour les récepteurs que les peptides sulfatés (Janssen et al. 2009). À l'heure actuelle, aucun ligand de CKR-1 n'a été identifié (Cardoso et al. 2012). De plus, il a été montré que les peptides NLP-12 sous leurs formes sulfatées et non-sulfatées, ne stimulent pas la contraction du rectum chez la blatte.

10.2 Homologues chez les Lophotrochozoaires

Peu d'études sur les homologues de la gastrine et de la CCK ont été réalisées chez les Lophotrochozoaires. Des expériences d'immunohistochimie ont permis de détecter la présence d'homologues à la CCK au sein du SNC du mollusque *Aplysia californica* (Vigna et al. 1984) et de l'annélide *Nereis diversicolor* (Dhainaut-Courtois et al. 1985). De plus, il a été montré que chez le mollusque *Pecten maximus*, les leucosulfakinines stimulent la libération d'α-amylase par l'intestin (Nachman et al. 1997). Des analyses approfondies sur les génomes et les transcriptomes de plusieurs espèces, ont permis d'identifier des homologues à la gastrine et à la CCK de vertébrés ainsi qu'aux SKs d'insectes chez *Lottia gigantea* (Veenstra 2010; Mirabeau and Joly 2013), chez *Capitella teleta* (Veenstra 2011; Mirabeau and Joly 2013), chez *Aplysia californica* et *Haliotis diversicolor* (Mirabeau and Joly 2013) et chez le gastéropode *Deroceras reticulatum* (Ahn et al. 2017a). Chez la seiche *Sepia officinalis,* deux peptides de type CCK/SK ont été identifiés et seul le peptide CCK/SK II a pu être détecté en spectrométrie de masse (Zatylny-Gaudin et al. 2016). De manière intéressante, chez le mollusque *Navanax inermis*, la CCK-8 inhibe les motoneurones responsables de la capture des proies (Zimering et al. 1988).

De plus, de récentes études ont permis d'identifier deux peptides de type CCK/SK chez le bivalve *Patinopecten yessoensis* (Zhang et al. 2018). La présence de ces deux neuropeptides a été confirmée par des études en spectrométrie de masse.

10.2.1 Chez l'huître

Des études réalisées sur les huîtres perlière *Pinctata fucata* et creuse *Crassostrea gigas* (Stewart et al. 2014; Zatylny-Gaudin and Favrel 2014) ont permis d'identifier deux peptides de type CCK/SK chez chacune d'elles. La présence de ces peptides a également été confirmée par des analyses en spectrométrie de masse d'extraits de ganglions. En ce qui concerne l'espèce *Crassostrea gigas*, les deux peptides Cragi-CCK1 et Cragi-CCK2 sont codés par un seul précurseur long de 158 acides aminés comprenant un peptide signal d'une longueur de 23 acides aminés (Figure 3 A article « Emergence of a cholecystokinin/sulfakinin signalling system in Lophotrochozoa »).

Ces peptides présentent des homologies de séquences avec la gastrine, la CCK et les SKs. En effet, Cragi-CCK1 présente une phénylalanine terminale amidée conservée chez les autres espèces. Il est à noter que Cragi-CCK2 possède un résidu tryptophane terminal amidé, comme cela est le cas également pour le peptide CCK/SK I de *Lottia gigantea* (Tableau 2).

De plus, les deux peptides partagent avec une grande majorité de peptides des autres espèces, le motif acide aspartique-tyrosine dont le résidu tyrosine est sujet à sulfatation. De manière intéressante, Cragi-CCK1 présente un second motif acide Asp-Tyr (**DY**). De ce fait, Cragi-CCK1 peut faire l'objet d'une disulfatation tout comme cela est le cas pour la cionine et Pev-SK1.

Afin d'étudier la voie de signalisation gastrine/CCK/SK chez *Crassostrea gigas*, il a été recherché dans les bases de données transcriptomiques (Riviere et al. 2015) des récepteurs présentant des homologies de séquences avec les récepteurs CCKRs et SKRs d'autres espèces déjà identifiés et pouvant être activés par les deux peptides potentiels Cragi-CCK1 et Cragi-CCK2. Deux récepteurs nommés Cragi-CCKR1 (Annexe 1) et Cragi-CCKR2 (Annexe 1) ont été identifiés et partagent avec les CCKRs et SKRs d'autres espèces la présence d'un intron à une position spécifique conservée au cours de l'évolution (Mirabeau and Joly 2013). Ainsi, afin de caractériser de manière fonctionnelle les couples CCK/CCKR d'huître, des expériences d'endocrinologie inverse (Figures 29 et 30) ont été menées. Des expériences de quantification d'expression de gènes (qPCR) d'huîtres conditionnées en absence ou présence de nourriture ainsi que des expériences rendant compte de l'activité myotrope ont été mises en œuvres pour comprendre le rôle de cette voie de signalisation dans la physiologie de l'huître. L'ensemble de ces expériences a fait l'objet d'une publication parue dans le journal « Scientific Reports ».

Tableau 2 : Séquences en acides aminés des peptides de type gastrine/CCK/SK identifiés et caractérisés chez les différentes espèces. Les résidus conservés sont en gras.

Espèce	Séquence consensus	Peptide	Séquence
Homo sapiens	Y(x)GWMD**Famide**	CCK-83	QPVPPADPAGSGLQRAEEAPRRQLRVSQRTDGESRAHLGALLARYIQQARKAPSGRMSIVKNL QNLDPSHRISDR**DY**MGWMD**Famide**
		CCK-58	VSQRTDGESRAHLGALLAR**Y**IQQARKAPSGRMSIVKNLQNLDPSHRISDRD**Y**MGWMD**Famide**
		CCK-33	KAPSGRMSIVKNLQNLDPSHRISDR**DY**MGWMD**Famide**
		CCK-22	NLQNLDPSHRISDR**DY**MGWMD**Famide**
		CCK-8	**DY**MGWMD**Famide**
		Gastrine-34	QLGPQGPPHLVADPSKKQGPWLEEEEEA**Y**GWMD**Famide**
		Gastrine-17	QGPWLEEEEEA**Y**GWMD**Famide**
		Gastrine-14	WLEEEEEA**Y**GWMD**Famide**
Hyla caerulea		Cæruléine	pEQ**DY**TGWMD**Famide**
Phyllomedusa sauvagii		Phyllocæruléine	pEE**Y**TGWMD**Famide**
Ciona intestinalis		Cionine	N**YY**GWMD**Famide**
Leucophaea maderae	E/**DY**GHL/MR**Famide**	Leucosulfakinine I	EQFE**DY**GHMR**Famide**
		Leucosulfakinine II	pESD**DY**GHMR**Famide**
Drosophila melanogaster		Drosulfakinine I (DSK-I ou DrmSKI)	FD**DY**GHMR**Famide**
		Drosulfakinine II (DSK-II ou DrmSKII)	GGDDQFD**DY**GHMR**Famide**
Periplaneta americana		Périsulfakinine I (PSK ou Pea-SK-I)	EQFD**DY**GHMR**Famide**
		Périsulfakinine II (Pea-SK-I)	pESD**DY**GHMR**Famide**
Locusta migratoria		Locusulfakinine (Lom-SK)	pELASD**DY**GHMR**Famide**
Gryllus bimaculatus		GrybiSKI	pESD**DY**GHMR**Famide**
		GrybiSKII	EPFD**DY**GHMR**Famide**
Apis mellifera		ApimeSKI	pEQFD**DY**GHLR**Famide**
		ApimeSKII	EQFE**DY**GHMR**Famide**
Calliphora vomitoria		Callisulfakinine I (Cav-SK-I)	FD**DY**GHMR**Famide**
		Callisulfakinine II (Cav-SK-II)	GGEEQFD**DY**GHMR**Famide**
Neobellieria bullata		Neosulfakinine I (Neb-SK-I)	FD**DY**GHMR**F**(amide)
		Neosulfakinine II (Neb-SK-II)	XXEEQFD**DY**GHMR**F**(amide)
Litopenaeus vannamei		Pev-SKI	AGGSGGVGGEYD**DY**GH(L/I)R**Famide**
		Pev-SKII	pEFDE**Y**GHMR**Famide**
Tribolium castaneum		Trica-SK	FD**DY**GHMR**Famide**
Penaeus monodon		Pem SKI	pEFDE**Y**GHMR**Famide**
		Pem SKII	AGGSGGVGGEYD**DY**GHLR**Famide**
		Pem SKIII	VGGEYD**DY**GHLR**Famide**
Caenorhabditis elegans	**DY**RPLQ**F amide**	NPL-12a (CKI)	**DY**RPLQ**Famide**
		NPL-12b (CKII)	DG**Y**RPLQ**Famide**

Espèce	Séquence consensus	Peptide	Séquence
Aplysia californica	E**DY**G/N/SL/I/F/WGGGR**Famide**	CCK/SK I	SYG**DY**GIGGGR**Famide**
		CCK/SK II	pEGAWSY**DY**GLGGGR**Famide**
Lottia gigantea		CCK/SK I	F**DY**NFGGGRW**amide**
		CCK/SK II	pEGAWDY**DY**GLGGGR**Famide**
Haliotis diversicolor		CCK/SK I	NYGE**Y**GFGGGR**Famide**
		CCK/SK II	pEGAWSY**DY**GLGGGR**Famide**
Capitella teleta		CCK/SK I	pEGAAWDM**DY**GWGGGR**Famide**
		CCK/SK II	**Y**DAFGLGGR**Famide**
Deroceras reticulatum		CCK/SK I	pEGGWSY**DY**GLGGGR**Famide**
		CCK/SK II	NYG**DY**GIGGGR**Famide**
Patinopecten yessoensis		CCK/SK I	pEGRWDL**DY**GLGGGR**Famide**
		CCK/SK II	EYD**DY**RLGGGR**Famide**
Sepia officinalis		CCK/SK I	GAWYY**DY**GLGGGR**Famide**
		CCK/SK II	KDYGYTD**DY**GIGGGR**Famide**
Crassostrea gigas		Cragi-CCK1	pEGAW**DY****DY**GLGGGR**Famide**
		Cragi-CCK2	F**DY**NFGGGRW**amide**
Pinctata fucata		CCK/SK I	pEGVWDF**DY**GLGGGR**Famide**
		CCK/SK II	SFG**DY**SLGGGR**Famide**

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Emergence of a cholecystokinin/sulfakinin signalling system in Lophotrochozoa

Received: 18 June 2018
Accepted: 1 October 2018
Published online: 06 November 2018

Julie Schwartz, Marie-Pierre Dubos, Jérémy Pasquier, Céline Zatylny-Gaudin & Pascal Favrel

Chordate gastrin/cholecystokinin (G/CCK) and ecdysozoan sulfakinin (SK) signalling systems represent divergent evolutionary scenarios of a common ancestral signalling system. The present article investigates for the first time the evolution of the CCK/SK signalling system in a member of the Lophotrochozoa, the second clade of protostome animals. We identified two G protein-coupled receptors (GPCR) in the oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca), phylogenetically related to chordate CCK receptors (CCKR) and to ecdysozoan sulfakinin receptors (SKR). These receptors, Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2, were characterised functionally using a cell-based assay. We identified di- and mono-sulphated forms of oyster Cragi-CCK1 (pEGAWDY(SO_3H)DY(SO_3H)GLGGGRF-NH_2) as the potent endogenous agonists for these receptors. The Cragi-CCK genes were expressed in the visceral ganglia of the nervous system. The Cragi-CCKR1 gene was expressed in a variety of tissues, while Cragi-CCKR2 gene expression was more restricted to nervous tissues. An *in vitro* bioassay revealed that different forms of Cragi-CCK1 decreased the frequency of the spontaneous contractions of oyster hindgut. Expression analyses in oysters with contrasted nutritional statuses or in the course of their reproductive cycle highlighted the plausible role of Cragi-CCK signalling in the regulation of feeding and its possible involvement in the coordination of nutrition and energy storage in the gonad. This study confirms the early origin of the CCK/SK signalling system from the common bilaterian ancestor and delivers new insights into its structural and functional evolution in the lophotrochozoan lineage.

Neuropeptides include a diverse group of small neuron-signalling peptides that govern most animal biological functions and play a crucial role in the elaboration of adapted physiological and behavioural responses to environmental constraints. They activate specific receptors, which predominantly belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) family. Global analyses including neuropeptide precursors and GPCR sequences from a variety of animal phyla have highlighted a long-term co-evolution of metazoan receptor-ligand families[1,2]. Until recently, knowledge on neuropeptide signalling systems was chiefly limited to well-studied vertebrate species and to ecdysozoan model species such as *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. Despite initial studies[3,4], neuropeptide signalling has so far remained largely elusive in Lophotrochozoa, the protostomian sister clade of Ecdysozoa. Lophotrochozoa represent one of the most diverse and evolutionarily highly successful bilaterian lineages[5]. The neuropeptide repertoire of several lophotrochozoan species has now been established[6–9], and large-scale genomic and transcriptomic resources are available[10,11]. This new situation offers the opportunity to investigate neuropeptide receptor coupling in a lophotrochozoan species and thus gain insight into the evolution of neuropeptide signalling in Bilateria. Accordingly, new signalling systems have recently been discovered in the annelid *Platynereis dumerilii*[12,13] and in the mollusc *Crassostrea. gigas*[14–16]. The present study investigates the evolution of the gastrin/cholecystokinin (G/CCK)/sulfakinin (SK) signalling system in Lophotrochozoa, using the mollusc *C. gigas* as a representative species.

In chordates, the G/CCK family includes structurally conserved, frequently sulphated regulatory peptides[17]. Similarly to gut hormones, gastrin stimulates gastric acid secretion from the parietal cells of the stomach and plays a central role in gastric mucosa growth[18,19], whereas CCK stimulates pancreatic enzyme secretion, induces the contraction and thus the emptying of the gallbladder, controls gut motility[20], and stimulates satiety[21]. Besides these canonical functions in the regulation of digestive processes, CCK peptides now emerge as ubiquitous messengers due to the widespread expression of their encoding gene in a number of organs, including the brain

Normandie Université, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC, UA, CNRS 7208, IRD 207, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), CS14032, 14032, Caen, Cedex 5, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.F. (email: pascal.favrel@unicaen.fr)

where they are major neurotransmitters[22] (for a review). The first protostomian member of the G/CCK family was biochemically characterised from head extracts of the cockroach (*Leucophea maderae*)[23]. This peptide was named leucosulfakinin (SK), and it exhibits around 55% of sequence identity with chordate G/CCKs. Moreover, the presence of a conserved sulphated tyrosyl residue further emphasises the resemblance with chordate G/CCKs. SKs have been identified in a number of insect species[24,25] and crustaceans[26]. This family also includes the related nematode neuropeptide NLP12[27]. Like their vertebrate counterparts, they display potent myotropic activity in several tissues, especially the gut[28] and the heart[29]. Similarly, they can regulate the release of digestive enzymes[30,31] and play a role as satiety regulators[28,31–33]. In addition to their structural homology and their convergent biological activities with G/CCKs, SKs specifically activate receptors (SKRs) that share a common ancestral gene with CCK receptors (CCKRs)[34].

Apart from initial studies reporting the occurrence of CCK-like immunoreactivity in the central nervous systems of *Aplysia californica*[35] and *Nereis diversicolor*[36], or revealing that insect SKs elicit the release of α-amylase from the gut of the scallop *Pecten maximus*[37], the CCK/SK signalling system has remained unexplored in Lophotrochozoa.

The present study investigates a CCK/SK signalling system in Lophtrochozoa for the first time.

Results

Molecular characterization Cragi-CCKRs. Two sequences displaying homologies with vertebrate and ecdysozoan CCK receptors were retrieved from GigaTON, an oyster comprehensive transcriptomic database[11]. These sequences named Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 share 43,5% of amino acid sequence identity. Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 also display around 31.5%-26.7% sequence identity with human CCKRs. Surprisingly, Cragi-CCKRs show slightly less identity with *C. elegans* CK-Rs (24.7-19.6%) and *Drosophila* DSKR1 (29.5–27.9%) (Fig. 1). In addition to the seven transmembrane domains characteristic of GPCRs, Cragi-CCKRs also hold the E/DRY and NPXXY (HPXXY for Cragi-CCKR2) motifs typical of family I GPCRs and critical for respectively receptor activation and Gαq dependent signalling pathways as well as STAT activation[38]. A phylogenetic analysis clearly revealed that Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 cluster with receptors from annelids and molluscs but as a separate branch from the insect SKRs. All chordate CCKRs form a distinct clade but with two branch clusters separating type 1 and type 2 receptors. *C. elegans* CKRs appeared more distant and emerged as a detached clade (Fig. 2). Alignment of the Cragi-CCKR cDNAs with the *C. gigas* genome sequence (http://www.oysterdb.com)[10] identified Cragi-CCKR1 gene (scaffold1301, CGI_10027768) and Cragi-CCKR2 gene (scaffold962, CGI_10027668) and revealing the existence of an intron at a conserved position across vertebrate CCKR and insect SKR genes (Fig. 1)[1].

Molecular characterization of Cragi-CCKs. Within the *C. gigas* neuropeptide repertoire[7], two potential CCK-like peptides, Cragi-CCK1 (pEGAWDYDYGLGGGRFamide) and Cragi-CCK2 (pEFDYGGGRWamide)[39], encoded by a single precursor (Fig. 3A) were detected from visceral ganglia (VG) extracts by mass spectrometry[7]. Alignment of Cragi-CCKs with CCK and SK peptides from other species shows that Cragi-CCK1 displays the C-terminal RFamide sequence feature common to insect SKs and distinct from the DFamide motif found in all chordate CCKs (Fig. 3B). Instead, Cragi-CCK2 comprises a C-terminal RWamide motif. Membership of *C. gigas* peptides to the CCK/SK family is also suggested by the conserved position of a key tyrosine residue which sulphated forms are often critical to elicit biological activity. In addition to the conserved tyrosine (Y^8, from the N-terminus), Cragi-CCK1 shows an extra tyrosine residue (Y^6) at a position corresponding to a second sulphated tyrosine present in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* SK1 and the protochordate *Ciona intestinalis* peptide Cionin[26,40]. Singularly, Cragi-CCK1 also displays a N-terminal sequence similarity to that of human gastrin-17. Using liquid chromatography (RP-HPLC) and mass spectrometry analysis, the occurrence of the non-sulphated form and of the mono-sulphated and disulphated forms of CCK1 was unambiguously confirmed in oyster visceral ganglia (Fig. 3C,D, Supplementary Fig. 1).

Cragi-CCK1 forms specifically activate Cragi-CCKRs. Transiently transfected HEK293T cells expressing Cragi-CCKR1 or Cragi-CCKR2 with or without the promiscuous Gα16 protein were challenged with rather high concentrations (10^{-5}M) of synthetic non-sulphated Cragi-CCKs. No signal was obtained with cells transfected with an empty vector or with a Gα16 expressing vector. Activation of Cragi-CCKRs with Cragi-CCKs appeared slightly more efficient in absence of Gα16 (Supplementary Fig. 2). Thus a series of synthetic sulphated (s) or non-sulphated (ns) forms of Cragi-CCKs were tested as potential ligands for Cragi-CCKRs. Non-sulphated Cragi-CCK1 activates Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 with half maximal effective concentrations (EC_{50}) of $0.19.10^{-6}$M and $0.46.10^{-6}$M respectively. The mono-sulphated form [Y^8S] Cragi-CCK1 was, with respect to Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2, 90 and 50 times more potent than its non-sulphated counterpart (Fig. 4, Table 1). Interestingly, the di-sulphated form [Y^6S-Y^8S] Cragi-CCK1was even more potent (2 and 5 folds respectively). The synthetic mono-sulphated form [Y^6S] Cragi-CCK1 was less potent on Cragi-CCKR1 and inactive on Cragi-CCKR2 at doses as high as 10^{-5}M (Table 1). Furthermore, the sulphated form [Y^3S] Cragi-CCK2 activated only Cragi-CCKR1 though at relatively high concentrations (EC_{50}= 5 10^{-5}M). No response was observed with high concentrations of the oyster GALRF-amide unrelated neuropeptide used as negative control[14] (Fig. 4). A possible transduction via Gαs was investigated using a cAMP luminescence assay but none of the synthetic peptides activated the cAMP signalling pathway even at concentrations as high as 10^{-5}M.

Gene expression of Cragi-CCK signalling components. The expression of Cragi-CCKR1, Cragi-CCKR2 and Cragi-CCK genes was investigated by RT-qPCR in several adult tissues and in fed and starved animals. Cragi-CCK gene was almost exclusively expressed in the visceral ganglia and to a lesser extent in the mantle (Fig. 5A). Cragi-CCKR1 gene was ubiquitously expressed in adult tissues though with a higher expression

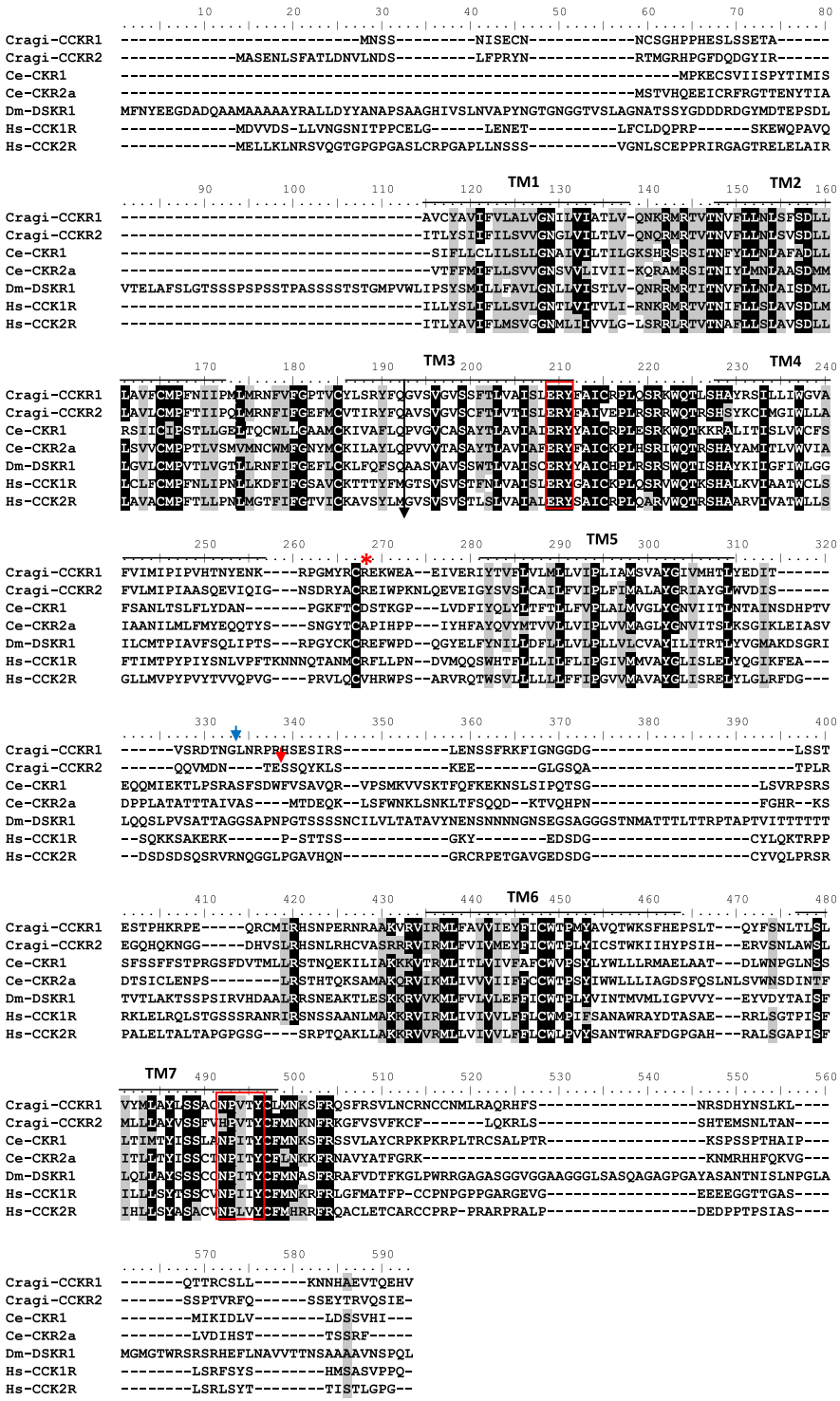


Figure 1. Alignment of the amino acid sequence of Cragi-CCKR1 (MF787221), Cragi-CCKR2 (MF787222) with CCKR family members from *Caenorhabditis elegans* (Ce-CKR1: NP_491918.3; Ce-CKR2a: ACA81683.1), *Drosophila melanogaster* (Dm-DSKR1: NP_001097021.1), *Homo sapiens* (Hs-CCKR1: NP_000721.1; Hs-CCKR2: NP_795344.1) using CLUSTALW[65]. Bars indicate the seven putative TM domains. Identical amino acid residues are highlighted in dark grey and similar residues in light grey. Black arrow indicates the position of a conserved intron, blue and red arrows indicate the respective position of Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 specific introns. Red boxes indicate the conserved "ERY" motif for receptor activation and "NPXXY" motif for Gαq and STAT –dependent signalling pathways. Red asterisk, the Arginine residue important for interaction with the sulphated tyrosine residue of CCK.

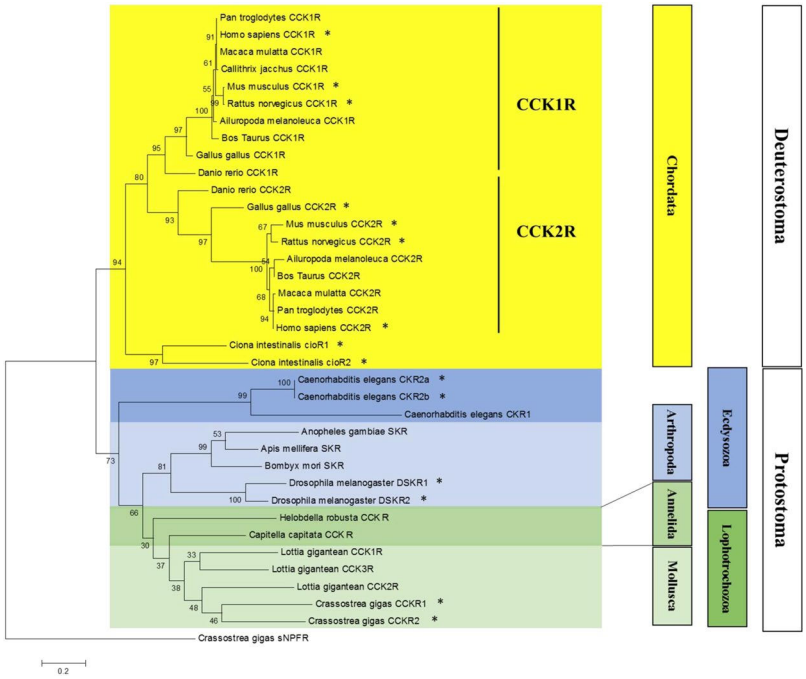


Figure 2. Phylogenetic representation of the relationship between Cragi-CCKRs and other CCKR family members. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 6[61] based on the maximum likelihood method. The accession members of the sequences used to construct the tree are listed in Supplementary Table 2. The Cg-sNPFR[14] was chosen as outgroup. * indicates functionally characterized receptors.

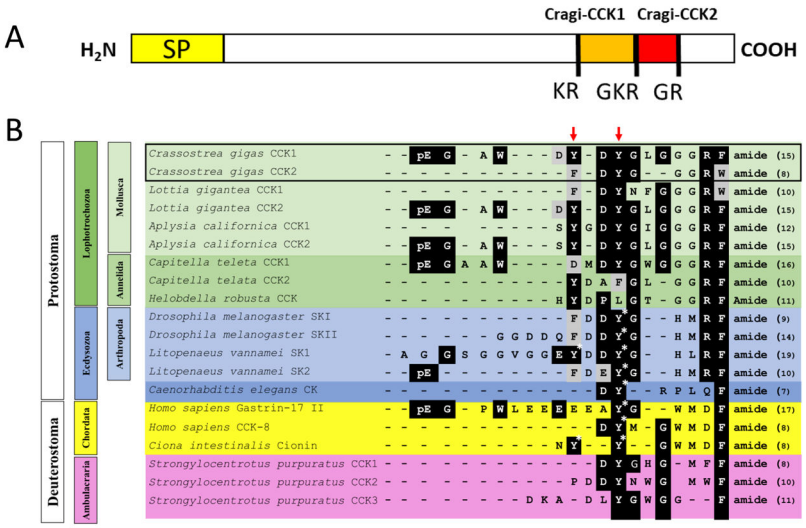
in the heart, the mantle and the visceral ganglia (Fig. 5B). In comparison, Cragi-CCKR2 was overall expressed at a lower level in adult tissues though at higher levels in the visceral ganglia, the mantle and the adductor muscle (Fig. 5C). To investigate the possible involvement of the oyster CCK signalling system in feeding regulation, we assessed the expression of the genes encoding the CCK signalling components including the major enzyme implicated in protein sulfation (TPST: Tyrosyl Protein sulfotransferase) in fed and four weeks starved animals. Both Cragi-CCK and Cragi-CCKR2 genes were significantly more expressed in VG of fed animals than in starved animals. Expression of all the other tested genes also slightly declined in starved animals yet not significantly (Fig. 6). Outside the VG, Cragi-CCKR1 decreased significantly in the gonad of starved animals (Supplementary Table 4). Given the expression of Cragi-CCKR1 in the gonad, we investigated the expression of receptor and ligand transcripts along a reproductive cycle. Expression of Cragi-CCK and Cragi-CCKRs did not fluctuate significantly along a reproductive cycle in VG. In contrast Cragi-CCKR1 gene showed a higher expression in the gonad during the first stages of reproduction and a significant decline of expression at the maturity stage (stage 3) in both males and females (Fig. 7).

Myotropic activity assays. Bioassays were carried out on the oyster hindgut. The basal activity is cyclic and composed of a succession of contraction and relaxation phases of an average period of 30 minutes (Fig. 8). Different concentrations of [Y^{6}S] Cragi-CCK1, [Y^{8}S] Cragi-CCK1 and [Y^{6}S-Y^{8}S] Cragi-CCK1 were administered. All peptides except [Y^{6}S] Cragi-CCK1 induce organ contraction though with distinct threshold concentrations. A minimal threshold concentration of 10^{-10}M was obtained for [Y^{8}S] Cragi-CCK1, 10^{-9}M for [Y^{6}S-Y^{8}S] Cragi-CCK1 and to 10^{-7}M for Cragi-CCK1 (Table 2). No response was obtained with [Y^{6}S] Cragi-CCK1 at a concentration up to 10^{-5}M. Active peptides induce a significant increase of the contraction and relaxation duration (except for [Y^{8}S] Cragi-CCK1) and a significant increase of amplitude of contraction when a threshold concentration of [Y^{6}S-Y^{8}S] Cragi-CCK1 is administered. No effect was observed with FMRF-amide at a concentration of 10^{-7}M.

Discussion

Structural and functional homology between peptide members of both the chordate G/CCK and arthropod SK groups, together with the phylogenetic proximity of their cognate receptors, support a common origin of these two signalling systems in the bilaterian ancestor. The present report reveals for the first time the existence of a functional CCK/SK signalling system in Lophotrochozoa, one of the two major clades of protostome animals.

The occurrence of a lophotrochozoan CCK/SK signalling system was first investigated by mining the transcriptomic and genomic resources of the oyster *C. gigas*. Then a wide-ranging phylogenetic analysis including a large number of functionally characterised chordate CCKRs and ecdysozoan SKRs was performed, and clearly identified Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 as orthologues of ecdysozoan SKRs and chordate CCKRs. Both oyster receptor genes harboured an intron at a position conserved among all chordate and arthropod receptor



	[Y⁶S-Y⁸S] Cragi-CCK1(a)	[Y⁶S]/[Y⁸S] Cragi-CCK1(b)	Cragi-CCK1(c)
F_{15}	**m/z 900.5 and 1802.5**	nd	**m/z 822.5 and 833.6**
F_{16}	nd	nd	**m/z 822.5 and 833.6**
F_{17}	nd	**m/z 860.4 and 1722.4**	**m/z 822.5 and 833.6**
F_{18}	nd	nd	**m/z 822.5 ; 833.6 ; 1644.7**
F_{19}	nd	nd	**m/z 822.5 ; 833.6 ; 1644.7**

Figure 3. (**A**) Schematic representation of Cragi-CCK precursor[7] (SP: Signal peptide). (**B**) Sequence alignment of Cragi-CCK peptides with Deuterostome G/CCK family members[44], ecdysozoan sulfakinins (SK)/CK[27] and lophotrochozoan CCK/SK[39,42]. The sulphated tyrosine residues (Y*) are labelled with an asterisk. Red-colored arrows indicate putative sulphated tyrosine residues in Cragi-CCKs or in putative CCK/SK peptides from other species. Black-colored and grey-colored shadings indicate respectively identical or similar amino acids (**C**) HPLC separation: In red, chromatogram of the second purification step of visceral ganglia extract. In blue, chromatogram of synthetic CCKs. a, [Y⁶S-Y⁸S] Cragi-CCK1; b, [Y⁶S]/[Y⁸S] Cragi-CCK1; c, Cragi-CCK1. (**D**) Detection with SIM mode of singly charged and doubled charged *ions* of different forms of Cragi-CCK1s in the different chromatographic fractions. nd: not detected.

genes, further strengthening the argument that they evolved from a common bilaterian ancestor[1,34]. At least two CCKRs or SKRs are present in most animal lineages. The type-1 and type-2 CCKR groups are clearly separated within vertebrates. Our phylogenetic analysis revealed that the two receptor types present in some arthropods and Lophotrochozoa not only clustered separately from the vertebrate receptors but also grouped in a phylum-specific way, consistent with independent duplication events that occurred at least after Ecdysozoa and Lophotrochozoa diverged. The situation was similar for the two related CioRs of the urochordate *Ciona intestinalis*[41]. In *C. gigas*, the two Cragi-CCKRs clustered together and separately from putative CCK/SK receptors from other molluscs or from annelids. As Cragi-CCKR genes were positioned in separate genome contigs, the duplication event was probably not recent and likely occurred in an ancestor of the bivalve lineage.

In line with the receptor/ligand co-evolution theory, we inferred that putative oyster neuropeptides previously identified based on their slight sequence homology with CCK/SK peptides[7] might represent the cognate ligands for Cragi-CCKRs. These peptides, i.e. Cragi-CCK1 and Cragi-CCK2, are generated from a single precursor[7] displaying an organization similar to their mollusc[8], annelid[42], nematode[43] and arthropod counterparts[34]. But

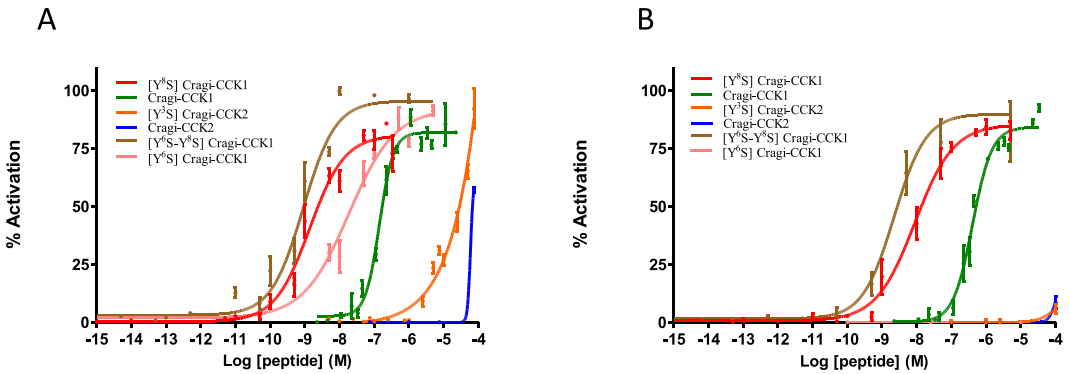


Figure 4. Dose-dependent activity of Cragi-CCK peptides on Cragi-CCKR1 (**A**) and on Cragi-CCKR2 (**B**) expressed in HEK293T cells. Data are shown as relative (%) to the highest value (100% activation) for a given peptide and represent the mean of an experiment (n = 4) performed in triplicate. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEM).

Peptide Name	Cragi-CCKR1	Cragi-CCKR2
Cragi-CCK1	$19.5 \pm 2.0\ 10^{-8}$M	$46.2 \pm 6.7\ 10^{-8}$M
[Y^{6}S] Cragi-CCK1	$1.64 \pm 0.01\ 10^{-8}$M	No activation
[Y^{8}S] Cragi-CCK1	$0.229 \pm 0.155\ 10^{-8}$M	$1 \pm 0.19\ 10^{-8}$M
[Y^{6}S-Y^{8}S] Cragi-CCK1	$0.11 \pm 0.025\ 10^{-8}$M	$0.198 \pm 0.025\ 10^{-8}$M
Cragi-CCK2	$>10^{-4}$M	$\gg 10^{-4}$M
[Y^{3}S] Cragi-CCK2	$>5\ 10^{-5}$M	$\gg 10^{-4}$M

Table 1. Cragi-CCK respective EC_{50} for receptor activation.

their precursors are distinct from the chordate G/CCK precursors which only contain one peptide that can be processed into a variety of N-terminally extended mature forms[34,38]. All chordate G/CCKs share the common C-terminal GWMDF-amide motif, which is not conserved in the other animal groups. For example, non-chordate deuterostomian putative CCK/SK-like peptides display a GXXF-amide motif[44], the *C. elegans* homologue a QF-amide motif[27], although all arthropod SKs display the C-terminal core sequence YGHMRF-amide motif[34]. Thus, in addition to the basically conserved (D/E)Y(G) sequence, the F-amide terminal motif appears as the common feature shared by bilaterian CCK/SK family members[44]. Hence Cragi-CCK1 resembles SKs because it exhibits a C-terminal RF-amide. In contrast, Cragi-CCK2 represents a singular exception because it displays an atypical C-terminal RW-amide motif. A comparison of Cragi-CCKs with other family members revealed the presence of one or even two (for Cragi-CCK1) conserved tyrosine residues that are frequently post-translationally sulphated[22]. Since both tyrosine residues are located in a consensus sequence compatible for recognition as TPST substrates[45], Cragi-CCKs were synthesized in their sulphated and non-sulphated forms. This report clearly demonstrates that the different sulphated forms of Cragi-CCK1 specifically activated both Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 and were far more potent than their non-sulphated counterparts. Interestingly, similarly to the cionin signalling system[41], the disulphated form of Cragi-CCK1 was more potent than its monosulphated derivatives. The sulphate moiety also appeared critical for receptor activation in other CCK/SK systems[38,46,47], although it was not found essential for the activation of *C. elegans* CKRs[27] or mammalian gastrin/CCK2R[22]. Both Cragi-CCKRs possess a conserved arginine residue in the extra-cellular loop 2. In mammalian CCK1R, it participates in the interaction with the negatively charged sulphate moiety of CCK[48]. Interestingly, CCK2R does not share this arginine residue, and neither do *C. elegans* CKRs (Fig. 1). The biochemical characterisation of Cragi-CCKs presented in this study clearly proves the existence of both mono and di-sulphated forms in the VG, consistent with the expression of the TPST gene in this tissue. Mass spectrometry signals associated with the sulphated forms were rather weak as compared to those of the non-sulphated form, suggesting that the former were expressed in lower quantities. However, mass spectrometry was not quantitative, and moreover this situation may have resulted from partial desulphation due to the acidic conditions used in the initial extraction process and in source dissociation[45]. Our experimental conditions did not allow us to discriminate between [Y^{6}S] Cragi-CCK1 and [Y^{8}S] Cragi-CCK1. Both forms were likely to be present, resulting either from partial desulphation of the disulphated form or representing intermediary molecular species of the synthesis of the di-sulphated form. Of the two monosulphated forms, [Y^{8}S] Cragi-CCK1 was more potent than [Y^{6}S] Cragi-CCK1, suggesting that the sulphated moiety located on the tyrosine residue with the most conserved position could be an ancestral feature, as suggested for cionin[41]. Thus, the sulphated forms of Cragi-CCK likely represent physiologically active peptides in oyster, even though the non-sulphated Cragi-CCK1 form may also be biologically relevant given its potency to activate Cragi-CCKRs. Indeed, in the context of local release from nerve terminals, a rather high concentration of peptide can be expected *in vivo* at the vicinity of the receptors. This assumption is fully compatible with a role of Cragi-CCK1 as a neurotransmitter, as formerly demonstrated for CCK[22] and SK[49] peptides. Regulatory

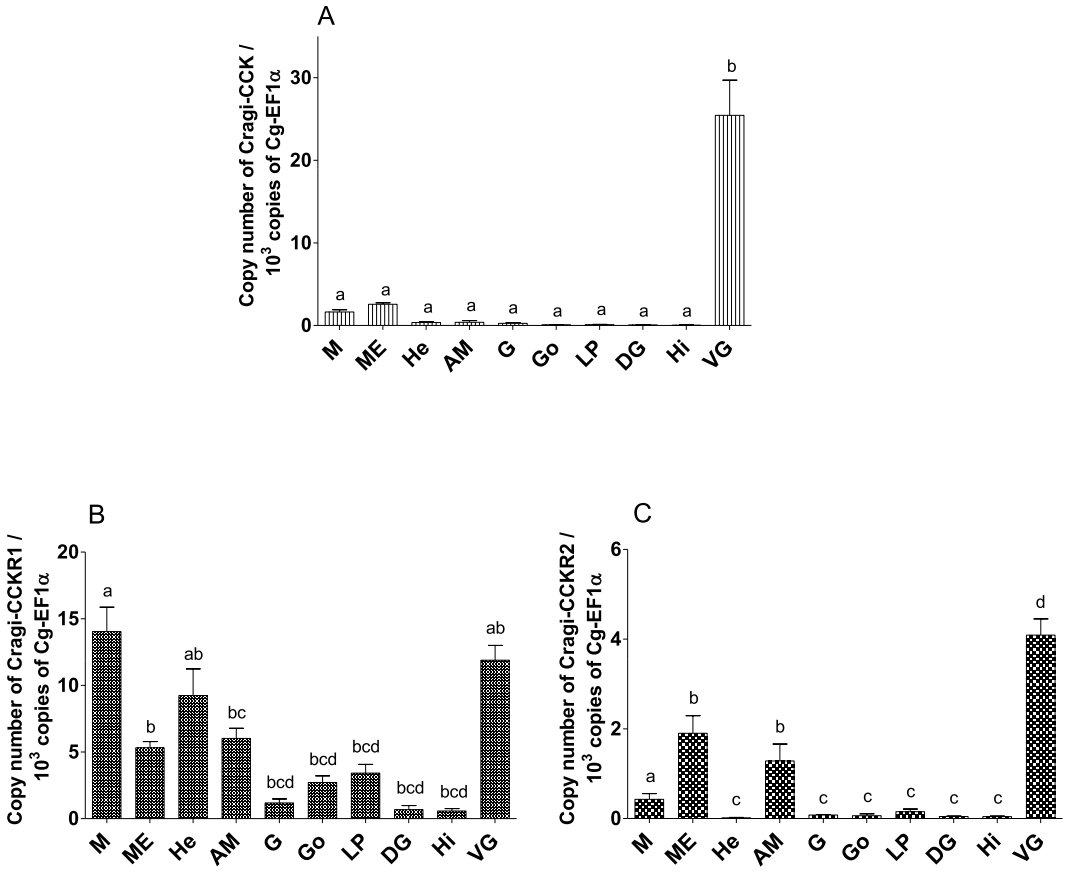


Figure 5. Distribution of mRNAs encoding Cragi-CCK (**A**), Cragi-CCKR1 (**B**) and Cragi-CCKR2 (**C**) in adult tissues. Each value is the mean + SEM of 5 pools of 6 animals. Expression levels were calculated as the number of copies of each specific transcript per 10^3 copies of Elongation Factor 1 α (EF1α) mRNA. Results were statistically tested with a one-way ANOVA $p < 0,05$. Significantly different means are indicated by different letters. M: Mantle; ME: Mantle Edge; He: heart; AM: Adductor Muscle; G: Gills; Go: Gonad; LP: Labial Palps; DG: Digestive Gland; Hi: Hindgut; VG: Visceral Ganglia.

activity from non-sulphated SKs was also shown in insects[50,51]. All oyster peptides activated calcium accumulation in Cragi-CCKR-expressing cells, suggesting that these receptors couple to G proteins of the $G\alpha_{q/11}$ familly. Similar findings were observed for chordate CCKRs[38,41] and SK family receptors[27,46,47], even though CCK1R[52], *C. elegans* CKR[27], and the red flour beetle SKR[47] also activated the cAMP transduction pathway. Activation of other signaling pathways cannot be ruled out, e.g. the JAK/STAT-dependent pathway: the activation of this pathway for CCK2R requires $G\alpha_q$ proteins and the NPXXY motif, which is also present in the Cragi-CCKR1 sequence[38]. Taken together, these results clearly show that the neuropeptide/receptor pairs Cragi-CCK1/Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 represent a Lophotrochozoan orthologue of the CCK/SK signalling systems of chordates and ecdysozoa.

In other respects, Cragi-CCK2 forms did not act as specific ligands for Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 since the concentrations required to elicit a partial activation of the receptors appear not physiologically relevant except conceivably in the specific context of synaptic transmission. This raises the issue of the nature of the cognate receptor(s) for this neuropeptide form which logically should display a relative phylogenetic vicinity to Cragi-CCKR1/2. The type of interaction between the two Cragi-CCK signalling systems is particularly intriguing since both peptides represent end products of the same precursor.

CCK/SK signalling systems regulate gut functioning, food ingestion, satiety, as well as a variety of other biological processes, so that these neuropeptides are now recognized as multifunctional regulators[22,53]. In oyster, the Cragi-CCK gene was predominantly expressed in nervous tissues, as expected for a neuropeptide-encoding gene. In contrast, Cragi-CCKRs were widely expressed in many tissues but with distinct patterns. Cragi-CCKR1 was expressed in almost all tissues though at variable levels, Cragi-CCKR2 was less expressed and mostly in the VG, in richly innervated tissues such as the adductor muscle and the mantle edge or in tissues containing neurons such as the mantle. These observations support a multifunctional activity for Cragi-CCKR1 signalling, and a more restricted role possibly associated with neuroregulation for Cragi-CCKR2 signalling.

Predominant expression of the Cragi-CCKR1 gene in oyster heart is reminiscent of the role of SKs in heart activity in insects[29]. In the same way, the expression of the Cragi-CCKR1 gene in oyster digestive tissues, albeit at moderate levels, is in agreement with the fact that SKs induce the release of α-amylase from the scallop digestive gland[37] or with the recorded activity of both sulphated and non-sulphated Cragi-CCK1 peptides on oyster

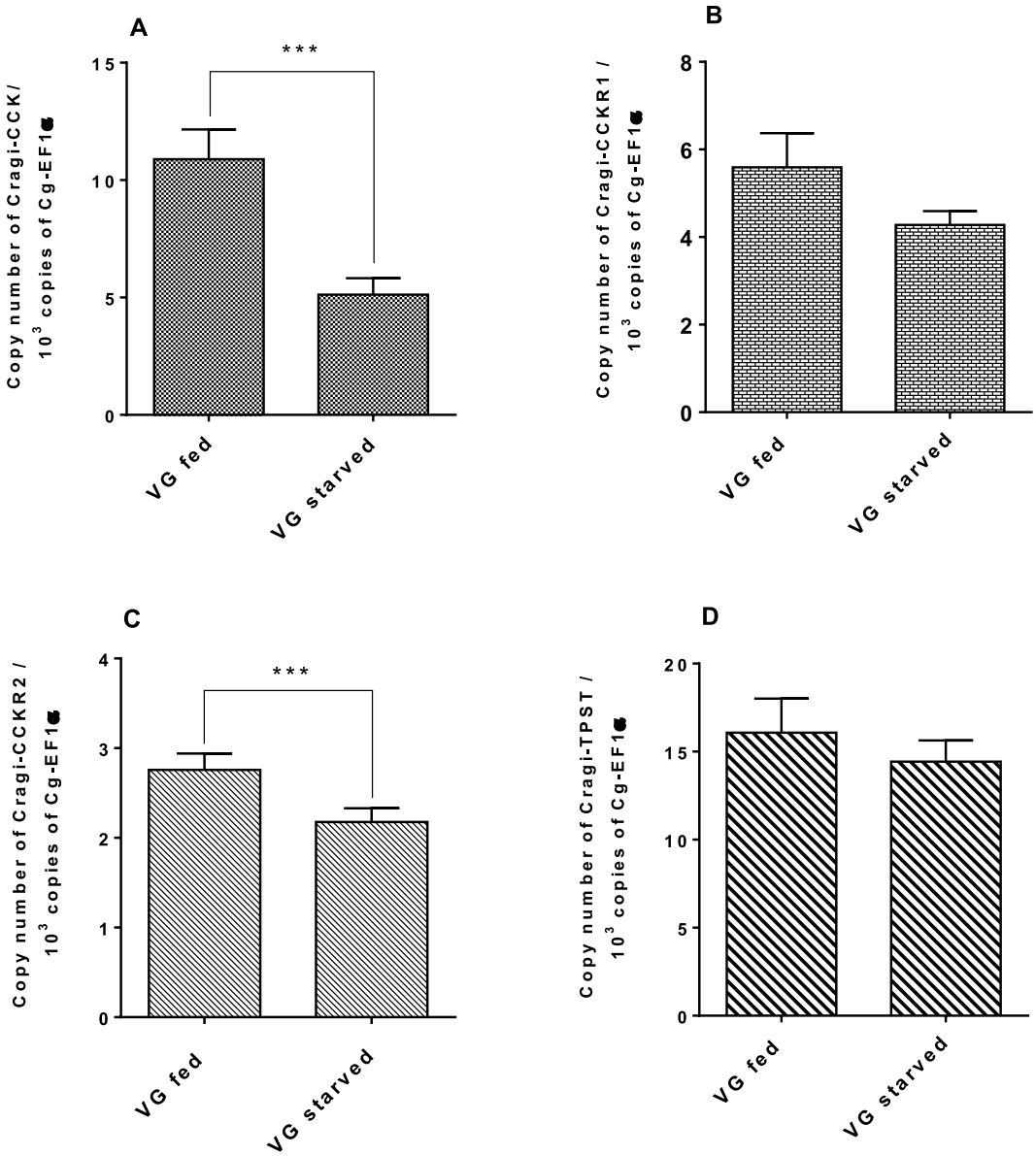


Figure 6. Expression levels of Cragi-CCK (**A**), Cragi-CCKR1 (**B**), Cragi-CCKR2 (**C**), Cragi-TPST (**D**) mRNAs in VG of four weeks *Isochrysis galbana* fed or starved oysters. Each value is the mean + SEM of 15 independent animals (VG after conditioning with or without food). Results were statistically tested with a student's t test. Significantly different means of samples from fed and starved animals are indicated by *($p < 0,05$) (**C**) and ***($p < 0.001$) (**A**). No significant statistical difference was observed for (**B**,**D**).

hindgut motility. Interestingly, Cragi-CCK1 peptides increase the period of spontaneous hindgut contractions *in vitro* but chiefly did not affect their amplitude, thus contrasting with the stimulatory effect of SKs on insect hindgut motility[54,55], but in line with the *in vivo* inhibition of foregut or larval anterior midgut contraction by SKs in *Drosophila*[51]. Cragi-CCK1 peptides seem to decrease the emptying process of the intestine in oyster. Thus, it would be interesting to test whether the anterior parts of the gut also respond to these peptides since different responses were noticed in different insect species[51,56]. By negatively controlling hindgut activity, Cragi-CCK1s probably affect food intake in oyster. The increased expression of Cragi-CCK1 and Cragi-CCKR2 in fed oysters as compared to starved oysters also pleads for a possible role of the Cragi-CCK system in satiety signalling, as also revealed in *Drosophila*[57] and other insects[31,33,58]. Besides the pleiotropic activities of CCK/SK peptides[22,53], it was intriguing to find a differential expression of Cragi-CCKR1 in the gonad area along the reproductive cycle and according to the nutritional status. Cragi-CCKR1 expression declined as gametogenesis progressed. Therefore, this receptor probably plays a role in glycogen storage cells since this tissue almost completely disappears in the mature gonad. SK signalling in Ecdysozoa is involved in the regulation of fat[27] and energy storage[50], and expression of Cragi-CCKR1 is higher in the gonad of fed oysters. Therefore it is tempting to propose a role for the Cragi-CCK signalling system as an additional regulator of the storage metabolism that might connect feeding and storage processes, as recently proposed for the sNPF-like signalling system in *C. gigas*[14].

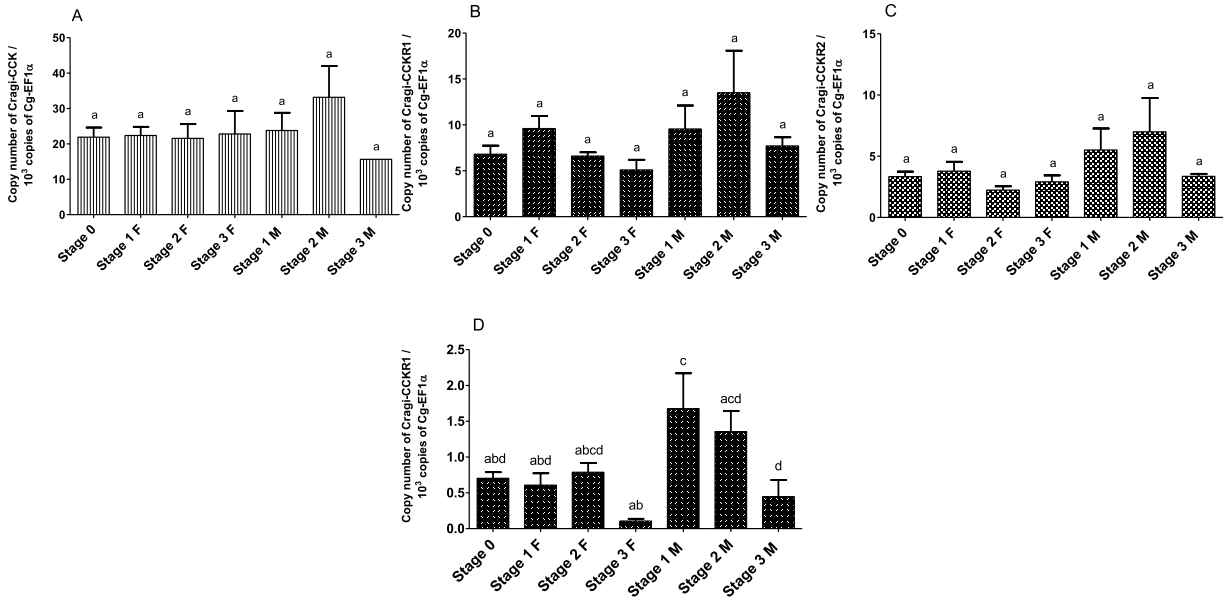


Figure 7. Level of expression of Cragi-CCK/Cragi-CCKR1/Cragi-CCKR2 mRNAs in VG (**A**–**C**) and of Cragi-CCKR1 mRNA in the gonads (**D**) along an annual reproductive cycle. Each value is the mean + SEM of 5 pools of 6 animals. Results were statistically tested with a one-way ANOVA, $p < 0,05$. Samples with significant statistical difference are marked with distinct letters. F: Female; M: Male; 0: stage 0 (sexual resting stage); 1: stage 1 (gonial multiplication stage); 2: stage 2 (tubule development and maturation stage); 3: stage 3 (sexual maturity stage).

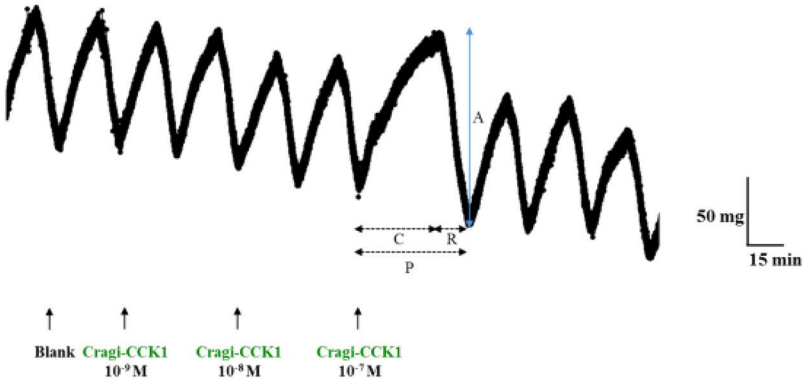


Figure 8. (**A**) Representative record of the hindgut-stimulating activity of Cragi-CCK1. Arrows indicate the application of saline solution (Blank) or Cragi-CCK1 peptide fractions at different concentrations. The different parameters taken into account to measure the biological response are indicated (C: Contraction time, R: Relaxation time, P: Period (min.) A: Amplitude of contraction (mg).

Peptide Name	Treatment	Duration (min)						Amplitude (A) (g)	
		Period (P)		Contraction (C)		Relaxation (R)			
Cragi-CCK1	No peptide	30,67 ± 0,67	***	20,18 ± 0,33	***	10,48 ± 0,78	*	0,161 ± 0,038	ns
	Peptide 10^{-7}M	51,27 ± 0,15		35,23 ± 1,32		16,03 ± 1,13		0,203 ± 0,038	
[Y⁶S] Cragi-CCK1	No peptide	31,53 ± 1,45	ns	20,18 ± 0,98	ns	11,35 ± 0,85	ns	0,129 ± 0,019	ns
	Peptide 10^{-5}M	32,23 ± 1,53		21 ± 1,42		11,23 ± 0,60		0,104 ± 0,021	
[Y⁸S] Cragi-CCK1	No peptide	29,66 ± 2,22	***	18,58 ± 1,03	***	11,08 ± 2,27	ns	0,121 ± 0,025	ns
	Peptide 10^{-10}M	54,75 ± 1,97		37,13 ± 3,28		17,62 ± 5,27		0,173 ± 0,023	
[Y⁶S-Y⁸S] Cragi-CCK1	No peptide	30,57 ± 2,22	***	18,76 ± 1,07	*	11,80 ± 1,63	***	0,103 ± 0,006	*
	Peptide 10^{-9}M	62,39 ± 2,50		38,57 ± 3,53		23,82 ± 1,35		0,153 ± 0,016	

Table 2. Effect of Cragi-CCK peptide variants on hindgut contraction parameters. Each value is the mean ± SEM of four experiments. Results were statistically tested with a student's t test, $*p < 0,05$, $***p < 0,001$, ns: not significant.

This study outlines the lophotrochozoan evolutionary version of the CCK/SK signalling system and underlines its remarkable conservation at the structural and functional levels, implying a central role of CCK/SK in physiological regulation in bilateria.

Material and Methods

Animals and tissue sampling. Two-year old adult oysters *C. gigas*, purchased from a local farm (Normandie, France), were used for peptide characterization and transcription analyses. Stages of reproduction (Stage 0: resting undifferentiated stage, Stage (1): gonial multiplication stage, Stage (2): maturation stage, Stage (3): sexual maturity) were determined by histological analysis of gonad sections as described previously[59]. To study the influence of trophic conditions, one-year-old adult oysters were reared in water tanks either in absence of food or in presence of *Isochrysis galbana* (clone T-Iso) maintained at a concentration of 6 million of cells/mL during (4) weeks. Adult tissues (mantle, gills, labial palps, digestive gland, hindgut, gonad (mix of all stages), heart, adductor muscle) were sampled, the visceral ganglia (VG) were carefully dissected out, thus limiting any contamination from the adjacent adductor muscles. All the samples were either placed in TriReagent (Sigma) or stored at −80 °C until use. For expression studies, adult tissues or VG and gonads during gametogenesis from (6) animals were mixed to generate (5) pools of each tissue. Individual VG from 15 fed or starved animals were used to study gene expression.

Peptide synthesis. All peptides were custom-synthesized by GeneCust (Luxemburg) using a standard Fmoc solid-phase protocol (Supplementary Table 1). Sulphated peptide variants were synthesized by coupling Fmoc-Tyr(SO_3Na)-OH amino acids instead of Fmoc-tyr(tBu)-OH amino acids. The sequences of *C. gigas* peptides were obtained from an in-house peptide database yielded by MS analyses of tissue extracts and data mining[7].

***In silico* analyses.** Multiple sequence alignment was performed with CCKRs from various species (Supplementary Table 2) using MUSCLE[60]. The alignment was manually trimmed that spans from the first to the seventh transmembrane domains. To determine the relationship between Cragi-CCKRs and CCKRs from other species, phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 6[61] based on the maximum likelihood method. The reliability of the inferred trees was estimated by applying the bootstrap procedure with 1000 replications.

Reverse endocrinology. *Molecular cloning of the Cragi-CCKRs and transfection of mammalian cells.* BLAST analysis of *C. gigas* transcriptomic database "GigaTon"[11] using *Drosophila* SKR as query resulted in the identification of two full length cDNAs encoding Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 (CHOYP_CCKAR.3.6 and CHOYP_CCKAR.4.6) respectively. The CDS of the Cragi-CCKR genes were amplified by PCR (Pfu DNA polymerase, Promega) using gene-specific sense primers harbouring a Kozak consensus sequence and antisense primers (Supplementary Table 3). Ten nanogram of plasmid DNA (Pal 17.3 vector, Evrogen) from a *C. gigas* "all developmental stages and adult central nervous system" directional and normalized cDNA library[62] was used as template. The resulting PCR products were directionally cloned into the pcDNA3.1 expression vector (Invitrogen). The correct insertion of the PCR products was confirmed by sequencing. Human Embryonic Kidney (HEK293T) cells were transiently transfected with the Cragi-CCKR/pcDNA3.1 constructs using Fugene HD (Promega) according to the manufacturer's instructions. As a first step, co-transfection was done with a pcDNA3.1 expression construct for the human $G\alpha_{16}$ subunit, a promiscuous G protein that can direct intracellular signalling of GPCRs to the release of calcium via the phospholipase C_β pathway, regardless of the endogenous G protein coupling of the receptor[63]. To assess receptor activity independent of $G\alpha_{16}$, calcium responses were measured in cells expressing only the Cragi-CCKRs. Cells for negative control experiments were transfected with empty pcDNA3.1 and $G\alpha_{16}$/pcDNA3.1 constructs.

Calcium fluorescence assay. Activation of the Cragi-CCKRs by candidate peptide ligands was monitored using a fluorescence-based calcium mobilization assay. Briefly, transfected HEK293T cells were loaded with Fluo-4 Direct (Invitrogen) plus probenecid (qsp 2.5 mM final in the cell) (Molecular Probes) for 1 hour (45 min at 37 °C and 15 min at room temperature). Excitation of the fluorophore was done at 488 nm. The calcium response was measured for 2 min at 525 nm using a FLEXstation 3 (Molecular Devices) at 37 °C. Data were analysed using SoftMax Pro (Molecular Devices). Candidate ligands were first tested at a final concentration of 10^{-5} M. Concentration-response measurements of activating ligands were conducted in quadruplicate and for at least three independent experiments. Half maximal effective concentrations (EC_{50} values) were calculated from concentration-response curves that were constructed using nonlinear regression analysis with a sigmoidal dose-response equation using Prism 5.0 (GraphPad software, USA).

cAMP luminescence assay. Cragi-CCKR transfected HEK 293 T cells were incubated with Glosensor cAMP reagent (qsp 4% final in the medium) (Promega) for 2 hours at room temperature prior to the injection of the candidate ligands. cAMP luminescence response was measured for 30 min after injection using a FLEX station 3 (Molecular Devices) at room temperature. Data were analysed using SoftMax Pro (Molecular Devices). Candidate peptide ligands were first tested at a final concentration of 10^{-5} M.

Reverse transcription and quantitative PCR. RT-qPCR analysis was performed using the iCycler iQ© apparatus (Bio-Rad). Total RNA was isolated from adult tissues using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Recovered RNA was then further purified on Nucleospin RNAII columns (Macherey-Nagel). After treatment during 20 min at 37 °C with 1 U of DNase I (Sigma) to prevent genomic DNA contamination, 1 μg of total RNA was reverse transcribed using 1 μg of random hexanucleotidic primers (Promega), 0.5 mM dNTPs and 200 U MMuLV Reverse Transcriptase (Promega) at 37 °C for 1 h in the appropriate buffer. The

reaction was stopped by incubation at 70 °C for 10 min. The GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) was used for real time monitoring of amplification (5 ng of cDNA template, 40 cycles: 95 °C/15 s, 60 °C/15 s) with gene-specific primers (Supplementary Table 2). A parallel amplification of *C. gigas* Elongation Factor 1α (EF1 α) transcript (BAD15289) was carried out to normalize the expression data of the studied transcripts. EF1 α was found as a reliable normalization gene as no significant difference ($p < 0.05$) of Ct values was observed between the different samples compared. Coefficient of variation of EF1 α was less than 5%. Thus, the relative level of each gene expression was calculated for one copy of the EF1 α reference gene by using the following formula: $N = 2^{(Ct\ EF1\alpha - Ct\ Cg\text{-}cDNA)}$. The PCR amplification efficiency (E; $E = 10^{(-1/slope)}$) for each primer pair was determined by linear regression analysis of a dilution series to ensure that E ranged from 1.98 to 2.02. The specificity of the primer pairs was confirmed by melting curve analysis at the end of each qPCR run.

Myotropic bioassay. The myotropic bioassay was performed using oyster's hindgut according to the protocol described earlier for the cuttlefish oviduct[64]. The muscle chamber was perfused at a flow rate of 0.67 mL.min^{-1}. Increasing concentrations of synthetic peptides (Cragi-CCK1, [Y^{8}S] Cragi-CCK1, [Y^{6}S] Cragi-CCK1, [Y^{6}S-Y^{8}S] Cragi-CCK1) were injected in the perfusing flow using a three-way valve to avoid mechanical stress. The flow of the samples into the muscle chamber was traced by adding phenol red.

Statistical analysis. Gene expression levels between different tissues and between samples at different reproduction stages were compared using one-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test. Expression levels between fed and starved animals were compared using an unpaired Student's t test. Significance was set at $p < 0.05$.

Purification and mass spectrometry analysis of endogenous Cragi-CCK1 forms. One hundred visceral ganglia, frozen and crushed in liquid nitrogen, were extracted in methanol/water/acetic acid (90/10/1 v/v/v) 30 minutes at 4 °C. After centrifugation 20 minutes at 15 000 g at 4 °C, supernatant was concentrated on C18 Sep-Pak cartridges. HPLC analysis was performed with a VARIAN-9012 solvent delivery system coupled to a VARIAN-9050 wave-length UV-VIS detector set at 214 nm. The extract was eluted with a 55-min linear gradient of 0.75% ACN *per* min from 22 to 58% ACN with TFA 0.1% on a C18 nucleodur column (4 mm × 250 mm × 5 µm). Fractions 45–48 corresponding to the retention times of the synthetic forms of CCK1 were pooled and separated on the same column with a 10-min linear gradient of 0.2% ACN per min from 45 to 47% ACN containing 10 mM ammonium acetate pH 5.2. Synthetic Cragi-CCK1, [Y^{6}S] Cragi-CCK1 and [Y^{6}S-Y^{8}S] Cragi-CCK1 were also separated in the same conditions. Fractions 15 to 19 were analyzed by mass spectrometry. Analysis was realized in a triple quadrupole mass spectrometer with an electrospray interface (LCMS 8030Plus; Shimadzu), with selected ion monitoring (SIM) mode. Ions selected for non-sulphated Cragi-CCK1 in positive mode were [M + H] + 1644.7, [M + 2 H]2 + 822.5 and 833.6, the [M + 2 H]2 + with sodium adduct. For sulphated peptides, negative mode was selected with respectively singly charged and doubled charged ions corresponding to 1722.4 and 860.4 for [Y^{6}S] Cragi-CCK1 and 1802.5 and 900.5 for [Y^{6}S-Y^{8}S] Cragi-CCK1.

References

1. Mirabeau, O. & Joly, J. Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 2028–2037 (2013).
2. Jékely, G. Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 8702–8707 (2013).
3. Cox, K. J. *et al*. Cloning, characterization, and expression of a G-protein-coupled receptor from *Lymnaea stagnalis* and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand. *J Neurosci* **17**, 1197–1205 (1997).
4. Tensen, C. P. *et al*. The lymnaea cardioexcitatory peptide (LyCEP) receptor: a G-protein-coupled receptor for a novel member of the RFamide neuropeptide family. *J Neurosci* **18**, 9812–9821 (1998).
5. Moroz, L. L. *et al*. Neuronal transcriptome of *Aplysia*: neuronal compartments and circuitry. *Cell* **127**, 1453–67 (2006).
6. Conzelmann, M., Williams, E. A., Krug, K., Franz-wachtel, M. & Macek, B. The neuropeptide complement of the marine annelid *Platynereis dumerilii*. *BMC Genomics* **14**, 906 (2013).
7. Stewart, M. J. *et al*. Neuropeptides encoded by the genomes of the Akoya pearl oyster *Pinctata fucata* and Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a bioinformatic and peptidomic survey. *BMC Genomics* **15**, 840 (2014).
8. Veenstra, J. A. Neurohormones and neuropeptides encoded by the genome of *Lottia gigantea*, with reference to other mollusks and insects. *Gen. Comp. Endocrinol.* **167**, 86–103 (2010).
9. Zatylny-Gaudin, C. *et al*. Neuropeptidome of the cephalopod *Sepia officinalis*: identification, tissue mapping, and expression pattern of neuropeptides and neurohormones during egg laying. *J. Proteome Res.* **15**, 48–67 (2016).
10. Zhang, G. G. *et al*. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49–54 (2012).
11. Riviere, G. *et al*. GigaTON: An extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Bioinformatics* **16**, 401 (2015).
12. Bauknecht, P. & Jékely, G. Large-scale combinatorial deorphanization of *Platynereis* neuropeptide GPCRs. *Cell Rep.* **12**, 684–693 (2015).
13. Conzelmann, M. *et al*. Conserved MIP receptor-ligand pair regulates *Platynereis* larval settlement. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 8224–8229 (2013).
14. Bigot, L. *et al*. Functional characterization of a short neuropeptide F-related receptor in a lophotrochozoan, the mollusk *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Biol.* **217**, 2974–2982 (2014).
15. Li, S. *et al*. Adipokinetic hormones and their G protein-coupled receptors emerged in Lophotrochozoa. *Scientific Reports* 1–13, https://doi.org/10.1038/srep32789 (2016).
16. Dubos, M.-P. *et al*. Characterization of a tachykinin signalling system in the bivalve mollusc *Crassostrea gig*as. *Gen. Comp. Endocrinol.* **266**, 110–118, https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.003 (2018).
17. Johnsen, A. H. Phylogeny of the Cholecystokinin/Gastrin Family. *Front. Neuroendocrinol.* **19**, 73–99 (1998).
18. Makhlouf, G. M., McManus, J. P. & Card, W. I. The action of gastrin II on gastric-acid secretion in man. Comparison of the maximal secretory response to gastrin II and histamine. *Lancet (London, England)* **2**, 485–9 (1964).
19. Koh, T. J. & Chen, D. Gastrin as a growth factor in the gastrointestinal tract. *Regul. Pept.* **93**, 37–44 (2000).
20. Schmidt, W. E. *et al*. Role of CCK in regulation of pancreaticobiliary functions and GI motility in humans: effects of loxiglumide. *Am. J. Physiol.* **260**, G197–206 (1991).

21. Gibbs, J., Young, R. C. & Smith, G. P. Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* **245**, 323–5 (1973).
22. Rehfeld, J. F. Cholecystokinin-From local gut hormone to ubiquitous messenger. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **8**, 1–8 (2017).
23. Nachman, R. J., Holman, G., Haddon, W. F. & Ling, N. Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to Gastrin and Cholecystokinin. *Science (80-.).* **234**, 71–73 (1986).
24. Clynen, E. & Schoofs, L. Peptidomic survey of the locust neuroendocrine system. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 491–507 (2009).
25. Zoephel, J., Reiher, W., Rexer, K.-H., Kahnt, J. & Wegener, C. Peptidomics of the agriculturally damaging larval stage of the cabbage root fly *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae). *PLoS One* **7**, e41543 (2012).
26. Torfs, P. *et al*. Isolation, identification, and synthesis of a disulfated sulfakinin from the central nervous system of an arthropod the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**, 312–20 (2002).
27. Janssen, T. *et al*. Discovery of a cholecystokinin-gastrin-like signaling system in nematodes. *Endocrinology* **149**, 2826–2839 (2008).
28. Maestro, J. L. *et al*. Screening of antifeedant activity in brain extracts led to the identification of sulfakinin as a satiety promoter in the German cockroach. Are arthropod sulfakinins homologous to vertebrate gastrins-cholecystokinins? *Eur. J. Biochem.* **268**, 5824–30 (2001).
29. Nichols, R., Manoogian, B., Walling, E. & Mispelon, M. Plasticity in the effects of sulfated and nonsulfated sulfakinin on heart contractions. Front. Biosci. **14**, 4035–43 (2009).
30. Harshini, S., Nachman, R. J. & Sreekumar, S. *In vitro* release of digestive enzymes by FMRF amide related neuropeptides and analogues in the lepidopteran insect *Opisina arenosella* (Walk.). *Peptides* **23**, 1759–63 (2002).
31. Zels, S. *et al*. Sulfakinin is an important regulator of digestive processes in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **61**, 8–16 (2015).
32. Wei, Z. *et al*. Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.* **46**, 1259–1265 (2000).
33. Meyering-Vos, M. & Müller, A. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **53**, 840–848 (2007).
34. Yu, N. & Smagghe, G. CCK(-like) and receptors: Structure and phylogeny in a comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* **209**, 74–81 (2014).
35. Vigna, S. R., Morgan, J. L. & Thomas, T. M. Localization and characterization of gastrin/cholecystokinin-like immunoreactivity in the central nervous system of *Aplysia californica*. *J. Neurosci.* **4**, 1370–7 (1984).
36. Dhainaut-Courtois, N., Dubois, M. P., Tramu, G. & Masson, M. Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annelida Polychaeta) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. *Cell Tissue Res.* **242**, 97–108 (1985).
37. Nachman, R. J. *et al*. Insect myosuppressins and sulfakinins stimulate release of the digestive enzyme α-amylase in two invertebrates: The scallop *Pecten maximus* and insect *Rhynchophorus ferrugineus*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **814**, (1997).
38. Dufresne, M., Seva, C. & Fourmy, D. Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol. Rev.* **86**, 805–847 (2006).
39. Zatylny-Gaudin, C. & Favrel, P. Diversity of the RFamide peptide family in mollusks. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **5**, 1–14 (2014).
40. Johnsen, A. H. & Rehfeld, J. F. Cionin: A disulfotyrosyl hybrid of cholecystokinin and gastrin from the neural ganglion of the protochordate *Ciona intestinalis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 3054–3058 (1990).
41. Sekiguchi, T., Ogasawara, M. & Satake, H. Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, *Ciona intestinalis*: the evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family. *J. Endocrinol.* **213**, 99–106 (2012).
42. Veenstra, J. A. Neuropeptide evolution: neurohormones and neuropeptides predicted from the genomes of *Capitella teleta* and *Helobdella robusta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **171**, 160–75 (2011).
43. McVeigh, P., Leech, S., Marks, N. J., Geary, T. G. & Maule, A. G. Gene expression and pharmacology of nematode NLP-12 neuropeptides. *Int. J. Parasitol.* **36**, 633–640 (2006).
44. Elphick, M. R. & Mirabeau, O. The Evolution and Variety of RFamide-Type Neuropeptides: Insights from Deuterostomian Invertebrates. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **5**, 93 (2014).
45. Griffiths, J. R. & Unwin, R. D. Analysis of protein post-translational modifications by mass spectrometry. (Wiley and Sons, 2016).
46. Kubiak, T. M. *et al*. Cloning and functional expression of the first *Drosophila melanogaster* sulfakinin receptor DSK-R1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 313–20 (2002).
47. Zels, S. *et al*. Signaling properties and pharmacological analysis of two sulfakinin receptors from the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *PLoS One* **9**, e94502. (2014).
48. Gigoux, V. *et al*. Arginine 197 of the cholecystokinin-A receptor binding site interacts with the sulfate of the peptide agonist cholecystokinin. *Protein Sci.* **8**, 2347–54 (1999).
49. Duve, H. *et al*. The sulfakinins of the blowfly *Calliphora vomitoria*. Peptide isolation, gene cloning and expression studies. *Eur. J. Biochem.* **640**, 633–640 (1995).
50. Slocinska, M., Marciniak, P., Jarmuszkiewicz, W. & Rosinski, G. New metabolic activity of the nonsulfated sulfakinin Zopat-SK-1 in the insect fat body. *Peptides* **68**, 157–163 (2015).
51. Nichols, R. The first nonsulfated sulfakinin activity reported suggests nsDSK acts in gut biology. *Peptides* **28**, 767–773 (2007).
52. Yule, D. I., Tseng, M. J., Williams, J. A. & Logdson, C. D. A cloned CCK-A receptor transduces multiple signals in response to full and partial agonists. *Am. J. Physiol.* **265**, G999–1004 (1993).
53. Nässel, D. R. & Williams, M. J. Cholecystokinin-like peptide (DSK) In *Drosophila*, not only for satiety signaling. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **5**, 1–5 (2014).
54. Nachman, R. J., Holman, G. M., Cook, B. J., Haddon, W. F. & Ling, N. Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 357–364 (1986).
55. Al-Alkawi, H., Lange, A. B. & Orchard, I. Cloning, localization, and physiological effects of sulfakinin in the kissing bug. *Rhodnius prolixus*. *Peptides* **98**, 15–22 (2017).
56. Haselton, A. T., Yin, C.-M. & Stoffolano, J. G. The effects of *Calliphora vomitoria* Tachykinin-I and the FMRFamide-related peptide Perisulfakinin on female *Phormia regina* crop contractions, *in vitro*. *J. Insect Physiol.* **52**, 436–441 (2006).
57. Söderberg, J. A. E., Carlsson, M. A. & Nässel, D. R. Insulin-producing cells in the *Drosophila* brain also express satiety-inducing cholecystokinin-like peptide, drosulfakinin. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **3**, 1–13 (2012).
58. Yu, N., Nachman, R. J. & Smagghe, G. Characterization of sulfakinin and sulfakinin receptor and their roles in food intake in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **188**, 196–203 (2013).
59. Rodet, F., Lelong, C., Dubos, M.-P., Costil, K. & Favrel, P. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochim Biophys Acta* **1730**, 187–195 (2005).
60. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–7 (2004).
61. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729 (2013).
62. Fleury, E. *et al*. Generation and analysis of a 29, 745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster *(Crassostrea gigas)* assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* **15**, 1–15 (2009).
63. Offermanns, S. & Simon, M. I. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **270**, 15175–80 (1995).
64. Endress, M. *et al*. Crustacean cardioactive peptides: Expression, localization, structure, and a possible involvement in regulation of egg-laying in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **260**, 67–79 (2018).
65. Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–80 (1994).

Acknowledgements

This work was funded by the ANR project "NEMO" (ANR 14CE02 0020). J. Schwartz PhD fellowship was co-financed by the NEMO project and by the European Union within the framework of the operational program FEDER/FSE 2014–2020. We are grateful to Professor Raphaël Delépée and the ICORE facility "PRISMM" for the mass spectrometry analyses and to Dr Emilie Réalis-Doyelle for her help in statistical analyses

Author Contributions

J.S. and P.F. designed the experiments. J.S., M.P.D. and C.Z.G. performed the experiments, J.S. and J.P. performed the phylogenetic analyses. C.Z.G. analysed the mass spectrometry data. J.S., C.Z.G., M.P.D., J.P. and P.F. analysed the data. J.S. and P.F. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-018-34700-4.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2018

Supplementary data article "Emergence of a cholecystokinin/sulfakinin signalling system in Lophotrochozoa"

Supplementary data

Supplementary table 1: Amino acid sequences of Cragi-CCK peptides.

Name	Amino acid sequence (NH_2 to COOH)
Cragi-CCK1	pEGAWDYDYGLGGGRFamide
[Y^8S] Cragi-CCK1	pEGAWDYDY(SO_3H)GLGGGRFamide
[Y^6S] Cragi-CCK1	pEGAWDY(SO_3H)DYGLGGGRFamide
[Y^6S-Y^8S] Cragi-CCK1	pEGAWDY(SO_3H)DY(SO_3H)GLGGGRFamide
Cragi-CCK2	FDYGGGRWamide
[Y^3S] Cragi-CCK2	FDY(SO_3H)GGGRWamide

Supplementary table 2: Accession numbers and references of the CCKR sequences used for the alignment and the phylogenetic analysis
(* indicates functionally characterized receptors)

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
CCK1R	*Airluropoda melanoleuca*	XP_002924347.1	Vertebrate	No reference
CCK2R	*Airluropoda melanoleuca*	XP_002925026.1	Vertebrate	No reference
SKR	*Anopheles gambiae*	XP_001237203.1	Ecdysozoa (Arthropod)	S. Kobberup, C.J.P. Grimmelikhuijzen, Annotation for a putative Anopheles gambiae sulfakinin receptor., (Unpublished)
SKR	*Apis mellifera*	XP_006562432.1	Ecdysozoa (Arthropod)	No reference
SKR	*Bombyx mori*	NP_001127744.1	Ecdysozoa (Arthropod)	N. Yamanaka, S. Yamamoto, D. Zitnan, K. Watanabe, T. Kawada, H. Satake, Y. Kaneko, K. Hiruma, Y. Tanaka, T. Shinoda, H. Kataoka, Neuropeptide réception transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathways., PLoS ONE. 3 (2008).
CCK1R	*Bos taurus*	NP_001095335.1	Vertebrate	A.V. Zimin, A.L. Delcher, L. Florea, D.R. Kelley, M.C. Schatz, D. Puiu, F. Hanrahan, G. Pertea, C.P. Van Tassell, T.S. Sonstegard, G. Marcais, M. Roberts, P. Subramanian, J.A. Yorke and S.L. Salzberg, A whole-genome assembly of the domestic cow, Bos Taurus., Genome Biol. 10 (2009).
CCK2R*	*Bos taurus*	NP_776687.2	Vertebrate	M. Dufresne, C. Escrieut, P. Clerc, I. Le Huerou-Luron, H. Prats, V. Bertrand, V. Le Meuth, P. Guilloteau, N. Vaysse, D. Fourmy, Molecular cloning, developmental expression and pharmacological characterization of the CCKB/gastrin receptor in the calf pancreas., European journal of pharmacology. 297 (1996) 165-79.
CCKR	*Capitella capitata*	ELT89517.1	Lophotrochozoa (Annelida)	O. Simakoy, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten., D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry, J.L. Boore, I.V. Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar, Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature. 493, (2013) 526-531.

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
CKR1	*Caenorhabditis elegans*	NP_491918.3	Ecdysozoa (Nematoda)	T. Janssen, E. Meelkop, M. Lindemans, K. Verstraelen, S.J. Husson, L. Temmerman, R.J. Nachman, L. Schoofs, Discovery of a cholecystokinin-gastrin-like signaling system in nematodes., Endocrinology. 149 (2008) 2826-2839.
CKR2a*	*Caenorhabditis elegans*	ACA81683.1	Ecdysozoa (Nematoda)	T. Janssen, E. Meelkop, M. Lindemans, K. Verstraelen, S.J. Husson, L. Temmerman, R.J. Nachman, L. Schoofs, Discovery of a cholecystokinin-gastrin-like signaling system in nematodes., Endocrinology. 149 (2008) 2826-2839.
CKR2b*	*Caenorhabditis elegans*	ACA81684.1	Ecdysozoa (Nematoda)	T. Janssen, E. Meelkop, M. Lindemans, K. Verstraelen, S.J. Husson, L. Temmerman, R.J. Nachman, L. Schoofs, Discovery of a cholecystokinin-gastrin-like signaling system in nematodes., Endocrinology. 149 (2008) 2826-2839.
CCK1R	*Callithrix jacchus*	XP_002745977.1	Vertebrate	No reference
CioR1*	*Ciona intestinalis*	NP_001027945.1	Urochordate	T. Sekiguchi, M. Ogasawara, H. Satake, Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, Ciona intestinalis: The evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family., Journal of endocrinology. 213 (2012) 99-106.
CioR2*	*Ciona intestinalis*	NP_001265909.1	Urochordate	T. Sekiguchi, M. Ogasawara, H. Satake, Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, Ciona intestinalis: The evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family., Journal of endocrinology. 213 (2012) 99-106.
Cragi-CCKR1*	*Crassostrea gigas*	MF787221	Lophotrochozoa (Mollusc)	Present publication
Cragi-CCKR2*	*Crassostrea gigas*	MF787222	Lophotrochozoa (Mollusc)	Present publication
CCK1R	*Danio rerio*	XP_697493.2	Vertebrate	No reference
CCK2R	*Danio rerio*	CAQ14219.1	Vertebrate	No reference

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
DSKR1*	*Drosophila melanogaster*	NP_001097021.1	Ecdysozoa (Arthropod)	T.M. Kubiak, M.J. Larsen, K.J. Burton, C.A. Bannow, R.A. Martin, M.R. Zantello, D.E. Lowery, Cloning and functional expression of the first Drosophila melanogaster sulfakinin receptor DSK-R1., Biochemical and biophysical research communications. 291 (2002) 313-320.
DSKR2*	*Drosophila melanogaster*	NP_001097023.1	Ecdysozoa (Arthropod)	R. Nichols. The first nonsulfated sulfakinin activity reported suggests nsDSK acts in gut biology., Peptides. 28 (2007) 767-773.
CCK1R	*Gallus gallus*	NP_001074970.1	Vertebrate	I.C. Dunn, S.L. Meddle, P.W. Wilson, C.A. Wardle, A.S. Law, V.R. Bishop, C.Hindar, G.W. Robertson, D.W. Burt, S.J.H. Ellison, D.M. Morrice, P.M. Hocking, Decreased expression of the satiety signal receptor CCKAR is responsible for increased growth and body weight during the domestication of chickens., AJP: Endocrinology and Metabolism. 304 (2013) E909-E921.
CCK2R*	*Gallus gallus*	NP_001001742.1	Vertebrate	I.B.M. Nilsson, S.P.S. Svensson, H.J. Monstein, Molecular cloning of an unusual bicistronic cholecystokinin receptor mRNA expressed in chicken brain: A structural and functional expression study., Regulatory Peptides. 114 (2003) 37-43.
CCKR	*Helobdella robusta*	XP_009030452.1	Lophotrochozoa (Annelida)	O. Simakoy, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten., D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry, J.L. Boore, I.V. Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar, Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature. 493, (2013) 526-531.
CCK1R*	*Homo sapiens*	NP_000721.1	Vertebrate	C.D. Ulrich, I. Ferber, E. Holicky, E. Hadac, G. Buell, L.J. Miller, Molecular cloning and functional expression of the human gallbladder cholecystokinin A receptor., Biochemical and biophysical research communications. 191 (2013) 204-211.

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
CCK2R*	*Homo sapiens*	NP_795344.1	Vertebrate	Y.M. Lee, M. Beinborn, E.W. McBride, M. Lu, L.F. Kolakowski, A.S. Kopin, The human brain Cholecystokinin-B/gastrin receptor. Cloning and characterization. Journal of Biological Chemistry. 268 (1993) 8164-8169.
CCK1R	*Lottia gigantean*	XP_009059889.1	Lophotrochozoa (Mollusc)	O. Simakoy, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten., D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry, J.L. Boore, I.V. Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar, Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature. 493, (2013) 526-531.
CCK2R	*Lottia gigantean*	XP_009047126.1	Lophotrochozoa (Mollusc)	O. Simakoy, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten., D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry, J.L. Boore, I.V. Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar, Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature. 493, (2013) 526-531.
CCK3R	*Lottia gigantean*	XP_009047144.1	Lophotrochozoa (Mollusc)	O. Simakoy, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten., D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry, J.L. Boore, I.V. Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar, Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature. 493, (2013) 526-531.
CCK1R	*Macaca mulatta*	XP_001084186.1	Vertebrate	No reference
CCK2R	*Macaca mulatta*	XP_001102094.1	Vertebrate	No reference

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
CCK1R*	*Mus musculus*	NP_033957.1	Vertebrate	D. Ghanekar, E.M. Hadac,E.L. Holicky, L.J. Miller. Differences in partial agonist action at cholecystokinin receptors of mouse and rat are dependent on parameters extrinsic to receptor structure: molecular cloning, expression and functional characterization of the mouse type a cholecystokinin receptor.J Pharmacol Exp Ther. 282 (1997) 1206-1212.
CCK2R*	*Mus musculus*	NP_031653.1	Vertebrate	L.C. Samuelson, M.S. Isakoff, K.A. Lacourse. Localization of the murine cholecystokinin A and B receptor genes. Mamm Genome. 6 (1995) 242–246.
CCK1R	*Pan troglodytes*	XP_526545.1	Vertebrate	No reference
CCK2R	*Pan troglodytes*	XP_521813.1	Vertebrate	No reference
CCK1R*	*Rattus norvegicus*	NP_036820.1	Vertebrate	S.A. Wank, R. Harkins, R.T. Jensen, H. Shapira, A. de Weerth, T. Slattery, Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas., Proc Natl Acad Sci USA. 89 (1992) 3125-3129.
CCK2R*	*Rattus norvegicus*	NP_037297.1	Vertebrate	J.R. Pisegna, A. De Weerth, K. Huppi, S.A. Wank, Molecular cloning of the human brain and gastric cholecystokinin receptor. Biochemical and biophysical research communications. 189 (1992) 296-303.

Supplementary table 3: **Sequence of the primers used for cloning experiments and RT-qPCR.**

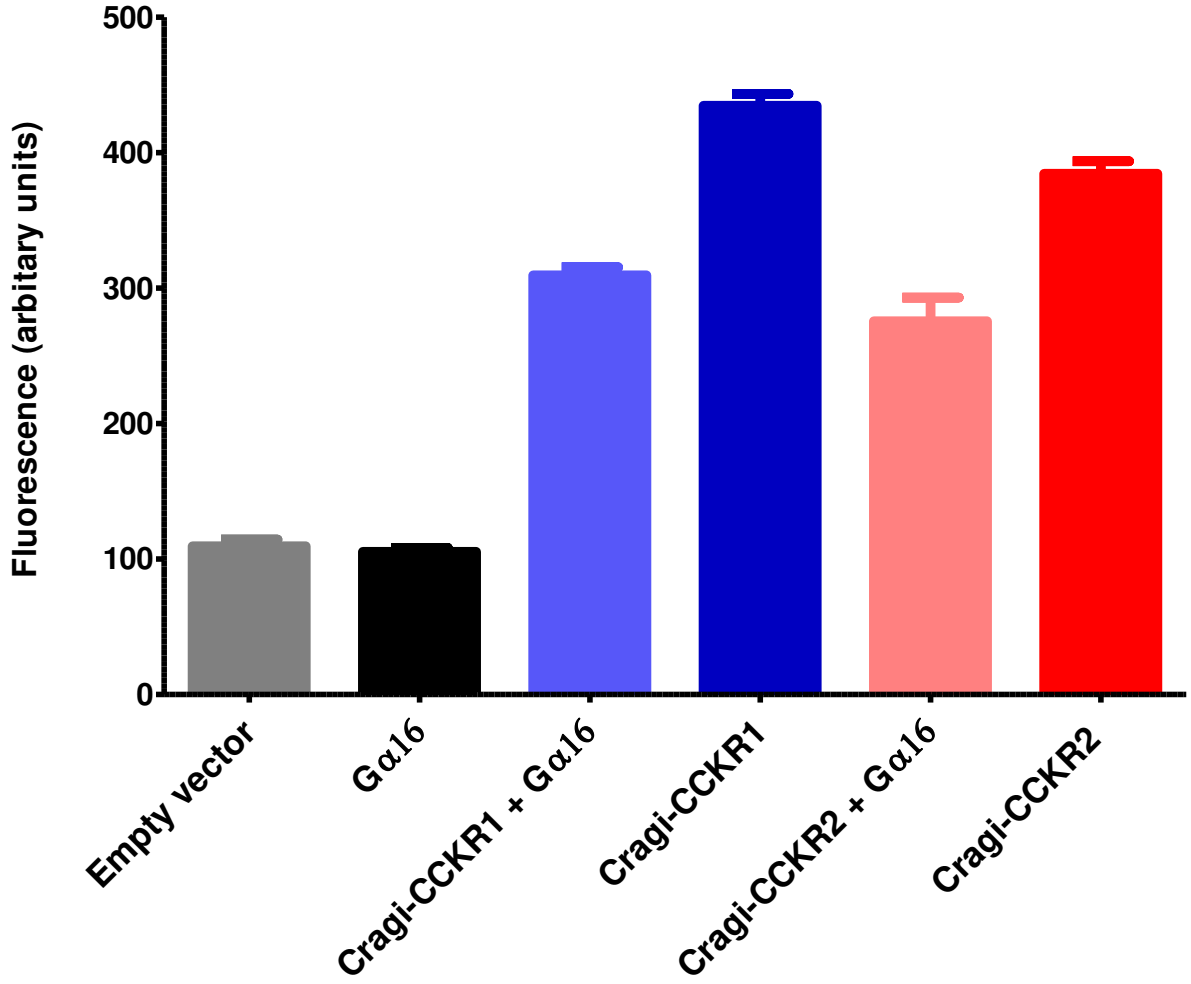
Specific primer	Sequence (5' to 3')	Primer information
s-*Cragi*-CCKR1	5'-**CACCATGA**ATAGTTCCAACATTTCCGAGTG-3'	CDS fragment
as-*Cragi*-CCKR1	5'-TTAAACATGTTCTTGCGTCACTTCCGCGT-3'	CDS fragment
s-*Cragi*-CCKR2	5'-**CACCATGG**CCTCCGAGAACCTG-3'	CDS fragment
as-*Cragi*-CCKR2	5'-TTACTCAATGGACTGAACTCGTGTGTACTC-3'	CDS fragment
Qs-*Cragi*-CCKR1	5′-GTATGCCCTTCAACATCATTCCA-3′	qPCR
Qa-*Cragi*-CCKR1	5′-GTATCCGTTGGTGTCAGCAGT-3′	qPCR
Qs-*Cragi*-CCKR2	5′-GGGAACGGGTTGGTGATT-3′	qPCR
Qa-*Cragi*-CCKR2	5′-CCGTCCTCTGTATGCCCTTC-3′	qPCR
Qs-*Cragi*-CCKs	5′-CAGACACCAGAAAACAGCGTG-3′	qPCR
Qa-*Cragi*-CCKs	5′-GTCCCTCCAGCATAACGACAA-3′	qPCR
Qs-*Cragi*-TPST	5'-ACGGAAAGCCTGACCCAAA-3'	qPCR Tyrosylprotein sulfotransferase
Qa-*Cragi*-TPST	5'-GGCCAAAATCTCCTGCTCCT-3'	qPCR Tyrosylprotein sulfotransferase
Qs-*Cg*-EF	5′-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3′	qPCR Elongation Factor 1 α
Qa-*Cg*-EF	5′-ACGACGATCGCATTTCTCTT-3′	qPCR Elongation Factor 1 α

CDS: Coding DNA Sequences. s: sense primer. as: antisense primer**.** Nucleotides of the Kozak consensus sequence are in bold.

Supplementary table 4: Expression levels of Cragi-CCKRs, Cragi-CCK, Cragi-TPST in tissues of four weeks fed and starved oysters

	Cragi-CCKR1		Cragi-CCKR2		Cragi-CCKs		Cragi-TPST	
	Fed	Starved	Fed	Starved	Fed	Starved	Fed	Starved
Visceral ganglia	5,61 ± 1,52	4,35 ± 0,71	4,08 ± 1,54	2,04 ± 0,20	12,25 ± 2,06	6,10 ± 1,22	15,41± 1,83	22,66 ± 6,87
Mantle edge	3,12 ± 0,65	2,14 ± 0,31	1,86 ± 0,54	0,95 ± 0,20	2,04 ± 0,66	0,99 ± 0,34	12,84 ± 6,65	5,05 ± 0,96
Labial palps	1,82 ± 0,38	1,04 ± 0,23	0,28 ± 0,09	0,21± 0,07	0,13 ± 0,06	0.07 ± 0,03	3,96 ± 0,68	2,56 ± 0,44
Digestive gland	0,40 ± 0,09	0,24 ± 0,08	0,026 ± ,01	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01	3,64 ± 0,51	3,02 ± 0,2
Hindgut	0,78 ± 0,32	0,33± 0,15	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,007	0,06 ± 0,02	1,33 ± 0,60	4,16 ± 1,75
Gonad (Stages 1/2)	1,42 ± 0,22	0,76 ± 0,11	0,07 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,04	5,82 ± 1,52	4,34 ± 0,31

Values are means ± SEM of the number of copies of a specific transcript per 10^3 copies of elongation factor 1α (EF1α) mRNA. Grey-coloured shadings represent significantly different values ($p<0.05$, Student's t test).



Supplementary Figure 1: Fluorescent signal induced by Cragi-CCKR1 and Cragi-CCKR2 expressed in HEK293T cells and challenged by Cragi-CCK1 at the concentration of 10^{-5}M in absence (Cragi-CCKR1 / Cragi-CCKR2) or presence (Cragi-CCKR1 / Cragi-CCKR2+ $G_{\alpha 16}$) of the promiscuous protein $G_{\alpha 16}$. $G_{\alpha 16}$ expressed alone or cells transfected with an empty vector were used as negative controls. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEM), number of replicates n=3.

10.2.2 Discussion

L'ensemble des expériences menées a permis de montrer pour la première fois, l'existence d'une voie de signalisation de type gastrine/CCK/SK chez les Lophotrochozoaires. De manière intéressante, les Cragi-CCK1/2 et leurs récepteurs associés, partagent en plus d'homologies structurales avec les CCK(R)s/SK(R)s d'autres espèces, des fonctions similaires. En effet, les études de qPCR ont montré que le précurseur codant les deux peptides est exprimé de manière plus importante dans les ganglions viscéraux d'huîtres nourries. Ces résultats suggèrent l'implication potentielle des CCK d'huîtres dans la régulation de la satiété, comme cela a été montré chez les mammifères (Gibbs et al. 1973) et chez plusieurs espèces d'insectes (Meyering-Vos and Müller 2007b; Yu et al. 2012; Zels et al. 2015). De plus, des tests d'activité myotrope ont montré que les peptides Cragi-CCK1, [Y^8S] Cragi-CCK1 et [Y^6S-Y^8S] Cragi-CCK1 induisent une modification de la durée de la période due à augmentation du temps de contraction et pour Cragi-CCK1 et [Y^6S-Y^8S] Cragi-CCK1, également due à une augmentation du temps de relâchement du rectum d'huître. L'ensemble de ces résultats suggère l'implication de la voie de type gastrine/CCK/SK de l'huître *Crassostrea gigas* dans la régulation des fonctions digestives.

Cette voie de signalisation implique deux récepteurs Cragi-CCKR1 et Cragi-CCKR2 tous deux activés par le peptide Cragi-CCK1. De manière intéressante, le peptide Cragi-CCK2 sous sa forme non-sulfatée n'active pas les récepteurs. En outre, Cragi-CCK2 sulfatée active uniquement le récepteur Cragi-CCKR1 mais, en présence de concentrations élevées. De ce fait, il a été recherché dans les banques de données transcriptomiques, des récepteurs phylogénétiquement proches de Cragi-CCKR1 et Cragi-CCKR2, pouvant lier Cragi-CCK2. À l'heure actuelle, ce récepteur reste inconnu. Aussi, il serait intéressant d'intensifier les recherches afin d'identifier le récepteur de ce neuropeptide.

Chapitre II :

Identification d'une voie de signalisation de type calcitonine/« Diuretic Hormone » 31 chez l'huître Crassostrea gigas

Chapitre II : identification d'une voie de signalisation de type calcitonine/« Diuretic Hormone » 31 chez l'huître *Crassostrea gigas*

Parmi les RCPGs identifiés au sein des banques de données transcriptomiques, il a été recherché du fait du thème de recherche de l'équipe d'accueil, des récepteurs potentiellement impliqués dans la fonction de reproduction. Pour cela, un travail préliminaire a consisté à analyser les données de RNAseq issues du tableau S14 « Transcriptomic representation of gene (RPKM) at different developmental stages and in different adult organ » (Zhang et al. 2012a) (RPKM : Reads Per Kilobase Million) disponibles sur l'interface GigaTON (Riviere et al. 2015) et à cibler les récepteurs exprimés de manière importante au sein des gonades mâles et/ou femelles. Plusieurs récepteurs ont été identifiés. Parmi ces récepteurs figurent des RCPGs potentiels à la calcitonine. De manière intéressante, des travaux précédents avaient mis en évidence la présence d'un récepteur de type calcitonine chez l'huître sur la base d'homologie de séquences avec des récepteurs de la famille de la calcitonine caractérisés chez l'homme (Dubos et al. 2003). Cependant, l'existence d'un ou plusieurs peptides de type calcitonine n'avait pas pu être démontrée. De ce fait, ce travail de thèse propose d'enrichir les connaissances sur la voie de signalisation calcitoninergique chez l'huître *Crassostrea gigas* et ce, grâce à l'exploitation des nouvelles données génomiques et transcriptomiques disponibles (Zhang et al. 2012a; Riviere et al. 2015).

1 Découverte de la calcitonine

En 1909, MacCallum et Voegtlin (MacCallum and Voegtlin 1909) ont observé que l'ablation chirurgicale des glandes parathyroïdes, dont la principale fonction encore inconnue, est de maintenir et réguler le niveau de calcium dans les fluides corporels, était accompagnée d'une chute importante du calcium sanguin associée à une tétanie et à des convulsions. Quelques années plus tard, Collip montra que l'administration d'un extrait de glandes parathyroïdes de bœuf, entraînait l'augmentation du taux de calcium dans le sang chez des chiens ayant subi une parathyroïdectomie (Collip 1925). En 1961, la parathormone fut purifiée depuis des glandes parathyroïdes de bovins (Rasmussen and Craig 1961). Selon les hypothèses émises, la parathormone serait contrôlée par le taux de calcium sanguin (Howard 1957). En d'autres

termes, une hypocalcémie stimulerait la production de cette hormone alors qu'une hypercalcémie l'inhiberait. De ce fait, selon McLean, il existerait un mécanisme de rétroaction. Ainsi, l'hypocalcémie stimulerait la production de parathormone, qui mobiliserait le calcium des os afin de rétablir le taux de calcium sanguin à la normale (McLean 1957). De plus, une hypercalcémie inhiberait la production de parathormone et provoquerait une chute du calcium sanguin similaire à celle provoquée par une parathyroïdectomie. Toutefois, un tel mécanisme de rétroaction provoquerait de grandes oscillations du taux de calcium (Rasmussen 1961) alors qu'en réalité, celui-ci est stable. En outre, des études ont montré que chez le chien sain, le calcium plasmatique revenait à son taux initial quelques heures après son augmentation artificielle par injection de calcium, ou après sa diminution par administration d'un chélateur de calcium l'EDTA (acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique) (Sanderson et al. 1960). Cependant, chez des chiens ayant subi une parathyroïdectomie, le calcium plasmatique n'était pas revenu à son taux initial même 24 heures après l'injection de calcium ou d'EDTA. Ces démonstrations montrent l'importance de la parathormone dans la régulation de l'hypocalcémie mais suggèrent également l'existence d'une autre hormone capable de réguler une hypercalcémie. Ainsi, les études entreprises par Copp ont montré que la perfusion d'un complexe de glandes thyroïdes et parathyroïdes chez des chiens présentant un fort taux de calcium sanguin, entraînait la libération d'une hormone capable de faire chuter rapidement la calcémie. Le nom de calcitonine (CT) fut donné à cette hormone (Copp et al. 1962). Sa sécrétion fut ensuite localisée au sein des cellules parafolliculaires (ou cellules C) de la thyroïde, dérivées du corps ultimobranchial de l'embryon, c'est-à-dire de la crête neurale. Par la suite, une grande quantité de corps ultimobranchiaux de saumon fut récoltée afin de purifier la CT et d'en déterminer la séquence peptidique (Niall et al. 1969). De manière intéressante, il a été montré que la calcitonine de saumon est plus puissante que les CTs de mammifères (Habener et al. 1971) et de ce fait, utilisée afin de traiter l'ostéoporose humaine.

Bien que sa séquence soit différente selon les espèces chez qui elle a été retrouvée, la CT présente un nombre d'acides aminés d'environ 32 acides aminés (Frendo et al. 2000). De plus, l'extrémité aminoterminale est constituée d'un pont disulfure reliant les deux cystéines. Ces résidus cystéines sont chez de nombreuses espèces, situés en position 1 et 7 du peptide (Tableau 3). En outre, le peptide possède en C-terminal une proline amidée. Le gène de la CT représente l'un des modèles les plus connus parmi les phénomènes d'épissage alternatif « tissu-spécifique ».

2 Biosynthèse de la calcitonine

Au sein du génome humain, il existe 4 gènes apparentés à la calcitonine : CALC-I, CALC-II et CALC-III situés sur le bras court du chromosome 11 et CALC-IV situé sur le bras court du chromosome 12 (Hoovers et al. 1993) (Figure 35). La CT est codée par le gène CALC-I (Adema and Baas 1992). Ce gène comporte 6 exons et 5 introns et code, selon les cellules, thyroïdiennes ou nerveuses, respectivement pour le précurseur de la CT ou du CGRP-I (Calcitonin Gene-Related Peptide-1 ou Calcitonin Gene-Related Peptide-α). En effet, la transcription du gène CALC-I dépend du tissu : thyroïde ou tissu nerveux (Adema and Baas 1992). De ce fait, au sein des cellules parafolliculaires, la transcription de CALC-I donne deux ARNm codant pour les précurseurs de la CT et un ARNm codant pour le précurseur du CGRP-I (Figure 35).

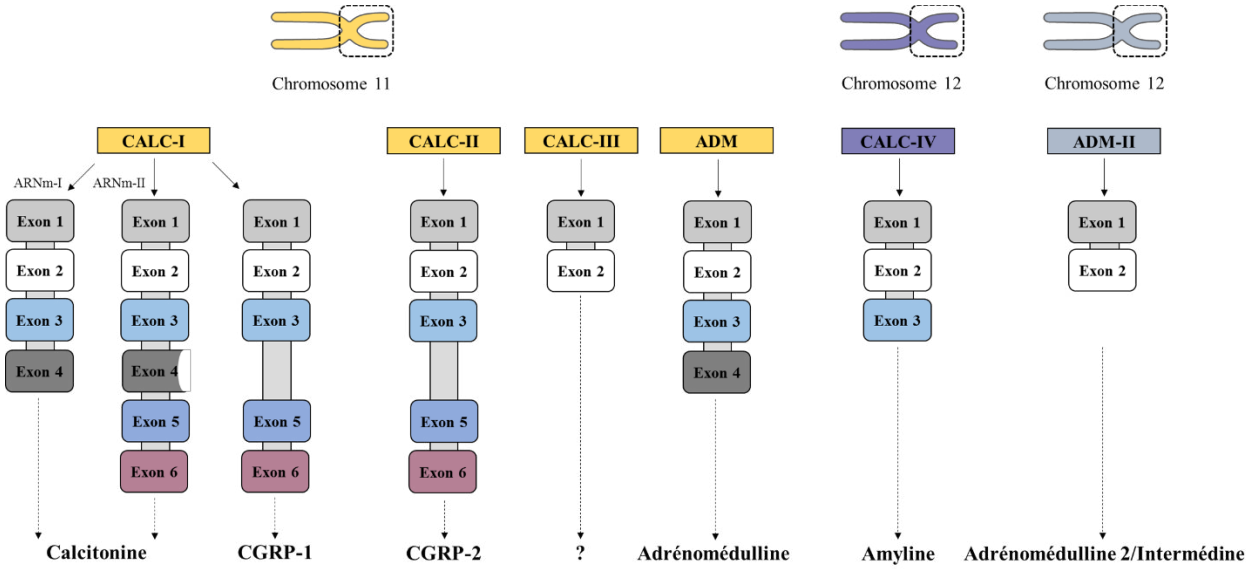


Figure 35 : Voies de maturation des gènes humains de la calcitonine et de l'adrénomédulline (ADM). Adaptée de (Ferrière 2000).

Ainsi, l'ARNm-I de la CT est le résultat de l'expression complète des exons de 1 à 4. En outre, l'ARNm-II résulte de l'épissage des exons 1, 2, 3, 5 et 6 et de l'épissage partiel de l'exon 4. Les préprocalcitonines synthétisées sont toutes les deux composées de 141 acides aminés et leurs différences se situent uniquement au niveau de la katacalcine ou CCP-I (Calcitonine Carboxy Terminal Peptide). La katacalcine constitue le peptide C-terminal de la procalcitonine (PCT) résultant du clivage protéolytique de la préprocalcitonine. La PCT comprend également une partie N-terminale, l'amino-procalcitonine ou N-PCT et la CT longue de 32 acides aminés (Ferrière 2000) (Figure 36).

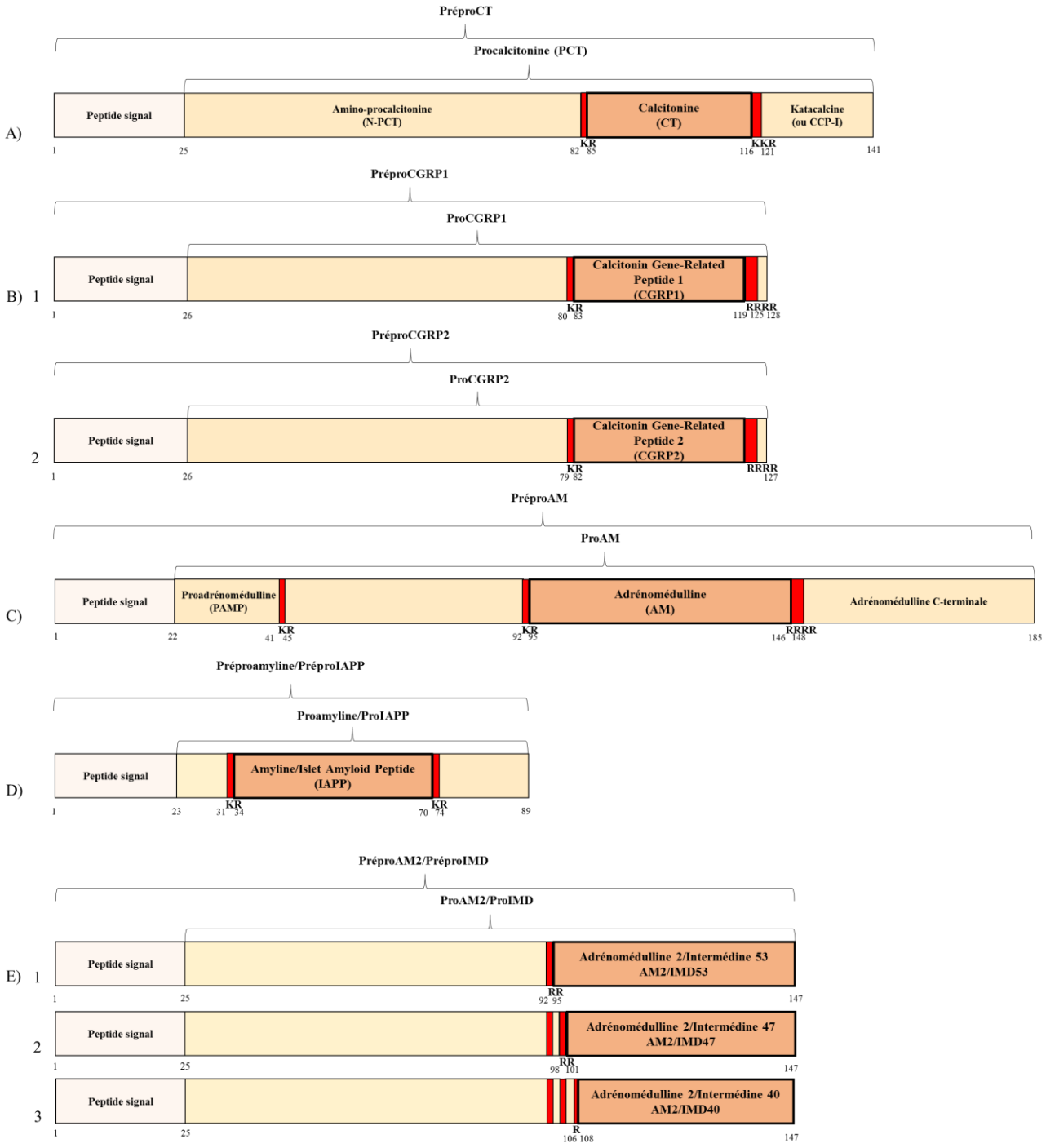


Figure 36 : Structure de la préproCT. A) : préproCT, B)1 : préproCGRP1, B)2 : préproCGRP2, C) préproAM, D) : préproamyline/préproIAPP, E)1 : préproAM2/préproIMD53, E)2 : préproAM2/préproIMD47, et E)3 : préproAM2/préproIMD40. CT : calcitonine ; CGRP : Calcitonine Gene Related Peptide ; AM : adrénomédulline ; IAPP : Islet Amyloid Peptide ; IMD : intermédine. Les rectangles rouges représentent les sites de clivage.

Il est à noter que le clivage protéolytique de la PCT aboutit à la formation de la CT immature qui, après amidation devient mature. Toutefois, dans certaines situations pathologiques, la production de PCT n'obéit pas au modèle physiologique si bien que l'expression du gène CALC-I perd sa spécificité tissulaire et que la PCT est synthétisée dans divers organes et tissus. De ce fait, la PCT ne subit pas les étapes de maturation la transformant en CT mature. En

conséquence, c'est la PCT intacte qui est sécrétée, servant ainsi de marqueur de l'infection et de l'inflammation (Graf JD 2007).

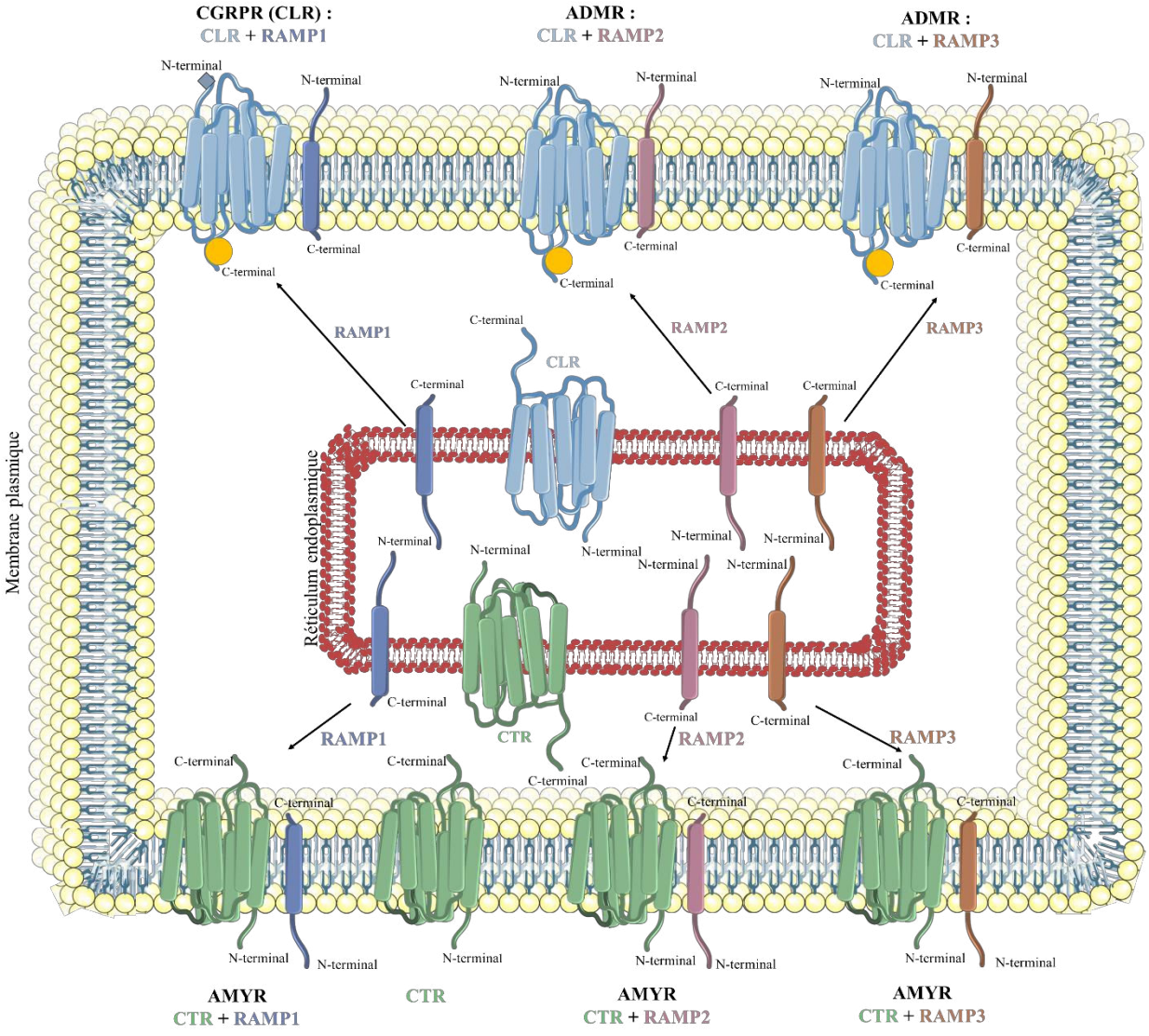
Le gène CALC-II possède la même organisation que CALC-I, à savoir 6 exons et 5 introns (Figure 35). Il exprime un seul ARNm codant pour le précurseur du CGRP-II, qui diffère chez l'homme par trois acides aminés de CGRP-I (en vert dans le tableau 3). De manière intéressante, CGRP-I et CGRP-II ont les mêmes propriétés biologiques. En effet, il a été montré que le CGRP est un puissant vasodilatateur et qu'il pourrait également exercer un rôle protecteur dans les maladies cardiovasculaires (Russell et al. 2014). De plus, le CGRP joue un rôle important dans la physiopathologie de la migraine (Tepper 2018). Le gène CALC-III comporte seulement les exons 1 et 2, de transcription inconnue. Le gène IV implique les exons 1, 2 et 3 et permet la synthèse de l'amyline, appelée également « Islet Amyloid Peptide » (IAPP), présente dans les tumeurs médullaires thyroïdiennes et dans les îlots de Langherans du pancréas (Figure 35).

3 Les récepteurs à la calcitonine et au CGRP

La calcitonine se lie au récepteur CTR de la famille des récepteurs de type Sécrétine, identifié dans un premier temps au sein de l'os et du rein (Marx et al. 1973; Lin et al. 1991). Par ailleurs d'autres études ont démontré la très large distribution du récepteur notamment au sein du SNC (Fischer et al. 1981), des testicules (Chausmer et al. 1980) et des poumons (Fouchereau-Peron et al. 2000). Le CTR peut se coupler à différentes protéines G, pouvant ainsi activer plusieurs voies de transduction dont la voie de l'AC et de la PLC (Force et al. 1992). Par ailleurs, l'activation du CTR peut également activer la voie mettant en jeu la phospholipase D (Naro et al. 1998). La transcription du gène du CTR peut mener à différents variants d'épissage dont notamment les récepteurs hCTR1 (ou « hCTa receptor ») et hCTR2 (ou « hCTb receptor ») ; qui diffèrent de 16 acides aminés au niveau de la première boucle intracellulaire (Moore et al. 1995; Poyner 2002). De manière intéressante, il a été montré que hCTR2 ne se couple pas à la protéine Gαq. De même, la dose efficace médiane nécessaire à l'obtention d'une augmentation d'AMPc intracellulaire lors de l'activation des récepteurs est beaucoup plus faible pour hCTR1. De plus, contrairement à hCTR1, hCTR2 n'est que très peu internalisé (Moore et al. 1995).

Le CGRP se lie au récepteur CLR (Calcitonin Like Receptor) (Wimalawansa 1996). Cependant, le CGRP ne peut activer le récepteur CLR, que si celui-ci forme un complexe avec deux protéines accessoires : une protéine RAMP (Mclatchie et al. 1998) et une protéine RCP (Evans et al. 2000; Prado et al. 2001) jouant des rôles différents (Figure 37). En effet, la protéine RAMP permet le transport des récepteurs à la membrane et contrôle la glycosylation du CLR (Cueille

and Garel 2004). Il existe trois isoformes de RAMP : RAMP1, RAMP2 et RAMP3. Le couplage de chacune de ses isoformes avec les récepteurs CTR et CLR, change la spécificité pharmacologique des récepteurs.



Complexe	Agoniste	Complexe	Agoniste
CLR	-	CTR	CT
CLR + RAMP1 + RCP	CGRP	CTR + RAMP1 + RCP	AMY
CLR + RAMP2 + RCP	ADM	CTR + RAMP2 + RCP	
CLR + RAMP3 + RCP		CTR + RAMP3 + RCP	

Receptor Component Protein

Glycosylation terminale

Figure 37 : Rôle des RAMP et de la RCP sur CTR et le CLR. Les RAMPs (Receptor Activity Modifying Proteins) sont des protéines composées d'un grand domaine extracellulaire (environ 100 résidus), d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine intracellulaire (10 résidus). La RCP (Receptor Component Protein) est une protéine intracellulaire de 148 acides aminés. L'association des différentes RAMP et de la RCP avec les récepteurs CTR et CLR forment plusieurs récepteurs. Ainsi, le complexe CLR/RAMP1/RCP forme le récepteur au CGRP. L'association de CLR avec les RAMP2/3 et la protéine RCP forment deux récepteurs à l'adrénomédulline (ADMR). Contrairement au CLR, CTR peut être acheminé à la membrane sans avoir recours à une protéine RAMP et lier la calcitonine. CTR peut également s'associer aux protéines RAMP1/2/3 afin de former les récepteurs à l'amyline (AMYR). Il est à noter que RAMP1 modifie la glycosylation aminoterminale de CLR. Adaptée de (Cueille and Garel 2004).

La protéine RCP est quant à elle nécessaire à la transduction du signal et permettrait l'interaction entre le complexe récepteur/RAMP et la protéine G. Il est à noter que les complexes CLR/RAMP2/RCP et CLR/RAMP3/RCP permettent la liaison de l'adrénomédulline (AM) et avec une plus faible affinité, du CGRP. L'AM est un peptide de 52 acides aminés impliqué dans diverses fonctions comme la vasodilatation, la bronchodilatation, la croissance, la régulation de la pression sanguine, la prise alimentaire et l'angiogenèse (Hinson et al. 2000; Ouafik and Martin 2008). Ce peptide est exprimé dans de nombreux tissus dont notamment le SNC. Par ailleurs, même si l'affinité est plus forte avec CLR/RAMP3/RCP (Hong et al. 2012), ces complexes lient également l'AM2 aussi appelée intermédine (Roh et al. 2004). Tout comme l'AM, ce peptide est exprimé de manière ubiquitaire au sein de l'organisme et est impliqué dans les mêmes fonctions. Toutefois, il semblerait que l'effet de l'intermédine soit moins puissant que celui de l'AM. Le clivage de la préprointermédine peut donner lieu à deux formes : une forme longue composée de 47 acides aminés nommée AM2/IMD-47 et une forme courte appelée AM2/IMD-40. De plus, le clivage du précurseur de l'intermédine pourrait également mener à la formation d'une intermédine de 53 acides aminés (Yang et al. 2005; Hong et al. 2012).

De manière intéressante, la CT active le CTR sans avoir recours aux protéines RAMP et RCP. Toutefois, le CTR peut se coupler aux trois protéines RAMPs et former les récepteurs à l'amyline. Il est à noter que le CTR peut en absence des différentes RAMPs, lier un autre peptide nommé CRSP (Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide). Chez plusieurs espèces dont le porc, le chien et le cheval, ce peptide est présent sous trois formes : CRSP-1, CRSP-2 et CRSP-3 et seul CRSP-1 se lie à CTR. Chez le porc, CRSP-1 permet de réduire la prise alimentaire et le taux de calcium plasmatique (Katafuchi et al. 2003, 2009). Néanmoins, il semblerait que le peptide CRSP ne soit pas présent chez l'homme. Ainsi, la CT, le CGRP, l'amyline, l'AM mais aussi le CRSP, forment une grande famille. Exceptés pour la CT et le CRSP, leurs récepteurs nécessitent la présence de protéines accessoires afin d'être acheminés à la membrane et de transduire le signal faisant de ces voies de signalisation, des systèmes complexes.

4 Homologues de la CT chez les Téléostéens

Depuis l'identification de la CT au sein des corps ultimobranchiaux de saumon, diverses études ont été réalisées chez les téléostéens. Ainsi, chez l'anguille *Anguilla anguilla*, des études ont montré que le CGRP est plus largement exprimé au sein de l'organisme que la CT. En effet, le CGRP est présent au sein de divers tissus dont le cerveau, les reins et les corps ultimobranchiaux

alors que la CT, est uniquement exprimée au sein des corps ultimobranchiaux. De plus, le taux de CGRP est beaucoup plus élevé que celui de la CT au sein du plasma (Lafont et al. 2004). Des études se sont également intéressées au rôle potentiel de la CGRP dans la régulation ionique. Pour cela, des anguilles ont été transférées d'une eau douce vers une eau de mer, induisant ainsi une hyperosmolalité et une augmentation du taux de CGRP plasmatique. De façon intéressante, le transfert de l'eau douce vers l'eau de mer entraîne une augmentation du nombre de sites de liaison au sein des branchies suggérant l'implication de la CGRP dans le contrôle de l'osmorégulation (Lafont et al. 2006).

Chez le zebrafish *Danio rerio*, 4 récepteurs nommés CTR, CRLR1, CRLR2 et CRLR3 ont été identifiés au sein des banques de données (Lafont et al. 2011). Des analyses ont montré que le CTR de zebrafish est phylogénétiquement proche des CTR de mammifères. De plus, le CRLR1 de zebrafish est plus proche des CLRs de mammifères que CRLR2 et CRLR3, suggérant que ces récepteurs pourraient lier de manière moins efficace la CT et le CGRP ou bien lier d'autres peptides appartenant à la famille des CT/CGRP. De plus, des expériences ont montré que le maintien d'embryons de zebrafish dans un milieu riche en Ca^{2+} entraînait une surexpression des gènes codant la CT et le CTR et une diminution de l'expression des canaux calciques épithéliaux. En outre, la surexpression du gène codant la CT a entraîné une baisse de l'expression de ces mêmes canaux et par conséquent, une diminution de l'entrée de calcium, suggérant que la CT agit en tant facteur hypocalcémiant (Lafont et al. 2011). De la même manière, des études se sont intéressées au rôle potentiel de la CGRP dans le contrôle de l'homéostasie des ions chlorure (Wang et al. 2016). Ainsi, chez *Danio rerio*, une seule CGRP proche des CGRP-1 des mammifères a été identifiée. Des tests d'acclimatation dans une eau artificiellement enrichie en Cl^- ont montré que les gènes codant la CGRP et le CRLR1 étaient plus exprimés en présence d'un fort taux de Cl^-. De plus, le *knockdown* du gène CGRP a induit une surexpression des co-transporteurs Na^+/Cl^- alors que la surexpression du gène a mené à une diminution de l'expression de ces co-transporteurs entraînant une diminution du taux de Cl^- au sein des embryons (Wang et al. 2016).

Chez *Paralichthys olivaceus*, des récepteurs de type CLR et CTR ont été isolés dans les branchies, constituant ainsi les premiers CLR et CTR clonés chez des vertébrés non mammaliens (Suzuki et al. 2000). De plus, des expériences de qPCR ont montré que l'expression du gène codant le CLR diminuait lors du transfert des animaux d'une eau de mer vers une eau de mer diluée et que, son expression était indétectable en présence d'eau douce au niveau des branchies. De manière intéressante, l'expression du gène codant CTR ne varie pas

au cours de l'acclimatation et le gène codant le CGRP n'est pas détecté dans l'ensemble des conditions (Suzuki et al. 2002). Toutefois, il a été montré que le CGRP est exprimé au sein de l'intestin, qui chez les téléostéens, joue un rôle important dans l'osmorégulation (Suzuki et al. 2001).

De manière intéressante chez les poissons téléostéens, 5 peptides de type AM (AM1 à AM5) ont été identifiés (Ogoshi et al. 2003, 2015; Takei et al. 2008; Cameron et al. 2015). Les analyses phylogénétiques et de synténie ont permis de diviser les AM en 3 groupes comprenant respectivement l'AM1/4 orthologue à l'AM1 de mammifères, l'AM2/3 et l'AM5. Des analyses génomiques comparatives ont montré que les paralogues AM4 et AM3 ont été générés lors du troisième évènement de duplication du génome (3R) survenue chez les téléostéens (Vandepoele et al. 2004). De plus, l'identification de l'AM5 chez les télésotéens, a permis de mettre en évidence l'existence d'un orthologue de l'AM5 chez le porc (Ogoshi et al. 2006).

5 Homologues de la CT chez les Céphalochordés, les Urochordés, les Hémichordés et les Echinodermes

Chez le Céphalochordé *Branchiostoma floridae*, de récentes études ont montré l'existence de 3 protéines de type RAMP (Bf-RAMP-LPs) présentant entre 15 et 40% d'identité de séquences avec les RAMPs humaines (Sekiguchi et al. 2016a). Ces protéines servent à acheminer à la membrane le récepteur Bf-CTFP(CT/CGRP family peptides)-R, phylogénétiquement proches des CTRs et CLR humains, lequel est activé par les trois peptides Bf-CTFPs orthologues des CT/CGRP de mammifères. Ces peptides sont codés par 3 précurseurs distincts. De plus, chez les Urochordés, plusieurs études d'immunohistochimie ont montré la présence d'une molécule de type CT au sein du tractus digestif (Fritsch et al. 1980) et du système nerveux de *Ciona intestinalis* (Fritsch et al. 1979; Girgis et al. 1980). Par la suite, le peptide Ci-CT a été isolé chez la cione et des expériences ont montré que ce peptide active le récepteur humain à la CT (Sekiguchi et al. 2009).

Chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, un peptide (SpCTLP, CTLP: Calcitonin-like peptide), d'une taille de 37 acides aminés et comprenant deux résidus cystéines fait figure de premier peptide de type CT identifié chez une espèce non-chordée (Rowe and Elphick 2012). De plus, chez cette même espèce, un récepteur présentant des homologies de séquence avec les CTR/CLR de mammifères a été identifié (Burke et al. 2006).

Par ailleurs, deux peptides nommés SkCTLP1 et SkCTLP2 ont été identifiés chez l'Hémichordé *Saccoglossus kowalevskii*. De manière intéressante, ces deux peptides sont codés par un unique précurseur (Mirabeau and Joly 2013). Cette spécificité est partagée par les peptides AjCTLP1 et AjCTLP2 identifiés chez l'échinoderme *Apostichopus japonicus* (Rowe et al. 2014).

De très récentes études menées chez l'étoile de mer *Asterias rubens* ont identifié un peptide de type CT (ArCT) (Semmens et al. 2016; Mayorova et al. 2016) dont la présence a été confirmée en spectrométrie de masse (Cai et al. 2018). Grâce aux techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, la distribution du peptide a pu être localisée au sein du système nerveux, du système digestif et des muscles tels que le muscle apical et le pied tubulaire. En outre, il a été montré que l'administration d'ArCT synthétique sur des préparations *in vitro* du muscle apical et des pieds tubulaires agit comme un relaxant. De surcroît, il a été montré la présence d'un relaxant musculaire orthologue à ArCT dans des extraits d'une autre espèce d'étoile de mer *Patiria pectinifera* (Kim et al. 2016; Cai et al. 2018).

6 Homologues de la CT chez les Protostomiens

6.1 Homologues chez les Ecdysozoaires

6.1.1 Homologues de la CT chez les arthropodes : « Diuretic Hormone 31 » (DH31)

La présence d'homologues à la CT chez les arthropodes, a d'abord été identifiée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre la CT de mammifère au sein des *corpus cardiacum* et *allatum* du cafard *Leucophaea maderae* (Langvad Hansen et al. 1982). Des études similaires ont par la suite montré la présence d'homologue à la CT chez *Manduca sexta* (El-Salhy et al. 1983) et *Leptinotarsa decemlineata* (Veenstra et al. 1985). Par ailleurs, des dosages radio-immmunologiques réalisés à l'aide de la CT de saumon synthétique ont révélé la présence de molécules de type CT au sein de l'hémolymphe de la crevette *Palaemon serratus* (Arlot-Bonnemains et al. 1986) .

Chez la blatte *Diploptera punctata*, deux hormones diurétiques (DH) ont été isolées : Dippu-DH46 et Dippu-DH31. Ces deux peptides ont été nommés ainsi du fait de leur capacité à stimuler la sécrétion des fluides au niveau des tubes de Malpighi mais aussi, pour leurs tailles respectives de 46 et 31 acides aminés. Néanmoins, alors que Dippu-DH46 appartient à la famille des « Corticotropin-Releasing-Factor » (CRF)-like, Dippu-D31 possède une plus grande similarité de séquence avec les CTs qu'avec les CRFs, faisant de ce peptide, la première molécule de type CT identifiée chez les arthropodes (Furuya et al. 2000). Bien que cette

similarité de séquences se résume à quelques résidus, les principales caractéristiques communes entre la CT et la DH31 sont la proline terminale amidée ainsi que la taille d'environ 30 acides aminés.

Suite à sa découverte, un peptide possédant 71 % d'identité de séquence avec Dippu-DH31 a été identifié par BLAST du génome de *Drosophila melanogaster*. Ce peptide nommé Drome-DH31, stimule la sécrétion des fluides des tubes de Malpighi *via* la production d'AMPc (Coast et al. 2001). De plus, il a été montré que ce peptide active le récepteur CG17415 de *Drosophila melanogaster* (Johnson et al. 2005b) phylogénétiquement homologue aux CTRs et CLR (Hewes 2001). Ce récepteur est donc le premier récepteur à la DH31 caractérisé chez les arthropodes. Par ailleurs, chez la drosophile, une protéine RCP a été caractérisée. En revanche, aucune protéine RAMP n'a été identifiée. D'autres études ont montré que la DH31 de *Drosophila melanogaster* peut également activer le récepteur au « Pigment-Dispersing Factor » (PDF), impliqué dans la synchronisation des rythmes circadiens et l'activité locomotrice (Mertens et al. 2005). Il a également été démontré que la Drome-DH31 agit en tant que modulateur du sommeil sans affecter l'activité locomotrice (Kunst et al. 2014). De nouvelles études ont montré que l'activation du récepteur PDFR par la DH31 permet de réguler la température durant la nuit (Goda et al. 2016). Par ailleurs, la DH31 aurait également un effet sur la durée de vie des drosophiles. En effet, la DH31 sécrétée par les cellules entéroendocrines entraînerait une augmentation de la sénescence de l'intestin moyen, causant ainsi une réduction de la longévité des animaux (Takeda et al. 2018). En outre, la DH31 synthétisée au sein de ces cellules, serait nécessaire au péristaltisme de l'intestin moyen (Lajeunesse et al. 2010).

Suite à la caractérisation de la Drome-DH31, un peptide a pu être identifié chez le chélicérate *Ixodes scapularis* grâce à des analyses *in silico* (Christie 2008). De manière intéressante, ce peptide possède 34 acides aminés. Cette caractéristique est également partagée par le peptide de type DH31 identifié chez l'acarien *Varroa destructor* (Zandawala et al. 2011).

Chez l'insecte hématophage *Rhodnius proxilus,* des études d'immunohistochimie réalisées grâce à un anticorps dirigé contre Dippu-DH31 ont révélé la présence de DH31 dans le SNC et l'intestin postérieur de la larve au 5ème stade (Te Brugge et al. 2005). Il a également été montré que l'administration de Dippu-DH31 entraînait une augmentation de la sécrétion de fluide *via* les tubes de Malpighi (Te Brugge et al. 2008). Le peptide de *Rhodnius proxilus* Rhopr-DH31 a ensuite été isolé et séquencé. Sa séquence est identique à celle de Dippu-DH31 (Te Brugge et al. 2008). Des essais biologiques ont montré que l'administration de Rhopr-DH31 augmente la fréquence de contraction du vaisseau dorsal et de l'intestin postérieur. Plus récemment, deux

récepteurs paralogues Rhopr-CT/DH-R1 et Rhopr-CT/DH-R2, ont été identifiés au sein du génome de *Rhodnius proxilus* (Zandawala et al. 2011, 2013). Rhopr-CT/DH-R1 est l'orthologue du récepteur CG17415 de *Drosophila melanogaster* et Rhopr-CT/DH-R2 est l'orthologue du récepteur CG4395, dont le ligand est à ce jour inconnu chez la drosophile. Pour Rhopr-CT/DH-R1, 3 variants d'épissage ont été identifiés et nommés Rhopr-CT/DH-R1-A, Rhopr-CT/DH-R1-B et Rhopr-CT/DH-R1-C. Pour Rhopr-CT/DH-R2, deux variants ont été identifiés : Rhopr-CT/DH-R2-A et Rhopr-CT/DH-R2-B. Les variants Rhopr-CT/DH-R1-A et Rhopr-CT/DH-R2-A sont tous les deux des récepteurs tronqués et ne possèdent pas les 7 domaines transmembranaires caractéristiques des RCPGs. Les récepteurs Rhopr-CT/DH-R1-B et Rhopr-CT/DH-R1-C possèdent des séquences qui diffèrent de 2 acides aminés au niveau du domaine C-terminal. Ces récepteurs sont tous les deux activés par la Rhopr-DH31 avec une concentration efficace médiane similaire mais inférieure à celle obtenue lors de l'activation du récepteur Rhopr-CT/DH-R2-B par le même peptide. De manière intéressante, des analyses en qPCR ont montré que ces récepteurs étaient exprimés aussi bien de manière centrale que périphérique. De plus, leur expression au niveau des ovaires, des testicules et des glandes prothoraciques, suggère la possible implication de la Rhopr-DH31 dans la physiologie de la reproduction et du développement.

Chez les moustiques, un peptide stimulant la sécrétion d'urine riche en Na^+ avait été initialement nommé peptide natriurétique (MNP) (Beyenbach and Petzel 1987). Toutefois, des études supplémentaires ont permis de caractériser le MNP comme étant un peptide de type CT/DH31 (Coast 2005). De ce fait, ce peptide d'*Anopheles gambiae* a été renommé Anoga-DH31. Sa séquence est similaire à celle de la DH31 du moustique *Aedes aegypti*. Des études ont montré que les DH31 de *Bombyx mori* (Bommo-DH31) et de *Anopheles gambiae* stimulaient la sécrétion des fluides des tubes de Malpighi de manière dose-dépendante chez le coléoptère *Tenebrio molitor* (Holtzhausen and Nicolson 2007). Par ailleurs, chez les insectes, le ganglion frontal module le comportement alimentaire à travers la régulation de la contraction de l'intestin antérieur et d'autres circuits neuronaux. Des extraits de ganglions frontaux de larves nourries *ad libitum* ont été analysés en spectrométrie de masse. Les spectres ont permis d'identifier la présence de plusieurs peptides dont Bommo-DH31. Afin de confirmer l'effet de Bommo-DH31 sur la prise alimentaire, des tests de latence ont été réalisés. Ces tests montrent que l'injection de Bommo-DH31 augmente le délai d'initiation de la prise alimentaire (Nagata and Nagasawa 2017).

D'autres séquences de type DH31 ont été identifiées au sein des banques de données génomiques et transcriptomiques de *Acyrthosiphon pisum*, *Aedes aegypti*, *Nilaparvata lugens*, *Nasonia vitripennis* (Zandawala et al. 2011), *Hylobius abietis* (Pandit et al. 2018) et *Tribolium castaneum* dont la présence a été confirmée par des analyses en spectrométrie de masse (Li et al. 2007).

La première DH31 de crustacés a été identifiée chez le brachiopode *Daphnia pulex* (Gard et al. 2009). Par la suite, une DH31 (Homam-CLDH) de séquence identique à celle identifiée chez *Tribolium castaneum* a été caractérisée chez l'espèce *Homarus americanus* (Christie et al. 2010). Des approches de RT-PCR ont montré que le gène codant Homam-CLDH est très largement exprimé dans le système nerveux, y compris au sein du ganglion cardiaque contrôlant le rythme cardiaque. De plus, la perfusion de ce neuropeptide dans le cœur de homard isolé, a entraîné une augmentation dose-dépendante de la fréquence et de l'amplitude de la contraction, ainsi qu'une diminution de la durée de la contraction (Christie et al. 2010). Très récemment, un couple peptide/récepteur de type DH31 a été caractérisé de manière fonctionnelle chez le crabe vert *Carcinus maenas* (Alexander et al. 2018). Les expériences d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* ont montré que la DH31 de crabe est localisée au sein du SNC, dans les ganglions cardiaques, commissuraux, œsophagiens et somatogastriques mais également au niveau des dendrites innervant la musculature de l'intestin antérieur et postérieur. Au vu de ces résultats, des bioessais ont été menés afin d'observer l'effet de la DH31 sur l'activité de cœurs de crabe semi-isolés. De manière intéressante, ces expériences ont montré que la DH31 entraîne l'augmentation de la fréquence cardiaque chez *Carcinus maenas* (Alexander et al. 2018).

Jusqu'à récemment, il était admis que la DH31 était l'homologue fonctionnel de la CT chez les arthropodes (Conzelmann et al. 2013). Toutefois, de nouvelles analyses réalisées sur des banques de données de plusieurs espèces, ont mis en évidence l'existence de peptide de type CT, c'est-à-dire possédant en particulier deux cystéines caractéristiques du côté N-terminal, chez les arthropodes dont notamment *Zootermopsis nevadensis*, *Locusta migratoria, Tribolium castaneum* et *Bomby mori* (Veenstra 2014). De la même manière, chez ces mêmes espèces des récepteurs à la CT ont également été identifiés. Par ailleurs, il semblerait que la CT soit absente chez *Drosophila melanogaster* et d'autres espèces de mouches, chez les moustiques, chez les aphides, chez *Rhodnius proxilus* et les Hyménoptères. Cependant, la CT est présente chez les mouches *Phlebotomus papatasi* et *Lutzomyia longipalpis,* les coléoptères et les lépidoptères (Veenstra 2014).

6.1.2 Chez les nématodes

Chez les nématodes, une séquence de type CT a été identifiée au sein des banques de données de *Caenorhabditis elegans* (Mirabeau and Joly 2013).

6.2 Homologues chez les Lophotrochozoaires

Quelques études se sont intéressées aux homologues de la CT/CGRP et de la DH31 chez les Lophotrochozoaires. En effet, un neuropeptide de type CT comprenant deux résidus cystéines et un neuropeptide de type DH31 comprenant des résidus conservés pour ce neuropeptide ont été identifiés chez l'annélide *Capitella telata* (Mirabeau and Joly 2013). Ces peptides sont codés par deux précurseurs différents. De la même manière, chez *Platynereis dumerilii*, un neuropeptide de type CT et un neuropeptide de type DH31 ont été identifiés (Conzelmann et al. 2013). Une étude de « déorphanisation » de récepteurs à grande échelle, a permis d'identifier deux récepteurs « DH31 receptor1 » et « DH31 receptor2 », activés par la DH31 de *Platynereis dumerilii* (Bauknecht and Jékely 2015). Les expériences de luminescence ont montré que l'activation de « DH31 receptor1 » n'induit pas d'augmentation de calcium intracellulaire en l'absence de protéine Gα16, suggérant que le récepteur ne se couple pas à une protéine de type Gαq/11. Par ailleurs, l'activation de « DH31 receptor2 » induit une augmentation de calcium intracellulaire en présence et absence de la protéine Gα16, suggérant que le récepteur se couple à une protéine Gαq/11. Chez le mollusque *Patinopecten yessoensis*, une étude récente a permis d'identifier 4 neuropeptides de type CT codés par deux précurseurs (Zhang et al. 2018). La présence de deux de ces neuropeptides a été confirmée par spectrométrie de masse. Par ailleurs, un peptide de type CT a été identifié chez *Lottia gigantea* (Veenstra 2010; Cai et al. 2018).

Ainsi, une hypothèse a été émise selon laquelle les Deutérostomiens posséderaient uniquement des peptides de type CT et que suite à une duplication génique survenue à la base des Protostomiens, la DH31 serait apparue et les résidus cystéines auraient été perdus. De ce fait, la CT aurait été conservée chez l'ensemble des Protostomiens, exceptés quelques espèces d'arthropodes, et la DH31 ne serait présente que chez les annélides et les arthropodes (Cai et al. 2018) (Figure 38).

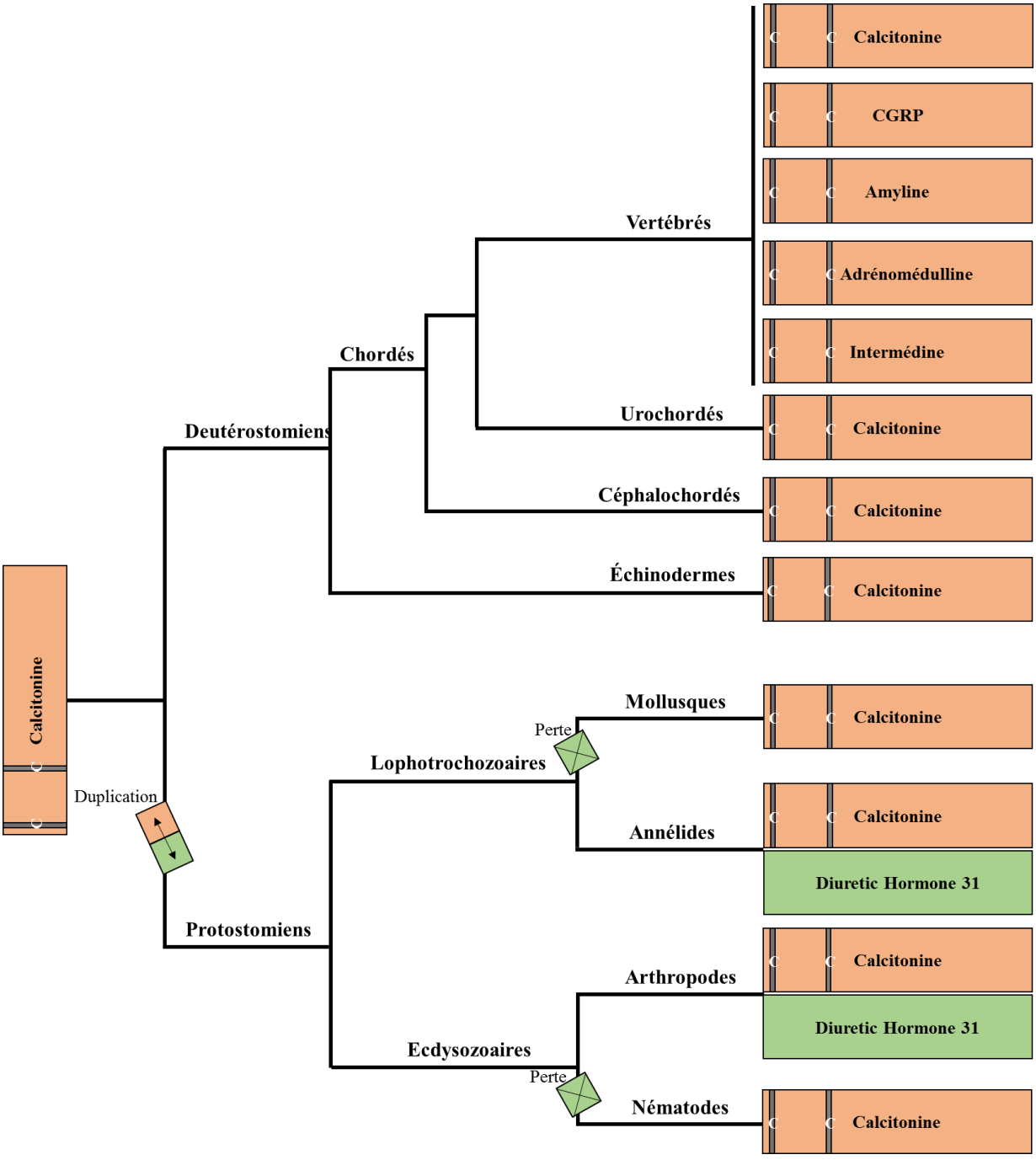


Figure 38 : Hypothèse de duplication et de perte de la CT chez les Bilatériens. Les rectangles orange et verts représentent respectivement la CT et la DH31. Les carrés orange et verts accolés correspondent à une duplication du gène codant la CT en un gène codant la CT et un codant la DH31. Les carrés verts représentent la perte de la DH31 chez les mollusques et les nématodes. Les traits gris annotés « C » correspondent aux résidus cystéine. Adaptée de (Cai et al. 2018).

6.2.1 Chez l'huître

Des études réalisées sur l'huître *Crassostrea gigas* ont mis en évidence un récepteur homologue aux CTRs et CLR humains nommé Cg-CT-R (Dubos et al. 2003). Ce récepteur est principalement exprimé au sein des branchies et du bord de manteau et dans une moindre mesure, dans la glande digestive, le cœur et les palpes labiaux. Afin d'étudier la possible implication de Cg-CT-R dans la régulation ionique, des expériences de conditionnement d'huîtres en eau saumâtre (8-12‰) ont été réalisées sur 3 jours. Ces expériences ont montré que le gène codant pour le récepteur était exprimé de manière plus faible dans les branchies d'huîtres conditionnées, suggérant l'implication de ce récepteur dans la régulation ionique chez l'huître. Afin de compléter cette première étude, il a été recherché dans les banques de données transcriptomiques de l'huître (Zhang et al. 2012a; Riviere et al. 2015), d'autres récepteurs homologues aux CTRs, CLR et DH31Rs, des RAMPs et RCPs homologues aux protéines complémentaires humaines ainsi que des peptides CT/DH31 potentiels. Ainsi, 7 autres récepteurs ont été identifiés comme étant potentiellement des CTRs/CLRs/DH31Rs d'huître. Toutefois, certaines séquences de récepteurs étant incomplètes, il n'a pas été possible de cloner l'ensemble des récepteurs durant ce travail de thèse. De ce fait, les récepteurs clonés sont présents dans la figure annexe 3 A, B et C. De plus, ces recherches préliminaires ont permis d'identifier une protéine potentielle de type RCP (Annexe 3 D) ainsi que 4 peptides putatifs (Tableau 3). Il est à noter qu'aucune protéine de type RAMP n'a été identifiée. Afin de caractériser de manière fonctionnelle les couples Cragi-CTs/Cg CT-R et Cragi-CTs/Cragi-CALCRs, des expériences d'endocrinologie inverse (Figures 29 et 30) ont été menées. Par ailleurs, afin de comprendre le rôle joué par ces couples, un conditionnement semblable à celui effectué lors de la première étude a été réalisé (Figure 39 A). En outre, un second conditionnement impliquant un stress ionique aigu a été mis en place (Figure 39 B).

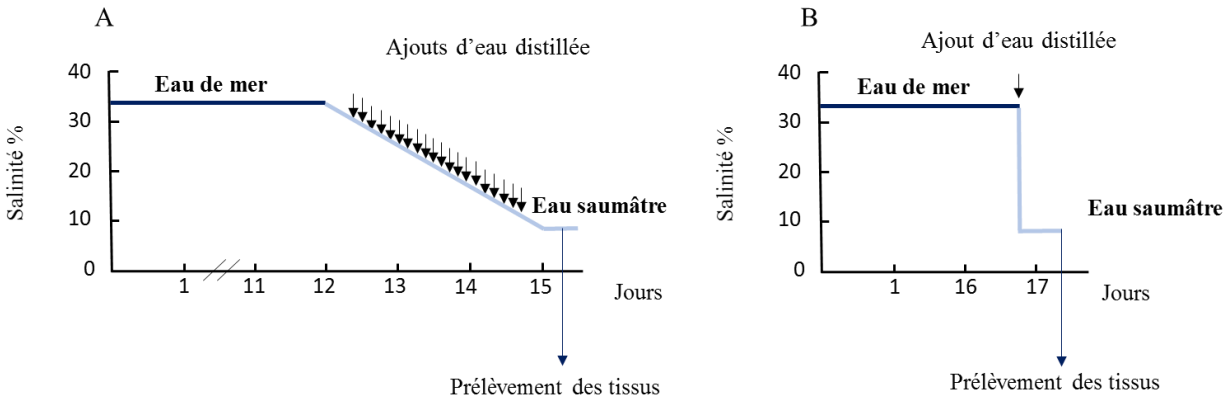


Figure 39 : Schémas représentant les conditionnements d'huîtres effectuées en diminuant la salinité de manière progressive (A) et brutale (B) avec de l'eau distillée.

L'ensemble de ces expériences a fait l'objet d'une publication soumise à « Journal of Experimental Biology ».

Tableau 3 : Séquences en acides aminés des peptides de type CT/DH31 identifiés et caractérisés chez les différentes espèces. Les résidus conservés sont en gras.

Espèce	Peptide	Séquence
Salmo salar	s-CT	**C**SNLST**C**VLGKLSQELHKLQTYPRTNTGSGT**Pamide**
Homo sapiens	h-CT	**C**GNLST**C**MLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGA**Pamide**
	CGRP-1	AC**C**DTAT**C**VTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKAF**amide**
	CGRP-2	AC**C**NTAT**C**VTHRLAGLLSRSGGMVKSNFVPTNVGSKAF**amide**
	Katacalcine	DMSSDLERDHRPHVSMPQNAN
	PCT	APFRSALESSPADPATLSEDEARLLLAALVQDYVQMKASELEQEQEREGSSLDSPRSKRCGNLSTCMLGTYTQ DFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKRDMSSDLERDHRPHVSMPQNAN
	Amyline	K**C**NTAT**C**ATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY**amide**
	PAMP	ARLDVASEFRKKWNKWALSR**amide**
	AM	HSGPRRYRQSMNNFQGLRSFG**C**RFGT**C**TVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY**amide**
	AM2/IMD53	TQAQLLRVG**C**VLGT**C**QVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY**amide**
	AM2/IMD47	TQAQLLRVG**C**VLGT**C**QVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY**amide**
	AM2/IMD40	VG**C**VLGT**C**QVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY**amide**
Sus scrofa domesticus	CRSP-1	S**C**NTAT**C**MTHRLVGLLSRSGSMVRSNLLPTKMGFKVFG**amide**
	CRSP-2	S**C**NTAS**C**VTHKMTGWLSRSGSVAKNNFMPTNVDSKIL**amide**
	CRSP-3	S**C**NTAI**C**VTHKMAGWLSRSGSVVKNNFMPINMGSKVL**amide**
	PAMP	ARLDVAAEFRKKWNKWALSR**amide**
	AM	YRQSMNNFQGLRSFG**C**RFGT**C**TVQKLAHQIYQFTDKDKDGVAPRSKISPQGY**amide**
	AM 5	TRHQVSLKSGRL**C**SLGT**C**QTHRLPEIIYWLRSASTKELSGKAGRKPQDPYSY**amide**
Ciona intestinalis	Ci-CT	**C**DGVST**C**WLHELGNSVHATAGGKQNVGFG**Pamide**
Branchiostoma floridae	Bf-CTFP1	D**C**STLT**C**FNQKLAHELAMDNQRTDTANPYS**Pamide**
	Bf-CTFP2	GKIA**C**KTAW**C**MNNRLSHNLSSLDNPTDTGVGA**Pamide**
	Bf-CTFP3	K**C**ESGT**C**VQMHLADRLRLGLGHNMFTNTGPES**Pamide**
Strongylocentrotus purpuratus	SpCTLP	SKG**C**GSFSG**C**MQMEVAKNRVAALLRNSNAHLFGLNG**Pamide**
Apostichopus japonicus	AjCTLP1	S**C**SNKFAG**C**AHMKVANAVLKQNSRGQQQFKFGSAG**Pamide**
	AjCTLP2	RVGG**C**GDFSG**C**ASLKAGRDLVRAMLRPSKFGSGG**Pamide**
Saccoglossus kowalevskii	SkCTLP1	GEG**C**KGFAA**C**GNLDAGRKHWKANMGGGRTAMFSSASGTP**amide**
	SkCTLP2	GRGTSA**C**GGFAT**C**KQLEYGRKYATSKADLSHFGATS**Pamide**
Asterias rubens	ArCT	NGESRG**C**SGFGG**C**GVLTIGHNAAMRMLAESNSPFGASG**Pamide**
Patiria pectinifera	PpCT	SGTG**C**TQFSG**C**AQLKVGQDALSRVLADSNSRFGSGG**Pamide**

Espèce	Peptide	Séquence
Diploptera punctata	Dippu-DH31	GL**D**L**G**LS**RG**F**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NYAG**GPamide**
Drosophila melanogaster	Drome-DH31	TV**D**F**G**LA**RG**Y**SG**TQE**AK**HRMGLAA**A**NFAG**GPamide**
Ixodes scapularis	CT/DH31	AGGLL**D**FGLS**RG**ASGAEA**AK**ARLGLKL**A**NDPY**GPamide**
Varroa destructor	CT/DH31	SNGML**D**F**G**LA**RG**MSGVDA**AK**ARLGLKY**A**NDPY**GPamide**
Rhodnius proxilus	Rhopr-DH31	GL**D**L**G**LS**RG**F**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NYAG**GPamide**
Anopheles gambiae	Anoga-DH31	TV**D**F**G**LS**RG**Y**SG**AQE**AK**HRMAMAV**A**NFAG**GPamide**
Aedes aegypti	Aedae-CT/DH	TV**D**F**G**LS**RG**Y**SG**AQE**AK**HRMAMAV**A**NFAG**GPamide**
Bombyx mori	Bommo-DH31	AF**D**L**G**LGRGY**SG**ALQ**AK**HLMGLAA**A**NFAG**GPamide**
	CT	**C**VNMWDEG**C**INGQLPGSGWDDYYLNGNFN**Pamide**
Acyrthosiphon pisum	CT/DH31	GL**D**L**G**LS**RG**Y**SG**TQA**AK**HLMGMAA**A**NFAG**GPamide**
Nilaparvata lugens	CT/DH31	GL**D**L**G**LSRGF**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NYAA**GPamide**
Nasonia vitripennis	CT/DH31	GL**D**L**G**LNRGF**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NYAG**GPamide**
Hylobius abietis	CT/DH31	GI**D**L**G**LGRGF**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NFAG**GPamide**
Tribolium castaneum	Trica-DH31	GL**D**L**G**LG**RG**F**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NFAG**GPamide**
	CT	**C**VNTGDDS**C**ANGYIPGAGDDYFSGGNT**Pamide**
Locusta migratoria	CT	D**C**DINAMDDS**C**VNGQWVGSGTDGDYFGSDGS**Pamide**
Zootermopsis nevadensis	CT	**C**VNTGDDS**C**ANGYIPGAGADDYFSGGNT**Pamide**
Daphnia pulex	Dappu-CLDH	GV**D**F**G**LG**RG**Y**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NYAI**GPamide**
Homarus americanus	Homam-CLDH	GL**D**L**G**LG**RG**F**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NFAG**GPamide**
Carcinus maenas	Carma-DH31	GL**D**M**G**LGRGF**SG**SQA**AK**HLMGLAA**A**NYAG**GPamide**
Caenorhabditis elegans	Cele-DH31	NRQ**C**LLNAGLSQG**C**DFSDLLHAQTQARKFMSFAG**Pamide**
Capitella telata	CT	T**C**QFNLGGH**C**ATESAASVADHWHLNSPLS**Pamide**
	DH31	RF**D**A**G**YGSRYGVAQSVGS**K**LMALKQ**A**ADWN**GPamide**
Platynereis dumerilii	CT	T**C**QVNLGGH**C**ATESAASVADQWHYLNSPLS**Pamide**
	DH31	RI**D**A**G**YGSRYAAGASVGSKLRALKQ**A**ADWN**GPamide**
Lottia gigantea	CT/DH31	S**C**SLRLGGM**C**LTENLNAAANQYEYLSSGLS**Pamide**
Patinopecten yessoensis	CT1	T**C**NIGVNSHF**C**ALADLDSKIRSREWLNSIYS**Pamide**
	CT2	T**C**AVEVGGT**C**RTEWASSIADQYYYLLGPHS**Pamide**
	CT3	S**C**KLNLGFH**C**QTEEYSAIADMYNFLQSAMS**Pamide**
	CT4	FLNDEAPS**C**LVSATD**C**SMGYIDPIEGFIDVVSNPNS**Pamide**
Crassostrea gigas	Cragi-CT1a	ETQERQIKL**C**RGMGPNNHP**C**GLTSFDVRNV
	Cragi-CT1b	T**C**AVELGGA**C**RTEWASAIADQYYYLMGPHG**Pamide**
	Cragi-CT2a	TFTQREA**C**ALSLNVDI**C**TEKYIEETADHQSKLQNLIEGN**Pamide**
	Cragi-CT2b	S**C**TLNLAYH**C**QTSEYAGLTDLYNYLNSNAS**Pamide**

Characterization of an evolutionarily conserved calcitonin signaling system in a lophotrochozoan, the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

Julie Schwartz[1], Emilie Réalis-Doyelle[1], Marie-Pierre Dubos[1], Benjamin Lefranc[2], Jérôme Leprince[2] and Pascal Favrel[1*]

1. Normandie Université, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC, UA, CNRS 7208, IRD 207, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), CS14032, 14032 CAEN, Cedex 5, France.

2 Normandie Université, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, F-76000 Rouen, France.

* Correspondence and requests for material should be addressed to PF (E-mail: pascal.favrel@unicaen.fr

Abstract

The calcitonin (CT)/CGRP family of peptides includes multiple members involved in the regulation of various physiological functions in chordates. The origin of the calcitonin signaling system seemingly dates back to the common ancestor of bilaterian metazoan, as both Deuterostoma and Protostoma express peptides and receptors homologous to chordate CT and CT receptors / CT-like receptors (CTR / CLR). In Protostoma, only the diuretic hormone 31 (DH31) signaling system, previously assumed to correspond to the ortholog of the chordate calcitonin signaling system, has been currently characterized. The present study demonstrates for the first time the existence of a CT-signaling system in a protostome species. Using the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) transcriptomic database GigaTON, we characterized seven

G-protein-coupled receptors (GPCRs) named CTRs and phylogenetically related to vertebrate CT receptors and to protostome DH31 receptors, as well as the two Cragi-CT1 and Cragi-CT2 transcripts: Cragi-CT1 encodes the precursor of one CTa and one CTb CT-type peptides, while Cragi-CT2 encodes the precursor of CT2a and CT2b.These neuropeptides exhibit the two N-terminal paired cysteine residues and except Cragi-CT2a the C-terminal proline-amide motif typical of deuterostome CT-type peptides. All mature Cragi-CTs but Cragi-CT2a were unambiguously detected in visceral ganglion (VG) extracts using mass spectrometry. The two oyster CT precursors are encoded by two distinct genes likely resulting from gene duplication as they display similar organizations. An expression assay revealed that the formerly characterized oyster receptors Cg-CTR and Cragi-CTR2 were specifically activated by Cragi-CT1b and Cragi-CT2b, respectively. Gene expression profiles monitored by real-time quantitative reverse transcription-PCR in different adult tissues and in oysters acclimated to brackish water suggest the potential implication of both Cg-CT-R/Cragi-CT1b and Cragi-CTR2/Cragi-CT2b in water and ionic regulations, though with apparently opposite effects.

Key words: Calcitonin (CT), Diuretic Hormone 31 (DH31), GPCR, Lophotrochozoa, Oyster

Introduction

Neuropeptides play roles as neurotransmitters, neuromodulators or neurohormones, and thereby participate to the regulation of many physiological functions in metazoans *via* the activation of different types of receptors, mostly G-protein-coupled receptors (GPCRs). Understanding the evolution of animal neuropeptide signaling systems is a significant challenge and basically involves in a first step the study of neuropeptide-receptor pairs. Global analyses have indeed shown that neuropeptides and their cognate receptors co-evolved over large evolutionary distances (Jekely 2013; Mirabeau and Joly 2013). Due to the lack of genomic and transcriptomic data available in several taxa, neuropeptide signaling systems have mainly been

studied in Vertebrates and Ecdysozoa model species. However, recent studies have identified and characterized the neuropeptide repertoire of several species of the protostome ecdysozoan sister clade, *i.e.* Lophotrochozoa, including annelids (Bauknecht and Jékely 2015) and mollusks (Veenstra 2010; Adamson et al. 2015; Zatylny-Gaudin et al. 2016; Ahn et al. 2017b; Zhang et al. 2018) such as the oyster *Crassostrea gigas* (Stewart et al. 2014). In this species, large-scale genomic and transcriptomic resources (Zhang et al. 2012b; Riviere et al. 2015b) are now available, and facilitate the study of signaling pathways (Bigot et al. 2014; Li et al. 2016; Dubos et al. 2018; Schwartz et al. 2018). The present study investigates the evolution of the calcitonin (CT) / diuretic hormone 31 (DH31) signaling system in the bivalve mollusk *C. gigas*.

In chordates, CT belongs to the large CT/CGRP family composed of several neuropeptides including CT, the calcitonin gene-related peptide (CGRP), the calcitonin receptor-stimulating peptide (CRSP), amylin, adrenomedullin 1 (AM1), and intermedin / adrenomedullin 2 (IMD/AM2). Although all these peptides display a disulfide bridge between two cysteine residues in the N-terminal region that forms a cyclic structure, they only share low sequence identity. These peptides transduce signals through only two related receptor types: the CT receptor (CTR) and the CGRP receptor known as the calcitonin-like receptor (CLR). The complexity of the signaling pathway of the CT/CGRP peptide family relies on the involvement of accessory proteins named RAMP (receptor activity-modifying protein) and RCP (receptor component protein), which form heterotrimeric complexes with the receptors (Weston et al. 2016). CTR and CLR can bind different RAMPs (RAMP1, RAMP2, and RAMP3) and thus change their ligand specificity. CLR becomes a CGRP receptor in association with RAMP1 but an AM1 receptor in association with RAMPs 2-3 (Mclatchie et al. 1998). CTR alone transduces the CT signal and possibly the CRSP signal (Katafuchi et al. 2009), but its interaction with RAMPs generates an AM receptor that also interacts with CGRP (Prado et al. 2001; Dickerson 2013). The RCP accessory protein appears only critical for the efficient coupling of CLR /

RAMP complexes to Gαs proteins (Dickerson 2013). In mammals, the variety of the CT/CGRP family of peptides is associated with a great diversity of sometimes overlapping functions (Muff et al. 1995) such as calcemia and phosphoremia regulation for CT (Copp 1963), vasodilation for CGRP (Brain et al. 1985) or AM (Kitamura et al. 1993), pain mediation for CGRP (Russell et al. 2014), inhibition of insulin-induced glucose uptake for AM, or suppression of food intake for CRSP (Katafuchi et al. 2003, 2009; Sawada et al. 2006). This complex family of peptides, CRSP excluded (Katafuchi et al. 2009), is well conserved among vertebrates (Chang et al. 2004). More recently, CT-type peptides have also been characterized in more basal deuterostome species such as cephalochordates (Sekiguchi et al. 2016b), urochordates (Fritsch et al. 1979, 1980; Sekiguchi et al. 2009), but also echinoderms where they play the role of a muscle relaxant (Cai et al. 2018). In Protostoma, peptides immunologically related to vertebrate CT were initially identified in insects (Langvad Hansen et al. 1982) and crustaceans (Arlot-Bonnemains et al. 1986). Later, a diuretic peptide composed of 31 amino acid residues and named dippu-DH31 (DH for diuretic hormone) was characterized in the cockroach *Diploptera punctata* (Furuya et al. 2000). Dippu-DH31 shows little sequence similarity with the CT family of peptides, but lacks the typical N-terminal pair of cysteine residues. Since insect DH31 homologs specifically activate CTR/CLR-related receptors (Johnson 2004; Zandawala et al. 2013; Iga and Kataoka 2015), they were initially considered as the insect evolutionary counterparts of the deuterostome CT/CGRP family of peptides. However, recent mining of the termite and locust genomes revealed the existence of a gene encoding typical CT-related peptides with an N-terminal disulfide bridge in addition to the DH31-encoding genes present in all insect genomes (Veenstra 2014). Up to now, only a CT-type peptide has been identified in nematodes (Mirabeau and Joly 2013). Interestingly, in Lophotrochozoa and more precisely in annelids, the two CT-like and DH31-like types of neuropeptides coexist in *Platynereis dumerlii* (Conzelmann et al. 2013). Moreover, annelid DH31 activates two DH31-related

receptors (Bauknecht and Jékely 2015). This infers the occurrence of a duplication event of a CT/DH31 ancestral gene in the common ancestor of protostomes (Conzelmann et al. 2013). However, in mollusks, only typical CT-like peptides have been identified among the predicted neuropeptides of *Lottia gigantea* (Veenstra 2010; Cai et al. 2018) and *Patinopecten yessoensis* (Zhang et al. 2018). Interestingly a CTR/CLR homolog named Cg-CT-R and potentially involved in ionic regulation in the pacific oyster *C. gigas* was formerly characterized but remained orphan (Dubos et al. 2003). Thanks to the recent emergence of genomic (Zhang et al. 2012b) and transcriptomic (Riviere et al. 2015b) data in *C. gigas*, we identified several other potential CT/DH31 receptors as well as putative CT peptide precursors. Therefore, this study demonstrates for the first time the existence of a functional CT-type signaling system distinct from a DH31 signaling system in a protostome.

Material and methods

Animals and tissue sampling

Two-year old adult oysters *C. gigas*, purchased from a local farm (Normandie, France), were used for peptide characterization and transcription analyses. Adult tissues (mantle, mantle edges, gills, labial palps, digestive gland, gonad (mix of all stages), heart, adductor muscle) were sampled, the visceral ganglia (VG) were carefully dissected out, thus limiting any contamination from the adjacent adductor muscles. To study the influence of osmotic conditions, oysters were transferred from seawater (33‰) to brackish water (8‰) at 17°C. Two conditioning experiments were carried out. An acute osmotic conditioning (AC) corresponding to the addition of distilled water once in the sea water tank or a mild osmotic conditioning (MC) consisting of diluting the sea water with a continuous flow (0.5 Lh^{-1}) of distilled water during 3 days. Tissues (VG, mantle and gills) were sampled after 12 h of incubation of the oysters in brackish water at the final salinity.

Peptide synthesis

Materials

All Fmoc amino acid residues and *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) were purchased from Christof Senn Laboratories (Dielsdorf, Switzerland) or Novabiochem (Darmstadt, Germany). PEG-PS resins were from Applied Biosystems and α-cyano-4-hydroxycinnamic acid from LaserBio Labs (Sophia-Antipolis, France). Piperidine, triisopropylsilane (TIS), *tert*-butylmethylether (TBME), thallium(III) trifluoroacetate and anisole were supplied from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Trifluoroacetic acid (TFA), *N*-methylpyrrolidone (NMP) and dimethylformamide (DMF) were from Biosolve (Dieuze, France). Dichloromethane (DCM), *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA) and acetonitrile were from Fisher Scientific (Illkirch, France).

Peptide synthesis

Peptides were synthesized on a 433A Applied Biosystems automated peptide synthesizer (Applera-France) using the standard manufacturer's procedures (0.1 mmol scale) on low loading Fmoc-PAL-PEG-PS resin (Cragi-CT1a, -CT1b, -CT2b) or Fmoc-Val preloaded PEG-PS resin (cragi-CT2a) as previously described (Chatenet et al., 2006). All Fmoc-amino acids (1 mmol, 10 equiv) were coupled by *in situ* activation with HBTU (1.25 mmol, 12.5 equiv) and DIEA (2.5 mmol, 25 equiv) in NMP. Reactive side chains were protected as follow: Asn, His, Gln, trityl (Trt) amine; Asp, Glu, *tert*-butyl (OtBu) ester; Ser, Thr, Tyr, *tert*-butyl (*t*Bu) ether; Arg, pentamethyldihydrobenzofuran (Pbf) sulfonylamide; Lys, *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) carbamate; Cys, acetamidomethyl (Acm) thioether. To minimize aggregation phenomenon, pseudoproline residues were used for synthesis of Cragi-CT1a (Fmoc-Leu-Ser(Ψ(Me,Me)Pro)-OH) and Cragi-CT1b (Fmoc-Asn-Ser(Ψ(Me,Me)Pro)-OH, Fmoc-Leu-Thr(Ψ(Me,Me)Pro)-OH and Fmoc-Gln-Thr(Ψ(Me,Me)Pro)-OH). The formation of the disulfide bond was carried out on resin by selective deprotection of the cysteines and *in situ* cyclisation with thallium(III)

trifluoroacetate (1.2 equiv) in 15 mL of a DMF/anisole (9.5:0.5, v/v) solution at 0°C for 4 h. After filtration and washes with 3x5 mL of DMF/anisole solution, 3x5 mL of DMF and 3x5 mL of DCM, the cyclic peptides were cleaved from the resin and deprotected by adding 10 mL of an ice-cold mixture of TFA/TIS/H_2O (9.5:0.25:0.25, v/v/v) and agitating 3 hours at room temperature. Peptides were then obtained by precipitation in TBME. Crude peptides were purified by semipreparative reversed-phase HPLC (RP-HPLC) on a Kinetex XB-C_{18} column (250 x 21.2 mm; Phenomenex, Le Pecq, France) using a linear gradient (20-50% or 20-40% over 50 min) of acetonitrile (0.1% TFA) at a flow rate of 10 mL/min as previously described (Leprince et al., 2001). Absorbance was monitored at 215 and 280 nm using a UV detector (Gilson, Villiers Le Bel, France). Analytical RP-HPLC analysis, performed on a Kinetex XB-C_{18} column (250 x 4.6 mm; Phenomenex), revealed that the purity of all peptides was higher than 97%. The authenticity of each peptide was verified by MALDI-TOF-MS on an UltrafleXtreme (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) in the reflector mode with α-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix.

Mass spectrometry characterization of oyster endogenous CT neuropeptides

Fifteen visceral ganglia (VG), frozen and crushed in liquid nitrogen, were extracted in acetonitrile/water/TFA/ 0.1% (90/10 v/v) 30 minutes at 4°C. After centrifugation 20 minutes at 15 000 g at 4°C, supernatant was concentrated on C18 Sep-Pak cartridges.

LC-ESI-MS/MS peptide analysis

Sample and standard peptides were resuspended in 3% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid (FA) buffer before mass spectrometry analyses.

Peptides were analyzed with a nano-LC1200 system coupled to a Q-TOF 6545XT AdvanceBio mass spectrometer equipped with a nanospray source and an HPLC-chip cube interface (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Briefly, peptides were enriched and desalted on a 40 nL

Zorbax RP-C18 trap column (300 Å pore size, 5-µm particle size stationary phase) and then a 35-min linear gradient (3–75% acetonitrile in 0.1% FA), at a flow rate of 300 nL/min, was used to separate peptides on Zorbax-300SB-Chip C18 column (150 mm long x 75 µm inner diameter). Full autoMS1 scans from 290 to 1700 *m/z* and autoMS2 from 59 to 1700 *m/z* were recorded. In each cycle, a maximum of 5 precursors sort by charge state (2+ preferred and single-charged ions excluded) were isolated and fragmented in the collision cell that was automatically adjusted depending on the *m/z*. Active exclusion of these precursors (sorted by abundance only) was enabled after 4 spectra within 1.5 min, static exclusion from 100 to 300 m/z was applied and the absolute threshold for precursor selection was set to 1000 counts (relative threshold 0.1%). Scan speed varied based on precursor abundance (22000 count/spectrum) and with 100% purity stringency and 30% purity cutoff. Masshunter Analysis Navigator version B.08.00 service pack 1 was used for data processing.

In silico analyses

Oyster CT putative precursors were obtained by performing a BLAST search using the GigaTON database resource (Riviere et al. 2015b) and the *Mytilus californianus* EST (ES402507) as query sequence (Conzelmann et al. 2013). Oyster RCP transcript was obtained using Drosophila RCP sequence (NP_573175.2) as query. Candidate oyster CT/CL/DH31-related receptors were retrieved from an in-house *C. gigas* GPCR database generated by selecting, from the GigaTON database, the sequences indexed with the IPR000832 (Secretin-like GPCRs) and IPR017452 (Rhodopsin-like receptors) InterPro family labels. Then, GPCRs annotated as calcitonin receptors (CALCRs and CALRLs) were selected. Gene structure was deduced by aligning the cDNA sequences with the genome sequence (Zhang et al. 2012b). A multiple sequence alignment was performed with CTR/CLR/DH31Rs from various species using Clustal Omega (Sievers et al. 2011). Seaview (Gouy et al. 2010) was used for selecting the conserved protein regions and for the manual correction of the alignment. PhyML was used

for generating the trees. The reliability of the inferred trees was estimated by applying the bootstrap procedure with 100 replications. FigTree (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) was used to draw the tree.

Reverse endocrinology

Molecular cloning of the *Cragi*-CTRs and Cragi-RCP and transfection of mammalian cells

Full length sequences of the incomplete transcripts found by the *in silico* analysis were acquired by a (5' or 3') PCR primer walking strategy. PCR was performed using 50 ng of a *C. gigas* "all development stages and adult central nervous system" directional and normalized cDNA library inserted into the Pal 17.3 vector (Evrogen) (Fleury et al. 2009a) in 50 µL reaction volume containing 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 1 µM of each sequence specific primers and Pal 17 specific primers (Supplementary table 5), 1.25 units of Go-Taq polymerase and the appropriate buffer (Promega) in nuclease-free water. Samples were submitted to the following cycling parameters (95°C, 2 min; 30 cycles of: 95°C 45 s, annealing temperature 30 s, 1 min 72°C followed by 5 min 72°C). Each PCR reaction was diluted 10 times and 1µL was used as template for nested PCR run under the same conditions using a nested specific sequence primer and Pal 17 nested specific primers (Supplementary table 5) PCR amplified products were cloned into pGEM®-T Easy Vector (Promega) and sequenced. The CDS of the candidate Cragi-CTRs and the Cragi-RCP transcripts were then amplified by PCR (Pfu DNA polymerase, Promega) using gene-specific sense primers harboring a Kozak consensus sequence and antisense primers (Supplementary table 5). Ten ng of plasmid DNA (Pal 17.3 vector, Evrogen) cDNA library was used as template. The resulting PCR products were directionally cloned into the pTARGET expression vector (Promega). The correct insertion of the PCR products was confirmed by sequencing. Human Embryonic Kidney (HEK293T) cells were transiently transfected with the Cragi-CTRs / pTARGET or Cragi-CTRs / Cragi-RCP / pTARGET

constructs using Fugene HD (Promega) according to the manufacturer's instructions. As a first step, co-transfection was done with a pTARGET expression construct for the human $G\alpha_{16}$ subunit, a promiscuous G protein that can direct intracellular signaling of GPCRs to the release of calcium via the phospholipase C_β pathway, regardless of the endogenous G protein coupling of the receptor (Offermanns and Simon 1995). To assess receptor activity independent of $G\alpha_{16}$, calcium responses were measured in cells expressing only the Cragi-CTRs. Cells for negative control experiments were transfected with empty pTARGET and $G\alpha_{16}$/ pTARGET constructs.

Calcium fluorescence assay

Activation of the Cragi-CTRs by candidate peptide ligands was monitored using a fluorescence-based calcium mobilization assay. Briefly, transfected HEK293T cells were loaded with Fluo-4 Direct (Invitrogen) plus probenecid (*q.s.* 2.5mM final in the cell) (Molecular Probes) for 1 hour (45min at 37°C and 15min at room temperature). Excitation of the fluorophore was done at 488 nm. The calcium response was measured for 2 min at 525 nm using a FLEXstation 3 (Molecular Devices) at 37°C. Data were analyzed using SoftMax Pro (Molecular Devices). Candidate ligands were first tested at a final concentration of 10^{-5} M. Concentration-response measurements of activating ligands were conducted in triplicate and for at least three independent experiments. Half maximal effective concentrations (EC_{50} values) were calculated from concentration-response curves that were constructed using nonlinear regression analysis with a sigmoidal dose-response equation using Prism 5.0 (GraphPad software, USA).

cAMP luminescence assay

Cragi-CTRs and Cragi-CTRs / Cragi-RCP transfected HEK293T cells were incubated with Glosensor cAMP reagent (*q.s.* 4% final in the medium) (Promega) for 2 hours at room temperature prior to the injection of the candidate ligands. cAMP luminescence response was measured for 30 min after injection using a FLEXstation 3 (Molecular Devices) at room

temperature. Data were analyzed using SoftMax Pro (Molecular Devices). Candidate peptide ligands were first tested at a final concentration of 10^{-5} M.

Reverse transcription and quantitative PCR

RT-qPCR analysis was performed using the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Total RNA was isolated from adult tissues using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Recovered RNA was then further purified on Nucleospin RNAII columns (Macherey-Nagel). After treatment during 20 min at 37°C with 1 U of DNase I (Sigma-Aldrich) to prevent genomic DNA contamination, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using 1 µg of random hexanucleotidic primers (Promega), 0.5 mM dNTPs and 200 U MMuLV Reverse Transcriptase (Promega) at 37°C for 1 h in the appropriate buffer. The reaction was stopped by incubation at 70°C for 10 min. The GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) was used for real time monitoring of amplification (5 ng of cDNA template, 40 cycles: 95°C/15 s, 60°C/15 s) with gene-specific primers. A parallel amplification of *C. gigas* elongation factor 1 α (EF1 α) transcript (BAD15289) was carried out to normalize the expression data of the studied transcripts. EF1 α was found as a reliable normalization gene as no significant difference ($p<0.05$) of Ct values was observed between the different samples compared. Coefficient of variation of EF1 α was less than 5%. Thus, the relative level of each gene expression was calculated for one copy of the EF1 α reference gene by using the following formula: $N = 2^{(\text{Ct EF1 } \alpha - \text{Ct } Cg\text{-cDNA})}$. The PCR amplification efficiency (E; $E = 10^{(-1/\text{slope})}$) for each primer pair was determined by linear regression analysis of a dilution series to ensure that E ranged from 1.98 to 2.02. The specificity of the primer pairs was confirmed by melting curve analysis at the end of each qPCR run.

Statistical analysis

Expression levels between differentially conditioned animals were compared using an unpaired Student's t test. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Molecular characterization of oyster CT/DH31-related receptors and RCP

In silico analysis resulted in the identification of six full length cDNAs encoding Cragi-CTR3 (CHOYP_CALCR.1.6), Cragi-CTR4 (CHOYP_CALCR.6.6), Cragi-CTR5 (CHOYP_CALCR.2.6), Cragi-CTR6 (CHOYP_CALRL.2.3), Cragi-CTR7 (CHOYP_CALCR.3.6) and (CHOYP_CALRL.3.3, AJ551182) corresponding to the formerly characterized Cg-CT-R (Dubos et al. 2003). The full length sequence of the partial cDNA encoding Cragi-CTR2 (CHOYP_CALCR.4.6) was obtained by a RACE procedure. The phylogenetic analysis clearly shows that both vertebrate CTRs and CLRs cluster apart from protostome DH31R and CTR sequences (Figure 1). Considering the protostome sequences, they segregate into two main subgroups. The first one corresponding to DH31R sequences including Cragi-CTR5 and also Cragi-CTR3 and Cragi-CTR4 which seem closer to *Platynereis dumerilii* DH31R1. The second cluster corresponding to CT-type receptors comprises lophotrochozoan receptors especially Cragi-CTR2, Cg-CT-R and the more distant Cragi-CTR7. Intriguingly, the functionally characterized *P. dumerilii* DH31 receptor 2 is even more distant. This cluster also contains as a separate branch the termite putative receptors CTRA and CTRB.

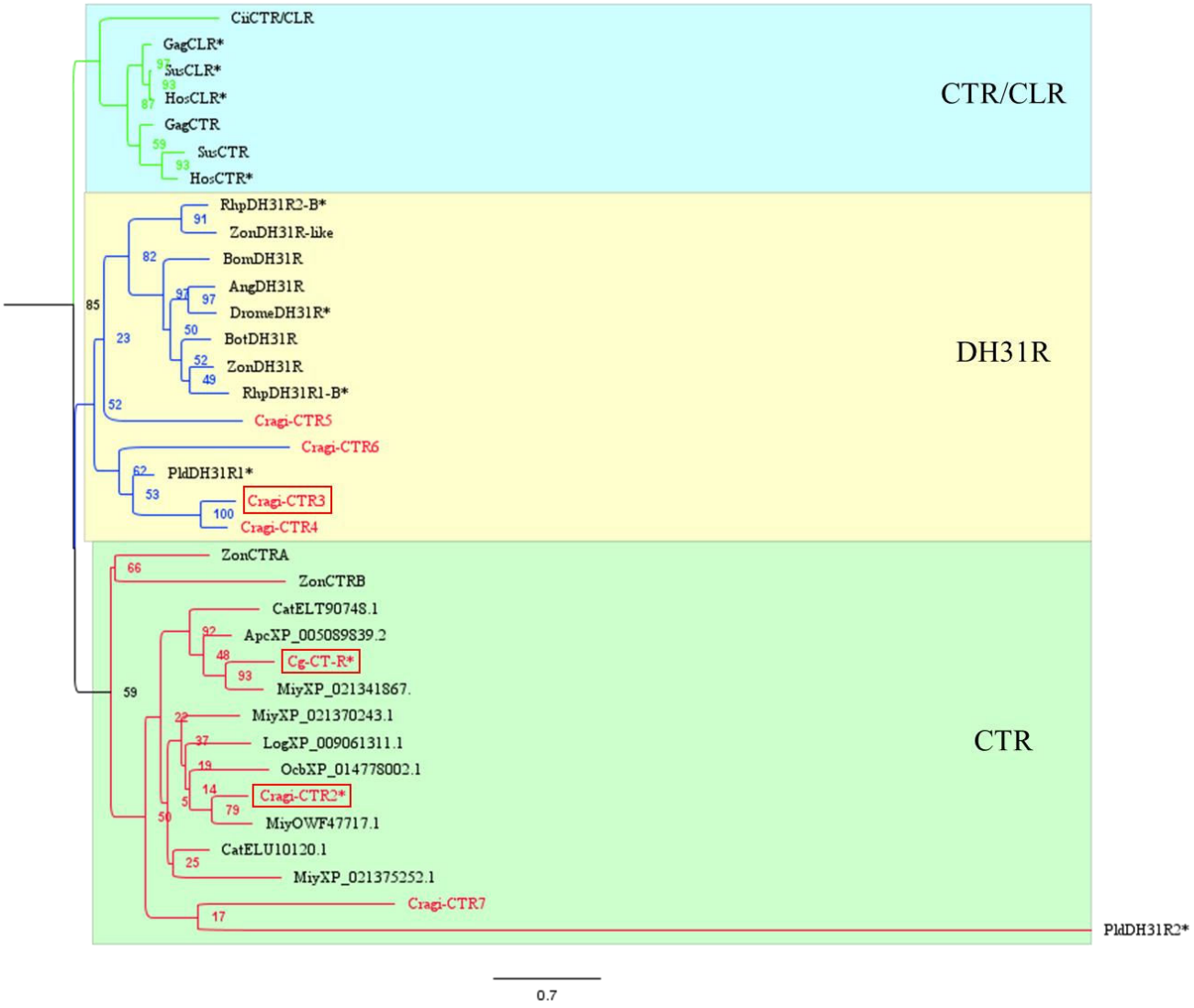
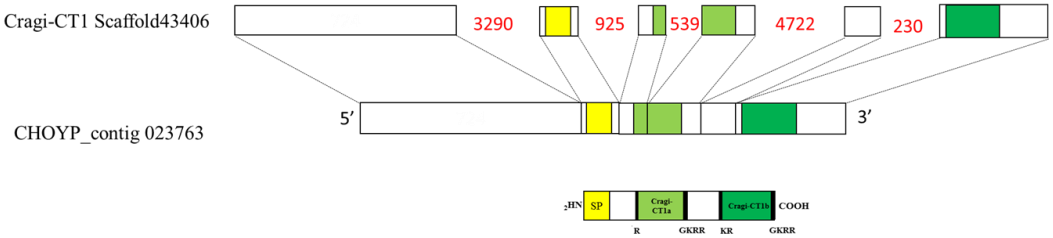


Figure 1: Phylogenetic representation of the relationship between Cragi-CTRs, Cg-CT-R and other CTR/DH31R family members. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using Seaview based on the maximum-likelihood method. The accession numbers and the sequences used to construct the tree are listed in supplementary tables 2 and 3. * indicates functionally characterized receptors.

Molecular characterization of Cragi-CTs.

BLAST search in the GigaTON database resulted in the identification of two transcripts coding for the precursors of Cragi-CT1 (CHOYP contig_023763) and Cragi-CT2 (CHOYP contig_035594). The two precursors share a similar organization, starting with a signal peptide and harboring two potential CT/DH31-like peptides (a and b) cleaved N-terminally at mono/di basic processing sites and C-terminally, except for Cragi-CT2a, at a tri/tetrabasic processing site typically found in CT/DH31 precursors. Because of the presence of a glycine residue upstream this last cleavage site, mature peptides (except Cragi-CT2a) are likely amidated (Figure 2, and supplementary Table 1). Cragi-CT1 and Cragi-CT2 genes, both composed of 6 exons, also display an analogous arrangement with introns at similar positions. Cragi-CT1a and Cragi-CT2a are encoded by the second/third and the third/ fourth exon of the respective genes and Cragi-CT1b and Cragi-CT2b are encoded by the last exons (Figure 2 A, B, C, D). Alignment of Cragi-CTs with CT and DH31 peptides from other species showed that oyster peptides only shared subtle sequence identity but, except for Cragi-CT2a, displayed the conserved C-terminal "proline-amide" motif common to insect DH31 and vertebrate CTs. Moreover, all of these peptides are similar in length of around 30 amino acids. Cragi-CT1a, Cragi-CT1b, Cragi-CT2a and Cragi-CT2b also exhibited the typical two cysteine residues for disulfide bond formation common to all deuterostome and protostome CT-type peptides (Figure 2 E,F).

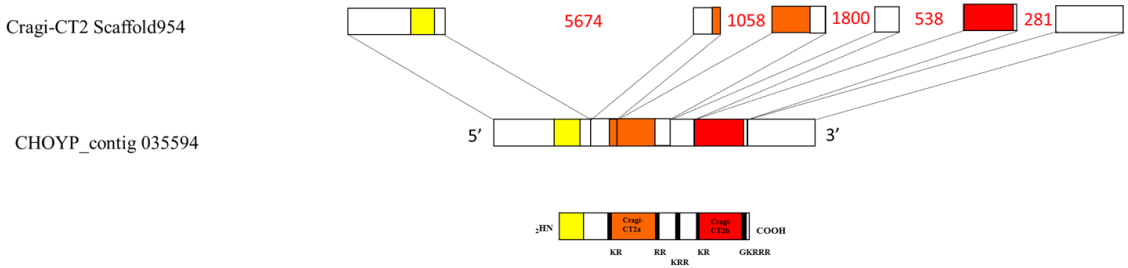
A



B

```
Cragi-CT1
tgtcgctcgcacagtatctaggaccagatgtcttgtaaataatttgcggatgtaatgagggcagccattctccaaatacccgtct     85
ctagtacatgtagatttaaatgaatcttaattcgattaagtaaagggctttgtcagtaaagactatctttcattaaaaaggttg    170
tacagtagacatgcataaacataaagcgccgaaagaagaacgaaaaaactccatgctgttcattatagccaatgtagacgcaaga    255
tttggatagtcactaagtagccaactgaaaatttgcattggaaagaggatttgaaaaatatggaaggattaaagacatccatt    338
                                                    M  E  G  L  K  T  S  I                 8
tgctcattgctttttttcatcgtcgctacaacgtccctcgagattaaatcacagcatattcgggaaaaacatctggtcgatcaa    422
 C  S  L  L  F  F  I  V  A  T  T  S  L  E  I  K  S  Q  H  I  R  E  K  H  L  V  D  Q     36
ttagacaaagtacgggagcagttaaaagacttatctcattccgttgacacactacgaactttcacacaaaggtgaagcctgcgct    506
 L  D  K  V  R  E  Q  L  K  D  L  S  H  S  V  D  T  L  R  T  F  T  Q  R  E  A  C  A     64
ctcagtcttaatgtagatatttgcacagagaaatacattgaggaaacggcagaccatcaaagcaaattacagaacctaatagaa    590
 L  S  L  N  V  D  I  C  T  E  K  Y  I  E  E  T  A  D  H  Q  S  K  L  Q  N  L  I  E     92
gggaacccaggaaagaggcgaccgaagagagcggctgatatgtccctagatttatttgttgaagatttgctgagaaagaatgct    674
 G  N  P  G  K  R  R  P  K  R  A  A  D  M  S  L  D  L  F  V  E  D  L  L  R  K  N  A    120
gctttgcagtcaatacaacagatattaaataacatgtccaagacagttcaccaagaaaagaagagaagttgcacactgaatctg    758
 A  L  Q  S  I  Q  Q  I  L  N  N  M  S  K  T  V  H  Q  E  K  K  R  S  C  T  L  N  L    158
gcttatcattgccaaacctccgagtatgcaggcctgacagatctgtacaactaccttaacagcaatgccagtcccggcaagagg    842
 A  Y  H  C  Q  T  S  E  Y  A  G  L  T  D  L  Y  N  Y  L  N  S  N  A  S  P  G  K  R    196
agatgatcattggagagaatacccaaataaacatttcgcatattctatgtctcatgccgagttttaattatttattccattcat    926
 R  *                                                                                   197s
tcgccaacgtttagagacacaggtatcacatacatgtatataaggtttaaatgtatggtaaaatttggacatacatctataag   1010
Caaacattttcgattgttcacatactaccagttgttctaataaagagaggcc                                  1062
```

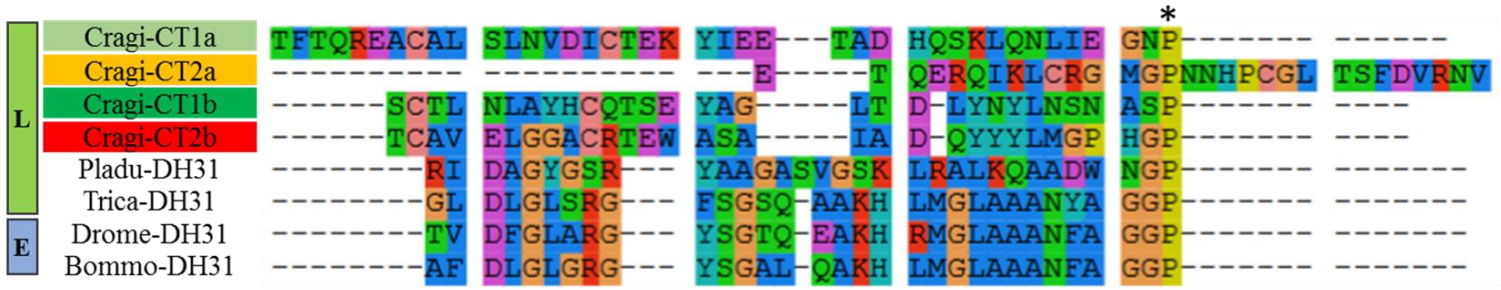
C



D

```
Cragi-CT2
cataattcttggagaggcccaaccggaatccagctccggtatcgattctggactttagctttttttaattctttttttcagatttg     85
gtttggctttgcacactgacggtaacttgggctccaagttggaaatgtatcattggagtaactgttggacttttttaatatac     168
                                                    M  Y  H  W  S  N  C  W  T  F  L  I  Y     13
ataattttcacattagcaccgtccctggggaattcggatcgagcagatgcatttgatgaaatgattgcggcgttcgccacagac     252
 I  I  F  T  L  A  P  S  L  G  N  S  D  R  A  D  A  F  D  E  M  I  A  A  F  A  T  D     41
acgagacacatacgatctgcaatttcttcggcagaggaagtaaaacgagaaactcaagaaagacagattaaactgtgtagaggg    336
 T  R  H  I  R  S  A  I  S  S  A  E  E  V  K  R  E  T  Q  E  R  Q  I  K  L  C  R  G     69
atgggacccaacaaccatccttgcggactaacgagttttgatgtcaggaatgtaagaagaggagacgatgaagacatagaagtg    420
 M  G  P  N  N  H  P  C  G  L  T  S  F  D  V  R  N  V  R  R  G  D  D  E  D  I  E  V     97
gagacgctcaatcgagggacacgatcgttagaagggagtagaccggacaacccaccgaccgaaaaggaaagaatggcctacatc    504
 E  T  L  N  R  G  T  R  S  L  E  G  S  R  P  D  N  P  P  T  E  K  E  R  M  A  Y  I    125
gccaaattagcaaaaagacgccaggacatggataggatattagagctcttaaatgaaaaggaaaacaacattcgacaaataaga    588
 A  K  L  A  K  R  R  Q  D  M  D  R  I  L  E  L  L  N  E  K  E  N  N  I  R  Q  I  R    153
aaacggacatgtgctgtggagttgggagggggcctgtcgcacggaatgggcatcagccattgcggatcagtattattaccttatg    672
 K  R  *  C  A  V  E  L  G  G  A  C  R  T  E  W  A  S  A  I  A  D  Q  Y  Y  Y  L  M    181
ggaccccatggacccggcaagagaaggaggaggctcgctaattaacgtactaacggggaaattatcgcatatatccacctcaaac    756
 G  P  H  G  P  G  K  R  R  R  R  S  L  I  N  V  L  T  G  K  L  S  H  I  S  T  S  N    209
aaagggcattgagtttctgagaaacaagtgatgtgtgtcaaacatctgtgatctcctctatactgaagcggctttaataaatat    840
  K  G  H  *                                                                           212
catatatggaacttttcctgtatataaaatcatcttgttcacggtttttttcccttcatcttccctatacatgtacagtatgca    924
cggtttgtgtgtgtttctataatattgtgtcatgtttattacatgaagtctctaatttcctc                         986
```

E



F

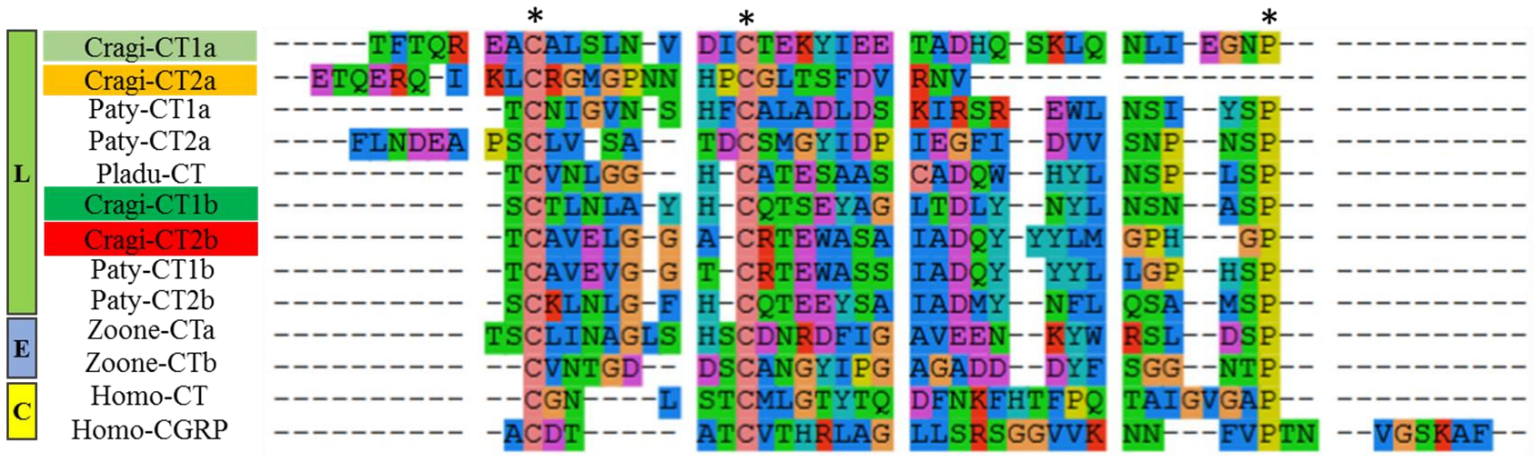


Figure 2: Schematic representation of Cragi-CT1 (A, B) and Cragi-CT2 (C, D) genes (A,C) and sequence of the precursors (B,D) (SP: Signal peptide). Sequence alignment of Cragi-CT peptides (E, F) with Protostome and Deuterostome DH31 (E) and CT (F). Amino acids with similar physico chemical properties are in the same color. Pladu: *Platynereis dumerilii*, Trica: *Tribolium castaneum*, Drome: *Drosophila melanogaster*, Bommo: *Bombyx mori*, Patye: *Patinopecten yessoensis*, Zoone: *Zootermopsis nevadensis*, Homo: *Homo sapiens*, L: Lophotrochozoa, E: Ecdysozoa, C: Chordata. Arrows indicate intron positions. * indicate conserved amino acids. The accession numbers and the sequences used to construct the alignment are listed in supplementary table 4.

Analysis of extracts of *C. gigas* VG using nano-LC coupled to mass spectrometry (LC-MS) uncovered the presence of the molecular masses corresponding to Cragi-CT1a [904.65 m/z (z =5+), Cragi-CT1b [1141.8489 m/z (z = 3+)] and Cragi-CT2b [1109.84 m/z (z =3+)] under native conditions. No signal corresponding to Cragi-CT2a molecular mass was detected from VG extracts (Supplementary Figure 1).

Distinct Cragi-CT forms specifically activate Cragi-CTRs and Cg-CT-R

A calcium mobilization assay was used to identify the cognate ligands of Cragi-CTRs. Only Cragi-CTR2, Cragi-CTR3, Cg-CT-R were tested. The receptors transiently transfected HEK293 T cells with the promiscuous Gα16 protein and with or without Cragi-RCP (CHOYP-CRCP.1.1) (Supplementary Figure 2) were challenged with rather high concentrations (10^{-5}M) of synthetic Cragi-CT1s and Cragi-CT2s. Cragi-CTR2 and Cg-CT-R were specifically activated with a high dose (10^{-5} M) of Cragi-CT2b and Cragi-CT1b respectively, in presence or absence of the promiscuous Gα16 protein. Thus, dose-dependent activations of Cragi-CTR2 and Cg-CT-R were recorded by omitting the Gα16 protein (Figure 3). No activation of Cragi-CTR3 was observed with any of the four Cragi-CTs. No signal was obtained with cells transfected with an empty vector or with a Gα16 expressing vector (Supplementary Figure 3). Cragi-CT2b activates Cragi-CTR2 with a half maximal effective concentration (EC_{50}) of 1.70 10^{-7} M and Cragi-CT1b activates Cg-CT-R with a EC_{50} of 3.37 10^{-7} M (Table 1).

Table 1 : Cragi-CT1/2 respective EC50 for receptor activation.

Peptide Name		Cg-CT-R	Cragi-CTR2	Cragi-CTR3
Cragi-CT1a	Ca^{2+}	No activation		No activation
	cAMP			
Cragi-CT1b	Ca^{2+}	3.37±3.12 10^{-7} M	No activation	
	cAMP	1.747±4.03 10^{-7} M		
Cragi-CT2a	Ca^{2+}	No activation		
	cAMP			
Cragi-CT2b	Ca^{2+}	No activation	1.70±0,18 10^{-7} M	
	cAMP		0.18±0,02 10^{-7} M	

Similar EC_{50} and identical fluorescence intensity were observed when Cragi-CTR2 or Cg-CT-R were co-transfected with Cragi-RCP (Supplementary Figure 4). The transduction via Gαs was investigated using a cAMP luminescence assay. Cragi-CT2b activates Cragi-CTR2 with an EC_{50} of 0.18 10^{-7} M and Cragi-CT1b activates Cg-CT-R with an EC_{50} of 1.75 10^{-7} M. As previously, no change was observed in the presence of Cragi-RCP.

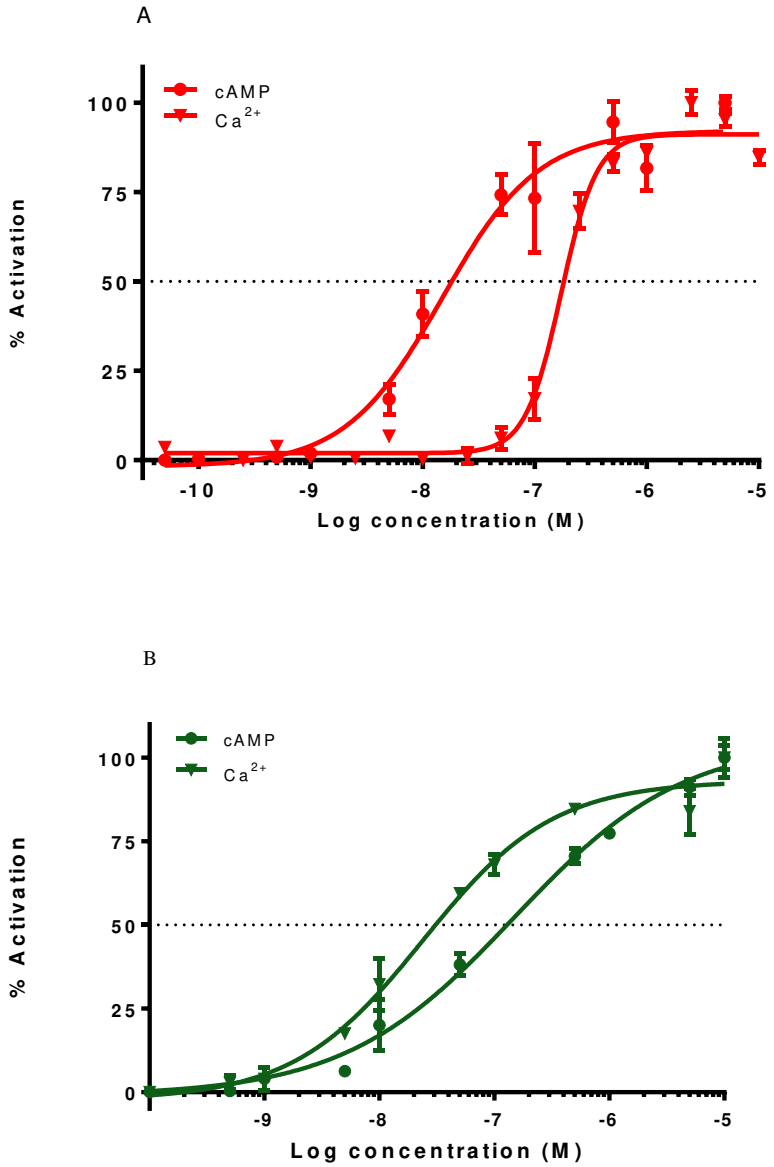


Figure 3: Dose-dependent activity of Cragi-CT2b on Cragi-CTR2 (A) and Cragi-CT1b on Cg-CT-R (B) expressed in HEK293T cells. Data are shown as relative (%) to the highest value (100% activation) for a given peptide and represent the mean of an experiment (n=3) performed in triplicate. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEM).

Gene expression of Cragi-CTR signaling components

The expression of Cragi-CTR2, Cragi-CT1 and Cragi-CT2 genes were investigated by RT-qPCR in several adult tissues (Figure 4). Cragi-CTR2 gene was ubiquitously expressed in adult tissues with a higher expression pattern in VG. Cragi-CT1 and Cragi-CT2 genes were also majorly expressed in VG but also in peripheral tissues like the mantle edges, the mantle, the gills and to lower extent in other adult tissues for Cragi-CT1. Cragi-CT1 was also expressed in the mantle, the mantle edges but also in the digestive gland and the gonads. No expression was detected in the gills.

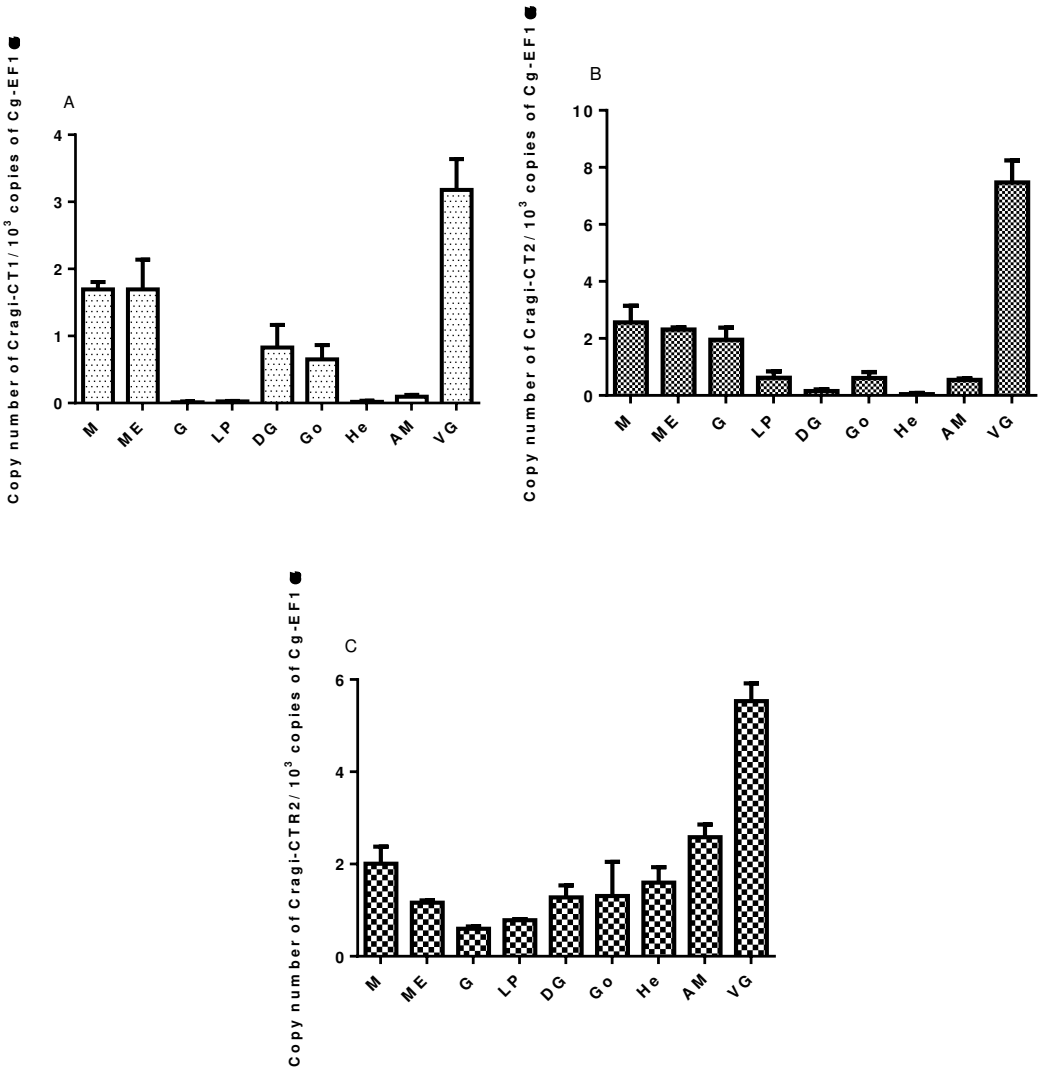


Figure 4: Distribution of mRNAs encoding Cragi-CT1 (A), Cragi-CT2 (B) and Cragi-CTR2 (C) in adult tissues. Each value is the mean + SEM of 5 pools of 6 animals. Expression levels were calculated as the number of copies of each specific transcript per 10^3 copies of elongation factor 1 α (EF1 α) mRNA. Results were statistically tested with a one-way ANOVA $p<0,05$. M: Mantle; ME: Mantle edge; He: Heart; AM: Adductor muscle; G: Gills; Go: Gonad; LP: Labial palps; DG: Digestive gland; Hi: Hindgut; VG: Visceral ganglia.

As Cg-CT-R was formerly found to be downregulated in the mantle edges and the gills of oysters acclimatized to brackish water (Dubos et al. 2003), we assessed the expression of Cragi-CTR2, Cragi-CT1 and Cragi-CT2 genes in oyster transferred to brackish water. Cragi-CTR2 gene expression was not affected by the transfer to brackish water except for a significant increase in the gills of oysters subjected to AC (Figure 5C). Interestingly, Cragi-CT2 gene, encoding the precursor of Cragi-CTR2 specific ligand tended to be also upregulated, though only significantly in VG, and the gills but not in the mantle of oyster acclimatized to MC (Figure 5B). In contrast, Cragi-CT1 gene expression decreased in both VG and in the mantle though significantly in this later tissue (Figure 5A). This decrease paralleled the lower expression of CT1 cognate receptor, Cg-CT-R, in the mantle and the gills following a hypo-osmotic conditioning (Dubos et al. 2003). Except for Cragi-CTR2 in the gills, no response was observed after the AC stress in any tissue tested (Figure 5).

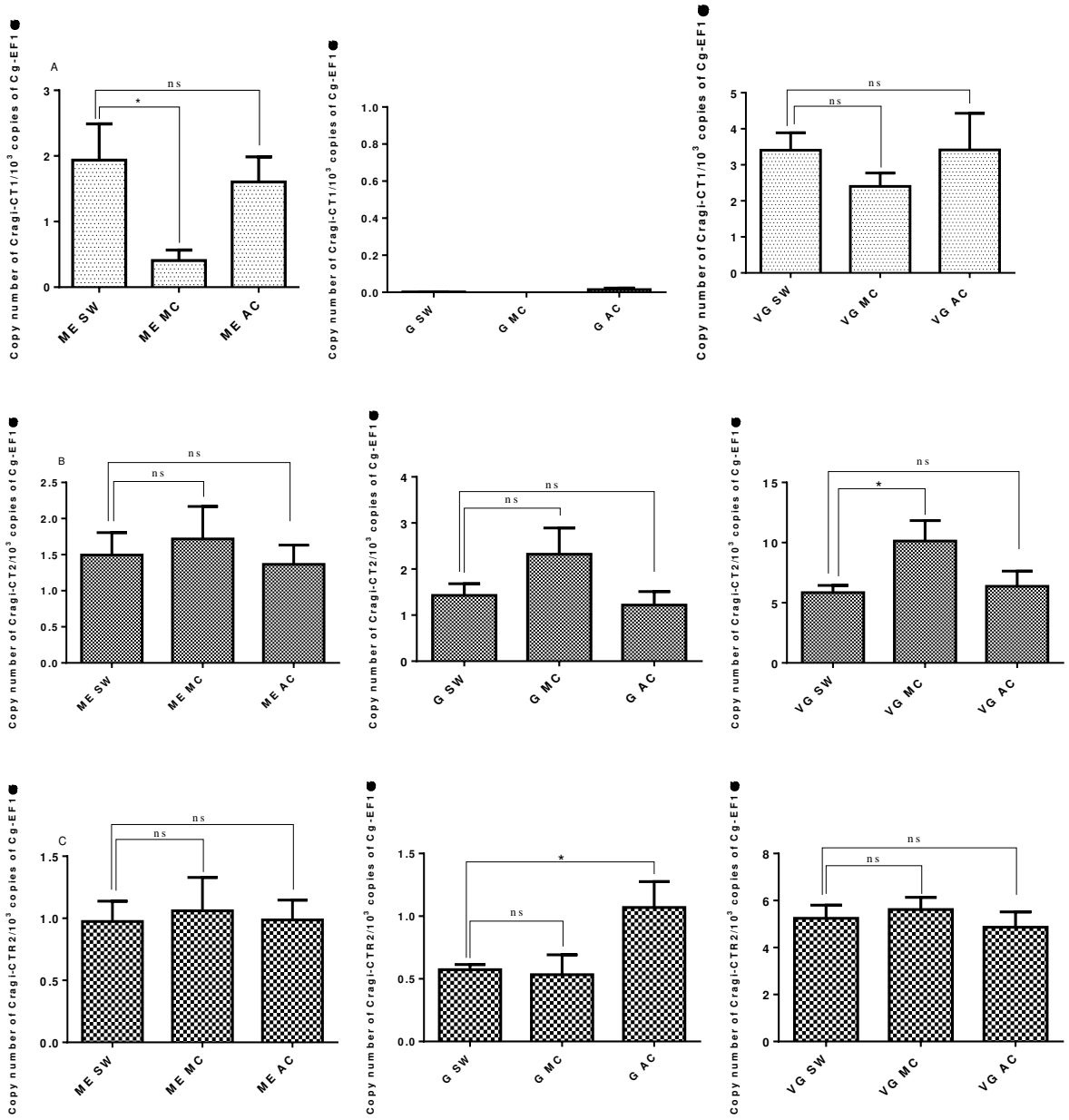


Figure 5: Expression levels of Cragi-CT1 (A), Cragi-CT2 (B) and Cragi-CTR2 (C) mRNAs in ME (first column), G (middle column) and VG (last column), and of oysters conditioned to brackish water. SW: Sea water, AC: Acute osmotic conditioning, MC: Mild osmotic conditioning. Each value is the mean + SEM of 5 pools of 5 animals. Results were statistically tested with a student's t test. Significantly different means of samples from control and conditioned animals are indicated by * ($p<0,05$).

Discussion

This study supplements the few existing data on the CT / DH31 signaling pathways in protostomes. Although CT-type peptides are absent in higher insect subgroups (Veenstra 2014), and DH31-type peptides presumably disappeared in mollusks (Conzelmann et al. 2013), both ecdysozoan and lophotrochozoan lineages comprise the two evolutionarily related peptide forms (Conzelmann et al. 2013; Veenstra 2014; Cai et al. 2018). They are believed to result from the duplication of an ancestral CT-type encoding gene present in the common bilaterian ancestor. This gene generated the diverse vertebrate CT/CGRP family of peptides, and after duplication in an ancestral protostome it gave rise to the genes encoding the CT- and DH31-type peptides that were subsequently lost or retained in some lineages (Cai et al. 2018). Up till now, only DH31 signaling systems have been characterized in protostomes (Johnson et al. 2005a; Zandawala et al. 2013; Bauknecht and Jékely 2015). Using the Pacific oyster as an experimental species, the present report identifies for the first time the existence of a functional protostome CT-type signaling system.

Oyster CT precursors generate two distinct mature CT-type neuropeptides

Mining the oyster transcriptomic database GigaTON led to the identification of two transcripts (Cragi-CT1 and Cragi-CT2) each encoding two peptides (a and b) displaying the characteristics of CT-type neuropeptides. All the Cragi-CT peptides display the N-terminal distinctive cysteine residues, a similar length of around 30 amino acids, and, except for Cragi-CT2a, share the C-terminal proline-amide motif with their counterparts. Cragi-CT2a appeared as a singular evolutionary form deprived of a C-terminal amide. Besides similarities, there were clearly two types of peptides considering the spacing of the cysteine residues: with respect to the cleavage site, the CTa-types displayed the (7xC8/9xC) motif, while the CTb-types displayed the (1xC7xC) motif. The arrangement of the precursors with two mature peptides is probably a recent innovation since deuterostome CT-type peptide precursors all contain a single peptide

(Muff et al. 1995; Sekiguchi et al. 2009) similarly to the annelid *P. dumerilii* CT and DH31 precursors (Conzelmann et al. 2013) and the DH31 and CT-A precursors in arthropods (Coast et al. 2001b; Li et al. 2007; Christie 2008; Gard et al. 2009; Christie et al. 2010; Zandawala et al. 2011; Zandawala 2012; Veenstra 2014; Alexander et al. 2018). In mollusks, this tandem peptide arrangement is observed in Bivalves (Zhang et al. 2018) and also in Gastropods (Supplementary Figure 5) probably resulting from intra-gene duplication. In the cephalopod *Sepia officinalis,* two precursors encoding only one mature peptide (named SP-amide) have been characterized (Zatylny-Gaudin et al. 2016); the same is true for the unique transcript detected in the cephalopod *Octopus bimaculoides* (XP_014768345.1). The two Cragi-CT precursors are encoded by separate genes that show a remarkable conserved organization, with exons encoding similar parts of the mature peptides suggesting that they probably arose through whole gene duplication. Two distinct genes also exist in the genome of the cephalopod *O. bimaculoides*: in addition to (XP_014768345.1), we detected another sequence encoding a mature CT-type peptide in the genome scaffold 69947 (Supplementary Figure 5). Thus, the intra-gene duplication event probably occurred prior to the whole-gene duplication event that generated the two mollusk CT genes in an ancestor of the mollusk lineage, and then the tandem peptide organization was probably lost in an ancestor of cephalopod mollusks.

Oyster CTR/CLR/DH31R-related receptors are specifically activated by oyster CT-type neuropeptides

By screening the GigaTON database (Riviere et al. 2015b), we identified seven receptors, including the formerly characterized oyster receptor Cg-CT-R (Dubos et al. 2003), revealing homologies with CTR/CLR/DH31R from other species. Only three of these receptors, namely Cragi-CTR2, Cragi-CTR3 and Cg-CT-R, were tested for their possible activation by Cragi-CTs. We found that Cragi-CT2b specifically and exclusively activated Cragi-CTR2, and Cragi-CT1b activated Cg-CT-R. None of the Cragi-CTs were effective in the activation of Cragi-CTR3 even

at concentrations as high as 10^{-5}M. Given the homologies between Cragi-CT1b and Cragi-CT2b, one would expect a certain degree of cross-reactivity between the two ligands and the two receptors. Due to the co-existence of four related CT neuropeptides in *C. gigas*, there seems to exist an evolutionary pressure on each receptor so that it can only be activated by its own ligand. A similar situation was observed in insects for the structurally related neuropeptides adipokinetic hormone (AKH), corazonin, and AKH/corazonin-related peptide (ACP), which activate their cognate receptor without cross-reactivity (Belmont et al. 2006; Hansen et al. 2010).

Interestingly, none of the Cragi-CTa-types (7xC8/9xC motif) was found active on the three tested receptors. We assume that among the phylogenetically more distantly related receptors identified in this study lie potential receptors (Cragi-CTR7, Cragi-CTR5, or Cragi-CTR6) able to be activated by Cragi-CT1a whose mature form was detected in oyster VG. Whether Cragi-CT2a represents a biologically active neuropeptide remains speculative since no corresponding molecular form was detected in VG. As CT1a and CT1b represent end products of the same precursor, physiological connections probably exist between their respective signaling systems. Thus it would be interesting to characterize cognate receptors of CT1a. A lack of activation of Cragi-CTR3 by any of the Cragi-CTs can simply mean that there are additional, still uncharacterized, CT or DH31-related neuropeptides expressed in *C. gigas*. The observation that Cragi-CTR3 and also Cragi-CTR6 and Cragi-CTR5 are phylogenetically close to functionally characterized DH31R from annelids and insects somehow further supports the existence of DH31-related peptides in oyster. Another possibility would be that translocation to the membrane and /or activation of Cragi-CTR3 by its cognate ligand require escort proteins such as RAMPs. Currently, no RAMP-like protein has been identified outside the chordate lineage (Sekiguchi et al. 2016b). Since RAMPs from different chordate species show very limited sequence identity, mining the protostome genomes for sequences homologous to vertebrate

RAMPs turned out to be fruitless. However, we cannot rule out the existence of functional though structurally distinct RAMP proteins in protostomes. Surprisingly, *Drosophila melanogaster* DH31R expressed in HEK-293 cells were only activated by Drome-DH31 provided that human RAMPs (1/2) were co-expressed. The signal was even higher and the receptor more sensitive to its ligand in the presence of *D. melanogaster* or human RCP (Johnson et al. 2005a). This clearly points to a parallel with *D. melanogaster* DH31 and CGRP signaling in terms of molecular interactions and implies that the *D. melanogaster* receptor is functionally closer to vertebrate CLR than to CTR. This may evenly apply to Cragi-CTR3 and also to the other Cragi-CTRs uninvestigated so far. However, no accessory protein was required for the DH31 signaling systems of the kissing bug *Rhodnius prolixus* (Zandawala et al. 2013) or of the annelid *P. dumerilii* (Bauknecht and Jékely 2015), or for the Cragi-CTR2 and Cg-CT-R signaling systems in *C. gigas*. Although we characterized the oyster RCP, its co-expression with Cragi-CTR2 or Cg-CT-R did not change the signal induced by the activation of the receptor by their specific ligands, thus reinforcing the hypothesis that Cragi-CTR2 and Cg-CT-R are functionally more closely related to vertebrate CTR than to CLR. RCP was initially associated to its ability to favor the coupling of CLR/RAMP complexes to Gαs, but recent findings suggest the involvement of this protein in alternate signaling pathways including transcriptional regulation (Dickerson 2013). Cragi-CTR2 and Cg-CT-R both activate the adenylyl cyclase and phosphoinositide transduction pathways, though with distinct potencies for Cragi-CTR2 / Cragi-CT2b. This suggests the existence of multiple conformational states for the oyster receptors, with distinct pharmacological and signaling properties. Dual activation was also observed for vertebrate CT (Force et al. 1992), although cAMP signaling represents the most common pathway to mediate the activity of the CT/CGRP/DH31 peptide family (Gorn et al. 1992; Coast et al. 2001b; Iga and Kataoka 2015).

Biological implications of the oyster CT signaling systems.

Both vertebrate CTs and insect DH31s are involved in the ion and water balance (Hirsch et al. 2001; Zandawala 2012). Interestingly, a role in ionic regulation was previously suggested for Cg-CT-R gene given its main expression in the mantle edges and the gills, as well as its decreased expression in brackish-water-acclimated oysters (Dubos et al. 2003). The present study also strongly points to a role of oyster CT signaling in ion or water regulation but with two opposite implications. Cg-CT-R/Cragi-CT1b expression was decreased while Cragi-CTR2/Cragi-CT2b was increased in lower saline concentration modalities. This dual command might be very efficient for the rapid adaptation of oysters to salinity fluctuations in their natural environment. Because the oyster Cg-CT-R/Cragi-CT1b and Cragi-CTR2/Cragi-CT2b genes do not seem to respond to an acute osmotic stress, these signaling systems might not mediate the stress response but more likely participate in the osmotic control, as CGRP does in the eel gill (Lafont et al. 2006) and possibly in *Ciona intestinalis* (Kawada et al. 2010). Whether the oyster CT signaling systems specifically regulate calcium fluxes as their vertebrate counterparts do (Zaidi et al. 2002) remains speculative. The relatively high expression of oyster signaling components in the mantle edges (Dubos et al. 2003), a tissue involved in shell biomineralization (Geraerts 1976), is strongly suggestive of such a role. In contrast to some oyster signaling systems (Bigot et al. 2012; Dubos et al. 2018; Schwartz et al. 2018), we found no involvement of the oyster CT signaling system in feeding regulation. This diverges from the role of DH31 in feeding regulation in arthropods (Nagata and Nagasawa 2017). Apart from a role in the ion or water balance in oyster, its expression in a variety of tissues hints for an implication of CT signaling in a variety of biological functions. In other respects, the expression of Cragi-CTR2 in VG argues for a role in neurotransmission within the oyster central nervous system.

References

Adamson KJ, Wang T, Zhao M, et al (2015) Molecular insights into land snail neuropeptides through transcriptome and comparative gene analysis. BMC Genomics 16:1–15.

Ahn SJ, Martin R, Rao S, Choi MY (2017) Neuropeptides predicted from the transcriptome analysis of the gray garden slug Deroceras reticulatum. Peptides 93:51–65.

Alexander J, Oliphant A, Wilcockson DC, Webster SG (2018) Functional identification and characterization of the diuretic hormone 31 (DH31) Signaling System in the Green Shore Crab, Carcinus maenas. Front Neurosci.

Arlot-Bonnemains Y, Van-Wormhoudt A, Favrel P, et al (1986) Calcitonin-like peptide in the shrimp Palemon serratus (Crustacea, Decapoda) during the intermolt cycle. Experientia 42:419–420.

Bauknecht P, Jékely G (2015) Large-scale combinatorial deorphanization of platynereis neuropeptide GPCRs. Cell Rep 12:684–693.

Belmont M, Cazzamali G, Williamson M, et al (2006) Identification of four evolutionarily related G protein-coupled receptors from the malaria mosquito Anopheles gambiae. Biochem Biophys Res Commun 344:160–165.

Bigot L, Beets I, Dubos MP, et al (2014) Functional characterization of a short neuropeptide F-related receptor in a lophotrochozoan, the mollusk Crassostrea gigas. J Exp Biol 217:2974–82.

Bigot L, Zatylny-Gaudin C, Rodet F, et al (2012) Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster Crassostrea gigas. Peptides 34:303–310.

Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, et al (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature 313:54–56.

Cai W, Kim CH, Go HJ, et al (2018) Biochemical, anatomical, and pharmacological characterization of calcitonin-type neuropeptides in starfish: discovery of an ancient role as muscle relaxants. Front Neurosci 12:382.

Chang CL, Roh J, Hsu SYT (2004) Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: A comparison with other calcitonin/intermedin family peptides in vertebrates. Peptides 25:1633–1642.

Chatenet D, Dubessy C, Boularan C, Scalbert E, et al (2006) Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogs: Identification of a urotensin II antagonist. J Med Chem 49:7234–7238

Christie AE (2008) Neuropeptide discovery in Ixodoidea: An in silico investigation using publicly accessible expressed sequence tags. Gen Comp Endocrinol 157:174–185.

Christie AE, Stevens JS, Bowers MR, et al (2010) Identification of a calcitonin-like diuretic hormone that functions as an intrinsic modulator of the American lobster, Homarus americanus, cardiac neuromuscular system. J Exp Biol 213:118–127.

Coast GM, Webster SG, Schegg KM, et al (2001) The Drosophila melanogaster homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules. J Exp Biol 204:1795–1804.

Conzelmann M, Williams EA, Krug K, et al (2013) The neuropeptide complement of the marine annelid Platynereis dumerilii. BMC Genomics.

Copp HD (1963) Calcitonin: a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. Am Inst Oral Biol 16:872–877.

Dickerson IM (2013) Role of CGRP-receptor component protein (RCP) in CLR/RAMP function. Curr protein pept sci 14:407–415.

Dubos MP, Badariotti F, Rodet F, et al (2003) Molecular and physiological characterization of an invertebrate homologue of a calcitonin-related receptor. Biochem Biophys Res Commun 310:972–978.

Dubos MP, Zels S, Schwartz J, et al (2018) Characterization of a tachykinin signalling system in the bivalve mollusc Crassostrea gigas. Gen Comp Endocrinol 1–9.

Fleury E, Huvet A, Lelong C, et al (2009) Generation and analysis of a 29 , 745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (Crassostrea gigas) assembled into a publicly accessible database : the GigasDatabase. BMC Genomics 15:1–15.

Force T, Bonventre J V, Flannery MR, et al (1992) A cloned porcine renal calcitonin receptor couples to adenylyl cyclase and phospholipase C. Am J Physiol 262:F1110–F1115.

Fritsch HAR, Van Noorden S, Pearse AGE (1979) Localization of somatostatin-, substance P- and calcitonin-like immunoreactivity in the neural ganglion of Ciona intestinalis L. (Ascidiaceae). Cell Tissue Res 202:263–274.

Fritsch HAR, Van Noorden S, Pearse AGE (1980) Calcitonin-like immunochemical staining in the alimentary tract of Ciona intestinalis L. Cell Tissue Res 205:439–444.

Furuya K, Milchak RJ, Schegg KM, et al (2000) Cockroach diuretic hormones: Characterization of a calcitonin-like peptide in insects. Proc Natl Acad Sci 97:6469–6474.

Gard AL, Lenz PH, Shaw JR, Christie AE (2009) Identification of putative peptide paracrines/hormones in the water flea Daphnia pulex (Crustacea; Branchiopoda; Cladocera) using transcriptomics and immunohistochemistry. Gen Comp Endocrinol 160:271–287.

Geraerts WPM (1976) Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail Lymnaea stagnalis. Gen Comp Endocrinol 29:61–71.

Gorn AH, Lin HY, Yamin M, et al (1992) Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. J Clin Invest 90:1726–1735.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 27:221–224.

Hansen KK, Stafflinger E, Schneider M, et al (2010) Discovery of a novel insect neuropeptide signaling system closely related to the insect adipokinetic hormone and corazonin hormonal systems. J Biol Chem 285:10736–10747.

Hirsch PF, Lester GE, Talmage R V (2001) Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? J Musculoskel Neuron Interact 1:299–305.

Iga M, Kataoka H (2015) Identification and characterization of the diuretic hormone 31 receptor in the silkworm Bombyx mori. Biosci Biotechnol Biochem 79:1305–1307.

Jekely G (2013) Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. Proc Natl Acad Sci 110:8702–8707.

Johnson EC (2004) Drosophila CG8422 encodes a functional diuretic hormone receptor. J Exp Biol 207:743–748.

Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, et al (2005) A novel diuretic hormone receptor in Drosophila: evidence for conservation of CGRP signaling. J Exp Biol 208:1239–1246.

Leprince J, Oulyadi H, Vaudry D, Masmoudi O, Gandolfo P, Patte C, et al (2001) Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. Eur J Biochem 268 6045–6057

Katafuchi T, Kikumoto K, Hamano K, et al (2003) Calcitonin receptor-stimulating peptide, a new member of the calcitonin gene-related peptide family: Its isolation from porcine brain, structure, tissue distribution, and biological activity. J Biol Chem 278:12046–12054.

Katafuchi T, Yasue H, Osaki T, Minamino N (2009) Calcitonin receptor-stimulating peptide: Its evolutionary and functional relationship with calcitonin/calcitonin gene-related peptide based on gene structure. Peptides 30:1753–1762.

Kawada T, Sekiguchi T, Sakai T, et al (2010) Neuropeptides, Hormone Peptides, and Their Receptors in Ciona intestinalis: An Update. Zoolog Sci 27:134–153.

Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al (1993) Adrenomedullin: A Novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Biochem Biophys Res Commun 192:553–560.

Lafont AG, Fitzpatrick T, Cliff Rankin J, et al (2006) Possible role of calcitonin gene-related peptide in osmoregulation via the endocrine control of the gill in a teleost, the eel, Anguilla anguilla. Peptides 27:812–819.

Langvad Hansen B, Nergaard Hansen G, Scharrer B (1982) Cell and tissue research immunoreactive material resembling vertebrate neuropeptides in the corpus cardiacum and corpus allatum of the insect Leucophaea maderae.

Li B, Predel R, Neupert S, et al (2007) Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle Tribolium castaneum. Genome Res 18:113–122.

Li S, Hauser F, Skadborg SK, et al (2016) Adipokinetic hormones and their G protein-coupled receptors emerged in Lophotrochozoa. Sci Rep 6:1–13.

Mclatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature 393-339:333–.

Mirabeau O, Joly JS (2013) Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. Proc Natl Acad Sci U S A 110:E2028–37.

Muff R, Born W, Fisher JA (1995) Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. Eur J Endocrinol 133:17–20.

Nagata S, Nagasawa H (2017) Calcitonin-like peptide hormone (CT/DH) in the frontal ganglia as a feeding regulatory peptide of the silkworm, Bombyx mori. Peptides 98:23–28.

Offermanns S, Simon MI (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. J Biol Chem 270:15175–80.

Prado MA, Evans-Bain B, Oliver KR, Dickerson IM (2001) The role of the CGRP-receptor component protein (RCP) in adrenomedullin receptor signal transduction. Peptides 22:1773–1781.

Riviere G, Klopp C, Ibouniyamine N, et al (2015) GigaTON: an extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster Crassostrea gigas. BMC Bioinformatics 16:401.

Russell FA, King R, Smillie S-J, et al (2014) Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 94:1099–1142.

Sawada H, Yamaguchi H, Shimbara T, et al (2006) Central effects of calcitonin receptor-stimulating peptide-1 on energy homeostasis in rats. Endocrinology 147:2043–2050.

Schwartz J, Dubos MP, Pasquier J, et al (2018) Emergence of a cholecystokinin/sulfakinin signalling system in Lophotrochozoa. Sci Rep 8:16424.

Sekiguchi T, Kuwasako K, Ogasawara M, et al (2016) Evidence for conservation of the calcitonin superfamily and activity-regulating mechanisms in the basal chordate: Branchiostoma floridae Insights into the molecular and functional evolution in chordates. J Biol Chem 291:2345–2356.

Sekiguchi T, Suzuki N, Fujiwara N, et al (2009) Calcitonin in a protochordate, Ciona intestinalis - The prototype of the vertebrate calcitonin/calcitonin gene-related peptide superfamily. FEBS J 276:4437–4447.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol.

Stewart MJ, Favrel P, Rotgans BA, et al (2014) Neuropeptides encoded by the genomes of the Akoya pearl oyster Pinctata fucata and Pacific oyster Crassostrea gigas: a bioinformatic and peptidomic survey. BMC Genomics 15:840.

Veenstra JA (2014) The contribution of the genomes of a termite and a locust to our understanding of insect neuropeptides and neurohormones. Front Physiol.

Veenstra JA (2010) Neurohormones and neuropeptides encoded by the genome of Lottia gigantea, with reference to other mollusks and insects. Gen Comp Endocrinol 167:86–103.

Weston C, Winfield I, Harris M, et al (2016) Receptor activity-modifying protein-directed G protein signaling specificity for the calcitonin gene-related peptide family of receptors. J Biol Chem 291:21925–21944.

Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, et al (2002) Forty years of calcitonin - Where are we now? A tribute to the work of Iain Macintyre, FRS. Bone 30:655–663.

Zandawala M (2012) Calcitonin-like diuretic hormones in insects. Insect Biochem Mol Biol 42:816–825.

Zandawala M, Li S, Hauser F, et al (2013) Isolation and functional characterization of calcitonin-like diuretic hormone receptors in Rhodnius prolixus. PLoS One 8:1–12.

Zandawala M, Paluzzi J-P, Orchard I (2011) Isolation and characterization of the cDNA encoding DH31 in the kissing bug, Rhodnius prolixus. Mol Cell Endocrinol 331:79–88.

Zatylny-Gaudin C, Cornet V, Leduc A, et al (2016) Neuropeptidome of the cephalopod sepia officinalis: identification, tissue mapping, and expression pattern of neuropeptides and neurohormones during egg laying. J Proteome Res 15:48–67.

Zhang GG, Fang X, Guo X, et al (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 490:49–54.

Zhang M, Wang Y, Li Y, et al (2018) Identification and Characterization of neuropeptides by transcriptome and proteome analyses in a bivalve mollusc Patinopecten yessoensis. Front Genet. doi: 10.3389/fgene.2018.00197

Acknowledgments. This work was funded by the ANR project "NEMO" (ANR 14CE02 0020). J. Schwartz PhD fellowship was co-financed by the NEMO project and by the European Union within the framework of the operational program FEDER/FSE 2014-2020. We are grateful to Dr Philippe Chan and the proteomic platform "PISSARO", University of Rouen (co-funded by The European Union and Region Normandie through the European Regional Development Fund (ERDF)), for the mass spectrometry analyses and to Dr Jean-Yves Toullec, Sorbonne Université, for his advises in the phylogenetic analysis.

Supplementary data article

"Characterization of an evolutionarily conserved calcitonin signaling system in a lophotrochozoan, the Pacific oyster (Crassostrea gigas)"

Supplementary data

Supplementary table 1: Amino acid sequences of Cragi-CT peptides.

Peptide Name	Sequence
Cragi-CT1a	TFTQREACALSLNVDICTEKYIEETADHQSKLQNLIEGNP-amide
Cragi-CT1b	SCTLNLAYHCQTSEYAGLTDLYNYLNSNASP-amide
Cragi-CT2a	ETQERQIKLCRGMGPNNHPCGLTSFDVRNV
Cragi-CT2b	TCAVELGGACRTEWASAIADQYYYLMGPHGP-amide

Supplementary table 2: Accession numbers and references of the CTR/CLR/DH31R sequences used for the alignment and the phylogenetic analysis
(* indicates functionally characterized receptors)

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
DH31R	*Anopheles gambiae*	XP_318856.3	Ecdysozoa (Arthropoda)	C.B. Beard, D.M. Hamm, F.H. Collins., The mitochondrial genome of the mosquito Anopheles gambiae: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects., Insect Mol. Biol. 2 (1993) 103-124.
CTR/DH31R	*Aplysia californica*	XP_005089839.2	Lophotrochozoa (Mollusca)	No reference
DH31R *	*Bombyx mori*	NP_001127732	Ecdysozoa (Arthropoda)	M. Iga, H. Kataoka, Identification and characterization of the diuretic hormone 31 receptor in the silkworm Bombyx mori., Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 79:8 (2015) 1305-1307.
DH31R	*Bombus terrestris*	XP_003398998.1	Ecdysozoa (Arthropoda)	No reference
CTR	*Capitella teleta*	ELT90748.1	Lophotrochozoa (Annelida)	O. Simakov, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten, D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry., J.L. Boore, I.V Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar., Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature, 493:7433, (2013) 526-531.
CTR	*Capitella teleta*	ELU10120.1	Lophotrochozoa (Annelida)	O. Simakov, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten, D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry., J.L. Boore, I.V Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar., Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature, 493:7433, (2013) 526-531.
CTR/CLR	*Ciona intestinalis*	NP_001265900	Chordata (Urochordata)	No reference
DH31-R *	*Drosophila melanogaster*	NP_725278.1	Ecdysozoa (Arthropoda)	E.C. Johnson, O.T. Shafer, J.S. Trigg, J. Park, D.A. Schooley, J.A. Dow, P.H. Taghert, A novel diuretic hormone receptor in Drosophila: evidence for conservation of CGRP signaling., J. Exp. Biol. 208 (2005) 1239-1246.

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
CTR	*Gallus gallus*	XP_425985	Chordata (Vertebrata)	L.W. Hillier, W. Miller, E. Birney, W. Warren, R.C. Hardison, C.P. Ponting, P. Bork, D.W. Burt, M.A.M. Groenen , M.E. Delany, J.B. Dodgson, A.T. Chinwalla, P.F. Cliften, S.W. Clifton, K.D. Delehaunty, C. Fronick, R.S. Fulton, T.A. Graves, R.K. Wilson, International Chicken Genome Sequencing Consortium, Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution., Nature, 432 (2004), 695-716.
CLR *	*Gallus gallus*	NP_001157122	Chordata (Vertebrata)	F. Meng, X. He, Y. Wang, J. Li, Molecular Cloning and Functional Characterization of Chicken Calcitonin Receptor-like Receptor., (2008).
CTR*	*Homo sapiens*	NP_001158209	Chordata (Vertebrata)	A.H. Gorn, H.Y. Lin, M. Yamin, P.E. Auron, M.R. Flannery, D.R. Tapp, C.A. Manning, H.F. Lodish, S.M. Krane, S.R. Goldring, Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line., J. Clin. Invest., 90 (1992), 1726-1735.
CLR*	*Homo sapiens*	NP_005786	Chordata (Vertebrata)	N. Aiyar, J. Disa, M. Pullen, P. Nambi, Receptor activity modifying proteins interaction with human and porcine calcitonin receptor-like receptor (CRLR) in HEK-293 cells., Mol Cell Biochem., 224:1-2 (2001), 123-133.
CTR	*Lottia gigantea*	XP_009061311.1	Lophotrochozoa (Mollusca)	O. Simakov, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten, D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry., J.L. Boore, I.V Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar., Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature, 493:7433, (2013) 526-531.
CTR	*Mizuhopecten yessoensis*	XP_021341867.1	Lophotrochozoa (Mollusca)	No reference
CTR	*Mizuhopecten yessoensis*	XP_021370243.1	Lophotrochozoa (Mollusca)	No reference
CTR	*Mizuhopecten yessoensis*	OWF47717.1	Lophotrochozoa (Mollusca)	S. Wang, J. Zhang, W. Jiao, J. Li, X. Xun, Y. Sun, X. Guo, P. Huan, B. Dong, L. Zhang, X. Hu, X. Sun, J. Wang, C. Zhao, Y. Wang, D. Wang, X. Huang, R. Wang, J. Lv, Y. Li, Z. Zhang, B. Liu, W. Lu, Y. Hui, J. Liang, Z. Zhou, R. Hou, X. Li, Y. Liu, H. Li, X. Ning, Y Lin, L. Zhao, Q. Xing, J. Dou, Y. Li, J. Mao, H. Guo, H. Dou, T. Li, C. Mu, W. Jiang, Q. Fu, X. Fu, Y. Miao, J. Liu, Q. Yu, R. Li, H. Liao, X. Li, Y. Kong, Z. Jiang, D. Chourrout, R. Li, Z. Bao, Scallop genome provides insights into evolution of bilaterian karyotype and development., Nat. Ecol. Evol., 1(2017),0120.
CTR	*Mizuhopecten yessoensis*	XP_021375252.1	Lophotrochozoa (Mollusca)	No reference

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
CTR	*Octopus bimaculoides*	XP_014778002.1	Lophotrochozoa (Mollusca)	No reference
DH31R1 *	*Platynereis dumerilii*	KP293952	Lophotrochozoa (Annelida)	P. Bauknecht, G. Jékely, Large-scale combinatorial deorphanization of platynereis neuropeptide GPCRs., Cell Reports, 12:4 (2015), 684-693.
DH31R2 *	*Platynereis dumerilii*	KP294016	Lophotrochozoa (Annelida)	P. Bauknecht, G. Jékely, Large-scale combinatorial deorphanization of platynereis neuropeptide GPCRs., Cell Reports, 12:4 (2015), 684-693.
DH31R1-B*	*Rhodnius prolixus*	AHB86317.1	Ecdysozoa (Arthropoda)	M. Zandawala, S. Li, F. Hauser, C.J. Grimmelikhuijzen, I. Orchard, Isolation and Functional characterization of Calcitonin-Like Diuretic Hormone receptors in Rhodnius prolixus., PLoS ONE, 8:11 (2013), E82466.
DH31R2-B*	*Rhodnius prolixus*	AHB86571.1	Ecdysozoa (Arthropoda)	M. Zandawala, S. Li, F. Hauser, C.J. Grimmelikhuijzen, I. Orchard, Isolation and Functional characterization of Calcitonin-Like Diuretic Hormone receptors in Rhodnius prolixus., PLoS ONE, 8:11 (2013), E82466.
CTR	*Sus scrofa*	NP_999519	Chordata (Vertebrata)	H.Y. Lin, T.L. Harris, M.S. Flannery, A. Aruffo, E.H. Kaji, A. Gorn, L.F. Kolakowski, H.F. Lodish, S.R. Goldring, Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor., Science, 254 (1991), 1022-1024.
CLR*	*Sus scrofa*	NP_999260	Chordata (Vertebrata)	B.R. Rorabaugh , M.A. Scofield , D.D. Smith , W.B. Jeffries, P.W. Abel, Functional calcitonin gene-related peptide subtype 2 receptors in porcine coronary arteries are identified as calcitonin gene-related peptide subtype 1 receptors by radioligand binding and reverse transcription-polymerase chain reaction., J. Pharmacol. Exp. Ther, 299 (2001) ,1086-1094.
CTRA	*Zootermopsis nevadensis*	KDR16222	Ecdysozoa (Arthropoda)	J. Veenstra, The contribution of the genomes of a termite and a locust to our understanding of insect neuropeptides and neurohormones., Frontiers in Physiology. 23 (2014).
CTRB	*Zootermopsis nevadensis*	KDR15977	Ecdysozoa (Arthropoda)	J. Veenstra, The contribution of the genomes of a termite and a locust to our understanding of insect neuropeptides and neurohormones., Frontiers in Physiology. 23 (2014).
DH31R	*Zootermopsis nevadensis*	KDR16174	Ecdysozoa (Arthropoda)	J. Veenstra, The contribution of the genomes of a termite and a locust to our understanding of insect neuropeptides and neurohormones., Frontiers in Physiology. 23 (2014).

Abbreviation	Species name	Accession number	Phylum	Reference
DH31R-like	*Zootermopsis nevadensis*	KDR11499	Ecdysozoa (Arthropoda)	J. Veenstra, The contribution of the genomes of a termite and a locust to our understanding of insect neuropeptides and neurohormones., Frontiers in Physiology. 23 (2014).

Supplementary table 3: Accession numbers and sequences of *Crassostrea gigas* CTR used for the alignment and the phylogenetic analysis
(* indicates functionally characterized receptors)

Name	Accession number	Sequence
Cg-CT-R *	AJ551182	MYWIAVLTLTPMIVSYTWADLDIYRGKLCRSHLGYHENVQDFRQYSCAWCFRFVFHLKYRPLVNS TGPTPVVYIFHNGGRVRFESMDFRNQSVKADVCDVLTSDECHQWTSCCESAERCCQRQLSVEKKGT NSSCGRVWDGWLCWDDAEPGTRSYGSCPLFMPFFTPSRQAFRTCQTNGEWITRTDYNPCIKKEELE TTLFIGLGCSIASLVALVPALLIFLKYRSLRKQHRIRLHINLFLSFLLKEVMDILWDMLVTYDKVTSTT VFETTLMQNGVGCKLLSFLKIYFKCCTYTWMFCEGFYLHRLMSNAFSPPRSLKVMYVFGWAAPLLS STLYGILRGVLNNESCWTFSYERLEWIFDAPNVLFLFLNLVFLSNILRILLTQMQTHPNEPGNFRRAV KATFILIPLFGIHRFFTLYRIPISQEGGHEYEKVSVIISHTQGLFVSMIFCFLNGEVISNIKRSIRHGRSRSL STSKRLNQTDQQTLSIRSEYDVGKNGDQCYKSLIVPTEGKDEMELKEKSTNGSLLHNGPHGET
Cragi-CTR2 *	GigaTON CHOYP_CALCR.4.6	MSCRYQHMSYDVPLFKVLTCSFCYVYMFKPEATQLRFDFTRAGPVLKAGPEGNFKYSYPPGSVYRA DLDNSSMVTQICEPLSENECEKWTTCCQTATKCCLRQQNLPTASQNWSHCPRTWDGFGCFDDTSAG STAYISCPSYVEHASDQETAYKVCWPNGTWYVHPHTGKQWSNYSTCVHGKVKDQMVLIYLGLGC NLISLSLLIPSCAIFLAFRQLRIQQRVRLHICFFSSFIASAIIAILWDFIVVSDRMNSPGDESAVQQNTGG CKFLYVLKRYTQSATYFWMFCEGFYLHRLIVRAFEIPKSLIIYYFIGIGGPWISTIVYAIIKASVSEYDR KCWVNNINGFEWLIYTPNLLCLFANVFFLGNILYILLTQLQSHPNEPSGYRRAIKATFVLIPLFGIQWG PVIYRPANTMWYEVLRIVIQHTQGAFVSLIFCIFNGEVHGHLKNCFSRISGRPLYRPRRELSTTSGTVY TQVRTSTAVDFN
Cragi-CTR3	GigaTON CHOYP_CALCR.1.6	MMDNFSLFENRIYRQYHAWSKMLCMKSVMSKPAPNDGKLYCSPRHDHFMGCWNYTEAGTRAFLP CPDIPGFAPDHSAYFDCLRNGSWYVHPTTGKEYSNYLGCRNFQNVLTDIGKNFAHVYVSVVGFCVS LIFLICSLVIFFKFRQLRCDRITVHKNLFVSYIITAFCFVIYLSVVSFGDGVLMENPVWCQVLHVITQYA VVSNFSWMFCEGLCLHTLMMHTFISGNSLIIVCLIIGWCVPLVLTGIYAGLRATLTDNTKFCWLSESS LQWIMFAPVVFSMLINIIFVINIMRLLVTKLRQMPEAAQTRKAVRATGILIPLLGLQFLVFIKRPNDKD STLYDVYTYAVAIVVSLQGSFVSVIYCFCNHEVVTLLKRRWHQHRAMFRGKHARTQSSTNSSTTYT FIDFVSNQPCLDKTSRC

Name	Accession number	Sequence
Cragi-CTR4	GigaTON CHOYP_CALCR.6.6	MEFMTENEYIRQYFAMLEAECKARVLSQHAPADGKSYCAPKLDHWMGCWNYTEAGTRATEPCPPI PGFDYLQNATFDCRENGTWYVNPATGREYADYSACFNFENAIKEMDKDVIHIYVTIALFCLSFVMIS ISLVIFFKFRQLRCDRITIHKNLFISYLLTDLFYLVYLSVIHFAEDVVLHNPDWCQFLHVITQYAIVCNF AWMFCEGLYLHTVMMSAFTSGKSVIIACLIIGWGVPVPLTIIYGAVRASLKDNIIACWSSESSFLWIM YAPVVLSMAINVVFVVNIMRLLITKLRQIPEVAQTSFISIHRKAVRATAILIPLLGLQFLIFIKRPEDKDS TLSTIYQYVLAIFVPLQGAFVSIMYCFCNGEVLSLLKRKWNQHNAMLPGKRKRAQSTSATQYTIVDP MSQVQTSVT
Cragi-CTR5	GigaTON CHOYP_CALCR.2.6	MTWLLFNHLVTLEVALDSPIWCILLWILKEYFNICNYSWLFVEGFYLHSIIVLTFTNQKKLLLVSLCIG WVLPMFPISIYAIMNAETQDHVGRLNCWAGDVRHNKLLWIIHGTCIASLCVNFIILLNVMRIIVVKIR AVNCGETTQLKKTLRACLILVPLLGVQKVLFPYRQNHIAYRIIVAIVNSYQGACVALLLCYCNREVIK CFKKKISQMKYMNDGRRSSLITIGTSISGFLRRGSRQVNVYTRRTSMSRDRKTSEQMTENGTQTQKE VGQPLLTKSEKRDSQKGESENLFSGAEEHSMTTFTGVRRESIRSSDSNKTRCNLPIISEV
Cragi-CTR6	GigaTON CHOYP_CALRL.2.3	MEECNFLPYPTDGELYCNATFDVQCWNFTLAGTTARGACPENHEFSIFFDDPEGYSYRKCKTNGQW GRPNYRPCVSPDSIKGYKSDSTHLPRITYIYISGYALSILLLVIALIIFGKFRQLWCKRVFIHSNLFSAYI LNGFAWIAVYTIPTVYTRLSNALPYVGLYTLSCCYGWMLAEGIFLHFCLANAFSNKKTLVIVCCIVG WVCPAISTGTYAVLMEEEGSIIKYWPKNMDYLWIILVPIILSQLLNIIFLINIIRILRSQVQREDNRNLLR YRKIVRAILILIPLLGLQILTKAVTIDSVYFRYFAAVISSYQGAVVPVLFCFLNREVLRAMDNKITTWR RLSASLSRGSDKFSIMFNIRRSSSNQNPSAEKLEPDPLL
Cragi-CTR7	GigaTON CHOYP_CALCR.3.6	MLHLTICLTHLELYNIVTSLFCYRLLLPHLSEQSKVYWETEITKNRTLKATDENQLFPSGFSFVPDVN NRTSVDIACNGLTENDCKRWVKCSKMATKCCEDYISSNASFEEPVANCPSIWDGMSCINSIPNGTVV SLDCPSYYIPSFQPANFTKTCLPNGVWENSHLDIDGSHVLYNYSSCMAANKQKRVEGTEEFRIQTMV TLVTNVISLAFLLPSFFIMTVALSSVFRYSGPLEAGYKRMFRTRLHFLSSLILVSIVTLSWDWVVGREH VYNLNREESLINRNSPICKVLISLQKYLRSATYFWMFLEGLNILIPQLHSSQIDSKVRMVWFYFIGWGI PLVTISIYVILRSTIEKYDFKCWIYNFLEIEWIVVVPNYLTVLCNVVFLIVVMVEVIRKSRAMKKASTY IPTSLRTLFFLIPLFGVNFIVPWISYAADNLLIPFIVNQVVEGLQGVFVCILWVLCKHEVQQNVKLAIR RKFPLLFERFHARKFSTTSSTHLTQAIHPMSVTPIVLDNAKVSGHLRTVLEVPEMERLSPDPEVNQIST DPA

Supplementary table 4: Accession numbers and references of the CT/DH31 sequences used for alignments

Name/Species	Accession number	Reference	Sequence
CT *Homo sapiens*	NP_001029124.1	R. Neher, B. Riniker, W. Rittek, H. Zuber, Huma, calcitonin. Structure of calcitonin M and D., Helv. Chim. Acta, 51 (1968), 1900-1905.	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPamide
CGRP *Homo sapiens*	NP_001029125.1	H.R. Morris, M. Panico, T. Etienne, J. Tippins, S.I. Girgis, I. McIntyre., Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. Nature, 308 (1984), 746-748.	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKAFamide
DH31 *Tribolium castaneum*	GLEAN_02243	L. Bin, R. Predel, S. Neupert, F. Hauser, Y. Tanaka, G. Cazzamali, M. Williamson, Y. Arakane, P. Verleyen, L. Scoofs, J. Schachtner, C.J.P. Grimmelikhuijzen, Y. Park, Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle Tribolium castaneum., Genome research, 12:1 (2007),113-122.	GLDLGLSRGFSGSQAAKHLMGLAAANYAGGPamide
DH31 *Bombyx mori*	NP_001124379.1	L. Roller, N. Yamanaka, K. Watanabe, I. Daubnerova, D. Zitnan, H. Kataoka, Y. Tanaka, The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm Bombyx mori., Insect Biochem. Mol. Biol., 38 (2008), 1147-1157.	AFDLGLGRGYSGALQAKHLMGLAAANFAGGPamide
DH31 *Zootermopsis nevadensis*	KDR23368	J. Veenstra, The contribution of the genomes of a termite and a locust to our understanding of insect neuropeptides and neurohormones., Frontiers in Physiology, 5 (2014).	GLDLGLSRGFSGSQAAKHLMGLAAANYAGGPamide
DH31 *Drosophila melanogaster*	NP_523514.1	G.M. Coast, S.G. Webster, K.M. Schegg, S.S. Tobe, D.A. Schooley, The Drosophila melanogaster homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules., 204 (2001), 1795-1804.	TVDFGLARGYSGTQEAKHRMGLAAANFAGGPamide

Name/Species	Accession number	Reference	Sequence
CT *Platynereis dumerilii*	No accession number	M. Conzelmann, E.A. Williams, K. Krug, M. Franz-Watchel, B. Macek, G. Jékély, The neuropeptide complement of the marine annelid Platynereis dumerilii., BMC Genomics, 14:906 (2013).	TCQVNLGGHCATESAASVADQWHYLNSPLSPamide
DH31 *Platynereis dumerilii*	No accession number	M. Conzelmann, E.A. Williams, K. Krug, M. Franz-Watchel, B. Macek, G. Jékély, The neuropeptide complement of the marine annelid Platynereis dumerilii., BMC Genomics, 14:906 (2013).	RIDAGYGSRYAAGASVGSKLRALKQAADWNGPamide
CT *Octopus bimaculoides*	XP_014768345.1	No reference	GCDSKIGGLGGQCPTYHTSLDLDRWRYLDSSQSPamide
CT *Octopus bimaculoides*	LGKD01399119.1 Scaffold60947_contig_15	No reference	GCTTNFEHLCSAQEAAELAELLRFLQSGEGPamide
SPamide1 *Sepia officinalis*	XP_009043607	C. Zatylny-Gaudin, V. Cornet, A. Leduc, B. Zanuttini, E. Corre, G. Le Corguillé, B. Bernay, J. Garderes, A. Kraut, Y. Couté, J. Henry., Neuropeptidome of the Cephalopod Sepia officinalis: identification, tissue mapping, and expression pattern of neuropeptides and neurohormones during egg laying., Journal of Proteome Research, 15:1 (2016), 48-67.	TCQIEATGECRSEEAAEVADKYHYLLSSKSPamide
SPamide2 *Sepia officinalis*	XP_009062318	C. Zatylny-Gaudin, V. Cornet, A. Leduc, B. Zanuttini, E. Corre, G. Le Corguillé, B. Bernay, J. Garderes, A. Kraut, Y. Couté, J. Henry., Neuropeptidome of the Cephalopod Sepia officinalis: identification, tissue mapping, and expression pattern of neuropeptides and neurohormones during egg laying., Journal of Proteome Research, 15:1 (2016), 48-67.	SAWSDPCRLNLGGRCATEIASDLVKAWHYLNSSNSPamide

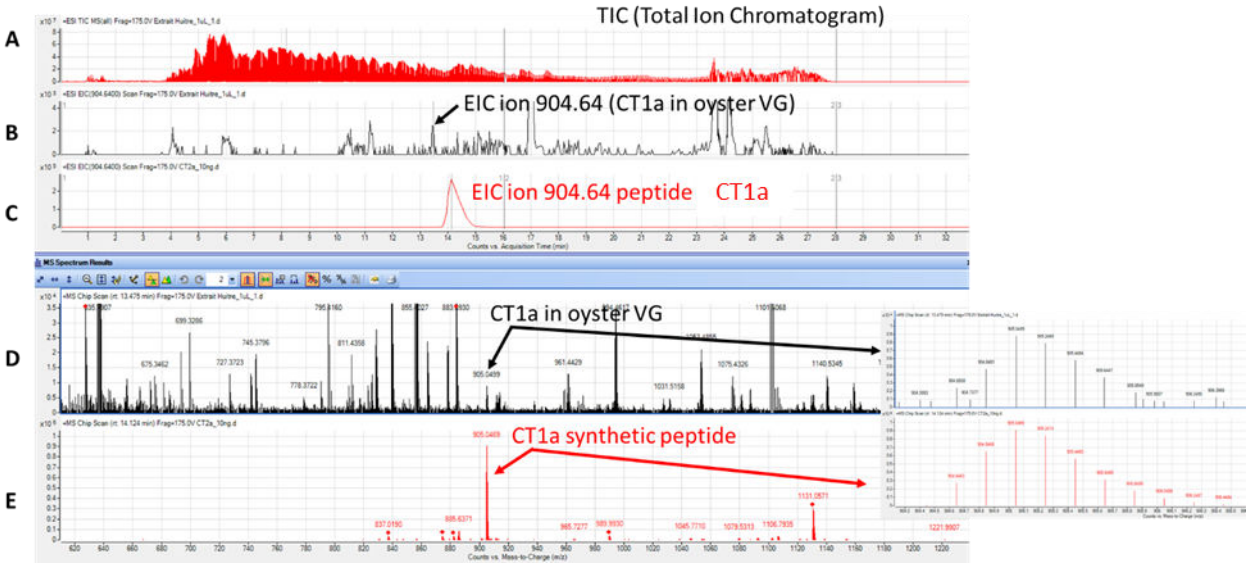
Name/Species	Accession number	Reference	Sequence
CT *Lottia gigantea*	XP_009043607.1	O. Simakov, F. Marletaz, S.J. Cho, E. Edsinger-Gonzales, P. Havlak, U. Hellsten, D.H. Kuo, T. Larsson, J. Lv, D. Arendt, R. Savage, K. Osoegawa, P. de Jong, J. Grimwood, J.A. Chapman, H. Shapiro, A. Aerts, R.P. Otillar, A.Y. Terry., J.L. Boore, I.V Grigoriev, D.R. Lindberg, E.C. Seaver, D.A. Weisblat, N.H. Putnam, D.S. Rokhsar., Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. Nature, 493:7433 (2013), 526-531.	MISTTPLYVTVSICLFYLTTTVYCRTDFRFLM TCAFGINSHQCTLTSLNNKMMSQAWLSDGMSPamide SCSLRLGGMCLTENLNAAANQYEYLSSGLSPamide
CT1 *Aplysia californica*	XP_012942527.1	No reference	ALYECLDIRSDLCEAIKIEAGLKDMGSLGPYWMAamide SCTLNLGFHCQTEEISNFADMYDFLSSPLSPamide
CT2 *Aplysia californica*	XM_013087865.1	No reference	ECRFITCVFWDRIDRRNSGVTEDVISEDYEGPQGSVLRNLQEQ TCRLRLGGHCLTEELDKAAKQYAYLKSGKSPamide
CT1 *Patinopecten yessoensis*	XP_021340701.1	M. Zhang, Y. Whang, Y. Li, W. Li, R. Li, X. Xie, S. Wang, X. Hu, L. Zhang, Z. Bao, Identification and characterization of neuropeptides by transcriptome and proteome analyses in a bivalve mollusc Patinopecten yessoensis., Fontiers in Genetics, 9:917 (2018).	TCNIGVNSHFCALADLDSKIRSREWLNSIYSPamide TCAVEVGGTCRTEWASSIADQYYYLLGPHSPamide
CT2 *Patinopecten yessoensis*	XP_021360924.1	M. Zhang, Y. Whang, Y. Li, W. Li, R. Li, X. Xie, S. Wang, X. Hu, L. Zhang, Z. Bao, Identification and characterization of neuropeptides by transcriptome and proteome analyses in a bivalve mollusc Patinopecten yessoensis., Fontiers in Genetics, 9:917 (2018).	FLNDEAPSCLVSATDCSMGYIDPIEGFIDVVSNPNSPamide SCKLNLGFHCQTEEYSAIADMYNFLQSAMSPamide
CT *Mytilus californianus*	ES407016.1	A. Gracey, J. Grimwood, J. Schmutz, R.M. Myers, Expressed sequence tags from Mytilus californianus (unpublished).	LSDVIEEECTWGGGMSDEMCSTVDIDEIQRSFQVIHDRNSPamide SCQLNLGFHCQTQEYSAIADMFNFLGSGRSPamide

Supplementary table 5: Sequence of the primers used for cloning experiments and RT-qPCR.

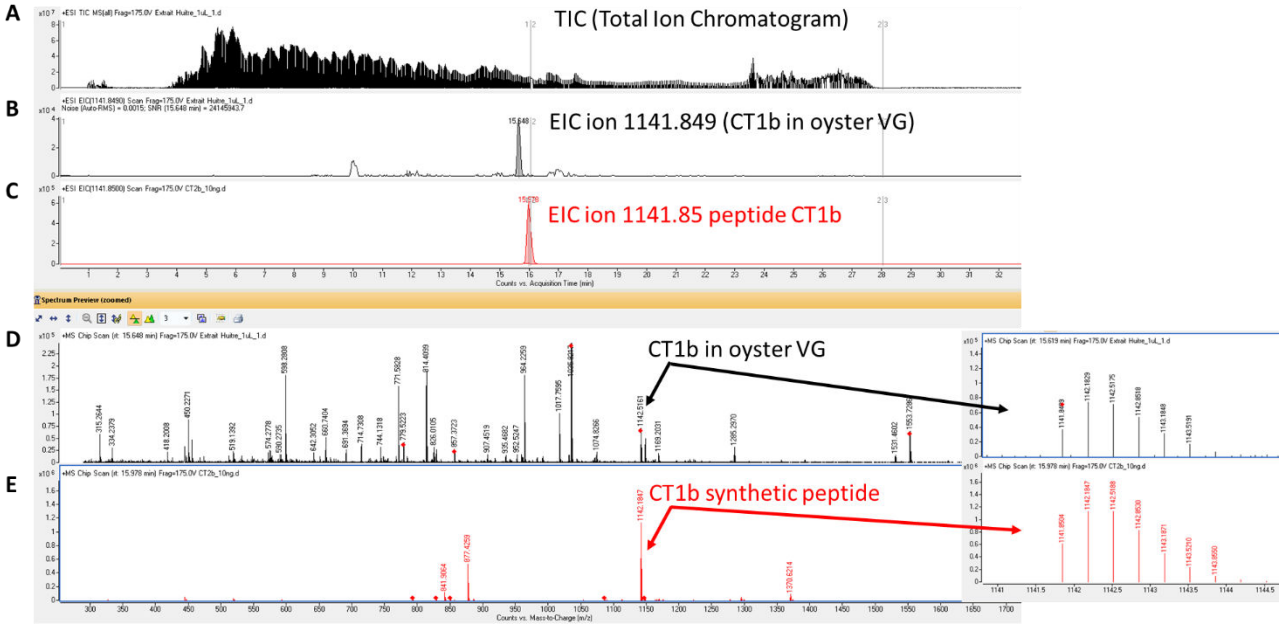
Specific primer	Sequence (5' to 3')	Primer information
RACE1s-Cragi-CTR2	GCAAGCGATCAAGAGACGGCC	RACE
RACE1as-Cragi-CTR2	TGGGTGTAGCGCTTCAGGACG	RACE
Nested-RACE2s-Cragi-CTR2	TGTCCACGGCAAGGTCAAGGA	Nested-RACE
Nested-RACE2as-Cragi-CTR2	ACAGAAACTTGCACCCTCCCGT	Nested-RACE
Pal 17dir	CCAGGGTTTTCCCAGTCACGA	RACE
Pal 17rev	CAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATA	RACE
Pal 17dirnested	AATTGGGCCCGACGTCGCATGCT	Nested-RACE
Pal 17revnested	CACAGGAAACAGCTATGACCA	Nested-RACE
s-Cg-CT-R	**CACCATGT**ATTGGATAGCCGTTCT	CDS fragment
as-Cg-CT-R	CTACGTTTCTCCATGAGGACCG	CDS fragment
s-Cragi-CTR2	**CACCATGA**GTTGTCGCTATCAACACATGAG	CDS fragment
as-Cragi-CTR2	GTCACCAGTACAGTCAAATATTCACTTCA	CDS fragment
s-Cragi-CTR3	**CACCATGA**TGGACAACTTTTCGTTGTTTGAAAATCG	CDS fragment
as-Cragi-CTR3	TTAACAACGGCTGGTTTTGTCGAGA	CDS fragment
s-Cragi-RCP	**CACCATGG**AAGTAGTCAATGAGAACTC	CDS fragment
as-Cragi-RCP	TCAATCATTGCTGGAATCCATTTCTG	CDS fragment
Qs-Cragi-CTR2	CACGGGAGGGTGCAAGTT	qPCR
Qas-Cragi-CTR2	GGGATCTCAAACGCTCGGA	qPCR
Qs-Cragi-CT1	GCCAAACCTCCGAGTATGCA	qPCR
Qas-Cragi-CT1	GATCATCTCCTCTTGCCGGG	qPCR
Qs-Cragi-CT2	CGCCACAGACACGAGACA	qPCR
Qas-Cragi-CT2	GGATGGTTGTTGGGTCCCA	qPCR
Qs-*Cg*-EF	5′-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3′	qPCR Elongation Factor 1 α
Qa-*Cg*-EF	5′-ACGACGATCGCATTTCTCTT-3′	qPCR Elongation Factor 1 α

CDS: Coding DNA Sequences. s: sense primer. as: antisense primer**.** Nucleotides of the Kozak consensus sequence are in bold.

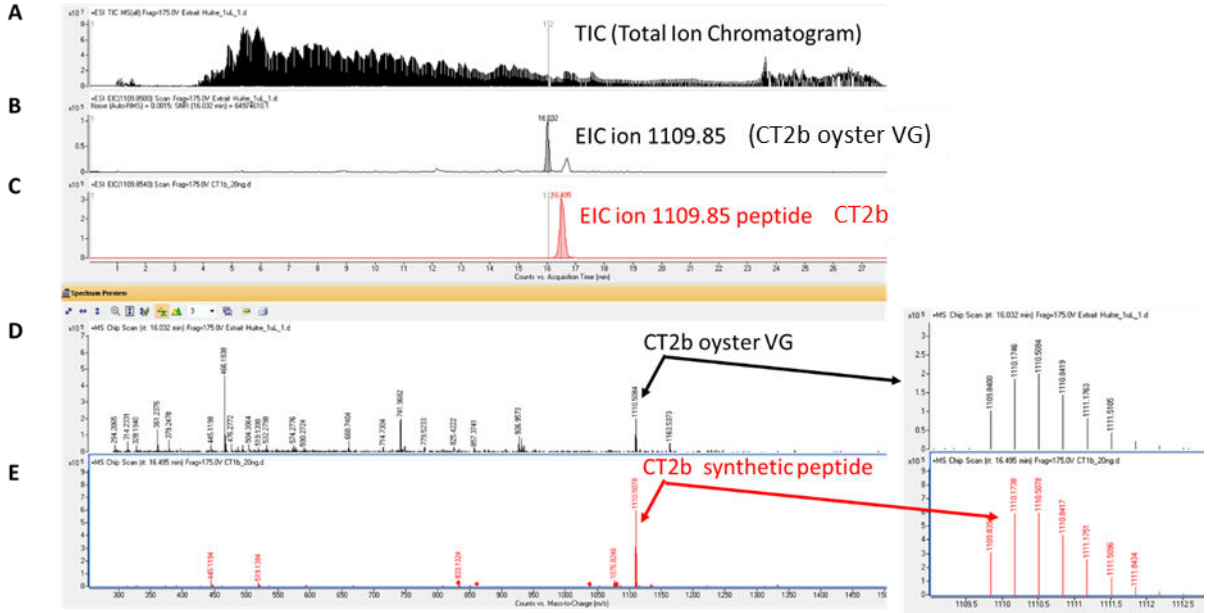
I


A
B
C
D
E
TIC (Total Ion Chromatogram)
EIC ion 904.64 (CT1a in oyster VG)
EIC ion 904.64 peptide CT1a
CT1a in oyster VG
CT1a synthetic peptide

II

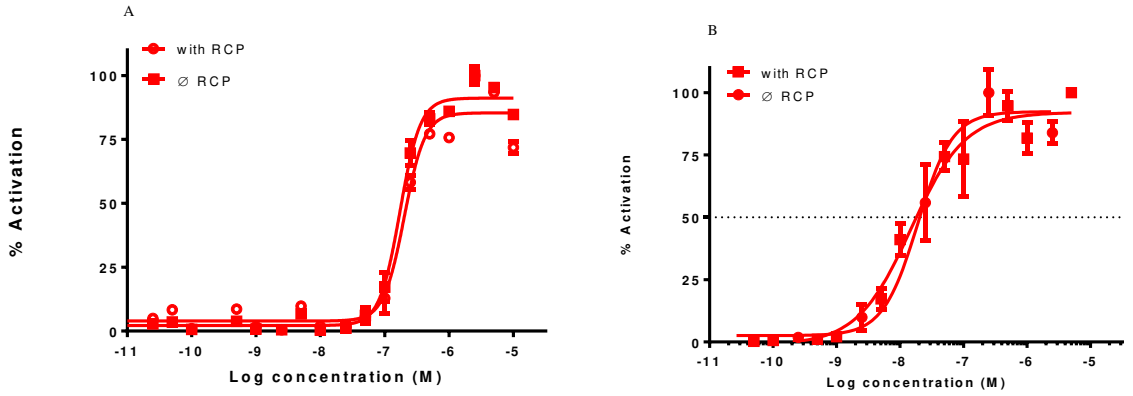

A
B
C
D
E
TIC (Total Ion Chromatogram)
EIC ion 1141.849 (CT1b in oyster VG)
EIC ion 1141.85 peptide CT1b
CT1b in oyster VG
CT1b synthetic peptide

III



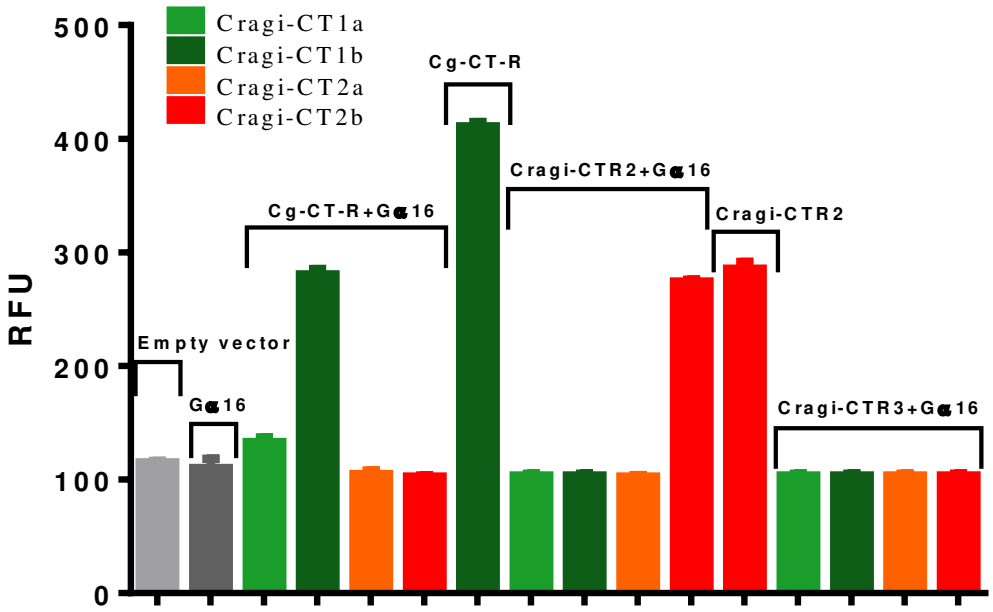
Supplementary Figure 1:

Characterization of I) Cragi-CT1a, II) Cragi-CT1b and III) Cragi-CT2b mature peptides by mass spectrometry: A: Total ion chromatogram, B-C: Extracted-ion chromatograms of Cragi-CTs in oyster VG extracts (B, black) and synthetic replicates (C, red), D: MS scan of oyster extract, E: MS scan of synthetic replicates. Inset: high magnification view.



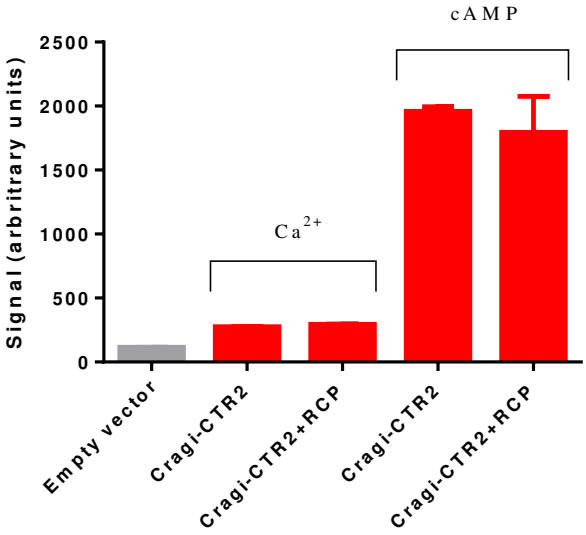
Supplementary Figure 2:

Dose-dependent activity of Cragi-CT2b on Cragi-CTR2 with or without co-expression of Cragi-RCP in HEK293T cells. A) Ca^{2+} B) cAMP.



Supplementary Figure 3:

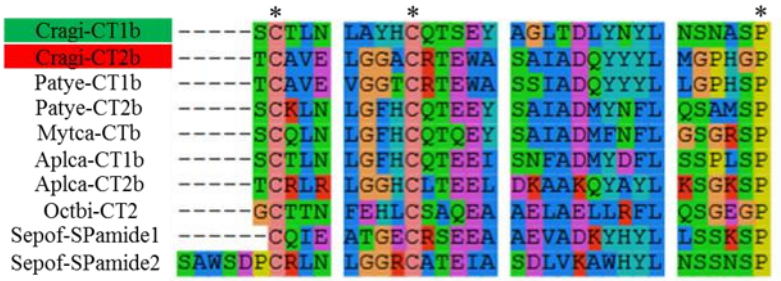
Fluorescent signal induced by Cg-CT-R, Cragi-CTR2 and Cragi-CTR3 expressed in HEK293T cells and challenged by Cragi-CT1s and Cragi-CT2s at the concentration of 10^{-5}M in absence (Cg-CT-R / Cragi-CTR2) or presence (Cg-CT-R + Gα16 / Cragi-CTR2 + Gα16 / Cragi-CTR3+ Gα16) of the promiscuous protein Gα16. Gα16 expressed alone or cells transfected with an empty vector were used as negative controls. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEM), number of replicates n=3.



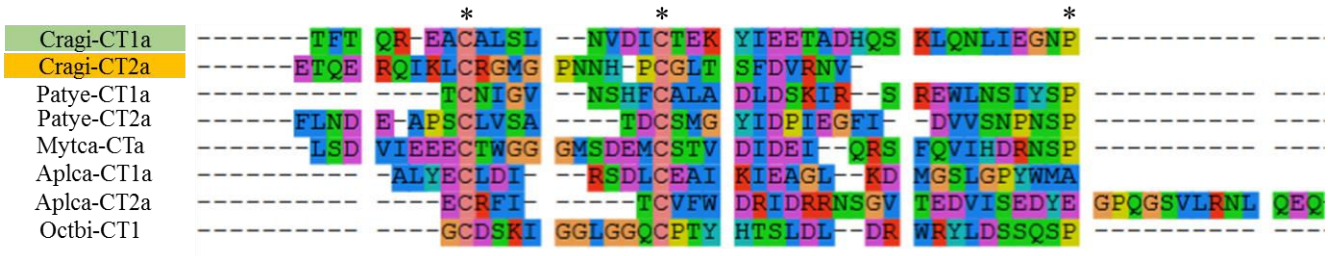
Supplementary Figure 4:

Intensity signal (fluorescence: Ca^{2+}, luminescence: cAMP) induced by Cragi-CTR2 expressed in HEK293T cells and challenged by Cragi-CT2b at the concentration of 10^{-5}M in absence or presence of RCP. Cells transfected with an empty vector were used as negative controls. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEM), number of replicates n=3.

A



B



Supplementary Figure 5:

Sequence alignment of Cragi-CTs peptides with predicted mollusc CT. A) CTa-types (7xC8/9xC motif), B) CTb-types (1xC7xC) motif**.** Cragi: *Crassostrea gigas*, Patye: *Patinopecten yessoensis*, Mytca: *Mytilus californianus*, Aplca: *Aplysia californica,* Octbi: *Octopus bimaculoides*, Sepof: *Sepia officinalis.* *: amino acids conserved.

6.2.2 Discussion

Ainsi, les différentes expériences menées ont permis de montrer l'existence d'une voie de signalisation de type CT/DH31 chez l'huître. En effet, il a été montré que parmi les peptides potentiels de type CT/DH31 de l'huître, deux d'entre eux, Cragi-CT1b et Cragi-CT2b, étaient capables d'activer deux récepteurs distincts, respectivement Cg-CT-R et Cragi-CTR2. L'activation de ces récepteurs entraîne la libération de Ca^{2+} et d'AMPc, suggérant le recrutement des protéines endogènes Gαq et Gαs comme cela est le cas chez les Deutérostomiens et les arthropodes (Force et al. 1992; Zandawala et al. 2013). Par ailleurs, les expériences de conditionnements salins réalisées chez l'huître ont montré des différences d'expression pour les gènes codant les récepteurs et les peptides lors d'une diminution de la salinité, suggérant la possible implication de ces couples dans la régulation de la balance ionique et hydrique. En outre, il serait intéressant de conditionner des huîtres dans des eaux riches ou appauvries en différents ions (Na^+, Cl^- et Ca^{2+}) afin de préciser le rôle joué par les couples neuropeptides/récepteurs dans la régulation de cette balance ionique et hydrique.

De manière intéressante, les séquences des gènes des peptides Cragi-CT1 et Cragi-CT2 partagent une identité de séquences plus importante avec les peptides de type CT qu'avec les DH31 des autres espèces. De plus, les analyses phylogénétiques réalisées ont montré que les récepteurs Cg-CT-R et Cragi-CTR2 se positionnent parmi les récepteurs de type CTRs de Protostomiens. De ce fait, ces observations suggèrent que la voie de signalisation étudiée est de type CT, faisant de ces couples, les preuves de l'existence d'une voie de signalisation fonctionnelle de ce type chez les Protostomiens.

Pour conclure, parmi l'ensemble des récepteurs identifiés dans la base de données GigaTON, trois ont pu être clonés et soumis à des tests d'activation par les Cragi-CT1s et Cragi-CT2s. Aussi, il serait intéressant de poursuivre les études afin de cloner les quatre autres récepteurs afin d'éventuellement, caractériser de nouveaux récepteurs de type CT chez l'huître. De plus, il serait intéressant de poursuivre les analyses *in silico* afin d'identifier d'autres peptides de type CT ou DH31, pas encore identifiés chez les mollusques, pouvant lier Cragi-CTR3.

Chapitre III :

Identification d'une voie de signalisation de type dopamine chez l'huître Crassostrea gigas

Chapitre III : identification d'une voie de signalisation de type dopamine chez l'huître *Crassostrea gigas*

Lors de l'analyse des données de RNAseq consistant à identifier des récepteurs exprimés de manière importante au sein des gonades mâles et ou femelles, plusieurs RCPGs avaient été identifiés chez l'huître. Parmi ces récepteurs d'intérêt, figurent entre autres les récepteurs à la CT qui ont fait l'objet du chapitre précédent et un récepteur potentiel à la dopamine. Chez les mammifères et les invertébrés, la dopamine est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques. Toutefois, peu d'études se sont intéressées au système dopaminergique chez l'huître. Aussi, ce chapitre de thèse propose de compléter les connaissances de ce système chez l'huître *Crassostrea gigas*.

1 Découverte de la dopamine

La dopamine (ou 3,4-dihydroxyphenylethylamine) a été synthétisée pour la première fois en 1910 par George Barger et James Ewins (Barger and Ewins 1910). La même année, Henry Dale s'intéressa à l'activité biologique de la dopamine et découvrit qu'il s'agissait d'une substance sympathomimétique, semblable à l'adrénaline (Barger and Dale 1910). Plus tard, des études ont montré que la dopamine, comme de nombreuses amines, était un substrat de la monoamine oxydase ou MAO (Blaschko et al. 1937). En 1938, Peter Holtz découvrit l'enzyme dopa-décarboxylase au sein d'homogénats de tissus de mammifères et montra que cette enzyme permet de transformer la L-dopa (ou levodopa, L-3,4-dihydroxyphénylalanine) (Holtz and Heise 1938; Hornykiewicz 1986) en dopamine (Figure 40). Une année après, Hermann Blaschko postula la voie de biosynthèse des catécholamines au sein de laquelle la dopamine joue seulement un rôle d'intermédiaire métabolique dans la synthèse de la noradrénaline et de l'adrénaline (Hornykiewicz 2002) (Figure 40). Des études ont par la suite montré que la dopamine était présente dans de nombreux tissus tels que la médullosurrénale, le cœur et les nerfs et ganglions sympathiques (Hornykiewicz 1986). Ces observations ont mené les auteurs à se questionner sur le possible rôle physiologique de la dopamine en tant que molécule. En effet, de précédentes études datant de 1942 avaient montré que chez certaines espèces dont le cobaye et le lapin, la dopamine avait un effet sur la pression artérielle différent de celui exercé par l'adrénaline. Ainsi, au lieu d'augmenter la pression artérielle, la dopamine la faisait diminuer, suggérant un rôle physiologique distinct de la dopamine par rapport à l'adrénaline et

de la noradrénaline (Hornykiewicz 2002). Toutefois, lors de la parution de cette étude, la chute de pression artérielle avait été attribuée à l'aldéhyde formé à partir de la dopamine sous l'action de la MAO. Afin de vérifier cette hypothèse, Oleh Hornykiewicz répéta ces expériences en ajoutant un inhibiteur de la MAO (IMAO), l'ipronazide, et observa une diminution de la pression artérielle (Hornykiewicz 1986). Ces observations vinrent alors renforcer l'hypothèse d'un rôle physiologique propre à la dopamine. Par la suite, la dopamine fut découverte au sein du cerveau (Montagu 1957; Carlsson and Waldeck 1958) et notamment au sein du striatum (Carlsson 1959) impliqué entre autres dans le contrôle des mouvements. De manière intéressante, la dopamine est présente au sein du striatum en plus grande quantité que la noradrénaline, renforçant l'hypothèse que la dopamine n'est pas seulement une molécule intermédiaire. De plus, il fut ensuite observé une déplétion du taux de dopamine au sein du striatum de patients atteints de la maladie de Parkinson, responsable de troubles moteurs (Hornykiewicz 1986). Cette observation confirma l'hypothèse que la dopamine joue un rôle spécifique au sein du corps humain. Depuis, il a été montré que la dopamine joue de nombreux rôles physiologiques (Tableau 4).

2 Biosynthèse de la dopamine

La dopamine est une monoamine de la classe des catécholamines agissant en tant que neurotransmetteur. Elle est synthétisée au niveau des neurones à partir d'un acide aminé, la phénylalanine, qui est catalysée par la phénylalanine hydroxylase afin de former de la tyrosine. Suite à cela, la tyrosine est catalysée par la tyrosine hydroxylase afin de produire la L-dopa. Cette dernière est ensuite décarboxylée par la dopa-décarboxylase afin de former la dopamine (Holtz and Heise 1938; Verlinden 2018). L'ensemble de ces réactions enzymatiques s'effectuent dans le cytoplasme et la dopamine est ensuite transportée jusqu'aux terminaisons présynaptiques dans des vésicules (Figure 41).

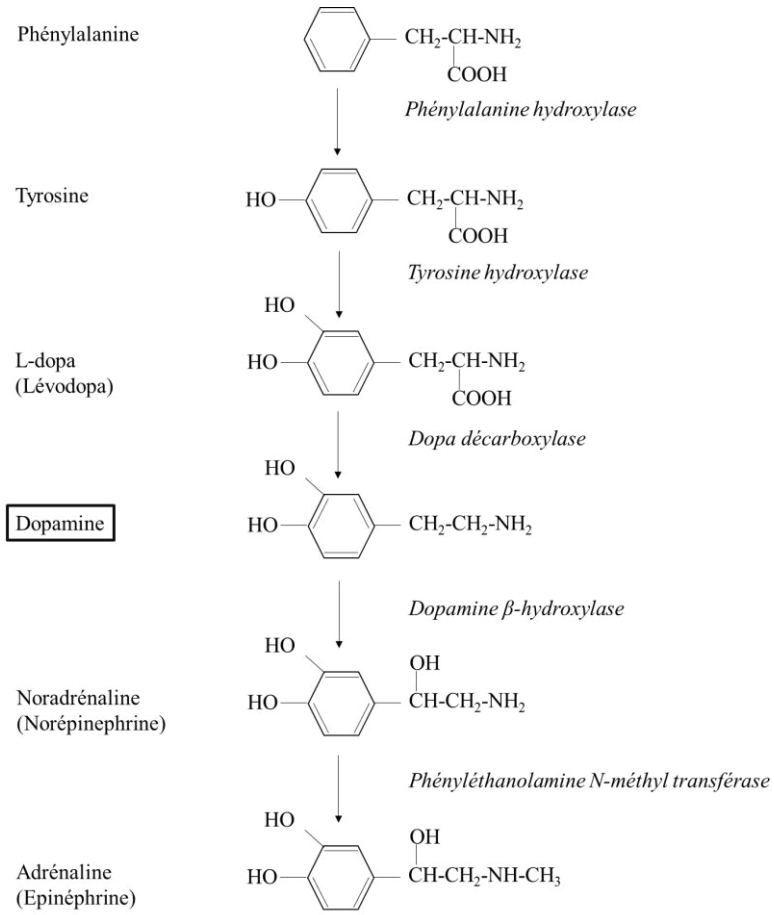


Figure 40 : Voie de biosynthèse des catécholamines. La dopamine, qui fait l'objet de ce chapitre, est encadrée en noir.

Il est à noter que d'autres réactions enzymatiques peuvent avoir lieu au sein du cytoplasme afin de former la noradrénaline, grâce à la catalyse de la dopamine par la dopamine β-hydroxylase. De même, la noradrénaline peut être méthylée en adrénaline par la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (ou PNMT). À l'arrivée d'un potentiel d'action, les vésicules libèrent la dopamine dans la fente synaptique par exocytose (Figure 41). La dopamine libérée active ensuite des récepteurs post-synaptiques de type D_1R-like et D_2R-like. De plus, la dopamine se lie également à des autorécepteurs de type D_2R présynaptiques, ce qui entraîne un rétrocontrôle négatif sur la libération de la dopamine à partir des terminaisons axoniques. Par ailleurs, une grande majorité de la dopamine sécrétée est recaptée par les transporteurs sélectifs DAT (« Dopamine Active Transporter ») situés au niveau des neurones présynaptiques. Il est à noter qu'au niveau du cortex préfrontal humain, l'expression des DAT est très faible et la dopamine est captée par les neurones noradrénergiques *via* les transporteurs NET (Norepinephrine Transporter). Une fois captée, la dopamine est soit recyclée, soit dégradée par l'action conjointe des enzymes MAO et COMT (« Catéchol-O-Méthyl Transférase ») en HVA (« Homovanillic acid ») (Dunlop and Nemeroff 2007).

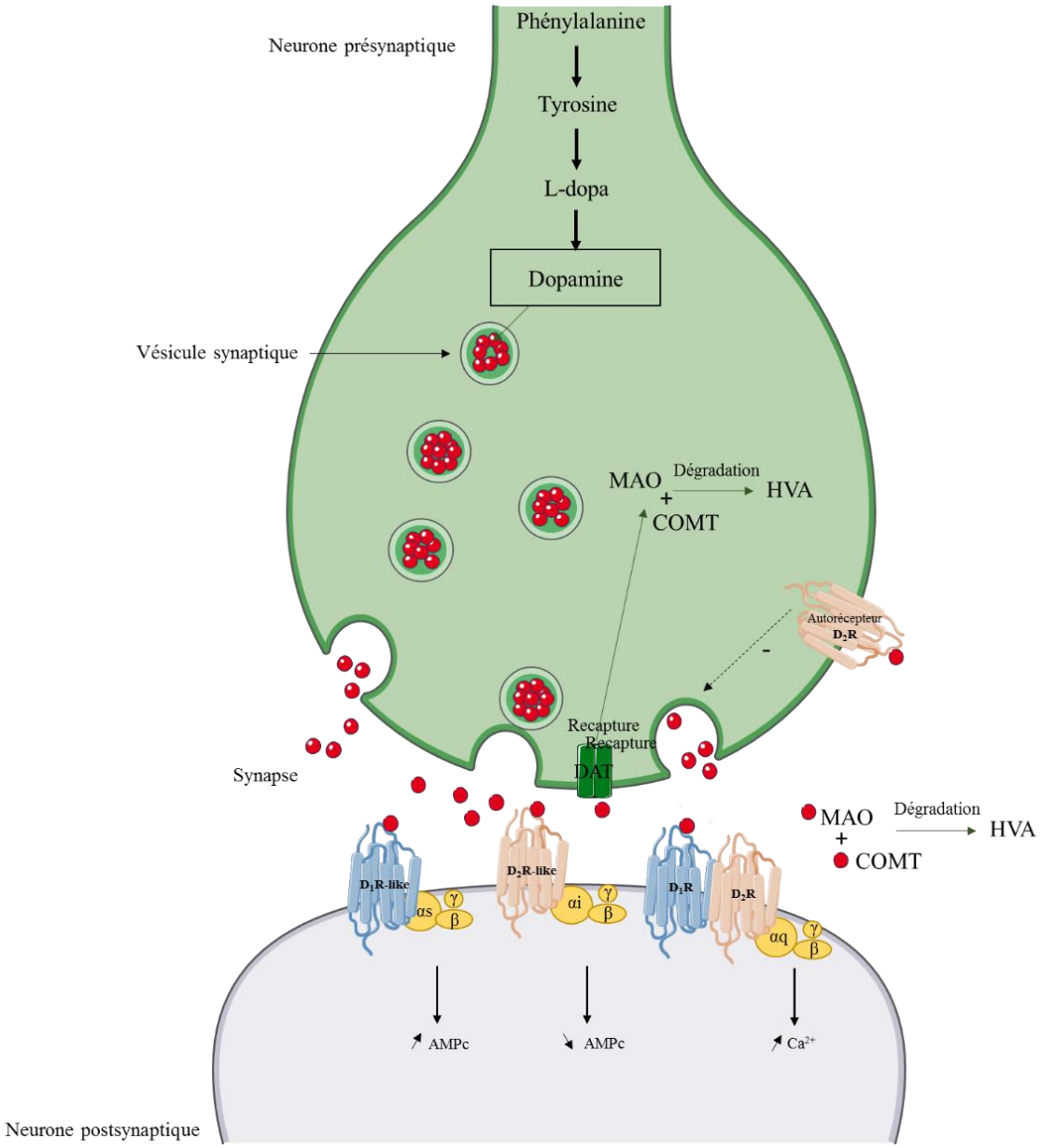


Figure 41 : Synthèse de la libération et de la recapture de dopamine. MAO = MonoAmine Oxydase ; COMT = Catéchol-O-Méthyl Transférase ; DAT = Dopamine Active Transporter. Adaptée de (Dunlop and Nemeroff 2007).

3 Les récepteurs à la dopamine et le rôle de la dopamine

Il existe 5 récepteurs à la dopamine nommés D_1R, D_2R, D_3R, D_4R et D_5R faisant partie de la famille des récepteurs de type Rhodopsine. Ces récepteurs se regroupent en 2 familles : la famille D_1R-like comprenant les récepteurs D_1R et D_5R, et la famille D_2R-like comprenant les récepteurs D_2R, D_3R et D_4R. En se liant aux récepteurs de la famille D_1R-like, la dopamine entraîne une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire alors que l'activation des récepteurs de la famille D_2R-like mène à une diminution de la concentration en AMPc (Sokoloff et al. 1993) (Tableau 4 et Figure 41). Les divers récepteurs ont une affinité différente

pour la dopamine. En effet, celle-ci se lie avec une affinité respective de l'ordre du micromolaire, du submicromolaire et du nanomolaire aux récepteurs D_1R et D_2R, D_4R et D_5R et, D_3R. L'affinité très élevée de la dopamine pour le récepteur D_3R pourrait s'expliquer par la nécessité du neurotransmetteur d'aller activer le récepteur à une longue distance des sites de libération, ou bien au fait qu'il puisse rester lié au récepteur sur une période prolongée (Sokoloff et al. 1993).

Les différents récepteurs sont localisés dans divers tissus humains. Leurs localisations ainsi que leurs rôles physiologiques associés sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résumé des voies de signalisation impliquées lors de l'activation des D_1R-like et D_2R-like chez les mammifères : localisation des récepteurs et fonctions physiologiques associées (adapté de (Osinga et al. 2017). Les croix indiquent la présence des récepteurs.

Récepteurs		Famille de type D_1R-like		Famille de type D_2R-like		
		D_1R	D_5R	D_2R	D_3R	D_4R
Homologie de séquences avec D_1R (en %)		100	82	45	42	42
Homologie de séquences avec D_2R (en %)		45	50	100	75	54
Voie de signalisation		Gαs AMPc		Gαi AMPc		
Localisation	**Cerveau :** cognition, contrôle moteur, émotion, perception de la douleur, comportement sexuel, prise alimentaire, circuit de la récompense, stress	X				
	Hypothalamus et hypophyse : Inhibition de la sécrétion de prolactine			X		X
	Glande médullosurrénale : D_1-like R : stimulation de la liberation d'adrénaline et de noradrénaline D_2-like R : inhibition de la liberation d'adrénaline et de noradrénaline	X				
	Glande corticosurrénale : D_1-like R : rôle inconnu D_2-like R : inhibition de la sécrétion d'aldostérone	X				
	Rétine : adaptation à la lumière	X				X
	Cœur : rôle inconnu					X
	Pancréas exocrine : rôle potentiel protecteur des muqueuses gastriques et intestinales		X			
	Pancréas endocrine : Inhibition de la sécrétion d'insuline	X				
	Vaisseaux sanguins : Inhibition de la liberation de de la noradrenaline, vasodilatation	X				
	Tractus gastrointestinal : Estomac : relâchement, vidange Côlon : relâchement, stimulation du côlon sigmoïde	X				
	Rein : D_1-like R : stimulation de la sécrétion de rénine D_2-like R : vasodilatation, diurèse, natriurèse	X				
	Cellules endothéliales : inhibition de la phosphorylation du récepteur VEGF-2			X		
	Système nerveux périphérique : ganglions sympathiques : Inhibition de la libération de noradrénaline			X		
	Cellules endothéliales progénitrices : rôle inconnu			X		
	Neutrophiles : Inhibition de la phagocytose, inhibition du facteur de nécrose tumorale TNF-α	X		X		
	Cellules NK ("Natural killer") : D_1-like R : augmentation de la cytotoxicité des lymphocytes NK D_2-like R diminution de la cytotoxicité des lymphocytes NK	X				
	Lymphocytes T : D_1-like R : réduction de la production d'interféron-γ **D_2-like R :** diminution de la prolifération de lymphocytes, réduction de la production d'intéféron-γ et d'interleukine-4	X				
	Lymphocytes B : sécrétion d'immunoglobulines G et M		X	X		X

Les récepteurs dopaminergiques peuvent également être activés par des agonistes différents de la dopamine. En effet, l'apomorphine peut activer l'ensemble des récepteurs à la dopamine et est utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson (Antonini and Tolosa 2009). Il est à noter qu'afin de rétablir une concentration normale de dopamine dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson, les traitements peuvent soit mimer l'action de la dopamine telle que l'apomorphine, soit bloquer la dégradation de la dopamine ou de son précurseur *via* des inhibiteurs de la COMT ou des iMAO. De plus, d'autres traitements consistent à administrer le précurseur de la dopamine, la L-dopa (Youdim and Bakhle 2006; Fabbri et al. 2018). Outre l'apomorphine, il existe d'autres agonistes qui peuvent être spécifiques d'un type de récepteur (Tableau 5). De plus, il existe plusieurs antagonistes spécifiques de chacun des récepteurs, notamment la chlorpromazine qui permet d'atténuer les symptômes de la schizophrénie.

Tableau 5 : Principaux agonistes et antagonistes sélectifs des différents types de récepteurs à la dopamine. Adapté de (Dunlop and Nemeroff 2007).

Récepteurs	**Famille de type D_1R-like**		**Famille de type D_2R-like**		
	D_1R	D_5R	D_2R	D_3R	D_4R
Agoniste	• Apomorphine • SKF38893 • Pergolide • Chloro-PB • 6,7-ADTN	• Apomorphine • Chloro-PB	• Apomorphine • Bromocriptine • Pergolide • Piribedil • Pramipexole • Quinpirole • 6,7-ADTN	• Apomorphine • Cabergoline • Pergolide • Pramipexole • 6,7-ADTN	• Apomorphine • PD 168077 • Quinpirole • 6,7-ADTN
Antagoniste	• SCH 23390 • Butaclamol	• SCH 23390 • Butaclamol	• Chlorpromazine • Sulpuride • Butaclamol	• Chlorpromazine • Butaclamol	• Clozapine • PD 101387 • Butaclamol

Ainsi, chez les mammifères, la dopamine est un neurotransmetteur impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Par ailleurs, des études ont montré que la dopamine est également présente au sein d'une grande variété de microorganismes, chez les champignons, les plantes (Roshchina 2016) mais également au sein du système nerveux des cnidaires (Kass-Simon and Pierobon 2007). De ce fait, ces observations suggèrent que le développement de la dopamine en tant que neurotransmetteur coïncide avec la création du système nerveux, il y a plus de 500 millions d'années (Verlinden 2018).

4 La dopamine et ses récepteurs au sein des Protostomiens

Chez les Protostomiens comme cela est le cas chez les Deutérostomiens, la dopamine est formée à partir de la phénylalanine. Cependant, chez les Protostomiens, il existe une seconde voie de biosynthèse à partir de la tyrosine permettant la formation de la tyramine grâce à l'action de la tyrosine décarboxylase (Figure 42). La tyramine peut ensuite être convertie en octopamine par la tyramine β-hydroxylase. Il est à noter que le nom d'octopamine provient de l'espèce *Octopus vulgaris*, chez qui elle a été découverte au sein des glandes salivaires (Erspamer and Boretti 1951).

Du fait de leurs similarités chimiques, de signalisation et fonctionnelles, il est admis que la tyramine et l'octopamine sont les homologues de l'adrénaline et la noradrénaline, qui ne sont présents qu'en quantité très négligeable chez les Protostomiens (Roeder 2005). Il est à noter que dans de rares cas, la tyramine peut également être formée depuis la dopamine grâce à l'action de la dopamine déhydroxylase (Barron et al. 2010).

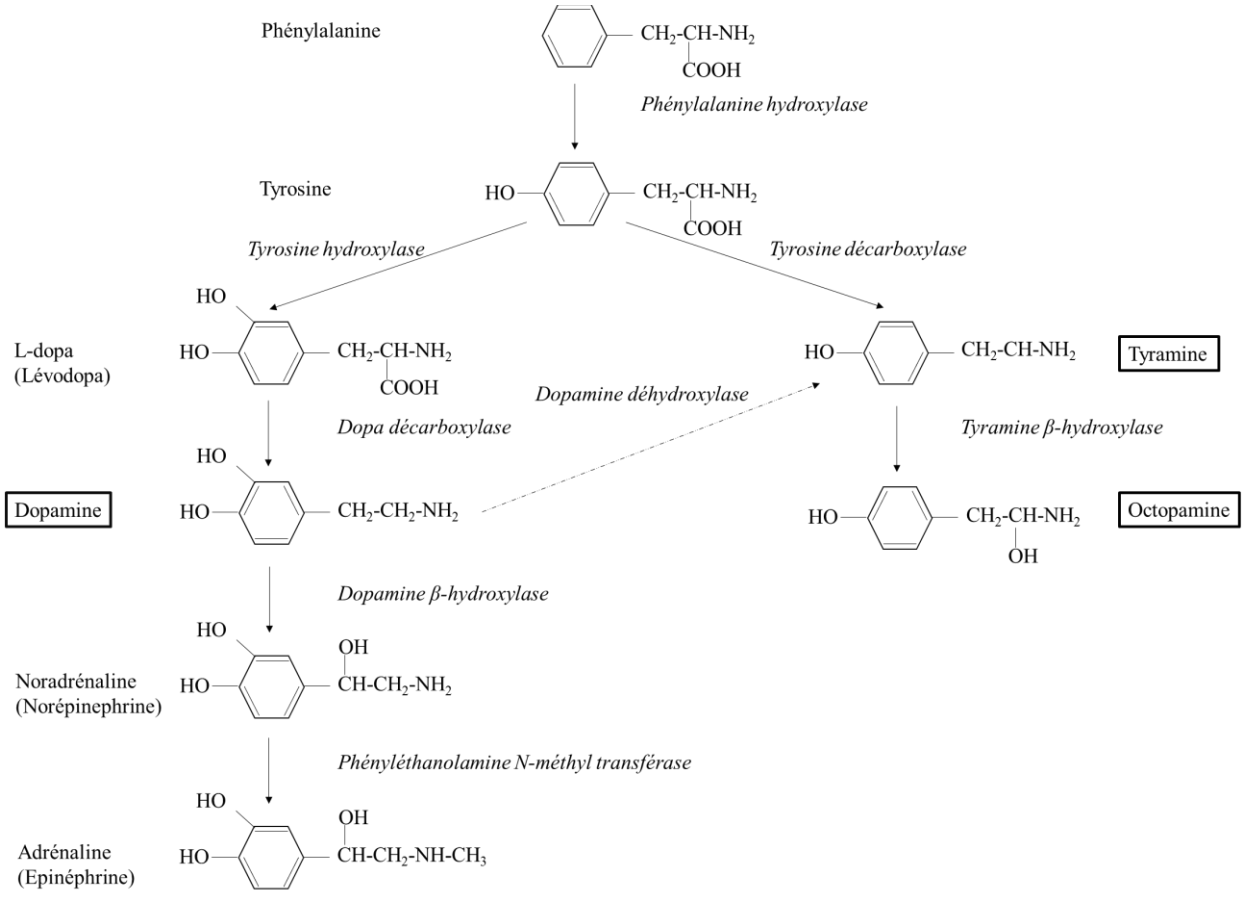


Figure 42 : Voie de biosynthèse des catécholamines menant à la formation de la tyramine et de l'octopamine. La dopamine, la tyramine et l'octopamine qui font l'objet de la partie suivante sont encadrées en noir.

5 Récepteurs à la dopamine, à l'octopamine et à la tyramine

Les Protostomiens possèdent quatre familles de récepteurs à la dopamine identifiées chez les arthropodes et nommées : Dop1, Dop2/INDR (« INvertebrate-type Dopamine Receptor »), Dop3 et Dop/Ecd (Ecdysteroïde) (Tableau 6). Parmi ces familles de récepteurs, Dop1, Dop2/INDR et Dop3 présentent des homologies fonctionnelles et structurelles avec les récepteurs à la dopamine des vertébrés.

Ainsi, les récepteurs de la famille Dop1 et Dop2/INDR sont plus proches des récepteurs de la famille D_1R-like que des D_2R-like de vertébrés puisque leur activation entraîne une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire (Mustard et al. 2005). Par ailleurs, les récepteurs Dop2/INDR peuvent également se coupler à une protéine de type Gαq et entraîner une augmentation du taux de calcium intracellulaire pour des concentrations plus faibles en dopamine que celles nécessaires pour induire une même augmentation d'AMPc (Verlinden 2018). Toutefois, les récepteurs de la famille Dop2/INDR s'avèrent être phylogénétiquement plus proches des « α-adrenergic-like octopamine receptors » des arthropodes, que des récepteurs de la famille D_1R-like de vertébrés. Ainsi, chez les arthropodes, les récepteurs à l'octopamine sont classés en trois familles : les « α-adrenergic-like octopamine receptors » ou OctαRs, les « β-adrenergic-like octopamine receptors » ou OctβRs et les récepteurs à l'octopamine/tyramine ou TyrR (Tableau 6). Cette classification a été établie d'après les similarités de séquences et de voie de signalisation avec les récepteurs adrénergiques de type α et β de vertébrés (Evans and Maqueira 2005; Verlinden et al. 2010). Ainsi ces observations suggèrent que les récepteurs à l'octopamine et les récepteurs adrénergiques de vertébrés ont divergé depuis un même ancêtre commun (Maqueira et al. 2005; Pflüger and Stevenson 2005; Evans and Maqueira 2005). Par ailleurs, il est à noter que les Dop2/INDR partagent également avec les OctαRs, la capacité à se coupler à des protéines de type Gαs et Gαq.

Les récepteurs de la famille Dop3 sont quant à eux, phylogénétiquement plus proches des récepteurs de la famille D_2R-like de vertébrés. De même, l'activation des récepteurs Dop3 par des agonistes, entraîne comme cela est le cas pour les D_2R-like, une diminution de la concentration en AMPc intracellulaire. Toutefois, il a été montré que chez *Tribolium castaneum*, l'activation du récepteur *TricaDop3* entraîne une augmentation du taux d'AMPc et de Ca^{2+} intracellulaire (Verlinden et al. 2015; Verlinden 2018).

Une quatrième famille nommée Dop/Ecd (Ecdystéroïde) a été identifiée chez *Drosophila melanogaster (Drome*Dop/Ecd*)* (Srivastava 2005). De manière intéressante, *Drome*Dop/Ecd

est l'homologue des récepteurs adrénergiques de type γ des vertébrés et peut être activé par la dopamine et les hormones stéroïdiennes ecdysone et 20-hydroxyecdysone. L'activation de Dop/Ecd par la dopamine entraîne l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire et active également la voie dépendante de la PI3K. Par ailleurs, l'activation de ce même récepteur par l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone inhibe les effets induits par la dopamine et mène à l'activation de la voie dépendante des MAP kinases menant à la phosphorylation de la protéine ERK2 (Srivastava 2005; Evans et al. 2014). Il est à noter qu'un récepteur homologue à *Drome*Dop/Ecd (*Aips*DopEcR) a également été identifié chez la noctuelle *Agrotis ipsilon* (Abrieux et al. 2013).

Tableau 6 : Récepteurs à la dopamine, octopamine et tyramine chez les Protostomiens.

Récepteurs	**Dop1**	**Dop2/INDR**	**Dop3**	**Dop/Ecd**	**OctαRs**	**OctβR**	**TyrR**
Homologie de séquences avec les récepteurs de vertébrés	D_1R-like		D_2R-like	Récepteurs γ-adrénergiques	Récepteurs α-adrénergiques	Récepteurs β-adrénergiques	Récepteurs α et β-adrénergiques
Voie(s) de signalisation	↗ AMPc	↗ AMPc ↗ Ca^{2+}	↘ AMPc *TricaDop3* : ↗ AMPc ↗ Ca^{2+}	↗ AMPc • Activation de la voie PI3K	↗ Ca^{2+} ↗ AMPc	↗ AMPc	↘ AMPc ↗ Ca^{2+}
Agonistes	• Dopamine • SKF38893 • Apomorphine • 6,7-ADTN	• Dopamine • SKF38893 • Apomorphine • 6,7-ADTN	• Dopamine • Bromocriptine • Ecdysone • 20-hydroxyecdysone • 6,7-ADTN	• Dopamine	• Octopamine > Tyramine	• Octopamine > Tyramine	• Tyramine > Octopamine
Antagonistes	• SCH 23390 • Butaclamol • Flupentixol • Fluphenazine • Chlorpromazine	• Flupentixol • Fluphenazine • Clozapine • Minasérine • SCH23390 • Butaclamol	• Butaclamol	• Flupentixol • Fluphenazine • Phentolamine • Yohimbine	• Chlorpromazine • Cyrpoheptadine • Yohimbine	• Miansérine • Cyrpoheptadine • Phentolamine	• Yohimbine
Espèces identifiées	• *Aedes aegypti* • *Apis mellifera* • *Bombyx mori* • *Chilo suppressalis* • *Drosophila melanogaster* • *Crassostrea angulata* • *Crassostrea gigas*	• *Aedes aegypti* • *Apis mellifera* • *Anopheles gambiae* • *Chilo suppressalis* • *Culex quinquefasciatus* • *Drosophila melanogaster* • *Periplaneta americana*	• *Apis mellifera* • *Chilo suppressalis* • *Drosophila melanogaster* • *Tribolium castaneum*	• *Drosophila melanogaster* • *Agrotis ipsilon*	• *Culex quinquefasciatus* • *Drosophila melanogaster* • *Aedes aegypti* • *Acyrthosiphon pisum* • *Anopheles gambiae* • *Apis mellifera* • *Bombyx mori* • *Heliothis virescens* • *Manduca sexta* • *Pediculus humanis corporis* • *Periplaneta americana* • *Schistocerca gregaria* • *Tribolium castaneum* • *Crassostrea gigas*	• *Culex quinquefasciatus* • *Drosophila melanogaster* • *Aedes aegypti* • *Acyrthosiphon pisum* • *Anopheles gambiae* • *Apis mellifera* • *Nasonia vitripennis* • *Pediculus humanis corporis* • *Schistocerca gregaria* • *Tribolium castaneum*	• *Culex quinquefasciatus* • *Drosophila melanogaster* • *Aedes aegypti* • *Acyrthosiphon pisum* • *Agrotis ipsilon* • *Anopheles gambiae* • *Apis mellifera* • *Bombyx mori* • *Heliothis virescens* • *Locusta migratoria* • *Mamestra brassicae* • *Nasonia vitripennis* • *Papilio xuthus* • *Pediculus humanis corporis* • *Periplaneta americana* • *Spodoptera littoralis* • *Tribolium castaneum* • *Crassostrea virginica*

La dopamine, l'octopamine et la tyramine jouent différents rôles physiologiques chez les Protostomiens. Les principaux rôles sont détaillés dans la partie suivante.

6 Rôle de la dopamine, octopamine et tyramine chez les Protostomiens

6.1 La dopamine, l'octopamine et la tyramine chez les Ecdysozoaires

Chez les arthropodes

Le comportement alimentaire

Le comportement alimentaire des arthropodes peut à première vue paraître simple. En effet, chez ces animaux, certaines flaveurs amènent à des réponses innées telles que l'attrait pour le sucre et l'évitement des composés amers. De ce fait, chez diverses espèces d'arthropodes comme *Apis mellifera* ou *Drosophila melanogaster*, des flaveurs attractives provoqueront l'extension du proboscis impliqué dans la préhension de la nourriture alors que des odeurs amères inhiberont l'extension de cet appendice (Hammer and Menzel 1995). Cependant, en fonction de l'état nutritionnel ou encore des expériences alimentaires précédentes, ces réponses peuvent être modulées. De même, l'attrait vers de nouvelles odeurs peut être renforcé ou évité si ces odeurs sont associées à du fructose ou de la quinine, qui est un composé inodore mais amer. Ainsi, *via* son action au sein des corps pédonculés (ou « Mushroom Bodies »), la dopamine est impliquée dans la plasticité et la mémoire gustative (Marella et al. 2012; Masek and Keene 2016).

Le circuit de la récompense et l'apprentissage

Chez les mammifères, la dopamine est impliquée dans le circuit de la récompense. Ce circuit est un système fonctionnel fondamental indispensable à la survie. En effet, il permet de fournir la motivation nécessaire à la réalisation d'une action ou d'un comportement adapté. Il est le résultat de trois composantes : affective, correspondant au plaisir provoqué par la « récompense » ou au déplaisir causé par la « punition » ; motivationnelle, équivalant à la motivation à obtenir la « récompense » ou à éviter la « punition » ; et cognitive, correspondant aux apprentissages le plus souvent conditionnés. Toutefois, chez les arthropodes, il a été montré que l'octopamine est plus fortement impliquée dans l'apprentissage de la récompense que la dopamine qui elle, semble être plus impliquée dans la mémoire aversive. En effet, il a été montré que chez le crabe *Chasmagnathus granulatus*, des injections d'octopamine augmentaient la recherche exploratoire de nourriture dans un nouvel environnement, alors que des injections

d'antagonistes des récepteurs octopaminergiques, réduisaient cette réponse (Kaczer and Maldonado 2009). De plus, chez les insectes, plusieurs études réalisées chez *Apis mellifera*, ont montré que l'injection d'octopamine affecte les réponses comportementales à la récompense au saccharose (Mercer and Menzel 1982; Hammer and Menzel 1998; Scheiner et al. 2002; Barron et al. 2007). De plus, des tests de conditionnement consistant à l'apprentissage de l'extension du proboscis face à de nouvelles odeurs avec pour récompense du saccharose (Bitterman et al. 1983), ont montré que l'injection de dopamine au sein des corps pédonculés entraîne une diminution de l'extension de l'appendice (Mercer and Menzel 1982). À l'inverse, l'injection d'octopamine peut substituer la présentation du saccharose en guise de récompense (Hammer and Menzel 1998). Toutefois, diverses études effectuées chez *Drosophila melanogaster*, ont permis de montrer que bien que l'octopamine joue un rôle dominant dans l'apprentissage de la récompense, la dopamine, *via* d'autres voies de signalisation, pourrait en plus de l'apprentissage de la punition, être impliquée dans l'apprentissage de la récompense (Kim et al. 2007; Krashes et al. 2009; Selcho et al. 2009). Ces observations peuvent être rapprochées du rôle de la dopamine chez les mammifères, dans le circuit de la récompense (Barron et al. 2010).

Le comportement social

De manière intéressante, la dopamine peut influencer le comportement social des arthropodes. En effet, le comportement des criquets peut alterner entre des phases solitaires et grégaires. Ainsi, un changement du nombre de criquets à un endroit donné peut amener un criquet solitaire à devenir grégaire et de ce fait, à intégrer un essaim. Ce changement de comportement peut se réaliser en moins de 4 heures. Toutefois, le retour à un comportement de type solitaire est plus long et peut durer jusqu'à 24 heures (Ellis 1963; Roessingh and Simpson 1994). Il a été montré que ces changements peuvent être dus à la sérotonine (Anstey 2009). Toutefois, il a été montré que la dopamine peut également jouer un rôle dans cette transition. En effet, il a été observé que chez le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria*, la concentration en dopamine du cerveau et des ganglions thoraciques a augmenté de façon transitoire face à une situation de surpopulation (Rogers et al. 2004). De plus, des injections de dopamine dans l'hémocœle thoracique des criquets pèlerins a réduit le comportement d'agrégation des animaux isolés et grégaires. En outre, des injections de fluphenazine, un antagoniste des récepteurs Dop1, Dop2 et Dop/Ecd, mènent à la formation d'essaims (Alessi et al. 2014). De ce fait, l'ensemble de ces données suggèrent que la dopamine joue un rôle clé dans l'isolement du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria*.

Rôle dans la reproduction

Chez les abeilles, il a été montré que le retrait de la reine d'une colonie entraînait l'augmentation du taux de dopamine dans le cerveau des jeunes abeilles ouvrières et conduisait à l'activation des ovaires (Beggs et al. 2007). De même, il a été montré que lorsque la reine des fourmis *Harpegnathos saltator* devient sénescente, les fourmis ouvrières se lancent dans un tournoi afin d'élire un groupe de fourmis ouvrières reproductives appelées les gamergates. De manière intéressante, il a été montré que le taux de dopamine des fourmis ouvrières en proie à devenir des gamergates était plus élevé que chez les fourmis simples ouvrières (Penick et al. 2014). De plus, le taux élevé de dopamine permettrait une activité ovarienne accrue nécessaire afin de mettre en place les capacités reproductives des futures gamergates. Par ailleurs, il apparaît que la concentration en tyramine est faible chez les gamergates et élevée chez les fourmis ouvrières. Le taux d'octopamine reste inchangé selon les classes (Penick et al. 2014).

Locomotion

Chez les abeilles mellifères ouvrières, il a été montré que la tyramine et l'octopamine pouvaient moduler l'activité locomotrice. En effet, les abeilles traitées avec de la tyramine ont effectué un nombre de vols moins important que les abeilles témoins alors que l'injection d'octopamine a entrainé une diminution du nombre de vols des abeilles (Fussnecker et al. 2006). Il est à noter que chez les abeilles ouvrières, le vol est un comportement associé à la recherche de nourriture. Chez *Drosophila melanogaster*, il a été montré qu'un mutant du transporteur DAT entraînait une augmentation de l'activité locomotrice diurne et nocturne (Lee et al. 2013). De plus, des mouches traitées avec de la bromocriptine, un agoniste des récepteurs de type Dop3, ont développé une hyperactivité locomotrice.

Développement

Au cours du développement de *Drosophila melanogaster*, quatre pics de concentration en dopamine peuvent être observés et coïncident avec les mues larvaires, la pupaison et l'émergence des adultes (Martínez-Ramírez et al. 1992). Il a également été montré que l'ajout de flupentixol, qui est un antagoniste des récepteurs Dop1, Dop2 et Dop/Ecd, entraîne un arrêt du développement des drosophiles ainsi que des anomalies morphologiques (Regna et al. 2016). De plus, la dopamine semble jouer un rôle dans la différenciation terminale du système nerveux puisque des mutants au niveau de la dopa-décarboxylase, présentent un modèle aberrant d'arborisation neuronale (Budnick et al. 1989).

6.2 La dopamine, l'octopamine et la tyramine chez les Lophotrochozoaires

Chez les Lophotrochozoaires, la dopamine peut jouer différents rôles. En, effet, chez les Mytilidés, la dopamine permet le ralentissement du rythme de battements des cellules des cils latéraux des branchies (Carroll and Catapane 2007) et l'accélération du rythme de battements des cellules frontales (Malanga et al. 1972). De plus, chez *Mytilus edulis,* la dopamine entraîne la contraction de la musculature des branchies (Gainey 2010) et de celle du pied (Aiello et al. 1981). Il est à noter que chez *Aplysia californica*, 4 récepteurs (D_1R, D_2R, D_3R et D_4R) ont pu être identifiés grâce à des tests de liaison effectués avec des agonistes et antagonistes spécifiques de chacune des familles de récepteurs à la dopamine de vertébrés (Chandhoke et al. 2001).

Chez l'annélide *Hirudo medicinalis*, les déplacements peuvent être réalisés en nageant ou en rampant. De manière intéressante, la dopamine inhibe l'activité de nage et promeut la reptation, activité locomotrice mise en place avant l'entrée en contact avec un hôte afin d'y prélever du sang (Crisp 2004). Aussi, il a été suggéré que la dopamine en plus d'être impliquée dans l'activité locomotrice, peut jouer un rôle important dans la prise alimentaire (O'Gara and Friesen 1995). En effet, des neurones dopaminergiques ont été identifiés au sein des glandes accessoires contrôlant les mâchoires (Crisp et al. 2002). De manière intéressante, l'octopamine peut induire le mouvement de nage (Hashemzadeh-Gargari and Otto Friesen 1989).

6.2.1 Chez l'huître

Plusieurs études ont été réalisées sur les catécholamines et leurs récepteurs associés chez différentes espèces d'huître.

Chez l'huître américaine *Crassostrea virginica,* les cellules ciliées latérales de l'épithélium branchial, responsables de la régulation du battement des cils latéraux, sont innervées par des terminaisons nerveuses dopaminergiques et sérotoninergiques (Carroll and Catapane 2007). Afin de caractériser les sous-types de récepteurs à la dopamine impliqués dans le battement des cils, des agonistes et antagonistes des D_1R-like et D_2R-like ont été appliqués sur les branchies et le rythme de battements des cils a été mesuré grâce à un suivi au microscope. Il a été montré que les agonistes et antagonistes des D_2R-like, à l'inverse de ceux de la famille D_1R-like, peuvent respectivement mimer ou inhiber l'action de la dopamine sur le battement des cils. De plus, des expériences d'immunofluorescence ont permis d'identifier à l'aide d'anticorps dirigés contre les D_2R-like, la présence de ce type de récepteurs au niveau des cellules ciliées latérales

de l'épithélium branchial (Anador et al. 2011). Des expériences complémentaires se sont intéressées à l'effet du manganèse sur le battement des cils. En effet, chez l'homme, l'intoxication au manganèse provoque une pathologie dont les symptômes sont comparables à ceux provoqués par la maladie de Parkinson. De ce fait, il a été montré qu'une exposition chronique au manganèse interfère avec la transmission dopaminergique. Aussi, chez l'huître, il a été observé que la dopamine active les D_2R-like présents au sein de la branchie ce qui entraîne un ralentissement du rythme de battements des cils (Carroll and Catapane 2007). De plus, il a été observé que le manganèse perturbe l'innervation dopaminergique des branchies, empêchant ainsi la réponse inhibitrice des cellules ciliées latérales à la dopamine (Martin et al. 2008). De très récentes études ont cherché à caractériser la voie de signalisation dopaminergique impliquée dans le contrôle du rythme de battements des cils. Pour cela, les auteurs ont utilisé un activateur de l'AC, la forskoline, et deux inhibiteurs de l'AC (MDL-12,330A et SQ 22,536) afin de déterminer si le manganèse a un effet sur la voie de signalisation mise en place lors de l'activation des D_2R-like par la dopamine (Nelson et al. 2018). Toutefois, aucun effet de la forskoline ni des MDL-12,330A et SQ 22,536 n'a été observé sur le rythme de battements des cils de branchies traités avec du manganèse. Aussi il est possible que le manganèse agisse sur le contrôle dopaminergique *via* une voie indépendante de l'AC ou interfère avec le processus d'activation du récepteur (Nelson et al. 2018).

Chez l'huître portugaise *Crassostrea angulata*, un récepteur présentant des homologies de séquences avec les récepteurs de type D_1R-like de vertébrés et Dop1 d'arthropodes a été identifié et nommé Ca-DAR1 (Yang et al. 2013). Le gène codant Ca-DAR1 est exprimé de manière ubiquitaire au sein de l'organisme adulte avec une expression plus importante au niveau des ovaires, des palpes labiaux et du manteau. De plus, il a été montré que le gène codant Ca-DAR1 est exprimé de manière plus importante lors du stade de prolifération des ovocytes et de manière plus faible lors du stade de maturation. Ces observations suggèrent que ce récepteur, à travers son activation par la dopamine, joue un rôle dans le développement précoce des ovocytes de l'huître *Crassostrea angulata*. Ceci peut être relié au fait que la dopamine est présente au sein des ovaires de nombreux organismes marins et joue un rôle dans le développement ovarien (Yang et al. 2013).

Il est à noter que les analyses phylogénétiques menées par Yang ont également permis d'identifier un récepteur homologue à Ca-DAR1 chez l'huître *Crassostrea gigas* (Yang et al. 2013).

Chez les bivalves, la dopamine est impliquée dans la biominéralisation de la coquille pendant le développement larvaire. Aussi, des études ont été menées afin d'identifier des récepteurs à la dopamine chez l'huître *Crassostrea gigas*. De ce fait, grâce à des homologies de séquences avec les récepteurs de type D_1R de vertébrés, un récepteur nommé CgD1DR-1 a été identifié chez *Crassostrea gigas*. De plus, ce récepteur entraîne une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire lors de son activation par la dopamine (Liu et al. 2018).

Par ailleurs, le gène codant le récepteur CgD1DR-1 est exprimé dans une grande variété de tissus avec une expression plus importante au sein de la glande digestive, du manteau, du muscle adducteur et des branchies. En outre, au cours du développement larvaire d'huître, ce gène est exprimé de manière plus élevée au sein de la larve-D en comparaison par rapport à la larve trochophore et véligère. De plus, il a été montré que l'antagoniste spécifique des D_1R-like, SCH 23390, entraîne l'inhibition de plusieurs gènes impliqués dans la formation de la coquille. Ces observations suggèrent ainsi l'implication de ce récepteur dans le développement de la coquille de la larve d'huître (Liu et al. 2018). Il a également montré que la dopamine est impliquée dans la réponse au stress chez *Crassostrea gigas*. En effet, il a été décrit une augmentation de la concentration en dopamine au sein de l'hémolymphe suite à un stress mécanique reproduisant les situations rencontrées dans les exploitations ostréicoles lors des processus de tri et de classement (Lacoste et al. 2001).

De plus, des expériences de séparation et de chromatographie en phase liquide ont permis de montrer la présence d'octopamine au sein des ganglions cérébroïdes et viscéraux, des branchies, des palpes labiaux, du manteau, du cœur et de l'hémolymphe de *Crassostrea virginica* (Pryce et al. 2015). Par ailleurs, des études préliminaires avaient décrit le rôle cardioexcitateur joué par l'octopamine chez l'huître suggérant la présence de récepteurs de type octopaminergique au sein du coeur (Pryce et al. 2011). Ainsi, grâce à des techniques d'immunoblot utilisant un anticorps dirigé contre les récepteurs aux amines à l'état de trace (Pan TAAR ou « Pan Trace amine-associated receptor »), un récepteur de type octopaminergique a pu être identifié chez l'huître *Crassostrea virginica* (Pryce et al. 2015).

Chez *Crassostrea gigas*, un récepteur phylogénétiquement proche des récepteurs à l'octopamine et à la tyramine de Protostomiens a été identifié, cloné et nommé CgGPR1 (Ji et al. 2016). Des analyses d'expression menées grâce aux techniques de Western blot et de qPCR, ont montré que CgGPR1 est exprimé tout au long des stades de développement de l'huître avec une expression plus importante au niveau des stades blastula et trochophore, suggérant ainsi que l'octopamine est potentiellement impliquée dans l'embryogenèse et la différenciation

tissulaire. Des études d'immunofluorescence ont permis de détecter la présence du récepteur au sein du velum, du pied, des branchies et du manteau de larves. De plus, il a été mis en évidence que le gène codant CgGPR1 est exprimé de manière ubiquitaire au sein des différents tissus de l'huître adulte avec néanmoins, une expression plus importante au sein du manteau. Toutefois, les tests pharmacologiques n'ont pas montré d'activation du récepteur avec la L-dopa, la dopamine, la tyramine, la tyramine, l'octopamine, la noradrénaline et l'adrénaline *via* les voies de signalisation impliquant l'AMPc et le Ca^{2+} (Ji et al. 2016).

Par ailleurs chez *Crassostrea gigas*, un récepteur phylogénétiquement proche des récepteurs adrénergiques de type α-1 (A1AR) de vertébrés a été identifié. Les tests ont démontré que ce récepteur appelé CgA1AR-1, peut être activé par la noradrénaline, entraînant ainsi une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Liu et al. 2016). Afin de confirmer l'appartenance de CgA1AR-1 à la famille des récepteurs adrénergiques, il a été montré que l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire induite lors de l'activation du récepteur, peut être inhibée par l'ajout d'un antagoniste spécifique des A1ARs de vertébrés, la Doxazosin mesylate (DOX). Par ailleurs, des lipopolysaccharides (LPS) ont été injectés au sein de l'huître afin de stimuler la réponse immunitaire. De manière intéressante, l'injection de LPS a entraîné la surexpression d'ARNm de CgA1AR-1 dans les hémocytes entre 12 et 24 heures post-injection. De plus, l'inhibition du récepteur par la DOX avant l'injection de LPS, a augmenté le taux de phagocytose et d'apoptose des hémocytes, suggérant ainsi l'implication de CgA1AR-1 dans l'immunité. De plus, l'inhibition de CgA1AR-1 avec la DOX entraîne la diminution de l'expression de l'activité superoxyde dismutase (SOD) et des lysozymes impliqués dans l'immunité (Liu et al. 2016).

Ainsi, l'ensemble des expériences menées sur les huîtres *Crassostrea virginica*, *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*, ont permis de montrer que les catécholamines jouent un rôle varié de fonctions physiologiques. De plus, la caractérisation de leurs récepteurs associés montre que les récepteurs de l'huître sont homologues aux récepteurs de vertébrés et d'arthropodes.

Au cours de ce travail de thèse, l'analyse menée sur les données de RNAseq accessibles depuis la banque GigaTON (Riviere et al. 2015), a permis de mettre en évidence un récepteur annoté Cragi-DOPR.2.1.1 (CHOYP_DOPR2.1.1) (Annexe 4) potentiellement exprimé de manière importante au sein des gonades d'huître.

De ce fait, différentes analyses (phylogénétiques, analyses de banques de données transcriptomiques) et expériences (tests d'endocrinologie inverse, conditionnements salins,

qPCR) ont été réalisées afin de confirmer l'appartenance de ce récepteur à la famille des récepteurs à la dopamine ; et dans le but d'étudier son implication dans la reproduction ainsi que dans d'autres fonctions physiologiques.

6.2.2 Identification d'une voie de type dopamine chez l'huître *Crassostrea gigas*

6.2.2.1 Analyse phylogénétique de Cragi-DOPR.2.1.1

Le récepteur d'intérêt a été annoté Cragi-DOPR.2.1.1 par BLAST. De ce fait, il est possible que la séquence de son gène ne partage avec les séquences d'autres espèces qu'une identité relativement faible. Aussi, il est nécessaire de construire un arbre phylogénétique afin de vérifier l'appartenance de la séquence d'intérêt Cragi-DOPR.2.1.1, à la grande famille des récepteurs à la dopamine. Pour cela, plusieurs séquences de récepteurs déjà identifiées et caractérisées chez d'autres espèces de Deutérostomiens et de Protostomiens ont été utilisées afin de construire l'arbre phylogénétique (Figure 43). Ces séquences de récepteurs recouvrent l'ensemble des familles : D_1R-like, D_2R-like, Dop1, Dop2/INDR, Dop3, Dop/Ecd, OctαR, OctβR et TyrR.

De manière intéressante, l'arbre montre que le récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 semble être un récepteur dopaminergique appartenant à la famille Dop2/INDR. Comme évoqué précédemment, la famille Dop2/INDR est phylogénétiquement plus proche de la famille OctαR que des récepteurs de la famille Dop1/ D_1R-like. De plus, il est à noter que Cragi-DOPR.2.1.1 est bien différent des récepteurs préalablement identifiés chez les huîtres du genre *Crassostrea* (Yang et al. 2013; Ji et al. 2016; Liu et al. 2016, 2018).

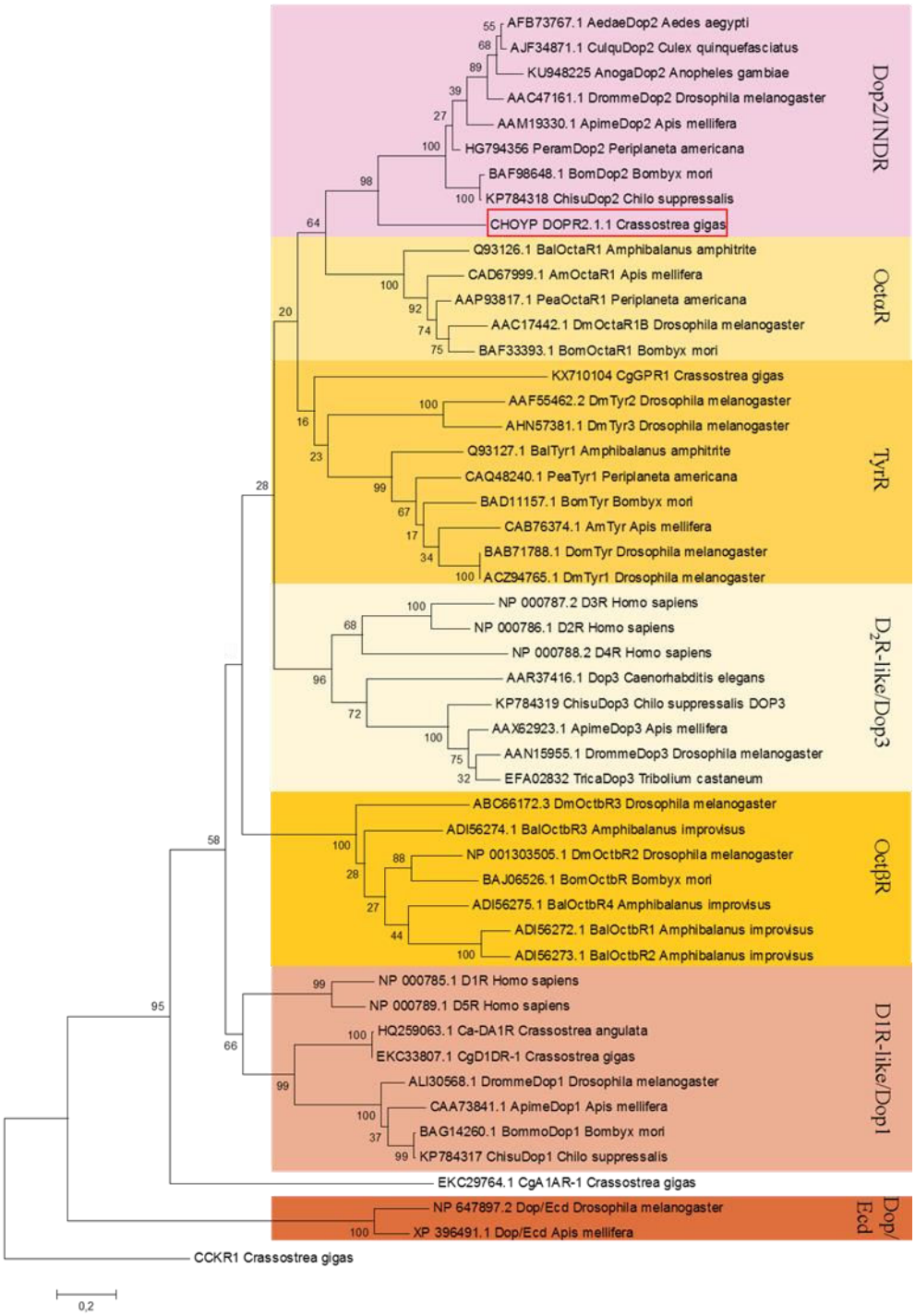


Figure 43 : Arbre phylogénétique représentant les différentes familles de récepteurs à la dopamine, octopamine et tyramine chez les Deutérostomiens et les Protostomiens. Les numéros des séquences sont notés avec le nom des récepteurs et l'espèce chez qui ils ont été identifiés. Le récepteur d'intérêt Cragi-DOPR.2.1.1 est encadré en rouge, Cet arbre a été réalisé avec le logiciel Mega version 6 (Tamura et al. 2013). Les domaines transmembranaires des récepteurs ont été alignés d'après la méthode MUSCLE (Edgar 2004) puis l'arbre a été constuit selon la méthode Maximum-Likelihood.

.

6.2.2.2 Caractérisation pharmacologique de Cragi-DOPR.2.1.1

Afin de confirmer l'appartenance du récepteur Cragi-DOPR.2.1.1. à la famille des récepteurs dopaminergiques, des tests d'activation du récepteur ont été réalisés avec les catécholamines suivantes : L-dopa, dopamine, tyramine, octopamine, noradrénaline et adrénaline. Les premiers tests ont été réalisés en co-exprimant les plasmides codant pour le récepteur d'intérêt et la protéine Gα16 dans un vecteur d'expression. Les premiers résultats ont montré que l'administration de dopamine, de tyramine, de noradrénaline et d'adrénaline entraînait une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire suggérant ainsi que l'ensemble de ces catécholamines active le récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 (Figure 44). Toutefois, l'administration de noradrénaline et d'adrénaline entraînait également une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire en l'absence d'expression du récepteur d'huître. De ce fait, il est possible que la noradrénaline et l'adrénaline activent des récepteurs adrénergiques exprimés de manière endogène au sein des cellules HEK293T. De plus, il est à noter que l'intensité du signal (en RFU : Relative Fluorescence Units) émise lors de l'administration de noradrénaline et d'adrénaline est identique, que le récepteur d'huître soit exprimé ou non (Figure 44).

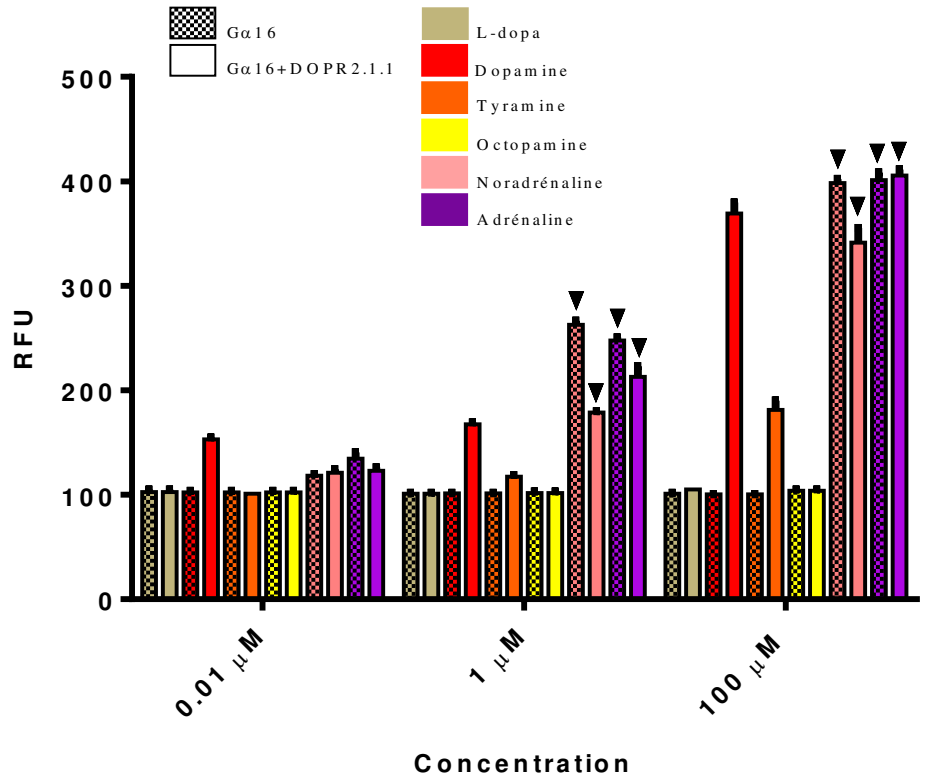


Figure 44 : Intensité de signal (en RFU) émise suite à l'administration des différentes catécholamines avec et sans expression du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1. Les flèches indiquent la noradrénaline et l'adrénaline.

6.2.2.3 Etude de la voie de signalisation endogène de Cragi-DOPR.2.1.1

Afin de connaître la voie de signalisation endogène activée par la liaison de la dopamine et de la tyramine au récepteur, seul le gène codant pour Cragi-DOPR.2.1.1 a été exprimé au sein du vecteur. L'activation du récepteur par la dopamine et la tyramine est à l'origine d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Ainsi, ces observations permettent de suggérer que la protéine G endogène recrutée lors de l'activation du récepteur est de type Gαq comme cela est le cas pour les récepteurs des familles Dop2/INDR, OctαR et TyrR. Il est à noter que l'activation du récepteur TricaDop3 de *Tribolium castaneum* peut également entraîner une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Verlinden et al. 2015).

De manière intéressante, l'intensité de signal obtenue lors de l'activation du récepteur par la tyramine est plus faible que celle obtenue par la dopamine, suggérant que la dopamine et la tyramine sont respectivement des agonistes plein et partiel du récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 (Figures 44 et 45). De plus, les EC 50 obtenus sont de l'ordre du nM pour la dopamine (≈7,5.10^{-9}M) et du µM (≈2,6.10^{-6}M) pour la tyramine. Chez les autres espèces, l'administration de dopamine entraîne une activation des récepteurs des différentes familles avec un EC_{50} variant de l'ordre du µM au nM (Verlinden 2018). L'ensemble de ces observations confirme que le récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 est de type dopaminergique.

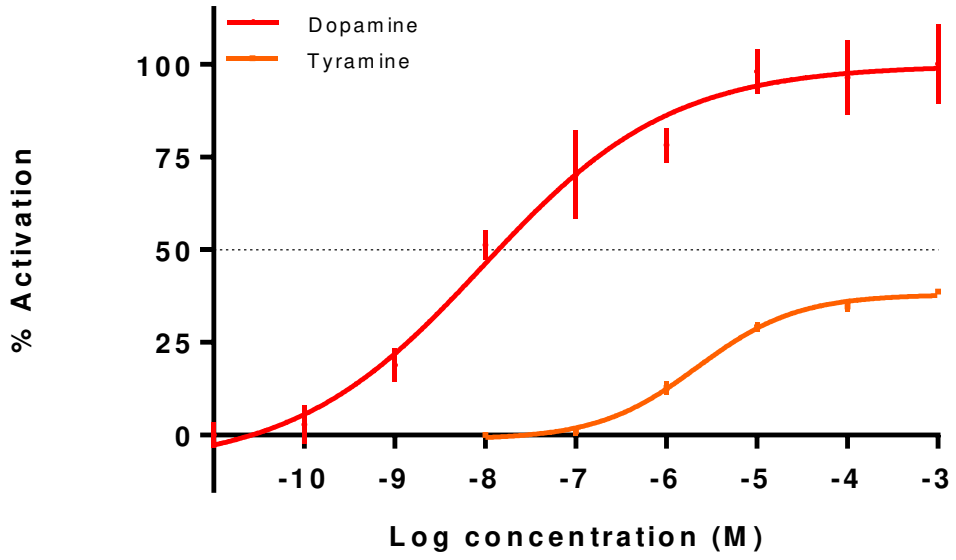


Figure 45 : Courbes effet dose représentant l'activation du récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 par la dopamine et la tyramine.

Il a également recherché si l'activation de Cragi-DOPR.2.1.1 entraînait le recrutement d'une protéine de type Gαs et par conséquent, l'augmentation d'AMPc intracellulaire, comme cela a

été montré pour les autres récepteurs de la famille Dop2/INDR. Les résultats des tests menés ont montré que les différentes catécholamines n'activent pas la voie de signalisation dépendante de l'AMPc. Ainsi, il semblerait que l'activation du récepteur entraîne uniquement le recrutement de la protéine Gαq comme cela a été observé pour le récepteur *Anoga*Dop2 chez *Anopheles gambiae* (Hill et al. 2016).

6.2.2.4 Expression de Cragi-DOPR.2.1.1 au cours du développement larvaire

Grâce aux données de RNA-seq accessibles (Zhang et al. 2012) depuis la banque GigaTON (Riviere et al. 2015), l'expression de Cragi-DOPR.2.1.1 a pu être observée au cours du développement (Figure 46).

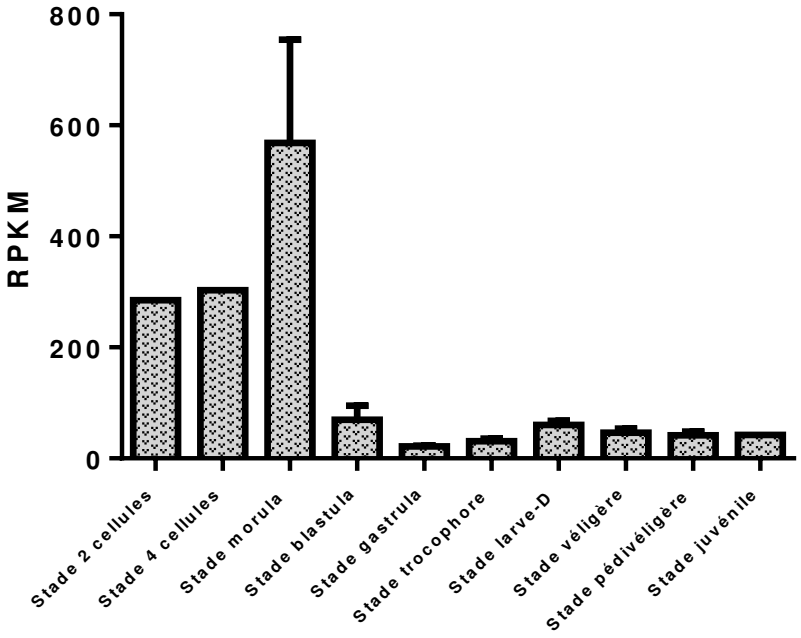


Figure 46 : Expression (en RPKM) de Cragi-DOPR.2.1.1 au cours du développement de l'huître.

De manière intéressante, le récepteur est exprimé de manière plus importante lors des premiers stades de développement et plus particulièrement lors du stade morula. De ce fait, ces observations suggèrent l'implication de ce récepteur dans les stades précoces de développement comme cela a été montré chez les arthropodes (Budnick et al. 1989; Martínez-Ramírez et al. 1992; Regna et al. 2016). De plus, les résultats montrent que le récepteur est exprimé de manière plus importante lors du stade de larve-D par rapport aux larves trochophore et véligère. Par ailleurs, il avait été montré que le récepteur CgD1DR-1 de *Crassostrea gigas*, était également exprimé de manière plus importante durant le stade de larve-D (Liu et al. 2018). De plus, un traitement de larves d'huîtres avec un antagoniste spécifique des récepteurs de la famille D_1R-

like avait entraîné une inhibition de la formation de la coquille, suggérant l'implication de CgD1DR-2 dans le développement de la coquille chez l'huître (Liu et al. 2018).

Les récepteurs de la famille Dop2 dont fait partie Cragi-DOP2R.1.1, sont plus proches des D_1R -like que des D_2R-like comprenant CgD1DR-1, et de ce fait, sont inhibés par les mêmes antagonistes. Aussi, ces observations suggèrent que Cragi-DOPR.2.1.1 pourrait également être impliqué dans le développement de la coquille.

6.2.2.5 Distribution tissulaire de l'expression de l'huître adulte

Des expériences de qPCR ont ensuite été menées afin de connaître l'expression tissulaire du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 (Figure 47).

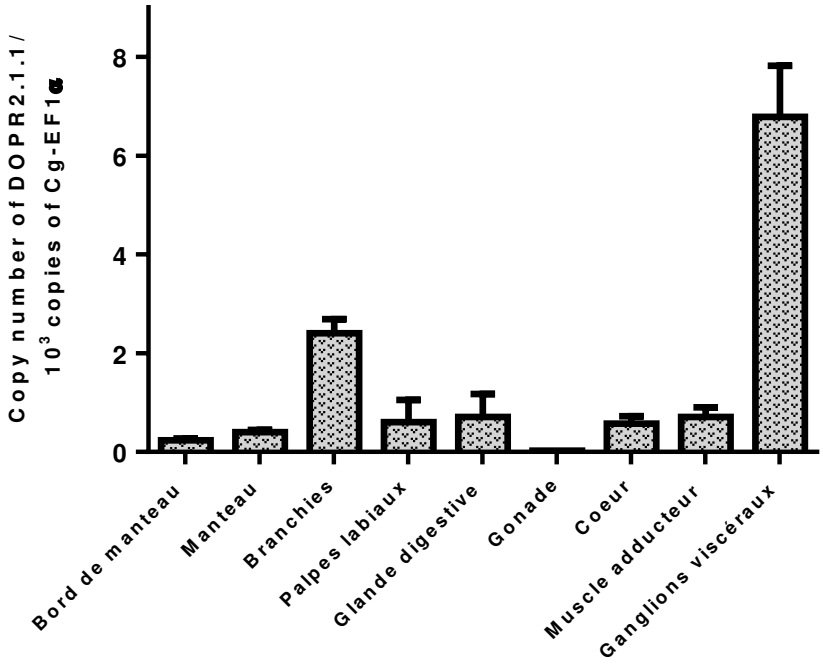


Figure 47 : Expression différentielle du gène codant le récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 (qPCR) au sein des différents tissus de l'huître adulte.

Ces expériences montrent que le gène est exprimé de manière importante au sein des ganglions viscéraux et des branchies mais faiblement au niveau des gonades. Toutefois, les gonades utilisées lors de l'expérience proviennent d'animaux dont le sexe et le stade de gamétogénèse sont inconnus. Or, il s'avère que les données de RNAseq ont montré que le récepteur est exprimé de manière importante chez les gonades d'huîtres femelles mais de stade inconnu. Aussi, le niveau d'expression du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 a été analysé au cours du cycle de spermatogenèse et d'ovogenèse, d'après les données d'expression publiées dans (Dheilly et al. 2012).

6.2.2.6 Expression du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 au cours du cycle de gamétogénèse

Ces analyses montrent que le gène d'intérêt est exprimé de manière significativement plus élevée au cours du stade 3 femelle par rapport au stade 0 indifférencié, suggérant l'implication de cette voie de signalisation dopaminergique dans la maturation des ovocytes et potentiellement dans l'induction de la ponte (Figure 48). De manière intéressante, ces données viennent compléter les observations menées chez *Crassostrea angulata* et montrant une expression importante du gène codant Ca-DAR1 lors du stade de prolifération des ovocytes. De ce fait, l'ensemble de ces analyses suggèrent l'implication de la voie dopaminergique dans la mise en place de l'ovogenèse ; lors du stade de prolifération des ovocytes pour Ca-DAR1 chez *Crassostrea angulata,* et potentiellement de son homologue chez *Crassostrea gigas*, et lors du stade de maturation pour Cragi-DOPR.2.1.1. Ainsi, la dopamine et ses récepteurs associés semblent être impliqués dans la fonction de reproduction chez l'huître comme cela a été montré chez les arthropodes.

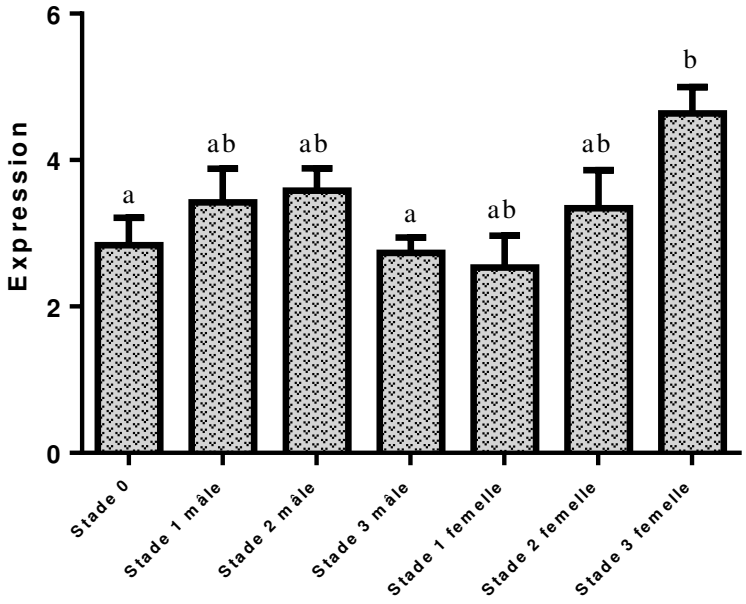


Figure 48 : Expression différentielle du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 en fonction des différents stades de gamétogenèse mâle et femelle. Les analyses ont été réalisées d'après les données d'expression publiées dans (Dheilly et al. 2012).

6.2.2.7 Expression différentielle du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 chez des huîtres conditionnées dans une eau dont la salinité a été abaissée

L'expression importante observée au sein des branchies semble corréler avec le rôle joué par la dopamine dans le battement des cils branchiaux (Carroll and Catapane 2007; Anador et al. 2011). Toutefois, il semblerait que seuls les récepteurs de type D_2R-like soient impliqués dans ce processus. Aussi, afin de comprendre le rôle joué par le récepteur au sein des branchies, des conditionnements consistant à réduire la salinité de manière progressive et brutale ont été

réalisés (Figure 39) et l'expression différentielle du gène codant le récepteur a été mesurée. En plus des branchies, des différences du niveau d'expression ont été observées dans les tissus suivants : bord de manteau, manteau et ganglions viscéraux.

Tableau 7 : Expression du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 au sein des branchies, du bord de manteau, du manteau et des ganglions viscéraux chez des huîtres témoins et conditionnées dans de l'eau dont la salinité a progressivement été diminuée (MC : Mild osmotic Conditioning). Des tests statistiques (test de Student $p<0,05$) ont été réalisés. Ns : non significatif.

	Cragi-DOPR.2.1.1		
Tissus	Témoins	Conditionnées (MC)	
Branchies	0,71 ± 0,21	1,04 ± 0,28	ns
Bord de manteau	0,45 ± 0,10	0,39 ± 0,5	ns
Manteau	0,24 ± 0,04	0,33 ± 0,10	ns
Ganglions viscéraux	2,12 ± 0,29	3,29 ± 0,53	ns

D'après les résultats obtenus, l'expression du gène codant le récepteur ne varie pas entre les huîtres témoins et conditionnées dans une eau dont la salinité a progressivement été diminuée (Tableau 7). Toutefois, une baisse significative de l'expression du gène est observée au sein des branchies d'huîtres ayant subi un stress osmotique brutal (Figure 49).

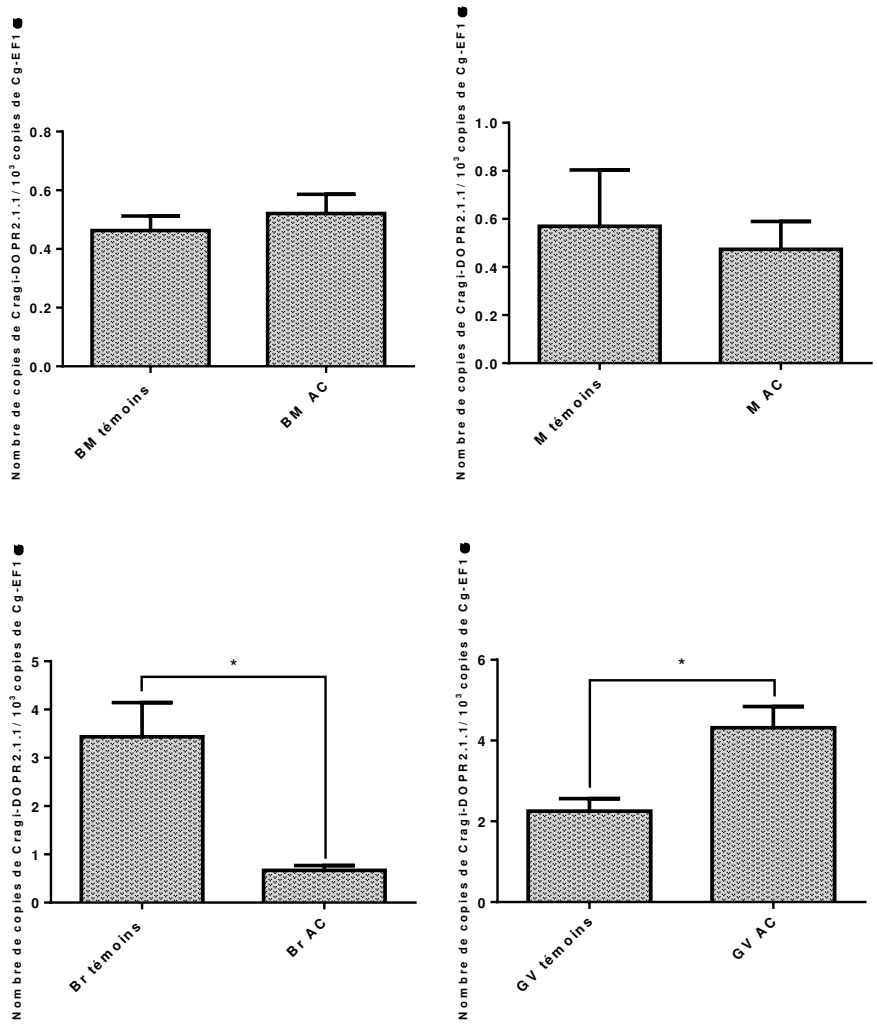


Figure 49 : Expression (qPCR) du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 au sein des bords de manteau (BM), du manteau (M), des branchies (Br) et des ganglions viscéraux (GV) chez les huîtres témoins et conditionnées dans une eau dont la salinité a été abaissée de manière brutale (AC : Acute osmotic Conditioning).

Les branchies jouent un rôle dans la respiration et dans la filtration des particules de l'eau. Aussi, la baisse significative observée suggère que le récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 joue un rôle dans la respiration et/ou la filtration branchiale. En effet, les huîtres ont été au préalable habituées à vivre dans une eau de mer dont la salinité a fortement chuté de manière brutale. Par conséquent, il est probable que les huîtres aient diminué leur filtration et/ou respiration afin de maintenir leur homéostasie. Ainsi, Cragi-DOPR.2.1.1 pourrait jouer un rôle dans cette diminution mais *via* un mécanisme différent de celui observé pour les récepteurs de type D_2R-like (Anador et al. 2011).

De manière intéressante, l'expression de ce même gène est significativement plus élevée au sein des ganglions viscéraux d'huîtres ayant subi le même conditionnement. Aussi, il peut être supposé que cette élévation est en relation avec le phénomène de stress subi par l'huître lors du changement brutal de salinité de l'eau. En effet, des études ont montré que la dopamine est

impliquée dans la réponse au stress chez *Crassostrea gigas*. Ainsi, il a été décrit une augmentation de la concentration en dopamine au sein de l'hémolymphe suite à un stress mécanique (Lacoste et al. 2001). Il semble donc que l'expression élevée du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 au sein des ganglions viscéraux soit liée à l'augmentation du taux de dopamine circulante au sein de l'hémolymphe. Ainsi la dopamine libérée pourrait activer les récepteurs à la dopamine présents dans les ganglions viscéraux en réponse à un stress aigu afin d'induire des réponses adaptées.

6.2.2.8 Conclusion

Ainsi, un récepteur de type dopaminergique a été identifié et caractérisé chez l'huître *Crassostrea gigas*. D'après les analyses phylogénétiques, ce récepteur Cragi-DOPR.2.1.1 fait partie de la famille Dop2 des Protostomiens, homologue de la famille D_2R-like des vertébrés. Les tests d'activation du récepteur avec différentes catécholamines ont montré que Cragi-DOPR.2.1.1 est activé par la dopamine et dans une moindre mesure, par la tyramine. De plus, ces tests ont montré que l'activation du récepteur entraînait le recrutement d'une protéine Gαq, menant à l'augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire, comme cela est le cas chez les récepteurs de type dop2/INDR. Toutefois, il serait intéressant de tester l'activation et l'inhibition de Cragi-DOPR.2.1.1 par des agonistes et antagonistes spécifiques des différentes familles de récepteurs dopaminergiques afin de prouver de manière pharmacologique l'appartenance de Cragi-DOPR.2.1.1 à la famille Dop2.

Par ailleurs, les différentes analyses de données RNA-seq et de qPCR ont montré que le récepteur pouvait être impliqué dans différentes fonctions : filtration/respiration, stress, reproduction et développement, comme cela est le cas chez les vertébrés et les arthropodes. Ainsi, l'ensemble de ces analyses montre la richesse de la voie dopaminergique ainsi que sa conservation au cours de l'évolution des Bilatériens.

6.2.2.9 Matériel et méthodes supplémentaires

Expression du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 au cours du cycle de développement

L'étude de l'expression du gène codant DOPR.2.1.1 (CHOYP_DOPR.2.1.1) au cours du développement larvaire a été réalisée d'après les données du tableau S14 « Transcriptomic representation of gene (RPKM) at different developmental stages and in different adult organ » (Zhang et al. 2012a) disponibles depuis l'interface GigaTON (Riviere et al. 2015). Le graphique représente les stades de développement : 2 cellules, 4 cellules, morula, blastula, gastrula, trochophore, larve-D, larve véligère, larve pédivéligère et larve juvénile. Ces stades regroupent les catégories du tableau S14 selon la répartition suivante : 2 cellules (Two Cells), 4 cellules (Four Cells), morula (Morula, Early Morula), blastula (Rotary Movement), gastrula (Gastrula, Early Gastrula), trochophore (Trochophore 1-5), larve-D (Early D-shaped larvae 1-2, D-shaped larvae 1-7), larve véligère (Early Umbo 1-2, Umbo 1-6), larve pédivéligère (Pediveliger 1-2) et larve juvénile (Juveline) (Figure 47).

Expression du gène codant Cragi-DOPR.2.1.1 au cours du cycle de gamétogenèse

L'étude de l'expression du gène codant DOPR.2.1.1 au cours du cycle de gamétogenèse a été obtenue par extraction des données de (Dheilly et al. 2012) réalisées sur les *expressed sequence tags* (EST) sélectionnées depuis la banque de données GigasDatabase (Fleury et al. 2009). Les données numériques de la séquence de l'EST (CU685044) correspondant à Cragi-DOPR.2.1.1 sont exprimées en valeurs logarithmiques normalisées d'après les valeurs d'expression de l'ensemble des gènes. Aussi, afin de décrire l'expression différentielle de Cragi-DOPR.2.1.1 selon les différents stades de gamétogenèse, les valeurs ont été transformées en valeurs arithmétiques en utilisant la formule suivante : $10^{(1-x)}$. Des tests statistiques (ANOVA, $p<0,05$) ont été réalisés afin de comparer l'expression du gène selon les stades de gamétogenèse (Figure 48).

Discussion générale et conclusion

Discussion et conclusion générale

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la grande majorité des RCPGs est orpheline et leurs ligands sont par conséquent inconnus. Aussi, ce travail de thèse avait pour objectif de caractériser de manière fonctionnelle des couples neuropeptide(s)/récepteur(s) impliqués dans la régulation physiologique de l'huître. Grâce à la méthode d'endocrinologie inverse, plusieurs récepteurs, ayant fait l'objet des chapitres précédents, ont pu être « déorphanisés » avec des ligands identifiés lors de la caractérisation du neuropeptidome (Cragi-CCK/SK, Cragi-TKs) (Stewart et al. 2014) ou dans les banques de données transcriptomiques (Cragi-CTs) (Riviere et al. 2015). L'ensemble de ces résultats a montré que ces couples neuropeptide(s)/récepteur(s) présentaient des homologies de séquences avec les neuropeptides et récepteurs d'autres espèces deutérostomiennes et protostomiennes corroborant l'hypothèse de co-évolution neuropeptides/récepteurs depuis l'ancêtre commun des Bilatériens (Jekely 2013; Mirabeau and Joly 2013; Elphick et al. 2018).

Toutefois, il a été montré que plusieurs systèmes neuropeptidergiques ont été perdus au cours de l'évolution chez certains taxons ou bien, sont spécifiques d'un seul taxon (Mirabeau and Joly 2013).

1 Perte et spécificité des systèmes neuropeptidergiques chez différents taxons

En effet, comme cela a été présenté au cours du chapitre II, il semblerait que la DH31 soit issue de la duplication du gène codant pour la CT survenue à la base des Protostomiens. De ce fait, la DH31 serait absente chez l'ensemble des Deutérostomiens. Ainsi, lors de l'identification de la première DH31 chez le cafard *Diploptera punctata*, les analyses ont montré que la DH31 présentait des homologies de séquences avec la CT, suggérant que la DH31 était l'homologue fonctionnel de la CT chez les Protostomiens (Furuya et al. 2000; Conzelmann et al. 2013). Toutefois, grâce à de récentes analyses menées sur les banques de données de plusieurs espèces d'arthropodes, il a pu être montré que la CT était également présente chez les lépidoptères, les coléoptères, le criquet *Locusta migratoria,* le termite *Zootermopsis nevadensis* et *Phlebotomus papatasi* (Veenstra 2014). Cependant, la CT semble être absente chez *Drosophila melanogaster* et les autres mouches, chez les moustiques, les aphides, les hyménoptères et chez *Rhodnius prolixus* (Veenstra 2014).

De plus, à l'heure actuelle, seuls des peptides de type CT ont été identifiés chez les nématodes (Mirabeau and Joly 2013) et les mollusques (Veenstra 2010; Zhang et al. 2018). Aussi, il semblerait que la CT soit conservée chez l'ensemble des Bilatériens exceptés chez quelques espèces d'arthropodes et que la DH31 ait été perdue chez les nématodes et les mollusques (Veenstra 2014; Cai et al. 2018).

Toutefois, il est difficile d'identifier des ligands d'une même famille chez différentes espèces sur la seule base de leur homologie de séquences, comme cela est le cas pour la CT/DH31. En effet, l'homologie est généralement faible et au vu de la petite taille des neuropeptides, seuls quelques acides aminés sont conservés. Aussi, afin d'identifier des neuropeptides d'intérêt, il s'avère nécessaire de s'intéresser à leurs récepteurs. Ainsi, de nombreux récepteurs ont été identifiés sur la base d'homologies de séquences avec des récepteurs déjà caractérisés chez d'autres espèces deutérostomiennes et/ou protostomiennes.

2 Comment identifier des récepteurs homologues chez l'huître?

- sur la base d'homologies de séquences avec des récepteurs de la même famille chez d'autres espèces

Au sein des banques de données de l'huître (Zhang et al. 2012a; Riviere et al. 2015), six récepteurs (CHOYP_CCKAR.1.6 à CHOYP_CCKAR.6.6) sont annotés comme étant des récepteurs homologues aux CCKRs d'autres espèces. Aussi, il a été recherché parmi l'ensemble de ces récepteurs, les véritables récepteurs homologues de type CCKR chez l'huître. En effet, chez les autres espèces, exceptés chez *Ciona intestinalis* (Janssen et al. 2008), il existe uniquement deux récepteurs de type CCKR, comme par exemple CCK1R et CCK2R chez les mammifères (Dufresne et al. 2006). De ce fait, un arbre phylogénétique a été réalisé afin de positionner les six récepteurs potentiels d'huître par rapport à des séquences de CCKR d'autres espèces prédites et « déorphanisées ». Cette analyse phylogénétique a permis de sélectionner parmi les six récepteurs potentiels, deux récepteurs, Cragi-CCKR1 et Cragi-CCKR2, comme étant d'éventuels récepteurs de type CCKR chez l'huître. De façon intéressante, les gènes codant les CCKRs des autres espèces partagent une organisation génomique similaire puisqu'un des introns est situé à une position conservée au cours de l'évolution (Mirabeau and Joly 2013). Aussi, il a été étudié l'organisation génomique de l'ensemble des six récepteurs potentiels et il a pu être montré que seuls Cragi-CCKR1 et Cragi-CCKR2 possédaient un intron positionné à un emplacement spécifique au sein du troisième domaine transmembranaire (Annexe 1).

L'ensemble de ces analyses a donc permis de sélectionner les récepteurs Cragi-CCKR1 et Cragi-CCKR2 comme potentiels homologues des CCKRs d'autres espèces.

Dans certains cas, comme cela a été montré lors du chapitre II traitant de la voie de signalisation de type CT/DH31, il est difficile d'identifier parmi les récepteurs potentiellement homologues à un type de famille, les véritables récepteurs homologues de l'huître. En effet, les analyses *in silico* ont permis d'identifier sept récepteurs (CHOYP_CALCR.1.6, CHOYP_CALCR.2.6, CHOYP_CALCR.3.6, CHOYP_CALCR.4.6, CHOYP_CALCR.6.6, CHOYP_CALRL.2.3 et CHOYP_CALRL.3.3) potentiellement homologues aux CTRs/DH31Rs d'autres espèces. Aussi, afin de discriminer les réels CTRs/DH31Rs d'huître parmi l'ensemble de ces récepteurs, des analyses phylogénétiques ont été réalisées avec des CTRs/DH31Rs d'autres espèces. Toutefois, d'après ces analyses, il semblerait que ces sept récepteurs fassent partie de la grande famille des CTRs/DH31Rs (Figure 1 de l'article Characterization of an evolutionarily conserved calcitonin signaling system in a lophotrochozoan, the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)). De ce fait, l'ensemble de ces récepteurs peut potentiellement lier des CT/DH31 et doit donc faire l'objet d'études supplémentaires.

Dans d'autre cas, le ligand est déjà clairement identifié et peut permettre l'identification du RCPG associé. Ainsi, lors de ce travail de thèse, des analyses ont été effectuées afin d'identifier le récepteur à l'APGWamide chez l'huître.

- lorsque le ligand a déjà été identifié

L'APGW/RGWamide correspond à une famille de neuropeptides spécifiques des Lophotrochozoaires (l'APGWamide est spécifique des mollusques et RGWamide des annélides) et a été identifiée pour la première fois chez les gastéropodes (Kuroki et al. 1990). Ces neuropeptides sont impliqués dans le comportement sexuel et les fonctions reproductrices chez les mâles (Li et al. 1992). Le premier récepteur à l'APGW/RGWamide a été identifié lors des expériences de « déorphanisation » à grande échelle menées chez *Platynereis dumerilii* (Bauknecht and Jékely 2015). Lors de ce travail, des analyses ont été entreprises afin de rechercher dans les banques de données, des récepteurs homologues au « RGWamide receptor 1 » d'autres espèces. Ces analyses ont montré que seuls des récepteurs homologues potentiels à l'APGW/RGWamide étaient présents chez les Lophotrochozaires, renforçant ainsi l'hypothèse émise que la voie de signalisation de type APGW/RGWamide est spécifique de ce taxon. Parmi ces récepteurs, un homologue a été proposé chez l'huître *Crassostrea gigas* (Bauknecht and Jékely 2015). De plus, ce récepteur (CHOYP_ FMAR.1.1) est, d'après les

données de RNAseq (Zhang et al. 2012a; Riviere et al. 2015), exprimé de manière importante au sein de la gonade mâle. Sur la base de ces observations, ce récepteur a donc été cloné et testé avec les peptides de type APGWamide préalablement identifiés au sein du neuropeptidome de l'huître (Stewart et al. 2014). Ces tests n'ayant pas été concluants, des analyses supplémentaires ont été réalisées afin d'identifier le récepteur à l'APGW/RGW chez l'huître. En effet, des analyses phylogénétiques (effectuées grâce au logiciel www.phylogeny.fr) et des BLAST ont été réalisés à partir de la séquence du « RGWamide receptor 1 » de *Platynereis dumerilii*, permettant ainsi d'identifier deux autres récepteurs potentiels à l'APGW/RGWamide (CHOYP_PHUM_PHUM28560.1.2 et XP_011428253.1). Par conséquent, de nouveaux tests ont été réalisés afin d'éprouver l'activation de ces récepteurs potentiels par les peptides de type APGW/RGWamide d'huître. Ces autres tests n'ayant pas été concluants, le récepteur à l'APGW/RGWamide de l'huître *Crassostrea gigas* reste à ce jour inconnu. L'ensemble de ces expériences illustre bien la difficulté à identifier des couples neuropeptide(s)/récepteur(s) sur la seule base de l'homologie de séquences.

- méthodologie employée

Toutefois, il est possible que le récepteur d'intérêt puisse être un des récepteurs potentiels identifiés. En effet, les tests d'activation ont été réalisés en présence de la protéine Gα16 ayant la capacité de se coupler à la grande majorité des RCPGs (80%) et qui par conséquent, peut ne pas se lier à certains récepteurs. Pour pallier ce problème, il faudrait expérimenter les multiples voies de signalisation afin de déterminer la protéine G se couplant de manière endogène au récepteur. Cependant, face à la diversité de protéines G, cela supposerait de maîtriser de nombreux tests fonctionnels ce qui peut s'avérer coûteux et chronophage. Aussi, dans la majorité des cas, il est nécessaire de s'intéresser aux différentes voies de signalisation impliquées lors de l'activation des récepteurs homologues chez les autres espèces afin de prédire la protéine G recrutée lors de la liaison ligand/récepteur. Ainsi, l'ensemble des expériences présentées au cours des différents chapitres de cet ouvrage a montré la conservation des voies de signalisation de la CCK/SK, de la CT/DH31 et de la dopamine chez *Crassostrea gigas*. Toutefois, concernant l'étude de la voie de signalisation de type APGW/RGWamide, le manque de données bibliographiques ne permet pas de pouvoir prédire le couplage du récepteur avec une catégorie spécifique de protéine G.

En effet, lors de l'étude de « déorphanisation » à grande échelle réalisée chez *Platynereis dumerilii*, l'activité du récepteur « RGWamide receptor 1 » a tout d'abord été éprouvée, en co-exprimant les gènes codant pour le récepteur et la protéine Gα16 afin de tester la liaison

neuropeptide/récepteur puis, en exprimant uniquement le gène codant le récepteur (Bauknecht and Jékely 2015). Ainsi, les résultats obtenus lors des tests d'activation du récepteur en absence de protéine Gα16 montrent que la protéine G recrutée n'est pas de type Gαq, mais ne permettent pas de conclure sur la nature exacte de la protéine G endogène. Outre les différents aspects évoqués précédemment, d'autres raisons peuvent expliquer la difficulté à identifier des récepteurs spécifiques sur le plan fonctionnel. En effet, comme cela a été évoqué lors du chapitre II, certains récepteurs peuvent nécessiter le couplage de protéines accessoires afin d'être exprimés à la membrane plasmique et de transduire un signal.

- le récepteur peut nécessiter une dimérisation

Ainsi, le CTR nécessite le couplage à des protéines de type RAMP afin de former les récepteurs à l'amyline, et à des protéines de type RAMP et RCP afin de constituer des récepteurs au CGRP et à l'AM. De plus, les protéines de type RAMP peuvent se lier à d'autres familles de récepteurs comme les récepteurs à l'hormone parathyroïdienne, au glucagon et au VIP/PACAP (Vasoactive Intestinal Peptide/Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) (Cueille and Garel 2004).

Chez l'homme, les protéines RAMP ne partagent entre elles qu'une faible homologie de séquences de moins de 30%, rendant difficile la recherche de ce type de protéines accessoires chez d'autres espèces. En effet, de récentes analyses ont permis d'identifier des protéines de type RAMP chez le céphalochordé *Branchiostoma floridae* présentant entre 15 et 40% d'identité de séquences avec les RAMPs humaines (Sekiguchi et al. 2016). Ainsi, malgré des analyses *in silico*, aucune protéine de type RAMP n'a été identifiée au sein des banques de données de l'huître. Toutefois, une protéine accessoire de type RCP nommée Cragi-RCP a pu être identifiée par identité de séquences avec la RCP humaine.

Par ailleurs, outre les protéines de type RAMP et RCP, il existe d'autres types de protéines accessoires. En effet, l'hormone hypophysaire ACTH (« Adreno Cortico Trophic Hormone »), active le récepteur nommé mélanocortine 2 (MC2R) entraînant ainsi la libération de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Pour cela, le récepteur MC2R se couple à une protéine accessoire à un domaine transmembranaire appelée MRAP (« Melanocortin 2 Receptor Accessory Protein »), nécessaire à son acheminement à la membrane cellulaire (Xu et al. 2002; Metherell et al. 2005; Webb and Clark 2010). De manière intéressante, il a été montré que chez certains patients atteints de FDG (« Familial Glucocorticoid Deficiency ») de type 2, une insensibilité à l'ACTH peut être due à des mutations au niveau de la protéine MRAP

(Metherell et al. 2005). D'autres protéines peuvent également servir de chaperons moléculaires. Ainsi, chez *Drosophila melanogaster*, la protéine NinaA permet l'acheminement à la membrane cellulaire du récepteur à la rhodopsine (Rh1).

Outre la nécessité de se coupler à des protéines accessoires, certains récepteurs ont besoin de former des dimères avec d'autres récepteurs (hétérodimères) afin d'induire une réponse biologique. Ainsi, le GABA se lie au $GABA_BR1$ qui n'a pas la capacité à l'état de monomère de se coupler à une protéine G. Aussi, $GABA_BR1$ a besoin de former un hétérodimère avec $GABA_BR2$ qui peut lui se lier à une protéine G et par conséquent, entraîner une réponse biologique. De plus, $GABA_BR2$ sert également de chaperon moléculaire puisqu'il permet l'adressage à la membrane de $GABA_BR1$ (Pin et al. 2004, 2009).

En plus des GABARs, les récepteurs au goût sucré et umami (désigné comme « cinquième saveur » avec le sucré, le salé, l'amer et l'acide) constituent également des exemples d'hétérodimères obligatoires. En effet, les RCPGs de type T1R1 (Taste Receptor), T1R2 et T1R3 ne sont pas fonctionnels à l'état de monomère et ont besoin de s'associer en hétérodimères T1R1/T1R3 et T1R2/T1R3 pour recevoir et transmettre respectivement les goûts sucrés et umami (Nelson et al. 2001, 2002).

Ainsi, certains récepteurs ont besoin de former des dimères avec des protéines accessoires ou avec d'autres récepteurs, afin d'être acheminés à la membrane cellulaire et d'entraîner une réponse biologique, rendant la recherche de couples ligand(s)/récepteur(s) complexe. Toutefois, il serait intéressant de vérifier l'adressage à la membrane de récepteurs d'intérêt à l'aide d'un marquage fluorescent et ce, en fusionnant le récepteur d'intérêt avec une protéine à fluorescence verte (GFP : « Green Fluorescence Protein »).

Outre ces aspects, cette recherche se heurte à d'autres difficultés, notamment lorsque les séquences des récepteurs prédits ne sont que partielles ou comportent des erreurs.

- le récepteur présente une séquence partielle ou incorrecte dans les banques de données

Ainsi, concernant le récepteur Cragi-CTR2, des expériences de RACE-PCR ont dû être réalisées afin d'obtenir la séquence complète du gène codant le récepteur. De même, l'ensemble des récepteurs identifiés comme étant des récepteurs potentiels à la CT/DH31 n'ont pu être clonés au cours de cette thèse.

En effet, d'après les banques de données, la séquence du gène d'un de ces récepteurs (Cragi-CTR4 ; CHOYP_CALCR2.6) semblait incomplète puisque ne comportant pas les 7 domaines transmembranaires caractéristiques des RCPGs. De plus, d'après les banques de données, deux autres récepteurs (respectivement Cragi-CTR6 et Cragi-CTR7; CHOYP_CALCR6.6 et CHOYP_CALCR3.6) disposaient d'une séquence complète comprenant les 7 domaines transmembranaires ainsi que d'une extrémité N-terminale débutant par un acide aminé méthionine et d'une extrémité C-terminale terminée par un codon stop. Toutefois, suite à plusieurs tentatives de clonage avec différents couples d'amorces, il n'a pas été possible d'amplifier les séquences d'acides nucléiques correspondant aux gènes codant les récepteurs par PCR.

En effet, il est possible que ces séquences comportent des inexactitudes dues à des erreurs d'assemblage des fragments séquencés effectuées lors du séquençage du génome ou des transcriptomes de l'huître. En effet, les nouvelles méthodologies de séquençage haut débit (Illumina) reposent sur le séquençage d'une quantité considérable de petits fragments d'ADN lesquels sont ensuite assemblés *in silico*. Aussi, afin de pallier ce problème, des amorces internes aux séquences des différents gènes ont été désignées afin d'obtenir la séquence complète des récepteurs CHOYP_CALCR2.6, CHOYP_3.6 et CHOYP_6.6 par une approche de type RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) 5' ou 3'. Cependant, par faute de temps, ces travaux complémentaires n'ont pas pu être réalisés durant cette thèse.

Aussi, il serait intéressant de poursuivre ces expériences et de cloner l'ensemble de ces récepteurs potentiels ainsi que le récepteur Cragi-CTR5 (CHOYP_CALRL.2.3) dans le but de tester leurs activations par les ligands Cragi-CT1a, Cragi-CT1b, Cragi-CT2a et Cragi-CT2b.

Ainsi, ces nouvelles expériences pourraient permettre d'identifier les récepteurs liant les peptides Cragi-CT1a et Cragi-CT2a qui à ce jour, restent inconnus. Toutefois, il est probable que ces récepteurs orphelins lient d'autres types de peptides et potentiellement un peptide de type DH31 qui n'a pas encore été identifié.

En effet, de manière générale, le nombre de résidus et motifs conservés entre les neuropeptides des différentes espèces est relativement faible, rendant les annotations difficiles. Aussi, pour les espèces dont le neuropeptidome a été identifié et annoté d'après des homologies de séquences, il serait intéressant de tester ces neuropeptides face à une bibliothèque de récepteurs déjà clonés. Toutefois, il est possible que la liste des peptides présents au sein des neuropeptidomes ne soit pas exhaustive. En effet, la reconnaissance des neuropeptides requiert des approches distinctes de celles permettant l'identification d'homologues de grandes protéines, lesquelles possèdent le plus souvent des domaines protéiques bien conservés au cours de l'évolution, comme cela est le cas des RCPGs. Aussi, il est nécessaire d'associer ces analyses *in silico* avec des technologies permettant l'identification des peptides matures *via* des approches mettant en œuvre des extractions peptidiques à partir de tissus biologiques couplées à des analyses le plus souvent en spectrométrie de masse. Ces méthodologies évoluent considérablement en termes de sensibilité, si bien qu'il devient nécessaire de développer des critères pour différencier ce qui relève de formes moléculaires en cours de maturation de celles qui sont matures et biologiquement actives.

Malgré cela, afin d'éviter de tester les neuropeptides de manière individuelle, ce qui serait long et coûteux, il est envisageable de diminuer le nombre d'expériences en regroupant un nombre important de peptides en plusieurs mélanges et cela en fonction de leurs points isoélectriques (pI ou pKi). Ainsi, ces différents mélanges peuvent être testés contre divers RCPGs (Bauknecht and Jékely 2015).

Par la suite, les RCPGs activés par un mélange spécifique, peuvent alors être testés avec plusieurs sous-mélanges afin d'identifier le ou les ligands endogène(s). Grâce à cette méthode, il est possible d'identifier des couples ligand(s)/récepteur(s) qu'il aurait été difficile de prédire uniquement par des analyses *in silico* (Figure 50).

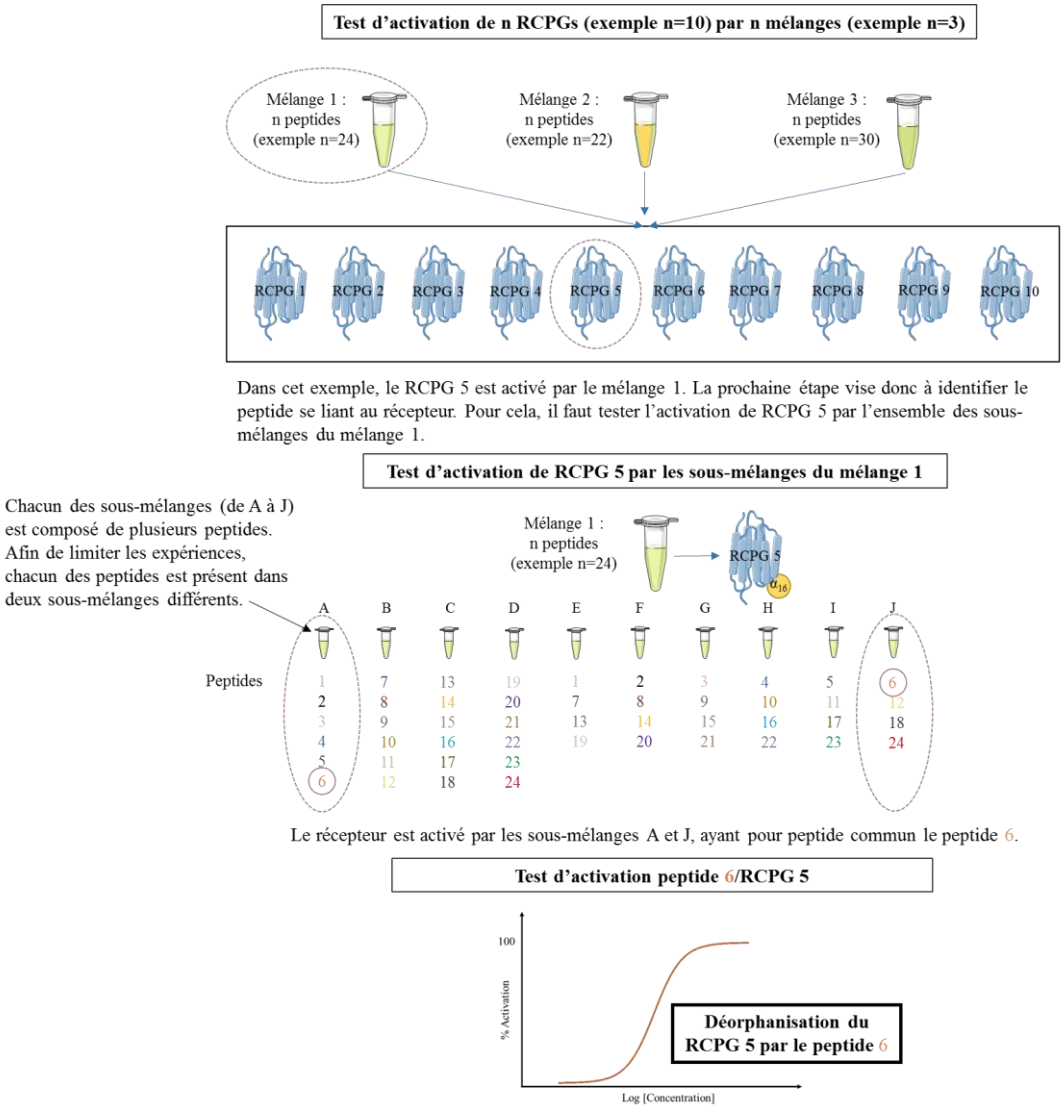


Figure 50 : Méthode de « déorphanisation » à grande échelle. Adaptée de (Bauknecht and Jékely 2015).

Cette méthode peut également permettre de confirmer l'appartenance de certains récepteurs à un type de famille spécifique. En effet, les RCPGs d'une même famille possèdent des domaines de séquences homologues (Johnsen 1998) et des caractéristiques communes comme par exemple une organisation génomique particulière (chapitre I). Au cours de cette thèse, deux autres récepteurs (EKC35560.1 : CHOYP_ANR1.1 et EKC23715.1) ont été prédits comme liant respectivement des neuropeptides apparentés à la famille de l'annétocine (Oumi et al. 1994) et de la céphalotocine (Reich 1992) appartenant tous les deux à la famille des peptides de type ocytocine/vasopressine. En effet, l'annétocine a été isolée pour la première fois chez l'annélide *Eisenia foetida* (Oumi et al. 1994) et s'avère être impliquée dans l'osmorégulation. La céphalotocine a quant à elle été isolée chez le céphalopode *Octopus vulgaris* et identifiée sur la base d'une importante homologie de séquences (78 %) avec la mésotocine, l'isotocine et la vasopressine de vertébrés (Reich 1992). Ainsi, c'est sur la base de ces observations que les

deux récepteurs d'huîtres potentiels aux peptides de type annétocine et céphalotocine ont été testés avec plusieurs peptides identifiés comme faisant partie de la famille de type ocytocine/vasopressine chez *Crassostrea gigas* (Stewart et al. 2014). Cependant, les tests d'activation des récepteurs n'ayant pas été concluants, il pourrait être utile d'avoir recours à la méthode de « déorphanisation » à grande échelle présentée précédemment afin d'identifier les peptides endogènes (Figure 50).

Cette méthode pourrait également être utilisée afin de caractériser le(s) récepteur(s) spécifique(s) au peptide Cragi-CCK2. En effet, contrairement à Cragi-CCK1 qui active les récepteurs Cragi-CCKR1 et Cragi-CCKR2, le peptide Cragi-CCK2 active uniquement Cragi-CCKR1 mais avec de fortes concentrations (Schwartz et al. 2018). Aussi, il a été supposé que le récepteur liant Cragi-CCK2 de manière endogène, présentait des homologies de séquences avec Cragi-CCKR1. Sur la base de ces observations, un récepteur prédit comme étant un récepteur de type CCKR1 d'huître (CHOYP_OX2R.1.3, XP_019922335.1) a été identifié dans les banques de données. De ce fait, ce récepteur a été cloné et testé avec Cragi-CCK1 et Cragi-CCK2. Ces tests ont montré que ces peptides n'activent pas le récepteur. Par conséquent, le récepteur liant Cragi-CCK2 reste à ce jour inconnu. Aussi, il serait intéressant de poursuivre les investigations afin de compléter l'étude de la voie de signalisation de type CCK/SK chez l'huître.

L'identification des couples ligand(s)/récepteur(s) a constitué une étape très importante dans ce travail de thèse. Toutefois, afin de compléter ces recherches, il a paru nécessaire de s'intéresser aux différentes fonctions physiologiques associées à ces systèmes neuropeptidergiques.

3 Implication des couples neuropeptides/récepteurs dans la physiologie de l'huître

Outre les homologies de séquences entre les systèmes neuropeptidergiques d'huître et de ceux d'autres espèces, il est important de s'intéresser à l'évolution des différentes fonctions physiologiques associées à ces systèmes.

Pour cela, une première étape peut consister à étudier l'expression des gènes codant les peptides et récepteurs d'intérêt dans les différents tissus adultes de l'huître. Ces données peuvent être obtenues en analysant les données RNAseq disponibles dans les banques transcriptomiques puis complétées en effectuant des expériences de qPCR. En effet, grâce à l'exploitation de ces données, une expression différentielle tissulaire des transcrits peut être constatée, permettant

ainsi d'émettre des hypothèses quant à la potentielle fonction régulée par un couple ligand/récepteur. De plus, des études de la distribution spatio-temporelle peuvent être effectuées afin de spécifier le rôle régulateur joué par ces couples. Ces expériences peuvent également être complétées par des hybridations *in situ* permettant de localiser l'expression tissulaire du gène d'intérêt. De ce fait, à travers ces différentes techniques, il est possible d'analyser l'expression différentielle des gènes au cours des différents stades de la gamétogenèse mâle et femelle afin de préciser le rôle joué par les couples ligands/récepteurs. Par ailleurs, il est également possible de comparer l'expression des gènes d'intérêt en fonction de différentes conditions (dessiccation, stress salins, privation de nourriture, changement de température…)

De plus, des analyses en spectrométrie de masse peuvent permettre de localiser la présence de peptides matures au sein des différents tissus. En effet, à l'aide des masses des peptides synthétiques utilisés comme masses de référence, il est possible de discriminer les peptides matures ayant subi des modifications post-traductionnelles telles qu'une sulfatation. De plus, les analyses en spectrométrie de masse permettent de déterminer la localisation des tissus cibles des différents peptides qui doit *a priori*, être corrélée à la présence de leurs récepteurs spécifiques. En outre grâce à des anticorps spécifiques dirigés contre des séquences peptidiques endogènes et immunogènes du récepteur d'intérêt ou contre les peptides matures, il est possible de déterminer sur des coupes de différents tissus, la localisation précise des récepteurs et des peptides. Des analyses d'histologie quantitative peuvent également être envisagées pour permettre d'évaluer de manière quantitative la présence des peptides et des récepteurs

Par ailleurs, grâce à ces anticorps, des expériences d'immunohistochimie en « whole mount » peuvent être réalisées sur des embryons et des larves d'huîtres afin de comparer la présence de peptides et de récepteurs durant les premiers stades de développement.

Disposant de la séquence de peptides matures, il est également envisageable de réaliser des tests d'activité biologique *in vitro* afin de comprendre l'implication de ces couples neuropeptides/récepteurs dans la régulation de la physiologie de l'huître. En effet, des tests peuvent être mis en place afin d'étudier l'activité myotrope de certains organes comme l'intestin, induite par l'administration de différents peptides (Henry et al. 1999, 2000; Zatylny-Gaudin et al. 2010; Schwartz et al. 2018). Ces expériences peuvent également être complétées par des dosages de sécrétions enzymatiques permettant de montrer l'implication d'un système neuropeptidergique dans la digestion par exemple (Favrel et al. 1994; Giard et al. 1995; Nachman et al. 1997, 1999) ou *via* la mesure de l'incorporation de précurseurs radioactifs

(Leucine tritiée, Thymidine tritiée) pour mesurer l'effet d'un neuropeptide sur respectivement la croissance et la prolifération cellulaires (Lebel et al. 1996; Giard et al. 1998)

De plus afin de confirmer l'implication d'un récepteur d'intérêt dans une fonction particulière, il peut être envisagé de mettre en place des tests d'invalidation de gènes de récepteurs comme la méthode CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9 (CRISP associated protein 9) (Bhaya et al. 2011; Cong et al. 2013). Toutefois, le CRISP-Cas 9 n'a pas encore été mis au point chez l'huître et constitue un challenge sur le plan méthodologique. De surcroît, l'intervention ayant lieu dans la cellule œuf, cela suppose d'être capable de maintenir l'huître vivante jusqu'au stade adulte et ceci à condition que le gène invalidé ne soit pas létal car nécessaire lors du développement embryonnaire, larvaire ou lors de la métamorphose. Aussi, une alternative plus accessible sur le plan expérimental, car déjà éprouvée chez l'huître, est de développer des expériences d'ARN interférent en ciblant le transcrit des récepteurs (Fabioux et al. 2009; Huvet et al. 2015).

Ainsi, grâce à ces pistes méthodologiques, il est possible d'étudier l'implication des couples neuropeptides/récepteurs dans la régulation de différentes fonctions physiologiques de l'huître (Figure 51).

4 Conclusion

Ainsi, ce travail de thèse a permis d'apporter de nouveaux éléments de compréhension de la régulation de la physiologie de l'huître *Crassostrea gigas*. Ce travail a été rendu possible grâce notamment aux récentes publications du neuropeptidome (Stewart et al. 2014) et la disponibilité de ressources génomiques et transcriptomiques conséquentes (Fleury et al. 2009; Zhang et al. 2012a; Riviere et al. 2015) chez l'huître, facilitant ainsi la recherche de couples ligand(s)/récepteur(s). De ce fait, grâce à la « déorphanisation » de plusieurs de ces couples, il a pu être montré que ces neuropeptides et récepteurs d'huître ont été hérités depuis l'ancêtre commun des bilatériens. L'ensemble de ces résultats a donc permis d'enrichir les données disponibles chez *Crassostrea gigas* mais également chez les Lophotrochozoaires, qui restent encore que peu étudiés. Toutefois, au cours de ces dernières années, plusieurs neuropeptidomes de Lophotrochozoaires ont été publiés et il est fortement envisageable que les recherches de couples neuropeptide(s)/récepteur(s) s'intensifient permettant ainsi d'améliorer la compréhension de l'évolution des systèmes neuropeptidergiques chez les Bilatériens.

Par ailleurs, l'étude des fonctions physiologiques associées aux différents systèmes neuropeptidergiques chez l'huître a permis d'enrichir les connaissances sur l'évolution de ces systèmes chez les Bilatériens. De plus, outre ces aspects, il est important de s'intéresser aux différentes fonctions physiologiques afin de mieux comprendre comment l'organisme de l'huître peut s'adapter et réagir aux différentes contraintes imposées par son environnement tel un stress, un changement de température ou encore une privation de nourriture. Ces différentes observations pourraient permettre de développer par la suite divers marqueurs de l'état physiologique de l'huître. Ainsi, l'étude des facteurs neuroendocriniens contrôlant la physiologie de l'huître constitue l'une des clés nécessaires à une meilleure maîtrise des productions en écloserie ou *in situ*.

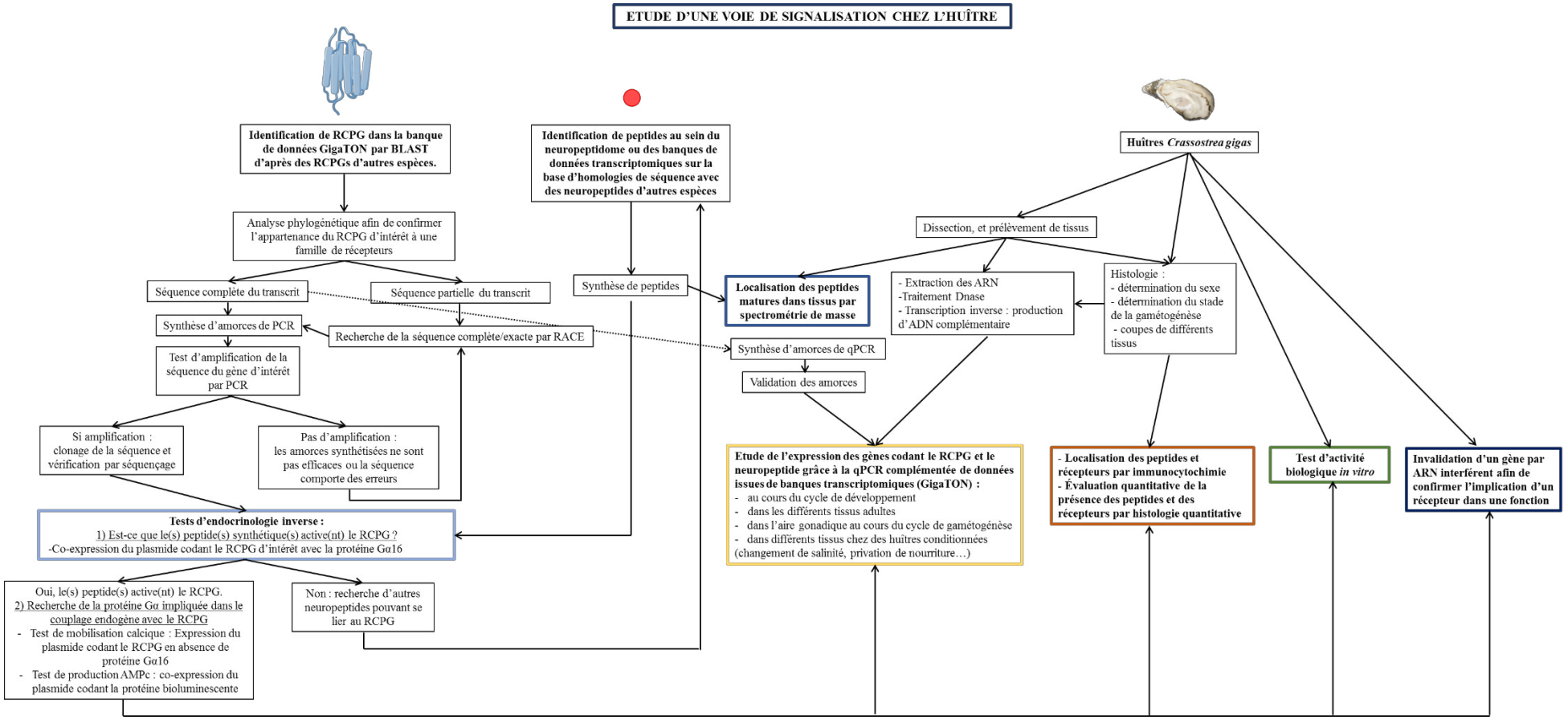
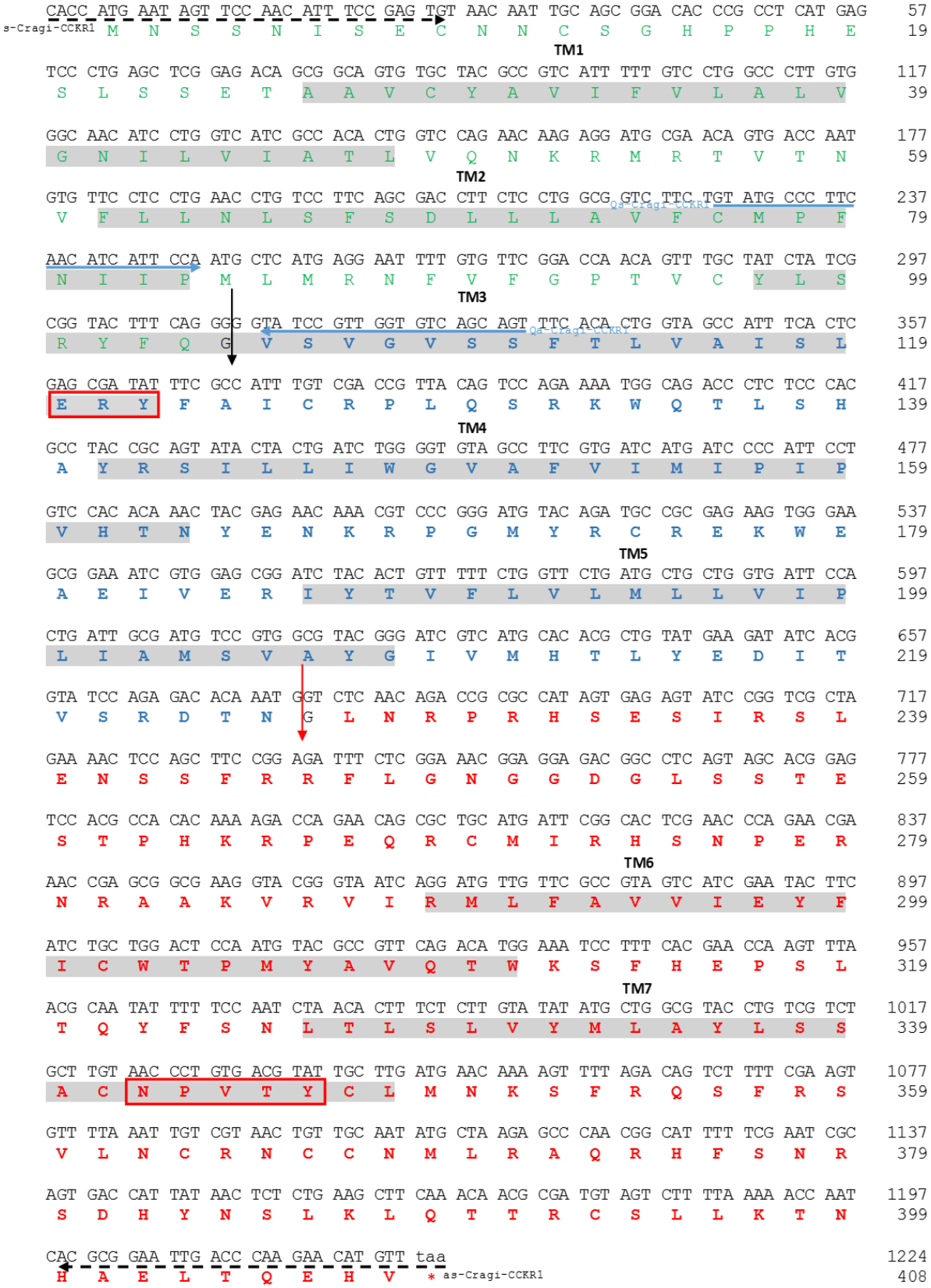


Figure 51 : Schéma général de l'étude d'une voie de signalisation chez l'huître *Crassostrea gigas*.

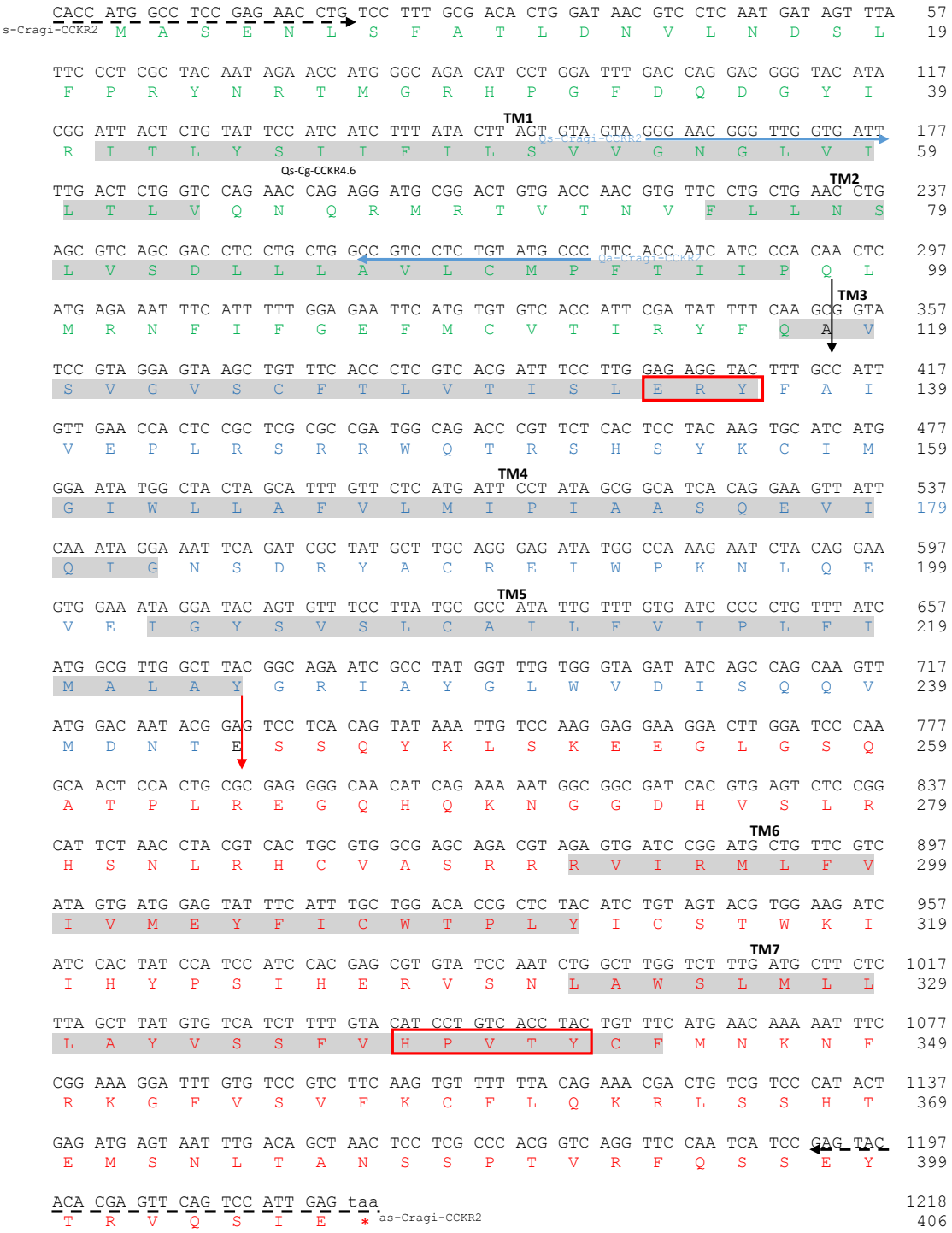
Annexes

Annexes

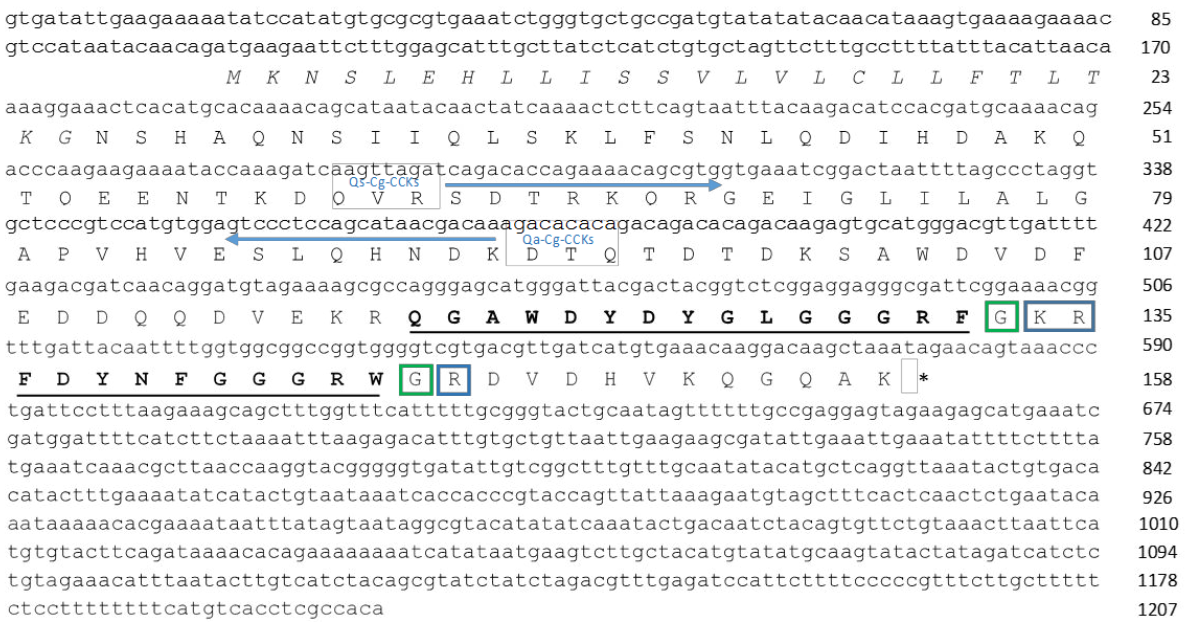
A)


CACC ATG AAT AGT TCC AAC ATT TCC GAG TGT AAC AAT TGC AGC GGA CAC CCG CCT CAT GAG 57
s-Cragi-CCKR1 M N S S N I S E C N N C S G H P P H E 19
TM1
TCC CTG AGC TCG GAG ACA GCG GCA GTG TGC TAC GCC GTC ATT TTT GTC CTG GCC CTT GTG 117
S L S S E T A A V C Y A V I F V L A L V 39
GGC AAC ATC CTG GTC ATC GCC ACA CTG GTC CAG AAC AAG AGG ATG CGA ACA GTG ACC AAT 177
G N I L V I A T L V Q N K R M R T V T N 59
TM2
GTG TTC CTC CTG AAC CTG TCC TTC AGC GAC CTT CTC CTG GCG GTC TTC TGT ATG CCC TTC 237
Qs-Cragi-CCKR1
V F L L N L S F S D L L L A V F C M P F 79
AAC ATC ATT CCA ATG CTC ATG AGG AAT TTT GTG TTC GGA CCA ACA GTT TGC TAT CTA TCG 297
N I I P M L M R N F V F G P T V C Y L S 99
TM3
CGG TAC TTT CAG GGG GTA TCC GTT GGT GTC AGC AGT TTC ACA CTG GTA GCC ATT TCA CTC 357
Qs-Cragi-CCKR1
R Y F Q G V S V G V S S F T L V A I S L 119
GAG CGA TAT TTC GCC ATT TGT CGA CCG TTA CAG TCC AGA AAA TGG CAG ACC CTC TCC CAC 417
E R Y F A I C R P L Q S R K W Q T L S H 139
TM4
GCC TAC CGC AGT ATA CTA CTG ATC TGG GGT GTA GCC TTC GTG ATC ATG ATC CCC ATT CCT 477
A Y R S I L L I W G V A F V I M I P I P 159
GTC CAC ACA AAC TAC GAG AAC AAA CGT CCC GGG ATG TAC AGA TGC CGC GAG AAG TGG GAA 537
V H T N Y E N K R P G M Y R C R E K W E 179
TM5
GCG GAA ATC GTG GAG CGG ATC TAC ACT GTT TTT CTG GTT CTG ATG CTG CTG GTG ATT CCA 597
A E I V E R I Y T V F L V L M L L V I P 199
CTG ATT GCG ATG TCC GTG GCG TAC GGG ATC GTC ATG CAC ACG CTG TAT GAA GAT ATC ACG 657
L I A M S V A Y G I V M H T L Y E D I T 219
GTA TCC AGA GAC ACA AAT GGT CTC AAC AGA CCG CGC CAT AGT GAG AGT ATC CGG TCG CTA 717
V S R D T N G L N R P R H S E S I R S L 239
GAA AAC TCC AGC TTC CGG AGA TTT CTC GGA AAC GGA GGA GAC GGC CTC AGT AGC ACG GAG 777
E N S S F R R F L G N G G D G L S S T E 259
TCC ACG CCA CAC AAA AGA CCA GAA CAG CGC TGC ATG ATT CGG CAC TCG AAC CCA GAA CGA 837
S T P H K R P E Q R C M I R H S N P E R 279
TM6
AAC CGA GCG GCG AAG GTA CGG GTA ATC AGG ATG TTG TTC GCC GTA GTC ATC GAA TAC TTC 897
N R A A K V R V I R M L F A V V I E Y F 299
ATC TGC TGG ACT CCA ATG TAC GCC GTT CAG ACA TGG AAA TCC TTT CAC GAA CCA AGT TTA 957
I C W T P M Y A V Q T W K S F H E P S L 319
TM7
ACG CAA TAT TTT TCC AAT CTA ACA CTT TCT CTT GTA TAT ATG CTG GCG TAC CTG TCG TCT 1017
T Q Y F S N L T L S L V Y M L A Y L S S 339
GCT TGT AAC CCT GTG ACG TAT TGC TTG ATG AAC AAA AGT TTT AGA CAG TCT TTT CGA AGT 1077
A C N P V T Y C L M N K S F R Q S F R S 359
GTT TTA AAT TGT CGT AAC TGT TGC AAT ATG CTA AGA GCC CAA CGG CAT TTT TCG AAT CGC 1137
V L N C R N C C N M L R A Q R H F S N R 379
AGT GAC CAT TAT AAC TCT CTG AAG CTT CAA ACA ACG CGA TGT AGT CTT TTA AAA ACC AAT 1197
S D H Y N S L K L Q T T R C S L L K T N 399
CAC GCG GAA TTG ACC CAA GAA CAT GTT taa 1224
H A E L T Q E H V * as-Cragi-CCKR1 408

B)

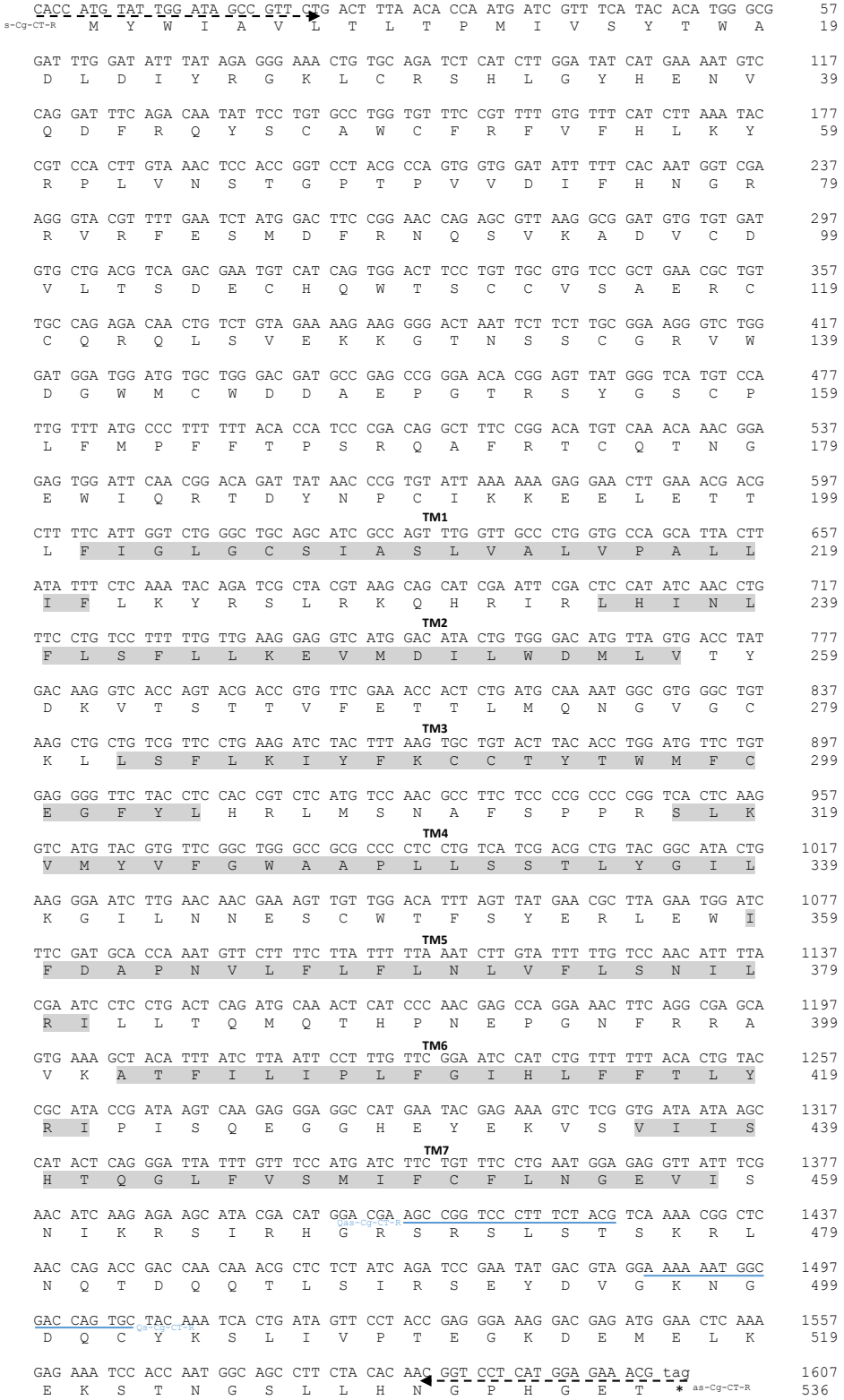


Annexe 1 : Séquences nucléotidiques des récepteurs Cragi-CCKR1 (A) (scaffold1301, CGI_10027768) et Cragi-CCKR2 (B) (scaffold962, CGI_10027668) de *Crassostrea gigas* et leurs traductions en séquences protéiques générées grâce au logiciel https://web.expasy.org/. Les séquences codantes débutent par le résidu méthionine (M) et se terminent au codon stop représentés par *. Les domaines transmembranaires (notés TM) sont surlignés en gris et ont déterminés d'après le logiciel en ligne http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/. Les séquences des récepteurs sont composées de 3 exons. Les acides aminés composant les exons 1 sont en vert, les exons 2 en bleu et les exons 3 en rouge. Les flèches pleines noires indiquent la position de l'intron conservé au sein des différentes espèces. Les flèches pleines rouges indiquent la position de l'intron spécifique à chacun des récepteurs. Les motifs conservés ERY et NPXXY (HPXXY pour Cragi-CCKR2 nécessaires respectivement à l'activation des récepteurs et au couplage à la protéine Gαq sont encadrés en rouge. Enfin, les amorces ayant servi aux expériences de clonage du récepteur sont soulignées par une flèche noire composée de tirets et les amorces utilisées lors des expériences de qPCR sont soulignées par une flèche pleine bleue.

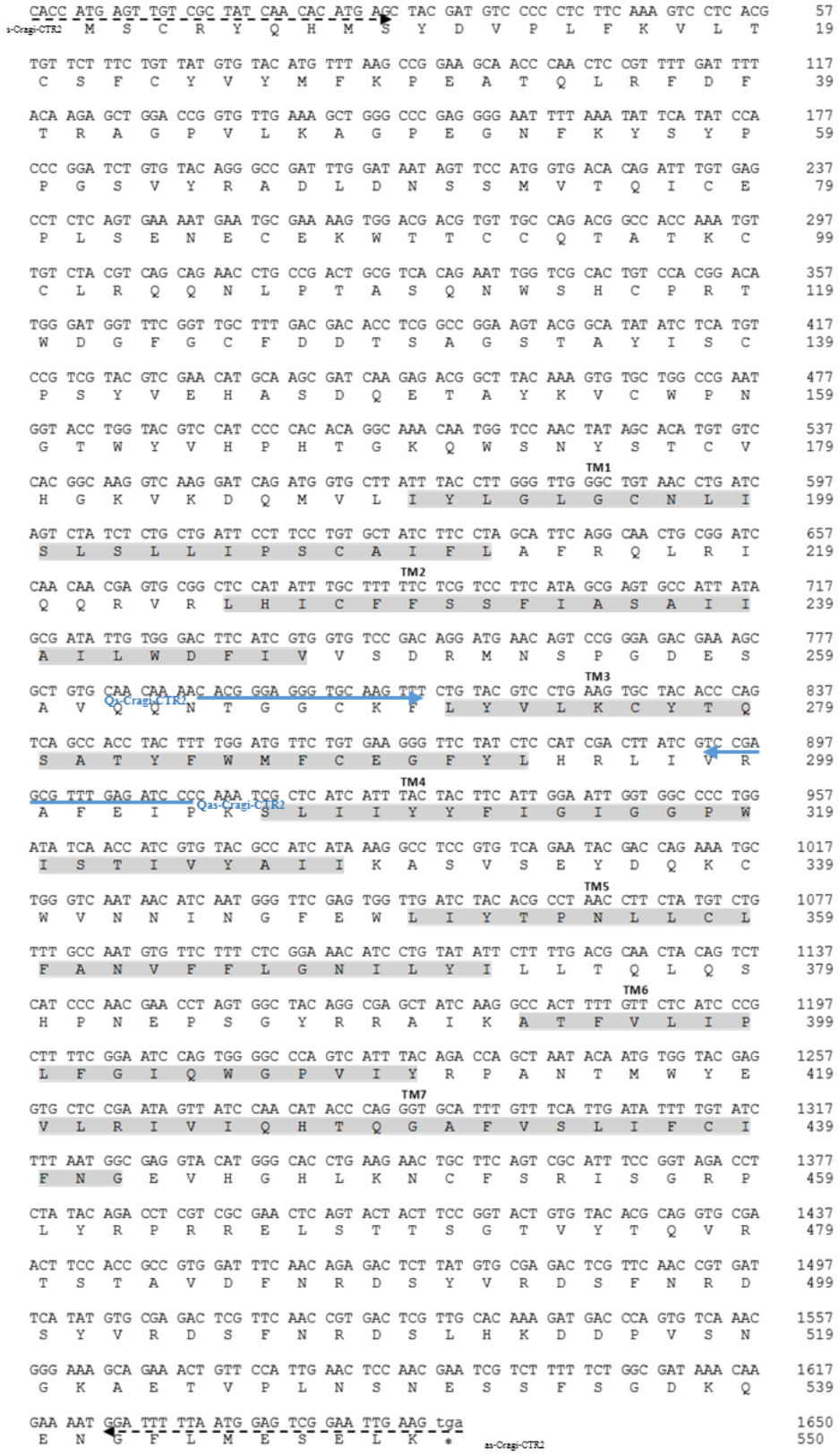


Annexe 2 : Séquence nucléotidique du précurseur des neuropeptides Cragi-CCK1 et Cragi-CCK2 de *Crassostrea gigas* présent dans la banque de données transcriptomiques GigaTON (CHOYP_contig_036872) et sa traduction en séquence protéique générée grâce au logiciel en ligne https://web.expasy.org/. La séquence codante supposée débute par le résidu méthionine (M) et se termine au codon stop représenté par *. Le peptide signal est constitué des acides aminés en italique. Les séquences en acides aminés de Cragi-CCK1 et Cragi-CCK2 sont soulignées et apparaissent en gras. Le site d'amidation des peptides est encadré en vert et le site de clivage après les peptides est encadré en bleu. Enfin, les amorces ayant servi aux expériences de qPCR sont soulignées par une flèche bleue.

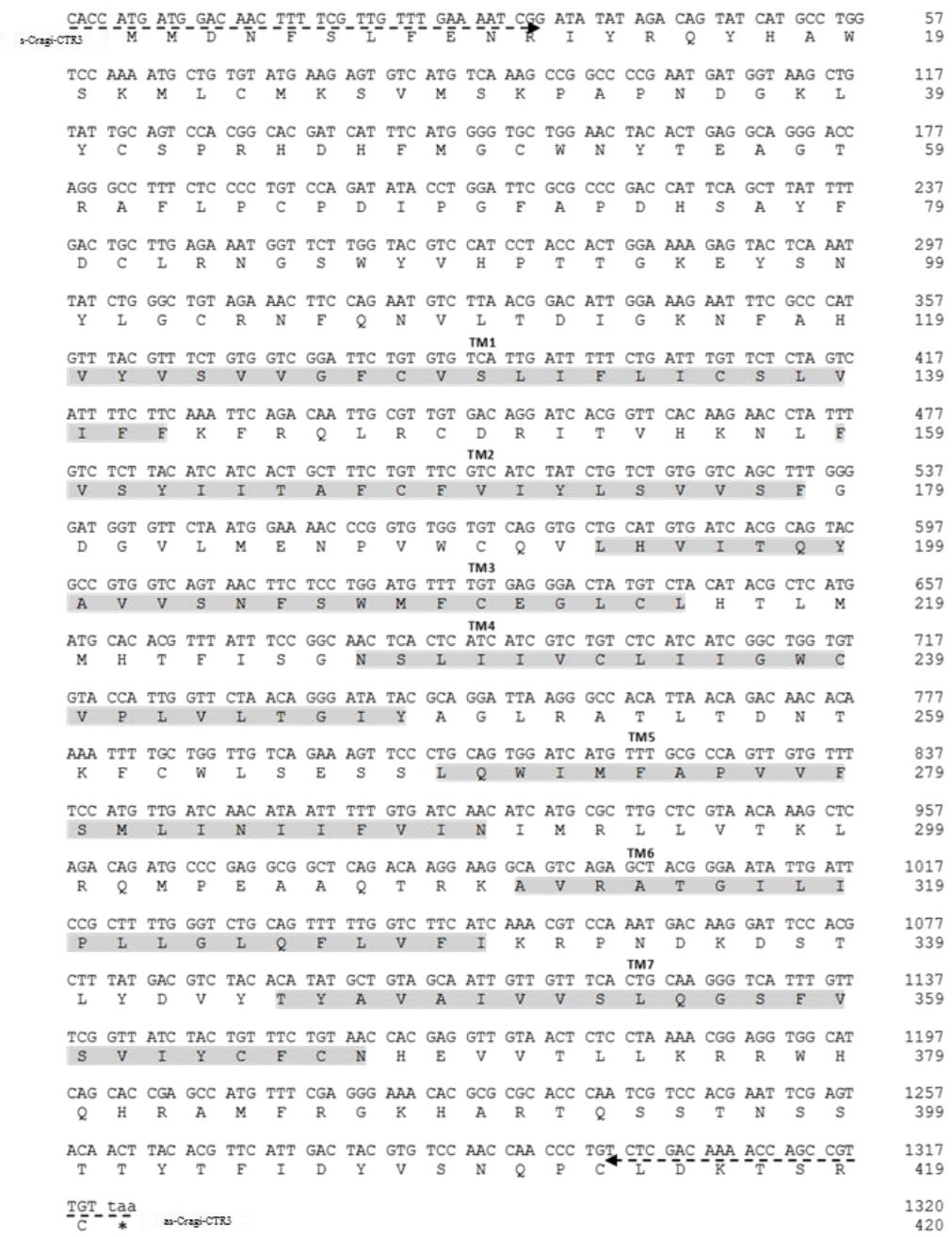
A)



B)


CACC ATG AGT TGT CGC TAT CAA CAC ATG AGC TAC GAT GTC CCC CTC TTC AAA GTC CTC ACG 57
s-Cragi-CTR2 M S C R Y Q H M S Y D V P L F K V L T 19
TGT TCT TTC TGT TAT GTG TAC ATG TTT AAG CCG GAA GCA ACC CAA CTC CGT TTT GAT TTT 117
C S F C Y V Y M F K P E A T Q L R F D F 39
ACA AGA GCT GGA CCG GTG TTG AAA GCT GGG CCC GAG GGG AAT TTT AAA TAT TCA TAT CCA 177
T R A G P V L K A G P E G N F K Y S Y P 59
CCC GGA TCT GTG TAC AGG GCC GAT TTG GAT AAT AGT TCC ATG GTG ACA CAG ATT TGT GAG 237
P G S V Y R A D L D N S S M V T Q I C E 79
CCT CTC AGT GAA AAT GAA TGC GAA AAG TGG ACG ACG TGT TGC CAG ACG GCC ACC AAA TGT 297
P L S E N E C E K W T T C C Q T A T K C 99
TGT CTA CGT CAG CAG AAC CTG CCG ACT GCG TCA CAG AAT TGG TCG CAC TGT CCA CGG ACA 357
C L R Q Q N L P T A S Q N W S H C P R T 119
TGG GAT GGT TTC GGT TGC TTT GAC GAC ACC TCG GCC GGA AGT ACG GCA TAT ATC TCA TGT 417
W D G F G C F D D T S A G S T A Y I S C 139
CCG TCG TAC GTC GAA CAT GCA AGC GAT CAA GAG ACG GCT TAC AAA GTG TGC TGG CCG AAT 477
P S Y V E H A S D Q E T A Y K V C W P N 159
GGT ACC TGG TAC GTC CAT CCC CAC ACA GGC AAA CAA TGG TCC AAC TAT AGC ACA TGT GTC 537
G T W Y V H P H T G K Q W S N Y S T C V 179
TM1
CAC GGC AAG GTC AAG GAT CAG ATG GTG CTT ATT TAC CTT GGG TTG GGC TGT AAC CTG ATC 597
H G K V K D Q M V L I Y L G L G C N L I 199
AGT CTA TCT CTG CTG ATT CCT TCC TGT GCT ATC TTC CTA GCA TTC AGG CAA CTG CGG ATC 657
S L S L L I P S C A I F L A F R Q L R I 219
TM2
CAA CAA CGA GTG CGG CTC CAT ATT TGC TTT TTC TCG TCC TTC ATA GCG AGT GCC ATT ATA 717
Q Q R V R L H I C F F S S F I A S A I I 239
GCG ATA TTG TGG GAC TTC ATC GTG GTG TCC GAC AGG ATG AAC AGT CCG GGA GAC GAA AGC 777
A I L W D F I V V S D R M N S P G D E S 259
TM3
GCT GTG CAA CAA AAC ACG GGA GGG TGC AAG TTT CTG TAC GTC CTG AAG TGC TAC ACC CAG 837
A V Q Q N T G G C K F L Y V L K C Y T Q 279
Qs-Cragi-CTR2
TCA GCC ACC TAC TTT TGG ATG TTC TGT GAA GGG TTC TAT CTC CAT CGA CTT ATC GTC CGA 897
S A T Y F W M F C E G F Y L H R L I V R 299
TM4
GCG TTT GAG ATC CCC AAA TCG CTC ATC ATT TAC TAC TTC ATT GGA ATT GGT GGC CCC TGG 957
Qas-Cragi-CTR2
A F E I P K S L I I Y Y F I G I G G P W 319
ATA TCA ACC ATC GTG TAC GCC ATC ATA AAG GCC TCC GTG TCA GAA TAC GAC CAG AAA TGC 1017
I S T I V Y A I I K A S V S E Y D Q K C 339
TM5
TGG GTC AAT AAC ATC AAT GGG TTC GAG TGG TTG ATC TAC ACG CCT AAC CTT CTA TGT CTG 1077
W V N N I N G F E W L I Y T P N L L C L 359
TTT GCC AAT GTG TTC TTT CTC GGA AAC ATC CTG TAT ATT CTT TTG ACG CAA CTA CAG TCT 1137
F A N V F F L G N I L Y I L L T Q L Q S 379
TM6
CAT CCC AAC GAA CCT AGT GGC TAC AGG CGA GCT ATC AAG GCC ACT TTT GTT CTC ATC CCG 1197
H P N E P S G Y R R A I K A T F V L I P 399
CTT TTC GGA ATC CAG TGG GGC CCA GTC ATT TAC AGA CCA GCT AAT ACA ATG TGG TAC GAG 1257
L F G I Q W G P V I Y R P A N T M W Y E 419
TM7
GTG CTC CGA ATA GTT ATC CAA CAT ACC CAG GGT GCA TTT GTT TCA TTG ATA TTT TGT ATC 1317
V L R I V I Q H T Q G A F V S L I F C I 439
TTT AAT GGC GAG GTA CAT GGG CAC CTG AAG AAC TGC TTC AGT CGC ATT TCC GGT AGA CCT 1377
F N G E V H G H L K N C F S R I S G R P 459
CTA TAC AGA CCT CGT CGC GAA CTC AGT ACT ACT TCC GGT ACT GTG TAC ACG CAG GTG CGA 1437
L Y R P R R E L S T T S G T V Y T Q V R 479
ACT TCC ACC GCC GTG GAT TTC AAC AGA GAC TCT TAT GTG CGA GAC TCG TTC AAC CGT GAT 1497
T S T A V D F N R D S Y V R D S F N R D 499
TCA TAT GTG CGA GAC TCG TTC AAC CGT GAC TCG TTG CAC AAA GAT GAC CCA GTG TCA AAC 1557
S Y V R D S F N R D S L H K D D P V S N 519
GGG AAA GCA GAA ACT GTT CCA TTG AAC TCC AAC GAA TCG TCT TTT TCT GGC GAT AAA CAA 1617
G K A E T V P L N S N E S S F S G D K Q 539
GAA AAT GGA TTT TTA ATG GAG TCG GAA TTG AAG tga 1650
E N G F L M E S E L K * 550
as-Cragi-CTR2

C)


CACC ATG ATG GAC AAC TTT TCG TTG TTT GAA AAT CGG ATA TAT AGA CAG TAT CAT GCC TGG 57
ss-Cragi-CTR3 M M D N F S L F E N R I Y R Q Y H A W 19
TCC AAA ATG CTG TGT ATG AAG AGT GTC ATG TCA AAG CCG GCC CCG AAT GAT GGT AAG CTG 117
S K M L C M K S V M S K P A P N D G K L 39
TAT TGC AGT CCA CGG CAC GAT CAT TTC ATG GGG TGC TGG AAC TAC ACT GAG GCA GGG ACC 177
Y C S P R H D H F M G C W N Y T E A G T 59
AGG GCC TTT CTC CCC TGT CCA GAT ATA CCT GGA TTC GCG CCC GAC CAT TCA GCT TAT TTT 237
R A F L P C P D I P G F A P D H S A Y F 79
GAC TGC TTG AGA AAT GGT TCT TGG TAC GTC CAT CCT ACC ACT GGA AAA GAG TAC TCA AAT 297
D C L R N G S W Y V H P T T G K E Y S N 99
TAT CTG GGC TGT AGA AAC TTC CAG AAT GTC TTA ACG GAC ATT GGA AAG AAT TTC GCC CAT 357
Y L G C R N F Q N V L T D I G K N F A H 119
TM1
GTT TAC GTT TCT GTG GTC GGA TTC TGT GTG TCA TTG ATT TTT CTG ATT TGT TCT CTA GTC 417
V Y V S V V G F C V S L I F L I C S L V 139
ATT TTC TTC AAA TTC AGA CAA TTG CGT TGT GAC AGG ATC ACG GTT CAC AAG AAC CTA TTT 477
I F F K F R Q L R C D R I T V H K N L F 159
TM2
GTC TCT TAC ATC ATC ACT GCT TTC TGT TTC GTC ATC TAT CTG TCT GTG GTC AGC TTT GGG 537
V S Y I I T A F C F V I Y L S V V S F G 179
GAT GGT GTT CTA ATG GAA AAC CCG GTG TGG TGT CAG GTG CTG CAT GTG ATC ACG CAG TAC 597
D G V L M E N P V W C Q V L H V I T Q Y 199
TM3
GCC GTG GTC AGT AAC TTC TCC TGG ATG TTT TGT GAG GGA CTA TGT CTA CAT ACG CTC ATG 657
A V V S N F S W M F C E G L C L H T L M 219
TM4
ATG CAC ACG TTT ATT TCC GGC AAC TCA CTC ATC ATC GTC TGT CTC ATC ATC GGC TGG TGT 717
M H T F I S G N S L I I V C L I I G W C 239
GTA CCA TTG GTT CTA ACA GGG ATA TAC GCA GGA TTA AGG GCC ACA TTA ACA GAC AAC ACA 777
V P L V L T G I Y A G L R A T L T D N T 259
TM5
AAA TTT TGC TGG TTG TCA GAA AGT TCC CTG CAG TGG ATC ATG TTT GCG CCA GTT GTG TTT 837
K F C W L S E S S L Q W I M F A P V V F 279
TCC ATG TTG ATC AAC ATA ATT TTT GTG ATC AAC ATC ATG CGC TTG CTC GTA ACA AAG CTC 957
S M L I N I I F V I N I M R L L V T K L 299
TM6
AGA CAG ATG CCC GAG GCG GCT CAG ACA AGG AAG GCA GTC AGA GCT ACG GGA ATA TTG ATT 1017
R Q M P E A A Q T R K A V R A T G I L I 319
CCG CTT TTG GGT CTG CAG TTT TTG GTC TTC ATC AAA CGT CCA AAT GAC AAG GAT TCC ACG 1077
P L L G L Q F L V F I K R P N D K D S T 339
TM7
CTT TAT GAC GTC TAC ACA TAT GCT GTA GCA ATT GTT GTT TCA CTG CAA GGG TCA TTT GTT 1137
L Y D V Y T Y A V A I V V S L Q G S F V 359
TCG GTT ATC TAC TGT TTC TGT AAC CAC GAG GTT GTA ACT CTC CTA AAA CGG AGG TGG CAT 1197
S V I Y C F C N H E V V T L L K R R W H 379
CAG CAC CGA GCC ATG TTT CGA GGG AAA CAC GCG CGC ACC CAA TCG TCC ACG AAT TCG AGT 1257
Q H R A M F R G K H A R T Q S S T N S S 399
ACA ACT TAC ACG TTC ATT GAC TAC GTG TCC AAC CAA CCC TGT CTC GAC AAA ACC AGC CGT 1317
T T Y T F I D Y V S N Q P C L D K T S R 419
TGT taa 1320
C * ss-Cragi-CTR3 420

D)

```
   CACC ATG GAA GTA GTC AAT GAG AAC TCA GCC ATG CTT AGT AAC TTT GAA GTG TAT GGT TTA      57
s-Cragi-CRCP  M   E   V   V   N   E   N   S   A   M   L   S   N   F   E   V   Y   G   L      19

   CTA ACA GAC ATA CAG GCA GGA AGA GGA CAA AAC AAA CCT AAC AAA CAC CAA CAA CAG CTG      117
    L   T   D   I   Q   A   G   R   G   Q   N   K   P   N   K   H   Q   Q   Q   L      39

   GCT ACT ATA ACC TGT GAA ACC ATC AAA TAT CTA GAG ACA AAA CCT TGC AAG CAC CAA TCA      177
    A   T   I   T   C   E   T   I   K   Y   L   E   T   K   P   C   K   H   Q   S      59

   GAA GAA AGC ATC ACT GAA TTC ATG AAG GAA CTC CAG TCC TTT AAT TTA ACC AAG GCA GAA      237
    E   E   S   I   T   E   F   M   K   E   L   Q   S   F   N   L   T   K   A   E      79

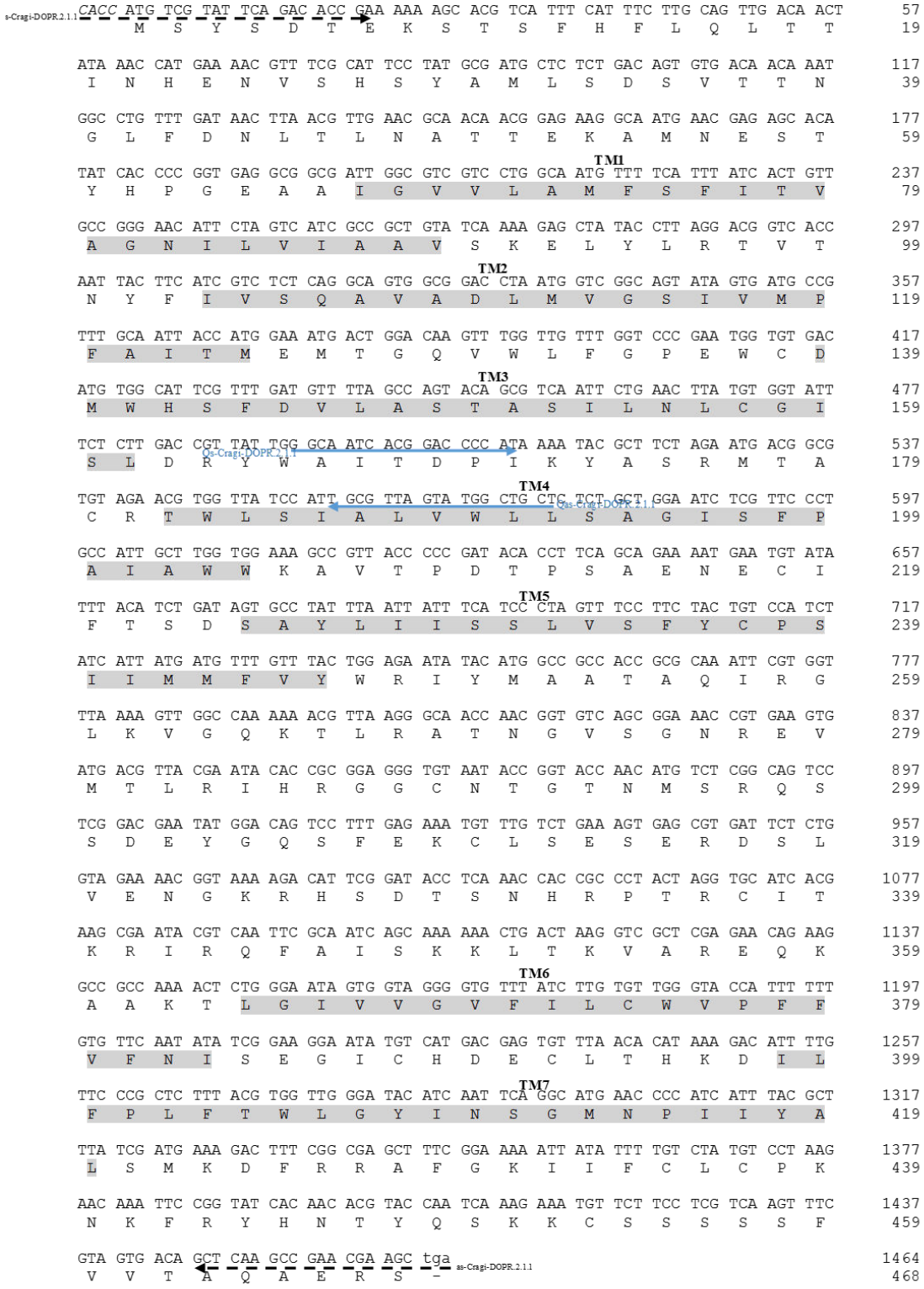
   AAA GGA CAG ATT TTG AAC CTT TGC CCC ACC ACT GCT GTC GAG ATT CAG CTT ATT ATT GAA      297
    K   G   Q   I   L   N   L   C   P   T   T   A   V   E   I   Q   L   I   I   E      99

   GAA AGT GAG GAG CGT TTG ACC GAG GAG CAG ATT TAC AAA TTG TTG GAT ATT ATC GTG AAA      357
    E   S   E   E   R   L   T   E   E   Q   I   Y   K   L   L   D   I   I   V   K     119

   TAT AAT CCT ACA GAG GCC GAC CAA GAA GAA GAC AAC TCG GCA GAA ATG GAT TCC AGC AAT      417
    Y   N   P   T   E   A   D   Q   E   E   D   N   S   A   E   M   D   S   S   N     139

   GAT tga.                                                                            420
    D   *  as-Cragi-CRCP                                                              140
```

Annexe 3 : Séquences nucléotidiques des récepteurs Cg-CT-R (A) (CHOYP_CALRL.3.3, CGI_10023718), Cragi-CTR2 (B) (CHOYP_CALCR.4.6, CGI_10009358), Cragi-CTR3 (C) Cragi-CALCR3 (CHOYP_CALCR.1.6) et (D) Cragi-RCP (CHOYP_CRCP.1.1) de Crassostrea gigas et leurs traductions en séquences protéiques générées grâce au logiciel https://web.expasy.org/. Les séquences codantes débutent par le résidu méthionine (M) et se terminent au codon stop représentés par *. Les domaines transmembranaires (notés TM) sont surlignés en gris http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/. Enfin, les amorces ayant servi aux expériences de clonage du récepteur sont soulignées par une flèche noire composée de tirets et les amorces utilisées lors des expériences de qPCR sont soulignées par une flèche pleine bleue.



Annexe 4 : Séquence nucléotidique des récepteurs Cragi-DOPR.2.1.1 (CHOYP_DOPR.2.1.1) de *Crassostrea gigas* et sa traduction en séquence protéique générée grâce au logiciel https://web.expasy.org/. La séquence codante débute par le résidu méthionine (M) et se termine au codon stop représenté par *. Les domaines transmembranaires (notés TM) sont surlignés en gris et ont déterminés d'après le logiciel en ligne http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/. Les amorces ayant servi aux expériences de clonage du récepteur sont soulignées par une flèche noire composée de tirets et les amorces utilisées lors des expériences de qPCR sont soulignées par une flèche pleine bleue.

General and Comparative Endocrinology 266 (2018) 110–118

Contents lists available at ScienceDirect

General and Comparative Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygcen

Characterization of a tachykinin signalling system in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*

Marie-Pierre Dubos[a], Sven Zels[b], Julie Schwartz[a], Jeremy Pasquier[a], Liliane Schoofs[b], Pascal Favrel[a,*]

[a] Normandy University, Université de Caen Normandie, UMR BOREA, MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France
[b] Department of Biology, Functional Genomics and Proteomics Group, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:
Mollusc
Neuropeptide
Tachykinin signalling
Feeding

ABSTRACT

Although tachykinin-like neuropeptides have been identified in molluscs more than two decades ago, knowledge on their function and signalling has so far remained largely elusive. We developed a cell-based assay to address the functionality of the tachykinin G-protein coupled receptor (Cragi-TKR) in the oyster *Crassostrea gigas*. The oyster tachykinin neuropeptides that are derived from the tachykinin precursor gene Cragi-TK activate the Cragi-TKR in nanomolar concentrations. Receptor activation is sensitive to Ala-substitution of critical Cragi-TK amino acid residues. The Cragi-TKR gene is expressed in a variety of tissues, albeit at higher levels in the visceral ganglia (VG) of the nervous system. Fluctuations of Cragi-TKR expression is in line with a role for TK signalling in *C. gigas* reproduction. The expression level of the Cragi-TK gene in the VG depends on the nutritional status of the oyster, suggesting a role for TK signalling in the complex regulation of feeding in *C. gigas*.

1. Introduction

Tachykinins (TKs) represent a large family of evolutionarily conserved brain/gut peptides in bilaterian animals. In mammals, the TK peptide family derives from alternate processing of three TAC genes (Steinhoff et al., 2014) (for review). TAC1 encodes substance P (SP), neurokinin A (NKA) as well as neuropeptide K (NPK) and neuropeptide γ (Npγ) (Carter et al., 1990). TAC3 (designated as TAC2 in rodents) only encodes neurokinin B (NKB) (Kotani et al., 1986). A third gene, TAC4 encodes endokinins A, B, C and D (EKA-D) as well as hemokinin-1 (HK-1) (Page et al., 2003). These genes are conserved from mammals to teleosts (Zhou et al., 2012) and a gene encoding two TK peptides was also characterized in the urochordate *Ciona intestinalis* (Satake et al., 2004). Outside the chordate phylum, TKs have also been characterized in insects, crustaceans, molluscs and annelids (Severini et al., 2002; Satake et al., 2003) (for review).

Chordate TK sequences display the conserved C-terminal pentapeptide signature FXGLM-amide, whereas protostome TKs share the C-terminal consensus sequence FX_1GX_2R-amide. Interestingly, some vertebrate-type TKs, derived from a distinct gene, have been identified in the salivary glands of cephalopod molluscs (Anastasi and Erspamer, 1963; Kanda et al., 2003) and insects (Champagne and Ribeiro, 1994) serving respectively as neurotoxins (Ruder et al., 2013) and as vasodilatory agents that act on vertebrate prey TK receptors (TKR) but not on endogenous receptors (Kanda et al., 2007).

TKs are widely distributed in the nervous systems of all bilaterian animal species. They have been shown to display regulatory roles in an extraordinarily diverse range of physiological processes. In addition to their modulatory role in the central control of respiration and cardiovascular activity, TKs, mainly via SP, also mediate pain, anxiety and motor coordination in the CNS of mammals (Vanden Broeck et al., 1999; Khawaja and Rogers, 1996). In arthropods, TKs are involved in odour perception and locomotion as shown in *Drosophila* (Winther et al., 2006) and in visual processing as suggested in crustaceans (Glantz et al., 2000). In bilateria, TKs have been shown to participate in the control of the activity of a wide array of peripheral organs and tissues. *In vitro* studies on organ preparations of protostome species suggest that TK signalling plays a role in the regulation of gut activity and visceral and skeletal muscle contractions (Palamiuc et al., 2017; Schoofs et al., 1990; Schoofs et al., 1990; Ikeda et al., 1993). Deficient TK functioning contributes to multiple disease processes in humans (Steinhoff et al., 2014).

In contrast to Ecdysozoa (Van Loy et al., 2010), which comprises arthropods and nematodes as major phyla, TK signalling has so far been largely unexplored in Lophotrochozoa, the protostome sister group of the Ecdysozoa. Only two studies, respectively in *Octopus* (Kanda et al., 2007) and in the worm *U. unitinctus* (Kawada et al., 2002), reported on the identification of a TKR in Lophotrochozoa. In bivalve molluscs, TK

* Corresponding author.
E-mail address: pascal.favrel@unicaen.fr (P. Favrel).

https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.003
Received 8 February 2018; Received in revised form 6 April 2018; Accepted 6 May 2018
Available online 08 May 2018
0016-6480/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

peptides have been molecularly characterized more than two decades ago in the mussel *Anodonta cygnea* (Fujisawa et al., 1993) and more recently in the oyster *Crassostrea gigas* (Stewart et al., 2014). The recent development of an extended transcriptomic database of *C. gigas* (Riviere et al., 2015) offers the opportunity to characterize neuropeptide receptors and thus establish their physiological role(s). The present study reports on the characterization of a TKR in the oyster *C. gigas* and shows that it is functionally activated by oyster TKs. In addition, we investigated the structure-activity relationship of ligand-receptor pairs by assessing the potency of a series of synthetic TK analogues. In order to further explore TK signalling in *C. gigas*, we determined the expression patterns of the genes encoding the TK precursor and the TKR at successive reproduction stages as well as in distinct nutritional conditions.

2. Material and methods

2.1. Peptide synthesis

All peptides were custom synthesized by GeneCust (Luxemburg). The sequences of *C. gigas* peptides were obtained from an in-house peptide database yielded by mass spectrometry analyses of tissue extracts and data mining (Stewart et al., 2014).

2.2. In silico analyses

Multiple sequence alignment was performed with TKR from various species (supplementary Table 1) using Clustal W (Thompson et al., 1994). To determine the relationship between Cragi-TKR and TKRs from other species (supplementary Table 2), a phylogenetic tree was generated by the maximum likelihood method using the phylogeny pipeline (www.phylogeny.fr) (Dereeper et al., 2008) connecting the following programs: MUSCLE for multiple alignment (full processing mode), Gblocks for alignment curation (minimum length of a block after gap cleaning: 10, no gap positions allowed in the final alignment, all segments with contiguous non-conserved positions higher than 8 rejected, minimum number of sequences for a flank position: 85%), PhyML for phylogeny (the default substitution model was chosen assuming an estimated proportion of invariant sites and 4 gamma-distributed rate categories to account for rate heterogeneity across sites. The gamma shape parameter was estimated directly from the data Model). The reliability of internal branches was evaluated using an approximate likelihood-ratio test (aLRT). TreeDyn was used for tree drawing.

2.3. Reverse endocrinology

2.3.1. Molecular cloning of the Cragi-TKR and transfection of mammalian cells

In silico screening of the oyster transcriptomic database "GigaTon" (Riviere et al., 2015) resulted in the identification of a full length cDNA encoding *Cragi-TK*R (CHOYP_LOC100744404.1.1). The CDS of the *Cragi-TK*R gene was amplified by PCR (Pfu DNA polymerase, Promega) using gene-specific sense primer (5′-CACCATGGAGGGGAACAATTCAA CAAAAG-3′) harbouring a Kozak consensus sequence and antisense primer (5′-TCATAAATATTCAGCACTAGTTCTCCGCCC-3′). Ten nanogram of plasmid DNA (Pal 17.3 vector, Evrogen) from a *C. gigas* "all developmental stages and adult central nervous system" directional and normalized cDNA library (Fleury et al., 2009) was used as template. The resulting PCR product was directionally cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen) and the correct insertion confirmed by sequencing. Human embryonic kidney (HEK293T) cells were transiently transfected with the *Cragi-TK*R/pcDNA3.1 construct using Fugene HD (Promega) according to the manufacturer's instructions. As a first step, co-transfection was done with an expression construct for the human $G\alpha_{16}$ subunit, a promiscuous G protein that can direct intracellular signalling of GPCRs to the release of calcium via the phospholipase C_β pathway, regardless of the endogenous G protein coupling of the receptor (Mertens et al., 2004). To assess receptor activity independent of $G\alpha_{16}$, calcium responses were measured in cells expressing only *Cragi-TK*R. Cells for negative control experiments were transfected with empty pcDNA3.1 and $G\alpha_{16}$/pcDNA3.1 constructs.

2.3.2. Calcium fluorescence assay:

Activation of *Cragi-TK*R by oyster TK synthetic peptides was monitored using a fluorescence-based calcium mobilization assay. Briefly, transfected HEK293T cells were loaded with Fluo-4 Direct plus probenecid (qsp 2.5 mM final in the cell) (Invitrogen/Molecular Probes) for 1 h (45 min at 37 °C and 15 min at room temperature). Excitation of the fluorophore was done at 488 nm. The calcium response was measured for 2 min at 525 nm using the FLEXstation 3 (Molecular Devices) at 37 °C. Data were analysed using SoftMax Pro (Molecular Devices). Candidate peptide ligands were first tested at a final concentration of 10^{-5} M. Concentration-response measurements of activating ligands were conducted in triplicate and for at least three independent experiments. Half maximal effective concentrations (EC_{50} values) were calculated from concentration-response curves that were constructed using nonlinear regression analysis with a sigmoidal dose-response equation using Prism 5.0 (GraphPad software, USA).

2.3.3. cAMP luminescence assay

Cragi-TKR transfected HEK 293 T cells were incubated with Glosensor cAMP reagent (qsp 4% final in the medium) (Promega) for 2 h at room temperature prior to the injection of the candidate ligands. cAMP luminescence response was measured for 30 min after injection using a FLEX station 3 (Molecular Devices) at room temperature. Data were analysed using SoftMax Pro (Molecular Devices). Candidate peptide ligands were first tested at a final concentration of 10^{-5} M.

2.4. Animals and tissue sampling

Two-year old adult oysters *C. gigas*, purchased from a local farm (Normandie, France), were used for peptide characterization and transcription analyses. Stages of reproduction (Stage 0: resting undifferentiated stage, Stage 1: gonial multiplication stage, Stage 2: maturation stage, Stage 3: sexual maturity) were determined by histological analysis of gonad sections as described previously (Rodet et al., 2005). To study the influence of trophic conditions, one-year-old adult oysters were reared in water tanks either in absence of food or in presence of *Isochrysis galbana* (clone T-Iso) maintained at a concentration of 6 million of cells/mL during 4 weeks. Adult tissues (mantle, gill, labial palps, digestive gland, gonad, hemolymph, adductor muscle) were sampled, the visceral ganglia (VG) were carefully dissected out, thus limiting any contamination from the adjacent adductor muscles. All the samples were either placed in TriReagent (Sigma) or stored at −80 °C until use. For expression studies, adult tissues or VG and gonads during gametogenesis from 6 animals were mixed to generate 5 pools of each tissue. Individual VG from 19 and 17 animals were used to study gene expression in fed and starved animals respectively.

2.5. Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR analysis was performed using the iCycler iQ© apparatus (Bio-Rad). Total RNA was isolated from adult tissues using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Recovered RNA was further purified on Nucleospin RNAII columns (Macherey-Nagel). After treatment during 20 min at 37 °C with 1 U of DNase I (Sigma) to prevent genomic DNA contamination, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using 1 µg of random hexanucleotidic primers (Promega), 0.5 mM dNTPs and 200 U MMuLV Reverse Transcriptase (Promega) at 37 °C for 1 h in the appropriate buffer. The reaction was stopped by incubation at 70 °C for 10 min. The GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) was used for real time monitoring of

amplification (5 ng of cDNA template, 40 cycles: 95 °C/15 s, 60 °C/15 s) with the following primers: Qs-Cragi-TKR (5′-ATGGCCCACAAGCGG ATG-3′) and Qa-Cragi-TKR (5′-GGTGGACACAAACGCCGT-3′) as sense (Qs) and antisense (Qa) primers for Cragi-TKR cDNA and Qs-Cragi-TK (5′-GCATACCAGAATCATCAA-3′) and Qa-Cragi-TK (5′-GTTTATTGTTCC GAACTAAT-3′) for Cragi-TK precursor cDNA. Accurate amplification of the target amplicon was checked by performing a melting curve analysis. Using Qs-*Cg*-EF (5′-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3′) and Qa-*Cg*-EF (5′-ACGACGATCGCATTTCTCTT-3′) primers, a parallel amplification of oyster Elongation Factor 1α (EF1 α) transcript (BAD15289) was carried out to normalize the expression data of *Cragi-TK*R and *Cragi-TK* transcripts. EF1 α was found as a reliable normalization gene as no significant difference ($p < 0.05$) of Ct values was observed between the different samples compared. Coefficient of variation of EF1 α was < 5%. Thus, the relative level of each gene expression was calculated for one copy of the EF1 α reference gene by using the following formula: $N = 2^{(Ct\ EF1\alpha - Ct\ Cg\text{-cDNA})}$. The PCR amplification efficiency (E; $E = 10^{(-1/slope)}$) for each primer pair was determined by linear regression analysis of a dilution series to ensure that E ranged from 1.98 to 2.02. The specificity of the primer pairs was confirmed by melting curve analysis at the end of each RT-qPCR run.

2.6. Statistical analysis

Gene expression levels between different tissues and between samples at different reproduction stages were compared using one-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test. Expression levels between fed and starved animals were compared using an unpaired Student's *t* test. Significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Molecular characterization of an oyster tachykinin receptor (Cragi-TKR)

The unique sequence displaying homology with vertebrate and protostome TKRs was retrieved from GigaTON, an oyster comprehensive transcriptomic database (Riviere et al., 2015). Alignment of *C. gigas* receptor (Cragi-TKR) with other receptors of the family displays an overall identity of 42% with *Octopus* TKRPR and 32% with *Drosophila* DTKR and human TKR1 (Fig. 1). A phylogenetic analysis clearly showed that Cragi-TKR clustered with predicted or functionally characterized mollusc TKRs and as a separate branch from the insect TKRs. Annotated orphan nematode TKRs appeared more distant and emerged as a separate branch. All vertebrate TK-related receptors including the three distinct classes of NK receptors (NK1R, NK2R and NK3R) formed a distinct clade (Fig. 2). Alignment of the Cragi-TKR cDNA with *C. gigas* genomic sequence (http://www.oysterdb.com) identified a gene (CGI_10007698) organized into 5 exons with 4 introns shared at conserved positions and with the same intron phasing with the receptors from vertebrate and protostome species (Kawada et al., 2002; Mirabeau and Joly, 2013) suggesting an evolution from a gene already present in the bilaterian common ancestor.

3.2. Oyster TKs specifically activate Cragi-TKR

A calcium mobilization assay was used to identify the cognate ligands of Cragi-TKR (Bigot et al., 2014). Transiently transfected HEK293T cells expressing the oyster receptor and the promiscuous G protein $G\alpha_{16}$ were challenged with the three oyster synthetic TKs (Cragi-TK1: FGFAPMR-amide, Cragi-TK2: ARFFGLR-amide and Cragi-TK3: FRFTALR-amide). These TKs are derived from the Cragi-TK neuropeptide precursor by posttranslational processing (Fig. 3A) and have previously been characterized as part of *C. gigas'* repertoire of neuropeptides (Stewart et al., 2014). Since Cragi-TKR was equally activated with high doses (10^{-5} M) of all three Cragi-TK peptides in presence or absence of the promiscuous $G\alpha_{16}$ protein (supplementary Fig. 1), a dose-dependent activation of Cragi-TKR was recorded by omitting the $G\alpha_{16}$ protein (Fig. 3B). Half maximal effective concentrations (EC_{50}) were of 4.1 nM for Cragi-TK2, 4.6 nM for Cragi-TK1 and 11.5 nM for Cragi-TK3. No signal was observed with cells transfected with an empty vector or with high concentrations (10^{-5} M) of the oyster GALRF-amide unrelated peptide used as negative control (Bigot et al., 2014).

To determine the residues that are critical for receptor activation, a series of alanine-substituted analogues of Cragi-TK2 were assessed (Fig. 4). The activity of the different analogues can be ranked into three main groups, a first one including the peptides displaying a high EC_{50} corresponding to the [Arg^7] and [Phe^3] alanine-substituted peptides, a second group comprising [Arg^2] and [Phe^4] alanine-substituted peptides for which the modification only moderately affected the potency and a third group including the [Gly^5] and [Leu^6] alanine-substituted peptides displaying a higher potency than the naturally occurring peptides Table 1. All these agonists displayed the same efficacy. None of the three naturally occurring peptides or the alanine substituted peptides activate the cAMP signalling pathway even at concentrations as high as 10^{-5} M.

3.3. Gene expression of Cragi-TKR and Cragi-TK

The expression of Cragi-TKR and of Cragi-TK genes was analysed by RT-qPCR. Cragi-TKR was found to be mainly expressed in the visceral ganglia and to a lower level in a majority of adult tissues including, the gills, the adductor muscle, the heart, the mantle, the gonads, the labial palps and the digestive gland (Fig. 5A). To determine a possible involvement of TK signalling in the regulation of oyster reproduction, Cragi-TKR gene expression was assayed in the visceral ganglia and in the gonads along the reproductive cycle (Fig. 5B). Except a slight peak of expression in females during vitellogenesis (stage2), Cragi-TKR gene expression did not fluctuate significantly in the visceral ganglia. In the gonads, Cragi-TKR gene expression was maximal in undifferentiated gonads (Stage 0) and gradually declined along the reproductive cycle in both males and females. Besides, Cragi-TK gene was chiefly expressed in the visceral ganglia and at basal levels in the mantle, the adductor muscle and the labial palps (Fig. 5C). No significant differential expression of Cragi-TK gene was noticed along the reproductive cycle in the visceral ganglia (Fig. 5D). Interestingly, Cragi-TK gene, but not Cragi-TKR gene, was significantly more expressed in four weeks starved animals than in fed animals (Fig. 5E and F).

4. Discussion

TK signalling systems have been extensively studied in a vast number of animal species. Mature TKs were first biochemically isolated and identified and as a result of the development of molecular biology approaches and genomics, the characterization of their precursor as well as their cognate receptors has become accessible. By mining *C. gigas* comprehensive transcriptomic (Riviere et al., 2015) and genomic (Zhang et al., 2012) databases, a unique receptor (Cragi-TKR) displaying consistent homology and phylogenetic proximity with vertebrate and insect TKRs has been identified. In contrast, vertebrate (Steinhoff et al., 2014) and *Drosophila* (Monnier et al., 1992; Birse et al., 2006) genomes encode respectively three and two TKR types. Diverse TKs (SP, NKA, NKB) derived from distinct peptide precursor genes, activate vertebrate TKR with distinct potencies (Steinhoff et al., 2014). In *Drosophila,* all TK peptides derived from the TK-related neuropeptide precursor gene activate the DTKR with different potencies (Poels et al., 2007). The other *Drosophila* receptor (NKD), is activated *in vitro* by only one of these six TKs (DTK-6) albeit at high concentrations (Poels et al., 2009). Finally, NKD turned out to represent the *bona fide* receptor for *Drosophila* natalisins, a family of insect neuropeptides that are derived from a distinct neuropeptide precursor gene. Natalisins promote insect reproduction and also display the C-terminal FXXXRamide motif

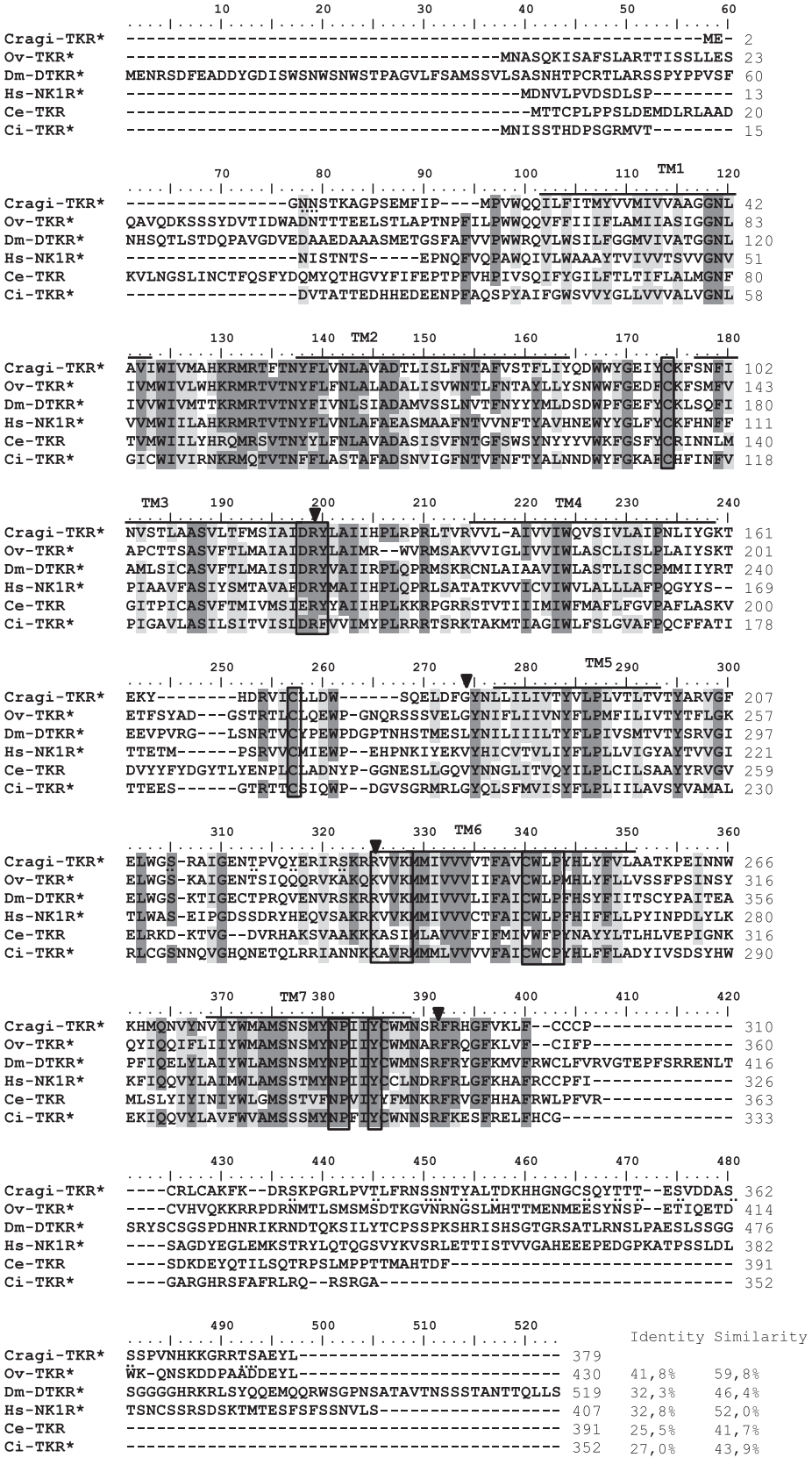


Fig. 1. Sequence alignment of the Cragi-TKR and TKR family members. The amino acid sequence of *Crassostrea gigas* (Cragi-TKR: MF320350) was aligned with those of *Octopus vulgaris* (Ov-TRR: Q58A49), *Drosophila melanogaster* (Dm-DTKR: P30975), *Homo sapiens* (Hs-NK1R: P25103), *Caenorhabditis elegans* (Ce-TKRF: O44148) and *Ciona intestinalis* (Ci-TKR: Q60GS8) using CLUSTALW. Bars indicate the seven putative TM domains. Identical amino acid residues are highlighted in dark grey and similar residues in light grey. Putative N-linked glycosylation sites (NXS/T) or S, T and Y potential phosphorylated residues are underlined with a dotted line. Amino acid residues in boxes are believed to play a pivotal role in GPCR activation. Arrow heads indicate the position of introns. * indicates functionally characterized receptors.

common to all protostomian TKs (Jiang et al., 2013).

In all lophotrochozoan species investigated so far, only one specific TKR has been identified (Kanda et al., 2007; Kawada et al., 2002). The occurrence of a natalisin type of receptor is unlikely in *C. gigas* since no homologous neuropeptide has been found among the exhaustive neuropeptide repertoires of oyster (Stewart et al., 2014) and other Lophotrochozoa (Zatylny-Gaudin et al., 2016; Conzelmann et al., 2013). Moreover, our phylogenetic study suggests that arthropod-specific

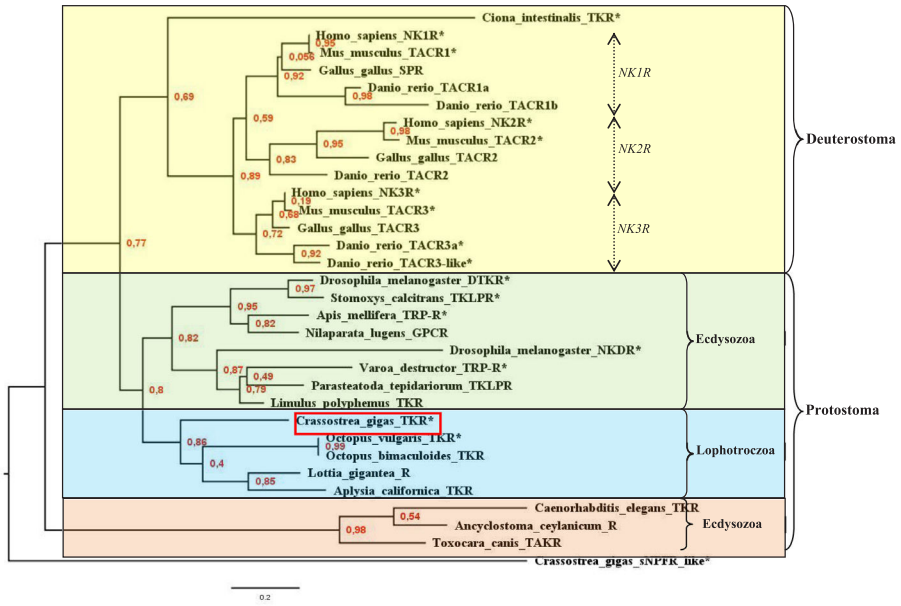


Fig. 2. Phylogenetic representation of the relationship between the *Cragi-TKR* and other TKR family members. The tree was generated by a maximum likelihood method using the phylogeny pipeline (www.phylogeny.fr) (Dereeper et al., 2008). *Crassostrea gigas* TKR (MF320350), *Ancylostoma ceylanicum* TKR (A0A016WHR5), *Apis mellifera* TRP-R (A0A141CIU0), *Aplysia californica* TKR (XP_012936179.1), *Caenorhabditis elegans* TKR (O44148), *Ciona intestinalis* TKR (Q60GS8), *Danio rerio* TACR1a (E9QCW0); TACR1b (I6UDB5); TACR2 (F1QPL8); TACR3-like (F1R3V0) and TACR3a (H6A6A7), *Drosophila melanogaster* DTKR (P30975) and NKDR (P30974), *Gallus gallus* TACR3 (F1NJ82); SPR (Q9W6I3) and TACR2 (E1BRR8), *Homo sapiens* NK1R (P25103), NK2R (P21452) *and* NK3R (P29371), *Limulus polyphemus* TKR (XP_013772923.1), *Lottia gigantea* (V4BE54), *Mus musculus* TACR1 (P30548); TACR2 (Q3KP20) and TACR3 (EDL12172.1), *Nilaparvata lugens* GPCR (U3U967), *Octopus vulgaris* TKR (Q58A49), *Octopus bimaculoides* TKR (XP_014785645.1) *Parasteatoda tepidariorum* TKLPR (XP_015910841.1), *Stomoxys calcitrans* TKLPR (A0A1I8PID0), *Toxocara canis* TAKR (A0A0B2V4Q7), *Varroa destructor* TRP-R (A0A141CIT9) were the sequences used to construct the tree. The Cg-sNPFR-like receptor (MF320349) was chosen as outgroup. * indicates functionally characterized receptors. Branch node labels correspond to likelihood ratio test values.

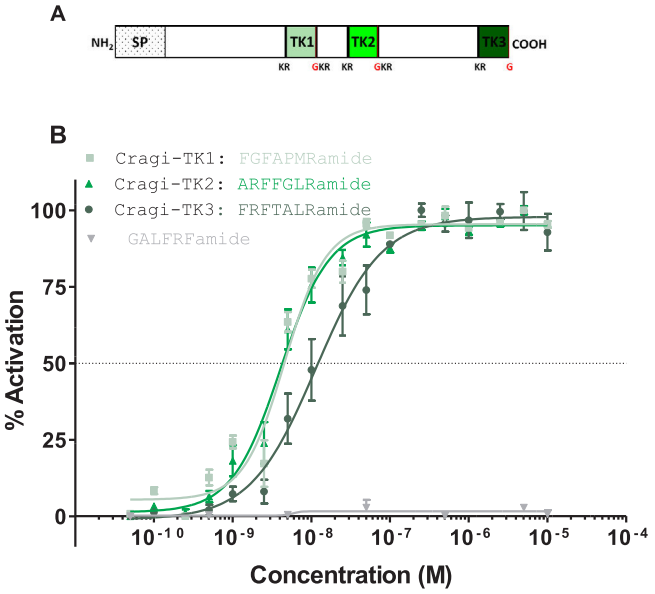


Fig. 3. Dose-dependent activity of Cragi-TK peptides on Cragi-TKR expressed in HEK293T cells. A: schematic representation of Cragi-TK precursor (SP: Signal peptide). B: Concentration–response data evoked by Cragi-TK peptides are shown as relative (%) to the highest value (100% activation) for a given peptide. Data are the means of three independent experiments done in triplicate. The *C. gigas* GALRF-amide peptide was used as negative control. Vertical bars represent the standard error of the mean (SEM).

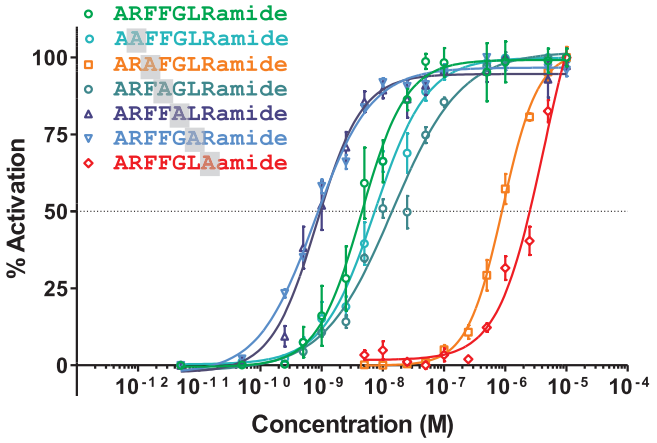


Fig. 4. Comparison of dose-response relationships of a series of Cragi-TK2 single amino acid replacement analogues. Fluorescent signal induced by Cragi-TKR expressed in HEK293T cells and challenged by a series of alanine-substituted analogues of Cragi-TK2. Grey shading represents the position of the Cragi-TK2 amino acids replaced by an alanine residue. Data are shown as relative (%) to the highest value (100% activation) for a given peptide, and were performed at least in triplicate. Vertical bars represent the SEM.

natalisin receptors may have arisen from a recent duplication during the evolution of arthropods.

Cragi-TKR behaves as a genuine TKR. Similar to its vertebrate and protostome counterparts, it is specifically and slightly selectively activated by all three oyster TKs encoded by the oyster TK precursor at concentration ranges similar to those required for the activation of TKRs in other species (Kawada et al., 2002; Poels et al., 2007; Liu et al., 1999). Similar to the *Octopus* TKR (Kanda et al., 2007), Cragi-TKR triggers *in vitro* only the phospholipase Cβ-mediated calcium transduction pathway, a feature distinct to some insect and vertebrate receptors which additionally transduce their signal via an increase in cAMP levels (Birse et al., 2006; Poels et al., 2005; Nakajima et al., 1992; He et al., 2014). Although distinct in sequence, Cragi-TKs exhibit only minor potency differences suggesting that they may be functionally redundant. To determine the essential amino acids of Cragi-TKs, a structure activity relationship analysis was performed using a series of synthetic analogues of Cragi-TK2 (ARFFGLR-amide) in which each amino acid was sequentially replaced by the neutral alanine residue. Considering the C-terminal consensus FX_1GX_2Ramide sequence of protostome TKs, only the replacement of the terminal Arginine or the first Phenylalanine showed drastic negative effects consistent with the high conservation of these two residues possibly due to a strong selective pressure during the evolution of protostome TKs. This also reflects the low activity reported for chordate-type TKs (harbouring a C-terminal methionine instead of an arginine) on protostome receptors (Kanda et al., 2007; Kawada et al., 2002; Torfs et al., 2002). Change of

Table 1
Amino acid sequences of Cragi-TK2 analogues and their respective EC50 for receptor activation. Grey shading represents the position of the Cragi-TK2 amino acids replaced by an alanine residue.

Name	Peptide sequence								EC_{50} (nM)
TK Vertebrate consensus	-	-	F	X	G	L	M	amide	
TK Protostome consensus	-	-	F	X	G	X	R	amide	
Cragi-TK2	A	R	F	F	G	L	R	amide	4.48
Cragi -TK2-A2	A	A	F	F	G	L	R	amide	7.43
Cragi -TK2-A3	A	R	A	F	G	L	R	amide	906.3
Cragi -TK2-A4	A	R	F	A	G	L	R	amide	14.2
Cragi -TK2-A5	A	R	F	F	A	L	R	amide	0.83
Cragi -TK2-A6	A	R	F	F	G	A	R	amide	0.74
Cragi -TK2-A7	A	R	F	F	G	L	A	amide	4276
Cragi -TK1	F	G	F	A	P	M	R	amide	4.6
Cragi -TK3	F	R	F	T	A	L	R	amide	11.5

the N-terminal extension of Cragi-TK2 did not alter significantly the neuropeptide activity. As expected, change of the flexible residue (X_1) of the consensus sequence resulted in only limited effects on the activation of Cragi-TKR. Surprisingly, Cragi-TKR showed higher sensitivity to peptide analogues with an alanine replacing either the conserved Glycine or the penultimate (X_2) residue. The glycine residue does not appear to be crucial since the three naturally occurring oyster TKs display a variability of residues at this position. Interestingly both Cragi-TK3 and the bivalve mollusc *Anodonta cygnea* TK hold an alanine at this position (Fujisawa et al., 1993). Such naturally occurring alanine-containing TKs also exist in insects (Predel et al., 2005; Torfs et al., 2001), and were proven more potent than their glycine-containing counterparts but behave as partial agonists due to reduced maximal calcium mobilisation efficacy (Poels et al., 2004). Partial agonistic activity and transduction pathway plasticity in insect and mammalian neurokinin signalling were suggested to reflect the existence of multiple receptor conformation states (Poels et al., 2004; Palanche et al., 2001) that may disclose a potential fine-tuning of physiological processes. Unexpectedly such a situation does not appear to exist in oyster since all peptides show equivalent efficacy.

The expression of Cragi-TKR in a wide variety of oyster organs and tissues clearly conforms with the pleiotropic regulatory role of TKs in other animal groups. As for other molluscs, the central nervous system represents the unique source of TKs, a situation different from insects where gut endocrine cells also contribute to the production of this family of peptides (Winther and Nässel, 2001) suggesting a possible link with the digestive processes and feeding. The increased expression level of the Cragi-TK gene in the CNS of starved oysters suggests a role in feeding behaviour. However, it is not well-defined whether this activity is exerted centrally, likely initiated through nutrient sensing, via the control of neuronal feeding circuits or peripherally at the level of the gills and labial palps -the main food collector organs- or the digestive tract. In mice, Tac1 (SP/neurokinin A) controls circadian feeding behaviour and metabolism (Maguire et al., 2017). Likewise in insects, TKs injected in starved *Bombyx mori* larvae induce a stimulatory effect in feeding behaviour by reducing the period of latency to the first bite (Nagata et al., 2011). The content of mature TKs was also affected in the brain of honey bees in association with nectar and pollen foraging suggesting a role in this social behaviour (Brockmann et al., 2009). Given the involvement of TKs in olfactory and locomotion behaviour in *Drosophila* (Winther et al., 2006), it was proposed that TK signalling could play a role in the perception, the localisation of a food source and its collection (Brockmann et al., 2009). Such hypothesis fits the presence of Cragi-TKR in the gills and the labial palps, the oyster organs implicated in the collection and sieving of food particles. In vertebrates and insects, the digestive tract also represents an important target for TKs. In the mammalian intestine TKs, mainly released from neurons control the activity of neuronal networks, influence fluid secretion and act on smooth muscles (Shimizu et al., 2008). Similarly, TKs stimulate *in vitro* contractions of the gut in insects (Schoofs et al., 1990) and also regulate enterocyte lipid production and systemic lipid homeostasis in *Drosophila* (Song et al., 2014). However, this later activity is mainly controlled by TKs released from enteroendocrine cells, the peptide content of which increases in starved animals. The weak expression of Cragi-TKR in the oyster digestive gland is consistent with a role of TKs in lipid metabolism. However, the lack of TK gene expression and the absence of endogenous TKs in this organ implies a regulation by TKs released as a circulating neurohormone. It is intriguing that, with the singular exception of the AKH signalling system (Dubos et al., 2017), most oyster neuroendocrine systems investigated so far appear sensitive to the nutritional status (Bigot et al., 2014; Bigot et al., 2012). This reflects the complexity of the feeding control in animals and emphasizes the requirement of a fine regulation to support constant energy needs in a context of sporadic food availability. That TK signalling also regulates the activity of oyster gonad cells was suggested by the fluctuating Cragi-TKR expression during the reproductive cycle. This is reminiscent of the role of TKs in the regulation of reproduction-associated processes in both vertebrate and protostome species. Indeed, TKs were shown to participate in the neuroendocrine control of reproduction in mammals (Rance et al., 2010; Fergani, 2017) and fish (Biran et al., 2012), in the regulation of oocyte growth in the ascidian *C. intestinalis* (Aoyama et al., 2008) and in the oviducal myotropic activity in the locust (Schoofs et al., 1990).

5. Conclusion

We have characterized in the oyster *C. gigas*, a TK signalling system that appears to share common features with that of other animal species: (1) an involvement in the regulation in a variety of physiological processes implied by a distribution of the TK receptors in diverse organs (2) a potential feeding modulating activity of TK peptides suggested by a marked increase in expression of their encoding gene in the CNS of

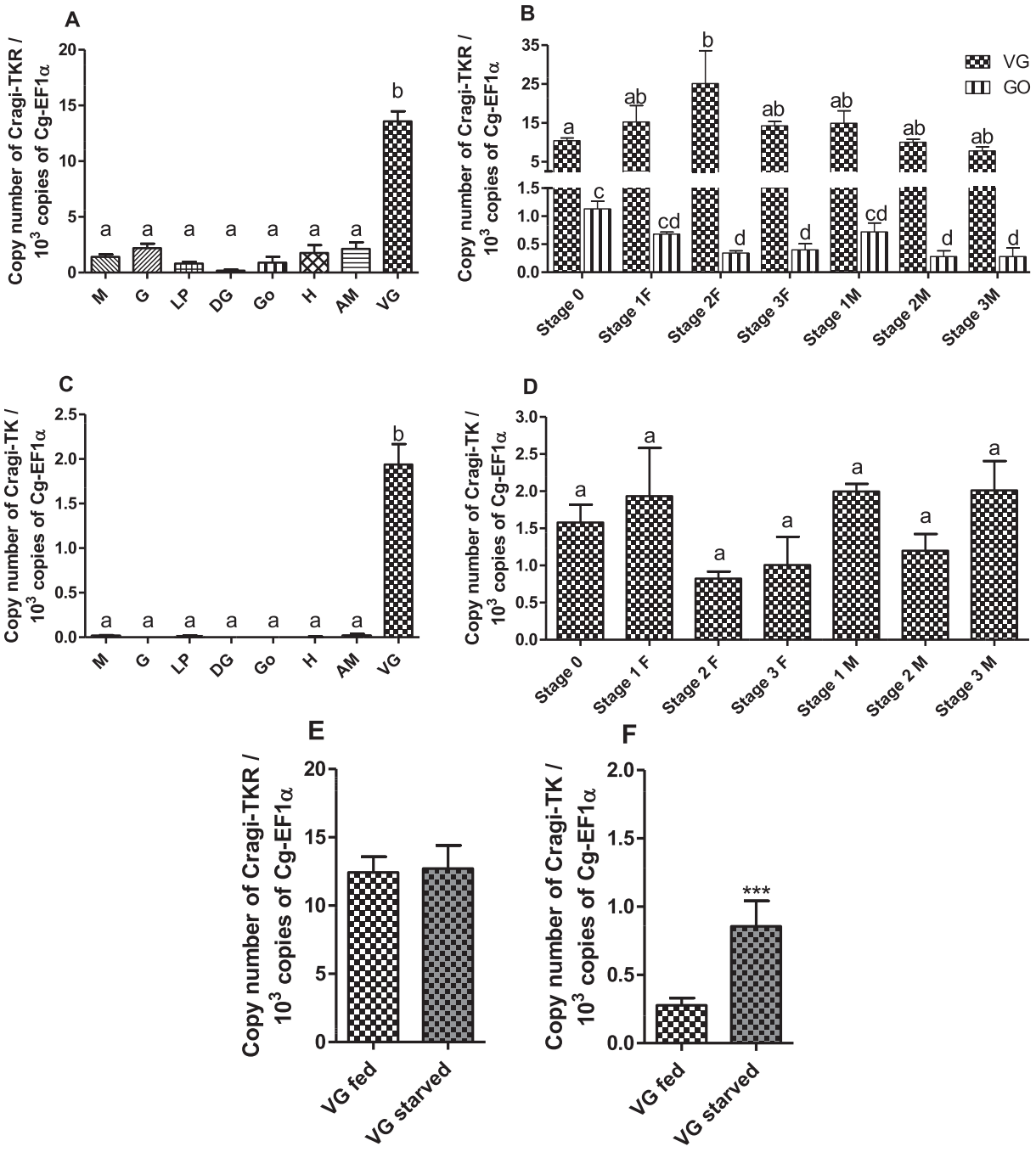


Fig. 5. Expression of Cragi-TKR and Cragi-TK genes. (A) Distribution of mRNAs encoding Cragi-TKR in adult tissues, (B) level of expression of Cragi-TKR mRNA in visceral ganglia (VG) and gonads (GO) during gametogenesis, (C) Distribution of mRNAs encoding Cragi-TK precursor in adult tissues, (D) level of expression of Cragi-TK mRNA in visceral ganglia (VG) along an annual reproductive cycle, (E and F) expression levels of Cragi-TKR and Cragi-TK mRNA respectively in VG of four weeks *Isochrysis galbana* fed or starved oysters, Each value is the mean + SEM of 5 pools of 6 animals (in adult tissues); 5 pools of 6 animals (VG during gametogenesis) and 19 or 17 independent animals (VG after conditioning with or without food). Expression levels were calculated as the number of copies of Cragi-TKR/Cragi-TK transcripts per 10^3 copies of elongation factor 1α (EF1α) mRNA. Results were statistically tested with a one-way ANOVA (A, B, D and E) or student's *t* test (C and F), $p < 0,05$. Significantly different means are indicated by different letters (A, B and D) or *** ($p < 0.001$) (B). No significant statistical difference was observed for (C and E). M: Mantle; G: Gills; LP: Labial Palps; DG: Digestive Gland; Go Gonad; H: heart; AM: Adductor Muscle; VG: Visceral Ganglia; F: Female; M: Male; 0: stage 0 (sexual resting stage); 1: stage 1 (gonial multiplication stage); 2: stage 2 (tubule development and maturation stage); 3: stage 3 (sexual maturity stage).

starved oysters, (3) a likely role in regulating reproduction processes in line with the variability of expression of TK signalling components along the reproductive cycle. In contrast to vertebrates and insects, oyster and other protostome species (Satake et al., 2003) express their TK gene in the central nervous system but not in the gut.

Acknowledgments

This work was funded by the ANR project "NEMO" (ANR 14CE02 0020). J. Schwartz PhD fellowship was co-financed by the NEMO project and a by the European Union in the frame of the operational program FEDER/FSE 2014-2020. S. Zels is a postdoctoral research fellow of

the Research Foundation - Flanders (FWO). L. Schoofs and S. Zels wish to acknowledge the European Research Council (ERC grant 340318) and the Research Foundation - Flanders (FWO grant G069713N and G0C0618N) for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.003.

References

Anastasi, A., Erspamer, V., 1963. The Isolation and amino acid sequence of eledoisin, the active endecapeptide of the posterior salivary glands of eledone. Arch. Biochem. Biophys. 101, 56–65.

Aoyama, M., Kawada, T., Fujie, M., Hotta, K., Sakai, T., Sekiguchi, T., 2008. A novel biological role of tachykinins as an up-regulator of oocyte growth: identification of an evolutionary origin of tachykininergic functions in the ovary of the ascidian, *Ciona intestinalis*. Endocrinology 149, 4346–4356. http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-0323.

Bigot, L., Zatylny-Gaudin, C., Rodet, F., Bernay, B., Boudry, P., Favrel, P., 2012. Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Peptides 34, 303–310. http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.017.

Bigot, L., Beets, I., Dubos, M.-P., Boudry, P., Schoofs, L., Favrel, P., 2014. Functional characterization of a short neuropeptide F-related receptor in a lophotrochozoan, the mollusk *Crassostrea gigas*. J. Exp. Biol. 217, 2974–2982. http://dx.doi.org/10.1242/jeb.104067.

Biran, J., Palevitch, O., Ben-dor, S., Levavi-sivan, B., 2012. Neurokinin Bs and neurokinin B receptors in zebrafish- potential role in controlling fish reproduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 10269–10274. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1119165109.

Birse, R.T., Johnson, E.C., Taghert, P.H., Nässel, D.R., 2006. Widely distributed Drosophila G-Protein-Coupled Receptor (CG7887) is activated by endogenous tachykinin-related peptides. J. Neurobiol. 66, 33–46. http://dx.doi.org/10.1002/neu.20189.

Brockmann, A., Annangudi, S.P., Richmond, T.A., Ament, S.A., Xie, F., Southey, B.R., Rodriguez-zas, S.R., Robinson, G.E., Sweedler, J.V., 2009. Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 2383–2388. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0813021106.

Carter, S., Louis, S., Io, M., 1990. Structure, expression and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. J. Neurosci. 10, 2203–2214.

Champagne, D.E., Ribeiro, J.M.C., 1994. Sialokinin I and II : Vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. US.A. 91, 138–142.

Conzelmann, M., Williams, E.A., Krug, K., Franz-wachtel, M., Macek, B., 2013. The neuropeptide complement of the marine annelid *Platynereis dumerilii*. BMC Genomics 14, 906.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. 36, W465–W469.

Dubos, M.-P., Bernay, B., Favrel, P., 2017. Molecular characterization of an adipokinetic hormone-related neuropeptide (AKH) from a mollusk. Gen. Comp. Endocrinol. 243, 15–21. http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.11.002.

Fergani, C., 2017. Expanding the role of tachykinins in the neuroendocrine control of reproduction. Reproduction 153, R1–R14. http://dx.doi.org/10.1530/REP-16-0378.

Fleury, E., Huvet, A., Lelong, C., De Lorgeril, J., Boulo, V., Gueguen, Y., Bachère, E., Tanguy, A., Moraga, D., Fabioux, C., Lindeque, P., Shaw, J., Reinhardt, R., Prunet, P., Davey, G., Lapègue, S., Sauvage, C., Corporeau, C., Moal, J., Gavory, F., Wincker, P., Moreews, F., Klopp, C., Mathieu, M., Boudry, P., Favrel, P., 2009. Generation and analysis of a 29, 745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (Crassostrea gigas) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. BMC Genomics 15, 1–15. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-341.

Fujisawa, Y., Muneoka, Y., Takahashi, T., Takao, T., Shimonishi, Y., Kubota, I., Ikeda, T., Minakata, H., Nomoto, K., Kiss, T., Hiripi, L., 1993. An invertebrate-type tachykinin isolated from the freshwater bivalve mollusk, *Anodonta cygnea*. In: Okada, Y. (Ed.), Pept. Chem., Protein Research Foundation, Osaka, pp. 161–164.

Glantz, R.M., Miller, C.S., Nässel, D.R., 2000. Tachykinin-related peptide and GABA-mediated presynaptic inhibition of crayfish photoreceptors. J. Neurosci. 20, 1780–1790. http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezp-prod1.hul.harvard.edu/pubmed/10684879.

He, X., Zang, J., Li, X., Shao, J., Yang, H., Yang, J., Huang, H., Chen, L., Shi, L., Zhu, C., Zhang, G., Zhou, N., 2014. Activation of BNGR-A24 by direct interaction with tachykinin- related peptides from the silkworm *Bombyx mori* leads to the Gq and Gs-coupled signaling cascades. Biochemistry 293, 6667–6678.

Ikeda, T., Minakata, H., Nomoto, K., Kubota, I., Muneoka, Y., 1993. Two novel tachykinin-related neuropeptides in the echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192, 1–6.

Jiang, H., Lkhagva, A., Chae, H., Simo, L., Jung, S., Yoon, Y., Lee, N., Seong, J.Y., Park, Y., Kim, Y., 2013. Natalisin, a tachykinin-like signaling system, regulates sexual activity and fecundity in insects. Proc. Biol. Sci. 10, E3526–E3534. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1310676110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1310676110.

Kanda, A., Iwakoshi-Ukena, E., Takuwa-Kuroda, K., Minakata, H., 2003. Isolation and characterization of novel tachykinins from the posterior salivary gland of the common octopus *Octopus vulgaris*. Peptides 24, 35–43.

Kanda, A., Takuwa-Kuroda, K., Aoyama, M., Satake, H., 2007. A novel tachykinin-related peptide receptor of *Octopus vulgaris* - Evolutionary aspects of invertebrate tachykinin and tachykinin-related peptide. FEBS J. 274, 2229–2239. http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05760.x.

Kawada, T., Furukawa, Y., Shimizu, Y., Minakata, H., Nomoto, K., Satake, H., 2002. A novel tachykinin-related peptide receptor: Sequence, genomic organization, and functional analysis. Eur. J. Biochem. 269, 4238–4246. http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03106.x.

Khawaja, A.M., Rogers, D.F., 1996. Tachykinins: receptor to effector. Int. J. Biochem. Cell Biol. 28, 721–738. http://dx.doi.org/10.1016/1357-2725(96)00017-9.

Kotani, H., Hoshimaru, M., Nawa, H., Nakanishi, S., 1986. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 7074–7078.

Liu, L., Warner, F., Conlon, J., Burcher, E., 1999. Pharmacological and biochemical investigation of receptors for the toad gut tachykinin peptide, bufokinin, in its species of origin. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 360, 187–195.

Maguire, C., León, S., Carroll, R., Kaiser, U., Navarro, V., 2017. Altered circadian feeding behavior and improvement of metabolic syndrome in obese Tac1-deficient mice. Int. J. Obes. 41, 1798–1804.

Mertens, I., Vandingenen, A., Meeusen, T., De Loof, A., Schoofs, L., 2004. Postgenomic characterization of G-protein-coupled receptors. Pharmacogenomics 5, 657–672. http://dx.doi.org/10.1517/14622416.5.6.657.

Mirabeau, O., Joly, J., 2013. Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 2028–2037. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1219956110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1219956110.

Monnier, D., Colas, J., Rosay, P., Hen, R., 1992. NKD, a developmentally regulated tachykinin receptor in *Drosophila*. J. Biol. Chem. 267, 1298–1302.

Nagata, S., Morooka, N., Matsumoto, S., Kawai, T., Nagasawa, H., 2011. Effects of neuropeptides on feeding initiation in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Gen. Comp. Endocrinol. 172, 90–95. http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.03.004.

Nakajima, Y., Tsuchida, K., Negishi, M., Ito, S., Nakanishi, S., 1992. Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of both phosphatidylinositol hydrolysis and cyclic AMP cascades in transfected Chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. 267, 2437–2442.

Page, N.M., Bell, N.J., Gardiner, S.M., Manyonda, I.T., Brayley, K.J., Strange, P.G., Lowry, P.J., 2003. Characterization of the endokinins : Human tachykinins with cardiovascular activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 6245–6250.

Palamiuc, L., Noble, T., Witham, E., Ratanpal, H., Vaughan, M., Srinivasan, S., 2017. A tachykinin-like neuroendocrine signalling axis couples central serotonin action and nutrient sensing with peripheral lipid metabolism. Nat. Commun. 8, 14237. http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14237.

Palanche, T., Ilien, B., Zoffmann, S., Reck, M.P., Bucher, B., Edelstein, S.J., Galzi, J.L., 2001. The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. J. Biol. Chem. 276, 34853–34861. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M104363200.

Poels, J., Van Loy, T., Franssens, V., Detheux, M., Nachman, R.J., Oonk, H.B., Åkerman, K.E., Vassart, G., Parmentier, M., De Loof, A., Torfs, H., Vanden Broeck, J., 2004. Substitution of conserved glycine residue by alanine in natural and synthetic neuropeptide ligands causes partial agonism at the stomoxytachykinin receptor. J. Neurochem. 90, 472–478. http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02506.x.

Poels, J.R.J., Nachman, K.E., Åkerman, H.B., Oonk, F., Guerrero, A., De Loof, A.E., Janecka, H., Torfs, J., 2005. Vanden Broeck Pharmacology of stomoxytachykinin receptor depends on second messenger system,. Peptides 26, 109–114. http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.07.015.

Poels, J., Verlinden, H., Fichna, J., Van Loy, T., Franssens, V., Studzian, K., Janecka, A., Nachman, R.J., Vanden Broeck, J., 2007. Functional comparison of two evolutionary conserved insect neurokinin-like receptors. Peptides 28, 103–108. http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2006.06.014.

Poels, J., Birse, R.T., Nachman, R.J., Fichna, J., Janecka, A., Vanden Broeck, J., Nässel, D.R., 2009. Characterization and distribution of NKD, a receptor for *Drosophila* tachykinin-related peptide 6. Peptides 30, 545–556. http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.10.012.

Predel, R., Neupert, S., Roth, S., Derst, C., Nässel, D.R., 2005. Tachykinin-related peptide precursors in two cockroach species: Molecular cloning and peptide expression in brain neurons and intestine. FEBS J. 272, 3365–3375. http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04752.x.

Rance, N.E., Krajewski, S.J., Smith, M.A., Cholanian, M., Dacks, P.A., 2010. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. Brain Res. 1364, 116–128. http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.059.

Riviere, G., Klopp, C., Ibouniyamine, N., Huvet, A., Boudry, P., Favrel, P., 2015. GigaTON: an extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. BMC Bioinf. 16, 401. http://dx.doi.org/10.1186/s12859-015-0833-4.

Rodet, F., Lelong, C., Dubos, M.-P., Costil, K., Favrel, P., 2005. Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. BBA 1730, 187–195. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.05.012.

Ruder, T., Ali, S.A., Ormerod, K., Brust, A., Roymanchadi, M.L., Ventura, S., Undheim, E.A.B., Jackson, T.N.W., Mercier, A.J., King, G.F., Alewood, P.F., Fry, B.G., 2013. Functional characterization on invertebrate and vertebrate tissues of tachykinin peptides from *Octopus* venoms. Peptides 47, 71–76. http://dx.doi.org/10.1016/j.

peptides.2013.07.002.
Satake, H., Kawada, T., Nomoto, K., Minakata, H., Satake, H., Kawada, T., Nomoto, K., 2003. Insight into tachykinin-related peptides, their receptors, and invertebrate tachykinins: a review. Zool. Sci. 20, 533–549.
Satake, H., Ogasawara, M., Kawada, T., Masuda, K., Aoyama, M., Minakata, H., Chiba, T., Metoki, H., Satou, Y., Satoh, N., 2004. Tachykinin and tachykinin receptor of an ascidian, *Ciona intestinalis*. J. Biol. Chem. 279, 53798–53805. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M408161200.
Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T.K., Kochansky, J., Nachman, R., De Loof, A., 1990. Locustatachykinin III and IV : two additional insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. Regul. Pept. 31, 199–212.
Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T.K., Nachman, R.J., De Loof, A., 1990. Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. FEBS Lett. 261, 397–401.
Severini, C., Improta, G., Falconieri-erspamer, G., Salvadori, S., 2002. The tachykinin peptide family. Pharmacol. Rev. 54, 285–322.
Shimizu, Y., Matsuyama, H., Shiina, T., Takewaki, T., Furness, J.B., 2008. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. Cell. Mol. Life Sci. 65, 295–311. http://dx.doi.org/10.1007/s00018-007-7148-1.
Song, W., Veenstra, J.A., Perrimon, N., 2014. Control of lipid metabolism by tachykinin in *Drosophila*. Cell Rep. 9, 40–47. http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.060.
Steinhoff, M.S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., Bunnett, N.W., 2014. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. Physiol. Rev. 94, 265–301. http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00031.2013.
Stewart, M.J., Favrel, P., Rotgans, B.A., Wang, T., Zhao, M., Sohail, M., O'Connor, W.A., Elizur, A., Henry, J., Cummins, S.F., 2014. Neuropeptides encoded by the genomes of the Akoya pearl oyster *Pinctada fucata* and Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a bioinformatic and peptidomic survey. BMC Genomics 15, 840. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-840.
Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.
Torfs, H., Oonk, H.B., Vanden Broeck, J., Poels, J., Van Poyer, W., De Loof, A., Guerrero, F., Meloen, R.H., Åkerman, K., Nachman, R.J., 2001. Pharmacological characterization of STKR, an insect G protein-coupled receptor for tachykinin-like peptides. Arch. Insect Biochem. Physiol. 48, 39–49. http://dx.doi.org/10.1002/arch.1056.
Torfs, H., Detheux, M., Oonk, H.B., Karl, E.A., Van Loy, T., De Loof, A., Vassart, G., Parmentier, M., Vanden, J., 2002. Analysis of C-terminally substituted tachykinin-like peptide agonists by means of aequorin-based luminescent assays for human and insect neurokinin receptors. Biochem. Pharmacol. 63, 1675–1682.
Van Loy, T., Vandersmissen, H.P., Poels, J., Van Hiel, M.B., Verlinden, H., Vanden Broeck, J., 2010. Tachykinin-related peptides and their receptors in invertebrates: a current view. Peptides 31, 520–524. http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.023.
Vanden Broeck, J., Torfs, H., Poels, J., Van Poyer, W., Swinnen, E., Ferket, K., De Loof, A., 1999. Tachykinin-like peptides and their receptors. Ann. N. Y. Acad. Sci. 897, 374–387.
Winther, Å.M., Acebes, A., Ferrús, A., 2006. Tachykinin-related peptides modulate odor perception and locomotor activity in *Drosophila*. Mol. Cell. Neurosci. 31, 399–406. http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2005.10.010.
Winther, M., Nässel, D.R., 2001. Intestinal peptides as circulating hormones: release of tachykinin-related peptide from the locust and cockroach midgut. J. Exp. Biol. 204, 1269–1280.
Zatylny-Gaudin, C., Cornet, V., Leduc, A., Zanuttini, B., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., Garderes, J., Kraut, A., Couté, Y., Henry, J., 2016. Neuropeptidome of the cephalopod *Sepia officinalis*: identification, tissue mapping, and expression pattern of neuropeptides and neurohormones during egg laying. J. Proteome Res. 15, 48–67. http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00463.
Zhang, G.G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J.J.J.J.J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S.S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y.Y., Li, N.N., Wang, J.J.J.J.J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 490, 49–54. http://dx.doi.org/10.1038/nature11413.
Zhou, W., Li, S., Liu, Y., Qi, X., Chen, H., Cheng, C.H.K., Liu, X., Zhang, Y., Lin, H., 2012. The evolution of tachykinin/tachykinin receptor (TAC/TACR) in vertebrates and molecular identification of the TAC3/TACR3 system in zebrafish (*Danio rerio*). Mol. Cell. Endocrinol. 361, 202–212. http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.04.007.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abrieux A, Debernard S, Maria A, et al (2013) Involvement of the G-Protein-coupled Dopamine/Ecdysteroid receptor DopEcR in the behavioral response to sex pheromone in an insect. PLoS One 8:e72785. doi: 10.1371/journal.pone.0072785

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, et al (2000) The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science 287:2185–2195. doi: 10.1126/science.287.5461.2185

Adamson KJ, Wang T, Zhao M, et al (2015) Molecular insights into land snail neuropeptides through transcriptome and comparative gene analysis. BMC Genomics 16:1–15. doi: 10.1186/s12864-015-1510-8

Adema GJ, Baas PD (1992) A novel calcitonin-encoding mRNA is produced by alternative processing of calcitonin/calcitonin gene-related peptide-I pre-mRNA. J Biol Chem 267:7943–7948.

Ahn SJ, Martin R, Rao S, Choi MY (2017) Neuropeptides predicted from the transcriptome analysis of the gray garden slug Deroceras reticulatum. Peptides 93:51–65. doi: 10.1016/j.peptides.2017.05.005

Aiello E, Stefano GB, Catapane EJ (1981) Dual innervation of the foot and the control of foot movement by the central nervous system in Mytilus Edulis (Bivalvia). Comp Biochem Physiol Part C, Comp 69C:25–30. doi: 10.1016/0306-4492(81)90097-6

Al-Alkawi H, Lange AB, Orchard I (2017) Cloning, localization, and physiological effects of sulfakinin in the kissing bug, Rhodnius prolixus. Peptides 98:15–22. doi: 10.1016/j.peptides.2016.12.017

Alessi AM, O'Connor V, Aonuma H, Newland PL (2014) Dopaminergic modulation of phase reversal in desert locusts. Front Behav Neurosci 8:1–15. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00371

Alexander J, Oliphant A, Wilcockson DC, Webster SG (2018) Functional identification and characterization of the Diuretic Hormone 31 (DH31) signaling system in the green shore crab, Carcinus maenas. Front Neurosci 12. doi: 10.3389/fnins.2018.00454

Anador S, Brown C, Adebesin D, et al (2011) Identification of dopamine D2 receptors in Gill of Crassostrea virginica. In Vivo (Brooklyn) 32:74–79.

Anastasi A, Bertaccini G, Cei JM, et al (1969) Structure and pharmacological actions of phyllocaerulein, a caerulein-like nonapeptide: its occurrence in extracts of the skin of Phyllomedusa sauvagei and related Phyllomedusa species. Br J Pharmacol 37:198–206. doi: 10.1111/j.1476–5381.1969.tb09538.x

Anastasi A, Erspamer V, Endean R (1967) Isolation and structure of caerulein, an active decapeptide from the skin of Hyla caerulea. Experientia 23:699–700.

Anstey ML, Rogers SM, Swidbert, et al (2009) Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts, Science 323: 627–630.

Antonini A, Tolosa E (2009) Apomorphine and levodopa infusion therapies for advanced Parkinson's disease: Selection criteria and patient management. J Mov Disord 9:859–867. doi: 10.1586/ern.09.48

Arlot-Bonnemains Y, Van-Wormhoudt A, Favrel P, et al (1986) Calcitonin-like peptide in the shrimp Palemon serratus (Crustacea, Decapoda) during the intermolt cycle. Experientia 42:419–420.

Attwood TK, Findlay JB (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. Protein Eng 7:195–203.

Autelitano DJ, Rajic A, Smith AI, et al (2006) The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. Drug Discov Today 11:306–314. doi: 10.1016/j.drudis.2006.02.003

B

Ballesteros JA, Weinstein H (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In: Methods in Neurosciences. pp 366–428

Barger G, Dale HH (1910) Chemical structure and sympathomimetic action of amines. J Physiol 41:19–59.

Barger G, Ewins AJ (1910) Some phenolic derivatives of B-phenylethylamine. J Chem Soc 97:2253–2261.

Barron AB, Maleszka R, Vander Meer RK, Robinson GE (2007) Octopamine modulates honey bee dance behavior.

Barron AB, Søvik E, Cornish JL (2010) The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. Front Behav Neurosci 4:1–9. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00163

Bauknecht P, Jékely G (2015) Large-scale combinatorial deorphanization of platynereis neuropeptide GPCRs. Cell Rep 12:684–693. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.052

Beets I, Lindemans M, Janssen T, Verleyen P (2011) Deorphanizing g protein-coupled receptors by a calcium mobilization assay. Methods Mol Biol 789:377–391. doi: 10.1007/978-1-61779-310-3

Beggs KT, Glendining KA, Marechal NM, et al (2007) Queen pheromone modulates brain dopamine function in worker honey bees, Proc Nat Ac Sc 104:2460-2464.

Beinfeld MC (2003) Biosynthesis and processing of pro CCK: Recent progress and future challenges. Life Sci 72:747–757. doi: 10.1016/S0024-3205(02)02330-5

Belmont M, Cazzamali G, Williamson M, et al (2006) Identification of four evolutionarily related G protein-coupled receptors from the malaria mosquito Anopheles gambiae. Biochem Biophys Res Commun 344:160–165. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.03.117

Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol 125:359–369. doi: 10.1016/S0305-0491(99)00187-X

Bhaya D, Davison M, Barrangou R (2011) CRISPR-Cas Systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annu Rev Genet 45:273–297. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132430

Bi Y, Williams JA (2005) A role for Rho and Rac in secretagogue-induced amylase release by pancreatic acini. Am J Physiol Cell Physiol 289:22–32. doi: 10.1152/ajpcell.00395.2004.

Bigot L, Beets I, Dubos M-P, et al (2014) Functional characterization of a short neuropeptide F-related receptor in a lophotrochozoan, the mollusk Crassostrea gigas. J Exp Biol 217:2974–2982. doi: 10.1242/jeb.104067

Bigot L, Zatylny-Gaudin C, Rodet F, et al (2012) Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster Crassostrea gigas. Peptides 34:303–310. doi: 10.1016/j.peptides.2012.01.017

Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. Bioch et Bioph acta 1990:164–224.

Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schäfer S (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (Apis mellifera). J Comp Psychol 97:107–119. doi: 10.1037/0735-7036.97.2.107

Bjarnadóttir TK, Fredriksson R, Höglund PJ, et al (2004) The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. Genomics 84:23–33. doi:10.1016/j.ygeno.2003.12.004

Blaschko H, Richter D, Schlossmann H (1937) The oxidation of adrenaline and other amines. Bioch Journal 31:2187–2196.

Bockaert J (1995) Les récepteurs à sept domaines transmembranaires : physiologie et pathologie de la transduction. Médecine/sciences 11:382–394.

Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P (2004) GPCR interacting proteins (GIP). Pharmacol Ther 103:203–221. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.06.004

Boer HH, Schot LPC, Veenstra JA, Reichelt D (1980) Cell and tissue research immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. Cell Tissue Res 213:21-27.

Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, et al (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature 313:54–56. doi: 10.1038/313054a0

Brown BE (1975) Proctolin: a peptide transmitter candidate in insects. Life Sci 1241–1252.

Budnick V, Wu CF, White K (1989) Altered branching of serotonin-containing neurons in Drosophila mutants unable to synthesize serotonin and dopamine. J Neurosci 9:2866–2877.

Burke RD, Angerer LM, Elphick MR, et al (2006) A genomic view of the sea urchin nervous system. Dev Biol 300:434–460. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.08.007

C

Cai W, Kim CH, Go HJ, et al (2018) Biochemical, anatomical, and pharmacological characterization of calcitonin-type neuropeptides in starfish: discovery of an ancient role as muscle relaxants. Front Neurosci 12:382. doi: 10.3389/fnins.2018.00382

Cameron MS, Nobata S, Takei Y, Donald JA (2015) Vasodilatory effects of homologous adrenomedullin 2 and adrenomedullin 5 on isolated blood vessels of two species of eel. Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol 179:157–163. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.09.034

Cardoso JCR, Félix RC, Fonseca VG, Power DM (2012) Feeding and the rhodopsin family G-protein coupled receptors in Nematodes and Arthropods. Front Endocrinol (Lausanne) 3:1–22. doi: 10.3389/fendo.2012.00157

Carlsson A (1959) The occurence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. Pharmacol Rev 11:490–493.

Carlsson A, Waldeck B (1958) A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-Hydroxytyramine.). Acta Physiol Scand 44:293–298. doi: 10.1111/j.1748-1716.1958.tb01628.x

Carroll MA, Catapane EJ (2007) The nervous system control of lateral ciliary activity of the gill of the bivalve mollusc, Crassostrea virginica. Comp Biochem Physiol 148:445–450.

Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, et al (2014) Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. Int J Mol Sci 15:19700–19728. doi: 10.3390/ijms151119700

Chandhoke V, Southall M, Holt R, Flinn JM (2001) Dopamine receptor subtype density as a function of age in Aplysia californica. Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol 130:461–466. doi: 10.1016/S1096-4959(01)00447-X

Chang CL, Roh J, Hsu SYT (2004) Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: A comparison with other calcitonin/intermedin family peptides in vertebrates. Peptides 25:1633–1642. doi: 10.1016/j.peptides.2004.05.021

Chatenet D, Dubessy C, Boularan C, Scalbert E, et al (2006) Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogs: Identification of a urotensin II antagonist. J Med Chem 49:7234–7238.

Chausmer AC, Stuart C, Stevens M (1980) Identification of testicular cell plasma membrane receptors for calcitonin. J Lab Clin Med 96:933–938.

Christie AE (2008) Neuropeptide discovery in Ixodoidea: An in silico investigation using publicly accessible expressed sequence tags. Gen Comp Endocrinol 157:174–185. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.03.027

Christie AE, Stevens JS, Bowers MR, et al (2010) Identification of a calcitonin-like diuretic hormone that functions as an intrinsic modulator of the American lobster, Homarus americanus, cardiac neuromuscular system. J Exp Biol 213:118–127. doi: 10.1242/jeb.037077

Civelli O, Nothacker HP, Saito Y, et al (2001) Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. Trends Neurosci 24:230–237. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01763-X

Clos J (2012) Les fonctions de nutrition chez les animaux.

Clynen E, Schoofs L (2009) Peptidomic survey of the locust neuroendocrine system. Insect Biochem Mol Biol 39:491–507. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.06.001

Coast GM (2005) Mosquito natriuretic peptide identified as a calcitonin-like diuretic hormone in Anopheles gambiae (Giles). J Exp Biol 208:3281–3291. doi: 10.1242/jeb.01760

Coast GM, Webster SG, Schegg KM, et al (2001) The Drosophila melanogaster homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules. J Exp Biol 204:1795–1804.

Collip JB (1925) The extraction of a parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium. J Biol Chem 63:395–438.

Cong L, Ran FA, Cox D, et al (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science (80-) 339:819–823. doi: 10.1126/science.1231143

Conlon JM, Andrews PC, Falkmer S, Thima L (1988) Isolation and structural characterization of insulin from the holocephalan fish, Chimaera monstrosa (rabbit fish). Gen Comp Endocrinol 72:154–160. doi: 10.1016/0016-6480(88)90191-8

Conzelmann M, Williams EA, Krug K, et al (2013a) The neuropeptide complement of the marine annelid Platynereis dumerilii. BMC Genomics. doi: 10.1186/1471-2164-14-906

Conzelmann M, Williams EA, Tunaru S, et al (2013b) Conserved MIP receptor-ligand pair regulates Platynereis larval settlement. Proc Natl Acad Sci U S A 110:8224–8229. doi: 10.1073/pnas.1220285110

Copp DH, Cameron EC, Cheney BA, et al (1962) Evidence for calcitonin—a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. endocrinology 70:638–649. doi: 10.1210/endo-70-5-638

Copp HD (1963) Calcitonin: a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. Am Inst Oral Biol 16:872–877.

Cordelier P, Estève J-P, Bousquet C, et al (1997) Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. Proc Natl Acad Sci USA 94:9343–9348.

Cox KJ, Tensen CP, Van der Schors RC, et al (1997) Cloning, characterization, and expression of a G-protein-coupled receptor from Lymnaea stagnalis and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand. J Neurosci 17:1197–1205.

Crisp KM (2004) A cephalic projection neuron involved in locomotion is dye coupled to the dopaminergic neural network in the medicinal leech. J Exp Biol 207:4535–4542. doi: 10.1242/jeb.01315

Crisp KM, Klukas KA, Gilchrist LS, et al (2002) Distribution and development of dopamine- and octopamine-synthesizing neurons in the medicinal leech. J Comp Neurol 442:115–129. doi: 10.1002/cne.10077

Cruz LJ, de Santos V, Zafaralla GC, et al (1987) Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from Conus geographus and Conus straitus venoms. J Biol Chem 262:15821–15824.

Cueille C, Garel J (2004) RAMP et récepteurs couplés aux protéines G. médecine/sciences 20:773–778. doi: 10.1051/medsci/2004208-9773

D

De Jong-Brink M, Ter Maat A, Tensen CP (2001) NPY in invertebrates: Molecular answers to altered functions during evolution. Peptides 22:309–315. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00332-1

Dhainaut-Courtois N, Dubois MP, Tramu G, Masson M (1985) Occurrence and coexistence in Nereis diversicolor O.F. Müller (Annelida Polychaeta) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. Cell Tissue Res 242:97–108.

Dheilly NM, Lelong C, Huvet A, et al (2012) Gametogenesis in the Pacific oyster Crassostrea gigas: A microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. PLoS One 7:e36353. doi: 10.1371/journal.pone.0036353

Dickerson IM (2013) Role of CGRP-receptor component protein (RCP) in CLR/RAMP function. Curr protein pept sci 14:407–415.

Dockray GJ, Duve H, Thorpe A (1981) Immunochemical characterization of gastrin/cholecystokinin-like peptides in the brain of the blowfly, Calliphora vomitoria. Gen Comp Endocrinol 45:491–496. doi: 10.1016/0016-6480(81)90053-8

Dockray GJ, Gregory RA, Hutchison JB (1978) Isolation, structure and biological activity of two cholecystokinin octapeptides from sheep brain. Nature 274:711–713.

Donk JA van der, Lips CJM, Hackeng WHL, et al (1978) The synthesis of calcitonin: some characteristics of its precursors in man and rat. J Mol Med 3:98–104.

Dubos MP, Badariotti F, Rodet F, et al (2003) Molecular and physiological characterization of an invertebrate homologue of a calcitonin-related receptor. Biochem Biophys Res Commun 310:972–978. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.116

Dubos MP, Bernay B, Favrel P (2017) Molecular characterization of an adipokinetic hormone-related neuropeptide (AKH) from a mollusk. Gen Comp Endocrinol 243:15–21. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.11.002

Dubos MP, Zels S, Schwartz J, et al (2018) Characterization of a tachykinin signalling system in the bivalve mollusc Crassostrea gigas. Gen Comp Endocrinol 1–9. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.05.003

Dufresne M, Seva C, Fourmy D (2006) Cholecystokinin and Gastrin receptors. Physiol Rev 86:805–847. doi: 10.1152/physrev.00014.2005

Dunlop BW, Nemeroff CB (2007) The role of dopamine in the pathophysiology of depression. Arch Gen Psychiatry 64:327–337. doi: 10.1001/archpsyc.64.3.327

Dupré D, Tostivint H (2014) Evolution of the gastrin-cholecystokinin gene family revealed by synteny analysis. Gen Comp Endocrinol 195:164–173. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.10.019

Duve H, Thorpe A, Scott AG, et al (1995) The sulfakinins of the blowfly Calliphora vomitoria. Peptide isolation, gene cloning and expression studies. Eur J Biochem 232:633–640.

E

Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340

Edkins JS (1905) On the Chemical Mechanism of Gastric Secretion. Proc R Soc London Biol Sci Ser B 76:376.

Ellis PE (1963) Changes in the social aggregation of locust hoppers with changes in rearing conditions. Anim Behav 11:152–160. doi: 10.1016/0003-3472(63)90023-X

Elphick MR, Mirabeau O (2014) The evolution and variety of RFamide-type neuropeptides: Insights from deuterostomian invertebrates. Front Endocrinol (Lausanne) 5:1–11. doi: 10.3389/fendo.2014.00093

Elphick MR, Mirabeau O, Larhammar D (2018) Evolution of neuropeptide signalling systems. J Exp Biol 221:jeb151092. doi: 10.1242/jeb.151092

El-Salhy M, Falkmer S, Kramer KJ, Speirs RD (1983) Cell and Tissue Research Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca, and corpora allata of an adult lepidopteran insect, Manduca sexta (L). Cell Tissue Res 232:295–317.

Endress M, Zatylny-Gaudin C, Corre E, et al (2018) Crustacean cardioactive peptides: Expression, localization, structure, and a possible involvement in regulation of egg-laying in the cuttlefish Sepia officinalis. Gen Comp Endocrinol 260:67–79. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.12.009

Erspamer V, Boretti G (1951) Identification of Enteramine and Enteramine related substances in extracts of posterior salivary glands of octopus vulgaris by paper chromatography. Arch Int Pharmacodyn Ther 88:296–332.

Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, et al (2000) CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. J Biol Chem 275:31438–31443. doi: 10.1074/jbc.M005604200

Evans PD, Bayliss A, Reale V (2014) GPCR-mediated rapid, non-genomic actions of steroids: Comparisons between DmDopEcR and GPER1 (GPR30). Gen Comp Endocrinol 195:157–163. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.10.015

Evans PD, Maqueira B (2005) Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned Drosophila G-protein coupled receptors. Invertebr Neurosci 5:111–118. doi: 10.1007/s10158-005-0001-z

F

Fabbri M, Ferreira JJ, Lees A, et al (2018) Opicapone for the treatment of Parkinson's disease: A review of a new licensed medicine. Mov Disord 33:1528–1539. doi: 10.1002/mds.27475

Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, et al (2009) In vivo RNA interference in oyster--vasa silencing inhibits germ cell development. FEBS J 276:2566–2573. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x

Favrel P, Giard W, Benlimane N, et al (1994) A new biological activity for the neuropeptide FMRFamide: experimental evidence for a secretagogue effect on amylase secretion in the scallop Pecten maximus. Experientia 50:1106–1110. doi: 10.1007/BF01923468

Favrel P, Van-Wormhoudt A, Studler JM, Bellon C (1987) Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinin-like peptides in Palaemon serratus (Crustacea decapoda): Intermolt variations. Gen Comp Endocrinol 65:363–372. doi: 10.1016/0016-6480(87)90121-3

Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, et al (2005) A Novel Mechanism for JAK2 Activation by a G Protein-coupled Receptor, the CCK2R. J Biol Chem 280:10710–10715. doi: 10.1074/jbc.M413309200

Ferrière F (2000) Intérêt de la procalcitonine, nouveau marqueur de l'infection bactérienne. Ann Biol Clin (Paris) 58:49–59.

Fischer JA, Tobler PH, Kaufmann M, et al (1981) Calcitonin: regional distribution of the hormone and its binding sites in the human brain and pituitary. Proc Natl Acad Sci U S A 78:7801–7805.

Fleury E, Huvet A, Lelong C, et al (2009) Generation and analysis of a 29 , 745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (Crassostrea gigas) assembled into a publicly accessible database : the GigasDatabase. BMC Genomics 15:1–15. doi: 10.1186/1471-2164-10-341

Fónagy A, Schoofs L, Proost P, et al (1992) Isolation and primary structure of two sulfakinin-like peptides from the fleshfly, Neobellieria bullata. Comp Biochem Physiol Part C, Comp 103:135–142. doi: 10.1016/0742-8413(92)90242-Y

Force T, Bonventre J V, Flannery MR, et al (1992) A cloned porcine renal calcitonin receptor couples to adenylyl cyclase and phospholipase C. Am J Physiol 262:F1110–F1115.

Fouchereau-Peron M, Moukthar MS, Benson AA, Milhaud G (2000) Characterization of specific receptors for calcitonin in porcine lung. Proc Natl Acad Sci USA 78:3973–3975.

Fourmy D, Escrieut C, Archer E, et al (2002) Structure of cholecystokinin receptor binding sites and mechanism of activation/inactivation by agonists/antagonists. Pharmacol Toxicol 91:313–20. doi: 10.1034/j.1600-0773.2002.910608.x

Fredriksson R (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. Mol Pharmacol 63:1256–1272. doi: 10.1124/mol.63.6.1256

Frendo JL, El Demerdache MM, Orcel P (2000) La calcitonine et son récepteur. Rev du Rhum [Edition Fr] 67:46–54. doi: 10.1016/S1169-8330(00)80077-0

Fritsch HAR, Van Noorden S, Pearse AGE (1980) Calcitonin-like immunochemical staining in the alimentary tract of Ciona intestinalis L. Cell Tissue Res 205:439–444. doi: 10.1007/BF00232284

Fritsch HAR, Van Noorden S, Pearse AGE (1979) Localization of somatostatin-, substance P- and calcitonin-like immunoreactivity in the neural ganglion of Ciona intestinalis L. (Ascidiaceae). Cell Tissue Res 202:263–274. doi: 10.1007/BF00232240

Furuya K, Milchak RJ, Schegg KM, et al (2000) Cockroach diuretic hormones: Characterization of a calcitonin-like peptide in insects. Proc Natl Acad Sci 97:6469–6474. doi: 10.1073/pnas.97.12.6469

Fussnecker BL, Smith BH, Mustard JA (2006) Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (Apis mellifera). J Insect Physiol 52:1083–1092. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.07.008

G

Gainey LFJ (2010) Seasonal potentiation of gill muscle contraction in four species of bivalve molluscs. J Exp Mar Bio Ecol 391:43–49. doi: 10.1016/j.jembe.2010.06.009

Galtsoff PE (1964) The american oyster Crassostrea virginica. Fishery bulletin of the fish and wildlife service volume 64.

Galzi J-L, Ilien B (2012) Les récepteurs couplés aux protéines G. médecine/sciences 28:852–857. doi: 10.1051/medsci/20122810013

Garcia LJ, Rosado JA, Gonzalez A, Jensen RT (1997) Cholecystokinin-stimulated tyrosine phosphorylation of p125 FAK and paxillin is mediated by phospholipase C-dependent and-independent mechanisms and requires the integrity of the actin cytoskeleton and participation of p21 rho.

Gard AL, Lenz PH, Shaw JR, Christie AE (2009) Identification of putative peptide paracrines/hormones in the water flea Daphnia pulex (Crustacea; Branchiopoda; Cladocera) using transcriptomics and immunohistochemistry. Gen Comp Endocrinol 160:271–287. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.12.014

Geraerts WPM (1976) Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail Lymnaea stagnalis. Gen Comp Endocrinol 29:61–71. doi: 10.1016/0016-6480(76)90007-1

Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. Endocrine Reviews 21:90–113. doi: 10.1210/er.21.1.90

Giard W, Favrel P, Boucaud-Camou E (1995) In vitro investigation of α-amylase release from the digestive cells of the bivalve mollusc Pecten maximus: effect of second messengers and biogenic amines. J Comp Physiol B 164:518–523. doi: 10.1007/BF00261391

Giard W, Lebel JM, Boucaud-Camou E, 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 - B Biochem Syst Environ Physiol. doi: 10.1007/s003600050123

Gibbs J, Young RC, Smith GP (1973) Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. Nature, UK 245:323–325. doi: 10.1038/245323a0

Gigoux V, Maigret B, Escrieut C, et al (1999) Arginine 197 of the cholecystokinin-A receptor binding site interacts with the sulfate of the peptide agonist cholecystokinin. Protein Sci 8:2347–54. doi: 10.1110/ps.8.11.2347

Girgis SI, Galan Galan F, Arnett TR, et al (1980) Immunoreactive human calcitonin-like in the nervous systems of Protochordates and a cyclostome, Myxine. J Endocrinol 87:375–382. doi: 10.1677/joe.0.0870375

Goda T, Tang X, Umezaki Y, et al (2016) Drosophila DH31 neuropeptide and PDF receptor regulate night-onset temperature preference. J Neurosci 36:11739–11754. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0964-16.2016

Gordon EJ (2007) Small-Molecule Screening: It Takes a Village. ACS Chem Biol 2:9–16. doi: 10.1021/cb6004454

Gorn AH, Lin HY, Yamin M, et al (1992) Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. JClinInvest 90:1726–1735.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 27:221–224. doi: 10.1093/molbev/msp259

Graf JD (2007) La procalcitonine, un marqueur (idéal?) des états septiques.

Gregory H, Hardy PM, Jones DS, et al (1964) The antral hormone gastrin. Nature 204:931–933.

Griffiths JR, Unwin RD (2016) Analysis of protein post-translational modifications by mass spectrometry. Wiley and Sons. doi:10.1002/9781119250906

Grimmelikhuijzen CJP, Hauser F (2012) Mini-review: The evolution of neuropeptide signaling. Regul Pept 177:S6–S9. doi: 10.1016/j.regpep.2012.05.001

Guo YS, Cheng J-Z, Jin G-F, et al (2002) Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. J Biol Chem 277:48755–48763. doi: 10.1074/jbc.M209016200

H

Habener JF, Singer FR, Deftos L, et al (1971) Explanation for unusual potency of salmon calcitonin. Nat New Biol 232:91–92. doi: 10.1038/newbio232091a0

Hammer M, Menzel R (1995) Learning and memory in the honeybee. J Neurosci 15:1617–1630.

Hammer M, Menzel R (1998) Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in Honeybees. Learn and Mem 5:146–156.

Han B, Logsdon CD (1999) Cholecystokinin induction of mob-1 chemokine expression in pancreatic acinar cells requires NF-κB activation. Am J Physiol Physiol 277:C74–C82. doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.1.C74

Hansen KK, Stafflinger E, Schneider M, et al (2010) Discovery of a novel insect neuropeptide signaling system closely related to the insect adipokinetic hormone and corazonin hormonal systems. J Biol Chem 285:10736–10747. doi: 10.1074/jbc.M109.045369

Harper AA, Raper HS (1943) Pancreozymin, a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine. J Physiol 102:115–125.

Harshini S, Nachman RJ, Sreekumar S (2002) In vitro release of digestive enzymes by FMRF amide related neuropeptides and analogues in the lepidopteran insect Opisina arenosella (Walk.). Peptides 23:1759–63.

Haselton AT, Yin C-M, Stoffolano JG (2006) The effects of Calliphora vomitoria tachykinin-I and the FMRFamide-related peptide perisulfakinin on female Phormia regina crop contractions, in vitro. J Insect Physiol 52:436–441. doi: 10.1016/j.jinsphys.2005.12.003

Hashemzadeh-Gargari H, Otto Friesen W (1989) Modulation of swimming activity in the medicinal leech by serotonin and octopamine. Comp Biochem Physiol Part C, Comp 94:295–302. doi: 10.1016/0742-8413(89)90182-5

Henry J, Zatylny C, Boucaud-Camou E (1999) Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod Sepia officinalis: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. Peptides 20:1061–70.

Henry J, Zatylny C, Favrel P (2000) HPLC and electrospray ionization mass spectrometry as tools for the identification of APGWamide-related peptides in gastropod and bivalve mollusks: comparative activities on Mytilus muscles. Brain Res 862:162–170.

Herpin A, Badariotti F, Rodet F, Favrel P (2004) Molecular characterization of a new leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor from a bivalve mollusc: Evolutionary implications. Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr 1680:137–144. doi: 10.1016/j.bbaexp.2004.09.003

Hewes RS (2001) Neuropeptides and Neuropeptide Receptors in the Drosophila melanogaster Genome. Genome Res 11:1126–1142. doi: 10.1101/gr.169901

Hill CA, Doyle T, Nuss AB, et al (2016) Comparative pharmacological characterization of D1-like dopamine receptors from Anopheles gambiae, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus suggests pleiotropic signaling in mosquito vector lineages. Parasites and Vectors 9:1–6. doi: 10.1186/s13071-016-1477-6

Hinson JP, Kapas S, Smith DM (2000) Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. Endocr Rev 21:138–167. doi: 10.1210/er.21.2.138

Hiraoka S, Miyazaki Y, Kitamura S, et al (2001) Gastrin induces CXC chemokine expression in gastric epithelial cells through activation of NF-B.

Hirsch PF, Lester GE, Talmage R V (2001) Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? J Musculoskel Neuron Interact 1:299–305.

Holtz YP, Heise R (1938) Fermentativer Abbau yon 1-Dioxyphenylalanin (Dopa) dutch Niere. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol 191:87–118.

Hong Y, Hay DL, Quirion R, Poyner DR (2012) The pharmacology of adrenomedullin 2/intermedin. Br J Pharmacol 166:110–120. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01530.x

Hoovers JMN, Redeker E, Speleman F, et al (1993) High-Resolution Chromosomal Localization of the Human Calcitonin/CGRP/IAPP Gene Family Members. Genomics 15:525–529. doi: 10.1006/geno.1993.1104

Hornykiewicz O (1986) A quarter century of brain dopamine research. Dopaminergic Syst their Regul 3–18. doi: 10.1007/978-1-349-07431-0_1

Hornykiewicz O (2002) Dopamine miracle: From brain homogenate to dopamine replacement. Mov Disord 17:501–508. doi: 10.1002/mds.10115

Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, et al (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. J Biol Chem 266:12127–12130.

Howard JE (1957) Calcium metabolism, bones and calcium homeostasis. A review of certain current concepts. J Clin Endocrinol Metab 17:1105–1123. doi: 10.1210/jcem-17-9-1105

Hu GM, Mai TL, Chen C-M (2017) Visualizing the GPCR Network: classification and evolution. Sci Rep 7:15495. doi: 10.1038/s41598-017-15707-9

Huang ES (2005) Predicting ligands for orphan GPCRs. Drug Discov Today 10:69–73. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03349-5

Huang HC, Klein PS (2004) The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. Genome Biol 5:234. doi: 10.1186/gb-2004-5-7-234

Hummon AB, Richmond TA, Verleyen P, et al (2006) From the Genome to the Proteome: Uncovering Peptides in the Apis Brain. Science (80-) 314:647–649. doi: 10.1126/science.1124128

Huvet A, Béguel JP, Cavaleiro NP, et al (2015) Disruption of amylase genes by RNA interference affects reproduction in the Pacific oyster Crassostrea gigas. J Exp Biol 218:1740–7. doi: 10.1242/jeb.116699

I

Iga M, Kataoka H (2015) Identification and characterization of the diuretic hormone 31 receptor in the silkworm Bombyx mori. Biosci Biotechnol Biochem 79:1305–1307. doi: 10.1080/09168451.2015.1018128

Ivy AC, Oldberg E (1928) Contraction and evacuation of the gallbladder by a purified "secretin" preparation. J Am Med Assoc 90:445. doi: 10.1001/jama.1928.02690330017005

J

Janssen T, Lindemans M, Meelkop E, et al (2010) Coevolution of neuropeptidergic signaling systems: From worm to man. Ann N Y Acad Sci 1200:1–14. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05506.x

Janssen T, Meelkop E, Lindemans M, et al (2008) Discovery of a cholecystokinin-gastrin-like signaling system in nematodes. Endocrinology 149:2826–2839. doi: 10.1210/en.2007-1772

Janssen T, Meelkop E, Nachman RJ, Schoofs L (2009) Evolutionary conservation of the cholecystokinin/gastrin signaling system in nematodes. Ann N Y Acad Sci 1163:428–432. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03649.x

Jekely G (2013) Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. Proc Natl Acad Sci 110:8702–8707. doi: 10.1073/pnas.1221833110

Ji P, Xu F, Huang B, et al (2016) Molecular characterization and functional analysis of a putative octopamine/tyramine receptor during the developmental stages of the pacific oyster, crassostrea gigas. PLoS One 11:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0168574

Johnsen AH (1998) Phylogeny of the Cholecystokinin / Gastrin Family. Front. Neuroendocrinol. 19:73–99.

Johnsen AH, Duve H, Davey M, et al (2000) Sulfakinin neuropeptides in a crustacean. Isolation, identification andtissue localization in the tiger prawn Penaeus monodon. Eur J Biochem 267:1153–60.

Johnsen AH, Rehfeld JF (1990) Cionin: A disulfotyrosyl hybrid of cholecystokinin and gastrin from the neural ganglion of the protochordate Ciona intestinalis. J Biol Chem 265:3054–3058.

Johnson EC (2004) Drosophila CG8422 encodes a functional diuretic hormone receptor. J Exp Biol 207:743–748. doi: 10.1242/jeb.00818

Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, et al (2005) A novel diuretic hormone receptor in Drosophila: evidence for conservation of CGRP signaling. J Exp Biol 208:1239–1246. doi: 10.1242/jeb.01529

Kaczer L, Maldonado H (2009) Contrasting role of octopamine in appetitive and aversive learning in the crab Chasmagnathus. PLoS One 4:e6223. doi: 10.1371/journal.pone.0006223

Kass-Simon G, Pierobon P (2007) Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol 146:9–25. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.09.008

Katafuchi T, Kikumoto K, Hamano K, et al (2003) Calcitonin receptor-stimulating peptide, a new member of the calcitonin gene-related peptide family: Its isolation from porcine brain, structure, tissue distribution, and biological activity. J Biol Chem 278:12046–12054. doi: 10.1074/jbc.M207970200

Katafuchi T, Yasue H, Osaki T, Minamino N (2009) Calcitonin receptor-stimulating peptide: Its evolutionary and functional relationship with calcitonin/calcitonin gene-related peptide based on gene structure. Peptides 30:1753–1762. doi: 10.1016/j.peptides.2009.06.012

Kawada T, Sekiguchi T, Sakai T, et al (2010) Neuropeptides, hormone peptides, and their receptors in Ciona intestinalis: An Update. Zoolog Sci 27:134–153. doi: 10.2108/zsj.27.134

Kim CH, Kim EJ, Go HJ, et al (2016) Identification of a novel starfish neuropeptide that acts as a muscle relaxant. J Neurochem 137:33–45. doi: 10.1111/jnc.13543

Kim YC, Lee HG, Han KA (2007) Behavioral/systems/cognitive D 1 Dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in Drosophila. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1167-07.2007

Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al (1993) Adrenomedullin: a novel Hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Biochem Biophys Res Commun 192:553–560. doi: 10.1006/bbrc.1993.1451

Koh TJ, Chen D (2000) Gastrin as a growth factor in the gastrointestinal tract. Regul Pept 93:37–44.

Kolakowski LFJ (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. Receptors Channels 2:1–7.

Kopin AS, Mathes WF, McBride EW, et al (1999) The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of body weight. J Clin Invest 103:383–391. doi: 10.1172/JCI4901

Kramer KJ, Speirs RD, Childs CN (1977) Immunochemical evidence for a gastrin-like peptide in insect neuroendocrine system. Gen Comp Endocrinol 32:423–426. doi: 10.1016/0016-6480(77)90224-6

Krashes MJ, Dasgupta S, Vreede A, et al (2009) A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in Drosophila. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.035

Krishnan A, Almén MS, Fredriksson R, Schiöth HB (2012) The origin of GPCRs: Identification of mammalian like rhodopsin, adhesion, glutamate and frizzled GPCRs in fungi. PLoS One 7:1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0029817

Kristiansen K (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: Molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. Pharmacol Ther 103:21–80. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.05.002

Kubiak TM, Larsen MJ, Burton KJ, et al (2002) Cloning and functional expression of the first Drosophila melanogaster sulfakinin receptor DSK-R1. Biochem Biophys Res Commun 291:313–20. doi: 10.1006/bbrc.2002.6459

Kunst M, Hughes ME, Raccuglia D, et al (2014) CGRP neurons mediate sleep-specific circadian output in Drosophila. doi: 10.1016/j.cub.2014.09.077

Kurokawa T, Suzuki T, Hashimoto H (2003) Identification of gastrin and multiple cholecystokinin genes in teleost. Peptides 24:227–235. doi: 10.1016/S0196-9781(03)00034-2

Kuroki Y, Kanda T, Kubota I, et al (1990) A molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone, RPCH. Biochem Biophys Res Commun 167:273–279. doi: 10.1016/0006-291X(90)91761-G

L

Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA (2001) Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster Crassostrea gigas. Gen Comp Endocrinol 122:181–188. doi: 10.1006/gcen.2001.7629

Lafont AG, Dufour S, Fouchereau-Peron M (2004) Characterisation and distribution of calcitonin gene-related peptide in a primitive teleost, the eel, Anguilla anguilla and comparison with calcitonin. Regul Pept 117:141–148. doi: 10.1016/j.regpep.2003.10.018

Lafont AG, Fitzpatrick T, Cliff Rankin J, et al (2006) Possible role of calcitonin gene-related peptide in osmoregulation via the endocrine control of the gill in a teleost, the eel, Anguilla anguilla. Peptides 27:812–819. doi: 10.1016/j.peptides.2005.09.009

Lafont AG, Wang YF, Chen GD, et al (2011) Involvement of calcitonin and its receptor in the control of calcium-regulating genes and calcium homeostasis in zebrafish (Danio rerio). J Bone Miner Res 26:1072–1083. doi: 10.1002/jbmr.301

Lajeunesse DR, Johnson B, Presnell JS, et al (2010) Peristalsis in the junction region of the Drosophila larval midgut is modulated by DH31 expressing enteroendocrine cells.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860–921. doi: 10.1038/35057062

Langvad Hansen B, Nergaard Hansen G, Scharrer B (1982) Cell and tissue research immunoreactive material resembling vertebrate neuropeptides in the corpus cardiacum and corpus allatum of the insect Leucophaea maderae. Cell Tissue Res 225:319–329.

Larsson LI, Rehfeld JF (1977) Evidence for a common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin. Nature 269:335–338. doi: 10.1038/269335a0

Lebel JM, Giard W, Favrel P, 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. doi: 10.1016/0248-4900(96)89526-8

Lee G, Kikuno K, Bahn JH, et al (2013) Dopamine D2 Receptor as a Cellular Component Controlling Nocturnal Hyperactivities in Drosophila melanogaster. Chronobiol Int 30:443–459. doi: 10.3109/07420528.2012.741169

Lee SP, So CH, Rashid AJ, et al (2004) Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. J Biol Chem 279:35671–35678. doi: 10.1074/jbc.M401923200

Leprince J, Oulyadi H, Vaudry D, Masmoudi O, Gandolfo P, Patte C, et al (2001) Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. Eur J Biochem 268:6045–6057.

Li B, Predel R, Neupert S, et al (2007) Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle Tribolium castaneum. Genome Res 18:113–122. doi: 10.1101/gr.6714008

Li KW, Jimrnez CR, Van Veelen PA, Geraerts WPM (1994) Processing and Targeting of a Molluscan Egg-Laying Peptide Prohormone as Revealed by Mass Spectrometric Peptide Fingerprinting and Peptide Sequencing. Endocrin 134:1812–1819.

Li KW, Smit AB, Geraerts WPM (1992) Structural and functional characterization of neuropeptides involved in the control of male mating behavior of Lymnaea stagnalis. Peptides 13:633–638. doi: 10.1016/0196-9781(92)90166-Z

Li S, Hauser F, Skadborg SK, et al (2016) Adipokinetic hormones and their G protein-coupled receptors emerged in Lophotrochozoa. Sci Rep 6:1–13. doi: 10.1038/srep32789

Lin HY, Harris TL, Flannery MS. Aruffo A, et al (1991) Expression Cloning of an Adenylate Cyclase-Coupled Calcitonin Receptor. Science 254:1022–1024.

Lips CJM, Sluys Veer JA van der, Donk JA van der, et al (1978) Common precursor molecule as origine for the ectopic-hormone-producing-tumor syndrome. Lancet 16–18.

Little PJ, Hollenberg MD, Kamato D, et al (2016) Integrating the GPCR transactivation-dependent and biased signalling paradigms in the context of PAR1 signalling. Br J Pharmacol 173:2992–3000. doi: 10.1111/bph.13398

Liu Z, Wang L, Yan Y, et al (2018) D1 dopamine receptor is involved in shell formation in larvae of Pacific oyster Crassostrea gigas. Dev Comp Immunol 84:337–342. doi: 10.1016/j.dci.2018.03.009

Liu Z, Zhou Z, Wang L, et al (2016) CgA1AR-1 acts as an alpha-1 adrenergic receptor in oyster Crassostrea gigas mediating both cellular and humoral immune response. Fish Shellfish Immunol 58:50–58. doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.022

Lubet P (1959) Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamétes chez les mytilides et les pectinides (Mollusques bivalves). Rev des Trav l'Institut des Pêches Marit 23:387–548.

M

MacCallum WG, Voegtlin C (1909) On the relation of parathyroidectomy to calcium metabolism. J Exp Med 11:118–151.

Maestro JL, Aguilar R, Pascual N, et al (2001) Screening of antifeedant activity in brain extracts led to the identification of sulfakinin as a satiety promoter in the German cockroach. Are arthropod sulfakinins homologous to vertebrate gastrins-cholecystokinins? Eur J Biochem 268:5824–30.

Makhlouf GM, McManus JP, Card WI (1964) The action of gastrin II on gastric-acid secretion in man. Comparison of the maximal secretory response to gastrin II and histamine. Lancet (London, England) 2:485–9.

Malanga CJ, Wenger GR, Aiello EL (1972) Endogenous dopamine in bivalve gills. Comp Biochem Physiol 43A:825–830. doi: 10.1016/0300-9629(72)90153-3

Maqueira B, Chatwin H, Evans PD (2005) Identification and characterization of a novel family of Drosophila β-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. J Neurochem 94:547–560. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03251.x

Marella S, Mann K, Scott K (2012) Dopaminergic modulation of sucrose acceptance behavior in Drosophila. Neuron 73:941–950. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.032

Marino CR, Leach SD, Schaefer JF, et al (1993) Characterization of cAMP-dependent protein kinase activation by CCK in rat pancreas. FEBS Lett 316:48–52.

Martin K, Huggins T, King C, et al (2008) The neurotoxic effects of manganese on the dopaminergic innervation of the gill of the bivalve mollusc, Crassostrea virginica. Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol 148:152–159. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.05.004

Martínez-Ramírez AC, Ferré J, Silva FJ (1992) Catecholamines in drosophila melanogaster: DOPA and dopamine accumulation during development. Insect Biochem Mol Biol 22:491–494. doi: 10.1016/0965-1748(92)90145-5

Marx SJ, Woodward C, Aurbach GD, et al (1973) Renal rceptors for Calcitonin. J Biol Chem 248:4797–4802.

Masek P, Keene AC (2016) Gustatory processing and taste memory in Drosophila. J Neurogenet 30:112–121. doi: 10.1080/01677063.2016.1185104

Massoubre C, Rattner A, Pellet J, et al (2002) La cholécystokinine : mise au point. Nutr Clin Métabo 16:4–13.

Mayorova TD, Tian S, Cai W, et al (2016) Localization of Neuropeptide Gene Expression in Larvae of an Echinoderm, the Starfish Asterias rubens. Front Neurosci 10:1–18. doi: 10.3389/fnins.2016.00553

McKnight AJ, Gordon S (1996) EGF-TM7: a novel subfamily of seven-transmembrane-region leukocyte cell-surface molecules. Immunol Today 17:283–287. doi: 10.1007/s12026-007-0049-4

Mclatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature 393-339:333–.

McLean FC (1957) The parathyroid hormone and bone. Clin Orthop 9:46–60.

McVeigh P, Leech S, Marks NJ, et al (2006) Gene expression and pharmacology of nematode NLP-12 neuropeptides. Int J Parasitol 36:633–640. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.01.009

Mendive FM, Van Loy T, Claeysen S, et al (2005) Drosophila molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. FEBS Lett 579:2171–2176. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.006

Mercer AR, Menzel R (1982) The Effects of Biogenic Amines on Conditioned and Unconditioned Responses to Olfactory Stimuli in the Honeybee Apis meilifera. J Comp Physiol 145:363–368.

Mertens I, Vandingenen A, Johnson EC, et al (2005) Report PDF Receptor Signaling in Drosophila Contributes to Both Circadian and Geotactic Behaviors. Neuron 48:213–219. doi: 10.1016/j.neuron.2005.09.009

Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, et al (2005) Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. Nat Genet 37:166–170. doi: 10.1038/ng1501

Meunier JC, Mollereau C, Toll L, et al (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. Nature 377:532–535.

Meyering-Vos M, Müller A (2007a) Structure of the sulfakinin cDNA and gene expression from the Mediterranean field cricket Gryllus bimaculatus. Insect Mol Biol 16:445–454. doi: 10.1111/j.1365-2583.2007.00737.x

Meyering-Vos M, Müller A (2007b) RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket Gryllus bimaculatus. J Insect Physiol 53:840–848. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.04.003

Mirabeau O, Joly JS (2013) Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. Proc Natl Acad Sci U S A 110:E2028–37. doi: 10.1073/pnas.1219956110

Mirzadegan T, Benko G, Filipek S, Palczewski K (2003) Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: Similarities to rhodopsin. Biochemistry 42:2759–2767. doi: 10.1021/bi027224+

Montagu KA (1957) Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. Nature 180:244–245.

Moore EE, Kuestner RE, Stroop SD, et al (1995) Functionally different isoforms of the human calcitonin receptor result from alternative splicing of the gene transcript. Mol Endocrinol 9:959–968. doi: 10.1210/mend.9.8.7476993

Moroz LL, Edwards JR, Puthanveettil S V, et al (2006) Neuronal transcriptome of Aplysia: neuronal compartments and circuitry. Cell 127:1453–67. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.052

Morris AJ, Malbon CC (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. Physiol Rev 79:1373–1430. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1373

Muff R, Born W, Fisher JA (1995) Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. Eur J Endocrinol 133:17–20.

Mustard JA, Beggs KT, Mercer AR (2005) Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. Arch Insect Biochem Physiol 59:103–117. doi: 10.1002/arch.20065

Mutt V (1994) Historical Perspectives on Cholecystokinin Research. Ann New York Acad Sci 713:1–10. doi: doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44046.x

Mutt V, Jorpes E (1971) Hormonal polypeptides of the upper intestine. Biochem J 125:57P–58P. doi: 10.1042/bj1250057P

N

Nachman RJ, Giard W, Favrel P, et al (1997) Insect myosuppressins and sulfakinins stimulate release of the digestive enzyme α-amylase in two invertebrates: The scallop Pecten maximus and insect Rhynchophorus ferrugineus. Ann N Y Acad Sci 814:335–338. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb46178.x

Nachman RJ, Holman GM, Cook BJ, et al (1986a) Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. Biochem Biophys Res Commun 140:357–364. doi: 10.1016/0006-291X(86)91098-3

Nachman RJ, Holman GM, Haddon WF, Ling N (1986b) Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. Science (80-) 15:71–73.

Nachman RJJ, Giard W, Lange A, Favrel P (1999) Stimulation of alpha-amylase release in the scallop Pecten maximus by the myosuppressins. Structure-activity relationships. Ann N Y Acad Sci 897:273–281.

Nagata S, Nagasawa H (2017) Calcitonin-like peptide hormone (CT/DH) in the frontal ganglia as a feeding regulatory peptide of the silkworm, Bombyx mori. Peptides 98:23–28. doi: 10.1016/j.peptides.2016.05.002

Naro F, Perez M, Migliaccio S, et al (1998) Phospholipase D-and protein kinase C isoenzyme-dependent signal transduction pathways activated by the calcitonin receptor. Endocrinoly 139:3241–3248.

Nässel DR, Enell LE, Santos JG, et al (2008) A large population of diverse neurons in the Drosophila central nervous system expresses short neuropeptide F, suggesting multiple distributed peptide functions. doi: 10.1186/1471-2202-9-90

Nässel DR, Williams MJ (2014) Cholecystokinin-like peptide (DSK) in Drosophila, not only for satiety signaling. Front Endocrinol (Lausanne) 5:1–5. doi: 10.3389/fendo.2014.00219

Nathans J, Hogness DS (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. Cell 34:807–814. doi: 0092-8674/83/100807-08

Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, et al (2002) An amino-acid taste receptor. Nature 416:199–202. doi: 10.1038/nature726

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, et al (2001) Mammalian Sweet Taste Receptors insight to our understanding of chemosensory discrimination and coding. Recently, we described the isolation of two novel families of G protein-coupled receptors. Cell 106:381–390. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00451-2

Nelson M, Adams T, Ojo C, et al (2018) Manganese toxicity is targeting an early step in the dopamine signal transduction pathway that controls lateral cilia activity in the bivalve mollusc Crassostrea virginica. Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol 213:1–6. doi: 10.1016/j.cbpc.2018.07.002

Niall HD, Keutmann HT, Copp DH, Potts JTJ (1969) Amino acide sequence of salmon ultimobranchial calcitonin. Proc Natl Acad Sci USA 63:771–778.

Nichols R (2007) The first nonsulfated sulfakinin activity reported suggests nsDSK acts in gut biology. Peptides 28:767–773. doi: 10.1016/j.peptides.2007.01.009

Nichols R, Manoogian B, Walling E, Mispelon M (2009) Plasticity in the effects of sulfated and nonsulfated sulfakinin on heart contractions. Front Biosci 14:4035–4043.

O

O'Gara BA, Friesen WO (1995) Termination of leech swimming activity by a previously identified swim trigger neuron. J Comp Physiol A. doi: 10.1007/BF00207191

Offermanns S, Simon MI (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. J Biol Chem 270:15175–80.

Ogoshi M, Inoue K, Naruse K, Takei Y (2006) Evolutionary history of the calcitonin gene-related peptide family in vertebrates revealed by comparative genomic analyses. Peptides 27:3154–3164. doi: 10.1016/j.peptides.2006.09.011

Ogoshi M, Inoue K, Takei Y (2003) Identification of a novel adrenomedullin gene family in teleost fish. Biochem Biophys Res Commun 311:1072–1077. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.10.111

Ogoshi M, Kato K, Sakamoto T (2015) Effect of environmental salinity on expression of adrenomedullin genes suggests osmoregulatory activity in the medaka, Oryzias latipes. Zool Lett 1:12. doi: 10.1186/s40851-015-0012-5

Osinga TE, Links TP, Dullaart RPF, et al (2017) Emerging role of dopamine in neovascularization of pheochromocytoma and paraganglioma. FASEB J 31:2226–2240. doi: 10.1096/fj.201601131R

Ouafik L, Martin PM (2008) Rôle de l'Adrénomédulline dans la vascularisation sanguine et lymphatique. médecine/sciences 24:682–683. doi: 10.1051/medsci/20082489682

Oumi T, Ukena K, Matsushima O, et al (1994) Annetocin: An Oxytocin-Related Peptide Isolated from the Earthworm, Eisenia foetida. Biochem Biophys Res Commun 198:393–399. doi: 10.1006/bbrc.1994.1055

P

Palczewski K (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. Science (80-) 289:739–745. doi: 10.1126/science.289.5480.739

Park JY, Lee SY, Kim HR, et al (2016) Structural mechanism of GPCR-arrestin interaction: Recent breakthroughs. Arch Pharm Res 39:293–301. doi: 10.1007/s12272-016-0712-1

Park Y, Kim YJ, Adams ME (2002) Identification of G protein-coupled receptors for Drosophila PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. Proc Natl Acad Sci U S A 99:11423–8. doi: 10.1073/pnas.162276199

Penick CA, Brent CS, Dolezal K, Liebig J (2014) Neurohormonal changes associated with ritualized combat and the formation of a reproductive hierarchy in the ant Harpegnathos saltator. J Exp Biol 217:1496–1503. doi: 10.1242/jeb.098301

Peyon P, Lin X., Himick B., Peter R. (1998) Molecular cloning and expression of cDNA encoding brain preprocholecystokinin in goldfish. Peptides 19:199–210. doi: 10.1016/S0196-9781(97)00296-9

Pflüger HJ, Stevenson PA (2005) Evolutionary aspects of octopaminergic systems with emphasis on arthropods. Arthropod Struct Dev 34:379–396. doi: 10.1016/j.asd.2005.04.004

Pin JP, Comps-Agrar L, Maurel D, et al (2009) G-protein-coupled receptor oligomers: Two or more for what? Lessons from mGlu and GABABreceptors. J Physiol 587:5337–5344. doi: 10.1113/jphysiol.2009.179978

Pin JP, Kniazeff J, Binet V, et al (2004) Activation mechanism of the heterodimeric GABABreceptor. Biochem Pharmacol 68:1565–1572. doi: 10.1016/j.bcp.2004.06.035

Poyner DR (2002) International Union of Pharmacology. XXXII. The Mammalian Calcitonin Gene-Related Peptides, Adrenomedullin, Amylin, and Calcitonin Receptors. Pharmacol Rev 54:233–246. doi: 10.1124/pr.54.2.233

Prado MA, Evans-Bain B, Oliver KR, Dickerson IM (2001) The role of the CGRP-receptor component protein (RCP) in adrenomedullin receptor signal transduction. Peptides 22:1773–1781. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00517-4

Price DA, Greenberg MJ (1977) Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. Science 197:670–671. doi: 10.1126/science.877582

Proux JP, Millert CA, Li JP, et al (1987) Identification of an arginine vasopressin-like diuretic hormone from Locusta migratoria. Biochem and Biophys Res Com 149:180–186.

Pryce K, Knight J, Catapane E, Carroll M (2011) Pharmacological study of the effects of octopamine on heart rate of Crassostrea viginica. In: Annals of the 2011 Annual SICB Conference. pp 1–20

Pryce K, Samuel D, Lagares E, et al (2015) Presence of octopamine and an octopamine receptor in Crassostrea virginica. *In vivo* (Brooklyn) 37:16–24.

Rang HP (2006) The receptor concept: Pharmacology's big idea. Br J Pharmacol 147:9–16. doi: 10.1038/sj.bjp.0706457

Rasmussen H (1961) Parathyroid hormone. Am J Med 30:112–128. doi: 10.1016/0002-9343(61)90068-7

Rasmussen H, Craig LC (1961) Isolation of a parathyroid polypeptides from acetic acid extracts of bovine parathyroid glands. J Biol Chem 236:1083–1086.

Regna K, Kurshan PT, Harwood BN, et al (2016) A critical role for the Drosophila dopamine D1-like receptor Dop1R2 at the onset of metamorphosis. BMC Dev Biol 16:15. doi: 10.1186/s12861-016-0115-z

Rehfeld JF (2017) Cholecystokinin-From local gut hormone to ubiquitous messenger. Front Endocrinol (Lausanne) 8:1–8. doi: 10.3389/fendo.2017.00047

Rehfeld JF, Friis-Hansen L, Goetze JP, Hansen TVO (2007) The biology of cholecystokinin and gastrin peptides. Curr Top Med Chem 7:1154–65. doi: 10.2174/156802607780960483

Reich G (1992) A new peptide of the oxytocin/vasopressin family isolated from nerves of the cephalopod Octopus vulgaris. Neurosci Lett 134:191–194. doi: 10.1016/0304-3940(92)90514-8

Ren J, Liu X, Jiang F, et al (2010) Unusual conservation of mitochondrial gene order in Crassostrea oysters: evidence for recent speciation in Asia. BMC Evol Biol 10:394. doi: 10.1186/1471-2148-10-394

Riviere G, Klopp C, Ibouniyamine N, et al (2015) GigaTON: An extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster Crassostrea gigas. BMC Bioinformatics 16:401. doi: 10.1186/s12859-015-0833-4

Rodet F, Lelong C, Dubos MP, et al (2005) Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr 1730:187–195. doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.05.012

Rodet F, Lelong C, Dubos MP, Favrel P (2008) Alternative splicing of a single precursor mRNA generates two subtypes of Gonadotropin-Releasing Hormone receptor orthologues and their variants in the bivalve mollusc Crassostrea gigas. Gene 414:1–9. doi: 10.1016/j.gene.2008.01.022

Roeder T (2005) TYRAMINE AND OCTOPAMINE: Ruling Behavior and Metabolism. Annu Rev Entomol 50:447–477. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130404

Roessingh P, Simpson SJ (1994) The time-course of behavioural phase change in nymphs of the desert locust, Schistocerca gregaria. Physiol Entomol 19:191–197. doi: 10.1111/j.1365-3032.1994.tb01042.x

Rogers SM, Matheson T, Sasaki K, et al (2004) Substantial changes in central nervous system neurotransmitters and neuromodulators accompany phase change in the locust. J Exp Biol 207:3603–3617. doi: 10.1242/jeb.01183

Roh J, Chang CL, Bhalla A, et al (2004) Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. J Biol Chem 279:7264–7274. doi: 10.1074/jbc.M305332200

Roshchina VV. (2016) New trends and perspectives in the evolution of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. Adv in Exp Med and Biol 874:25–77.

Roth BL (2016) DREADDs for Neuroscientists. Neuron 89:683–694. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.040

Rowe ML, Achhala S, Elphick MR (2014) Neuropeptides and polypeptide hormones in echinoderms: New insights from analysis of the transcriptome of the sea cucumber Apostichopus japonicus. Gen Comp Endocrinol 197:43–55. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.12.002

Rowe ML, Elphick MR (2012) The neuropeptide transcriptome of a model echinoderm, the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. Gen Comp Endocrinol 179:331–344. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.09.009

Russell FA, King R, Smillie S-J, et al (2014) Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 94:1099–1142. doi: 10.1152/physrev.00034.2013

S

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell 92:573–585. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80949-6

Sanderson PH, Marshall F, Wilson RE (1960) Calcium and phosphorus homeostasis in the parathyroidectomized dog; evaluation by means of ethylenediamine tetraacetate and calcium tolerance tests. J Clin Invest 39:662–670. doi: 10.1172/JCI104081

Sawada H, Yamaguchi H, Shimbara T, et al (2006) Central effects of calcitonin receptor-stimulating peptide-1 on energy homeostasis in rats. Endocrinology 147:2043–2050. doi: 10.1210/en.2005-1226

Scheiner R, Plückhahn S, Öney B, et al (2002) Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. Behav Brain Res 136:545–553. doi: 10.1016/S0166-4328(02)00205-X

Schiöth HB, Fredriksson R (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. Gen Comp Endocrinol 142:94–101. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.12.018

Schmidt WE, Creutzfeldt W, Schleser A, et al (1991) Role of CCK in regulation of pancreaticobiliary functions and GI motility in humans: effects of loxiglumide. Am J Physiol Liver Physiol 260:G197–G206. doi: 10.1152/ajpgi.1991.260.2.G197

Schoofs L, Holman M, Hayes T, De Loof A (1990) Isolation and identification of a sulfakinin-like peptide, with sequence homology to vertebrate gastrin and cholecystokinin, from the brain of Locusta migratoria. Chromatogr Isol insect Horm pheromones 231–241.

Schulte G, Wright SC (2018) Frizzleds as GPCRs – more conventional than we thought! Trends Pharmacol Sci 0:1–15. doi: 10.1016/j.tips.2018.07.001

Schwartz J, Dubos MP, Pasquier J, et al (2018) Emergence of a cholecystokinin/sulfakinin signalling system in Lophotrochozoa. Sci Rep 8:16424. doi: 10.1038/s41598-018-34700-4

Scott MGH, Benmerah A, Marullo S (2004) Endocytose des récepteurs couplés aux protéines G. médecine/sciences 20:78–83. doi: 10.1051/medsci/200420178

Sekiguchi T, Kuwasako K, Ogasawara M, et al (2016) Evidence for conservation of the calcitonin superfamily and activity-regulating mechanisms in the basal chordate: Branchiostoma floridae Insights into the molecular and functional evolution in chordates. J Biol Chem 291:2345–2356. doi: 10.1074/jbc.M115.664003

Sekiguchi T, Ogasawara M, Satake H (2012) Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, Ciona intestinalis: the evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family. J Endocrinol 213:99–106. doi: 10.1530/JOE-11-0410

Sekiguchi T, Suzuki N, Fujiwara N, et al (2009) Calcitonin in a protochordate, Ciona intestinalis - The prototype of the vertebrate calcitonin/calcitonin gene-related peptide superfamily. FEBS J 276:4437–4447. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07151.x

Selcho M, Pauls D, Han K-A, et al (2009) The Role of Dopamine in Drosophila Larval Classical Olfactory Conditioning. PLoS One 4:e5897. doi: 10.1371/journal.pone.0005897

Semmens DC, Mirabeau O, Moghul I, et al (2016) Transcriptomic identification of starfish neuropeptide precursors yields new insights into neuropeptide evolution. Open Biol. doi: 10.1098/rsob.150224

Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega 7. Mol Syst Biol. doi: 10.1038/msb.2011.75

Silvente-Poirot S, Wank SA, (1996) A Segment of Five Amino Acids in the Second Extracellular Loop of the Cholecystokinin-B Receptor Is Essential for Selectivity of the Peptide Agonist Gastrin. J Biol Chem 271:1469–14706.

Slocinska M, Marciniak P, Jarmuszkiewicz W, Rosinski G (2015) New metabolic activity of the nonsulfated sulfakinin Zopat-SK-1 in the insect fat body. Peptides 68:157–163. doi: 10.1016/j.peptides.2014.05.010

Smeekens SP, Steiner DF (1990) Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing KEX2. JBiolChem 265:2997–3000.

Smith CL, Varoqueaux F, Kittelmann M, et al (2014) Novel Cell Types, Neurosecretory Cells, and Body Plan of the Early-Diverging Metazoan Trichoplax adhaerens. Curr Biol 24:1565–1572. doi: 10.1016/j.cub.2014.05.046

Smith GP, Jerome C, Gibbs J (1981) Abdominal vagotomy does not block the satiety effect of bombesin in the rat. Peptides 2:409–411. doi: 10.1016/S0196-9781(81)80096-4

Söderberg JAE, Carlsson MA, Nässel DR (2012) Insulin-producing cells in the Drosophila brain also express satiety-inducing cholecystokinin-like peptide, drosulfakinin. Front Endocrinol (Lausanne) 3:1–13. doi: 10.3389/fendo.2012.00109

Sokoloff P, Martres MP, Schwartz JC (1993) La famille des récepteurs de la dopamine. Medecine/Sciences 9:12–20.

Song J, Olsen R, Szafranski K, et al (2006) The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. Nature 435:43–57.

Srivastava DP (2005) Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel Drosophila G-protein-coupled receptor. J Neurosci 25:6145–6155. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1005-05.2005

Staubli F, Jørgensen TJD, Cazzamali G, Williamson M, et al (2002) Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. Proc Natl Acad Sci 99: 3446-3451. doi: 10.1073/pnas.052556499

Stepan V, Ramamoorthy S, Pausawasdi N, et al (2004) Role of small GTP binding proteins in the growth-promoting and antiapoptotic actions of gastrin. doi: 10.1152/ajpgi.00169.2003.-G17

Stewart MJ, Favrel P, Rotgans BA, et al (2014) Neuropeptides encoded by the genomes of the Akoya pearl oyster *Pinctata fucata* and Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a bioinformatic and peptidomic survey. BMC Genomics 15:840. doi: 10.1186/1471-2164-15-840

Stone J V, Mordue W (1976) Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. Nature 263:207–211. doi: 10.1038/261403a0

Suzuki N, Suzuki T, Kurokawa T (2000) Cloning of a calcitonin gene-related peptide receptor and a novel calcitonin receptor-like receptor from the gill of flounder, Paralichthys olivaceus. Gene 244:81–88. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00004-4

Suzuki N, Suzuki T, Kurokawa T (2002) Possible involvement of calcitonin gene-related peptide in seawater adaptation of flounder: Expression analysis of its receptor mRNA in the gill. Fish Sci 68:425–429. doi: 10.1046/j.1444-2906.2002.00441.x

Suzuki N, Suzuki T, Kurokawa T (2001) Cloning of a calcitonin gene-related peptide from genomic DNA and its mRNA expression in flounder, Paralichthys olivaceus. Peptides 22:1435–1438. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00484-3

T

Takeda K, Okumura T, Terahata M, et al (2018) Drosophila peptide hormones allatostatin A and diuretic hormone 31 exhibiting complementary gradient distribution in posterior midgut antagonistically regulate midgut senescence and adult lifespan. Zoolog Sci 35:75–85. doi: 10.2108/zs160210

Takei Y, Hashimoto H, Inoue K, et al (2008) Central and peripheral cardiovascular actions of adrenomedullin 5, a novel member of the calcitonin gene-related peptide family, in mammals. J Endocrinol 197:391–400. doi: 10.1677/JOE-07-0541

Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197

Te Brugge VA, Schooley DA, Orchard I (2008) Amino acid sequence and biological activity of a calcitonin-like diuretic hormone (DH31) from Rhodnius prolixus. J Exp Biol 211:382–390. doi: 10.1242/jeb.013771

Te Brugge VA, Lombardi VC, Schooley DA, Orchard I (2005) Presence and activity of a Dippu-DH31-like peptide in the blood-feeding bug, Rhodnius prolixus. Peptides 26:29–42. doi: 10.1016/j.peptides.2004.08.025

Tensen CP, Cox KJ, Smit a B, et al (1998) The lymnaea cardioexcitatory peptide (LyCEP) receptor: a G-protein-coupled receptor for a novel member of the RFamide neuropeptide family. J Neurosci 18:9812–21.

Tepper SJ (2018) History and Review of anti-Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Therapies: From Translational Research to Treatment. Headache J Head Face Pain. doi: 10.1111/head.13379

The C. elegans Sequencing Consortium (1998) Genome Sequence of the Nematode C. elegans: A Platform for Investigating Biology. Science (80-) 282:2012–2018. doi: 10.1126/science.282.5396.2012

Thompson J, Higgins D, Gibson T (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–80.

Torfs P, Baggerman G, Meeusen T, et al (2002) Isolation, identification, and synthesis of a disulfated sulfakinin from the central nervous system of an arthropod, the white shrimp Litopenaeus vannamei. Biochem and Biophys Res Commun 299:312–320.

Turrigiano G, Selverston AI (1989) Cholecystokinin-like peptide is a modulator of a crustacean central pattern generator. J Neurosci 9:2486–2501.

V

Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, et al (2004) Major events in the genome evolution of vertebrates: Paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. Proc Natl Acad Sci 101:1638–1643. doi: 10.1073/pnas.0307968100

Varoqueaux F, Fasshauer D (2017) Getting nervous: an evolutionary overhaul for communication. Annu Rev Genet 51:455–476. doi: 10.1146/annurev-genet-120116-024648

Veenstra JA (1989) Isolation and structure of two gastrin/CCK-like neuropeptides from the American cockroach homologous to the leucosulfakinins. Neuropeptides 14:145–149. doi: 10.1016/0143-4179(89)90038-3

Veenstra JA (2014) The contribution of the genomes of a termite and a locust to our understanding of insect neuropeptides and neurohormones. Front Physiol. doi: 10.3389/fphys.2014.00454

Veenstra JA (2010) Neurohormones and neuropeptides encoded by the genome of Lottia gigantea, with reference to other mollusks and insects. Gen Comp Endocrinol 167:86–103. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.02.010

Veenstra JA (2011) Neuropeptide evolution: Neurohormones and neuropeptides predicted from the genomes of Capitella teleta and Helobdella robusta. Gen Comp Endocrinol 171:160–175. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.01.005

Veenstra JA, Romberg-Privee HM, Schooneveld H, Polak JM (1985) Histochemistry Immunocytochemical localization of peptidergic neurons and neurosecretory cells in the neuro-endocrine system of the Colorado potato beetle with antisera to vertebrate regulatory peptides. Histochemistry 82:9–18.

Verlinden H (2018) Dopamine signalling in locusts and other insects. Insect Biochem Mol Biol 97:40–52. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.04.005

Verlinden H, Vleugels R, Marchal E, et al (2010) The role of octopamine in locusts and other arthropods. J Insect Physiol 56:854–867. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.05.018

Verlinden H, Vleugels R, Verdonck R, et al (2015) Pharmacological and signalling properties of a D2-like dopamine receptor (Dop3) in Tribolium castaneum. Insect Biochem Mol Biol 56:9–20. doi: 10.1016/j.ibmb.2014.11.002

Vigna SR, Morgan LM, Thomas M (1984) Localization and characterization of gastrin/cholecystokinin-like immunoreactivity in the central nervous system of Aplysia californica. J Neurosci 4:1370–1377.

W

Wan Li K, Jiménez CR, Veelen PAV et al. (1994) Processing and targeting of a molluscan egg-laying peptide prohormone as revealed by mass spectrometric peptide fingerprinting and peptide sequencing

Wang W, Qiao Y, Li Z (2018) New Insights into Modes of GPCR Activation. Trends Pharmacol Sci 39:367–386. doi: 10.1016/j.tips.2018.01.001

Wang YF, Lafont AG, Lee YC, Hwang PP (2016) A novel function of calcitonin gene-related peptide in body fluid Cl − homeostasis. Proc R Soc B Biol Sci 283:20160684. doi: 10.1098/rspb.2016.0684

Wang Z (2016) Transactivation of epidermal growth factor receptor by g protein-coupled receptors: Recent progress, challenges and future research. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms17010095

Wank SA (1998) G Protein-Coupled Receptors in Gastrointestinal Physiology I. CCK receptors: an exemplary family. Am J Physiol 274:607–613.

Webb TR, Clark AJL (2010) Minireview: The Melanocortin 2 Receptor Accessory Proteins. Mol Endocrinol 24:475–484. doi: 10.1210/me.2009-0283

Wei Z, Baggerman G, R JN, et al (2000) Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, Schistocerca gregaria. J Insect Physiol 46:1259–1265. doi: S0022191000000469 [pii]

West SD, Helmer KS, Chang LK, et al (2003) Cholecystokinin secretagogue-induced gastroprotection: role of nitric oxide and blood flow. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284:399–410. doi: doi.org/10.1152/ajpgi.00130.2002

Weston C, Winfield I, Harris M, et al (2016) Receptor activity-modifying protein-directed G protein signaling specificity for the calcitonin gene-related peptide family of receptors. J Biol Chem 291:21925–21944. doi: 10.1074/jbc.M116.751362

Wimalawansa SJ (1996) Calcitonin gene-related peptide and its receptors: Molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. Endocr Rev 17:533–585. doi: 10.1210/edrv-17-5-533

Wootten D, Christopoulos A, Sexton PM (2013) Emerging paradigms in GPCR allostery: Implications for drug discovery. Nat Rev Drug Discov 12:630–644. doi: 10.1038/nrd4052

Xu A, Choi KL, Wang Y, et al (2002) Identification of novel putative membrane proteins selectively expressed during adipose conversion of 3T3-L1 cells. Biochem Biophys Res Commun 293:1161–1167. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00354-6

Yang B, Ni J, Zeng Z, et al (2013) Cloning and characterization of the dopamine like receptor in the oyster Crassostrea angulata: Expression during the ovarian cycle. Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol 164:168–175. doi: 10.1016/j.cbpb.2012.12.006

Yang JH, Jia YX, Pan CS, et al (2005) Effects of intermedin1–53 on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. Biochem Biophys Res Commun 327:713–719. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.071

Yeoh JGC, Pandit AA, Zandawala M, et al (2017) DINeR: Database for Insect Neuropeptide Research. Insect Biochem Mol Biol 86:9–19. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.05.001

Youdim MBH, Bakhle YS (2006) Monoamine oxidase: Isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. Br J Pharmacol. doi: 10.1038/sj.bjp.0706464

Yu HG, Schrader H, Otte J-M, et al (2004) Rapid tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130Cas by gastrin in human colon cancer cells. Biochem Pharmacol 67:135–146. doi: 10.1016/j.bcp.2003.08.015

Yu N, Nachman RJ, Smagghe G (2013) Characterization of sulfakinin and sulfakinin receptor and their roles in food intake in the red flour beetle Tribolium castaneum. Gen Comp Endocrinol 188:196–203. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.03.006

Yu N, Smagghe G (2014a) CCK(-like) and receptors: Structure and phylogeny in a comparative perspective. Gen Comp Endocrinol 209:74–81. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.05.003

Yu N, Smagghe G (2014b) Characterization of sulfakinin receptor 2 and its role in food intake in the red flour beetle, Tribolium castaneum. Peptides 53:232–237. doi: 10.1016/j.peptides.2013.12.011

Yule DI, Tseng MJ, Williams JA, Logdson CD (1993) A cloned CCK-A receptor transduces multiple signals in response to full and partial agonists. Am J Physiol 265:G999–1004. doi: 10.1152/ajpgi.1993.265.5.G999

Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, et al (2002) Forty years of calcitonin - Where are we now? A tribute to the work of Iain Macintyre, FRS. Bone 30:655–663. doi: 10.1016/S8756-3282(02)00688-9

Zandawala M (2012) Calcitonin-like diuretic hormones in insects. Insect Biochem Mol Biol 42:816–825. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.06.006

Zandawala M, Li S, Hauser F, et al (2013) Isolation and functional characterization of calcitonin-like diuretic hormone receptors in Rhodnius prolixus. PLoS One 8:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0082466

Zandawala M, Paluzzi J-P, Orchard I (2011) Isolation and characterization of the cDNA encoding DH31 in the kissing bug, Rhodnius prolixus. Mol Cell Endocrinol 331:79–88. doi: 10.1016/j.mce.2010.08.012

Zatylny-Gaudin C, Bernay B, Zanuttini B, et al (2010) Characterization of a novel LFRFamide neuropeptide in the cephalopod Sepia officinalis. Peptides 31:207–14. doi: 10.1016/j.peptides.2009.11.021

Zatylny-Gaudin C, Cornet V, Leduc A, et al (2016) Neuropeptidome of the Cephalopod Sepia officinalis: Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. J Proteome Res 15:48–67. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00463

Zatylny-Gaudin C, Favrel P (2014) Diversity of the RFamide peptide family in mollusks. Front Endocrinol (Lausanne) 5:1–14. doi: 10.3389/fendo.2014.00178

Zels S, Dillen S, Crabbé K, et al (2015) Sulfakinin is an important regulator of digestive processes in the migratory locust, Locusta migratoria. Insect Biochem Mol Biol 61:8–16. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.03.008

Zels S, Verlinden H, Dillen S, et al (2014) Signaling properties and pharmacological analysis of two sulfakinin receptors from the red flour beetle, Tribolium castaneum. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0094502

Zhang G, Fang X, Guo X, et al (2012a) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 490:49–54. doi: 10.1038/nature11413

Zhang M, Wang Y, Li Y, et al (2018) Identification and Characterization of Neuropeptides by Transcriptome and Proteome Analyses in a Bivalve Mollusc *Patinopecten yessoensis*. Front Genet. doi: 10.3389/fgene.2018.00197

Zhang Z, Wu J, Yu J, Xiao J (2012b) A brief review on the evolution of GPCR: conservation and diversification. Open J Genet 02:11–17. doi: 10.4236/ojgen.2012.24B003

Zimering MB, Madsen AJ, Elde RP (1988) CCK-8 inhibits feeding-specific neurons in Navanax, an opisthobranch mollusc. Peptides 9:133–139. doi: 10.1016/0196-9781(88)90019-8

Zoephel J, Reiher W, Rexer KH, et al (2012) Peptidomics of the agriculturally damaging larval stage of the cabbage root fly Delia radicum (Diptera: Anthomyiidae). PLoS One 7:e41543. doi: 10.1371/journal.pone.0041543

Zollinger RM, Ellison EC (1955) Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors. Twenty-five-year appraisal. Ann Surg 142:709–723. doi: 10.1097/00000658-198009000-00018

Identification de voies neuroendocriniennes du contrôle de la physiologie chez l'huître *Crassostrea gigas* par la caractérisation fonctionnelle de couples ligands/récepteurs.

Résumé

Les acteurs neuroendocriniens régulant la physiologie des Lophotrochozoaires, groupe frère des Ecdysozoaires parmi les Protostomiens, demeurent peu connus. Grâce à l'émergence récente de ressources génomiques, transcriptomiques et peptidomiques chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'étude des couples ligand(s)/récepteur(s) régulant les fonctions physiologiques est désormais facilitée. Ainsi, par une approche d'endocrinologie inverse consistant à éprouver l'activité d'un panel de ligands potentiels, plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), jusqu'alors orphelins ont pu être caractérisés sur le plan fonctionnel. Trois voies de signalisation ont été étudiées : la voie de type cholécystokinine/sulfakinine (CCK/SK) la voie de type calcitonine (CT) et la voie de type dopamine (DA). Grâce à des tests fonctionnels, deux neuropeptides et deux récepteurs de type CCK/SK ont pu être caractérisés. Des tests d'activité biologique *in vitro* et des expériences de conditionnement alimentaire ont montré la potentielle implication de ces couples dans la régulation de la digestion et de la satiété chez l'huître. Par ailleurs, deux couples neuropeptide/récepteur de type CT ont été caractérisés montrant, à l'image de leurs homologues chez les vertébrés, leur possible rôle dans la régulation hydrique ou ionique. D'autre part, un récepteur activé de manière spécifique par la dopamine et la tyramine a été caractérisé. Ce système de signalisation semble être impliqué dans la médiation du stress et intervenir dans les processus régulateurs de la reproduction au niveau de la gonade. Ainsi, les différents résultats obtenus au cours de ces travaux ont permis d'identifier des couples ligands/récepteurs d'huître homologues de systèmes de signalisation présents chez les Ecdysozoaires et les vertébrés confirmant l'origine de ces systèmes neuroendocriniens depuis l'ancêtre commun des Bilatériens. Les résultats obtenus ont également permis de mieux comprendre comment l'huître intègre les paramètres du milieu et donc s'acclimate aux différentes contraintes environnementales.

Mots-clés :

Récepteurs couplés aux protéines G, neuropeptides, physiologie, huître *Crassostrea gigas*, Cholécystokinine, Calcitonine, Dopamine.

Identification of neuroendocrine pathways regulating physiological processes in the oyster *Crassostrea gigas via* the functional characterization of ligand / receptor couples.

Abstract

The neuroendocrine regulators of the physiology of Lophotrochozoa, the sister clade of Ecdysozoa among Protostoma, remain poorly understood. Thanks to the recent emergence of genomic, transcriptomic and peptidomic resources in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, the functional characterization of ligand/receptor pairs regulating a diversity of physiological functions has been facilitated. Using a reverse endocrinology approach, a number of orphan G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) have been functionally characterized. Three signalling systems have been studied in the oyster: The cholecystokinin/sulfakinin (CCK/SK), the calcitonin (CT) and the dopamine (DA) signalling systems. Two CCK/SK receptors and ligands have been characterized. *In vitro* bioassays and feeding conditions suggested the potential involvement of this signalling system in the regulation of digestion and satiety. Besides, two couples of CT-type peptides and receptors have been characterized showing, as for their vertebrate counterparts, their possible role in the regulation of water and ion balance. A receptor specifically activated by dopamine and by tyramine has also been characterized. This signalling system appeared to be implicated in the mediation of stress and to play a role in the regulatory processes of reproduction in the gonads. This study allowed the characterization in the oyster of ligand receptor pairs homolog to known signalling systems present in Ecdysozoa and vertebrates, thus confirming the origin of these neuroendocrine systems in the common ancestor of Bilateria. The results of this study also contributed to understand how the oyster integrates external parameters and adapts to various environmental constrains.

Key words:

G-proteins coupled receptors, neuropeptides, physiology, oyster *Crassostrea gigas*, Cholecystokinin, Calcitonin, Dopamine.