



HAL
open science

Neuropeptides et phéromones sexuelles impliqués dans le contrôle de la ponte chez la seiche *Sepia Officinalis*

Maxime Endress

► **To cite this version:**

Maxime Endress. Neuropeptides et phéromones sexuelles impliqués dans le contrôle de la ponte chez la seiche *Sepia Officinalis*. Biologie de la reproduction. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC208 . tel-01842255

HAL Id: tel-01842255

<https://theses.hal.science/tel-01842255>

Submitted on 18 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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

Neuropeptides et phéromones sexuelles impliqués dans le contrôle de la ponte chez la seiche *Sepia officinalis*

Présentée et soutenue par
Maxime ENDRESS

Thèse soutenue publiquement le 10 avril 2018

devant le jury composé de

Mme Martine MAIBECHE	Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mr Jean-Yves TOULLEC	Maître de Conférences, HDR Université Pierre et Marie Curie Station biologique de Roscoff	Rapporteur
Mme Fabienne AUDEBERT	Maître de Conférences, Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Mr Pascal FAVREL	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Examineur
Mme Céline ZATYLNKY-GAUDIN	Maître de Conférences, HDR Université de Caen Normandie	Examineur
Mr Joël HENRY	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Joël Henry, UMR BOREA



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



EdNBISE
Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Remerciements

Remerciements

Je remercie chaleureusement le Professeur Joël Henry de l'Université de Caen Normandie, pour avoir encadré ce travail, et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche scientifique. Son enthousiasme, ses conseils et son investissement ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Docteur Céline Zatylny-Gaudin, de l'Université de Caen Normandie, pour ses conseils scientifiques, ses encouragements et ses observations qui ont apporté un regard critique et constructif à ce travail. Ses connaissances du modèle Sepia ont été d'une aide précieuse.

J'apporte ma reconnaissance au Professeur Pascal Sourdain pour son accueil au sein de l'Unité Mixte de Recherche BOREA (Biologie des Organismes et des Ecosystèmes Associés).

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Martine Maibeche, de l'Université Pierre et Marie Curie, et au Docteur Jean-Yves Toullec, de la station biologique de Roscoff, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également le Docteur Fabienne Audebert, de l'Université Pierre et Marie Curie, et le Professeur Pascal Favrel, de l'Université de Caen Normandie, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie le Docteur Benoit Bernay et Julien Pontin de la plateforme PROTEOGEN (Caen) pour leur implication dans les (très) nombreuses analyses en spectrométrie de masse. Je les remercie également pour les moments passés ensemble.

Que les Docteurs Arnaud Bondon, Anne-Gaëlle Lafont et Liza Mouret de la plateforme PRISM (Rennes 1) soient ici remerciés pour les analyses structurales en RMN et dichroïsme circulaire.

Que les Docteurs Jérôme Leprince et Benjamin Lefranc (INSERM U982 "Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine") soient ici remerciés pour la synthèse des neuropeptides nécessaires à ce travail.

J'exprime ma gratitude au Docteur Jimmy Rangama du laboratoire CIMAP (Caen) pour la mise au point, avec Mr Leduc, du système d'acquisition numérique pour les tests fonctionnels.

Je remercie le Docteur Didier Goux de la plateforme de microscopie CemaBio, pour m'avoir accueilli sur son plateau technique.

Je tiens particulièrement à remercier chaleureusement Mr Jean-Luc Blaie, patron du chalutier Père Daniel, et son équipage pour l'approvisionnement en seiches, ainsi que pour m'avoir accueilli à bord afin de découvrir les joies de la pêche professionnelle.

Je souhaite également remercier Maxime Marie, patron du BipBip. Son approvisionnement en seiches aux moments critiques fut d'une aide précieuse.

Que Beatrice Adeline, technicienne en histologie soit ici remerciée pour ces connaissances partagées en histologie et son travail de qualité.

Je remercie le personnel de la Station Marine de Luc sur Mer pour sa contribution dans le stockage des animaux.

J'exprime ma gratitude à Mr Laurent Sallé pour le prêt à (plus ou moins) long terme de matériel d'électrophysiologie.

Je remercie les techniciennes du laboratoire Sandra Sritharan et Fabienne Marais pour leur présence et leur soutien au quotidien. Merci également à Christophe Roger pour la réalisation des viviers nécessaires à la capture des seiches, ainsi que pour sa présence.

Je tiens aussi à remercier Mesdames Myriam Tayou et Catherine Eudes pour leur aide lors des formalités administratives ainsi que pour nos échanges.

Je remercie bien entendu les autres membres du laboratoire BOREA qui auront fait de cette thèse un moment enrichissant et intéressant.

Je remercie également tous mes collègues doctorants, passés et présents. Un grand merci au futur Docteur Alexandre Leduc (dit, l'homme aux chaussures molles), aîné des doctorants, pour sa sagesse (quoique ...?) et ses conseils avisés. Merci à Baptiste Houyvet (alias Chouquette, alias Kiki) pour sa présence et les moments passés ensemble. Merci également aux Docteurs Valérie, Laura, Alexis, Aurore (la petite), Jérôme et ceux que j'oublie mais à qui je pense quand même. Je souhaite bon courage aux doctorants restants : Aurore (la grande), Julie, Louis (LOUIIISSS !!!), Floriane, Charles, Maëva et Lorane. J'ai passé un agréable moment en votre compagnie.

Bien entendu, ces remerciements ne pourraient être complets sans remercier ma famille sur laquelle j'ai pu compter et qui m'a toujours soutenue.

À Margaux, qui partage ma vie au quotidien, et qui a toujours cru en moi, merci à toi.

Financeurs

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 Ecosystèmes 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 le Conseil Régional de Normandie (ex Conseil Régional de Basse-Normandie) et l'ANR internationale NEMO (NEuropeptides of Marine Organisms).



Table des matières

Table des matières

Introduction générale	1
I. Contexte, problématique et objectifs	1
II. Le modèle <i>Sepia officinalis</i>	4
A. Généralités	4
B. Anatomie	6
1. Anatomie générale.....	6
2. Le système nerveux central.....	7
3. L'appareil reproducteur	7
a. Les organes génitaux femelles	9
b. Les organes génitaux mâles	11
4. L'appareil circulatoire	11
5. L'organe olfactif.....	11
C. Cycle de vie de la seiche de Manche	12
D. Reproduction	13
1. L'ovogénèse.....	13
2. L'accouplement.....	15
3. La ponte.....	15
E. Comportement	18
III. Peptides et polypeptides régulant la ponte	20
A. Introduction	20
B. Les neuropeptides	20
1. Présentation générale	20
2. Les neuropeptides chez les Mollusques	21
C. Les régulateurs ovariens	27
1. Régulation paracrine chez les Mollusques	27
2. Régulation paracrine chez la seiche	27
D. Les phéromones sexuelles	28
1. Présentation générale	28
2. Les phéromones sexuelles	29
3. Phéromones sexuelles chez les Insectes.....	30
4. Phéromones sexuelles chez les Mammifères	30

5. Phéromones sexuelles chez les Mollusques non Céphalopodes	31
6. Phéromones sexuelles chez les Céphalopodes	32
IV. Approches expérimentales.....	33
Matériels et méthodes	39
I. Matériel Biologique	39
A. Animaux	39
B. Prélèvements de matériel biologique	39
II. Approche transcriptomique	39
A. Extraction d'ARN.....	39
B. Séquençage et création d'une banque de transcrits	40
C. Analyses <i>in silico</i>	41
III. Approche peptidomique.....	42
A. Extractions	42
1. Extraction de neuropeptides.....	42
2. Extraction de phéromones à partir de la GOVI et des capsules d'œufs.....	42
3. Extraction de phéromones à partir d'eau d'incubation d'œufs	42
B. Purification.....	43
1. Chromatographie Liquide Haute performance en phase inverse (rpHPLC)	43
a. Purification de phéromones du milieu d'incubation des œufs.....	43
b. Purification de capsules internes et externes	43
c. Purification de phéromones de GOVI	43
2. Nano-LC-MALDI-TOF/TOF	44
C. Réduction, alkylation et digestion trypsique.....	45
D. Spectrométrie de masse.....	45
E. Séquençage d'Edman	45
IV. Production de la phéromone β en système recombinant.....	46
A. Transformation bactérienne.....	46
B. Contrôle de l'intégration du plasmide par PCR.....	46
C. Production en système recombinant.....	48
D. Extraction et purification de la phéromone β recombinante.....	48
E. Dosage Bradford et gel SDS-PAGE	48
1. Dosage Bradford.....	49
2. Gel SDS-PAGE	49
V. Cartographie tissulaire en immunocytochimie.....	49

A.	Préparation des échantillons	49
B.	Immunocytochimie	49
C.	Contre-coloration au Trichrome de Prenant-Gabe	51
D.	Observations microscopiques	51
VI.	Synthèse peptidique	51
VII.	Caractérisation fonctionnelle	51
A.	Analyses <i>ex vivo</i>	51
B.	Tests comportementaux	52
VIII.	Analyses structurales en RMN et CD	53
Partie I : Caractérisation structurale et fonctionnelle de deux familles de neuropeptides impliquées dans le contrôle de la ponte		57
I.	Introduction	57
II.	Crustacean Cardioactive Peptides	65
III.	Neuropeptides FLGamides	89
IV.	Conclusion	106
Partie II : Caractérisation de phéromones sexuelles et production en système recombinant		113
I.	Introduction	113
A.	Phéromones sexuelles, ponte et reproduction	113
B.	Phéromones sexuelles chez le genre <i>Aplysia</i>	114
C.	Phéromones sexuelles chez <i>Sepia officinalis</i>	118
D.	Objectifs	122
II.	Résultats et discussion	125
A.	Caractérisation structurale des précurseurs SP	125
1.	À partir de la glande de l'oviducte	125
2.	À partir des capsules d'œufs	126
3.	À partir de l'eau d'incubation des œufs	129
4.	À partir de l'eau d'incubation des œufs fractionnée en rpHPLC	129
B.	Recherche de récepteurs candidats à la liaison des phéromones sexuelles	135
C.	Production de la phéromone β et tests fonctionnels	136
III.	Conclusions et perspectives	138
Conclusion générale et perspectives		145
Références bibliographiques		151

Table des figures

Figure 1 : <i>Sepia officinalis</i> : couple de géniteurs	5
Figure 2 : Position phylogénique de la seiche chez les Mollusques.....	5
Figure 3 : Anatomie générale de la seiche.....	6
Figure 4 : Système nerveux central de seiche.	8
Figure 5 : L'appareil génital de la seiche femelle à maturité sexuelle.	10
Figure 6 : Cycle de vie de <i>Sepia officinalis</i> en Manche.	13
Figure 7 : Stroma ovarien et follicules ovariens.....	14
Figure 8 : Les trois niveaux de régulation de la ponte chez <i>Sepia officinalis</i>	16
Figure 9 : Le précurseur de l'ELH chez <i>Aplysia californica</i>	21
Figure 10 : Représentation schématique du SNC d' <i>Aplysia californica</i>	22
Figure 11 : Précurseur des Peptides A et B, et des Califines.....	23
Figure 12 : Alignement des Peptides A et B libérés par la glande atriale, et de l' α -BCP	24
Figure 13 : Précurseur de l'APGWa.	25
Figure 14 : Précurseur des FaRPs.....	25
Figure 15 : Précurseurs de la Sepiatocine et de la Pro-Sepiatocine	26
Figure 16 : Les quatre phéromones sexuelles identifiées chez l'aplysie.	32
Figure 17 : Alignement des trois précurseurs de phéromones sexuelles de seiche	33
Figure 18 : Caractérisation structurale et fonctionnelle des régulateurs.....	35
Figure 19 : Purification Nano-LC : résumé des paramètres de séparation.....	44
Figure 20 : Production de la phéromone β en système recombinant.....	47
Figure 21 : Test d'activité biologique <i>ex vivo</i>	52
Figure 22 : Tests de comportement en structure de type " open space".	53
Figure 23 : Les SoCCAPs chez <i>Sepia officinalis</i>	62
Figure 24 : FLGamide : précurseurs et neuropeptides.	63
Figure 25 : Le genre <i>Aplysia</i> (Linné, 1758) : un modèle pour la recherche de phéromones chez les mollusques.....	114
Figure 26 : L'appareil génital de l'aplysie.	115
Figure 27 : Alignement des attractines du genre <i>Aplysia</i>	116
Figure 28 : Alignement de l'enticine chez 3 espèces d'aplysie.....	116
Figure 29 : Alignement des temptines identifiées dans le genre <i>Aplysia</i>	117
Figure 30 : Séductine et Alb-1 chez <i>A.californica</i>	117
Figure 31 : Les précurseurs de phéromones sexuelles (SP) chez <i>Sepia officinalis</i>	119
Figure 32 : Activité biologique des phéromones sexuelles de seiche sur le pénis de mâle mature.....	120
Figure 33 : Activité biologique du peptide β 2 synthétique sur le tractus génital des seiches femelles en ponte.	121
Figure 34 : Localisation de l'organe olfactif chez la seiche	123
Figure 35 : Représentation schématique de l'extrémité distale du tractus génital d'une seiche femelle.	124
Figure 36 : Produits de clivage des précurseurs SP dans la GOVI.....	125
Figure 37 : Produits de clivage des précurseurs SP dans la GOVI.....	127
Figure 38 : Produits de clivage des précurseurs SP dans la capsule externe d'œufs	128
Figure 39 : Spectre MS, mode linéaire, d'extrait d'eau d'incubation de pontes fraîches concentrée sur SepPack C18.....	129

Figure 40 : Chromatogramme (214nm) de séparation, sur rpHPLC C18, d'eau de baignation de pontes fraîches.	130
Figure 41 : Deuxième étape de purification.	131
Figure 42 : Le précurseur SP γ : transcrit, séquence en acides aminés et profils d'expression.	132
Figure 43 : Deuxième étape de purification des phéromones sexuelles à partir d'eau d'incubation de pontes fraîches.	133
Figure 44 : Les phéromones α' , β et γ , issues du second mode de maturation.	133
Figure 45 : Séquence primaire des deux récepteurs putatifs aux phéromones sexuelles.	136
Figure 46 : Phéromones sexuelles chez Octopus bimaculoïdes.	139

Table des tableaux

Tableau 1 : Familles de neuropeptides candidates à l'implication dans le processus de ponte.	59
---	----

Table des annexes

Annexe 1 : Analyse RMN du SoCCAP1.	152
Annexe 2 : Cartographie tissulaire en immunocytochimie des neuropeptides PYY et FLGa.	152
Annexe 3 : Activité biologique des neuropeptides FLGa1 et FLGa3 sur l'oviducte distal de seiche mature.	152
Annexe 4 : Précurseurs SP α , α' et produits de clivages.	152
Annexe 5 : Précurseurs SP β et produits de clivages.	152
Annexe 6 : Précurseurs SP γ et produits de clivages.	152

Glossaire

5

5-HT: 5-Hydroxytryptamine

A

ACN: Acétonitrile

AP: Acidic Peptide

β

βMSP : β-microséminoprotéine

B

BCP: 1-Bromo-3-Chloro-Propane

BCPs : bag cell peptides

BET : Bromure d'éthidium

BSA : (Bovine serum albumin) Albumine sérique bovine

C

CD : Dichroïsme circulaire

CCAPs: Crustacean CardioActive Peptides

CHCA : α-cyano-4 hydroxycinnamic acid

D

Dithiothréitol (DTT)

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine
Tetrahydrochloride)

E

EBC : ELH and BCP containing Cell

ELH : Egg Laying Hormone

ESTs: Expressed Sequence Tags

F

FPKM : Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped

G

GNA : Glandes nidamentaires accessoires

GndHCl : Chlorure de Guanidinium

GNP : Glandes nidamentaires principales

GOVI : Glande de l'oviducte

H

HFBA : Acide heptafluorobutyrique

I

I3PR : Inositol triphosphate

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

M

MSSO : Masse sous-œsophagienne

MSO : Masse sus-œsophagienne

MW (Molecular Weight) : masse moléculaire

N

NGS : Next Generation Sequencing

NH₄HCO₃ : Bicarbonate d'ammonium

O

OJPs : Ovarian Jelly Peptides

P

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLC : Phospholipase C

R

RAD : Réduction/Alkylation/Digestion à la trypsine

REG : Réticulum endoplasmique granuleux

RMN : Raisonance Magnétique Nucléaire

rpHPLC : Chromatographie Liquide Haute
Performance en phase inverse

S

SA : Acide Sinapinique

SepCRP : Sepia Releasing Capsule Peptide

SepSAP : Sepia Sperm Attracting Peptide

SNC : Système nerveux central

SP : Sex pheromone

T

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TFA : Acide trifluoroacétique

Introduction générale

Introduction générale

I. Contexte, problématique et objectifs

La seiche de Manche *Sepia officinalis* est un Mollusque Céphalopode qui constitue une ressource économique importante pour la région Normandie. Avec en moyenne 4000 à 7000 tonnes débarquées par an en criée (source : *normandiefraicheurmer.fr*) par les flottes hauturières et côtières, il s'agit de la quatrième ressource halieutique de la région en terme de tonnage. Ce stock est soumis à de fortes variations annuelles en raison notamment des conditions environnementales. L'espèce étant sémelpare, chaque génération assure successivement la pérennité de l'espèce sans jamais cohabiter avec les juvéniles. Un prélèvement excessif dans le stock de géniteurs ou une année de recrutement plus faible se traduit par une chute rapide du stock qui peut toutefois être compensée tout aussi rapidement par un bon recrutement. La seiche est donc une espèce fragile qui nécessite un suivi afin de préserver une ressource halieutique majeure des côtes normandes.

Si le suivi et l'évaluation des stocks de seiches constituent une approche incontournable dans une politique visant à préserver la ressource, l'étude des mécanismes régulateurs associés à la reproduction doit être réalisée en parallèle afin d'accéder à une compréhension globale des variations de stock. Grâce aux travaux réalisés dans notre équipe, il est aujourd'hui admis que la régulation de la ponte chez la seiche fait intervenir trois types de régulateurs : les neuropeptides étroitement associés à la perception des paramètres environnementaux, les peptides régulateurs ovariens opérant une synchronisation des différents organes constitutifs de l'appareil génital, et les phéromones sexuelles impliquées dans la stimulation de l'accouplement et la phase finale de l'émission des ovocytes mais aussi suspectées de faciliter le recrutement des géniteurs sur les aires de ponte côtières.

Les neuropeptides ont été les premiers régulateurs de ponte étudiés chez cette espèce. Leur identification a été réalisée sur la base de leur activité biologique au niveau des organes de l'appareil génital femelle. Ces peptides exprimés par le système nerveux central (SNC) modulent les contractions du tractus génital et des glandes annexes, participant respectivement au transport de l'ovocyte et à la sécrétion de la capsule. Ils sont par ailleurs suspectés de jouer un rôle dans la régulation de la vitellogénèse des follicules ovariens et dans la synthèse des

produits capsulaires (Henry and Boucaud-Camou, 1993). Depuis peu, les nouvelles techniques de séquençage (NGS) ont rendu accessible l'acquisition massive de données transcriptomiques.

La réalisation de plusieurs transcriptomes de système nerveux de seiches mâles et femelles sexuellement matures est à l'origine de l'identification de l'ensemble du neuropeptidome (Zatylny-Gaudin et al, 2016). Des analyses *in silico* couplées à une approche peptidomique ont permis la sélection de familles de neuropeptides potentiellement impliquées dans la régulation de la ponte. À partir de critères basés sur le profil d'expression des transcrits et sur la localisation tissulaire des neuropeptides matures, deux familles de neuropeptides ont finalement été sélectionnées pour une exploration fonctionnelle et structurale : les Crustacean CardioActive Peptides (CCAPs) et les FLGamides.

Les CCAPs sont surexprimés dans le SNC des femelles en ponte *versus* des mâles matures. Cette surexpression est particulièrement marquée dans la masse sous-œsophagienne (MSSO). Cette région du SNC et en particulier le lobe palléoviscéral situé en position postérieure innerve les viscères et l'appareil génital, et communique avec la seule aire neurohémale décrite chez la seiche. Par ailleurs, les 3 neuropeptides prédits à partir du précurseur protéique des CCAPs sont détectés dans les terminaisons nerveuses de la glande de l'oviducte et dans les glandes nidamentaires principales (GNP).

Les FLGamides ont été décrits pour la première fois chez la seiche *Sepia officinalis* (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Tous les neuropeptides prédits à partir des deux précurseurs protéiques ont été identifiés en spectrométrie de masse. Ils sont présents dans l'ensemble de l'appareil génital et notamment dans le stroma ovarien, où ils sont les seuls neuropeptides à être détectés. Ils sont présents dans l'hémolymphe, ce qui permet de prédire un statut de neurohormones.

Un second type de régulateurs a été identifié chez *S. officinalis* : les peptides régulateurs ovariens, impliqués dans la régulation paracrine de l'appareil génital. Ils sont exprimés par les follicules ovariens et sont libérés dans la lumière de l'oviducte par les ovocytes. Ils sont impliqués dans la synchronisation du tractus génital et bloquent la libération des ovocytes pendant la période qui précède l'accouplement (Bernay et al., 2005, 2004). Enfin, ils sont à l'origine de la cyclisation des contractions de l'oviducte (Bernay et al., 2006a; Zatylny et al., 2000b, 2000c).

Les phéromones sexuelles constituent une troisième catégorie de régulateurs. Elles participeraient à la fois au recrutement des géniteurs sur les aires de ponte côtières, mais faciliteraient également l'accouplement et le déclenchement de la ponte.

Chez la seiche, trois transcrits présentant d'importantes homologies structurales ont été identifiés par Enault et *al.* (2012). Le clivage des précurseurs protéiques aboutit à la libération de peptides de masses moléculaires faibles à moyennes (1 à 8 kDa). Pour certains de ces peptides, des activités myotropes ont été démontrées sur les appareils génitaux mâles et femelles (Enault et *al.*, 2012). Par ailleurs, l'existence de phéromones de masse moléculaire plus élevée telles que celles décrites chez l'aplysie, espèce migratrice de faible amplitude se reproduisant à la côte, est fortement suspectée chez la seiche normande, espèce migratrice de moyenne amplitude se reproduisant sur des aires de ponte côtières.

Cette thèse s'inscrit donc dans la continuité des travaux initiés dans l'unité et dont l'objectif est l'étude des mécanismes régulateurs impliqués dans le contrôle de la ponte. Grâce aux nouveaux outils d'investigation que sont le séquençage haut débit (RNAseq *de novo* Illumina) permettant la construction de transcriptomes et les approches peptidomiques/protéomiques, les volets fonctionnel et structural sont explorés en parallèle.

II. Le modèle *Sepia officinalis*

A. Généralités

La seiche est un Mollusque Céphalopode gonochorique (Figure 1). Elle appartient à la sous classe des *Coleoidea* (Figure 2) qui regroupe également les calmars et les poulpes. La seiche porte dix bras (Décapodes), ce qui la différencie des poulpes qui n'en ont que huit (Octopodes). Comme tous les Céphalopodes, la seiche est un animal exclusivement marin. Elle est necto-benthique et vit dans les eaux néritiques, où elle réalise des migrations saisonnières horizontales et verticales. La seiche est sémelpare, c'est-à-dire que chaque génération ne se reproduit qu'une seule fois avant de mourir. Cependant, les femelles peuvent pondre de façon fractionnée pendant plusieurs semaines, permettant ainsi de constituer une masse de 500 à 2000 œufs avant de mourir (Bidder et al., 1989). Le gonochorisme à dimorphisme sexuel se traduit par des mâles plus élancés, plus volumineux, et aux patterns plus contrastés que ceux des femelles.

Le régime alimentaire de la seiche se compose principalement de crabes et de crevettes, mais également de poissons osseux (principalement des gobies, lançons, et labres, et parfois des poissons plats), de mollusques et de vers (némertiens et polychètes) en fonction de la composition et de la disponibilité dans l'écosystème (Guerra, 2006).

Les plus grands individus peuvent pratiquer le cannibalisme sur les plus petits, particulièrement lorsque la densité est élevée (élevage). Les juvéniles se nourrissent essentiellement de petites crevettes, de leur larves (mysis) et d'amphipodes (Bidder et al., 1989). Les seiches se nourrissent exclusivement d'animaux vivants, bien qu'en captivité elles peuvent se nourrir de surimi (Guerra, 2006), de poissons congelés ou de morceaux de maquereaux (observations personnelles).

Il est question dans cette étude de la population de Manche de la seiche commune *Sepia officinalis* (Linné 1758). On rencontre cette espèce sur l'ensemble des côtes d'Atlantiques Nord-Est. La limite méridionale de la répartition géographique se situe au niveau des côtes d'Afrique du Sud et la limite Nord au Sud de la Norvège. Cette espèce comprend plusieurs populations qui se distinguent par la durée de leur cycle de vie qui varie en fonction de la latitude géographique et par la distance parcourue lors de la migration. En Méditerranée le cycle est réduit à environ 16 mois du fait de la température moyenne annuelle qui est supérieure à celle rencontrée par les populations plus septentrionales comme la population de Manche dont le cycle est de 22 mois en Baie de Seine. La durée du cycle de vie aura donc un impact sur la

stratégie de reproduction avec des concentrations massives de reproducteurs dans les secteurs les plus septentrionaux et une période de ponte relativement réduite.

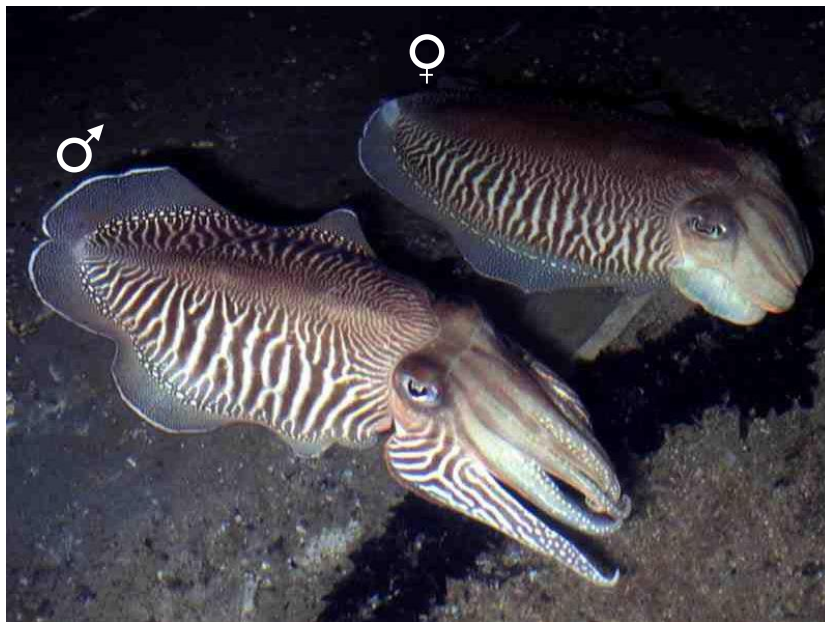


Figure 1 : *Sepia officinalis* : couple de géniteurs. Le pattern du mâle apparaît plus contrasté que celui de la femelle (www.marlin.ac.uk).

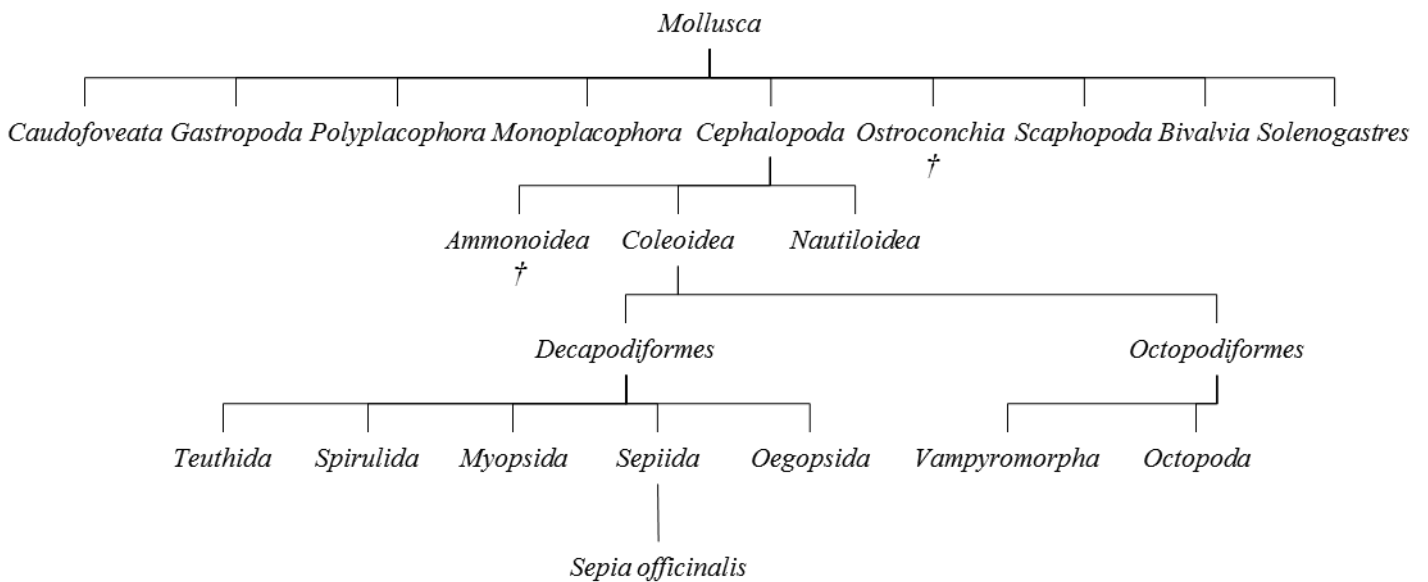


Figure 2 : Position phylogénique de la seiche chez les Mollusques. Selon marinespecies.org

B. Anatomie

1. Anatomie générale

La seiche est un coléoïde : son corps est mou et possède une coquille interne. Il est divisé en deux régions distinctes : le céphalopodium et le complexe palléoviscéral (Figure 3).

Le céphalopodium est la partie la plus antérieure de l'animal. Elle se compose d'une part de l'appareil brachial : huit bras munis de ventouses organisées en lignes transversales sur la face interne, et de deux tentacules préhensibles rétractables pourvus de ventouses uniquement aux extrémités.

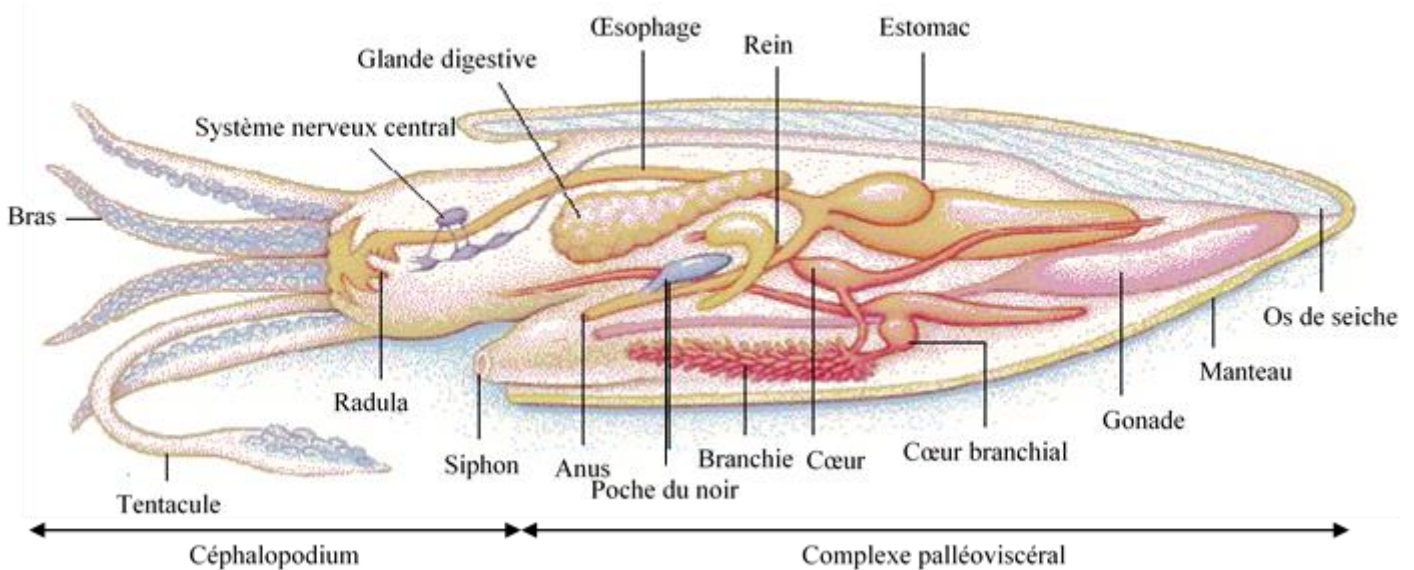


Figure 3 : Anatomie générale de la seiche. Adapté de : <https://goodridgebiopatrick.wordpress.com>.

Chez le mâle, le quatrième bras gauche est spécialisé dans le transfert des spermatophores dans la poche copulatrice de la femelle, on le désigne sous le nom de bras hectocotyle. Cette partie porte aussi la masse buccale avec des mâchoires en bec de perroquet inversé, ainsi qu'une paire d'yeux bien développés à pupilles en W et recouverts d'une membrane transparente. Un pseudo crâne cartilagineux renferme le SNC qui est traversé par l'œsophage. Enfin, l'entonnoir, ou siphon, permet d'évacuer les fluides et les matières de la cavité palléale (encre, fèces...) mais aussi l'eau de mer perfusant les branchies. L'évacuation sous pression grâce à la contraction puissante des muscles du manteau permet de propulser l'animal. Ce mode de déplacement, propre aux Céphalopodes, permet aux seiches de réaliser des migrations annuelles de moyenne amplitude.

Le complexe palléoviscéral, contient les viscères (appareils reproducteur, digestif, et circulatoire), ainsi que la poche du noir. La coquille interne (os de seiche) est une structure composée de chambres et de septums permettant à l'animal de réguler sa flottabilité.

2. Le système nerveux central

Le SNC est particulièrement bien développé chez les Céphalopodes par rapport aux autres Mollusques (Bidder et al., 1989). Il résulte de la céphalisation et de la fusion des ganglions nerveux des Mollusques (Figure 4). Ainsi, les ganglions cérébroïdes forment la masse sus-œsophagienne (MSO) qui comprend les centres moteurs supérieurs, les centres d'analyse des récepteurs sensoriels et les centres de la mémoire. La MSSO provient de la fusion des ganglions palléoviscéraux, pédieux et viscéraux. Cette masse est le siège des centres moteurs inférieurs et intermédiaires.

Les lobes optiques sont des structures réniformes situées de part et d'autre du cerveau. Ils baignent dans le corps blanc, tissu suspecté de jouer un rôle dans l'hématopoïèse. Ils sont reliés à la MSO par les pédoncules oculaires et sont issus des ganglions cérébroïdes. Sur la partie dorsale du pédoncule se trouve la glande optique.

La structure histologique des différents lobes présente la même organisation : un cortex constitué des corps cellulaires des neurones entoure le neuropile : zone fibrillaire contenant quelques des plages cellulaires. La masse centrale du système nerveux est entourée d'une capsule plus ou moins fermée coté dorsal. Cette capsule crânienne est un cartilage dont les cellules se ramifient dans une matrice hyaline qui ressemble de très près à celle des vertébrés (Person and Philpott, 1969).

Le cerveau des coléoidés est volumineux comparé à celui d'autres invertébrés ou des vertébrés inférieurs et il ne représente qu'une partie de la masse nerveuse. En effet il existe d'autres masses nerveuses dans le corps de l'animal, ainsi le terme de ganglion est réservé aux formations nerveuses relativement éloignées du cerveau.

3. L'appareil reproducteur

Les seiches sont des animaux gonochoriques à fécondation externe et chaque sexe possède une gonade unique. Chez la population de Baie de Seine, l'appareil génital commence à se former à partir du onzième mois chez le mâle et continue à se développer jusqu'au quatorzième mois. Chez la femelle la maturation débute au quatorzième mois et se termine six mois plus tard. Cet écart s'explique par la quantité de vitellus à synthétiser et à stoker dans les ovocytes (Boucaud-

Camou et al., 1989) qui demande un effort métabolique important aux femelles pendant la vitellogenèse.

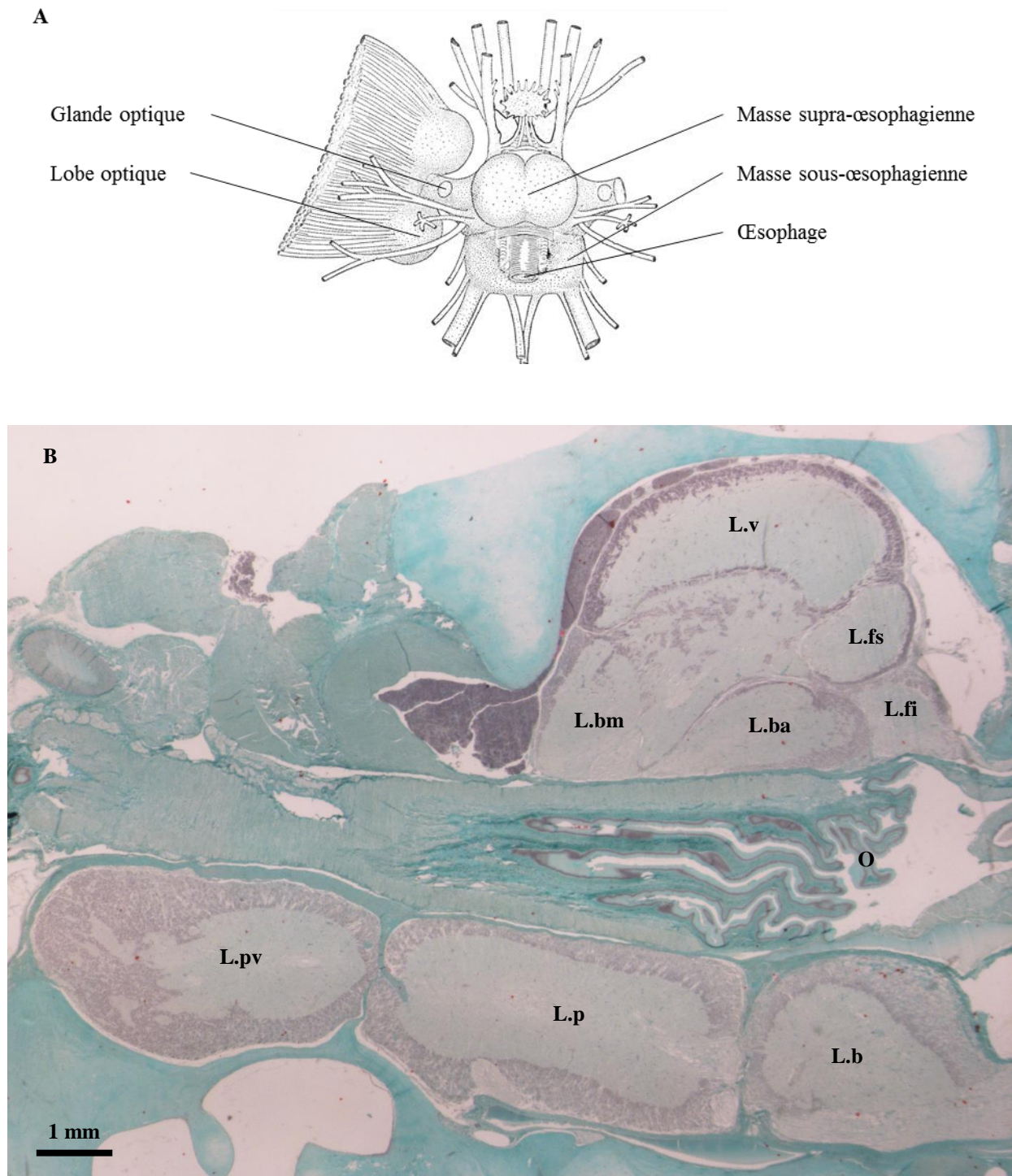


Figure 4 : Système nerveux central de seiche. (A) : Schéma anatomique en vue dorsale. Adapté du *Traité de Zoologie*, Tome V, Fascicule 4 : Céphalopodes. Edition Masson. (B) : Coupe sagittale Coloration : trichrome de Prenant-Gabe. Masse supra-œsophagienne : L.bm : Lobe basal médian ; L.v : Lobe vertical ; L.fs : Lobe frontal supérieur ; L.fi : Lobe frontal inférieur ; L.ba : Lobe basal antérieur. Masse sous-œsophagienne : L.pv : Lobe palléoviscéral ; L.p : Lobe pédieux ; L.b : Lobe brachial. O : Œsophage.

a. Les organes génitaux femelles

Chez la femelle, l'appareil génital se compose d'un ovaire unique auquel s'ajoutent les glandes annexes : la glande de l'oviducte, et les glandes nidamentaires principales et accessoires (Figure 5).

L'ovaire, est suspendu à la paroi dorsale du coelome génital, dans la partie dorsale la plus postérieure de l'animal. C'est une structure constituée de tissu conjonctif très vascularisé (le stroma), d'une zone corticale de cellules germinales, et d'un épithélium très mince continu avec le coelome génital. Le coelome génital est formé d'un sac translucide qui contient les ovocytes matures et s'ouvre sur la partie proximale de l'oviducte.

L'oviducte se trouve sur le côté gauche. Il est composé de deux parties : la partie proximale qui est la continuité du coelome génital et la seconde partie, glandulaire, qui est nommée oviducte distal, et qui se termine par le pavillon. Le transport de l'ovocyte dans l'oviducte est assuré par des contractions rythmiques péristaltiques qui permettent une progression continue.

La glande de l'oviducte (GOVI) est une structure blanche traversée par l'oviducte distal. Elle est constituée de lamelles de tissu conjonctif recouvert d'épithélium glandulaire (Figure 5A) Elle sécrète les mucopolysaccharides et les protéines capsulaires constitutifs de la capsule interne de l'œuf, ainsi que des phéromones sexuelles peptidiques et polypeptidiques (Enault et al., 2012). Le pavillon, situé à l'extrémité distale de l'oviducte distal, est une structure en forme de « cuillère pointue » qui pourrait être impliquée dans la présentation de l'ovocyte à proximité de l'orifice du canal sécréteur des glandes nidamentaires principales. Des observations réalisées au laboratoire lors des tests myotropes montrent que la lésion du pavillon induit une perte de sensibilité de l'oviducte distal aux stimulations myotropes, ce qui pourrait signifier la présence de récepteurs impliqués dans la régulation du processus de ponte.

Les seiches possèdent deux paires de glandes nidamentaires situées en position ventrale médiane. Les glandes nidamentaires principales (GNP) sont de taille importante chez les femelles matures si on les compare à la GOVI. D'un blanc laiteux en prévitellogénèse, elles prennent une teinte blanc nacré à maturité et sont nervurées de noir en post ponte. Leur organisation histologique est semblable à celle de la glande de l'oviducte (Figure 5B). Elles sécrètent également des mucopolysaccharides et des glycoprotéines qui entrent dans la composition de la capsule externe de l'œuf (Cornet et al., 2015b). Les glandes nidamentaires accessoires (GNA) sont de couleur orange vif à maturité et forment une structure trilobée. Ces glandes sont rattachées à la partie distale des GNP. Leur organisation tissulaire montre un ensemble de tubules glandulaires (Figure 5C). Bien que peu de données soient disponibles sur

les GNA chez la seiche, plusieurs messagers impliqués dans la voie Toll/NF- κ B, responsables de la reconnaissance entre les symbiotes et les pathogènes, ont été identifiés (Cornet et al., 2015a).

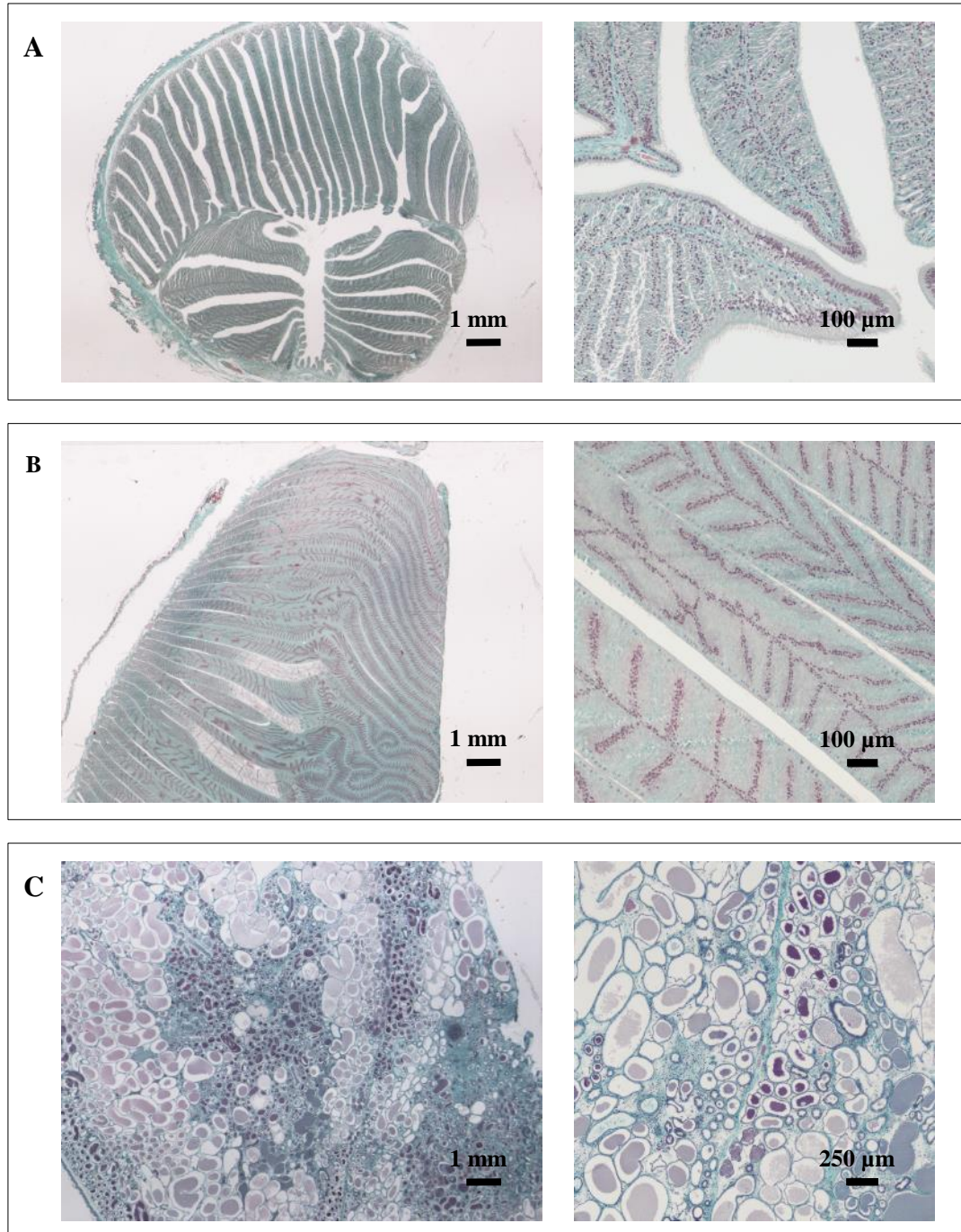


Figure 5 : L'appareil génital de la seiche femelle à maturité sexuelle. Coupes transversales de glandes annexes contre-colorées au Trichrome de Prenant Gabe. (A) : Glande de l'oviducte (sans l'oviducte). (B) Glande nidamentaire principale. (C) : Glande nidamentaire accessoire. Les noyaux sont colorés en bleu, le cytoplasme en rose et le tissu conjonctif en vert.

Chez le calmar, chaque tubule est constitué d'un épithélium cilié dense délimitant une large lumière contenant des bactéries symbiotiques (Bloodgood, 1977). Selon Biggs et Epel (1991), les GNA seraient impliquées dans la formation de la couche bactérienne présente au niveau de la capsule de l'œuf, protégeant l'embryon des infections (Biggs and Epel, 1991). Bien que fortement suspectées d'être impliquées dans la sécrétion de produits capsulaires (Fields, 1965), cette hypothèse reste encore à démontrer expérimentalement.

b. Les organes génitaux mâles

L'appareil génital mâle est constitué du testicule, du canal déférent et des glandes annexes. Le testicule se trouve dans la partie dorso-postérieure de l'animal dans l'axe médian. Il est relié par le canal déférent aux glandes annexes, situées sur le côté gauche. Ces glandes annexes, les glandes accessoires et les vésicules séminales, sont impliquées dans la formation des spermatophores qui sont stockés dans la glande de Needham en attendant l'accouplement. Les contractions du pénis libèrent les spermatophores dans la cavité palléale, ceux-ci sont ensuite saisis par le bras hectocotyle du mâle et transférés à la femelle dans la poche copulatrice.

4. L'appareil circulatoire

Chez la seiche, comme chez tous les Céphalopodes, l'appareil circulatoire est clos et les artères sont reliées aux veines par un réseau de capillaires sur le modèle de ce que l'on observe chez les vertébrés. L'appareil se compose d'un cœur situé en position centrale, et de deux cœurs branchiaux situés à la base des branchies. Chez la seiche, une seule aire neurohémale a été décrite (Alexandrowicz, 1965, 1964, 1960; Tompset, 1939). Cette aire est connectée au lobe palléoviscéral de la masse sous œsophagienne.

5. L'organe olfactif

Chez les coléoïdés, les fossettes, les papilles ou l'organe olfactif, selon la dénomination adoptée, sont situés de chaque côté du céphalopodium, en arrière des yeux (Bidder et al., 1989). Peu d'informations sont disponibles chez la seiche concernant ces structures sous cutanées, cependant chez le calmar, l'épithélium serait semblable à celui du rhinophore du nautilé (Emery, 1975). L'organe olfactif est considéré comme sensible aux stimuli chimiques et contrôlerait la qualité de l'eau entrant dans la cavité palléale. Selon une hypothèse de Woodhams et Messenger l'organe olfactif serait le siège de la détection des phéromones sexuelles (Woodhams and Messenger, 1974).

C. Cycle de vie de la seiche de Manche

Le cycle de vie de la seiche de Manche est ponctué de migrations saisonnières horizontales induites par la chute des températures côtières en période hivernale (Figure 6). Ce cycle a été parfaitement décrit par Boucaud-Camou et Boismery (Boucaud-Camou and Boismery, 1989). Les œufs sont pondus au printemps au niveau des côtes de la Baie de Seine et de l'ouest Cotentin. L'éclosion a lieu au milieu de l'été après trois mois de développement embryonnaire dans les aires de ponte côtières. Les paralarves (morphologiquement identiques à l'adulte) fraîchement écloses bénéficient ainsi d'une nourriture abondante et de températures favorables au développement post-embryonnaire.

Les jeunes seiches âgées d'environ 4 mois, migrent une première fois à la mi-novembre vers la Manche Ouest. Leur destination est la zone d'hivernage située au Sud du Cap Lizard, sur des fonds de 60 à 70 mètres de profondeur. Les animaux, juvéniles et pré-adultes, y bénéficient de températures plus favorables que celles observées sur les côtes à la même période avec une température moyenne voisine de 9°C. L'hivernage se poursuit jusqu'à la fin du mois de février avec un retour sur les côtes Normandes pour une estivation de mars à octobre avant de repartir en Manche ouest à la mi-novembre.

À la fin de la seconde estivation, soit environ 14 mois après l'éclosion, la majorité des seiches mâles sont sexuellement matures, tandis que les femelles commencent leur gamétogénèse.

Ce n'est qu'après la quatrième et dernière migration, qui se traduit par un retour sur les aires de ponte côtières, que les femelles sont prêtes à pondre. Les mécanismes impliqués dans les migrations sont encore méconnus bien que le rôle de phéromones sexuelles peptidiques et polypeptidiques libérées par les femelles soit fortement suspecté. Une régulation similaire a été décrite chez un autre mollusque marin, l'aplysie, chez laquelle un bouquet de phéromones polypeptidiques et protéiques a été identifié et caractérisé sur un plan structural et fonctionnel (Cummins et al., 2005; Cummins et al., 2004; Painter et al., 1998).

Au printemps de la deuxième année du cycle, les seiches s'accouplent, les femelles pondent et les géniteurs meurent massivement. Le phénomène est observable par des échouages importants d'os de seiche sur les plages de Baie de Seine et de l'Ouest Cotentin.



Figure 6 : Cycle de vie de *Sepia officinalis* en Manche. Les juvéniles migrent des frayères côtières vers la zone d'hivernage située en Manche Ouest à partir de la fin du mois d'octobre et reviennent à la côte à partir du mois de mars. À l'issue de la seconde migration côtière, tous les animaux sont sexuellement matures. Après l'accouplement et la ponte, les géniteurs meurent.

D. Reproduction

1. L'ovogénèse

L'ovogénèse de la seiche a été décrite par les travaux de Dhainaut et Richard (Dhainaut et Richard, 1976). Selon ces auteurs, six stades de développement sont nécessaires à la maturation de l'ovocyte. Boucaud et *al.* (1988) ont par la suite subdivisés les stades III et IV en fonction du diamètre des follicules ovariens et du développement des cellules folliculaires. Les ovocytes sont formés dans la région corticale de l'ovaire appelée stroma (Figure 7). Les stades I et II correspondent respectivement aux phases de mitoses goniales, et prophase de méiose.

La prévitellogénèse a lieu au début de l'automne de la seconde année. Elle est marquée par la multiplication des cellules folliculaires qui se disposent à la périphérie de l'ovocyte sous la forme de deux enveloppes (stade IIIa). Elles pénètrent ensuite en profondeur dans l'ooplasme

sous forme de cordons (stade IIIb à c). On parle alors d'ovocyte réticulé à cause de l'aspect macroscopique de l'ovocyte.

La prévitellogénèse est suivie par une période de synthèse et de sécrétion du vitellus par les cellules folliculaires : la vitellogénèse. Cette étape commence généralement à la fin de l'automne et se caractérise par la croissance importante de l'ovocyte et des complexes de cellules folliculaires (stades IV a, b, et c).

La croissance folliculaire observée est principalement liée à la production massive de vitellus, laquelle est régulée par des facteurs issus du système nerveux central (Henry and Boucaud-Camou, 1993).

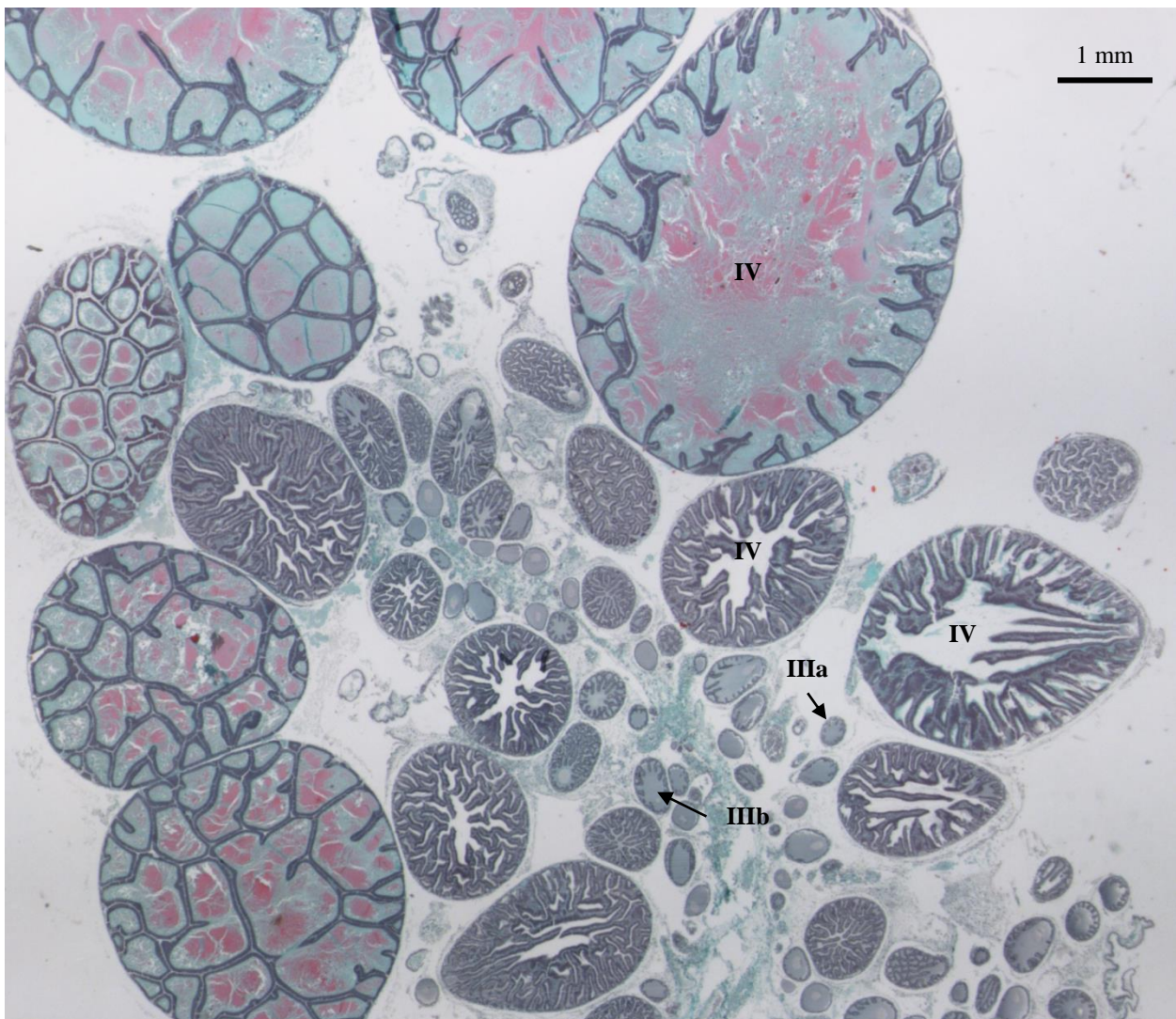


Figure 7 : Stroma ovarien et follicules ovariens. Coupe transversale de stroma ovarien mature colorée au Trichrome de Prenant-Gabe. La seiche est une espèce réalisant une gamétogénèse asynchrone, plusieurs stades folliculaires sont donc simultanément présents dans l'ovaire à maturité. Le tissu conjonctif est coloré en vert. Les chiffres romains correspondent aux différents stades des ovocytes.

Finalement, un chorion est formé par les cellules folliculaires (stade V). Le syncytium folliculaire dégénère et disparaît. L'ovocyte mature est alors lisse et riche en vitellus, et est émis dans le cœlome génital (stade VI). Cette dernière étape est appelée ponte ovulaire. Le mécanisme de libération de l'ovocyte est peu connu, mais il semblerait que les contractions du stroma seraient à l'origine de la libération de l'ovocyte. Le ou les facteurs impliqués restent inconnus. Seule la SepOvotropine, un peptide régulateur ovarien issu du clivage d'une protéine vitelline et caractérisé par Zatylny et al. (2000), induit l'augmentation du tonus mais à une concentration élevée (10^{-5} M).

La gamétogénèse étant asynchrone, l'ovaire contient des follicules ovariens à tous les stades, dès lors que la femelle atteint la maturité sexuelle. C'est la présence d'ovocytes lisses matures dans le cœlome génital qui détermine la maturité sexuelle des femelles.

2. L'accouplement

L'accouplement a été décrit par Hanlon et al. (1999). Il est divisé en quatre étapes distinctes. L'étape d'initiation est la saisie de la femelle par le mâle, les deux partenaires sont face à face et les couronnes de tentacules sont juxtaposées. Le mâle propulse alors un puissant jet d'eau dans la poche copulatrice de la femelle afin d'éliminer les spermatophores provenant d'un éventuel accouplement précédent. Le mâle dépose ensuite ses spermatophores dans la poche copulatrice de la femelle, c'est l'étape de transfert. Pour finir, les spermatophores sont libérés par un courant d'eau de mer modéré propulsé par le mâle, et sont implantés dans les réceptacles séminaux de la poche copulatrice. La ponte commence quelques minutes à quelques jours après l'accouplement.

3. La ponte

Chez la seiche, la ponte est associée à un comportement stéréotypé bien décrit, mais certains processus restent encore inconnus à ce jour. Il est clairement établi que ce mécanisme est piloté par trois catégories de régulateurs : les peptides régulateurs ovariens, les neuropeptides, et les phéromones sexuelles (Figure 8).

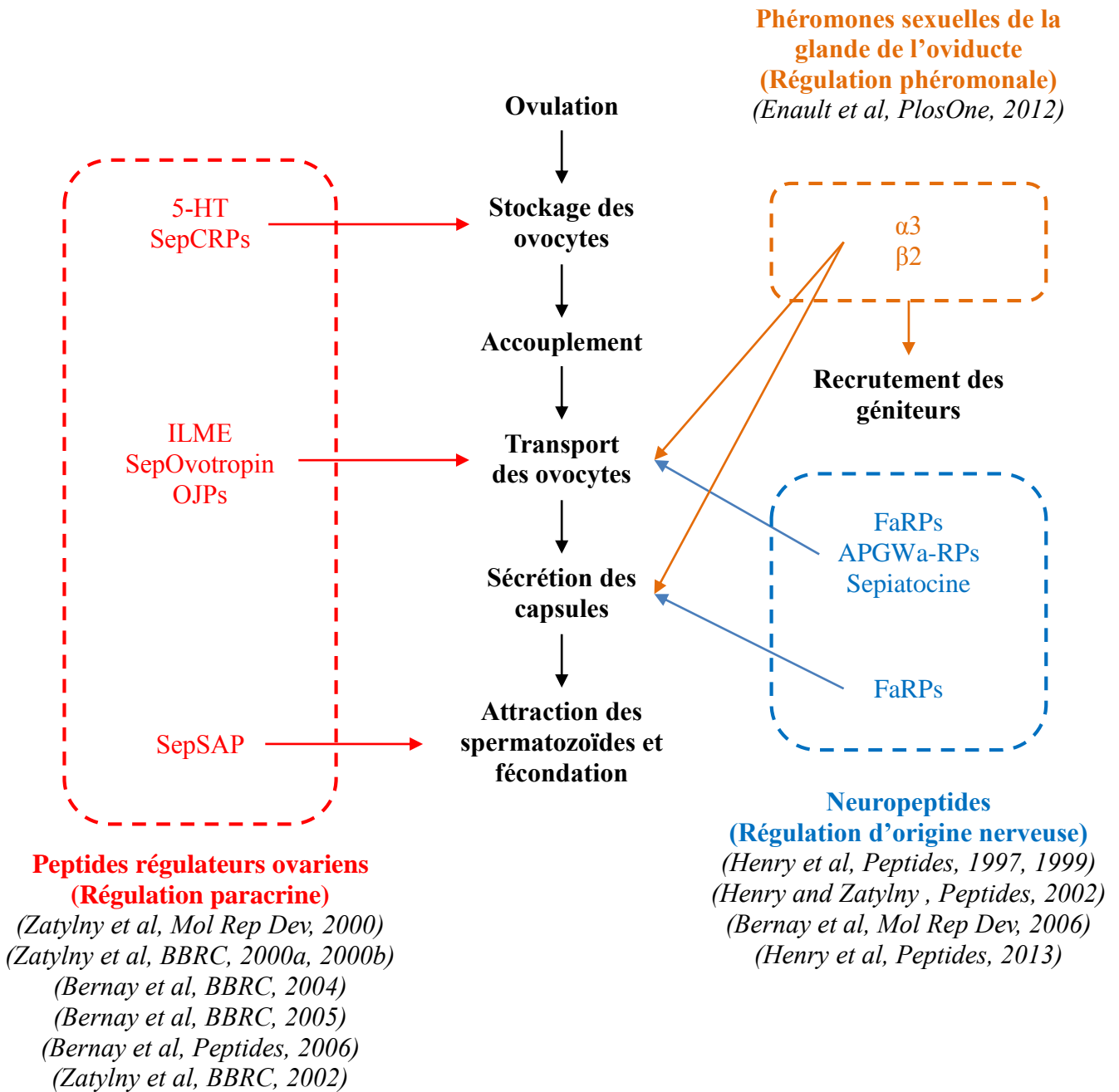


Figure 8 : Représentation schématique des trois niveaux de régulation de la ponte chez *Sepia officinalis*.

Les ovocytes sont élaborés dans l'ovaire puis sont expulsés (ponte ovulaire) et stockés à maturité dans le coelome génital. Leur transport est bloqué par l'action de la 5-HT (Zatylny et al., 2000a) et des SepCRPs (Bernay et al., 2005, 2004). Ces facteurs inhibent les contractions de l'oviducte et sont suspectés de bloquer la libération des ovocytes chez les femelles non accouplées. La poursuite du transit des ovocytes dans l'oviducte est induite par une combinaison de facteurs qui agissent à des niveaux divers : l'accouplement qui est indispensable pour initier un comportement de ponte stéréotypé décrit précédemment, des neuropeptides parmi lesquels la sepiatocine (Henry et al., 2013), les FaRPs (Henry et al., 1999) et l'APGWamide (Henry et al., 1997) qui agissent au niveau de l'oviducte et des glandes annexes de l'appareil génital, des peptides régulateurs ovariens (ILME, SepOvotropine et OJPs) (Bernay et al., 2006a; Zatylny et al., 2000b, 2000c) qui entretiennent et synchronisent les différentes structures de l'appareil génital et des phéromones sexuelles qui agissent sur la libération des ovocytes dans la cavité palléale et qui stimulent la sécrétion capsulaire ainsi que l'accouplement (Enault et al., 2012). L'ovocyte rejoint ensuite la GOVI qui sécrète une première enveloppe gélatineuse : la capsule interne dont les protéines constitutives sont associées aux phéromones sexuelles. L'ovocyte partiellement encapsulé est libéré dans la cavité palléale, à proximité de l'orifice du canal sécréteur des GNP. Ces glandes sécrètent des protéines comme les Egg Capsule Protéines ou ECPs (Cornet et al., 2015b), qui, mêlées à l'encre de la poche du noir, forment la capsule externe de l'œuf. D'après Enault et al (2012), il semble que certaines phéromones sexuelles jouent un rôle dans la sécrétion de la capsule externe en stimulant les GNP.

L'ovocyte quitte la cavité palléale par l'entonnoir pour être fécondé par les spermatozoïdes présents dans la poche copulatrice. Ce mécanisme est encore mal connu mais il est établi que des peptides sperme-attractants tels que le SepSAP (Zatylny et al., 2002) sont libérés par l'ovocyte pour faciliter la fécondation.

Un peptide à action similaire, l'OctoSAP a également été caractérisé chez *Octopus vulgaris* (De Lisa et al., 2013). L'œuf est finalement fixé sur un support de ponte choisi par la femelle pour former finalement une masse de plusieurs centaines d'œufs, la fécondité étant dépendante de paramètres tels que la taille de la femelle et la durée de ponte. Les observations en bassin et l'examen des œufs montrent que la femelle façonne deux languettes collantes à partir de l'enveloppe encore souple de l'œuf, languettes qu'elle utilise pour fixer ce dernier à un support.

E. Comportement

Les Céphalopodes sont connus pour être les représentants les plus évolués parmi les Mollusques, à la sociabilité complexe et stéréotypée. Ainsi, le poulpe *Octopus tetricus* est capable de vivre en solitaire ou en communauté de 10 à 15 individus, en aménageant un lieu de vie commun, en chassant les congénères indésirables. Les sites sont caractérisés par des excavations formant des fosses, et des couches de coquilles de pétoncle (*Mimachlamys asperima*) recouvrant la surface de ces zones (Scheel et al., 2017).

Les seiches sont migratrices, elles n'aménagent donc pas leur habitat mais se regroupent en période de reproduction dans des endroits bien précis sur les côtes, c'est d'ailleurs le seul moment où elles manifestent des signes sociaux (Hanlon and Messenger, 1996). Leurs comportements sociaux dans ces zones sont stéréotypés. Ils s'illustrent par des postures et des mouvements de bras, ainsi que par la modification des patterns (Hanlon and Messenger, 1988). Chez les seiches, il y a des individus dominants (généralement les plus gros) et des dominés (Adamo and Hanlon, 1996; Boal, 1996).

Aucun comportement de cour n'a été observé chez les seiches en captivité. Lorsqu'un mâle convoite une femelle, il nage vers elle, couronne de tentacules ouverte, et s'y agrippe pour s'accoupler immédiatement (Hanlon et al., 1999). Il peut en revanche y avoir une forme d'intimidation via les patterns de face (anneau sombre autour de l'œil et pupille dilatée) (Adamo and Hanlon, 1996) et des combats entre les mâles pour le droit à s'accoupler (Allen et al., 2017). De plus, il semble que les femelles aient des préférences pour certains mâles, qui ne sont pas forcément les dominants mais plutôt pour leurs aptitudes à s'accoupler. Ainsi, elles préféreront les mâles qui se sont accouplés récemment (Boal, 1997).

La "compétition du sperme" est aussi un aspect important dans le comportement de reproduction (Hanlon et al., 1999). Le mâle cherche en effet à favoriser sa semence. Avant l'accouplement, le mâle nettoie la poche copulatrice de la femelle afin d'éliminer les spermatophores rivaux éventuellement présents. Après l'accouplement, le mâle garde et protège la femelle en ponte des concurrents sexuels pour éviter tout accouplement. Il arbore un pattern zébré fortement contrasté appelé "Intense Zebra Display" (Adamo and Hanlon, 1996; Tinbergen, 1939), se place parallèlement à la femelle et déploie son quatrième bras en direction du rival (Hanlon and Messenger, 1996).

Chez certaines espèces de calmars, un comportement similaire est observé. Les mâles les plus gros et les plus agressifs s'accouplent et gardent les femelles (Cummins et al., 2011). Cependant certains individus appelés "sneaker", ou "sournois", réussissent à s'accoupler avec une femelle surveillée, en jouant de vitesse (Hanlon and Messenger, 1996).

La modification de la couleur du corps, ou homochromie est une caractéristique des Céphalopodes. Ainsi cette capacité à se fondre dans le décor en fait de véritables experts en camouflage. Par exemple, la seiche est capable de s'ensabler partiellement dans le substrat, du sable généralement, et d'adopter une couleur mimétique pour chasser à l'affût ou tout simplement pour se reposer à l'abri des prédateurs.

La prédation est aussi à l'origine de comportements stéréotypés. Les stratégies de capture varient en fonction du type de proie et surtout du rapport de taille entre la seiche et la proie (Duval et al., 1984). Ainsi une capture par coiffage avec les bras est plus adaptée à la capture d'une proie de grande taille, tandis qu'une capture avec les tentacules préhensiles sera utilisée pour une proie de petite taille, crevettes ou petits poissons par exemple.

III. Peptides et polypeptides régulant la ponte

A. Introduction

Comme précisé précédemment, chez la seiche, la ponte est sous le contrôle d'au moins trois types de régulateurs peptidiques : des neuropeptides associés à la perception des paramètres environnementaux, des peptides régulateurs ovariens assurant la régulation paracrine du tractus génital, et des phéromones sexuelles impliquées d'une part dans la régulation de la ponte et probablement dans la concentration des géniteurs sur les aires de ponte côtières.

B. Les neuropeptides

1. Présentation générale

Les neuropeptides sont de courtes chaînes d'acides aminés produites par le tissu nerveux et qui participent à la régulation de nombreux processus physiologiques tels que la reproduction, la digestion, la nutrition, la circulation, l'excrétion et les processus comportementaux (Nässel and Larhammar, 2013). Ils sont issus de la maturation d'un précurseur protéique, le prepropeptide, qui peut porter plusieurs neuropeptides différents, présents sous la forme de plusieurs copies ou en un seul exemplaire.

Le prepropeptide d'un neuropeptide possède une séquence signal à l'extrémité N-terminale. Cette séquence signal (ou peptide signal) qui permet l'adressage du complexe ARNm/ribosomes vers les membranes des citernes du réticulum endoplasmique granuleux (REG) est clivée par une peptidase membranaire dès son entrée dans la lumière du REG.

Les séquences des neuropeptides sont généralement encadrées par des sites de clivage mono, di ou tribasiques sauf si la séquence est accolée au peptide signal tel que l'on peut l'observer pour les ocytocines/vasopressines, le GnRH, les neuropeptides Y, etc. ou si au contraire elle est positionnée en C-terminal comme les Bursicons, les CCAPs, les NKY ou l'urotensine II.

Les neuropeptides sont libérés par des endopeptidases, les prohormones convertases, présentes dans la lumière de l'appareil de Golgi. De nombreux neuropeptides subissent des modifications post-traductionnelles pour acquérir une structure biologiquement active, que ce soient la formation de ponts disulfures, la mise en place d'une amidation C-terminale, ou la cyclisation d'une glutamine N-terminale en acide pyroglutamique (De Haes et al., 2015).

Les neuropeptides sont exprimés et sécrétés afin de répondre à un stimulus qui peut être une modification environnementale ou une stimulation mécanique, par exemple. Ils se lient à un récepteur membranaire couplé à une protéine G, déclenchant ainsi une cascade de réactions intracellulaires aboutissant à la modulation de l'activité des cellules cible.

2. Les neuropeptides chez les Mollusques

La régulation neuroendocrine de la ponte a bien été décrite chez les Mollusques Gastéropodes hermaphrodites, notamment chez la lymnée *Lymnea stagnalis* et chez l'aplysie *Aplysia californica*, respectivement pulmoné et opisthobranch. Ces Gastéropodes montrent par ailleurs des comportements stéréotypés et bien décrits lors de l'accouplement et de la ponte (Morishita et al., 2010) tels que l'inhibition de la locomotion et des ondulations de la tête (Arch and Smock, 1977; Ferguson et al., 1989).

Chez l'aplysie, le contrôle de la ponte est régulé par une neurohormone : l'ELH (Egg Laying Hormone) (Chiu et al., 1979). L'ELH est un neuropeptide amidé possédant 36 résidus (Figure 9). Elle déclenche la ponte si elle est injectée à des animaux matures (Bernheim and Mayeri, 1995), *in vitro* elle déclenche, de façon dose-dépendante, l'émission d'œufs par l'ovotestis isolé à partir de 8.10^{-10} M (Barry S. Rothman et al., 1983). Enfin, elle excite le neurone R15 situé dans le ganglion abdominal (Branton et al., 1978), il en résulte la libération du peptide R15 α 1, qui module le transport de l'ovocyte par le biais du péristaltisme du grand canal hermaphrodite (Alevizos et al., 1991).

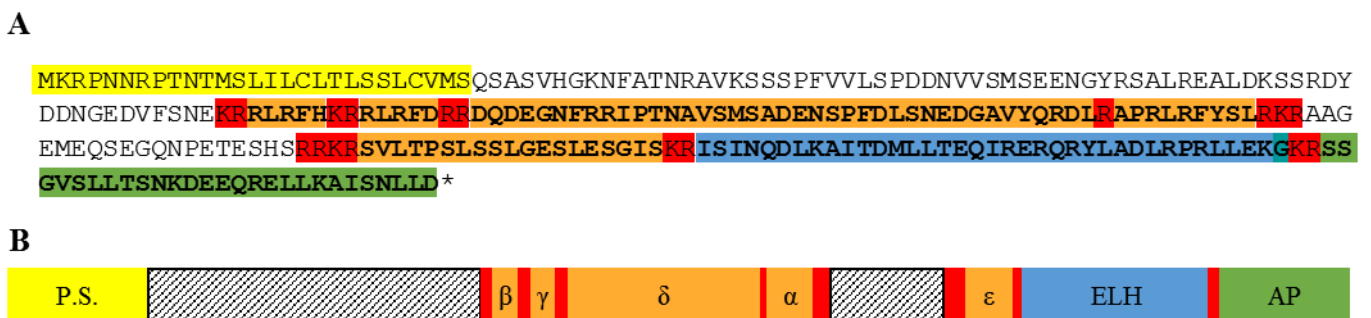


Figure 9 : Le précurseur de l'ELH chez *Aplysia californica*. (A) : Séquence en acides aminés du précurseur. Surligné en jaune : peptide signal, surlignés en rouge : les sites de clivage mono-, di-, tri-, et tetrabasiques, surligné en orange : les BCPs, surlignés en bleu : l'ELH, en bleu-vert : l'amidation C-terminale de l'ELH, en vert : l'AP. (B) : Organisation du précurseur de l'ELH.

D'autres peptides sont également présents sur le précurseur de l'ELH (Figure 9) : les Bag Cell Peptides (BCPs) et l'Acidic Peptide (AP) (B S Rothman et al., 1983; Scheller et al., 1983).

Les BCPs sont au nombre de 5 : α -, β -, γ -, δ -, et ϵ -BCP (B S Rothman et al., 1983; Scheller et al., 1983). Les BCPs agissent sur le tractus génital et sur le système nerveux, ils permettent ainsi de moduler la ponte ainsi que le comportement associé de l'animal tel que la cessation de la locomotion, l'inhibition de l'alimentation et des ondulations de la tête. Les α - et β -BCP, ainsi que le γ -BCP sont impliqués dans l'auto-stimulation des bag cells, qui prolongent la décharge

de ces dernières en conduisant à une libération massive d'ELH et de BCPs (Brown and Mayeri, 1989; Kauer et al., 1987). Le δ -BCP stimule le flux de Ca^{2+} dans les mitochondries des cellules sécrétrices de la glande de l'albumine, induisant la stimulation et/ou la synthèse de liquide péritellin par la glande (Nagle et al., 1990). Aucune fonction biologique n'est attribuée à l' ε -BCP ni à l'AP. Ce dernier est situé à l'extrémité C-terminale du précurseur de l'ELH (Figure 9), son nom vient de la richesse en acides aminés acides. (Mayeri et al., 1985; Scheller et al., 1983).

L'ELH est libérée en réponse à des stimuli externes (température et probablement des phéromones sexuelles) perçus par les neurones périphériques et à des stimuli internes (état de maturité de l'animal) (Blankenship and Haskins, 1979; Haskins and Blankenship, 1979; Morishita et al., 2010). Le gène codant pour l'ELH est exprimé dans le SNC par les bag cells (Kupfermann and Kandel, 1970). Les bag cells sont une paire de clusters neuronaux localisés sur les connectifs pleuro-abdominaux de l'animal, à proximité du ganglion abdominal (Figure 10). Hors période de ponte, les bag cells sont électriquement silencieuses. Chez l'aplysie, la décharge de ces bag cells déclenche la ponte. (Kupfermann, 1967; Kupfermann and Kandel, 1970; Strumwasser et al., 1969). L'expression du gène de l'ELH par les bag cells conduit à la libération de l'hormone (Chiu et al., 1979), des BCPs et de l'AP (Scheller et al., 1983). Les BCPs vont prolonger la décharge par l'autoexcitation des bag cells (Brown and Mayeri, 1989; Kauer et al., 1987).

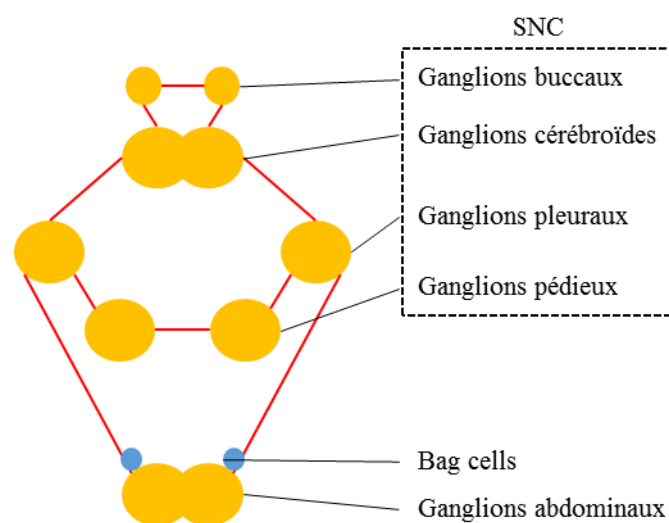


Figure 10 : Représentation schématique du SNC d'*Aplysia californica*.

L'excitabilité des bag cells est elle-même régulée par le SNC. Le ganglion pleural droit et le ganglion cérébroïde de l'aplysie contiennent des neurones exprimant le gène de l'ELH : les ELH and BCP containing Cells (EBC) (Chiu and Strumwasser, 1981)(Chiu and Strumwasser, 1984; Painter et al., 1989; Pulst et al., 1988). L'excitation de ces neurones par l'ELH ou les BCPs induit la décharge des bag cells, et par conséquent la libération d'ELH et des BCPs par ces dernières (Brown and Mayeri, 1989). Les bag cells sont entourées de terminaisons nerveuses contenant de la sérotonine (McPherson and Blankenship, 1991) et du FMRFa (Fisher et al., 1993). Ces messagers issus du SNC permettent de stopper la décharge des bag cells et donc de mettre fin au processus de ponte. Il s'agit là d'un rétrocontrôle négatif du SNC sur les bag cells.

La glande atriale exprime également des messagers qui interviennent sur le système nerveux, les peptides A et B et les califines. Les peptides A et B sont des peptides amidés de 34 résidus exprimés par la glande atriale (Figure 11) (Heller et al., 1980). Ces peptides ont une extrémité C-terminale très similaire à celle de l' α -BCP (Figure 12) et déclenchent l'excitabilité des EBC (Sherry D Painter et al., 1988). Les Califines sont exprimées et secrétées en grande quantité au niveau de la glande atriale (Nagle et al., 1986; Rothman et al., 1986).

Au nombre de trois, notées A, B, et C, elles sont formées d'une sous unité commune de 18 acides aminés, reliée par un pont disulfure à une grande sous unité de 36 acides aminés. Cette grande sous unité est fortement homologue à l'ELH (78 à 83%), c'est d'ailleurs cette sous unité

A

MKANTMFIIILCLSLSTLCVSSQSTSVHGKIFVFNRAVKLSSDGNYPFDLSKEDGAQPYFMTPLRLRFYPIGKRAAGMEQSEG
QNPETKSHSWRKR SVLT PSLSSLGESLES GISKRI SINQDLKAITDMLL TEQIQARRRCLDALRQRLD LGKRDSDVSLFNG
DLLPNGRCS*

B

MKANTMFIIILCLTLSTLCVSSQFTSVLGKIFVTNRVAVKSSSYEKYPFDLSKEDGAQPYFMTPLRLRFYPIGKRAAGMEQSEG
QNPETKSHSWRKR SVLT PSLSSLGESLES GISKRI SINQDLKAITDMLL TEQIQARQRCLAALRQRLD LGKRDSDVSLFNG
DLLPNGRCS*

C



Figure 11 : Précurseur des Peptides A et B, et des Califines. Séquences en acides aminés du (A) : précurseur du peptide A et de la Califine A, et (B) : du peptide B et de la Califine B. (C) : Organisation générale des précurseurs des peptides A et B. Surligné en jaune : peptide signal, surlignés en rouge : les sites de clivage mono et dibasiques, surlignées en bleu-vert : les glycines C-terminales correspondant aux amidations, surlignés en orange : les peptides A et B, surlignées en bleu foncé : les grandes sous-unités des Califines, surlignées en bleu clair : les petites sous-unités des Califines. Peptides en gras et cystéines soulignées.

qui est responsable de l'activité biologique des Califines. Les Califines sont codées par les précurseurs des peptides A et B (Figure 11). Il n'y a pas de précurseur identifié pour la Califine C, bien que son existence ait été démontrée (Rothman et al., 1986). Injectées à des animaux sexuellement matures, les Califines déclenchent un comportement de ponte. *Ex vivo*, les Califines A et C à 670 nM provoquent une excitation prolongée ciblée des neurones dans la région du quadrant gauche (LUQ : Left Quadrant Upper) du ganglion abdominal. Bien que la Califine B n'ait pas été testée, une activité semblable aux autres Califines est suspectée du fait de la forte homologie de séquence.

```

alpha_BCP      -----APRLRFYSL-
Peptide_A      AVKLSSDGNYPFDLSKEDGAQPYFMTPLRFRFYPIG
Peptide_B      AVKSSSYEKYPFDLSKEDGAQPYFMTPLRFRFYPIG
                                     :***** :

```

Figure 12 : Alignement des Peptides A et B libérés par la glande atriale, et de l' α -BCP issu du système nerveux.

Chez l'huitre creuse *Crasostrea gigas*, une EST (CU997912) codant pour l'ELH est décrite pour la première fois par Veenstra (Veenstra, 2010). Deux ELH de 36 acides aminés, CgELH1 et CgELH2 sont présentes sur le précurseur de 166 acides aminés. Les extrémités N- et C-terminales sont les domaines les plus conservés entre les différentes espèces de mollusques, laissant supposer un rôle important dans les interactions avec le récepteur (Stewart et al., 2014). Cette hypothèse est renforcée par une étude réalisée chez l'aplysie qui montre que la modification ou la suppression des extrémités d'une ELH synthétique provoque la diminution de l'activité biologique (Strumwasser et al., 1987).

Chez la seiche, seules trois familles de neuropeptides sont décrites pour leur implication dans la régulation de la ponte : les APGWamide-RPs, les FMRFamide related peptides (FaRPs), la Sepiatocine, et la pro-Sepiatocine (Henry et al., 2013, 1999, 1997; Zatylny-Gaudin et al., 2010). Le térapeptide APGWa est un neuropeptide identifié pour la première fois chez le Gastéropode *Fusinus ferrugineus* pour son rôle dans le blocage de la libération de la sérotonine, inhibant ainsi la contraction du muscle rétracteur du pénis et induisant par conséquent l'érection (Kuroki et al., 1990). Chez la seiche, la forme clivée GWamide de ce neuropeptide est identifiée et caractérisée pour la première fois au niveau des lobes optiques (Henry et al., 1997). Ce dipeptide inhibe les contractions de l'oviducte, bloquant le transit de l'ovocyte dans le tractus génital si l'animal ne s'est pas accouplé. Chez la seiche, le précurseur protéique de l'APGWa contient

nidamentaire principale montre clairement le rôle des FaRPs dans la synchronisation de l'ovulation et de la sécrétion des produits capsulaires.

Le FMRFa est par ailleurs impliqué dans le contrôle de l'homochromie avec un effet stimulateur sur le muscle du chromatophore (Loi and Tublitz, 2000).

La Sepiatocine et la Pro-Sepiatocine sont des neuropeptides identifiés récemment chez la seiche (Henry et al., 2013). Les précurseurs de ces peptides (Figure 15) sont très similaires à ceux décrits chez les vertébrés. Chez les Mammifères, l'ocytocine induit les contractions de l'utérus lors de l'accouchement ainsi que l'émission du lait.



Figure 15 : Précurseurs de la Sepiatocine (A) et de la Pro-Sepiatocine (B). Séquence signal en jaune, neuropeptide en gras, amidation C-terminale en vert et cystéines soulignées. La flèche indique le début du domaine neurophysine.

La Vasopressine joue un rôle dans la balance osmotique et module les contractions des fibres musculaires lisses de la paroi des artères. Chez le poulpe *Octopus vulgaris*, deux peptides apparentés à la superfamille des Ocytocines/Vasopressines ont été identifiés : la Cephalotocine (Reich, 1992), et l'Octopressine (Takuwa-Kuroda et al., 2003). L'Octopressine serait impliquée dans la régulation de la reproduction, de la circulation et de l'activité cardiaque, et dans la nutrition. La cephalotocine quant à elle serait circulante et régulerait certaines voies métaboliques.

La Sepiatocine, exprimée dans les différentes régions du SNC et bien que non circulante, possède une séquence primaire très proche de celle de l'octopressine avec seulement un acide aminé divergent. Il a été démontré qu'elle module l'activité contractile du pénis, de l'oviducte, et de la veine cave (Henry et al., 2013), d'où son implication très probable dans l'émission des gamètes des 2 sexes.

La Pro-Sepiatocine, dont l'expression est localisée au niveau des masses sous et sup œsophagiennes, ne diffère de la cephalotocine que de deux résidus. Sa fonction n'est pas élucidée mais sa présence dans l'hémolymphe au moment de la ponte permet d'envisager une implication dans la reproduction.

Chez la seiche, le séquençage récent du transcriptome du SNC a permis d'identifier 38 familles de neuropeptides exprimées par 54 précurseurs protéiques. Cinq de ces familles n'ont jamais été décrites dans le règne animal, trente sont identifiées pour la première fois chez la seiche, et quatorze sont surexprimées chez la femelle en ponte par rapport au mâle mature (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Mais très peu d'informations fonctionnelles sont actuellement disponibles en ce qui concerne ces nouvelles familles de neuropeptides. Toutefois, des hypothèses fonctionnelles ont été formulées par Zatylny-Gaudin et al. (2016) sur la base de la localisation tissulaire des neuropeptides chez la femelle en ponte *versus* le mâle mature, et des profils d'expression. Ces hypothèses fonctionnelles restent donc à vérifier expérimentalement. Parmi les familles de neuropeptides identifiées, les Crustacean Cardioactive Peptides (CCAPs) et les FLGamides sont suspectés d'être impliqués dans les mécanismes associés à la ponte chez la seiche. Ces familles sont décrites dans le chapitre 1.

C. Les régulateurs ovariens

1. Régulation paracrine chez les Mollusques

Chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas*, le PIESVD est le premier peptide régulateur ovarien à avoir été identifié (Bernay et al., 2006b). Ce régulateur agit spécifiquement sur les femelles matures en modulant l'activité du muscle adducteur dont les contractions participent à l'émission des gamètes dans le milieu pendant la période de reproduction. Des travaux récents montrent que ce peptide est clivé à partir d'une protéine vitelline (Joël Henry, communication personnelle).

2. Régulation paracrine chez la seiche

La 5-Hydroxytryptamine (5-HT) est le premier régulateur ovarien identifié chez la seiche (Zatylny et al., 2000a). Isolée à partir d'ovocytes matures, elle contribue à leur stockage dans le coelome génital avant l'accouplement et cible l'oviducte proximal dont elle inhibe, de façon dose dépendante, les contractions (diminution de l'amplitude et de la fréquence). Ce régulateur est synthétisé par l'ovocyte dès le début de la vitellogénèse (stade IVa) jusqu'au stade mature (stade V), où la concentration est maximale.

Le térapeptide ILME (Zatylny et al., 2000b) a été identifié à partir d'un extrait peptidique d'œufs, il est aussi présent au niveau des follicules vitellogéniques et des ovocytes lisses. Il est détecté dans l'eau d'incubation des œufs et des ovocytes matures, ce qui fait qu'il est également considéré comme une phéromone aquatique. L'ILME déclenche la cyclisation des contractions

de l'appareil génital femelle à partir de 10^{-14} M. Ce peptide augmente le tonus et la fréquence des contractions des GNP, responsables de la sécrétion de la capsule externe de l'œuf. Il cible spécifiquement le tractus génital et les GNP, et n'a pas d'effet sur d'autres organes contractiles tels que l'œsophage, par exemple.

La SepOvotropine (Zatylny et al., 2000c) a été identifiée à partir de follicules vitellogéniques et est également présente dans les ovocytes matures et dans les œufs. Ce peptide module les contractions du tractus génital des femelles matures à partir de 10^{-19} M.

À 10^{-10} M la SepOvotropine déclenche la cyclisation des contractions de l'oviducte distal. Bien que n'étant pas impliqué dans la motilité du tractus génital, le SepSAP (pour Sepia Sperm Attracting Peptide, (Zatylny et al., 2002)) n'en n'est pas moins impliqué dans la ponte. Cet hexapeptide amidé en C-terminal est exprimé par les follicules vitellogéniques et est libéré par les ovocytes encapsulés lors de la ponte. Actif dès 10^{-17} M, il facilite la rencontre des gamètes en exerçant un effet attractant sur les spermatozoïdes, permettant sans doute une sélection des gamètes les plus compétentes pour la fertilisation.

Le *Sepia* Capsule Releasing Peptide, ou SepCRP, est exprimé pendant la vitellogénèse dans les follicules ovariens (Bernay et al., 2004). Il cible spécifiquement l'oviducte et la GNP dont il inhibe les contractions. Tout comme la 5-HT, il serait impliqué dans le stockage des ovocytes avant l'accouplement. Sept autres peptides apparentés à ce premier SepCRP ont été identifiés par la suite (Bernay et al., 2005). Ces peptides conservent une activité similaire.

Les Ovarian Jelly Peptides ou OJPs présentent des similitudes avec les SepCRPs : même localisation, activité semblable sur les mêmes organes cibles, et séquence qui conserve un domaine (DEV(K) (Bernay et al., 2006a). Le nom de cette famille de peptides régulateurs ovariens provient de leur propriété gélifiante en solution aqueuse. Enfin, la Sepovotropine, les SepCRPs et les OJPs sont issus du clivage d'une protéine vitelline très abondante dans les follicules ovariens vitellogéniques et les ovocytes matures (Joël Henry, communication personnelle).

D. Les phéromones sexuelles

1. Présentation générale

Une phéromone se définit comme une substance de nature biochimique variable (peptide, protéine, lipide, ester, etc...), sécrétée dans l'environnement par un individu d'une espèce donnée, et qui est reçue par un individu de la même espèce chez qui elle déclenche une réaction

spécifique, tel un comportement morphologique ou une réaction stéréotypée. Contrairement à d'autres formes de communication chimique, une phéromone implique une notion de volonté de la part de l'émetteur et du receveur.

Les phéromones ont pour particularité de déclencher une réaction à très faible concentration, et peuvent agir en mélange sous forme de bouquet dont la composition qualitative et quantitative module la spécificité du message.

La nature chimique des phéromones est variable selon l'organisme, le rôle et le mode de transport : les phéromones de faible poids moléculaire (esters, alcools, aromatiques...) sont plutôt volatiles et donc facilement transportables par voie aérienne. De par leur nature il s'agit surtout de phéromones de communication à longue distance comme par exemple le bombykol libéré par la femelle *Bombyx mori* (Butenandt et al., 1961). Les phéromones de masse moléculaire plus élevée (protéines, stéroïdes, hydrocarbures cuticulaires...) sont présentes chez les organismes vivant en groupe et dont les signaux sont échangés à faible distance ou par contact. Ces phéromones de contact sont effectives lors de la manipulation (d'œufs par exemple). Les phéromones protéiques, polypeptidiques et peptidiques peuvent être modifiées pour limiter leur dégradation dans le milieu (amidation C-terminale, ponts disulfures intra-chaine des protéines et N-glycosylations).

Il existe deux classes de phéromones, définies selon les travaux de Wilson (Wilson, 1963). Les phéromones incitatrices qui déclenchent une modification instantanée et réversible du comportement du receveur (migration, attitude agressive, attitude copulatrice...). On retrouve dans cette classe les phéromones d'identité, sexuelles, d'alarme, de piste, d'agrégation, territoriales, et d'espacement. La seconde classe est celle des phéromones modificatrices qui déclenchent des changements morphologiques ou physiologiques sur les individus. Cette classe est largement représentée chez les insectes sociaux avec les phéromones de caste et de grégarisation.

2. Les phéromones sexuelles

Les phéromones sexuelles sont dites incitatrices : elles visent à modifier instantanément et temporairement le comportement de l'individu receveur. Ces phéromones peuvent avoir un effet attractant, telle que l'attractine chez l'aplysie (Painter et al., 2003) ou la darcine chez la souris (Roberts et al., 2010). Elles peuvent jouer un rôle dans la régulation de la ponte, comme le tétrapeptide ILME chez la seiche (Zatylny et al., 2000b), ou encore dans la sélection des géniteurs comme la Loligo- β -sémio-protéine (Loligo- β -MSP) chez le calmar *Loligo pealeii* (Cummins et al., 2011).

3. Phéromones sexuelles chez les Insectes

Le bombykol est la première phéromone sexuelle identifiée chez le Bombyx du murier (Butenandt et al., 1961). Il s'agit d'une phéromone volatile (alcool) sécrétée par la femelle pour attirer le mâle. Le bombykol déclenche une action à très faible concentration : il a été démontré qu'une seule molécule de bombykol suffit à déclencher un potentiel d'action chez le mâle.

Chez la drosophile, trois phéromones sexuelles ont été identifiées (Gomez-diaz and Benton, 2013). La 11-cis-vaccenyl acetate (cVA) est une phéromone lipidique volatile produite par la drosophile mâle, connue pour inhiber les comportements de cour des autres mâles (Bartelt et al., 1985) et favoriser l'accouplement avec les femelles (Kurtovic et al., 2007). De plus, elle agit aussi comme phéromone d'agrégation. Cette phéromone est détectée par le récepteur Or67d exprimé dans les antennes des mâles et des femelles (Ha and Smith, 2006; Kurtovic et al., 2007). Les deux autres phéromones sont des hydrocarbures cuticulaires qui agissent par contact et qui sont produites de manière sexe-spécifique : la 7,11-heptacosadiène (7,11-HD) est produite par les femelles et agit comme un aphrodisiaque chez les mâles, tandis que la phéromone mâle 7-tricosène a un effet antagoniste (Benton, 2007; Kurtovic et al., 2007).

4. Phéromones sexuelles chez les Mammifères

Chez les Mammifères, plusieurs phéromones sexuelles ont été identifiées. Elles agissent notamment sur le comportement des géniteurs. Elles sont reconnues par l'organe voméro-nasal (ou organe de Jacobson) situé entre le palais et les fosses nasales et spécialisé dans la détection des phéromones, ou par l'épithélium olfactif principal situé dans la cavité nasale. Ces phéromones sont libérées et associées à l'urine ou aux sécrétions lacrymales.

Chez la souris, la phéromone ESP1 (pour Excorine-Gland-Secreting peptide 1) est un peptide de 7 kDa exclusivement produit par le mâle (Yoshinaga et al., 2013). Ce peptide est sécrété par les glandes lacrymales extraorbitales et est reconnu par le récepteur Vmn2r116 (aussi connu sous le nom de V2Rp5) exprimé dans l'organe voméro-nasal des mâles et des femelles (Haga et al., 2010).

L'activité d'ESP1 sur le comportement de la souris est sexe dépendante : ainsi chez la femelle, ESP1 déclenche un comportement de lordose (reflexe copulatoire de courbure de la colonne vertébrale favorisant la pénétration). Chez la souris mâle, EPS1 agit en synergie avec l'urine de mâles non familiers et déclenche un comportement agressif (Hattori et al., 2016). La Darcine (ou Major Urinary Protein 20, Mup20) est une petite protéine de 18893 Da présente dans l'urine des souris mâle (Roberts et al., 2010). Elle déclenche l'attraction des femelles pour un mâle

émetteur spécifique. Enfin, les composés volatiles tels que le DHB (3,4-dehydro-exo-brevicomine) et la SBT (2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole), sont également retrouvés dans l'urine des mâles et agissent seuls ou en combinaison. Ils sont impliqués dans l'attraction des femelles, dans l'agression entre mâles, et induisent l'œstrus (Dulac and Torello, 2003).

5. Phéromones sexuelles chez les Mollusques non Céphalopodes

Chez les Mollusques autres que les Céphalopodes, la communication visuelle est limitée par le faible développement des yeux et par la turbidité du milieu. La communication chimique joue donc un rôle important pour permettre le regroupement de géniteurs, la reconnaissance des partenaires sexuels ou encore la synchronisation de l'émission de gamètes. Par ailleurs, le caractère sessile de certains Mollusques tels que certains bivalves nécessite la synchronisation de l'émission des gamètes afin de permettre un taux de fécondation suffisant. La libération de messagers chimiques synchronisant l'émission des gamètes mâles et femelles est une nécessité. Les études sur les phéromones initiées chez la seiche se sont appuyées sur les travaux réalisés chez l'aplysie, un Gastéropode marin. *Aplysia californica* et *Sepia officinalis* partagent des caractéristiques communes d'un point de vue comportemental et sont de fait très proches au niveau phylogénétique.

Ces deux mollusques ont un comportement comparable au moment de la période de reproduction, caractérisée par des concentrations très importantes de géniteurs sur les aires de pontes côtières. Par ailleurs, leurs migrations sont horizontales et verticales, et annuelles. Enfin, les regroupements de géniteurs facilitent les accouplements et se traduisent par de fortes densités d'œufs dans des zones côtières très localisées.

Chez le genre *Aplysia*, un bouquet de phéromones composé de quatre peptides et polypeptides (Cummins et al., 2005; Cummins et al., 2004; Painter et al., 1998) a été identifié et caractérisé (Figure 16). Ce bouquet a un effet attractant sur les géniteurs et est libéré par les œufs et les individus sexuellement matures. L'expression de ces phéromones est localisée au niveau de la glande de l'albumine, homologue fonctionnel de la glande de l'oviducte (sécrétion de la capsule interne) et des glandes nidamentaires principales (sécrétion de la capsule externe) de la seiche.

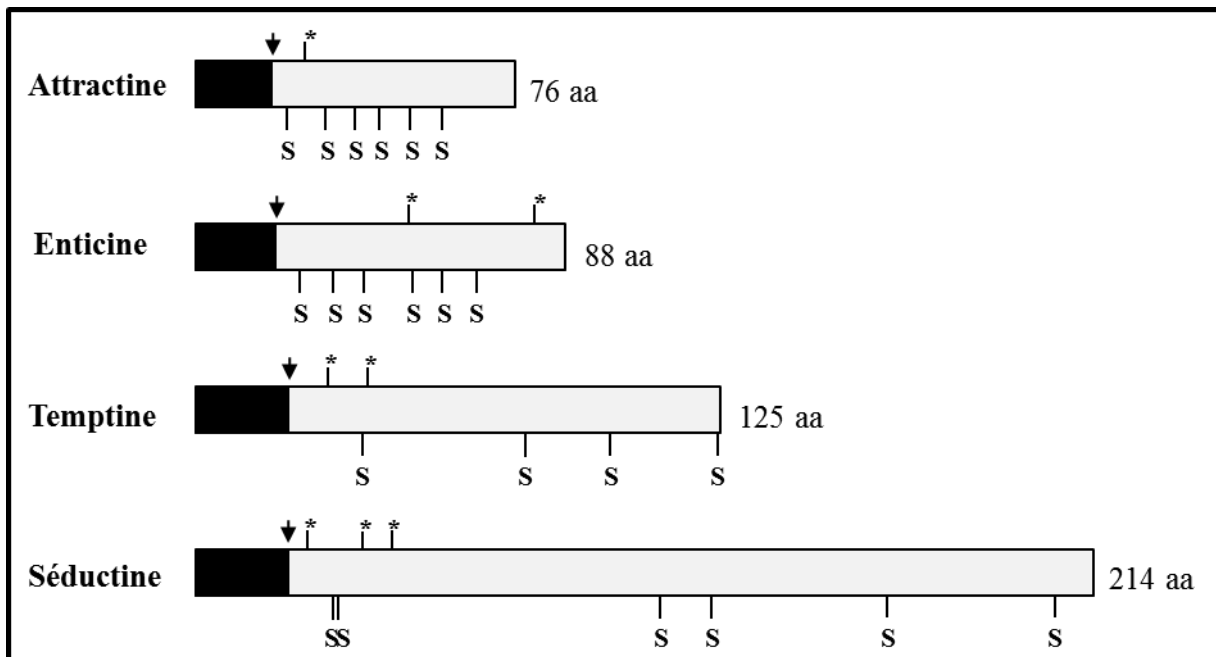


Figure 16 : Les quatre phéromones sexuelles identifiées chez l'aplysie. La boîte noire correspond au peptide signal, les astérisques aux sites de glycosylation et les S aux cystéines.

6. Phéromones sexuelles chez les Céphalopodes

L'utilisation des œufs comme vecteur de phéromones sexuelles est également décrite chez les Céphalopodes. Chez *Loligo pealeii*, il a été démontré que les mâles sont attirés par les grappes d'œufs et que, après les avoir manipulés, ils deviennent agressifs envers leur congénères masculins (King et al., 2003). Cet état d'agressivité est attribué à une phéromone sexuelle : la Loligo- β -microseminoprotéine (Cummins et al., 2011), apparentée aux microseminoprotéines de vertébrés. Cette phéromone est synthétisée et secrétée au niveau de l'épithélium cilié de la glande nidamentaire et des cellules sécrétrices des glandes nidamentaires accessoires. Elle agit en tandem avec les stimuli visuels induits par les pontes : les expériences de King et al. (2003) démontrent le rôle des pontes dans l'attraction visuelle des mâles avec finalement une agressivité induite par la manipulation des œufs. L'état d'agressivité est temporaire et la manipulation régulière des pontes est nécessaire pour maintenir cet état.

Un tel comportement agressif est interprété comme une stratégie de reproduction visant à sélectionner les géniteurs mâles les plus vigoureux, mais aussi les plus aptes à garder les femelles pour les empêcher de s'accoupler avec les autres mâles (Hanlon et al., 1997).

Chez la seiche, il existe peu de données concernant les phéromones. Avant 2012, seul le peptide ILME (Zatylny et al., 2000b) avait été identifié. Ce dernier, libéré par les pontes, facilite la

libération d'ovocytes dans la cavité palléale en modulant les contractions de l'oviducte, et stimule la sécrétion des produits capsulaires.

En 2012, dans le cadre de sa thèse, Jérémy Enault identifie trois précurseurs protéiques structuralement apparentés et exprimés par la glande de l'oviducte (GOVI) : SP α , SP α' , et SP β (Enault et al., 2012).

Ces travaux ont démontré l'existence d'un premier mode de maturation basé sur des clivages de type prohormone convertase au niveau de sites dibasiques (Figure 17), permettant ainsi la libération potentielle de douze peptides et polypeptides. Une étude fonctionnelle a permis de démontrer des activités *in vitro* ciblées sur les organes impliqués dans l'accouplement et la ponte (peptides α_3 et β_2). En effet, le peptide β_2 déclenche une augmentation de l'amplitude des contractions du pénis ainsi que la stimulation suivi de l'augmentation du tonus basal de l'oviducte et des GNP. En parallèle ce peptide déclenche des contractions au niveau de la branchie qui pourraient induire un mécanisme d'hyperventilation lorsque les géniteurs sont à proximité des œufs afin d'accroître l'imprégnation. Le peptide α_3 déclenche contractions de forte amplitude du pénis. Ces résultats expérimentaux tendent à confirmer le rôle des phéromones sexuelles dans la stimulation de l'accouplement.

```

Précurseur SP Alpha MDK - - - - - PGKTSPLSWLVVYITALILVFFLARLEIRSNVQKAEFQHRAARLLVSVRRYYAAGPVFTRWGNRCPYRSYRVYEGIMGGQDKTH 88
Précurseur SP Alpha-Prime MDK - - - - - PGKTSPLSWLVVYITALILVFFLARLEIRSNVQKAEFQHRAARLLVSVRRYYAAGPVFTRWGNRCPYRSYRVYEGIMGGQDKTH 88
Précurseur SP Beta MTSFDNKMP TSGK-SKLRWFFYVFSLLALIFVFSRLEKKAEEKIQIKKFTYYPVQVK-IPGPGATYVWGRKKCTSNDRVYTG YTAGQHYNH 93
Précurseur SP Alpha RGGASNFLCLPRRP TWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPAHVNGF-GLFITTHLKPPHNHDVPCAVCQVTKPATVLMIPGRKVCTPGWDLMYRGYL 182
Précurseur SP Alpha-Prime RGGASNFLCLPRRP TWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPSQVNGF-GLFFQTHLKPPHNHDVPCAVCQVTKPATVLMIPGRKVCTPGWDLMYRGYL 182
Précurseur SP Beta AGGGSN I LCLPRFPVSDQIT TSTENVASIFGVR YRIGSYNSLGTNGLFSTPNNISLNKRVPVPCSVCLTNGSATIMVIPGRTHCYPGWYRQYSGYL 188
Précurseur SP Alpha MSEKRNNAGRMTYVCVDRPQVYWAGYLNENGATINHVESKCGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSKCP I 248
Précurseur SP Alpha-Prime MSEKRNNAGRMTYVCVDRPQVYWAGYLNENGATINHVESKCGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSKCP I 248
Précurseur SP Beta MTAHYAHVGRSNHICVHRRPQRYFG--TSPLQAFLYHVEAE CGSLPCPPYCNFELPCVVCRKCP - 251

```

Figure 17 : Alignement des trois précurseurs de phéromones sexuelles identifiés par J.Enault (2012). Le peptide signal est encadré en jaune. Les acides aminés conservés sont figurés en rouge.

IV. Approches expérimentales

Antérieurement, la recherche de régulateurs était basée sur le screening de molécules issus d'un extrait peptidique utilisant un test biologique. Pour l'identification de neuropeptides, l'extrait de système nerveux central était soumis à un fractionnement en chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'activité des fractions purifiées étaient testées sur un bio-essai *ex vivo*. Lorsqu'une activité était observée, la fraction active était soumise à une série de purifications successives afin d'obtenir un produit actif pur, condition nécessaire à un séquençage par la dégradation N-terminale d'Edman. Cette approche technique a longtemps été la seule à

permettre la caractérisation de peptides régulateurs. Elle permettait d'établir un lien immédiat entre le composé purifié et la fonction biologique.

Désormais, la construction de transcriptomes peut être réalisée relativement rapidement à partir de quelques milligrammes de tissu. Par une approche *in silico* ciblée, il est alors possible d'identifier spécifiquement les régulateurs d'intérêt en utilisant des critères structuraux : présence d'un peptide signal, types de modifications post traductionnelles, répétition de séquences, etc. L'existence des peptides prédits grâce aux banques données est ensuite vérifiée par le biais d'une analyse peptidomique. Cette approche permet d'une part de déterminer la séquence primaire des produits d'expression matures, mais aussi de réaliser une cartographie tissulaire qui pourra être complétée par une approche immunocytochimique au niveau cellulaire. Ces étapes de caractérisation structurale et de localisation tissulaire sont généralement suivies par une caractérisation fonctionnelle. Cette dernière nécessite de disposer d'un test biologique robuste et d'une molécule synthétique mimétique du régulateur étudié, qui permettront de vérifier l'existence d'une relation dose/activité. (Figure 18).

Lorsque les peptides/polypeptides régulateurs d'intérêt possèdent moins de 60-70 acides aminés, la synthèse chimique sur support solide constitue un moyen rapide de produire une molécule mimétique. Au-delà d'une soixantaine d'acides aminés, la production en système recombinant est plus adaptée, même si certains prestataires proposent des synthèses de composés de plus de 100 acides aminés.

L'approche expérimentale développée dans ce manuscrit repose sur l'exploitation, par des approches *in silico* et peptidomiques, de bases de données transcriptomiques produites chez la seiche. La multiplicité des transcriptomes produits à partir de différents organes provenant des deux sexes, ainsi que les données d'expression, ont permis de sélectionner quelques familles de neuropeptides susceptibles d'être impliquées dans la régulation de la ponte, qu'il s'agisse de l'ovulation, du transport des ovocytes dans les voies génitales femelles ou de la sécrétion des produits capsulaires par les glandes annexes.

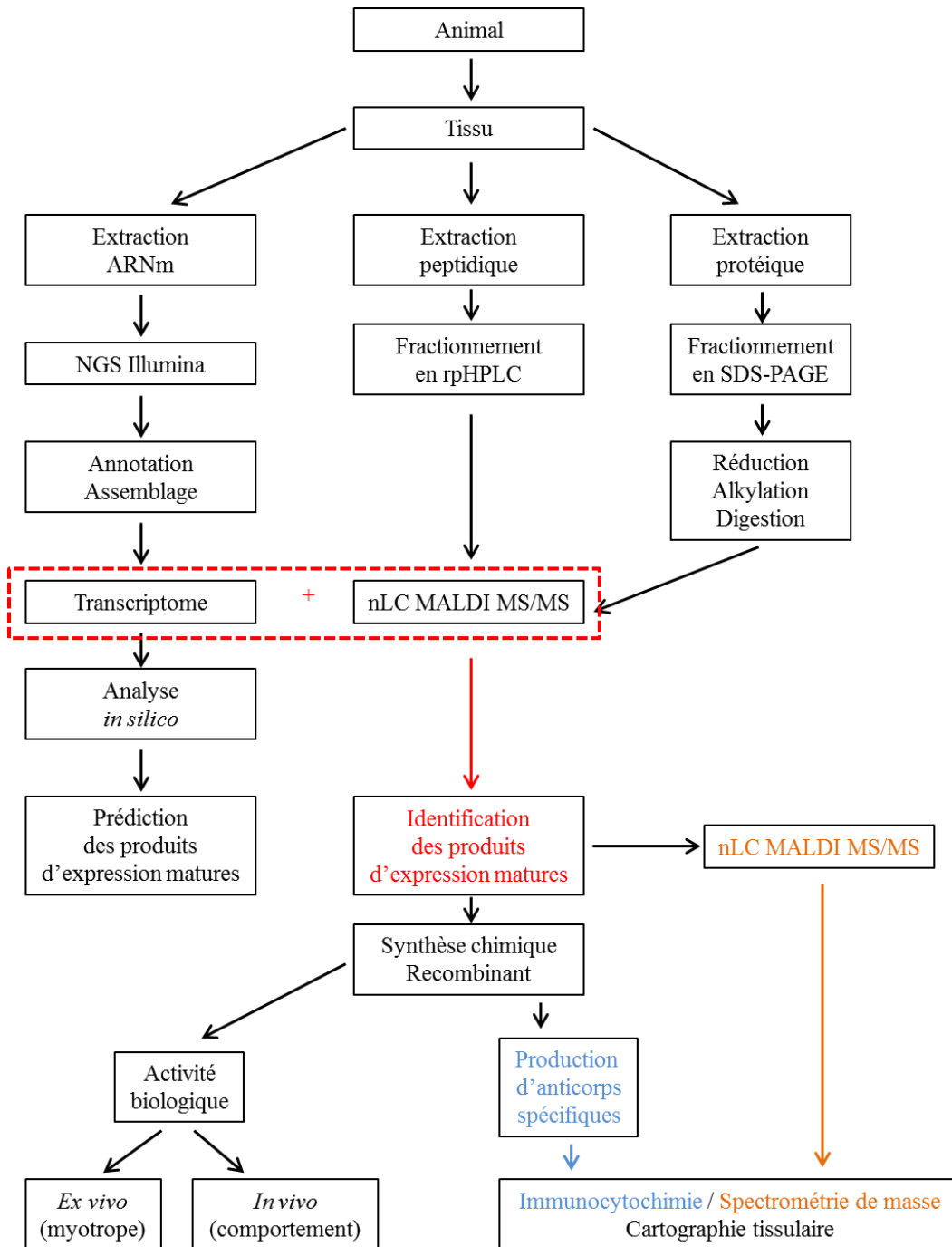


Figure 18 : Caractérisation structurale et fonctionnelle des régulateurs. Schéma synthétique de l'approche expérimentale.

Cette approche que l'on peut qualifier de transcripto-peptidomique a par ailleurs été complétée par la mise en œuvre de tests fonctionnels, de screening tissulaires par des techniques de marquage immunocytochimiques ou par spectrométrie de masse. Enfin, une étude structurale a été réalisée en résonance magnétique nucléaire (RMN) avec des molécules mimétiques.

Les neuropeptides sont cartographiés en immunocytochimie, technique appuyée par la spectrométrie de masse, dans le système nerveux central des femelles en ponte, ainsi que dans les différents organes impliqués dans la ponte : ovaire et glandes annexes. Les tests fonctionnels sont mis en place sur ces organes, ainsi que sur l'oviducte. Il s'agit d'un bio-essai *ex vivo* qui permet de suivre les contractions musculaire des organes testés.

Les phéromones sexuelles ont quant à elles été identifiées par une approche mixte peptidomique/protéomique et l'une d'entre elles a été produite en système recombinant. Une approche transcriptomique ciblée sur l'organe olfactif mâle et le pavillon de l'oviducte distal, deux organes cibles potentiels des phéromones sexuelles, a permis de réaliser une recherche *in silico* dans l'optique d'identifier un ou plusieurs récepteurs candidats.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

I. Matériel Biologique

A. Animaux

Les seiches sont capturées au casier au large de Luc sur mer (Calvados, France) par les techniciens de la station du Centre de Recherche en Environnement Côtier (CREC ; station marine de l'Université de Caen) ou capturées au chalut par les pêcheurs professionnels de Port en Bessin (Calvados, France). Dans les deux cas, les animaux sont séparés selon leur sexe au moment du débarquement afin d'éviter la compétition des mâles pour les femelles. Les seiches sont stabulées dans les structures de l'aquarium céphalopode du CREC.

Les seiches fraîchement capturées sont placées en quarantaine durant plusieurs heures dans des bassins de 1000 L alimentés en circuit ouvert. Les animaux sont ensuite maintenus, dans la mesure du possible, par groupe de trois dans des bassins de stabulation. Ces bassins sont thermorégulés à 16°C et soumis à une photopériode naturelle. Les groupes formés sont constitués d'un mâle pour deux femelles. Les pontes fraîches prélevées sur les casiers sont placées dans les bassins afin d'inciter les femelles à pondre.

B. Prélèvements de matériel biologique

Les animaux sont anesthésiés puis prélevés et euthanasiés selon le protocole en vigueur (Gonçalves et al., 2012). Les organes disséqués sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C en attendant leur traitement. Les organes destinés aux études fonctionnelles sont mis en balnéation dans une solution de perfusion (Instant Océan® 30g/L, glucose 1mM) et utilisés dans les plus brefs délais. Les organes destinés à l'immunocytochimie sont immédiatement placés dans du Davidson (eau de mer naturelle filtrée : 30%, éthanol 95% : 30%, formaldéhyde 37% : 20%, glycérol 10% : 10% et acide acétique : 10%). Enfin, les pontes fraîches (de moins de 24h) sont collectées pour la recherche de phéromones sexuelles au niveau de la capsule.

II. Approche transcriptomique

A. Extraction d'ARN

Pour chaque échantillon 100µg de tissu en poudre sont homogénéisés dans 1 ml de TRI-Reagent froid à partir de 5 individus. Après une centrifugation 10 minutes à 12000g le surnageant contenant les protéines, ADN et ARN, est incubé 5 minutes à température ambiante. 100 µL BCP sont ajoutés. Après 20 minutes de centrifugation à 12000g la phase aqueuse supérieure contenant les ARN est transférée dans un tube RNase Free. Les ARN sont précipités par l'ajout de 500 µL d'isopropanol, suivie de 10 minutes d'incubation à température ambiante, puis d'une centrifugation 10 minutes à 12000g. Le culot contenant les ARN est lavé dans de l'éthanol 70% puis centrifuger 30 secondes à 7500g. Les ARN sont finalement repris dans 20µl d'eau stérile, leur concentration et leur qualité en terme de pureté sont déterminées par une mesure au NanoDrop®. Les ratios 260/280 et 260/230 permettent d'évaluer respectivement d'une part les contaminations protéiques et la présence de phénol et d'autre part la présence de solvants, de sels et de molécules organiques. Si la qualité des ARN n'est pas jugée satisfaisante, ces derniers sont précipités une seconde fois dans l'isopropanol ou en présence d'acétate de sodium 3M pH5. La concentration des ARN est finalement ajustée à 2µg/µL et 10 µL de cette solution sont déposés dans des tubes RNA Stable (SIGMA) et séchés au speed-vac en évitant tout échauffement du tube.

B. Séquençage et création d'une banque de transcrits

Les échantillons d'ARN conditionnés comme décrit précédemment sont séquencés en prestation par la plateforme Génome Québec (<http://www.genomequebec.com/ressources-et-plateformes-technologiques.html>) sur un séquenceur Illumina HiSeq4000 en paired end 2 x 100pb.

L'analyse bioinformatique est effectuée par la plateforme de bioinformatique ABIMS (Analyse and Bioinformatics for Marine Science, Roscoff, France) sur des données de séquençage d'ARN provenant du pavillon de l'oviducte et de l'organe olfactif. L'objectif est d'obtenir des transcriptomes de références annotés. L'ensemble des données brutes est filtré et nettoyé à l'aide de Trimmomatic v (0.36) (Bolger et al., 2014), en utilisant les paramètres suivants: ILLUMINACLIP: adapter.fa: 2: 30: 10, LEADING: 5, TRAILING: 5, FENETRE COULISSANTE: 4: 5, MINLEN: 25. La qualité de séquence globale est vérifiée à l'aide de FastQC (v 0.11.5) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). L'assemblage global est réalisé avec Trinity 2.4.0. (Grabherr et al., 2013), un package dédié à l'assemblage transcriptomique *de novo*. Une étape de normalisation est réalisée selon la couverture en kmer (kmer de 25 nt, couverture maximale de 30) proposée par le package Trinity.

Les contigs inconsistants générés par Trinity sont supprimés après un remapping des reads en utilisant Bowtie (v 1.1.2) (Langmead et al., 2009), et l'estimation de l'abondance relative en utilisant RSEM (v 1.2.22) (Li and Dewey, 2011) pour obtenir les valeurs FPKM (Les deux logiciels ont été lancés via les wrappers perl fournis par le package Trinity). Seuls les transcrits ayant au moins une valeur FPKM supérieure à 1 et les isoformes correspondant à plus de 1% du nombre total de gènes sont conservés. L'annotation des séquences de contig est réalisée en utilisant le pipeline Trinotate (<http://trinotate.github.io>), comme décrit dans (Haas et al., 2013).

Les séquences sont blastées contre la base de données NCBI nr (version 193) avec les paramètres de configuration suivants : max BLAST hits 20, min Expect Value 10^{-3} , et contre la base de données Ensembl du protéome humain (version 82) (BLASTX). Seuls les résultats avec des valeurs E < 0,001 sont conservés. La prédiction de peptides est réalisée en utilisant le logiciel TranDecoder (Haas et al., 2013).

La recherche de similarité (blastp des peptides prédits par Transdecoder) est effectuée contre la base de données uniprot-swissprot (version 2017-01). La prédiction du peptide signal est réalisée en utilisant l'utilitaire signal P v4.1 (Petersen et al., 2011). La détection des domaines transmembranaires est réalisée en utilisant TMHMM v2.0c (Krogh et al., 2001). La recherche de domaine protéique est effectuée en utilisant hmmscan de la suite hmmer v.3.1b1 par rapport à la base de données Pfam-A (Finn et al., 2014). Enfin, l'annotation fonctionnelle du transcriptome est réalisée en utilisant le pipeline Trinotate.

C. Analyses *in silico*

Les analyses *in silico* sont principalement réalisées avec le logiciel Peptraq. Il s'agit d'un logiciel développé en interne permettant de trier les transcrits, les précurseurs protéiques ou les produits de clivage à partir de fichiers au format fasta ou .txt, sur la base de multiples critères structuraux tel que la composition en acides aminés, la présence de motifs particuliers ou de pattern de cystéines, l'abondance de certains acides aminés, la charge électrique, etc. et au niveau de l'annotation en utilisant des mots clés.

Les prédictions des domaines transmembranaires des protéines sont réalisées avec les utilitaires HMMTOP (www.enzim.hu), TMHMM, version 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) et I-TASSER (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER). Les séquences signales sont prédites avec SignalP Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) et PrediSi (www.predisi.de). Les calculs de masse moléculaire (MW) sont réalisés avec Protein Prospector (prospector.ucsf.edu).

Les séquences sont alignées avec Clustal Omega (www.ebi.ac.uk) et CLC Main Workbench 6.7.1. Les blasts ciblés sur l'espèce *Loligo pealeii* sont réalisés sur le site dédié ivory.idyll.org/blog/2014-loligo-transcriptome-data.html, quant aux autres blasts, ils sont réalisés sur le site blast.ncbi.nlm.nih.gov.

III.Approche peptidomique

A. Extractions

1. Extraction de neuropeptides

Les organes conservés à -80°C sont préalablement broyés au mortier dans de l'azote liquide. Afin d'optimiser l'étape d'extraction, deux types de milieu d'extraction sont utilisés, à raison de 10 ml de milieu pour 1g de poudre d'organe.

La première extraction est réalisée dans une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique 0.1% (TFA) contenant 50mM de dithiothréitol (DTT) en agitation à 4°C pendant 1h.

La seconde extraction est réalisée dans une solution aqueuse contenant 90% de méthanol qualité HPLC acidifiée à 1% avec de l'acide acétique qualité HPLC maintenue en agitation à 4°C pendant 30 minutes.

Après l'extraction, la phase insoluble est éliminée par centrifugation à 30000g pendant 30 minutes à 4°C. Les surnageants sont concentrés et dessalés sur micro-colonne Sep-Pak C18 (Waters) puis séchés. Pour la seconde extraction faisant intervenir un pourcentage élevé de méthanol, le surnageant est préalablement séché et repris dans du TFA 0.1% avant d'être concentré sur micro-colonne.

2. Extraction de phéromones à partir de la GOVI et des capsules d'œufs

Les capsules internes et externes sont prélevées à partir d'œufs frais et sont congelées et stockées à -80°C. Les tissus (GOVI et capsules) sont broyés dans l'azote liquide et les peptides sont extraits 1h à 4°C dans un tampon acide (TFA 0.1% ou HFBA (acide heptafluorobutyrique) 0.1%) contenant 50 mM de DTT. 10 ml de milieu sont utilisés pour 1g de poudre de tissu. Après l'extraction, la phase insoluble est éliminée par centrifugation à 30000g pendant 30 minutes à 4°C. Les surnageants sont concentrés et dessalés sur micro-colonne Sep-Pak C18 puis séchés.

3. Extraction de phéromones à partir d'eau d'incubation d'œufs

Les œufs fraîchement pondus (de moins de 24h) déposés par des femelles maintenues en captivité dans les bassins de la station marine de Luc sur mer sont placés en balnéation dans de

l'eau de mer artificielle (Instant Ocean®, 30g/l) préalablement filtrée sur cartouche C18 (Sep-Pak Vac 35cc 10g, Waters). Chaque balnéation est composée de 300 œufs disposés dans 500 ml d'eau de mer artificielle. Après 24h d'incubation, le milieu est prélevé, filtré sur papier Whatman et dilué avec de l'eau ultra pure (un quart du volume initial) pour abaisser la salinité. Cette eau est acidifiée à 0.1% avec du TFA et concentrée sur cartouche C18. L'éluat est finalement aliquoté, séché au speed-vac et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

B. Purification

1. Chromatographie Liquide Haute performance en phase inverse (rpHPLC)

a. Purification de phéromones du milieu d'incubation des œufs

Les échantillons provenant du milieu d'incubation des œufs sont séparées en deux étapes. Pour la première étape de séparation, les aliquots sont repris dans du TFA 0.1% et centrifugés trois minutes à 17000g. Le système utilisé est une colonne C18 (Nucleodur® EC 250/4 100-10 C18ec) associée à une chaîne HPLC Shimadzu® (Pompe LC20AB, détecteur FRC-10A, analyseur CBM20A), et thermorégulée à 40°C (Four CTO-10AS VP). Le volume d'échantillon injecté est de 500µl. Les composés sont séparés selon un gradient d'acétonitrile (ACN) de 0.33%/min. Le débit est fixé à 1mL/min et la détection à 214 nm correspond à la longueur d'onde de la liaison peptidique. Les fractions sont collectées minute par minute et sont séchées au speed-vac. La seconde étape de séparation est réalisée avec la colonne de première étape sans changer de contre ions, avec un gradient quasiment isocratique variant de 39.2 à 40.8% d'ACN en 50 minutes. La chaîne HPLC utilisée est une Varian® 9012/9050 et les paramètres de collecte et d'acquisition restent les mêmes que pour la première étape. Les fractions collectées sont poolées selon leur temps de rétention, puis séchées et stockées à -20°C.

b. Purification de capsules internes et externes

Les extraits capsulaires sont repris dans 200 µl de TFA 0.1%. Les phéromones sont purifiées sur colonne C8 (Nucleodur® EC250/4 100-5 C8ec) reliée à la chaîne HPLC Varian®. Le volume d'injection est de 185 µl et les composés sont séparés selon un gradient d'ACN de 0.33%/min après une phase isocratique de 15 minutes à 0% d'ACN. Pendant la phase isocratique, le débit est réglé à 0.2 ml/min et passe à 1 ml/min lors de la phase de séparation. Les fractions sont collectées toutes les deux minutes, puis sont séchées et stockées à -20°C.

c. Purification de phéromones de GOVI

Les extraits glandulaires sont repris dans 200 µl de TFA 0.1%. Les phéromones sont purifiées sur colonne C8 (Nucleodur® EC250/4 100-5 C8ec) ou C18 (Nucleodur® EC 250/4 100-10 C18ec) reliée à la chaîne HPLC Varian®. Le volume d'injection est de 180 µl et les composés sont séparés selon un gradient d'ACN de 0.33%/min après une phase isocratique de 15 minutes à 0% d'ACN. Pendant la phase isocratique, le débit est réglé à 0.2 ml/min et passe à 1 ml/min lors de la phase de séparation. Les fractions sont collectées toutes les deux minutes, puis sont séchées et stockées à -20°C.

2. Nano-LC-MALDI-TOF/TOF

Les neuropeptides de la partie distale des GNP et du pavillon de l'oviducte sont séparés en Nano-LC avant d'être analysés en spectrométrie de masse. Les extraits tissulaires sont réduits dans 100 mM de DTT pendant 1h à 55°C et alkylés dans 50 mM d'iodoacétamide à 55°C pendant 45 minutes. Les échantillons sont reconcentrés et dessalés sur C18 OMIX-tips (10µl, Agilent) et l'étape de chromatographie est menée sur un système Nano-LC (Prominence, Shimadzu). Les peptides sont concentrés sur une pré-colonne C18 (Zorbax, 5x0.3mm, 5µm, Agilent) et séparés sur une colonne C18 (Zorbax, 150x0.075mm, 0.3µm, Agilent). Les paramètres de séparation sont résumés en figure 19. L'éluat est homogénéisé avec de la matrice CHCA (α -cyano-4 hydroxycinnamic acid) et le mélange est déposé sur une cible MALDI 384 spots à raison d'une fraction toutes les 20 secondes. Les spots sont analysés en spectrométrie de masse MS/MS (voir plus bas).

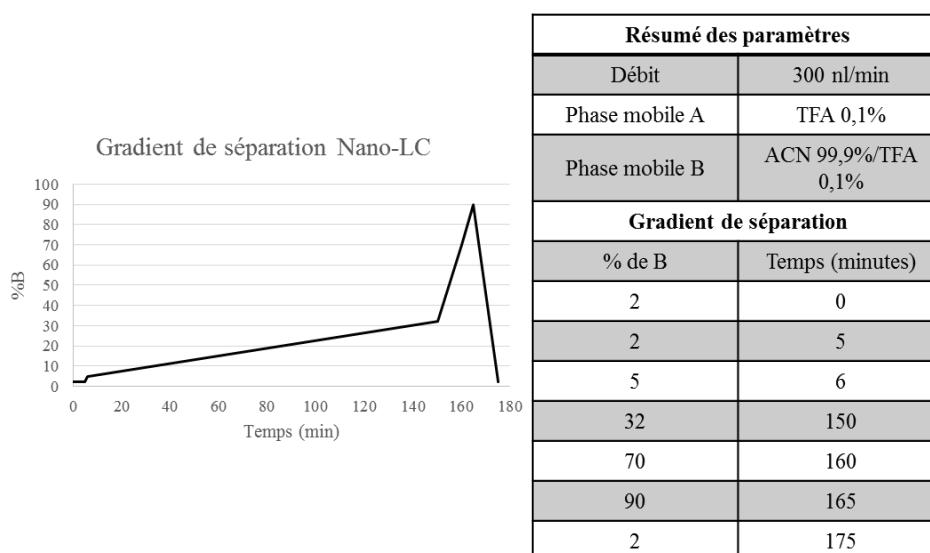


Figure 19 : Purification Nano-LC : résumé des paramètres de séparation.

C. Réduction, alkylation et digestion trypsique

Les fractions à traiter sont préalablement reprises dans 15µl de bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) 25 mM. La réduction des ponts disulfures dure 5 minutes à 95°C après l'ajout de 1,5 µl de DTT 100 mM/ NH₄HCO₃ 25 mM. La réduction des ponts disulfures permet de linéariser les protéines afin d'optimiser la digestion trypsique. Les cystéines sont alkylées pendant 20 minutes à l'obscurité dans après addition de 3µl de iodoacétamide 50mM/ NH₄HCO₃ 25 mM. L'alkylation des résidus cystéines permet de bloquer la (re)formation des ponts disulfures après la réduction des groupements thiol.

La digestion trypsique permet de cliver la liaison peptidique située en C-terminal des arginines (R) et des lysines (K). Cette étape de digestion a pour but de permettre l'identification en MS/MS des polypeptides et/ou protéines présents dans l'échantillon. Un microlitre de trypsine à 0,1 µg/µl (dilué dans du NH₄HCO₃ 25 mM) est ajouté au milieu réactionnel. La digestion demande une nuit à 37°C. Les fractions digérées sont finalement séchées et conservées à température ambiante.

D. Spectrométrie de masse

Les échantillons secs sont repris dans 10µl de TFA 0.1% puis dilués au dixième dans la matrice adaptée aux analyses souhaitées. La matrice SA (Acide Sinapinique) est utilisée pour les analyses MS en mode linéaire, favorisant l'ionisation des protéines et peptides de haute MW. La matrice CHCA est plus indiquée pour ioniser les peptides de faible MW.

Cette dernière est utilisée pour les mesures MS en mode reflectron, mais aussi pour l'identification en MS/MS. Les analyses en spectrométrie de masse sont réalisées sur un MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation tandem Time-Of-Flight), modèle AB Sciex 5800, sur la plateforme PROTEOGEN (SF ICORE 4206, Université de Caen). La précision de l'appareil est calibrée à 200 ppm et 0.6 Da, respectivement pour les analyses MS et MS/MS. Les données MS/MS sont analysées avec le logiciel Masco 2.5.1 (Matrix Science) et confrontées aux banques de données issues des transcriptomes de *S.officinalis*, afin de déterminer l'identité des peptides et protéines détectés. Les modifications post-traductionnelles prises en compte sont : l'amidation en C-terminale, l'oxydation des méthionines et la cyclisation de la glutamine en N-terminal (pyroglutamate).

E. Séquençage d'Edman

La détermination de la séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale des composés est réalisée sur la plateforme de protéomique PRIMACEN (Rouen, Seine-Maritime). Le séquençage d'Edman est réalisé sur un micro-séquenceur "Procise P494". Seules les fractions HPLC issues de la deuxième étape de purification, contenant des polypeptides de MW proches de 20kDa (MW prédite pour les phéromones issues du clivage des précurseurs SP) et identifiées comme étant des produits de clivage des précurseurs SP, sont utilisées pour le séquençage.

IV. Production de la phéromone β en système recombinant

A. Transformation bactérienne

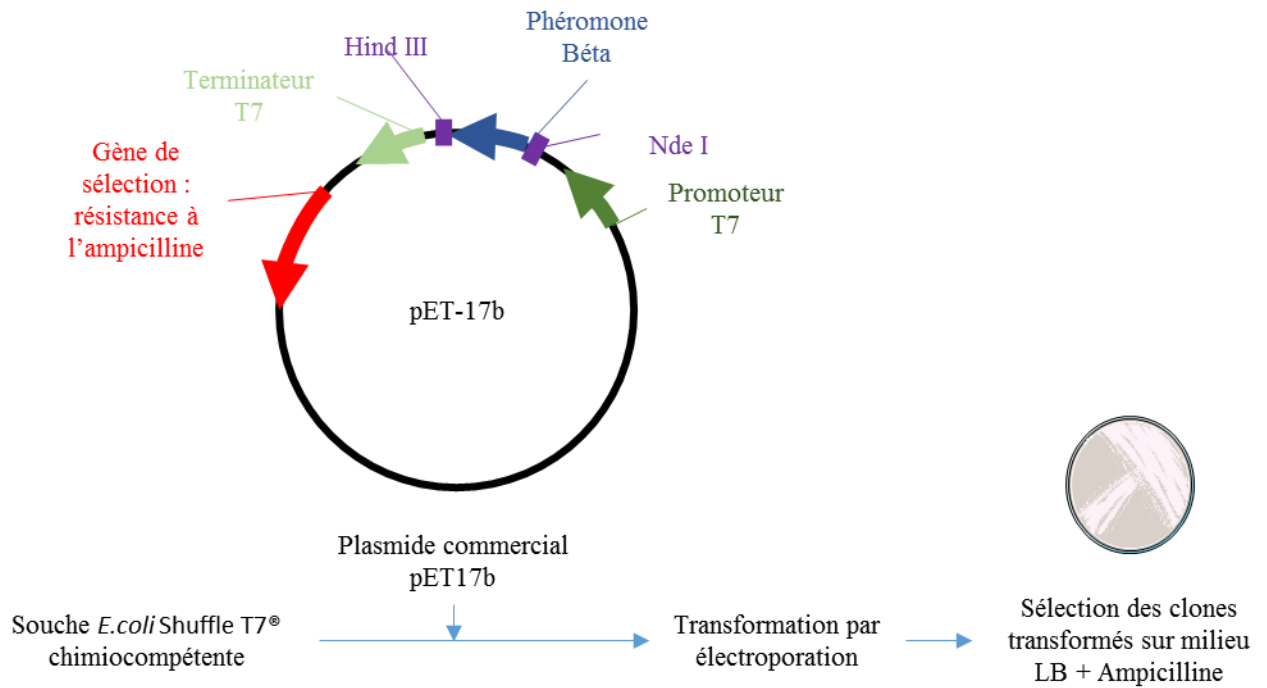
La phéromone β est produite en système recombinant pour réaliser des tests fonctionnels. La phéromone est produite dans une souche *Escherichia coli* SHuffle® T7 (C3026H, BioLabs.inc) chimiocompétente transformée avec un plasmide pET17B (GeneCust) contenant le gène codant pour la phéromone β , entre les sites de restriction NdeI et HindIII, avec une résistance à l'ampicilline (Figure 20).

Les bactéries chimiocompétentes sont décongelées sur glace et 40ng de plasmide sont ajoutés à 50 μ l de bactéries commerciales. La transformation se fait par un choc thermique de 42°C au bain marie (30s) et dépôt sur glace. Les bactéries sont ensuite régénérées 1h à 37°C avec du milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) et étalées sur milieu Lysogeny Broth (LB) solide contenant 100 μ g/ μ l d'ampicilline. L'intégration du plasmide est contrôlée par le gène de sélection (résistance à l'ampicilline) et par PCR (Polymerase Chain Reaction).

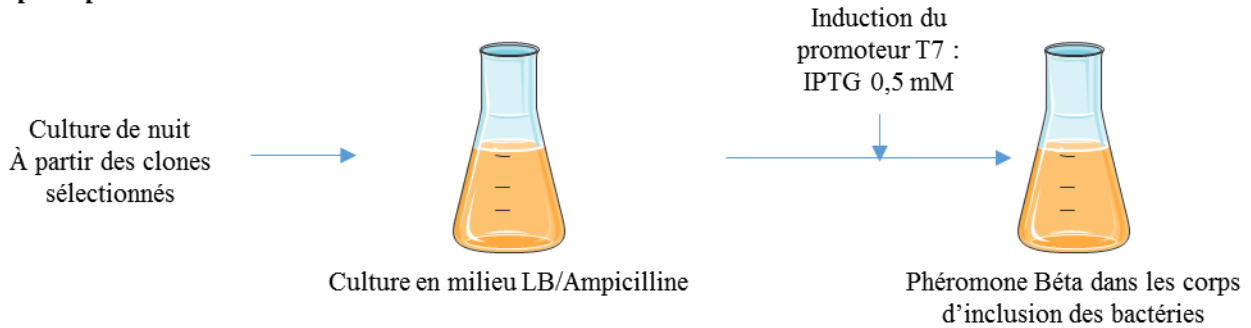
B. Contrôle de l'intégration du plasmide par PCR

La transformation des bactéries est contrôlée par PCR. Le mélange réactionnel est composé de 1 μ l de dNTP 10mM, 1 μ l de chaque amorce à 10 μ M (T7 promoteur et terminateur), 4 μ l de MgCl₂, 4 μ l de Buffer green 5x, 8.75 μ l d'H₂O et 0.25 μ l d'ADN polymérase (GoTaq Flexi G2, Promega). Le mélange réactionnel est déposé sur le culot de 20 μ l de culture de nuit de bactéries transformées et préalablement centrifugées (1 minute, 8000 rpm, à température ambiante). La réaction PCR a lieu comme suit : après 10 minutes de dégradation membranaire à 94°C, les ADN sont amplifiés 25 fois (dénaturation 45 secondes à 94°C, hybridation 45 secondes à 50°C et élongation 1 minute à 72°C) avant l'élongation finale : 7 minutes à 72°C. Les ADN amplifiés sont déposés sur gel d'agarose 1% adapté à la séparation de fragments compris entre 0.5 et 7 kb. Après migration des ADN sur le gel, ces derniers sont révélés dans un bain de BET 500 μ g/l (bromure d'éthidium) pendant 5 minutes. Le gel est finalement observé sous lumière UV.

Étape 1 : transformation & sélection des clones



Étape 2 : production



Étape 3 : extraction et purification

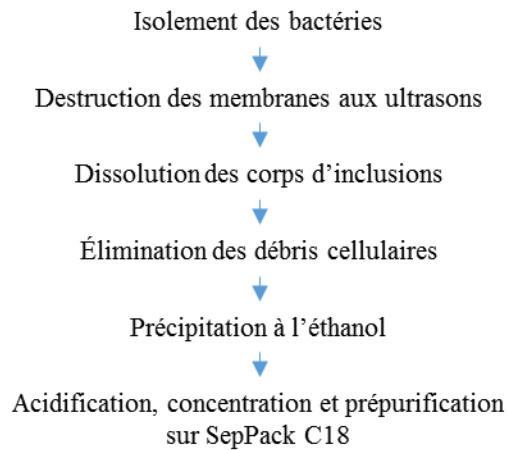


Figure 20 : Production de la phéromone β en système recombinant.

C. Production en système recombinant

Les bactéries sont cultivées dans 200ml de LB/ampicilline après un ensemencement au 200^{ème} pour une culture de nuit. Après une période de croissance à 37°C suffisante pour atteindre une densité optique (DO) d'environ 0.5, la culture est induite avec 0.5 mM d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 20h à température ambiante. Les bactéries sont finalement séparées du milieu de culture par centrifugation 20 minutes à 3000g, et conservées, à -80°C.

D. Extraction et purification de la phéromone β recombinante

Les culots cellulaires sont repris dans du tampon de lavage (Tris-HCl 50mM, pH8) et traités au bain à ultrasons par tranches de 30s (destruction membranaire), alternées de phases de repos de deux minutes sur glace (évite le réchauffement trop important de l'échantillon). Le tampon de lavage est éliminé par centrifugation 20 minutes à 17400g, 4°C. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec le tampon précédent. Les corps d'inclusion sont lysés avec une solution de chlorure de guanidinium (GndHCl) 6M solubilisée dans du tampon Tris-base 50mM à pH8. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 20 minutes à 17400g, 20°C. Le surnageant protéique est collecté et conservé à -20°C jusqu'à extraction.

Les protéines contenues dans le surnageant sont précipitées à l'éthanol. Un volume de protéines est précipité dans 9 volumes d'éthanol 100% froid, après homogénéisation le milieu est incubé 10 minutes à -20°C puis centrifugé 5 minutes (15000g à 4°C). Le culot est repris dans de l'éthanol 90% froid puis centrifugé comme précédemment. Le culot est finalement solubilisé dans du TFA 0.1%, puis séparé sur microcolonne C18. Une première élution à 20% d'ACN/TFA 0.1% a pour but d'éliminer les peptides de faible MW. La seconde élution réalisée en présence de 80% d'ACN/TFA 0.1% permet d'éluer la phéromone β recombinante. L'éluat est finalement séché au speed-vac.

E. Dosage Bradford et gel SDS-PAGE

Pour contrôler l'expression de la phéromone β recombinante, les protéines extraites sont au préalable dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), puis séparées sur gel SDS-PAGE.

1. Dosage Bradford

150 µl de surnageant protéique en GndHCL sont précipités à l'éthanol. Les protéines sont reprises dans 300µl d'H₂O et sont dosées contre une gamme étalon composée de BSA (Albumine sérique bovine) selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2. Gel SDS-PAGE

15 µg de protéines précipitées sont reprises dans 10µl de tampon de charge, chauffées 5 minutes à 95°C et déposées immédiatement sur glace avant d'être déposées sur un gel de polyacrylamide 12%. Les protéines sont mises à migrer 30 minutes à 80V, puis à 140V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le fond de la cuve. Le gel est coloré 1h dans une solution de méthanol 40%/acide acétique 10%/Bleu de Coomassie 0.1%, puis décoloré une nuit dans une solution de décoloration (méthanol 40%/acide acétique 10%). Les bandes d'intérêt sont découpées, lavées, et déshydratées puis les protéines sont réduites, alkylées et digérées à la trypsine, pour ensuite être analysées en spectrométrie de masse MS/MS.

V. Cartographie tissulaire en immunocytochimie

A. Préparation des échantillons

Les organes fraîchement disséqués sont placés dans la solution de fixation de Davidson (eau de mer naturelle filtrée : 30%, éthanol 95% : 30%, formaldéhyde 37% : 20%, glycérol 10% : 10% et acide acétique : 10%) pendant 24h à 48h, à 4°C. Une déshydratation est réalisée par des bains successifs de 24h : éthanol 70%, éthanol 90%, éthanol 100% et butanol 100%. Les organes sont immergés dans deux bains successifs de paraffine de 24h à 60°C, avant d'être inclus dans un bloc de paraffine. Des coupes sériées de 3 ou 5 µm sont ensuite réalisées au microtome.

B. Immunocytochimie

La détection immunocytochimique de neuropeptides est mise en œuvre grâce à la production d'anticorps polyclonaux de lapin purifiés par affinité (GeneCust®). 3 anticorps ont été produits sur la base des séquences immunogènes suivantes : CVFCNSFGGCTNI pour les CCAPs et CVFDTLGGGHVPYY et CFDSLGGGSFLG-amide pour les FLGAmides.

La détection est réalisée avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à une peroxydase (Invitrogen, A16029) permettant de d'induire l'oxydation d'un chromogène, le DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, Sigma FAST), et formant ainsi un précipité brun.

Les coupes sont déparaffinées avec deux bains de Roti-Histol® (Carl Roth®) et réhydratées avec deux bains d'éthanol 100%. Les peroxydases endogènes sont bloquées par un bain de 10 minutes dans une solution de méthanol 97%/H₂O₂ 3%, et les coupes sont réhydratées par deux bains successifs d'éthanol (95% puis 70%) et un bain dans du TrisHCl 100mM, pH7.4. Les coupes sont rincées avec trois bains successifs de solution TT (TrisHCl 100mM, pH7.4 / Triton X-100 0.5%) avant un bain de BSA 3% / TT 97% visant à bloquer les sites non spécifiques. Après deux rinçages en solution TT, l'anticorps primaire est déposé dilué au 1000^{ème} (SNC) ou au 500^{ème} (Glandes de l'appareil génital). Les coupes sont incubées une nuit à 4°C en ambiance humide.

Après 4 rinçages dans une solution TT, l'anticorps secondaire est déposé dilué au 500^{ème} pour une incubation d'1h à température ambiante. Après deux rinçages avec la solution TT puis deux bains en TrisHCl 100mM pH7.4, l'anticorps secondaire est révélé avec une solution de DAB. La coloration est stoppée après 10 secondes de marquage avec un bain d'eau distillée. Après deux bains de rinçage au TrisHCl 100mM pH7.4, les coupes sont contre-colorées à l'hématoxyline. Les coupes sont finalement déshydratées avec deux bains d'éthanol et un bain de Roti-Histol®, avant le montage.

C. Contre-coloration au Trichrome de Prenant-Gabe

La contre coloration au Trichrome de Prenant-Gabe est utilisée pour l'observation des structures tissulaires. Les lames sont d'abord déparaffinées comme décrit précédemment et rincées à l'eau distillée. Un premier bain d'hématoxyline de Groat d'une minute colore les noyaux en violet. Après un rinçage à l'eau distillée, les cytoplasmes sont colorés en rose par un bain de 8 minutes d'éosine Y aqueuse 1.5%. La coloration est mordancée par un bain de 30 secondes dans de l'acide phosphomolybdique 1% et les tissus conjonctifs sont colorés en vert avec un bain de vert lumière aqueux à 0.2% pendant 30 secondes. Les coupes sont finalement déshydratées dans deux bains successifs d'éthanol 100% et un bain de Roti-Histol® avant le montage.

D. Observations microscopiques

Les lames sont observées en microscopie optique sur le plateau CMABio (SF ICORE 4206, Caen).

VI. Synthèse peptidique

Cf : page 72

VII. Caractérisation fonctionnelle

A. Analyses *ex vivo*

Les organes fraîchement prélevés et maintenus dans la solution de perfusion (Instant Océan® 30g/L, glucose 1mM) sont ligaturés sur le dispositif d'acquisition (Figure 21). La tension de l'organe est calibrée à 1 volt, ce qui est équivalent à un gramme. Les tests fonctionnels débutent lorsque l'organe est stabilisé (régularité du myogramme) cette étape peut prendre deux heures à une nuit.

Le dispositif d'acquisition se compose d'une cuve dans laquelle se trouve l'organe, alimentée en solution de perfusion par un orifice situé au niveau inférieur. L'alimentation est assurée par une pompe péristaltique reliée à une vanne trois voies permettant à la fois l'injection d'échantillon ou de solution de perfusion. L'organe est relié à un dynamomètre couplé à un amplificateur et à un dispositif d'acquisition des données (voltmètre). Le voltmètre est, en fonction du dispositif disponible, analogique (imprimante) ou numérique. Le voltmètre numérique est basé sur la technologie Arduino®, associé à une interface numérique développée en interne. Le débit de perfusion est réglé à 0.5 mL/min et l'ensemble est thermorégulé à 17°C. La progression des solutions dans les cathéters est suivie avec du rouge phénol, sans incidence

sur l'expérience. Le contrôle négatif est assuré par de la solution de perfusion et le témoin positif de l'oviducte distal et des GNP est une solution de FMRFamide 10^{-9} M. Il n'y a pas de témoin positif connu pour le stroma ovarien.

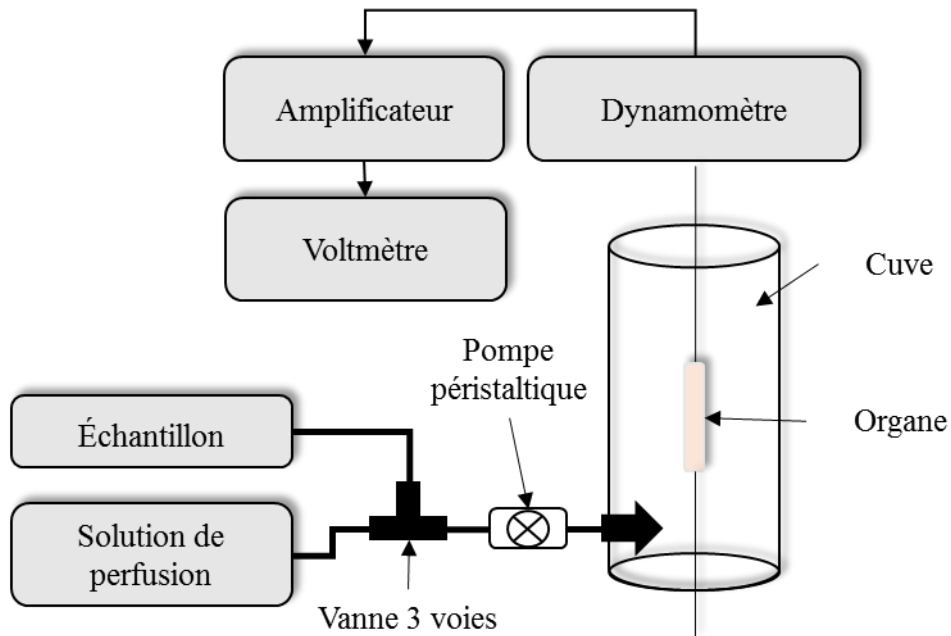


Figure 21 : Test d'activité biologique *ex vivo*. Schéma du dispositif utilisé pour la caractérisation fonctionnelle des neuropeptides de seiche. L'organe est suspendu dans une cuve au volume adapté. La cuve est perfusée en continu par de l'eau de mer synthétique glucosée (solution de perfusion) via une vanne trois voies qui permet également l'administration des échantillons à tester. Les contractions de l'organe sont captées par un dynamomètre et sont transmises à un amplificateur pour finalement être enregistrées et visualisées à l'aide d'un voltmètre analogique (imprimante) ou numérique (système Arduino®)

B. Tests comportementaux

Les phéromones sont testées sur les animaux dans une structure de type "open-space". Il s'agit d'un bassin carré de 90 x 90 cm, contenant quatre systèmes d'injection aux coins, ainsi qu'une pompe pour faciliter la diffusion des substances injectées (Figure 22). Les enregistrements sont réalisés à l'aide d'une caméra reliée à un système d'acquisition NOLDUS®

Les tests sont tous menés selon la même procédure : les animaux sont d'abord légèrement sédatés avec 1% d'éthanol, puis installés dans la structure. Après la phase de réveil et d'acclimatation, un premier enregistrement témoin de dix minutes permet d'observer le comportement de l'animal sans stimulation. Le test débute par l'injection de la solution à tester dans le bassin et dure vingt minutes. L'animal est récupéré pour être remis dans son bassin de stabulation.

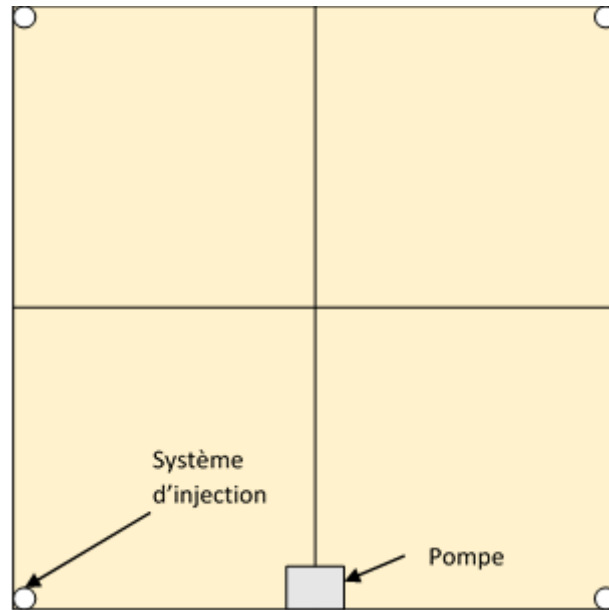


Figure 22 : Tests de comportement en structure de type " open space". Quatre systèmes d'injection reliés à des seringues contenant les solutions de phéromones sont placés aux 4 quarts de la structure. Ceci permet l'administration d'échantillons à l'opposé de l'animal. La pompe assure un courant d'eau nécessaire à l'oxygénation et au brassage de la phéromone.

VIII. Analyses structurales en RMN et CD

Cf : page 73.

*Partie I : Caractérisation
structurale et fonctionnelle de
deux familles de neuropeptides
impliquées dans le contrôle de la
ponte*

Partie I : Caractérisation structurale et fonctionnelle de deux familles de neuropeptides impliquées dans le contrôle de la ponte

I. Introduction

Chez les Mollusques, les neuropeptides sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Exprimés et libérés par les neurones, ils constituent une catégorie de régulateurs très diversifiée par leur structure, leur mode d'action et les fonctions physiologiques qu'ils régulent. Ils sont issus d'un précurseur protéique clivé, au niveau de sites mono et dibasiques, dans l'appareil sécréteur du neurone. Les neuropeptides sont souvent de petite taille (2 à 100 acides aminés, le plus souvent moins de 20) et se prêtent bien aux techniques d'analyse structurales telles que la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie. Cette technique permet aussi de visualiser les modifications post-traductionnelles conventionnelles, qui sont fréquemment retrouvées chez les neuropeptides matures, comme les glutamates en N-terminale, ou les amidations en C-terminale. Plusieurs neuropeptides peuvent être présents sur le précurseur en une unique copie, d'autres peuvent être présents en plusieurs copies, ou peuvent être différents de quelques acides aminés. Ceci permet d'avoir une large gamme de modulation de l'interaction neuropeptide-récepteur.

La ponte est un des processus régulés, en partie, par les neuropeptides. Ce processus est maintenant étudié depuis plus de trente ans chez la seiche : les neuropeptides, produits en réponse à des stimuli du milieu extérieur, agissent directement sur les organes impliqués dans l'émission et la protection des gamètes, via les terminaisons nerveuses. Chez la seiche, ces organes sont : le stroma ovarien, impliqué dans la maturation de l'ovocyte, l'oviducte, garant du transport de l'ovocyte, par péristaltisme, dans la cavité palléale. La glande de l'oviducte (GOVI) et les glandes nidamentaires principales (GNP) sont quant à elles responsables de la synthèse capsulaire.

Plusieurs familles de neuropeptides impliquées dans le processus de ponte ont à ce jour été identifiées chez la seiche : Les FaRPS, l'APGWa et la Sepiatocine (Henry et al., 2013, 1999; Henry and Boucaud-Camou, 1993; Henry and Zatylny, 2002; Zatylny-Gaudin et al., 2010). Ces connaissances ont été complétées par la réalisation et la publication récente de transcriptomes

différentiels de seiches mâles matures et femelles en ponte (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Ces données sont à l'origine de l'identification de nouvelles familles candidates de neuropeptides potentiellement impliquées dans la ponte. Afin d'affiner leur(s) implication(s), les auteurs ont appliqué des filtres à ces familles :

La surexpression des familles de neuropeptides dans la masse sous-œsophagienne (MSSO) des femelles en ponte par rapport aux mâles matures. Cette partie du système nerveux innerve les viscères et l'appareil reproducteur, et est en lien avec la seule aire neurohémale connue chez la seiche. En toute logique, une surexpression de neuropeptides chez la femelle dans cette zone, pourrait être en lien avec le processus de ponte. Quatorze familles ont ainsi été détectées : l'Achatine 1, l'Allatropine, le Bursicon A, les CCAPs, le FFamide, l'orcokinine B, le GGNamide, les NPY 1, 2, 3, 4 ,et 5, le PXXXamide et les small cardioactive peptides (SCP) (Tableau 1).

La détection, en spectrométrie de masse, des neuropeptides matures dans les terminaisons nerveuses des glandes annexes. Plusieurs familles ont été détectées dans ces terminaisons nerveuses : les CCAPs, les FaRPs, LFRFamide, les FLGamide, les SCP, la Myomoduline, les peptides neurotransmetteurs de type PTS, et les Allatostatines 1 et 2 (Tableau 1).

Les deux critères ne sont pas forcément nécessaires pour qu'une famille de neuropeptides soit impliquée dans la ponte, mais ils permettent d'affiner la recherche. Par exemple, le précurseur du FMRFamide n'est pas surexprimé dans la MSSO des femelles matures, mais les neuropeptides ont été détectés en spectrométrie de masse dans la GOVI et dans les GNP (Zatylny-Gaudin et al., 2016), et leur implication a été démontrée par des tests fonctionnels sur l'oviducte et les GNP (Henry et al., 1999).

Deux familles de neuropeptides répondent à ces deux critères : la famille des CCAPs, et celle des SCP. Dans la présente étude, c'est la famille des CCAPs qui a été retenue pour être caractérisée.

Le premier Crustacean Cardioactive Peptide (CCAP) a été identifié chez le crabe vert *Carcinus maenas* (Stangier et al., 1987). C'est un nonapeptide (PFCNAFTGCamide) issu d'un précurseur unique (Chung et al., 2006), possédant un pont disulfure et une amidation C-terminale. Comme son nom l'indique, ce neuropeptide provoque une augmentation du rythme cardiaque.

Tableau 1 : Familles de neuropeptides candidates à l'implication dans le processus de ponte. D'après Zatylny-Gaudin *et al.* (2016).

Famille de neuropeptides	Surexpression chez la femelle en ponte vs mâle mature	Détection en spectrométrie de masse des neuropeptides dans les terminaisons nerveuses du tractus génital femelle		
		Stroma ovarien	Glande de l'oviducte	Glandes nidamentaires principales
Achatine 1	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
Allatostatine 2	Non Surexprimée	Non détectés	Détectés	Non détectés
Allatostatine 3	Non Surexprimée	Non détectés	Détectés	Détectés
Allatropine	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
Bursicon A	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
CCAP	Surexprimée	Non détectés	Détectés	Détectés
FaRP	Non Surexprimée	Non détectés	Détectés	Détectés
FFamide	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
FLGamide	Non Surexprimée	Détectés	Détectés	Détectés
GGNamide	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
LFRFamid	Non Surexprimée	Non détectés	Détectés	Non détectés
NPY1	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
NPY2	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
NPY3	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
NPY4	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
NPY5	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
Myomoduline	Non Surexprimée	Non détectés	Détectés	Détectés
Orcokinine B	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
PTS-Like peptides	Non Surexprimée	Non détectés	Détectés	Non détectés
PXXXamide	Surexprimée	Non détectés	Non détectés	Non détectés
SCP	Surexprimée	Non détectés	Détectés	Non détectés

La séquence de ce neuropeptide est très conservée chez les Arthropodes. La séquence du CCAP est identique chez les autres Crustacés tels que le homard *Homarus americanus* (Christie et al., 2017), ou le krill *Euphausia crystallorophias* (Toullec et al., 2013), mais également chez les Insectes telle que la drosophile *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000), et le sphinx du tabac *Manduca sexta* (Loi et al., 2001). Chez les Mollusques les neuropeptides sont plus hétérogènes.

Les CCAPs sont décrits pour la première fois chez *Helix pomatia* (Minakata et al., 1992; Muneoka et al., 1994) avec deux neuropeptides appelés M-CCAPs pour Molluscan CCAPs : M-CCAP1 (PFCNSYGCYNSamide) et M-CCAP2 (LFCNGYGGCQNLamide). Ces deux neuropeptides sont impliqués dans le comportement alimentaire chez *Lymnaea stagnalis* (Vehovszky et al., 2005). Chez *Lottia gigantea*, un précurseur dont le clivage aboutit à la libération de 3 neuropeptides a été identifié (Veenstra, 2010) mais aucune fonction n'est encore décrite chez cette espèce.

Chez les huitres *Saccostrea glomerata* et *Crassostrea gigas*, trois neuropeptides ont été identifiés. L'un, VFCNGFFGCSNamide, est commun aux deux espèces alors que les deux autres, LFCNFGGCFNamide chez *S. glomerata* et LFCNFGGCFGamide chez *C. gigas*, ne diffèrent que par l'acide aminé N-terminal. Chez *S. glomerata*, les CCAPs, associés au LFRFamide, augmentent de façon significative le nombre de femelles en ponte (In et al., 2016).

Chez les Céphalopodes autres que la seiche *S. officinalis*, un unique précurseur, partiel, a été identifié chez *Idiosepius paradoxus* (DB919014), lequel permet de prédire deux neuropeptides non amidés : VFCNSYGGCKSF et VFCNSFGGCRSL. L'un de ces peptides est par ailleurs totalement identique au SoCCAP 2 de *S. officinalis*, VFCNSYGGCKSF, le second ne diffère que par les trois derniers acides aminés. Chez *Loligo pealeii*, un précurseur codant pour trois neuropeptides identiques à ceux retrouvés chez *S. officinalis* a été identifié dans la banque de transcrit du lobe optique (<http://ivory.idyll.org/blog/2014-loligo-transcriptome-data.html>).

Plus récemment, chez *Deroceras reticulatum*, deux précurseurs de CCAPs ont été identifiés (Ahn et al., 2017). Chaque précurseur permet de prédire trois neuropeptides et l'un d'entre eux, PFCNSYGCYNSamide, est commun aux deux précurseurs. Chaque précurseur libère également un CCAP amidé, et un non amidé. Les CCAPs ne sont pas toujours amidés, que ce soit chez les Céphalopodes, et la seiche en particulier, ou chez certains Gastéropodes. Bien qu'initialement identifié sur la base de son activité cardioexcitatrice, le CCAP des Arthropodes joue également un rôle dans d'autres processus physiologiques, telle que la nutrition : chez

Periplaneta americana il stimule la contraction de l'intestin et l'activité de l' α -amylase (Sakai et al., 2004). Chez *Schistocera americana*, le CCAP est impliqué dans la locomotion : il augmente le rythme musculaire des pattes postérieures (Lehman et al., 1993). La régulation de la ponte est également sous le contrôle du CCAP : chez le criquet migrateur *L. migratoria*, le neuropeptide est impliqué dans l'émission des gamètes en modulant les contractions de l'oviducte (Donini et al., 2001) et de la spermathèque (da Silva and Lange, 2006). Chez les Mollusques, les CCAPs ont également un rôle à jouer dans le contrôle de la ponte. Ainsi, chez l'huitre de Sydney *S. glomerata*, les CCAPs augmentent significativement le nombre de femelles en ponte, en association avec le LFRFamide (In et al., 2016).

Chez la seiche le précurseur des CCAPs, identifié à partir du neuropeptidome récemment identifié, code pour une copie de trois neuropeptides (Figure 23 A). Ces peptides sont nommés *SoCCAPs* (pour *Sepia officinalis* CCAPs) et sont numérotés selon leur ordre d'apparition sur le précurseur : *SoCCAP1* (VFCNSFGGCTNI), *SoCCAP2* (VFCNSYGGCKSF) et *SoCCAP3* (VFCNSFGGCQN). Contrairement aux CCAPs identifiés chez la plupart des espèces, les *SoCCAPs* ne sont pas amidés, mais conservent leur pont disulfure intra-chaine. La prédiction de ces neuropeptides a été confirmée par leur localisation, en spectrométrie de masse, dans les masses supra- et sous-œsophagiennes et dans les lobes optiques de femelles en ponte. Les trois neuropeptides ont été détectés dans la GOVI, et les peptides *SoCCAP1* et *SoCCAP2* ont été détectés dans les GNP. Dans la MSSO, le précurseur des *SoCCAPs* est largement surexprimé chez les femelles en ponte par rapport aux mâles matures (Figure 23 B), une telle surexpression chez la femelle (environ 65 fois supérieure) dans la partie du système nerveux innervant l'appareil génital laisse peu de doute quant à son implication dans le processus de ponte.

Les FLGamides constituent la seconde famille de neuropeptides retenue pour cette étude. Il s'agit d'une nouvelle famille de neuropeptides, encore jamais décrite dans le règne animal mais qui présente toutefois des homologies de séquences avec plusieurs autres familles de neuropeptides. Contrairement à d'autres familles de neuropeptides, elle n'est pas surexprimée chez les femelles au moment de la ponte, mais c'est la seule dont les neuropeptides sont détectés en spectrométrie de masse dans le stroma ovarien. Jusqu'à présent, aucun régulateur d'origine nerveuse n'avait été détecté dans cet organe, responsable de la maturation et de la libération des ovocytes dans le cœlome génital. De plus, les neuropeptides de cette famille ont été détectés dans d'autres structures de l'appareil génital comme la GOVI et les GNP. Enfin les FLGamides sont présents dans l'hémolymphe, ce qui démontre qu'il s'agit de neurohormones. Cette

localisation tissulaire associée à leur présence dans l'hémolymphe est à l'origine de leur sélection pour une étude approfondie de leur rôle suspecté dans la régulation de la ponte.

A

MQSVSSSLSTGLFFLTVNVLCVSTLIRVTSSQPQENTFQMKPSESDIILNMKIRHLIRRAVQRQPTANDFSNEELASL
 PDKRVFCNSFGGCINI~~KRL~~FDEENDFKLVASDSIQPMEQETAID~~KRV~~FCNSYGGCKSF~~KRV~~SANDI~~KK~~PEMIKNKQR
 HLI~~RR~~LKLQPIKIS~~RR~~VFCNSFGGCQN*

B

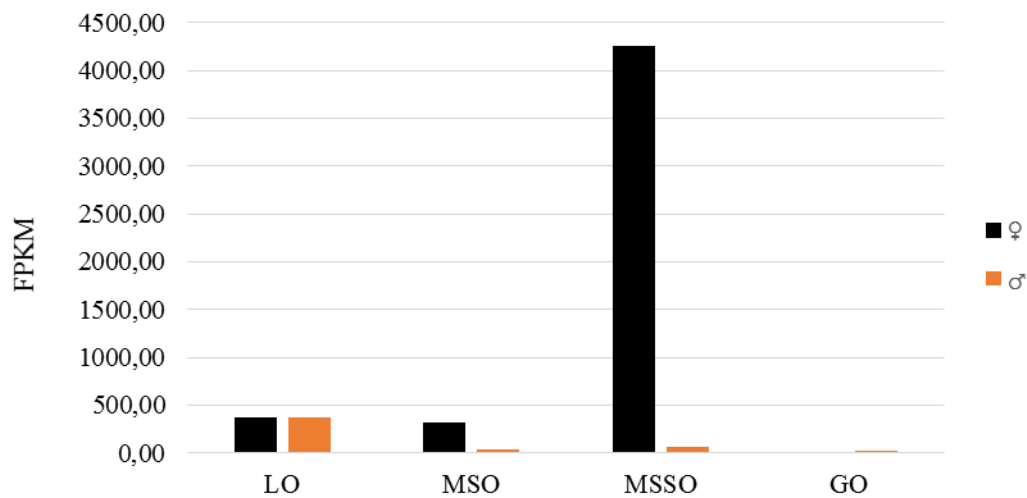


Figure 23 : Les SoCCAPs chez *Sepia officinalis*. (A) : Précurseur des SoCCAPs. Séquence signalée en jaune, sites de clivage dibasiques en rouge et cystéines soulignées. Les trois SoCCAPs prédits sont en gras. (B) : Profil d'expression du précurseur des SoCCAPs dans le système nerveux des femelles en ponte *versus* mâles matures. Dans la masse sous-œsophagienne, le facteur de surexpression est de 65 en faveur des femelles. Les niveaux d'expression sont exprimés en FPKM.

Deux précurseurs similaires ont été identifiés à partir d'une banque de transcrits nouvellement assemblée (Figure 24 A). Ces précurseurs codent pour six neuropeptides différents. Chacun de ces neuropeptides est présent en une seule copie, à l'exception du peptide FLGa 3 qui est présent en 7 copies sur le précurseur FLGa A et 8 pour le FLGa B. Les neuropeptides FLGa 1 (GAESGEAHVFDSLGGGHVPYY) et FLGa 2 (VFDTLGGGHVPYY) ont la particularité de posséder une extrémité C-terminale identique et non amidée. Les neuropeptides FLGa 3 (SFDSLGGGAFLGamide), FLGa 4 (SFDSLGGGSFLGamide) et FLGa 5 (TFDSLGGGSFLGamide) possèdent une séquence C-terminale commune. Enfin, FLGa 6 (GFDSLGGGSFIGV) voit sa glycine C-terminale substituée par une valine, de ce fait il perd l'amidation présente sur les trois précédents FLGamides. Les FLGamides sont actuellement classés en deux catégories en fonction de leur extrémité C-terminale : les PYY (FLGa 1 et 2) et

les FLGamide (FLGa 3, 4, 5 et 6). À noter que le FLGa 6, bien que non amidé est inclus dans les FLGamides. L'alignement des séquences permet de mettre en évidence la conservation d'un motif interne, FDSLGGG qui se décline en FDTLGGG pour le neuropeptide FLGa 2 (Figure 24 B).

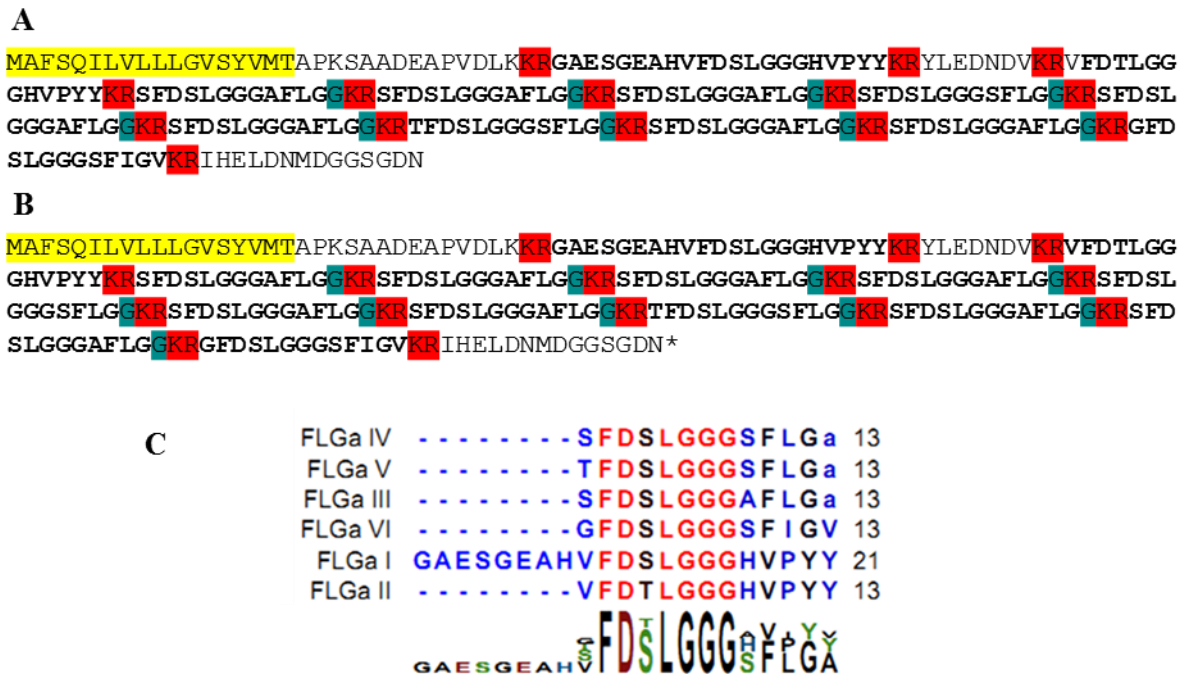


Figure 24 : FLGamide : précurseurs et neuropeptides (A et B) : Précurseurs des FLGamides. Séquence signal en jaune, neuropeptide en gras et amidation en C-terminale en vert. (C) : Alignement des séquences des neuropeptides prédits. Un motif FD(S/T)LGGG apparaît comme très conservé.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est la caractérisation des deux familles de neuropeptides, CCAPs et FLGamides.

Le premier volet est la caractérisation fonctionnelle par un bio-essai *ex vivo*. Ce test mené sur le tractus génital des femelles doit pouvoir permettre d'indiquer sur quel organe agissent les neuropeptides. Par exemple, une modification de l'activité de l'oviducte prédit une implication dans le transport de l'ovocyte.

Le second volet a pour objectif de réaliser la localisation tissulaire des neuropeptides pour compléter et affiner les travaux de de Zatylny-Gaudin *et al.* (2016) réalisés en spectrométrie de masse. Une cartographie tissulaire sera réalisée par la mise en œuvre de techniques immunocytochimiques. Il s'agit notamment de localiser finement les sites d'expression au niveau cellulaire dans le SNC et les fibres nerveuses dans les organes cibles.

Le troisième volet est ciblé sur la caractérisation structurale par des techniques de Dichroïsme Circulaire (DC) et de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a pour finalité de déterminer la structure tridimensionnelle des neuropeptides ainsi que leur comportement en environnement membranaire. Leur structuration sera donc étudiée dans l'eau et dans un milieu contenant des micelles de SDS pour mimer la présence de membranes biologiques et donc simuler les conditions rencontrées par le neuropeptide à proximité du récepteur.

Enfin, la recherche de récepteurs spécifiques sera réalisée à partir des banques de données transcriptomiques.

II. Crustacean Cardioactive Peptides



Crustacean cardioactive peptides: expression, localization, structure, and a possible involvement in regulation of egg-laying in the cuttlefish *Sepia officinalis*

Maxime Endress^a, Céline Zatylny-Gaudin^a, Erwan Corre^b, Gildas Le Corguillé^b, Louis Benoist^a, Jérôme Leprince^c, Benjamin Lefranc^c, Benoît Bernay^e, Alexandre Leduc^a, Jimmy Rangama^f, Anne-Gaëlle Lafont^d, Arnaud Bondon^d, Joël Henry^{a, e}

^a Normandy University, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), F-14032 Caen, France

^b UPMC, CNRS, FR2424, ABiMS, Station Biologique, F-29680 Roscoff, France

^c Normandy University, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, F-76000 Rouen, France

^d Equipe CORINT, UMR CNRS 6226, PRISM, CS 34317, Campus de Villejean, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France

^e Normandy University, Post Genomic Platform PROTEOGEN, SF ICORE 4206, F-14032 Caen, France

^f Normandy University, CIMAP, UMP 6252 (CEA/CNRS/ENSICAEN/Normandy University), Caen, France

Abstract

The cuttlefish (*Sepia officinalis*) is a cephalopod mollusk distributed on the western European coast, in the West African Ocean and in the Mediterranean Sea. On the Normandy coast (France), cuttlefish is a target species of professional fishermen, so its reproduction strategy is of particular interest in the context of stock management. Egg-laying, which is coastal, is controlled by several types of regulators among which neuropeptides. The cuttlefish neuropeptidome was recently identified by Zatylny-Gaudin et al. (2016). Among the 38 neuropeptide families identified, some were significantly overexpressed in egg-laying females as compared to mature males.

This study is focused on crustacean cardioactive peptides (CCAPs), a highly expressed neuropeptide family strongly suspected of being involved in the control of egg-laying. We investigated the functional and structural characterization and tissue mapping of CCAPs, as well as the expression patterns of their receptors. CCAPs appeared to be involved in oocyte transport through the oviduct and in mechanical secretion of capsular products. Immunocytochemistry revealed that the neuropeptides were localized throughout the central nervous system (CNS) and in the nerve endings of the glands involved in egg-capsule synthesis and secretion, i.e. the oviduct gland and the main nidamental glands. The CCAP receptor was expressed in these glands and in the subesophageal mass of the CNS. Multiple sequence alignments revealed a high level of conservation of CCAP protein precursors in *Sepia officinalis* and *Loligo pealei*, two cephalopod decapods. Primary sequences of CCAPs from the two species were fully conserved, and cryptic peptides detected in the nerve endings were also partially conserved, suggesting biological activity that remains unknown for the time being.

Keywords: neuropeptides, CCAPs, egg-laying, NMR, *Sepia officinalis*, Cephalopod

Abbreviations: ACN: acetonitrile; CCAPs: crustacean cardioactive peptides; CHCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CNS: central nervous system; DTT: dithiothreitol; ELH: egg-laying hormone; FPKM: fragments per kilobase of exon per million fragments mapped; MNG: main nidamental gland; NMR: nuclear magnetic resonance; OvG: oviduct gland; OL: optic lobe; SoCCAPs: *Sepia officinalis* CCAPs; SCP: Small cardioactive peptide; SubEM: subesophageal mass; SupEM: supraesophageal mass; TFA: trifluoroacetic acid.

1. Introduction

In the cuttlefish *Sepia officinalis*, spawning begins with the release of mature oocytes into the genital coeloma, followed by their retention until mating. This blockage prevents oocyte emission if the female cuttlefish has not been fertilized. Mating triggers peristaltic contractions of the oviduct that restart oocyte transport through the genital tract. A first inner layer of the capsule is secreted by the oviduct gland (OvG), which is closely associated with the distal oviduct. The partially encapsulated oocyte is released into the mantle cavity where the outer capsule is secreted by the main nidamental glands (MNGs). This second capsule is made of egg-capsule proteins (Cornet et al., 2015b) which make up a network with polysaccharides, bacteria, and melanin from the ink bag. The encapsulated oocyte quits the mantle cavity through the siphon, probably carried by the gill-current associated with siphon contractions, and remains approximately 3 minutes in a cavity formed by the arms and the buccal mass. At this stage, fertilization takes place with the spermatozoa stored by the female since mating. The eggs are finally laid on a supporting material near the bottom, e.g. seaweeds, to form the egg mass. The successive ovulation, oocyte transport, encapsulation and fertilization steps are orchestrated by neuropeptides (Henry et al., 2013, 1999, 1997), ovarian regulatory peptides (Bernay et al., 2006b, 2005, 2004, Zatylny et al., 2000b, 2000c), and sex pheromones (Enault et al., 2012).

Although neuropeptides are not the only regulators involved in regulation of egg-laying mechanisms, they nevertheless play an important role in integrating environmental parameters such as the photoperiod, temperature, salinity or depth. Expressed and released by neurons, they make up a highly diversified category by their structure, their mode of action, and the physiological functions they regulate.

In cuttlefish, neuropeptides like APGWamide (Henry et al., 1997), FMRFamide (Henry et al., 1999) and sepiatocin (Henry et al., 2013) play a role in oocyte transport and capsular secretion. In other mollusks such as the Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*), several neuropeptides induce egg laying in sexually mature individuals: egg-laying hormone (ELH), GnRH, APGWamide, buccalin, CCAPs (crustacean cardioactive peptides), and LFRFamide (In et al., 2016). In gastropods, ELH appears to be pivotal in egg-laying regulation, particularly in hermaphrodite snails such as *Aplysia* (Arch, 1972; Chiu et al., 1979; Chiu and Strumwasser, 1981) and *Lymnaea* (Ebberink et al., 1985; Geraerts et al., 1983; Vreugdenhil et al., 1985), whereas in gonochoric gastropods many neuropeptides also appear to be involved in addition to ELH. In the abalone *Haliotis*

asinina, several genes encoding APGWamide, myomodulin, proctolin-like, FMRFamide, schistosomin-like, insulin and a halotid growth-associated peptide are differentially expressed during the two-week spawning cycle in both male and female abalone (York et al., 2012).

A recent study in cuttlefish (*S. officinalis*) identified the neuropeptidome as composed of at least 38 distinct families (Zatylny-Gaudin et al., 2016). On the basis of expression patterns and tissue localization, several neuropeptide families were strongly suspected to be involved in the control of the successive steps that lead to the formation and release of encapsulated eggs: APGWamide, CCAPs, clionin, FLGamide, PTSP-like peptides, SCP (small cardioactive peptide), insulin, myomodulin, sepiatocin and SPamide.

The present study is focused on SoCCAPs (for *Sepia officinalis* CCAPs), which are highly overexpressed in egg-laying females *versus* mature males and are detected by mass spectrometry in the nerve endings of mature female OvG.

The first CCAP was initially identified in *Carcinus maenas* on the basis of its cardioresponsive activity (Stangier et al., 1987). Later, the same peptide was found to modulate oviduct activity in *Locusta migratoria* (Donini et al., 2001) and therefore thought to be involved in egg emission. Furthermore, this neuropeptide is also involved in fertilization in *L. migratoria* since it increases the basal tonus and the frequency of spontaneous spermatheca contractions (da Silva and Lange, 2006).

In *C. maenas*, the CCAP protein precursor (Figure 1A) encodes one copy of a single neuropeptide: PFCNAFTGCamide (Chung et al., 2006), also found in many arthropods such as *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000), *Manduca sexta* (Loi et al., 2001), *Periplaneta americana* (Honegger et al., 2002), *Euphausia crystallorophias* (Toullec et al., 2013), *Homarus americanus* (Christie et al., 2017), and *Chorismus antarcticus* (Toullec et al., 2017). From a structural point of view, analysis of the *S. officinalis* precursor predicted the release of 3 neuropeptides with very similar sequences, subsequently characterized by mass spectrometry (Zatylny-Gaudin et al., 2016). A special feature of these neuropeptides lies in the fact that although they are not amidated at their C-terminal end they keep the characteristic disulfide bond, in contrast to CCAPs from arthropods and bivalves (In et al., 2016). We named these neuropeptides based on the order of their occurrence in the precursor: SoCCAP1 (VFCNSFGGCTNI), SoCCAP2 (VFCNSYGGCKSF), and SoCCAP3 (VFCNSFGGCQN). The neuropeptidome of the

gastropod *Deroceras reticulatum* recently revealed 2 precursors able to release 3 CCAPs each, including one non-amidated peptide (Ahn et al., 2017). In other gastropods like *Lottia gigantea* (Veenstra, 2010) or *Aplysia californica* (XP_005103388.1), 3 amidated CCAPs are predicted to be generated from their precursor (Figure 1B). In addition, as observed in arthropods, the primary sequence of molluscan CCAPs is well conserved (Figure 1B), suggesting a major physiological role. In arthropods, a phylum with abundant physiological data, the involvement of CCAPs is well described in many main regulation pathways controlling the heart rate, ecdysis behavior, or oviduct contraction in insects such as *Manduca sexta* (Lehman et al., 1993), *Tenebrio molitor* (Furuya

et al., 1993), *D. melanogaster* (Baker et al., 1999; Dulcis et al., 2005; Dulcis and Levine, 2003), *L. migratoria* (Donini et al., 2001), *Anopheles gambiae* (Estévez-Lao et al., 2013), or in crustaceans such as *C. maenas* (Stangier et al., 1987) and *Cancer magister* (McGaw et al., 1995).

The aim of the present study was to demonstrate the involvement of SoCCAPs in the regulation mechanisms of egg-laying in cuttlefish (*S. officinalis*). In this perspective, we investigated tissue expression of SoCCAPs and their putative receptor. The neuropeptides were localized by immunostaining using specific polyclonal antibodies, and characterized by mass spectrometry. The capacity of



Fig. 1 : (A): Sequence alignment of CCAP protein precursors of (Ac) *Aplysia californica* (LOC101863916), (Dr) *Deroceras reticulatum* (ARS01357.1) (ARS01358.1), (So) *Sepia officinalis*, (Cg) *Crassostrea gigas* (XP_011446187.2), and (Cm) *Carcinus maenas* (ABB46291.1). Signal peptides are highlighted in yellow, and predicted neuropeptides in red. (B): Sequence alignment of CCAPs from *Sepia officinalis*, *Deroceras reticulatum*, *Aplysia californica*, *Carcinus maenas*, and *Crassostrea gigas*. C-terminal amidations are indicated by the letter a.

SoCCAPs to adopt a defined structure in a membrane mimicking their environment was evaluated by nuclear magnetic resonance (NMR). Biological activity was assessed by a myotropic bioassay performed on the ovarian stroma (oocyte release into the genital coelom), the distal oviduct (oocyte release into the mantle cavity and internal egg capsule secretion), and the MNGs outer egg-capsule secretion). Finally, expression of the receptor was studied in the different tissues by an *in silico* approach from the transcriptomes produced by Zatylny-Gaudin et al. (2016).

2. Materials and methods

2.1 Animal and tissue collection

All mature cuttlefish were trapped in the Bay of Seine between April and June 2015, 2016 and 2017. They were maintained in 1,000-liter outflow tanks at $15 \pm 1^\circ\text{C}$ at the Marine Station of Luc-sur-Mer (University of Caen-Normandy, France) under a natural photoperiod. Organs were dissected on animals anesthetized with 3% ethanol according to (Gonçalves et al., 2012), and then immediately frozen in liquid nitrogen or stored in artificial seawater (Reef crystal®) containing 1 mM glucose and maintained at 18°C , or fixed in Davidson solution. All applicable guidelines for care and use of animals were followed. Procedures were approved by the regional ethical committee (Comité d’Ethique Normandie en Matière d’Expérimentation Animale, CENOMEXA; agreement number 54).

2.2 Expression data

Transcriptome sequencing, assembly and annotation are described in Zatylny-Gaudin et al. (2016). Expression was quantified using fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) values from the 16 tissue-specific transcriptomes. The FPKM values of a given transcript from several tissues were compared to establish an expression pattern. In this case, FPKM values represented the pooled expression of five animals used to determine each transcriptome.

2.3 Sequence alignment and comparison

Multiple sequence alignments of CCAPs, CCAP precursors and putative CCAP G-protein-coupled receptors from mollusks and arthropods were performed using CLC Main Workbench 6.7.1 and SIM - Alignment Tool for protein sequences (Expasy). Transmembrane domains of cephalopod GPCRs were predicted with the web tools HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>), TMHMM version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) and I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), and finally aligned with the CCAP GPCR of *Apis*

mellifera for which transmembrane domains were predicted by multiple sequence alignments (Garcia et al., 2015).

2.4 Tissue mapping by mass spectrometry

2.4.1 Peptide extraction

Each tissue extraction was performed from 3 animals. Tissues were crushed in liquid nitrogen and extracted for 30 minutes in the extraction buffer containing cold methanol/water/acetic acid (90/9/1) adjusted to 50 mM dithiothreitol (DTT). One gram of tissue was used for 10 mL of extraction buffer. The extract was centrifuged 20 min at 20,000xg at 4°C , and then the supernatant was evaporated in a speed vac. Dry pellets were resuspended in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), concentrated on C18 Sep-Pak cartridges (360 mg, Waters) and eluted with 80% acetonitrile (ACN) in water adjusted to 0.1% TFA.

2.4.2 NanoLC-MALDI-TOF/TOF analysis

2.4.2.1 Sample preparation for mass spectrometry analysis

Concentrated and desalted pellets were reduced with 100 mM DTT at 55°C for 60 min, alkylated with 50 mM iodoacetamide at 55°C for 45 min, and then re-concentrated and desalted on C18 OMIX-tips (10 μL , AGILENT). The chromatography step was performed on a nano-LC system (Prominence, Shimadzu). Peptides were concentrated on a Zorbax 5x0.3mm C18 precolumn (Agilent), and separated on a Zorbax 150x75 μm C18 column (Agilent). Mobile phases consisted of 0.1% TFA in 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% TFA in 99.9% ACN (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 nL/min, and the gradient profile was as follows: constant 2% B for 5 min, from 2 to 5% B in 1 min, from 5 to 32% B in 144 min, from 32 to 70% B in 10 min, from 70 to 90% B in 5 min, and back to 2% B in 10 min. The 300 nL/min volume of the peptide solution was mixed with 1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ volumes of solutions of 5 mg/mL of an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix prepared in a diluent solution of 50% ACN containing 0.1% TFA. Twenty-second fractions were spotted by an AccuSpot spotter (Shimadzu) on stainless steel Opti-TOF™ 384 targets.

2.4.2.2 Mass spectrometry analysis

MS experiments were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF TOF ion optics and OptiBeam™ on-axis laser irradiation with 1,000 Hz repetition rate. The system was calibrated before analysis with a mixture of des-Arg-bradykinin, angiotensin I, Glu1-fibrinopeptide B, ACTH (18-39) and ACTH (7-38), and mass precision was better than 50 ppm in reflectron mode. A laser intensity of 3400 was typically employed for

ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing 1,000 single spectra (5×200) in the 700 to 4,000 Da mass range. MS/MS spectra from the twenty most intense ions were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2,500 single spectra (10×250) with a laser intensity of 4300. For tandem MS experiments, the acceleration voltage was 1 kV, and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings.

2.4.2.3 Peptide sequencing and protein precursor identification

The fragmentation pattern based on the occurrence of y, b and a ions was used to determine peptide sequences. Database searching was performed using the Mascot 2.5.1 program (Matrix Science). A database corresponding to a homemade *S. officinalis* transcript database (including 356,644 entries) was used (BioProject PRJNA242869). The variable modifications allowed were as follows: methionine oxidation and dioxidation, C-terminal amidation, and N-terminal pyroglutamate. “No enzyme” was selected. Mass accuracy was set to 200 ppm and 0.6 Da for the MS and MS/MS modes, respectively.

2.5 Immunolocalization of CCAPs

The central nervous system (CNS), the distal end of the oviduct, the OvG and MNGs were freshly dissected from $n=3$ animals and placed in a modified Davidson’s fixative solution (30% sea filtered water, 30% ethanol 95%, 20% formalin 37%, 10% glycerol, 10% acetic acid for 24 to 48 h, at 4°C. Tissues were dehydrated in several baths containing increasing ethanol contents. Tissues were completely dehydrated by a bath of butanol before paraffin inclusion. 5- μ m sections were deparaffined with Roti®-Histol (Carl Roth®), and incubated in H₂O₂-methanol 3% for 10 minutes at room temperature. Rehydration was performed in several baths of decreasing ethanol contents, Tris buffer (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4), and TT buffer (Tris buffer, 0.5% TritonX-100). Neutralization of non-specific sites was performed by incubation in bovine serum albumin (BSA) 3% in TT buffer. Diluted (1:500 or 1:1,000) *SoCCAP* antibodies (Rabbit, GeneCust®, directed against *SoCCAP1*) in TT buffer were applied on the sections and incubated overnight at 4°C. Conjugated anti-rabbit antibody peroxidase diluted 1:500 in TT buffer (Invitrogen™ A16029) was applied on the sections and incubated 1 hour at room temperature. Cells and nervous fibers containing immunolabelled material were visualized using diaminobenzidine (SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets) as a chromogen. Slides were finally counterstained with hematoxylin for 30 seconds. The primary antibody was preabsorbed with 20 μ g/mL of antigen as a pre-absorption control for

specificity. Alternatively, the primary antibody was omitted.

2.6 Neuropeptide synthesis

2.6.1 Chemicals and reagents

Fmoc-L-amino acid residues were purchased from Iris Biotech (Marktredwitz, Germany). Preloaded polyethylene glycol-polystyrene resins (Fmoc-Asn(Trt)-PEG-PS, Fmoc-Ile-PEG-PS and Fmoc-Phe-PEG-PS) and *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) were purchased from Life Technologies (Villebon-sur-Yvette, France). ACN, dimethylformamide (DMF) and *N*-methylpyrrolidone (NMP) were purchased from Biosolve Chimie (Dieuze, France). Diisopropylethylamine (DIEA), piperidine, anisole, TFA, thallium(III) trifluoroacetate (Tl(CF₃COO)₃) and other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.6.2 Peptide synthesis

SoCCAP1 (H-Val-Phe-Cys-Asn-Ser-Phe-Gly-Gly-Cys-Thr-Asn-Ile-OH; LV-5347), *SoCCAP2* (H-Val-Phe-Cys-Asn-Ser-Tyr-Gly-Gly-Cys-Lys-Ser-Phe-OH; LV-5348), and *SoCCAP3* (H-Val-Phe-Cys-Asn-Ser-Phe-Gly-Gly-Cys-Gln-Asn-OH; LV-5346) were synthesized (0.1 mmol scale) on Fmoc-Ile-PEG-PS, Fmoc-Phe-PEG-PS or Fmoc-Asn(Trt)-PEG-PS resins, respectively, using an Applied Biosystems model 433A automatic peptide synthesizer and the standard procedures, as previously described (Chatenet et al., 2006; Quan et al., 2015). All Fmoc-amino acids (1 mmol, 10 eq.) were coupled by *in situ* activation with HBTU (1.25 mmol, 12.5 eq.) and DIEA (2.5 mmol, 25 eq.) in NMP. Reactive side-chains were protected as follows: Cys, acetamidomethyl (Acm) thioether; Asn and Gln, trityl (Trt) amide; Ser, Thr and Tyr, tert-butyl (tBu) ether, and Lys, tert-butyloxycarbonyl (Boc) carbamate. Once chain assembly was completed, cyclization of *SoCCAPs* was performed by Tl(CF₃COO)₃ oxidation, as previously described (Chatenet et al., 2004). Peptides were deprotected and cleaved from the resin using TFA as previously described (Chatenet et al., 2006; Labarrère et al., 2003). Crude peptides were purified by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) on a Vydac 218TP1022 C₁₈ column (2.2 x 25 cm; Grace Discovery Sciences Alltech, Templemars, France) using a linear gradient (10-50% over 50 min) of ACN/TFA (99.9:0.1, v/v) at a flow rate of 10 ml/min. Peptides were analyzed by RP-HPLC on a Vydac 218TP54 C₁₈ column (0.46 x 25 cm; Grace Discovery Sciences Alltech) using a linear gradient (10-60% over 25 min) of ACN/TFA (99.9:0.1, v/v) at a flow rate of 1 ml/min. The purity of all peptides was higher than 99.9%. The peptides were characterized by MALDI-TOF mass spectrometry on a Voyager DE-

PRO (AB Sciex, Les Ulis, France) in the reflector mode, with CHCA as a matrix.

2.7 NMR and structure determination

2.7.1 NMR measurements

The nuclear magnetic resonance (NMR) samples containing 1-3 mM of peptides *SoCCAP1*, *SoCCAP2* and *SoCCAP3* were dissolved in water or in the presence of SDS micelles (150-200 mM) in a 5.1 - 5.7 pH range. All spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5-mm TCI cryoprobe (^1H , ^{13}C , ^{15}N). Homonuclear 2-D spectra DQF-COSY, TOCSY and ROESY or NOESY were typically recorded using standard Bruker sequences in the phase-sensitive mode using the States-TPPI method. NOESY or ROESY spectra were acquired with 8 scans, 8 spectra were summed, leading to less t1 noise as recently reported (Mo et al., 2017). Typical spectra were acquired using matrices of 4,096 x 320-600 zero filled in F1 to 2K x 1K after apodization with shifted sine-square multiplication in both domains. Spectra were processed with Topspin software (Bruker) and analyzed with NMRview (Johnson, 2004).

2.7.2 Structure calculations

^1H chemical shifts were assigned according to the classical sequential assignment procedure. NOE cross-peaks were integrated and assigned in the NMRView software program (Johnson, 2004). The NOE peak volumes between methylene pair protons were used as 1.8-Å references. The lower bound for all restraints was fixed at 1.8 Å, and upper bounds at 2.7, 3.3 and 5.0 Å for strong, medium and weak correlations, respectively. Structure calculations were performed with AMBER 17 (Case et al., 2005) in two stages: cooking and simulated annealing in explicit solvent. The cooking stage was performed at 1,000 K to generate 100 initial random structures. Simulated annealing calculations were carried out during 20 ps (20,000 steps, 1 fs long). First, the temperature was risen quickly and was maintained at 1,000 K for the first 5,000 steps, then the system was cooled gradually from 1,000 K to 100 K from step 5,001 to 18,000, and finally the temperature was brought to 0 K during the 2,000 remaining steps. For the first 3,000 steps, the force constant of the distance restraints was increased gradually from 2.0 kcal.mol⁻¹.Å to 20 kcal.mol⁻¹.Å. For the rest of the simulation (step 3,001 to 20,000), the force constant was kept at 20 kcal.mol⁻¹.Å. The 15 lowest energy structures with no violations > 0.3 Å were considered as representative of the compound structure. Representation and quantitative analysis were carried out using MOLMOL (Koradi et al., 1996) or YASARA (Krieger et al., 2002).

2.8 Myotropic bioassay

The myotropic bioassay was performed using different contractile organs involved in egg-laying: MNGs, distal oviduct, proximal oviduct and ovarian stroma. Each organ was suspended on a dynamometer (Dynamometer UF1, Pioden controls LTD) in a muscle chamber, with a nylon thread (0.12-mm diameter). The signal was amplified by an amplifier (SGA 920201-01, Bionic instrument) and contractions were displayed on a printer (L200E, Linseis) or with Seriaduinoplotter_1.1. This second imaging method is a homemade digital voltmeter based on Arduino technology (<https://www.arduino.cc>) coupled to the Qt application programming interface (<https://www.qt.io>). The muscle chamber was perfused at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ with perfusion solution and maintained at 18 °C. Increasing concentrations of synthetic peptides 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.

3. Results

3.1 Expression patterns of *SoCCAPs* and *SoCCAP* GPCR

Expression patterns revealed that *SoCCAP* transcripts were expressed in the three main parts of the CNS: the optic lobes (OL), the supraesophageal mass (SupEM), and the subesophageal mass (SubEM) (Figure 2A). High levels of overexpression were observed in the SubEM, which is the part of the CNS that innervates viscera and the genital apparatus; it is connected to the only neurohemal area described in cuttlefish so far.

Expression of the *SoCCAP* receptor identified from the annotated *S. officinalis* transcriptome was mainly restricted to the MNGs and OvG, the accessory sex glands involved in egg-capsule secretion. A very low expression level was also observed in the CNS, the posterior salivary glands, and the ovary (Figure 2B).

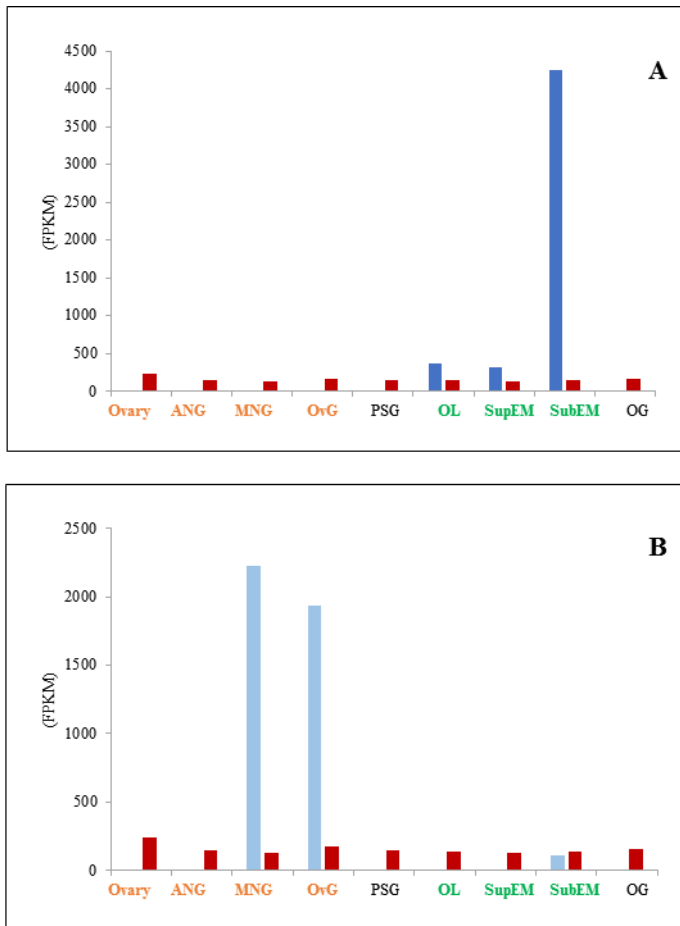


Fig. 2 Tissue expression patterns: dark blue bars for SoCCAPs (A), light blue bars for SoCCAP GPCR (B) in egg-laying females (expressed in FPKM). Red bars for elongation protein 3 as a reference gene. ANG: Accessory nidamental gland; MNGs: Main nidamental glands; OvG: Oviduct gland; PSG: Posterior salivary gland; OL: Optic lobe; SupEM: Supraesophageal Mass; SubEM: Subesophageal Mass; OG: Optic gland. Organs belonging to the genital apparatus are in bold orange; the CNS is in bold green.

3.2 Transmembrane domains of CCAP GPCRs

Sequence alignment of *S. officinalis*, *Loligo pealei*, *Octopus bimaculoides* and *Apis mellifera* GPCRs allowed us to predict transmembrane domains using HMMTOP, TMHMM and I-TASSER, according to Garcia et al. (2015) (Figure 3). The two *L. pealei* Lp1 and Lp2 isoforms showed a high level of conservation with the GPCR identified in *S. officinalis*. The seven transmembrane domains were quite similarly organized in these two cephalopod decapod species, and so were amino acid sequences. For *O. bimaculoides* GPCR, only four or five transmembrane domains (depending of the web tools) were predicted. Sequence alignment revealed that the N-terminal sequence was truncated: it lacked the first

and second predicted transmembrane domains, as well as a part of the third one.

3.3 Immunocytochemistry

The specificity of affinity purified polyclonal antibodies raised against SoCCAP1 was improved by using antibodies preabsorbed with antigen (not shown) or by omitting primary antibodies (Figures 4B-4D).

In the genital tract of egg-laying females (figure 4), immunostained nerve endings were observed in OvG blades and at the level of the distal end of the gland. Intense staining was also observed in the distal end surrounding the distal oviduct (Figure 4A-B). This particular staining did not correspond to cell bodies, so it probably enhanced large fiber bundles. In addition, similar immunostaining was observed in the distal end of the MNGs associated to the secretory duct (Figure 4C-D). Investigations at the level of the ovarian stroma did not reveal any immunostaining.

Tissue mapping was performed in the CNS (Figure 5A) and the genital tract of egg-laying females. Neurons and nerve fibers were stained in the posterior part of the paleovisceral lobe of the SubEM (Figure 5B). Immunostained neurons were observed in the median and anterior basal lobes of the SupEM (Figure 5C and 5D). Immunostained neurons and nerve fibers were also observed in the medulla of the OL.

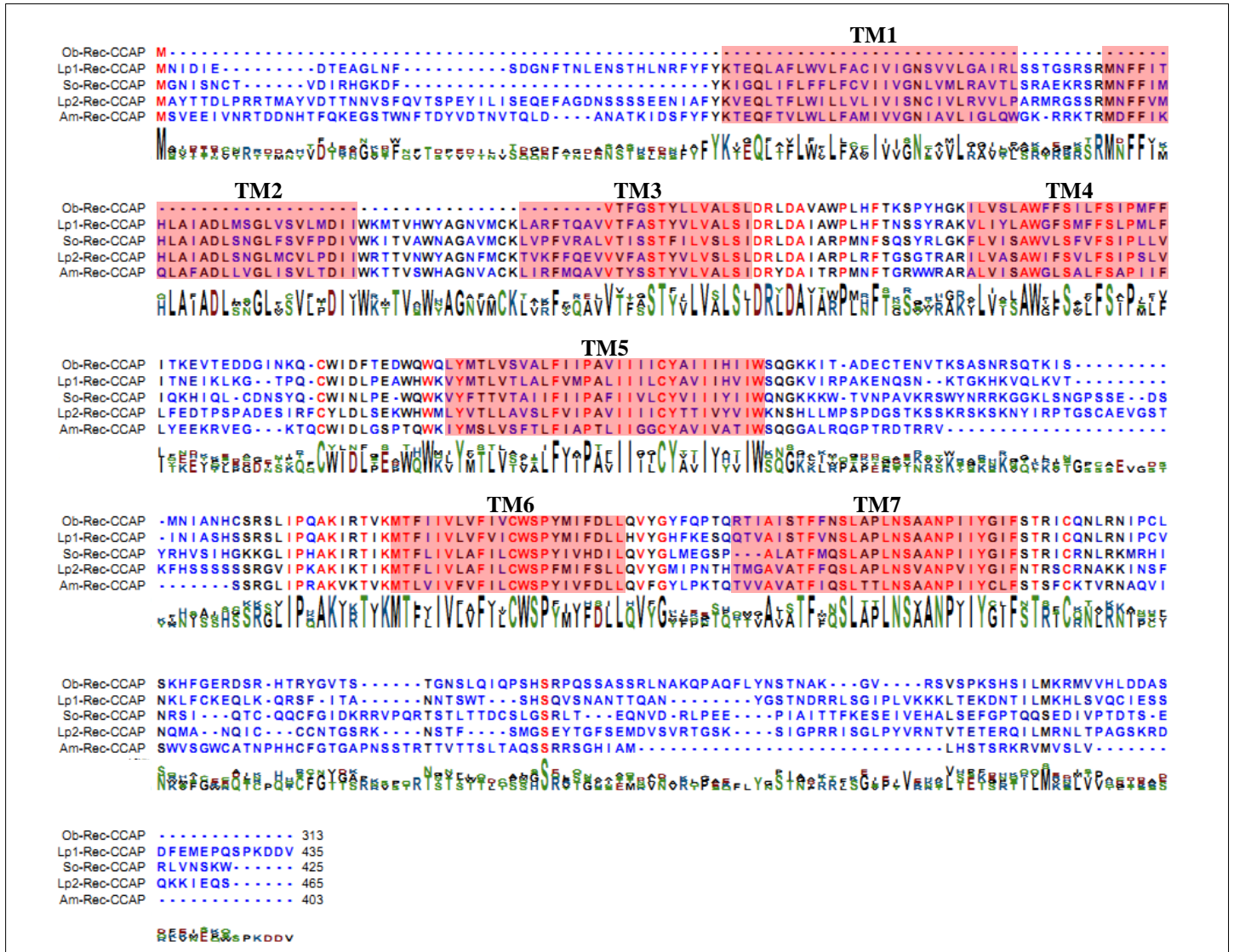


Fig. 3: Multiple sequence alignment of the cuttlefish CCAPreceptor sequence with the receptor sequences of *Octopus bimaculoïdes* (XP_014778737.1) (Ob), *Loligo pealeii* (Lp)(<http://ivory.idyll.org/blog/2014-loligo-transcriptome-data.html>), and *Apis mellifera* (XP_001122652.2) (Am). Transmembrane domains are highlighted in red.

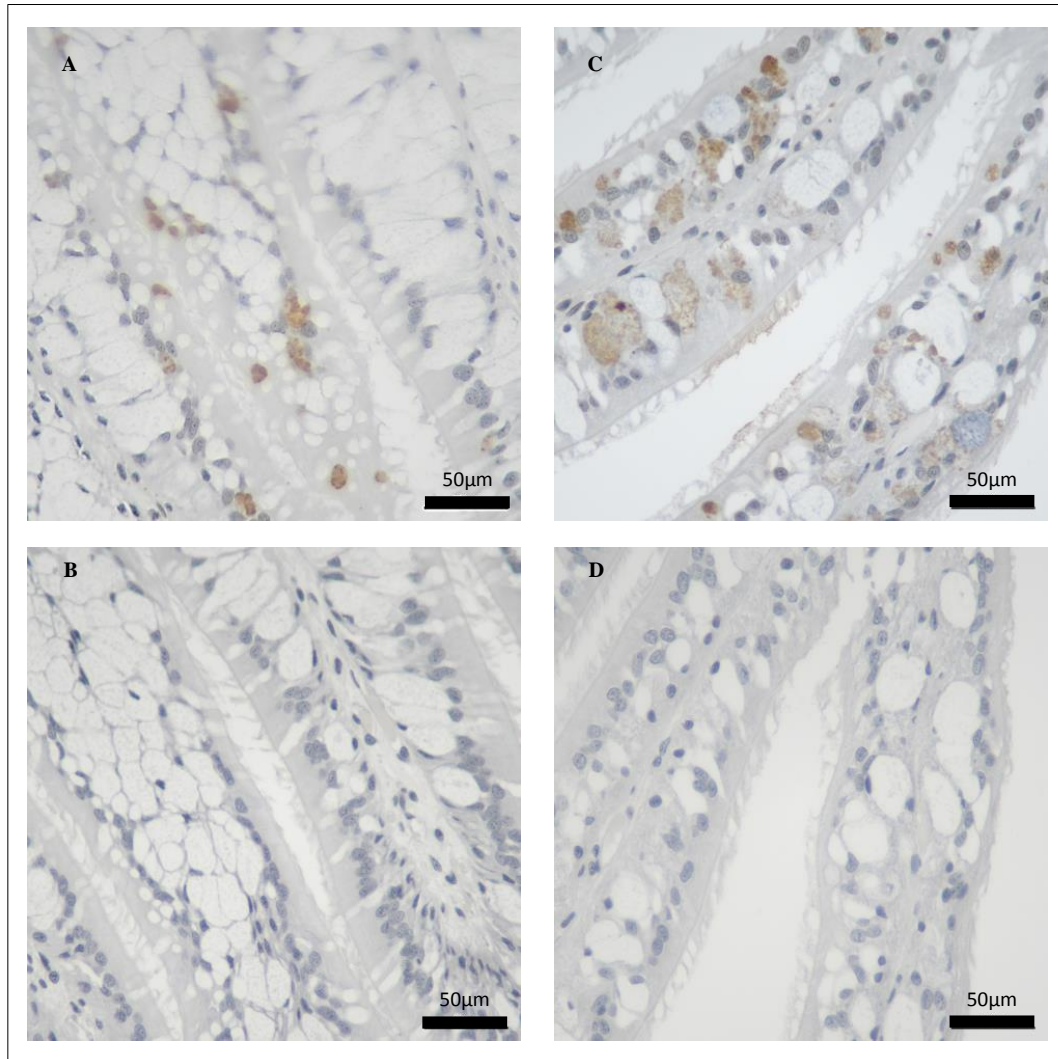


Fig. 4 : (A): Presence of immunostained fiber bundles in the distal end of the oviduct with SoCCAP antibodies, (B): Negative control without a primary antibody. (C): Presence of immunostained fiber bundles in the distal part of the MNG. (D): Negative control without a primary antibody. Counterstaining: hematoxylin.

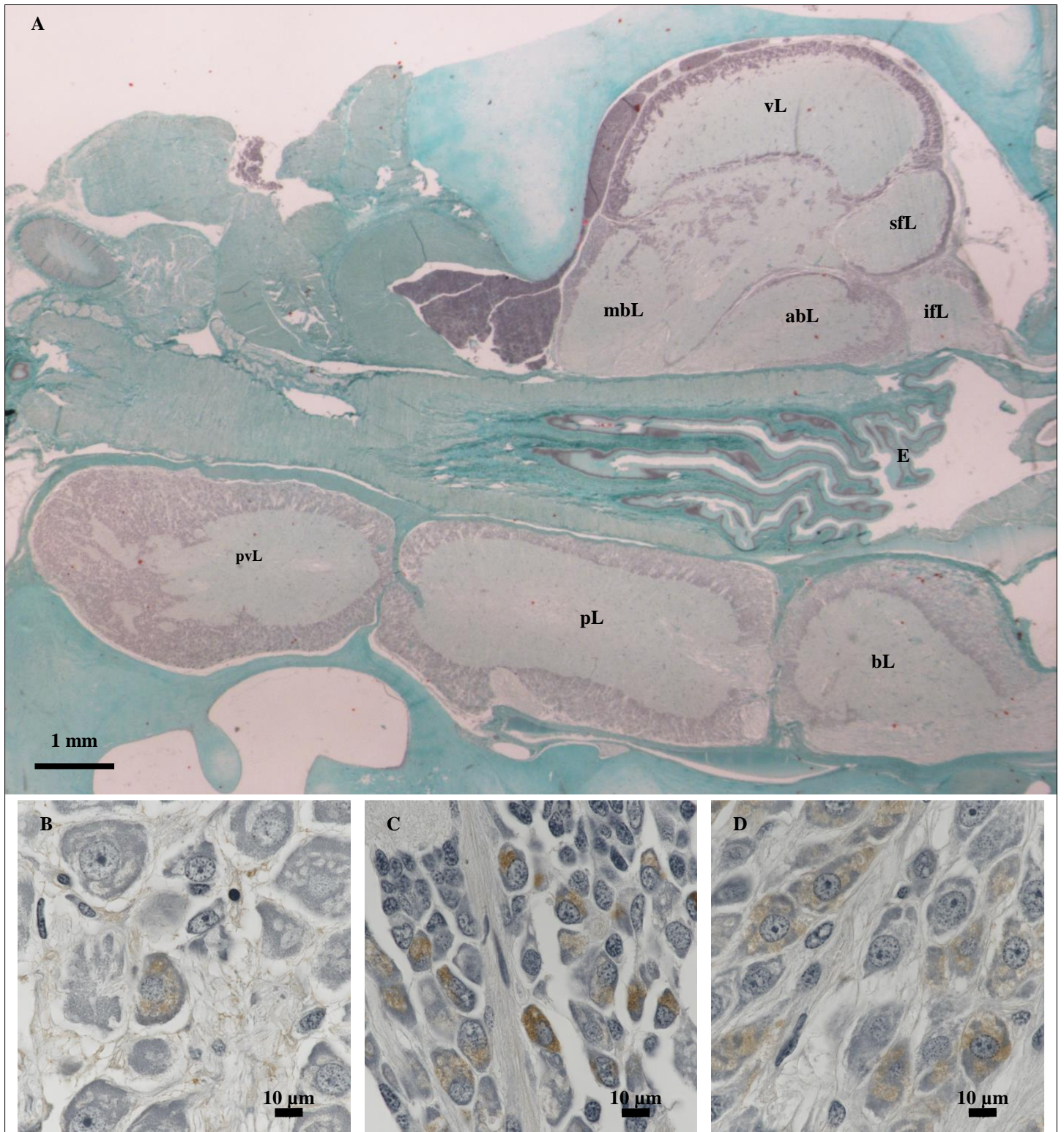


Fig. 5 : (A): Longitudinal section of the CNS of *Sepia officinalis* egg-laying females. Lobes belonging to the SupEM: mbL: median basal lobe; vL: vertical lobe; sfL: superior frontal lobe; ifL: inferior frontal lobe; abL: anterior basal lobe. Lobes belonging to the SubEM: pvL: palleovisceral lobe; pL: pedal lobe; bL: brachial lobe. E: esophagus. Counter staining: Trichrome of Prenant-Gabe. (B): presence of SoCCAP immunostained neurons and fibers in the palleovisceral lobe of the SubEM; (C): presence of SoCCAP immunostained neurons in the median basal lobe of the SupEM; (D): presence of SoCCAP immunostained neurons in the anterior basal lobe of the SupEM. Counterstaining: hematoxylin.

3.4 Neuropeptides localization by mass spectrometry

Immunocytochemistry detection of *SoCCAPs* in the nerve endings of the distal area of MNGs and in the OvG motivated further investigations by mass spectrometry focused on the immunostained areas. The MS/MS spectrum of *SoCCAP1* is presented in Figure 6. In addition, *SoCCAPs* were detected in the whole oviduct, together with cryptic peptides such as pQPQENTFQMKPSES DILNMKIRHLI, LFDEENDFKLVASDSIQPMEQETAID and AVQRQPTANDFSNEELASLPD (Figure 7A and B). A truncated form, pQPQENTFQMKPSES DILNMKI, was also detected only in the distal end of the oviduct.

3.5 NMR assays

SoCCAP1, *SoCCAP2*, and *SoCCAP3* ^1H NMR spectra were performed in water and in the presence of SDS micelles. For each *SoCCAP*, the greatest number of constraints was obtained in the presence of SDS micelles as compared to water. The NOE connectivity diagrams of the three *SoCCAPs* in water provided only sequential information, with $d\alpha\text{N}(i, i+1)$, $d\beta\text{N}(i, i+1)$ and $d\text{NN}(i, i+1)$ connectivities. In the presence of SDS micelles, while *SoCCAP3* showed only a few additional cross-peaks, *SoCCAP1* and *SoCCAP2* NOE diagrams displayed several two-medium-range connectivities, *i.e.* five $d\alpha\text{N}(i, i+2)$ for *SoCCAP2*, and six $d\alpha\text{N}(i, i+2)$, four $d\text{NN}(i, i+2)$, and four $d\alpha\text{N}(i, i+3)$ for *SoCCAP1*. As the greatest amount of spatial information was obtained for *SoCCAP2*, we decided to focus on this peptide to further study its structure in the presence of SDS micelles.

The ^1H chemical shifts of *SoCCAP1* in the presence of SDS micelles are given in Supplemental Table 1. In the final run, *SoCCAP1* structures were calculated using 81 inter-residue constraints. The 20 lowest energy structures without distance violation superior to 0.3 Å, out of the 100 structures calculated with AMBER, are presented in Figure 8A, and detailed lowest energy structure is shown in Figure 8B. These *SoCCAP1* structures displayed disordered N-terminal and C-terminal domains, and a well-defined cycle encompassing all the amino acids between cysteine residues 3 and 9. These two cysteine residues formed the disulfide bond conserved in CCAPs. The calculated rmsd for these 20 structures was 0.179 Å when considering the backbone and the disulfide bond, and 0.212 Å when considering all the heavy atoms between Cys³ and Cys⁹. Inside the stable Cys³-Cys⁹ cycle, two hydrogen bonds were defined between CO of Asn⁴ and NH of Gly⁷, and between CO of Ser⁵ and NH of Gly⁸, with ca. 2 Å between the two residues involved in each hydrogen bond. When considering these two hydrogen bonds in the 20 lowest energy structures, the distribution of the

dihedral angles of residues $i+1$ and $i+2$ led to the identification of a type II β -turn for Asn⁴ - Gly⁷ and a type III' β -turn for Ser⁵ - Gly⁸ (Lewis et al., 1973).

3.6 Bioassays

Bioassays were carried out on the genital tract of egg-laying females, and also on the penis and deferent duct of mature males. The *SoCCAP1* peptide decreased the amplitude of MNG contractions, with a threshold of 10^{-9} M (Figure 9A). Similar activity levels were observed with *SoCCAP2* and *SoCCAP3*. *SoCCAP1* decreased the tonus of the proximal oviduct with a threshold at 10^{-9} M (Figure 9B). No effect was observed on the ovarian stroma of egg-laying females, the penis or the deferent duct of mature males, or in the genital tract of vitellogenic females. Based on the biological activities reported in arthropods, *SoCCAP1* was also tested on the vena cava of egg-laying females. An increase in the frequency and tonus of the vein contractions was observed, with a threshold of 10^{-8} M. All activities were dose-dependent, from 10^{-6} to 10^{-8} or 10^{-9} M (data not shown).

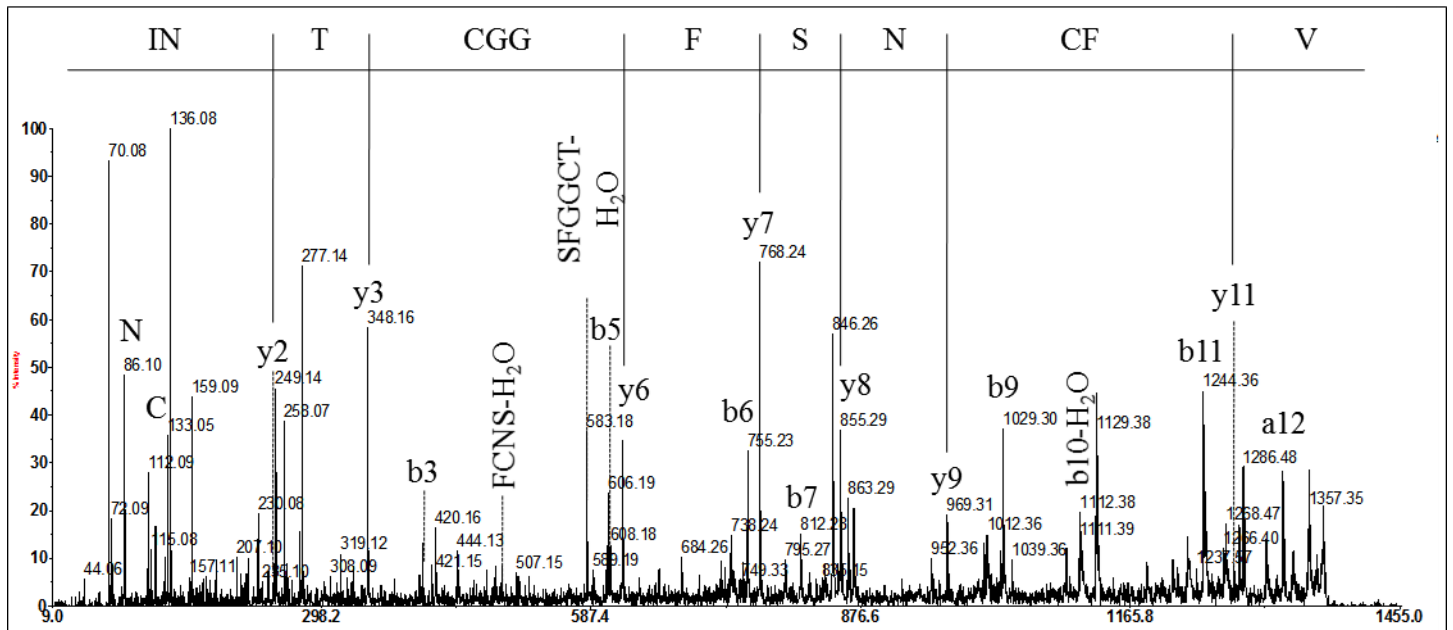
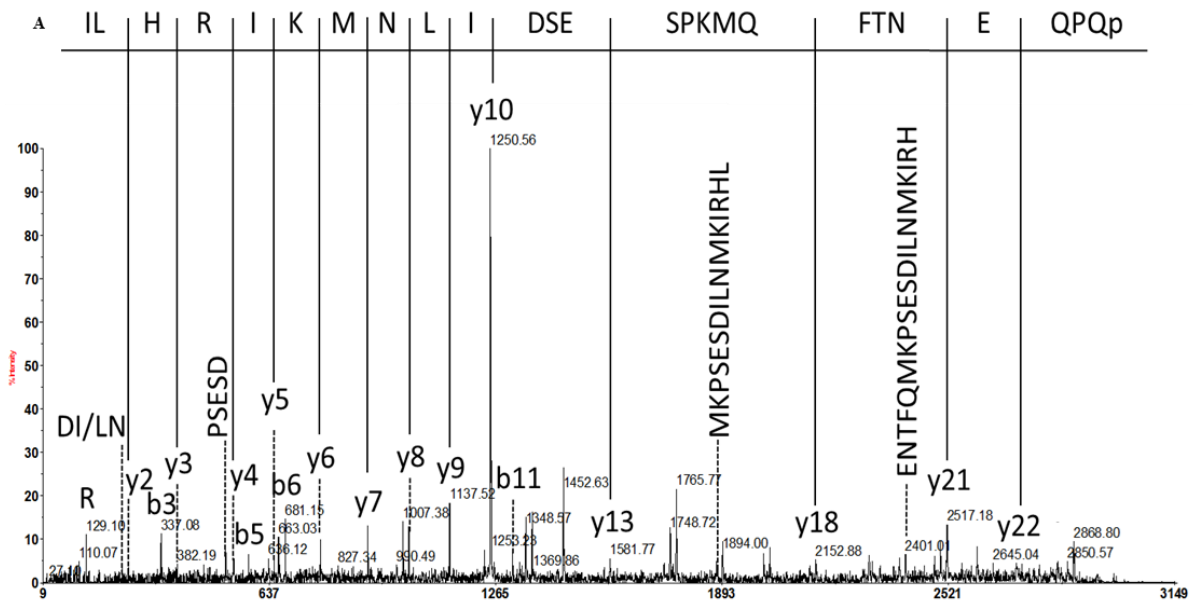


Fig. 7 : Off-line nLC-MALDI tandem MS analysis of the OvG: MS/MS spectrum of SoCCAP1 (VFCNSFGGCTNI).



B

MQSVSSSLSTGLFFLTVNVLVSTLIRVTS **SPQENTFQMKPSESDILNMKIRHL** **IRRAVQRQPTANDFSNEELASLP**
DK **VFCNSFGGCTNI** **K** **LFDEENDFKLVASDSIQPMEQETAID** **KR** **VFCNSYGGCKSF** **KR** **VSANDI** **KK** **PEMIKNKQRHL**
IR **LKLQPIKIS** **RR** **VFCNSFGGQCN**

- Cryptic 1 pQPQENTFQMKPSESDILNM**KIRHLI**
- Cryptic 1' pQPQENTFQMKPSESDILNMKI
- Cryptic 2 AVQRQPTANDFSNEELASLPD
- Cryptic 3 LFDEENDFKLVASDSIQPMEQETAID
- Cryptic 4 VSANDI
- Cryptic 5 PEMIKN**KQRHLI**
- Cryptic 6 LKLQPIKIS

Fig. 6 : Cryptic peptides cleaved from the SoCCAP protein precursor. (A): Off-line nLC-MALDI tandem MS analysis of the distal end of the oviduct. MS/MS spectrum of cryptic peptide 1 (m/z 2,979.7) predicted from the SoCCAP protein precursor. Immonium, a, b, y, and detected internal ions are indicated. (B): SoCCAP protein precursor: the predicted signal peptide is highlighted in yellow, predicted convertase cleavage sites in red, N-terminal glutamine predicted to be converted into pyroglutamic acid in dark gray, cryptic peptides detected by mass spectrometry in light gray. Cryptic peptides are indicated in italics, SoCCAPs in bold and conserved C-terminal sequences of cryptic peptides 1 and 5 are highlighted in green.

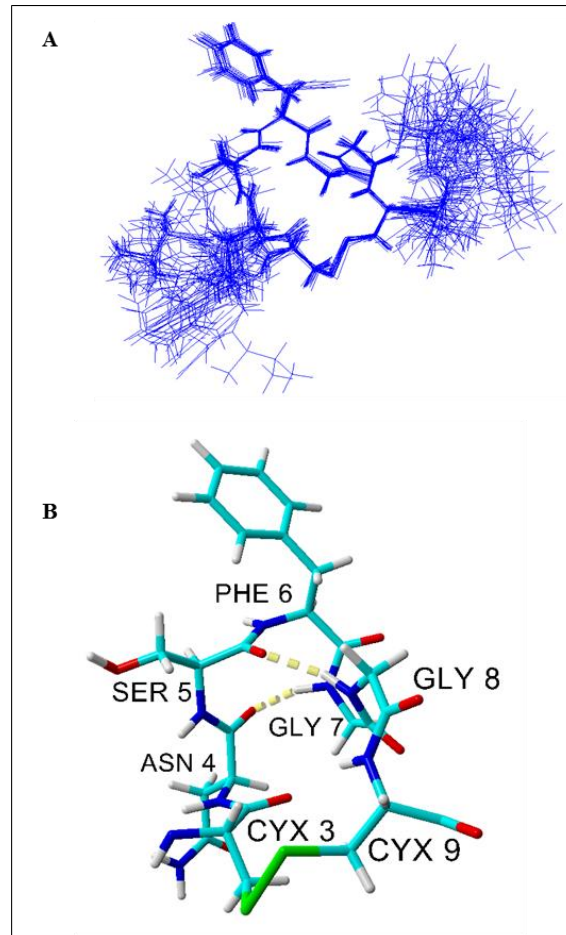


Fig. 8 : (A): Overlay of the 20 lowest energy structures with no violations $> 0.3 \text{ \AA}$ from the 100 structures calculated with AMBER software for neuropeptide SoCCAP2 in SDS micelles. Overlay was performed using the backbone atoms of residues 3–8. (B): Detail of the lowest energy structure of SoCCAP2 in SDS micelles displaying the hydrogen bonds between Asn4-Gly7 and Ser5-Gly8 (yellow dashes). N-term and C-term were omitted for clarity. The disulfide bridge is indicated in green.

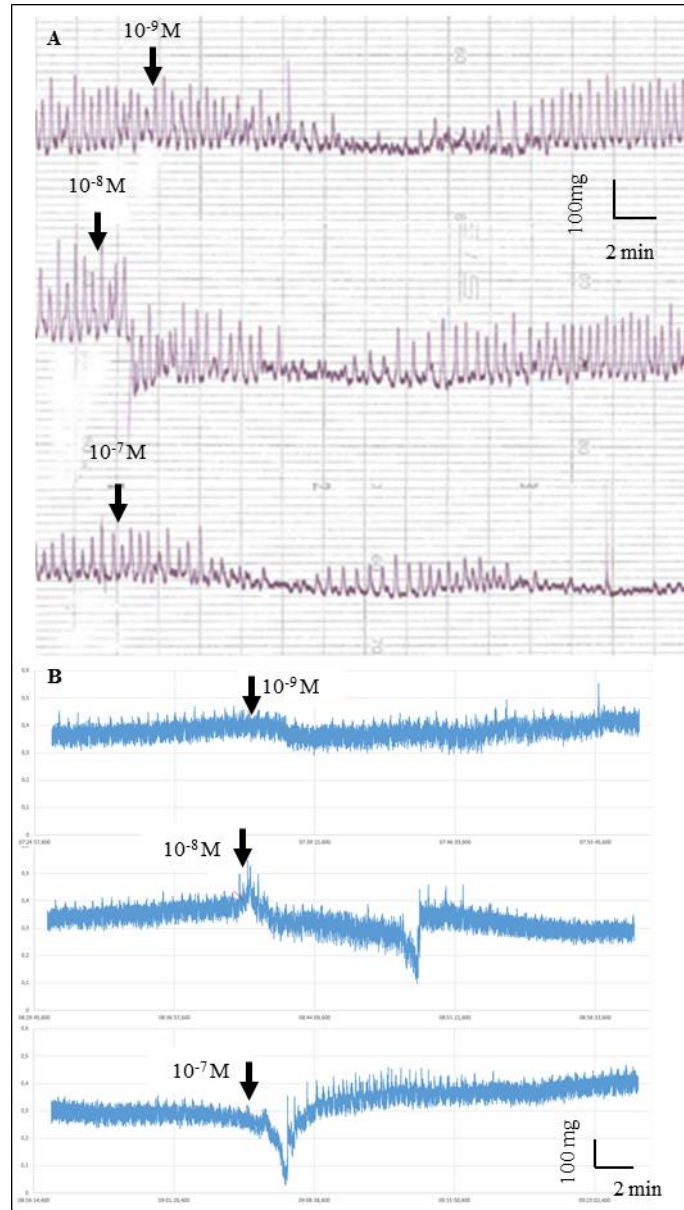


Fig. 9 : Dose-dependent myotropic effect of SoCCAP1 applied to the MNGs (A) and distal oviduct (B) of egg-laying females.

4. Discussion

In a previous paper, we showed that the *SoCCAP* precursor was expressed in different parts of the CNS and overexpressed in egg-laying females as compared to sexually mature males (Zatylny-Gaudin et al., 2016).

The present study addresses the putative involvement of *SoCCAPs* in the regulation of egg-laying through tissue expression patterns, tissue mapping of mature neuropeptides, identification and tissue mapping of receptor transcripts, and bioactivity of *SoCCAPs* on the genital tract. In addition, were performed structural investigations to determine *SoCCAP* structure in a medium that mimics a lipid membrane. The three mature neuropeptides detected in the OvG by mass spectrometry (Zatylny-Gaudin et al., 2016) suggest a role in the secretion of the inner oocyte capsule and / or in modulation of contractions of the distal oviduct which releases oocytes into the mantle cavity. Additional immunocytochemistry investigations carried out in the present study revealed the presence of *SoCCAPs* in OvG nerve endings and in the distal oviduct associated with this gland. New mass spectrometry analyses confirmed the previous results and demonstrated the concomitant occurrence of cryptic peptides. Cryptic peptides or “cryptome” flanked by dibasic cleavage sites on protein precursors often have distinct biological properties from the peptides of their protein precursor. They appear to play a role in modulating biological processes such as angiogenesis, immune functions, cell growth, and offer new opportunities for protein-based therapy (Autelitano et al., 2006). Dylag et al. (2008) demonstrated the existence of a novel bioactive cryptic peptide within an already known NPFF precursor. Bosso et al. (Bosso et al., 2017) described a cryptic host defense peptide in human 11-hydroxysteroid dehydrogenase-1 β -like. In this context, cryptic peptides cleaved from the *SoCCAP* protein precursor could have biological activities. They were detected in the oviduct, and possessed post-translational modifications such as an N-terminal pyroglutamate for one of them, or a conserved RHLI C-terminal sequence for two of them (Figure 7B).

Immunocytochemistry and mass spectrometry investigations on the distal end of the oviduct revealed the occurrence of immunostained nerve fibers and the presence of *SoCCAPs* and cryptic peptides. Tissue mapping of the neuropeptides and receptor associated to biological activity clearly established the involvement of *SoCCAPs* in the regulation of oocyte transport and also probably in the mechanical secretion of capsular products since the distal oviduct and the OvG are very closely associated.

Immunocytochemistry also revealed the presence of CCAP-like peptides in the nerve endings of the distal end of MNGs, according to mass spectrometry analyses. These large glands secrete the outer capsule of the egg and have a very similar histological organization to the OvG. A central axial channel collects the secretions released by microvilli lined with secretory cells. The secreting activity of these glands has to be synchronized with that of the OvG to allow egg-capsule formation. Mechanical secretion is therefore quite probably synchronized by the same families of regulators. Similarly to the OvG, MNGs expressed the *SoCCAP* receptor described above, and their contractions were modulated by *SoCCAPs*. Their effect on the OvG and MNGs suggests that they may be involved in regulating egg-capsule inner and/or outer layer secretion.

Interestingly, *SoCCAPs* had no myotropic activity in the ovarian stroma. This densely vascularized structure made of conjunctive tissue and muscle fibers is involved in ovulation, which in cuttlefish corresponds to the release of mature oocytes into the genital coelom. Thus, regulation by *SoCCAPs* seems to be restricted to specific reproductive functions.

Even if the effects of *SoCCAPs* observed in OvG and MNG decreased the tonus and the amplitude of contractions, it is important to keep in mind that we recorded the activity of a single isolated neuropeptide, a situation that never occurs in physiological conditions. Previous papers showed that APGWamide (Henry et al., 1997) as well as FMRFamide (Henry et al., 1999) induced strong modifications of the contractile activity of the oviduct. So we can assume that the contractile activity of the genital apparatus is regulated by a very complex cocktail of neuropeptides. This cocktail is probably able to cause successive contraction phases followed by rest periods to allow for a sustained activity throughout the several-day-long egg-laying period.

At the level of the CNS, in the SubEM and more particularly in the paleovisceral lobe, clusters of immunostained neurons and fibers were observed. CCAP localization in this part of the CNS was previously confirmed by mass spectrometry, with the detection of the 3 *SoCCAPs* in SubEM (Zatylny-Gaudin et al., 2016). The presence of peptides potentially involved in reproduction in this part of the CNS is coherent because the paleovisceral lobe is the lobe that innervates the genital tract and viscera. Moreover, this part of the CNS is coupled to the neurohematic area of the vena cava, even if mass spectrometry analysis of haemolymph samples showed that *SoCCAPs* acted exclusively via nervous signals.

Immunostained neurons and fibers were also observed in the OL and SupEM. In the SupEM, only

neurons were observed as a large cluster in the anterior part of the basal anterior lobe. This lobe is involved in the predatory behavior (Chichery and Chichery, 1987), and transcriptomic data indicated that the *SoCCAP* precursor was more expressed in the SupEM of egg-laying females. Therefore *SoCCAPs* may also be involved in predation, in order to build up reserves for spawning: our aquarium observations showed that female cuttlefish stopped feeding during spawning.

At the structural level, the presence of a disulfide bond in such a short primary sequence will constraint the cycle. However, small peptides (neuropeptides or antimicrobial peptides) are often unstructured in water but can acquire a well-defined tridimensional structure in a hydrophobic environment such as SDS micelles. This medium mimics the lipid membrane and is assumed to induce structures close to the receptor-bound peptide conformations. Accordingly to such a scheme, NMR analyses in water did not yield much data about the three-dimensional conformation of *SoCCAPs*. The three *SoCCAPs* displayed only sequential constraints, in agreement with an unstable structure of these peptides in aqueous medium. In contrast, in the presence of SDS micelles, more medium-range connectivity was observed in NOESY spectra. Nevertheless, the extent of medium-range connectivity was also dependent on the *SoCCAP* studied; this suggests a role of the C-terminal domain, which is specific to each *SoCCAP*, in 3D structure stabilization. The structure of *SoCCAP1* was solved in the presence of SDS micelles. We determined the presence of two types of β -turns inside the stable cyclic structure.

CCAP structures have only been described in a few arthropod and mollusk species, including an insect - the fruit fly *D. melanogaster* -, a crustacean - the crab *C. maenas* -, and a gastropod mollusk - the marine cone snail *Conus villepini* - (Jackson et al., 2009; Miloslavina et al., 2010; Nagata and Tanokura, 2005).

bond obviously confers all reported CCAPs a cyclic structure given by the two cysteine residues. In the marine cone snail *C. villepini*, the N-terminal and C-terminal domains have been described as more flexible (Miloslavina et al., 2010). In *C. maenas* and *D. melanogaster*, the CCAP sequence is shorter and ends by Cys⁹, which is involved in the disulfide bond (Jackson et al., 2009; Nagata and Tanokura, 2005). The N-terminal end presents a high degree of flexibility. The well-defined cycle between the cysteine residues implied in the conserved disulfide bond could represent a conserved structure of CCAPs in protostomes, with the presence of flanking N-terminal and C-terminal disordered domains, when they exist in the sequence.

While the presence of a β -turn inside the stable cyclic structure appears to be common in protostomes, the β -turn type varies among species. In the crab *C. maenas*, a type-IV β -turn was described between residues Ala⁵ and Gly⁸, and in the marine cone snail *C. villepini* a type-I β -turn was described between residues Asn⁴ and Gly⁷ (Jackson et al., 2009; Miloslavina et al., 2010).

In cephalopods, the primary sequence of CCAPs is highly conserved among species. For example, the primary sequences of *S. officinalis* and *L. pealeii* CCAPs are fully conserved (Figure 10). This homology will have to be confirmed in cephalopod decapods once novel transcriptomes or genomes are available. The high level of sequence conservation in regulatory peptides is often associated to regulation of important functions. In insects, e.g. *Rhodnius prolixus*, CCAP is essential for ecdysis (Lee et al., 2013). The first indication of CCAP involvement in ecdysis was decreased staining intensity in neurons containing CCAP immediately after ecdysis, suggesting CCAP release. CCAP also has a role in circular activity by controlling the heart rate. In *L. migratoria*, CCAP increased the basal tonus and the frequency and amplitude of phasic contractions

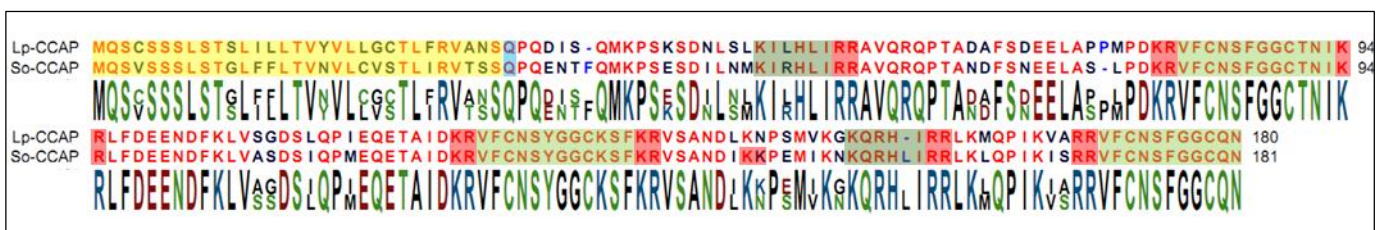


Fig. 10 : Sequence alignment of the CCAP protein precursors of *Sepia officinalis* and *Loligo pealeii*, two cephalopod decapods (<http://ivory.idyll.org/blog/2014-loligo-transcriptome-data.html>). The predicted neuropeptides highlighted in green are conserved in the two species. Signal peptides are highlighted in yellow, predicted convertase cleavage sites in red, C-terminal conserved sequences of cryptic peptides in dark orange, the N-terminal pyroglutamic acid of cryptic peptide 1 detected in *Sepia officinalis* and predicted in *Loligo pealeii* in blue.

In *D. melanogaster*, NOE analysis of CCAP in water showed that most interactions were sequential, with only few medium-range and long-range connectivities (Jackson et al., 2009). The disulfide

(Donini et al., 2001). Unlike in *S. officinalis*, no CCAP-like immunoreactive structures were observed in the nerves innervating the oviduct, suggesting that CCAPs probably acted as neurohormones. Still in *L.*

migratoria, CCAP-like immunostained cells were discovered in the fat body associated with the oviducts that represents a potential source of CCAP, along the transverse nerve and perivisceral organs. In the mosquito *A. gambiae*, CCAP increased the contraction rate of the auxiliary hearts, the organ that controls hemolymph circulation in the antennae (Suggs et al., 2016). In *S. officinalis* CCAPs increased the vena cava tonus in a dose-dependent manner; this demonstrates their involvement in the regulation of hemolymph circulation (data not shown).

In *R. prolixus*, the CCAP receptor (RhoCCAPR) is expressed in the female and male reproductive systems and salivary glands (Lee et al., 2013). In *S. officinalis*, expression of the only SoCCAP receptor identified so far was restricted to the OvG and MNGs, and was not recovered in the salivary glands of either sex. CCAP GPCR organization showed a high level of conservation between cephalopods and arthropods, with very similar transmembrane domains.

Finally, in arthropods and cephalopods, conservation of neuropeptide and GPCR structures appears to be associated to conservation of regulated functions, e.g. hemolymph circulation and reproduction (gamete release), except ecdysis that is of course restricted to arthropods.

This study shows that CCAPs expressed in cuttlefish are certainly involved in oocyte transport and egg-capsule secretion. They probably also play a role in the release of oocytes into the mantle cavity near the secretory orifices of the MNGs. Regarding expression data, the tissue mapping of neuropeptides as well as the distribution of receptors, we can speculate that CCAPs are one of the main neuropeptide family involved in egg-laying regulation as FMRFamide, APGWamide and sepiatocin.

Further cellular investigations will have to be performed to determine their putative involvement in the regulation of egg-capsule synthesis during vitellogenesis.

Acknowledgments

We thank Jean-Luc Blaie and Maxime Marie, captains of the professional fishing boats “Père Daniel” and “Bip-Bip”, and their crews for their valuable help in providing cuttlefish. We thank Beatrice Adeline for technical support in histological analysis, and Christophe Roger for technical support in the construction of specific equipments. We thank Drs Baptiste Legrand and Matthieu Simon for their help with the AMBER software program. This work was financed by the ANR "NEMO" and the Conseil regional of BASSE-NORMANDIE.

References

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.C., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Miklos, G.L.G., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H., Andrews-pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P. V, Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., Pablos, B. De, Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., Mcintosh, T.C., Mcleod, M.P., Mcpherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V, Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D.C., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Side, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster* 287, 2185–2195.

Ahn, S.J., Martin, R., Rao, S., Choi, M.Y., 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
- Arch, S., 1972. Biosynthesis of the egg-laying hormone (ELH) in the bag cell neurons of *Aplysia californica*. *J. Gen. Physiol.* 60, 102–119. doi:10.1085/jgp.60.1.102
- Autelitano, D.J., Rajic, A., Smith, A.I., Berndt, M.C., Ilag, L.L., Vadas, M., 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
- Baker, J.D., McNabb, S.L., Truman, J.W., 1999. The hormonal coordination of behavior and physiology at adult ecdysis in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 202, 3037–3048.
- Bernay, B., Baudy-Floc'h, M., Zanuttini, B., Gagnon, J., Henry, J., 2005. Identification of SepCRP analogues in the cuttlefish *Sepia officinalis*: A novel family of ovarian regulatory peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1037–1047. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.034
- Bernay, B., Baudy-Floc'h, M., Zanuttini, B., Zatylny, C., Pouvreau, S., Henry, J., 2006. Ovarian and sperm regulatory peptides regulate ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 607–616. doi:10.1002/mrd.20472
- Bernay, B., Gagnon, J., Henry, J., 2004. Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 215–222. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.085
- Bosso, A., Pirone, L., Gaglione, R., Pane, K., Del Gatto, A., Zaccaro, L., Di Gaetano, S., Diana, D., Fattorusso, R., Pedone, E., Cafaro, V., Haagsman, H.P., van Dijk, A., Scheenstra, M.R., Zanfardino, A., Crescenzi, O., Arciello, A., Varcamonti, M., Veldhuizen, E.J.A., Di Donato, A., Notomista, E., Pizzo, E., 2017. A new cryptic host defense peptide identified in human 11-hydroxysteroid dehydrogenase-1 β -like: from in silico identification to experimental evidence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1861, 2342–2353. doi:10.1016/j.bbagen.2017.04.009
- Case, D.A., Cheatham III, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz JR., K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., 2005. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688. doi:10.1117/1.3103783.Extended-working-distance
- Chatenet, D., Dubessy, C., Boularan, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Lihmann, I., Pacaud, P., Tonon, M.C., Vaudry, H., Leprince, J., 2006. Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogues: Identification of a urotensin II antagonist. *J. Med. Chem.* 49, 7234–7238. doi:10.1021/jm0602110
- Chatenet, D., Dubessy, C., Leprince, J., Boularan, C., Carlier, L., Ségalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Oulyadi, H., Davoust, D., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Tonon, M.C., Lihmann, I., Pacaud, P., Vaudry, H., 2004. Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* 25, 1819–1830. doi:10.1016/j.peptides.2004.04.019
- Chichery, M.P., Chichery, R., 1987. The Anterior Basal Lobe and Control of Prey-Capture in the Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Physiol. Behav.* 40, 329–336.
- Chiu, A.Y., Hunkapiller, M.W., Heller, E., Stuart, D.K., Hood, L.E., Strumwasser, F., 1979. Purification and primary structure of the neuropeptide egg-laying hormone of *Aplysia californica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 6656–6660. doi:10.1073/pnas.76.12.6656
- Chiu, A.Y., Strumwasser, F., 1981. An Immunohistochemical Study of the Neuropeptidergic Bag Cells of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 1, 812–826.
- Christie, A.E., Roncalli, V., Cieslak, M.C., Pascual, M.G., Yu, A., Lameyer, T.J., Stanhope, M.E., Dickinson, P.S., 2017. Prediction of a neuropeptidome for the eyestalk ganglia of the lobster *Homarus americanus* using a tissue-specific de novo assembled transcriptome. *Gen. Comp. Endocrinol.* 243, 96–119. doi:10.1016/j.ygcen.2016.11.001
- Chung, J.S., Wilcockson, D.C., Zmora, N., Zohar, Y., Dirksen, H., Webster, S.G., 2006. Identification and developmental expression of mRNAs encoding crustacean cardioactive peptide (CCAP) in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 209, 3862–3872. doi:10.1242/jeb.02425
- Cornet, V., Henry, J., Goux, D., Duval, E., Bernay, B., Le Corguillé, G., Corre, E., Zatylny-Gaudin, C., 2015. How Egg Case Proteins Can Protect Cuttlefish Offspring? *PLoS One* 10, e0132836. doi:10.1371/journal.pone.0132836
- da Silva, R., Lange, A.B., 2006. The association of crustacean cardioactive peptide with the

- spermatheca of the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 52, 399–409. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.01.006
- Donini, A., Agricola, H.J., Lange, A.B., 2001. Crustacean cardioactive peptide is a modulator of oviduct contractions in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 47, 277–285. doi:10.1016/S0022-1910(00)00112-8
- Dulcis, D., Levine, R.B., 2003. Innervation of the heart of the adult fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 465, 560–578. doi:10.1002/cne.10869
- Dulcis, D., Levine, R.B., Ewer, J., 2005. Role of the neuropeptide CCAP in *Drosophila* cardiac function. *J. Neurobiol.* 64, 259–274. doi:10.1002/neu.20136
- Dylag, T., Pachuta, A., Raof, H., Kotlinska, J., Silberring, J., 2008. A novel cryptic peptide derived from the rat neuropeptide FF precursor reverses antinociception and conditioned place preference induced by morphine. *Peptides* 29, 473–478. doi:10.1016/j.peptides.2007.09.014
- Ebberink, R.H., van Loenhout, H., Geraerts, W.P., Joosse, J., 1985. Purification and amino acid sequence of the ovulation neurohormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7767–71.
- Enault, J., Zatylny-Gaudin, C., Bernay, B., Lefranc, B., Leprince, J., Baudy-Floc'h, M., Henry, J., 2012. A complex set of sex pheromones identified in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *PLoS One* 7, e46531. doi:10.1371/journal.pone.0046531
- Estévez-Lao, T.Y., Boyce, D.S., Honegger, H.-W., Hillyer, J.F., 2013. Cardioacceleratory function of the neurohormone CCAP in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 216, 601–13. doi:10.1242/jeb.077164
- Furuya, K., Liao, S., Reynolds, S.E., Ota, R.B., Hackett, M., Schooley, D. a, 1993. Isolation and Identification of a Cardioactive Peptide From *Tenebrio Molitor* and *Spodoptera Eridania* 374, 1065–1074.
- Garcia, V.J., Daur, N., Temporal, S., Schulz, D.J., Bucher, D., 2015. Neuropeptide Receptor Transcript Expression Levels and Magnitude of Ionic Current Responses Show Cell Type-Specific Differences in a Small Motor Circuit. *J. Neurosci.* 35, 6786–6800. doi:10.1523/JNEUROSCI.0171-15.2015
- Geraerts, W.P.M., Cheeseman, P., Ebberink, R.H.M., Nuyt, K., Hogenes, T.M., 1983. Partial purification and characterization of the ovulation hormone of the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 51, 471–476. doi:10.1016/0016-6480(83)90064-3
- Gonçalves, R.A., Aragão, C., Frias, P.A., Sykes, A. V., 2012. The use of different anaesthetics as welfare promoters during short-term human manipulation of European cuttlefish (*Sepia officinalis*) juveniles. *Aquaculture* 370–371, 130–135. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.014
- Henry, J., Cornet, V., Bernay, B., Zatylny-Gaudin, C., 2013. Identification and expression of two oxytocin/vasopressin-related peptides in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Peptides* 46, 159–66. doi:10.1016/j.peptides.2013.05.004
- Henry, J., Favrel, P., Boucaud-Camou, E., 1997. Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the motility of the mature oviduct in the cuttlefish, *sepia officinalis*. *Peptides* 18, 1469–1474. doi:10.1016/S0196-9781(97)00241-6
- Henry, J., Zatylny, C., Boucaud-Camou, E., 1999. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: Involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* 20, 1061–1070. doi:10.1016/S0196-9781(99)00102-3
- Honegger, H.W., Market, D., Pierce, L. a., Dewey, E.M., Kostron, B., Wilson, M., Choi, D., Klukas, K. a., Mesce, K. a., 2002. Cellular localization of bursicon using antisera against partial peptide sequences of this insect cuticle-sclerotizing neurohormone. *J. Comp. Neurol.* 452, 163–177. doi:10.1002/cne.10357
- In, V. Van, Ntalamagka, N., Connor, W.O., Wang, T., Powell, D., Cummins, S.F., Elizur, A., 2016. Peptides Reproductive neuropeptides that stimulate spawning in the Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*). *Peptides* 82, 109–119. doi:10.1016/j.peptides.2016.06.007
- Jackson, G.E., Mabula, A.N., Stone, S.R., Gäde, G., Kövér, K.E., Szilágyi, L., van der Spoel, D., 2009. Solution conformations of an insect neuropeptide: Crustacean cardioactive peptide (CCAP). *Peptides* 30, 557–564. doi:10.1016/j.peptides.2008.11.014
- Johnson, B.A., 2004. Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol. Biol.* 278, 313–352.
- Koradi, R., Billeter, M., Wüthrich, K., 1996.

- MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* 14, 51–55. doi:10.1016/0263-7855(96)00009-4
- Krieger, E., Koraimann, G., Vriend, G., 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - A self-parameterizing force field. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 47, 393–402. doi:10.1002/prot.10104
- Labarrère, P., Chatenet, D., Leprince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M.-C., Dubessy, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Calas, B., Pacaud, P., Vaudry, H., 2003. Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 18, 77–88. doi:10.1080/1475636031000093507
- Lee, D., Orchard, I., Lange, A.B., 2013. Evidence for a conserved CCAP-signaling pathway controlling ecdysis in a hemimetabolous insect, *Rhodnius prolixus*. *Front. Neurosci.* 7, 1–9. doi:10.3389/fnins.2013.00207
- Lehman, H.K., Murguic, C.M., Miller, T. a., Lee, T.D., Hildebrand, J.G., 1993. Crustacean cardioactive peptide in the sphinx moth, *Manduca sexta*. *Peptides*. doi:10.1016/0196-9781(93)90106-Q
- Lewis, P.N., Momany, F.A., Scheraga, H.A., 1973. Chain reversals in proteins. *BBA - Protein Struct.* 303, 211–229. doi:10.1016/0005-2795(73)90350-4
- Loi, P.K., Emmal, S. a, Park, Y., Tublitz, N.J., 2001. Identification, sequence and expression of a crustacean cardioactive peptide (CCAP) gene in the moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 204, 2803–16.
- McGaw, I.J., Wilkens, J.L., McMahon, B.R., Airriess, C.N., 1995. Crustacean cardioexcitatory peptides may inhibit the heart in vivo. *J. Exp. Biol.* 198, 2547–2550.
- Miloslavina, A., Ebert, C., Tietze, D., Ohlenschläger, O., Englert, C., Görlach, M., Imhof, D., 2010. An unusual peptide from *Conus villepini*: Synthesis, solution structure, and cardioactivity. *Peptides* 31, 1292–1300. doi:10.1016/j.peptides.2010.04.002
- Mo, H., Harwood, J.S., Yang, D., Post, C.B., 2017. A simple method for NMR t1 noise suppression. *J. Magn. Reson.* 276, 43–50. doi:10.1016/j.jmr.2016.12.014
- Nagata, K., Tanokura, M., 2005. Cardioacceleratory peptide (CCAP) of the fruit fly *Drosophila melanogaster*: solution structure analysis and docking simulation to the receptor CG6111. *Pept. Sci.* 41, 441–444.
- Quan, F.B., Dubessy, C., Galant, S., Kenigfest, N.B., Djenoune, L., Leprince, J., Wyart, C., Lihmann, I., Tostivint, H., 2015. Comparative distribution and in vitro activities of the urotensin II-related peptides URP1 and URP2 in zebrafish: Evidence for their colocalization in spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons. *PLoS One* 10, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0119290
- Stangier, J., Hilbich, C., Beyreuther, K., Keller, R., 1987. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 575–579. doi:10.1073/pnas.84.2.575
- Suggs, J.M., Jones, T.H., Murphree, S.C., Hillyer, J.F., 2016. CCAP and FMRFamide-like peptides accelerate the contraction rate of the antennal accessory pulsatile organs (auxiliary hearts) of mosquitoes. *J. Exp. Biol.* 219, 2388–2395. doi:10.1242/jeb.141655
- Toullec, J., Corre, E., Mandon, P., Gonzalez-aravena, M., Ollivaux, C., Lee, C., 2017. Characterization of the neuropeptidome of a Southern Ocean decapod, the Antarctic shrimp *Chorismus antarcticus*: Focusing on a new decapod ITP-like peptide belonging to the CHH peptide family. *Gen. Comp. Endocrinol.* 252, 60–78. doi:10.1016/j.ygcen.2017.07.015
- Toullec, J.Y., Corre, E., Bernay, B., Thorne, M. a. S., Cascella, K., Ollivaux, C., Henry, J., Clark, M.S., 2013. Transcriptome and Peptidome Characterisation of the Main Neuropeptides and Peptidic Hormones of a Euphausiid: The Ice Krill, *Euphausia crystallorophias*. *PLoS One* 8, e71609. doi:10.1371/journal.pone.0071609
- Veenstra, J. a, 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
- Vreugdenhil, E., Geraerts, W.P.M., Jackson, J.F., Joosse, J., 1985. The molecular basis of the neuro-endocrine control of egg-laying behaviour in *Lymnaea*. *Peptides* 6, 465–470. doi:10.1016/0196-9781(85)90415-2
- York, P.S., Cummins, S.F., Degnan, S.M., Woodcroft, B.J., Degnan, B.M., 2012. Marked changes in neuropeptide expression accompany broadcast spawnings in the gastropod *Haliotis asinina*. *Front. Zool.* 9, 9. doi:10.1186/1742-

9994-9-9

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. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00463

Zatylny, C., Gagnon, J., Boucaud-Camou, E., Henry, J., 2000a. ILME: A Waterborne Pheromonal Peptide Released by the Eggs of *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 217–222. doi:10.1006/bbrc.2000.3286

Zatylny, C., Gagnon, J., Boucaud-Camou, E., Henry, J., 2000b. The SepOvotropin: A New Ovarian Peptide Regulating Oocyte Transport in *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1013–1018. doi:10.1006/bbrc.2000.3595

III. Neuropeptides FLGamides

NB : Les analyses structurales ayant pris du retard en raison d'une erreur de séquence pour l'un des peptides étudiés, le papier ne sera donc soumis que dans trois mois environ dans la revue "Peptides".

Structural and functional characterization of orcokinin B-like neuropeptides in cuttlefish (*Sepia officinalis*)

Maxime Endress¹, Céline Zatylny-Gaudin¹, Jérôme Leprince³, Benjamin Lefranc³, Erwan Corre², Gildas Le Corguillé², Benoît Bernay⁵, Alexandre Leduc¹, Jimmy Rangama⁶, Liza Mouret⁴, Anne-Gaëlle Lafont⁴, Arnaud Bondon⁴, Joël Henry^{1,5}

1: Normandy University, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), F-14032 Caen, France.

2: UPMC, CNRS, FR2424, ABiMS, Station Biologique, F-29680 Roscoff, France.

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

4: Equipe CORINT, UMR CNRS 6226, PRISM, CS 34317, Campus de Villejean, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France.

5: Normandy University, Post Genomic Platform PROTEOGEN, SF ICORE 4206, F-14032 Caen, France.

6: Normandy University, CIMAP, UMP 6252 (CEA/CNRS/ENSICAEN/Normandy University), Caen, France.

Corresponding author: Joël HENRY. joel.henry@unicaen.fr

Address: Normandy University, UMR BOREA, Esplanade de la paix, F-14000 Caen, France.

Keywords: Cephalopods, Egg-laying, Neuropeptides, NMR, Immunohistology *In vitro* bioassay.

Abstract

The common cuttlefish (*Sepia officinalis*) is a Cephalopod mollusc that lives in the English Channel and breeds in coastal spawning grounds in spring. A previous work showed that the control of egg-laying is monitored by different types of regulators among which neuropeptides play a major role. They are involved in the integration of environmental cues, and participate in the transport of oocytes in the genital tract and in the secretion of capsular products. This study addresses a family of neuropeptides recently identified as FLGamide, renamed orcokinin B in this article.

These neuropeptides are suspected to be involved in the control of egg-laying, oocyte transport in the oviduct, capsular secretion, but also in the release of mature oocytes into the genital coelom by the ovarian stroma. These are indeed the only neuropeptides detected so far by mass spectrometry in the ovary. They are also present in the nerve endings of the accessory glands of the female genital tract. Finally, their presence in the haemolymph of egg-laying females demonstrates that they also have a hormone-like role.

Immunocytochemistry analyses confirmed the presence of neuropeptides in the nerve endings as well as in the cells of the accessory glands of the female genital tract and in different regions of the CNS. They are more particularly found in the sub-esophageal mass, a region that innervates the genital tract and the neurohemal area of the vena cava. *In vitro* tests indicated that neuropeptides FLGa1 and FLGa3 modulated oocyte transport and capsular secretion, and acted synergistically with FMRFamide.

Finally, *in silico* analyses of the databases indicated that FLGamides had extensive structural homology with orcokinins B, which motivated their name change. In addition, the *in silico* study also led us to suggest modifying the annotations of *Octopus bimaculoides* and *Loligo pealeii* orcokinins B currently annotated "Feeding Circuit Activating Neuropeptides (FCANs).

Abbreviations:

Ac₂O: piperidine, acetic anhydride; ACN: acetonitrile; APGWa-RPs : APGWamide related peptides; CCAPs : Crustacean Cardioactive Peptides; CD: circular dichroism; CHCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CNS: central nervous system; DCC: Deleted Colorectal Cancer; DCM: Dichloromethane; DIEA: *N,N*-Diisopropylethylamine; DMF: dimethylformamide; DTT: dithiothreitol; ELH: egg-laying hormone; FaRPs : FMRFamide related peptides; FPKM: fragments per kilobase of exon per million fragments mapped; HBTU: *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N,N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HGAP: Haliotid Growth-Associated Peptide; HMP: 4-hydroxymethyl-phenoxymethyl-copolystyrene-1%-divinylbenzene; MNG: main nidamental gland; NMP: *N*-methylpyrrolidone; NMR: nuclear magnetic resonance; OvG: oviduct gland; SCPs: Small Cardioactive Peptides; SubEM: subesophageal mass; SupEM: supraesophageal mass; TBME: *tert*-butylmethylether; TFA: trifluoroacetic acid; TIS: triisopropylsilane.

1. Introduction

Cuttlefish (*Sepia officinalis*) is one of the main cephalopods fished on the English Channel coast. At the end of a life cycle of *ca.* 22 months, it breeds between March and June in highly localized coastal spawning areas. Before the breeding season, females perform gametogenesis in the autumn of the second year of their life cycle: an intense phase of cell multiplication takes place in the genital tract glands and in the ovary, corresponding to previtellogenesis. This is followed in early winter by the biosynthesis of yolk proteins by the ovary and of capsular products by the accessory glands of the genital tract, corresponding to vitellogenesis. Females are considered to be mature when ovulation starts, that is, when mature oocytes are released into the genital coelom by the ovary. Egg-laying usually starts before mating, so oocytes are stored in the genital coelom and proximal oviduct contractions are inhibited by factors of ovarian origin expressed and secreted by oocytes (Bernay et al., 2005, 2004; Zatylny et al., 2000a).

The inhibition of oviduct contractions is broken by mating, and then oocytes resume their progress through the genital tract. This transport is made possible by the peristaltic contractions of the oviduct, which are modulated by neuropeptides such as FMRFamide-related peptides (FaRPs), APGWamide-related peptides (APGWa-RPs) and Sepiatocin (Henry et al., 2013, 1999, 1997), in association with ovarian peptides (Bernay et al., 2006a; Zatylny et al., 2000b, 2000c), and sexual pheromones (Enault et al., 2012). During their transport and before their release into the mantle cavity, oocytes are embedded in a first gelatinous capsule secreted by the oviduct gland (OvG), which forms the innermost layer of the future capsule. After their release into the mantle cavity, the partially encapsulated oocytes are embedded in a second envelope; this outermost layer is composed among others of proteins secreted by the main nidamental glands (MNGs), by bacteria, and of melanin from the ink pouch (Cornet et al., 2015b). The secretion of the capsule inner and outer layers is regulated by neuropeptides (Henry et al., 1999), and sex pheromones (Enault et al., 2012). A role of the accessory nidamental glands in capsular secretion is suspected but has never been demonstrated.

The encapsulated oocytes leave the mantle cavity through the siphon, probably carried by the gill current, and remain for *ca.* three minutes in a cavity formed by the female cuttlefish arms and buccal mass. Fertilization takes place there, with the spermatozoa stored in the copulatory pouch since mating. Because asynchronous gametogenesis results in the continuous production of mature oocytes, the majority of females are able to replenish their oocyte stock while renewing the capsular products. This mechanism results in multiple egg deposition periods interspersed with rest periods that make it difficult to assess fertility (Boletzky, 1987).

Although neuropeptides are not the only regulators involved in egg-laying regulation, they play a determining role in the integration of environmental cues such as the photoperiod, temperature, salinity, or depth.

In cuttlefish, neuropeptides such as APGWamide (Henry et al., 1997), FMRFamide (Henry et al., 1999), and sepiatocin (Henry et al., 2013) play a key role in oocyte transport and capsule secretion. In other mollusks such as oyster (*Saccostrea glomerata*), several neuropeptides can induce spawning in sexually mature individuals: spawning hormone (ELH), GnRH, APGWamide, buccalines, Crustacean Cardioactive Peptides (CCAPs), and LFRFamide (In et al., 2016). In gastropods, ELH appears to be the mainstay of egg-laying regulation, particularly in hermaphrodite snails such as *Aplysia* (Arch, 1972; Chiu et al., 1979; Chiu and Strumwasser, 1981) and *Lymnaea* (Ebberink et al., 1985; Geraerts et al., 1983; Vreugdenhil et al., 1985), while in gonochoric gastropods, several neuropeptides are also involved in addition to ELH. In abalone (*Haliotis asinina*), several genes encoding APGWa, myomodulin, proctolines-like, FMRFa, schistosomine-like, insulin (MIP), and HGAP (haliotid growth-associated peptide) are expressed differentially in males and females during the two-week spawning cycle (York et al., 2012). Recent studies in cuttlefish have identified the entire neuropeptidome, which is composed of at least 38 distinct families (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Based on patterns of expression and tissue localization, several families are strongly suspected to be involved in egg-laying control, particularly in the formation and release of encapsulated oocytes: APGWa, CCAPs, clionine, FLGamide, PTSP-like peptides, Small Cardioactive Peptides (SCPs), insulin, myomodulin, sepiatocin, and SPamide. We chose to study the FLGamide family of neuropeptides, first identified by Zatylny-Gaudin et al. (Zatylny-Gaudin et al., 2016), and possibly related to arthropod orckinins. We identified an incomplete N-terminal precursor as well as two C-terminal ends (Figure 01A) from which six neuropeptides are potentially cleaved (Figure 01B). The presence of three neuropeptides with a C-terminal FLGamide end initially led to the name "FLGamide neuropeptides". These neuropeptides were therefore named based on their order of appearance on the precursors: FLGaI and FLGaII have a common PYY C-terminal end, FLGaIII, FLGaIV and FLGaV are amidated in their C-terminal end, and FLGa VI does not have any C-terminal amidation. The mature neuropeptides predicted by the *in silico* study were detected by mass spectrometry in the central nervous system (CNS), in the reproductive tract of egg-laying females and in the haemolymph. It is also the only family of neuropeptides detected so far in the ovary.

from a first assembly by Zatylny-Gaudin et al (2016) (BioProject PRJNA242869) and a second supplemental one associating the transcriptomes of previtellogenic accessory sex glands of females and juvenile CNS.

2.3 Tissue mapping by mass spectrometry

2.3.1 Extraction

Each tissue extraction was performed from 3 animals. Tissues were crushed in liquid nitrogen and extracted for 30 minutes in cold methanol/water/acetic acid (90/9/1) adjusted to 50 mM dithiothreitol (DTT). One gram of tissue was used for 10 mL of extraction buffer. Each extract was centrifuged 20 min at 20,000g at 4°C, and then the supernatant was evaporated in a speed vac. Dry pellets were resuspended in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and concentrated on C18 Sep-Pak cartridges (Waters).

2.3.2 NanoLC-MALDI-TOF/TOF analysis

2.3.2.1 Sample preparation for mass spectrometry analysis

Concentrated and desalted peptide pellets were reduced with 100 mM DTT at 55°C for 60 min, alkylated with 50 mM iodoacetamide at 55°C for 45 min, and then concentrated and desalted on C18 OMIX-tips (10 µL, AGILENT). The chromatography step was performed on a nano-LC system (Prominence, Shimadzu). Peptides were concentrated on a Zorbax 5x0.3mm, 5µm C18 precolumn (Agilent), and separated on a Zorbax 150x0.075mm, 3.5µm C18 column (Agilent). Mobile phases consisted of 0.1% TFA in 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% TFA in 99.9% acetonitrile (ACN) (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 nL/min, and the gradient profile was as follows: constant 2% B for 5 min, from 2 to 5% B in 1 min, from 5 to 32% B in 144 min, from 32 to 70% B in 10 min, from 70 to 90% B in 5 min, and back to 2% B in 10 min. The 300 nL/min volume of the peptide solution was mixed with 1.2 µL/min volumes of solutions of 5 mg/mL of an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix prepared in a diluent solution of 50% ACN containing 0.1% TFA. Twenty-second fractions were spotted by an AccuSpot spotter (Shimadzu) on stainless steel Opti-TOF™ 384 targets.

2.3.2.2 Mass spectrometry analysis

MS experiments were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF TOF ion optics and OptiBeam™ on-axis laser irradiation with 1,000 Hz repetition rate. The system was calibrated before analysis with a mixture of des-Arg-bradykinin, angiotensin I, Glu1-fibrinopeptide B, ACTH (18-39) and ACTH (7-38), and mass precision was better than 50 ppm in reflectron mode. A laser intensity of 3400 was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing

1,000 single spectra (5 × 200) in the 700 to 4,000 Da mass range. MS/MS spectra from the twenty most intense ions were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2,500 single spectra (10 × 250) with a laser intensity of 4300. For tandem MS experiments, the acceleration voltage was 1 kV, and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings.

2.3.2.3 Peptide sequencing and protein precursor identification

The fragmentation pattern based on the occurrence of y, b and a ions was used to determine peptide sequences. Database searching was performed using the Mascot 2.5.1 program (Matrix Science). A database corresponding to a homemade *S. officinalis* transcript database (including 356,644 entries) was used (BioProject PRJNA242869).

The variable modifications allowed were as follows: methionine oxidation and dioxidation, C-terminal amidation, and N-terminal pyroglutamate. “No enzyme” was selected. Mass accuracy was set to 200 ppm and 0.6 Da for the MS and MS/MS modes, respectively.

2.4 Tissue mapping by immunocytochemistry

The female central nervous system (CNS), the distal end of the oviduct, the OvG, MNGs, and the ovarian stroma were freshly dissected and placed in Davidson solution (30% filtered sea water, 30% ethanol 95%, 20% formalin 37%, 10% glycerol, 10% acetic acid for 24 to 48 h at 4°C. Tissues were dehydrated in several baths containing increasing ethanol contents. Tissues were totally dehydrated by a bath of butanol before paraffin inclusion. 5-µm sections were deparaffined with Roti®-Histol (Carl Roth®), and incubated in H₂O₂-methanol 3% for 10 minutes at room temperature. Rehydration was performed in several baths of decreasing ethanol contents, Tris buffer (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4), and TT buffer (Tris buffer, 0.5% TritonX-100). Neutralization of non-specific sites was performed by incubation in bovine serum albumin (BSA) 3% in TT buffer. Diluted (1:500 or 1:1,000) primary antibodies (Rabbit, GeneCust®, directed against CVFDTLGGGHVPPY and CFDSLGGGSFLG-amidation) in TT buffer were applied on the sections and incubated overnight at 4°C. Conjugated anti-rabbit antibody peroxidase diluted 1:500 in TT buffer (Invitrogen™ A16029) was applied on the sections and incubated 1 hour at room temperature. Cells and nervous fibers containing immunolabelled material were visualized using diaminobenzidine (SIGMAFAST™ 3,3'-diaminobenzidine tablets) as a chromogen. Slides were finally counterstained with hematoxylin for 30 seconds. The primary antibody was preabsorbed with 20 µg/mL of antigen as a negative control for specificity. Alternatively, the primary antibody was omitted.

2.5 Peptide synthesis

All Fmoc amino acid residues, *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) and Rink amide 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin were purchased from Christof Senn Laboratories (Dielsdorf, Switzerland) or Novabiochem (Darmstadt, Germany). Preloaded 4-hydroxymethylphenoxymethyl-copolystyrene-1%-divinylbenzene (HMP) resins were obtained from Life Technologies (Villebon sur Yvette, France). *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA), piperidine, acetic anhydride (Ac₂O), TFA, triisopropylsilane (TIS), *tert*-butylmethylether (TBME) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). *N*-methylpyrrolidone (NMP) and dimethylformamide (DMF) were purchased from Biosolve (Dieuze, France). Dichloromethane (DCM) and acetonitrile were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Peptides were synthesized by solid phase methodology on a 433A Applied Biosystems peptide synthesizer at a 0.1-mmol scale using the standard procedures, as previously described (Leprince et al., 2001). All Fmoc-amino acids (1 mmol, 10 eq.) were coupled, either on a Fmoc-Gly-HMP, a Fmoc-Leu-HMP, a Fmoc-Tyr(*t*Bu)-HMP, a Fmoc-Val-HMP or a Rink amide resin, by *in situ* activation with HBTU (0.9 mmol, 9 eq.) and DIEA (2.5 mmol, 25 eq.) in NMP including a capping step (Ac₂O) before Fmoc removal (piperidine 20 % in NMP). Reactive side-chains were protected as follows: Asp and Glu, *O*-*tert*-butyl (*Or*Tu) ester; His, trityl (Trt) amine; Ser, Thr and Tyr, *tert*-butyl (*t*Bu) ether. After completion of the chain assembly, peptides were cleaved from the resin by adding 10 ml of a TFA/TIS/H₂O (9.5:0.25:0.25) mixture for 120 min at room temperature as previously described (Chatenet et al., 2006). Crude peptides were precipitated by adding TBME, centrifuged (4,500 rpm), washed three times in TBME, and freeze-dried. The synthetic peptides were purified by reverse-phase HPLC on a 2.2 x 25 cm Vydac 218TP1022 C₁₈ column using a linear gradient (10 to 50% in 45 min) of CH₃CN/TFA (99.9:0.1) at a flow rate of 10 mL/min. The purified peptides were then characterized by MALDI-TOF mass spectrometry on a Voyager DE PRO in the reflector mode using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix. Analytical HPLC, performed on a 0.46 x 25 cm Vydac 218TP54 C₁₈ column, indicated that the purity of all peptides was >99.9%.

2.6 Myotropic bioassay

The myotropic bioassay was performed using different contractile organs involved in egg-laying: the MNGs, the distal oviduct, the proximal oviduct, and the ovarian stroma. Each organ was suspended on a dynamometer (Dynamometer UF1, Pioden controls Ltd) in a muscle chamber, with a nylon thread (0.12-mm diameter). The signal was amplified by an amplifier (SGA 920201-01, Bionic instrument) and contractions were displayed on a printer (L200E, Linseis) or with Serial Arduino

plotter_1.1. This second imaging method is a homemade digital voltmeter based on Arduino technology (<https://www.arduino.cc>) coupled to the Qt application programming interface (<https://www.qt.io>). The muscle chamber was perfused at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ with perfusion solution and maintained at 18 °C. Increasing concentrations of synthetic peptides 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.

3. Results

3.1 Identification of FLGamide precursors

The *in silico* analyses of the new transcriptome assembly identified two similar complete protein precursors (Figure 02) probably derived from alternative splicing. The first precursor, named FLGaA, encoded the six neuropeptides; it carried 7 copies of neuropeptide FLGa III and a single copy of the other neuropeptides. The second precursor, FLGaB, differed only by an additional copy of neuropeptide FLGa III.

3.2 Tissue mapping by mass spectrometry

Mass spectrometry analyses were carried out on the distal part of the MNG, on the proximal oviduct, as well as on the most distal part of the oviduct (the flag). FLGa neuropeptides I, II, and III were detected in these three structures. The other three neuropeptides predicted on the precursor were not detected.

3.3 Tissue mapping by immunocytochemistry

In the oviduct gland, cells immunostained with the anti-FLGa antibody were detected in the secretory areas (Figure 03 A). Nerve fibers labeled with the same antibody were also observed in the connective tissue that surrounds the gland. Similar observations were made with the anti-PYY antibody (Figure 03 B). The oviduct contained endings labeled with the two antibodies, as well as cells with their cytoplasm labeled with the anti-FLGa antibody (Figure 03 C-D). In the main nidamental gland, bundles of labeled nerve fibers were abundantly detected in the distal portion of the gland, with both antibodies diluted at 1/500. In the ovarian stroma, nerve endings labeled with anti-FLGa and anti-PYY antibodies (Figure 03 F) diluted at 1/500 were detected. All immunocytochemistry images of accessory glands are available in the supplementary data (S01). In the central nervous system, anti-PYY and anti-FLGa antibodies were used at a 1/1000 dilution. Fibers and neurons labeled with both antibodies were observed in the palaeovisceral (Figure 04) and brachial lobes of the suboesophageal mass (unpublished data), specifically in the ventral portion of these lobes (relatively to the animals). Nerve fibers labeled with the



Fig 2 : Sequence alignment of FLGamide protein precursors in *Sepia officinalis* and *Loligo pealeii*.

anti-PYY antibody were also observed in the most dorso-posterior part of the medial basal lobe of the supra-esophageal mass (data not shown).

3.4 Biological activity

Two neuropeptides were used in the biological activity tests to represent each peptide type: peptide FLGa 1 for neuropeptides with a PYY-type C-terminal end, and peptide FLGa 3 for neuropeptides with an FLGamide-type C-terminal end. Increasing peptide concentrations were used to test the contractile activity of the ovarian stroma, distal oviduct, and main nidamental glands of egg-laying and vitellogenesis females, and also of the penis and gills of mature males. No activity was observed in male organs or in the organs of vitellogenesis females. Similarly, no activity was observed in the ovarian stroma, regardless of the cuttlefish maturity state.

Both neuropeptides had a dose-dependent myosuppressive activity on the mature distal oviduct: they triggered a sharp fall in tonus (Figure 05) at 10^{-8} and 10^{-9} M, then the tonus increased gradually. Additional biological activity figures are available in supplementary data S02.

The tests carried out on mature main nidamental glands showed heterogeneous biological activity of the two neuropeptides: at 10^{-6} M, FLGa 1 increased the amplitude of the contractions of the gland (Figure 06 A). At this same concentration, it also induced an increase in tonus (Figure 06 B). At 10^{-6} M, neuropeptide FLGa 3 triggered a slight temporary increase in tonus followed by a slight temporary decrease in the amplitude of the contractions (Figure 06 C). At 10^{-8} M, this same neuropeptide induced a marked decrease in the amplitude of the contractions (Figure 06 D). After *ca.* fifteen minutes, the amplitude of the contractions returned to the basal level. In order to check the existence of a synergy between FLGamide and other neuropeptides, we conducted an experiment on the main nidamental gland (Figure 07). Firstly, 10^{-6} M FMRFamide was dripped into the vessel (Figure 07A), followed by dripping of FLGa 3 at 10^{-6} M (Figure 07B). Then, the two neuropeptides were dripped simultaneously at 10^{-6} M (Figure 07 C). The

neuropeptide mixture triggered a sharp increase of the amplitude of the gland contractions. A similar but more intense and lasting effect was observed on this same gland with the simultaneous dripping of FMRFamide and FLGa1 at 10^{-6} M (Figure 07 D).

4. Discussion

The results of the present study provide insights into the role of a family of neuropeptides found in the whole *S. officinalis* female genital tract in the regulation of spawning.

The expression profile determined from the 16 transcriptomes sequenced by Zatylny-Gaudin et al (Zatylny-Gaudin et al., 2016) (BioProject PRJNA242869) made it possible to highlight that transcripts were localized in the three main regions of the central nervous system (OL, SupEM, and SubEM). The SUBEM is the region of the CNS that innervates the visceral mass and the genital tract, as well as the only neurohemal area described to date in cuttlefish (Alexandrowicz, 1965, 1964, 1960; Tompset, 1939). Moreover, expression levels much lower than in the CNS were observed in the glands involved in the secretion of the inner and outer capsules of the egg (Figure1C).

The occurrence of neuropeptide transcripts in these glands allows us to speculate about the mechanisms responsible for the rapid response induced by external stimuli. These mechanisms could be regulated by netrin-1 as described in *Aplysia californica* (Kim and Martin, 2015). The binding of netrin-1 to the cytoplasmic domain of the netrin-1 receptor called DCC (for Deleted Colorectal Cancer) increases translation of subcellular mRNAs located in dendrites or axons. An ultrastructure study revealed the occurrence of rough endoplasmic reticulum, smooth reticulum and Golgi apparatus in the axonal compartment; therefore the mRNAs detected in axons could be translated very close to the target tissue (Merienda and Twiss, 2013).

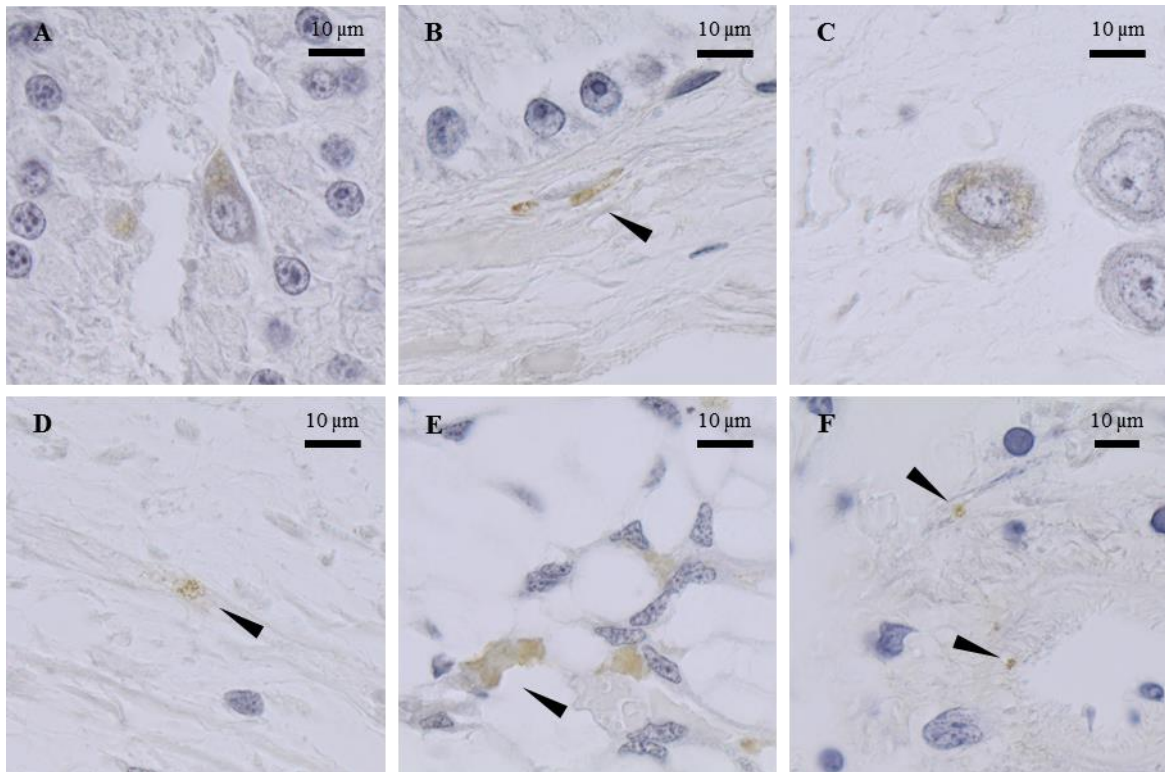


Fig 4 : Tissue mapping by immunocytochemistry of PYY and FLG α neuropeptides. Transversal sections of genital apparatus of mature female cuttlefish. (A): Presence of cells with immunostained cytoplasm in the OvG with FLG α antibodies. (B): Presence of immunostained end fibers in the OvG with PYY antibodies. (C): Presence of cells with immunostained cytoplasm in the wall of oviduct with FLG α antibodies. (D): Presence of immunostained end fibers in the wall of oviduct with PYY antibodies. (E): Presence of immunostained fiber bundles in the distal end of the MNG with PYY. (F): Presence of immunostained end fibers in the ovarian stroma with PYY antibodies. Arrowheads indicate the immunostained end fibers.

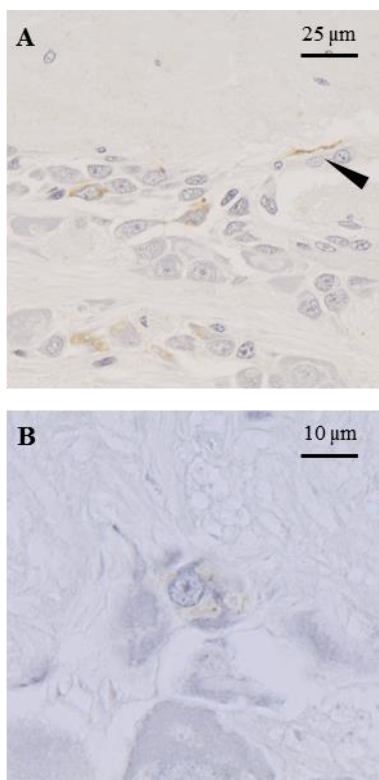


Fig 3 : Immunocytochemical detection of neuropeptides of the FLGamide family in the SubEM of the pallevisceral lobe in female cuttlefish. (A): A group of neurons and a nerve fiber immunostained with the PYY antibodies. (B): A neuron with immunostained cytoplasm with FLG α antibodies. Arrowhead indicates immunostained nerve fiber.

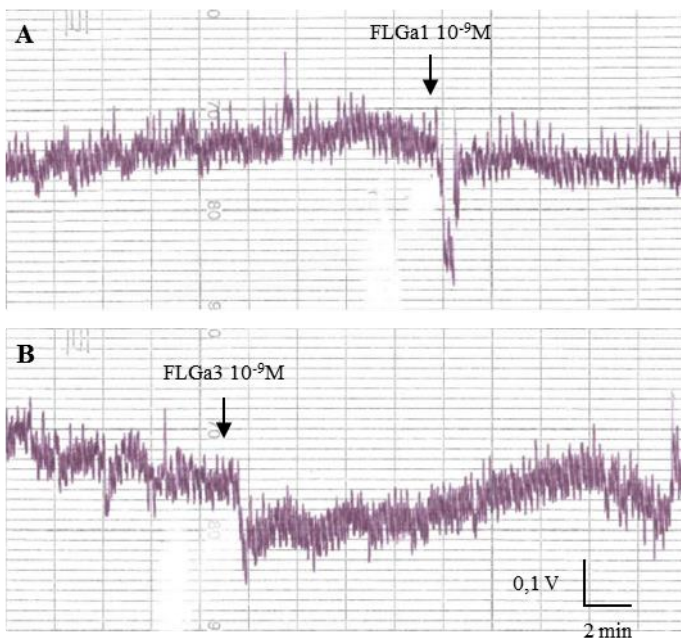


Fig 5 : Biological activity of neuropeptides (A): FLGa1 and (B): FLGa3 applied to the distal distal oviduct of mature cuttlefish. The two neuropeptides trigger a reversible fall of oviduct tonus.

Moreover, we have to take into account local expression by isolated peripheral cells. Immunocytochemistry investigations in cuttlefish revealed immunostained nervous fibers and cells located in the MNG and OvG. The neuropeptides detected in these glands by mass spectrometry could therefore have 3 distinct, possibly complementary origins. (1) they may be expressed in the cellular body of a central neuron of the SubEM and carried to the target organ via axonal vesicles; (2) they may be expressed from mRNAs delocalized in terminal axons by nexin, as described in *Aplysia*; (3) they may be expressed and secreted by peripheral cells (neurons ?) scattered across the glandular tissue, as observed in the present study.

The immunostained cells observed in the secretory tissue of the oviduct gland and MNG, along with a few labeled nerve fibers, differed from the adjacent secretory cells by a different morphology. This suggests that they were not glandular cells involved in the synthesis of capsule products. Endocrine cell dispersal at the peripheral level in the genital tract has already been described in different invertebrates such as crustaceans, using cells immunostained with an anti-molluscan ELH antibody in the female gonad (Liu et al., 2009, 2006) or with a specific anti-ELH antibody in the gastropod *H. asinina* (Saitongdee et al., 2005). These cells may therefore be the source of local neuropeptide secretion in the target tissue, i.e. of paracrine regulation.

In the MNG, labeled nerve fibers were mostly found at the most distal end of the gland, near the distal end of

the main collecting duct located in the main axis of the gland. Similar labeling has already been detected in this area with an anti-CCAP antibody (Endress et al., *in press*). This highly muscular canal contracts to discharge secretions into the mantle cavity when oocytes pass through it. Therefore our immunostaining results are in agreement with our mass spectrometry analyses.

In the CNS, immunostained neurons and fibers were detected in the palaeovisceral and brachial lobes of the SubEM as well as in the median lobe of the SupEM. These results confirm mass spectrometry results from SupEM and SubEM (Zatylny-Gaudin et al., 2016). Moreover, they make it possible to specify the localization of the expression sites of the peptides in the lobes. The detection of labeled neurons in the palaeovisceral lobe is consistent with the presence of immunostained nerve fibers in the accessory glands of the female genital tract since this lobe innervates the viscera and the genital tract. Moreover, the palaeovisceral lobe innervates the neurohemal area of the vena cava, and this is also in agreement with the detection of all the mature neuropeptides by mass spectrometry in the neurohemal area and the haemolymph of egg-laying females (Zatylny-Gaudin et al., 2016).

The biological activity tests revealed that FLGamide had a biological activity in the genital tract of egg-laying females, but no activity was observed in male genital organs or in the genital tract of vitellogenesis females. The neuropeptides decreased the tonus of the distal oviduct in a dose-dependent manner, demonstrating their involvement in oocyte transport through the modification of peristalsis. They can also be involved in blocking oocytes to avoid their emission in the mantle cavity of unmated females. Similar activity from serotonin of ovarian origin has already been described in cuttlefish (Zatylny et al., 2000a) and by SepCRPs (Bernay et al., 2005, 2004). At the level of the main nidamental gland, which secretes the outer capsule of the egg, the results of the myotropic tests were more heterogeneous. However, thanks to the synergy test carried out in this study, we highlighted that FLGamide worked in association with FMRFamide, and increased its myoexcitator effect. Nevertheless, the effects of FLGAmides alone showed that they are probably involved in the secretory mechanisms that release capsular products. As for the heterogeneity of the results, it was attributable to the fact that cuttlefish were caught in the wild. It was impossible to tell whether the females we tested had ever laid eggs, once, twice or more, or if they were senescent, unless the first signs of loss of control of buoyancy and orientation were already visible. This means that although the females we tested were all sexually mature, they were likely to be more or less advanced in their spawning period and therefore more or less receptive to stimulation. These parameters

undoubtedly induced variations in the intensity of the responses observed during the myotropic tests.

On the other hand, it is important to take into account the fact that under physiological conditions, target organs are subjected to the stimulation of a complex cocktail of regulatory peptides, ovarian peptides, neuropeptides, and even sexual pheromones for the organs of the genital system that bathe in the mantle cavity. The activity recorded when an isolated neuropeptide is applied on a target organ makes it possible to predict the presence of specific receptors. Yet, it does not in any way enable us to predict the characteristics of this activity because the neuropeptide is part of a set that is lacking during the myotropic tests.

The C-terminal PYY and FLGamide ends of the neuropeptides predicted from mRNA and then confirmed by mass spectrometry were quite unique according to current available data. Nevertheless, it appeared that this neuropeptide family presented important sequence homology with neuropeptide families well described in protostomians, especially in arthropods. Multiple alignments revealed a strong conservation of the GGG domain common to orcokinin B and C (Figure 08). However, the hexapeptide domain DS (L/I)GGG characteristic of FLGamide appeared best preserved in orcokinin B. From a physiological viewpoint, in cockroach (*Blattella germanica*), orcokinin B is involved in the control of vitellogenesis and oocyte growth in adult females (Ons et al., 2015). However, the localization of cuttlefish FLGAmides in nerve endings innervating the ovary suggests a similar role in the regulation of vitellogenesis. This strong structural homology associated with functional convergence led us to rename this neuropeptide family So-orcokinin B. A first neuropeptide family had been annotated orcokinin B by Zatylny et al. (Zatylny-Gaudin et al., 2016).

However, given the high variability of the C-terminal domain of the DSI motif, it seemed to us more coherent to rename it So-orcokinin A.

Besides, we should point out an annotation error in *O. bimaculoïdes* and *L. pealeii*, in which orcokinin B are annotated "Feeding circuit activating neuropeptides" (FCANs). Figures 9A and 9B show a significant divergence between the consensus sequences of insect FCANs and *Octopus* and *Loligo* pseudo FCANs. In addition, So-orcokinin B have strong homology at the level of the primary sequences of *Octopus* and *Loligo* pseudo FCAN, especially with characteristic N-terminal elongations. Therefore we believe that *Octopus* and *Loligo* pseudo FCANs are orcokinin B.

In summary, this article presents first evidence that a neuropeptide family initially called FLGamide and renamed So-orcokinin B is expressed both in the CNS and peripheral cells associated to the glandular epithelium of cephalopods. So-orcokinin B may

regulate various steps of egg-laying such as oocyte transport and egg capsule secretion. As orcokinin B are both neurohormones and neuromodulators in *S. officinalis*, we can suspect them to be involved in the regulation of egg capsule biosynthesis. Further studies will allow us to check this hypothesis. On the other hand, the role played by So-orcokinin B in the ovary has to be elucidated. Although they are not involved in the release of oocytes into the genital coelom, as shown in this study, their occurrence in the nerve endings of the ovarian stroma suggests a possible involvement in the regulation of vitellogenesis, as described in insects. Finally, this study allowed us to correct annotations of *S. officinalis* FLGamide, as well as *O. bimaculoïdes* and *L. pealeii* FCANs, by newly annotating them as orcokinin B.

Disclosure

The authors declare that there is no conflict of interest.

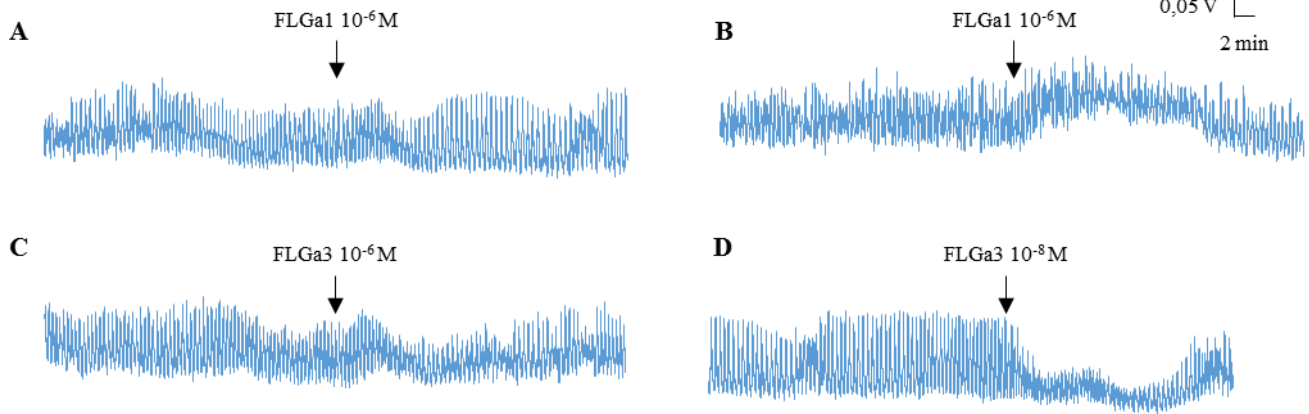


Fig 6 : Biological activity of the neuropeptides FLGa1 (A and B) and FLGa3 (C and D) on the MNG of mature cuttlefish. FLGa 1 tends to have a myoexcitatory effect, whereas FLGa 3 tends to have a myosuppressive effect.

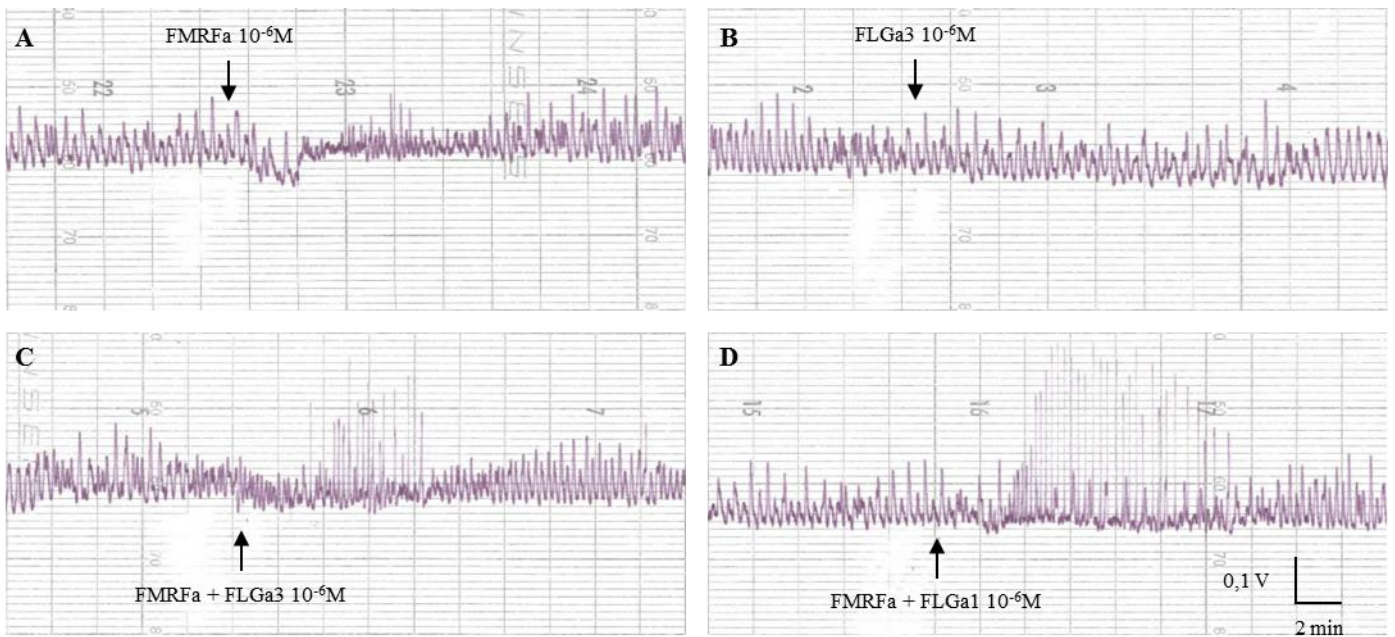


Fig 7 : Synergistic activity of FLGamide with FMRFa, biological activity on MNG of mature cuttlefish. (A): FMRFa alone, (B): FLGa3 alone, (C): potentiation of FMRFa by FLGa3, (D): potentiation of FMRFa by FLGa1. Neuropeptides of the FLGamide family act in synergy with FMRFamide on MNG, triggering a temporary myoexcitatory effect.

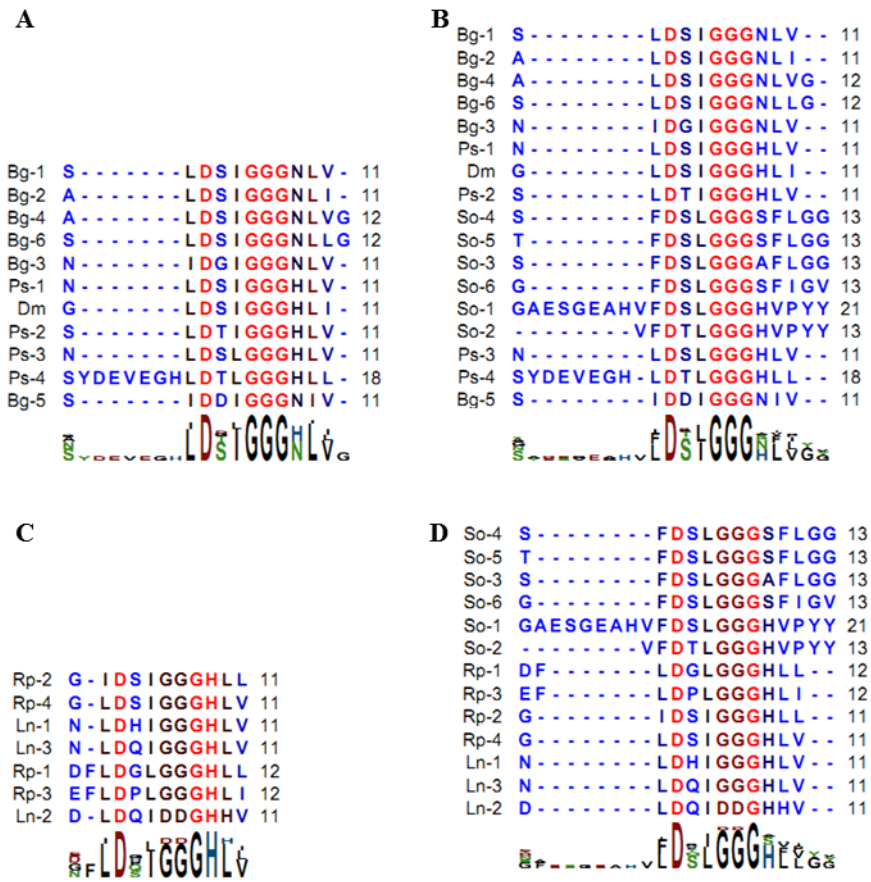


Fig 8 : (A): Pattern of orcokinin B in insects. Bg: *Blatella germanica* (AKR13996.1). Ps: *Plautia stali* (BAV788822.1). Dm: *Drosophila melanogaster* (NP_002261160.1). (B): Multiple sequence alignments of orcokinin B of Bg, Ps, Dm and FLGamide of *S. officinalis*. (C): Pattern of orcokinin C in insects. Rp: *Rhodnius prolixus* (AGW15565.1). Ln: *Lasius niger* (KMQ93900.1). (D): Multiple sequence alignments of orcokinin C of Rp, Ln and FLGamide of *S. officinalis*.

A

Dr-FCAN1 ALDS LGGFQVHGW 13
 Dr-FCAN3 SLDS LGGFQVHGW 13
 Dr-FCAN4 ALDSL GDFQVHGW 13
 Ac-FCAN2 ALDS LGGFQVHGW 13
 Ac-FCAN3 ALDT LGGFQVHGW 13
 Ac-FCAN6 SLDS LGSFQVHGW 13
 Dr-FCAN2 SLSS LGGFQVHGW 13
 Ac-FCAN4 QVDR LGGFQVHGW 13
 Ac-FCAN5 QVDSL GGFQVHGW 13
 Ac-FCAN7 NLNN LGSFQVHGW 13
 Ac-FCAN1 VFDSL GGYEVHGF 13

B

Ob-FCAN1 N - - - - - FDSLGGAFMPGG 13
 Ob-FCAN2 N - - - - - FDSLGGAFMPGG 13
 Ob-FCAN3 S - - - - - FDSLGGAFMPGG 13
 Ob-FCAN5 Q - - - - - FDSLGGAFMPGG 13
 Ob-FCAN7 QDDR PYLWQPFDSLGGAFMPGG 22
 So-orcoB3 S - - - - - FDSLGGGAFLLGG 13
 Lp-FCAN3 S - - - - - FDSLGGGAFLLGG 13
 So-orcoB4 S - - - - - FDSLGGGSFLLGG 13
 Lp-FCAN4 S - - - - - FDSLGGSAFLGG 13
 Ob-FCAN6 Q - - - - - FDSLGGAFLPNI 13
 So-orcoB5 T - - - - - DSLGGGSFLLGG 12
 So-orcoB6 G - - - - - FDSLGGGSFLLGG 13
 Lp-FCAN5 S - - - - - FDSLGGSSFLLGG 13
 Ob-FCAN4 T - - - - - FDSLGGAFMPVG 13
 So-orcoB1 GAE - SGEAHV FDSLGGGHVPYY 21
 Lp-FCAN1 GAE - PSEAHV FDSLGGGHVPYY 21
 So-orcoB2 - - - - - VFDTLGGGHVPYY 13
 Lp-FCAN2 - - - - - VFDSLGGGHVPYY 13

Fig 9 : (A): Pattern of feeding circuit activating neuropeptides (FCANs) in insects. Bg: *Blattella germanica* (AKR13996.1). Ps: *Plautia stali* (BAV788822.1). Dm: *Drosophila melanogaster* (NP_002261160.1). (B): Aligement of pseudo feeding circuit activating neuropeptides of *Octopus bimaculoïdes* (XP_014768639.1), *Loligo pealeii* with So-orcokinin B of *S. officinalis*.

Acknowledgments

We thank Jean-Luc Blaie and Maxime Marie, captains of the professional fishing boats “Père Daniel” and “Bip-Bip”, and their crews for their valuable help in providing cuttlefish. We thank Beatrice Adeline for technical support in histological analyses, and Christophe Roger for technical support in the construction of specific facilities. We thank Didier Goux from the technical platform CMAbio for his help in optical microscopy. We thank Drs Baptiste Legrand and Matthieu Simon for their help with the AMBER software program. This work was financed by the ANR “NEMO” and the Conseil regional of BASSE-NORMANDIE.

References

- [1] B. Bernay, J. Gagnon, J. Henry, Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 215–222. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.085.
- [2] B. Bernay, M. Baudy-Floc’h, B. Zanuttini, J. Gagnon, J. Henry, Identification of SepCRP analogues in the cuttlefish *Sepia officinalis*: A novel family of ovarian regulatory peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (2005) 1037–1047. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.034.
- [3] C. Zatylny, F. Durantou, E. Boucaud-Camou, J. Henry, Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying, *Mol. Reprod. Dev.* 55 (2000) 182–188. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200002)55:2<182::AID-MRD7>3.0.CO;2-B.
- [4] J. Henry, V. Cornet, B. Bernay, C. Zatylny-Gaudin, Identification and expression of two oxytocin/vasopressin-related peptides in the cuttlefish *Sepia officinalis*, *Peptides.* 46 (2013) 159–66. doi:10.1016/j.peptides.2013.05.004.
- [5] J. Henry, C. Zatylny, E. Boucaud-Camou, Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: Involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides, *Peptides.* 20 (1999) 1061–1070. doi:10.1016/S0196-9781(99)00102-3.
- [6] J. Henry, P. Favrel, E. Boucaud-Camou, Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the motility of the mature oviduct in the cuttlefish, *Sepia officinalis*, *Peptides.* 18 (1997) 1469–1474. doi:10.1016/S0196-9781(97)00241-6.
- [7] B. Bernay, M. Baudy-Floc’h, J. Gagnon, J. Henry, Ovarian jelly-peptides (OJPs), a new family of regulatory peptides identified in the cephalopod *Sepia officinalis*, *Peptides.* 27 (2006) 1259–68. doi:10.1016/j.peptides.2005.11.025.
- [8] C. Zatylny, J. Gagnon, E. Boucaud-Camou, J. Henry, The SepOvotropin: A New Ovarian Peptide Regulating Oocyte Transport in *Sepia officinalis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 1013–1018. doi:10.1006/bbrc.2000.3595.
- [9] C. Zatylny, J. Gagnon, E. Boucaud-Camou, J. Henry, ILME: A Waterborne Pheromonal Peptide Released by the Eggs of *Sepia officinalis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (2000) 217–222. doi:10.1006/bbrc.2000.3286.

- [10] J. Enault, C. Zatylny-Gaudin, B. Bernay, B. Lefranc, J. Leprince, M. Baudy-Floc'h, J. Henry, A complex set of sex pheromones identified in the cuttlefish *Sepia officinalis*., *PLoS One*. 7 (2012) e46531. doi:10.1371/journal.pone.0046531.
- [11] V. Cornet, J. Henry, D. Goux, E. Duval, B. Bernay, G. Le Corguillé, E. Corre, C. Zatylny-Gaudin, How Egg Case Proteins Can Protect Cuttlefish Offspring?, *PLoS One*. 10 (2015) e0132836. doi:10.1371/journal.pone.0132836.
- [12] S. Boletzky, Fecundity variation in relation to intermittent or chronic spawning in the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Mollousca, Cephalopoda), *Bull. Mar. Sci.* 40 (1987) 382–387.
- [13] V. Van In, N. Ntalamagka, W.O. Connor, T. Wang, D. Powell, S.F. Cummins, A. Elizur, Peptides Reproductive neuropeptides that stimulate spawning in the Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*), *Peptides*. 82 (2016) 109–119. doi:10.1016/j.peptides.2016.06.007.
- [14] S. Arch, Biosynthesis of the egg-laying hormone (ELH) in the bag cell neurons of *Aplysia californica*, *J. Gen. Physiol.* 60 (1972) 102–119. doi:10.1085/jgp.60.1.102.
- [15] A.Y. Chiu, M.W. Hunkapiller, E. Heller, D.K. Stuart, L.E. Hood, F. Strumwasser, Purification and primary structure of the neuropeptide egg-laying hormone of *Aplysia californica*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 6656–6660. doi:10.1073/pnas.76.12.6656.
- [16] A.Y. Chiu, F. Strumwasser, An Immunohistochemical Study of the Neuropeptidergic Bag Cells of *Aplysia*, *J. Neurosci.* 1 (1981) 812–826.
- [17] R.H. Ebberink, H. van Loenhout, W.P. Geraerts, J. Joosse, Purification and amino acid sequence of the ovulation neurohormone of *Lymnaea stagnalis*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 7767–71. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=391415&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [18] W.P.M. Geraerts, P. Cheeseman, R.H.M. Ebberink, K. Nuyt, T.M. Hogenes, Partial purification and characterization of the ovulation hormone of the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*, *Gen. Comp. Endocrinol.* 51 (1983) 471–476. doi:10.1016/0016-6480(83)90064-3.
- [19] E. Vreugdenhil, W.P.M. Geraerts, J.F. Jackson, J. Joosse, The molecular basis of the neuro-endocrine control of egg-laying behaviour in *Lymnaea*, *Peptides*. 6 (1985) 465–470. doi:10.1016/0196-9781(85)90415-2.
- [20] P.S. York, S.F. Cummins, S.M. Degnan, B.J. Woodcroft, B.M. Degnan, Marked changes in neuropeptide expression accompany broadcast spawnings in the gastropod *Haliotis asinina*, *Front. Zool.* 9 (2012) 9. doi:10.1186/1742-9994-9-9.
- [21] 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, *J. Proteome Res.* 15 (2016) 48–67. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00463.
- [22] R.A. Gonçalves, C. Aragão, P.A. Frias, A. V. Sykes, The use of different anaesthetics as welfare promoters during short-term human manipulation of European cuttlefish (*Sepia officinalis*) juveniles, *Aquaculture*. 370–371 (2012) 130–135. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.014.
- [23] J. Leprince, H. Oulyadi, H. Vaudry, O. Masmoudi, P. Gandolfo, C. Patte, J. Costentin, J.-L. Fauchère, D. Davoust, H. Vaudry, M. Tonon, Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist., *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 6045–6057.
- [24] D. Chatenet, C. Dubessy, C. Boullaran, E. Scalbert, B. Pfeiffer, P. Renard, I. Lihmann, P. Pacaud, M.C. Tonon, H. Vaudry, J. Leprince, Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogues: Identification of a urotensin II antagonist, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7234–7238. doi:10.1021/jm0602110.
- [25] J.S. Alexandrowicz, The neurosecretory system of the vena cava in Cephalopoda II. *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris*, *J. Mar. Biol.* (1965) 209–228. doi:10.1017/S0025315400024681.
- [26] J.S. Alexandrowicz, The Neurosecretory System of the Vena Cava In Cephalopoda I. *Eledone Cirrosa*., *J. Mar. Biol.* (1964) 111–132. doi:10.1017/S0025315400024681.
- [27] J.S. Alexandrowicz, Innervation of the Hearts of *Sepia officinalis*, *Acta Zool.* 41 (1960) 65–100. doi:10.1111/j.1463-6395.1960.tb00475.x.
- [28] D.H. Tompset, *Sepia*, The University Press of Liverpool, Liverpool, 1939.
- [29] S. Kim, K.C. Martin, Neuron-wide RNA transport combines with netrin-mediated local translation to spatially regulate the synaptic proteome., *Elife*. 2015 (2015) 1–24. doi:10.7554/eLife.04158.
- [30] T. Merianda, J. Twiss, Peripheral nerve axons contain machinery for co-translational secretion of

axonally-generated proteins, *Neurosci. Bull.* 29 (2013) 493–500. doi:10.1007/s12264-013-1360-9.

[31] Z. Liu, J. Donald, P. Hanna, P. Nuurai, P. Sobhon, Comparative distribution of a putative egg-laying hormone in neural and reproductive tissues of four Decapoda crustaceans, *Invertebr. Neurosci.* 9 (2009) 21–28. doi:10.1007/s10158-009-0087-9.

[32] Z. Liu, P. Sobhon, B. Withyachumnarnkul, P. Hanna, Identification of a putative egg-laying hormone in neural and ovarian tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using immunocytochemistry, *Invertebr. Neurosci.* 6 (2006) 41–46. doi:10.1007/s10158-006-0016-0.

[33] P. Saitongdee, S. Apisawetakan, N. Anunruang, T. Poomthong, P. Hanna, P. Sobhon, Egg-laying-hormone immunoreactivity in the neural ganglia and ovary of *Haliotis asinina* Linnaeus, *Invertebr. Neurosci.* 5 (2005) 165–172. doi:10.1007/s10158-005-0032-5.

[34] S. Ons, X. Bellés, J.L. Maestro, Orcokinin contribute to the regulation of vitellogenin transcription in the cockroach *Blattella germanica*, *J. Insect Physiol.* 82 (2015) 129–133. doi:10.1016/j.jinsphys.2015.10.002.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence l'implication des *SoCCAPs* et des *FLGamides* dans le processus de ponte.

L'activité biologique des *SoCCAPs* a été étudiée avec le peptide *SoCCAP1*, les 3 *SoCCAPs* ayant des séquences primaires très voisines. On observe un effet myo-suppresseur dose-dépendant sur les GNP et sur l'oviducte. Ces activités se traduisent par une implication à la fois sur la sécrétion capsulaire mais également sur le transport de l'ovocyte. L'effet myo-suppresseur, déjà observé avec la 5-HT (Zatylny et al., 2000a) ou les *SepCRPs* ((Bernay et al., 2005, 2004) peut s'expliquer par un contrôle de l'émission des gamètes empêchant la libération des ovocytes si la femelle ne s'est pas accouplée au préalable. De plus, les tests myotropes menés sur la veine cave viennent confirmer l'implication des *SoCCAPs* au niveau de l'appareil circulatoire, et donc la convergence fonctionnelle de ces neuropeptides entre Arthropodes et Céphalopodes (et sans doute Mollusques).

Il est important de rappeler que les tests *ex vivo* sont réalisés avec des doses croissantes d'un unique neuropeptide, ce qui ne correspond absolument pas aux conditions physiologiques. En effet, l'activité contractile de l'oviducte et des glandes est en réalité régulée par un cocktail de neuropeptides et de peptides ovariens pour l'essentiel, impossible à reproduire expérimentalement. L'activité mesurée pour chacun des peptides régulateurs ne permet pas de conclure quant à l'activité en conditions physiologiques, mais seulement d'en déduire la présence de récepteurs spécifiques au niveau du tissu cible.

La cartographie tissulaire réalisée en immunocytochimie met en évidence une forte densité de fibres et de neurones immunopositifs dans le lobe palléoviscéral de la MSSO. Ce lobe innerve les viscères, l'appareil génital et l'aire neurohémale de veine cave. La détection des *SoCCAPs* dans ce lobe est donc cohérente avec une implication dans le processus de ponte.

La détection de terminaisons nerveuses immunopositives dans la partie distale de la GNP et dans la GOVI a motivé la réalisation de nouvelles analyses en spectrométrie de masse. Ces analyses ont permis de détecter les 3 *SoCCAPs* dans la région distale de la GNP, dans la GOVI et dans les oviductes proximal et distal. Par ailleurs, des peptides cryptiques issus du précurseur des *SoCCAPs* ont aussi été détectés en spectrométrie de masse dans ces organes. De futures investigations, s'appuyant notamment sur des tests d'activité biologique et des détections

immunocytochimiques, devraient permettre d'explorer l'hypothèse d'un rôle éventuel du cryptome dans la régulation de la ponte.

Au cours de cette étude, le récepteur des SoCCAPs a été identifié *in silico*. L'expression très localisée de ce récepteur dans la GOVI et les GNP est cohérente avec les activités biologiques mesurées. Une localisation tissulaire par une approche immunocytochimique devra être mise en œuvre pour réaliser un criblage global des structures associées à l'appareil génital.

Les FLGamides constituent la seconde famille de neuropeptides étudiée dans ce document. Identifiés pour la première fois par Zatylny-Gaudin et *al.* (2016), les FLGamides ne sont pas surexprimés chez les femelles en ponte, cependant ils sont détectés dans l'ensemble du tractus génital des femelles, notamment dans le stroma ovarien où ce sont les seuls neuropeptides détectés. Le stroma ovarien est une structure conjonctivo-musculaire responsable de la libération des ovocytes matures dans le coelome génital. On ne connaît pas de régulateurs impliqués dans cette libération. La présence de neuropeptides dans cette structure semble donc apporter un élément de réponse à la régulation de ce processus. Les FLGamides ont aussi été détectés dans l'hémolymphe ce qui indique qu'ils ont un mode d'action en tant que neurohormone, en plus d'être neuromodulateurs. Précédemment, trois séquences incomplètes de précurseurs avaient été décrites. Dans cette étude, de nouvelles analyses dans les banques de données ont permis d'identifier deux séquences complètes qui ne diffèrent que d'une seule copie d'un neuropeptide. L'analyse du précurseur indique que deux types de FLGamides peuvent être différenciés sur la base de leur extrémité C-terminale : les PYY et les FLGamides au sens stricte (bien que l'un d'entre eux ne possède pas d'amidation). Les tests fonctionnels ont été réalisés avec un représentant de chaque catégorie : FLGa1 pour les PYY et FLGa3 pour les FLGamides au sens strict. Aucun de ces neuropeptides ne déclenche d'activité contractile sur le stroma ovarien, écartant de ce fait une implication dans la libération des ovocytes matures dans le coelome génital. Les deux neuropeptides ont une action sur le transport de l'ovocyte en modulant le péristaltisme de l'oviducte. L'effet sur les GNP, et donc sur la sécrétion capsulaire, est plus nuancé : le FLGa1 augmente temporairement le tonus, tandis que le FLGa3 diminue l'amplitude des contractions. En revanche, les deux neuropeptides agissent en synergie avec le FMRFa en amplifiant la réponse de la GNP au FMRFa. Les deux types de neuropeptides ont été détectés en immunocytochimie dans plusieurs parties du système nerveux central de femelles en ponte. Ils sont détectés dans la MSO et dans la MSSO, notamment dans le lobe palléoviscéral qui innerve les viscères et l'appareil génital. Les deux types de neuropeptides sont aussi détectés au niveau des fibres et des faisceaux de fibres dans les GNP, dans la GOVI,

dans l'oviducte traversant la GOVI, mais également dans le stroma ovarien. Concernant la GOVI, les PYY et les FLGamides sont détectés dans le cytoplasme de certaines cellules. Ces cellules se trouvent dans les "frondes" de la glande, co-localisées avec les cellules sécrétrices. La détection des neuropeptides dans ces cellules est cohérente avec la détection des transcrits dans la GOVI. En effet, les données d'expression indiquent une expression bien plus faible des FLGamides dans la GOVI que dans le SNC, mais qui est néanmoins existante. Des niveaux d'expression deux fois plus faibles que dans la GOVI sont observés pour les GNP, cependant, aucune cellule au cytoplasme marqué n'a été observée en immunocytochimie dans cette dernière glande. Enfin, les FLGamides ont été renommés orcokinine B : puisqu'ils partagent le domaine hexapeptidique DS(L/I)GGG. Sur le plan fonctionnel, l'orcokinine B module la synthèse de vitellogénine chez *Blattella germanica* (Ons et al., 2015). Chez la seiche, les FLGamides sont présents au niveau du stroma ovarien mais ne déclenchent pas d'activité contractile, on peut donc, par analogie fonctionnelle, les suspecter d'agir sur les cellules folliculaires en stimulant la synthèse de vitellines.

L'hétérogénéité des animaux pose de sérieux problèmes au niveau expérimental, en particulier pour les tests biologiques. Il est en effet difficile de savoir si les femelles sexuellement matures capturées par la pêche professionnelle ont déjà pondu ou combien de fois elles ont pondu. Il est impossible de savoir si elles ont été capturées pendant une phase de ponte ou pendant une phase de repos entre deux pontes. Il est bien évident que ce paramètre influe nécessairement sur la réceptivité des organes utilisés pour les tests *ex vivo*. Ces problèmes sont inhérents aux études menées sur des espèces sauvages directement prélevées en milieu naturel.

Par ailleurs, on constate que les femelles capturées entre octobre et novembre qui sont en prévitellogenèse et que l'on conditionne en aquarium jusqu'à la maturité sexuelle à la station marine, présentent des réponses aléatoires aux stimulations et produisent des pontes avec de nombreux œufs infertiles.

D'autre part, les expérimentations réalisées en conditions *ex vivo* sur des organes isolés induisent la suppression des interactions entre les différents organes. Or, on constate chez l'aplysie que le peptide B, exprimé par la glande atriale, maintient l'activation des bag cells qui elles-mêmes expriment et sécrète l'ELH (Sherry D. Painter et al., 1988). Cet exemple permet de souligner l'importance de prendre en compte l'ensemble des organes impliqués dans les processus biologiques.

Enfin, chez la seiche qui est une espèce semelpare, le SNC subit une dégénérescence, qualifiée de « dégénérescence post reproductive », qui conduit finalement à la mort de l'animal après la période de reproduction. Ce mécanisme bien que peu visible au stade précoce, affecte le système nerveux, et en particulier la MSO (Chichery and Chichery, 1992). Chez les animaux en senescence, les prises alimentaires s'espacent jusqu'à un arrêt total des captures qui précède de peu la mort de l'animal.

Cette chute du comportement prédateur est associée à la dégénérescence du lobe basal antérieur situé dans la MSO (Chichery and Chichery, 1992). Il a été démontré que la lésion artificielle de ce lobe provoque une baisse des capacités prédatrices (Chichery and Chichery, 1987). Les expériences de Chichery et Chichery (1992) ont été réalisées sur des animaux en fin de vie, et ne montrant pas de lésions corporelles, comme on peut en observer sur des animaux très proches de la mort. Il est donc difficile de distinguer chez les femelles en ponte celles qui ont déjà entamé un processus de dégénérescence. Or, ce processus induit très certainement des variations dans les réponses aux stimulations.

*Partie II : Caractérisation de
phéromones sexuelles et
production en système
recombinant*

Partie II : Caractérisation de phéromones sexuelles et production en système recombinant

I. Introduction

A. Phéromones sexuelles, ponte et reproduction

Chez les Céphalopodes les études ciblées sur les phéromones sexuelles sont encore peu nombreuses. Toutefois, elles révèlent que les pontes jouent un rôle clé dans la libération des phéromones, comme le montrent les travaux réalisés sur la β -MSP (β -microsémipoprotéine) de *L. pealeii* (Cummins et al., 2011). Cette phéromone est produite par les glandes nidamentaires. Le stimulus visuel associé à la manipulation des œufs provoque l'agressivité des mâles (King et al., 2003). Ce comportement est interprété comme une façon de sélectionner les géniteurs les plus vigoureux (Hanlon et al., 1997). L'activité de la β -MSP associée à la manipulation des œufs semble indiquer que la phéromone est libérée par les pontes. Cette hypothèse est consolidée par le fait que la synthèse des produits capsulaires et de la phéromone est assurée par les mêmes organes. La manipulation des œufs est nécessaire pour maintenir un état d'agression (King et al., 2003), ce qui laisse penser que la β -MSP est une phéromone de contact, qui probablement ne diffuse pas dans le milieu. Elle ne serait donc pas impliquée dans l'attraction des géniteurs.

Chez la seiche, ce sont trois précurseurs de phéromones sexuelles qui ont été identifiés (Enault et al., 2012). Ces précurseurs libèrent des peptides amidés qui stimulent l'activité contractile d'organes impliqués dans la reproduction. Ces précurseurs sont surexprimés dans la glande de l'oviducte (GOVI) -glande responsable dans la sécrétion capsulaire- ce qui pose la question du rôle des pontes dans la diffusion des phéromones, à l'instar de la β -MSP de *L. pealeii*. Par ailleurs, chez la seiche les œufs ont un effet attractant sur les géniteurs (Boal et al., 2010; Enault, 2012) ce qui renforce l'hypothèse de l'existence de phéromones attractantes libérées par les pontes.

L'exemple de référence chez les Mollusques est actuellement le modèle aplysie. Chez ce Gastéropode hermaphrodite, un bouquet de phéromones sexuelles a été mis en évidence (Cummins et al., 2005; Cummins et al., 2004; Painter et al., 1998). Ces phéromones sont exprimées par la glande de l'albumine qui a une fonction analogue à celle des glandes

nidamentaires de *L.pealeii* et de la GOVI de *S.officinalis*. Le bouquet diffuse dans le milieu par le biais des œufs, induisant l'attraction des géniteurs sur les zones de ponte (Cummins et al., 2004; Painter et al., 1991), favorisant l'accouplement (Painter et al., 2003) et déclenchant la ponte (Begnoche et al., 1996). Il apparaît que des investigations ciblées sur le rôle des pontes en tant que vecteurs de phéromones sexuelles, ainsi que l'étude du milieu environnant semblent nécessaires pour l'identification et la caractérisation de phéromones impliquées dans les relations entre géniteurs et les processus liés à la ponte.

B. Phéromones sexuelles chez le genre *Aplysia*

L'aplysie (Figure 25A) est un Mollusque Gastéropode solitaire au cours de l'année, en dehors de la période de reproduction. Celle-ci induit la formation d'agrégats de reproducteurs sur des sites côtiers très localisés où ont lieu successivement accouplements et pontes (Figure 25B). Les animaux sont alors associés à de nombreuses masses d'œufs fraîchement pondus (Figure 25C) (Kupfermann and Carew, 1974). Expérimentalement, il a été démontré que les œufs ont un effet attractant sur les géniteurs (Painter et al., 1991) et que leur contact déclenche la ponte, par la stimulation des bag-cells (Begnoche et al., 1996) qui induit la libération d'ELH. D'autre part, la présence de quantités massives d'œufs sur des sites de reproduction très localisés stimule l'accouplement (Audesirk, 1977; Painter et al., 1991), ainsi qu'une réduction du temps de latence entre les accouplements (Painter et al., 1991).



Figure 25 : Le genre *Aplysia* (Linné, 1758) : un modèle pour la recherche de phéromones chez les Mollusques. (A) : *Aplysia californica* (marinebio.net), (B) : Regroupement de géniteurs (weiweigao.com). (C) : Recrutement de géniteurs à proximité d'œufs (carnivoraforum.com)

Un bouquet de phéromones sexuelles aquatiques exprimées et secrétées par la glande de l'albumine (Figure 26) est libéré par les œufs et diffuse dans le milieu extérieur (Cummins et al., 2005; Cummins et al., 2004; Painter et al., 2004, 1991).

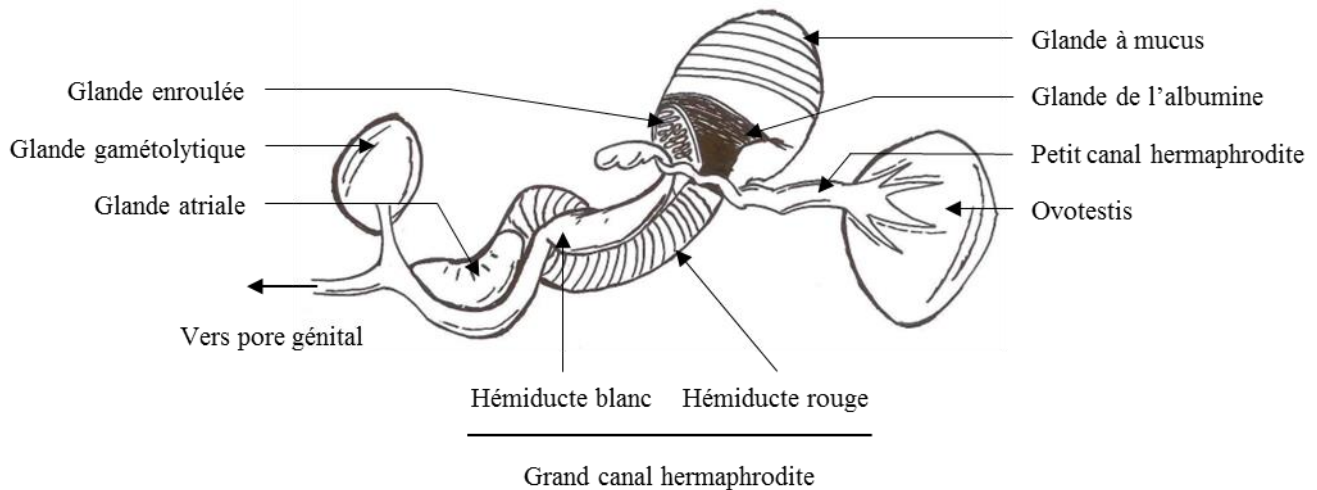


Figure 26 : L'appareil génital de l'aplysie. Schéma anatomique du tractus génital d'aplysie. Les ovocytes sont émis par l'ovotestis et sont transportés par le petit canal hermaphrodite. Ils sont ensuite fécondés et conditionnés sous forme de cordons au niveau de la masse génitale accessoire (composée des glandes à mucus, de l'albumine et enroulée). Cette masse génitale accessoire est reliée au pore génital par le grand canal hermaphrodite. Ce canal est composé des hémiductes blanc (canal copulateur) et rouge (oviducte). La glande atriale, associée à l'oviducte, sécrète des produits tels que les califines ou les peptides A et B, qui interviennent dans le processus de ponte. Les gamètes mâles sont stockés dans la glande gamétolytique. (Adapté de Cummins et al., 2005).

L'attractine (Figure 27) est la première phéromone à avoir été caractérisée chez l'espèce *Aplysia californica* (Painter et al., 1998) à partir du milieu d'incubation des œufs. Première à avoir été caractérisée chez les Mollusques, l'attractine est associée aux masses d'œufs fraîchement pondus et est fortement exprimée par la glande de l'albumine chez les individus sexuellement matures, seule glande qui exprime et sécrète le peptide (Fan et al., 1997). D'un point de vue structural, c'est un peptide de 58 résidus, riche en cystéines qui forment trois ponts disulfures intra-chaine (Schein et al., 2001), N-glycosylée au niveau de l'asparagine située en position 8, et qui est clivée à partir d'un précurseur de 76 acides aminés (Fan et al., 1997). Cette structure rend le peptide hydrophile et stable, et donc moins sensible à la dégradation (Fan et al., 1997). À noter que la N-glycosylation n'est pas impliquée dans l'activité biologique du peptide (Painter et al., 2003). La séquence primaire de l'attractine est très conservée chez le genre *Aplysia* (Figure 27) (Painter et al., 2004). Si bien qu'elle peut agir de façon croisée sur différentes espèces du genre *Aplysia*. L'attractine d'*A.californica* est active sur des individus de l'espèce *A. brasiliensis* et réciproquement. À noter qu'elle serait également active chez *L. stagnalis*, un Gastéropode pulmoné d'eau douce (Painter et al., 2003). Un motif heptapeptidique particulièrement bien conservé entre les attractines, IEECKTS, est impliqué dans le phénomène d'attraction (Cummins et al., 2004).

La caractérisation fonctionnelle de l'attractine réalisée chez *A. brasiliensis* montre qu'il faut dissocier son action associée à l'attraction des géniteurs et celle ciblant la stimulation de l'accouplement. Seule, elle contribue à la formation et au maintien de chaînes de géniteurs en facilitant l'accouplement en diminuant le temps de latence entre ces derniers (Painter et al., 2003). Par contre, elle n'est attractante qu'associée à la présence d'un individu mature. Cette observation permet de suspecter une action basée sur un mécanisme nécessitant une synergie avec d'autres phéromones aquatiques. L'activité attractante des œufs décrite par Painter et al., (1991) démontre que cette phéromone agit probablement au sein d'un bouquet de phéromones aquatiques.



Figure 27 : Alignement des attractines du genre *Aplysia*. L'heptapeptide IEECKTS est conservé chez toutes les espèces ainsi que la position des cystéines.

Certaines des phéromones attendues composant ce bouquet ont été caractérisées par Cummins et al., (2004 et 2005). Il s'agit de l'enticine, de la temptine et de la séductine. L'enticine est un peptide de 69 acides aminés (7.7 kDa), fortement exprimé par la glande de l'albumine (Figure 28). Elle est issue d'un précurseur de 88 acides aminés et possède six cystéines pouvant former trois ponts disulfures intra-chaîne. La temptine est clivée à partir d'un précurseur de 125 résidus (Figure 29) dont la maturation aboutit à un peptide de 103 acides amidés (10.9 kDa) comportant deux ponts disulfures intra-chaîne (Cummins et al., 2007b). La structure de ces deux phéromones est très conservée entre les espèces d'aplysies (*A. californica* et *A. brasiliensis*) comme le montrent les figures 28 et 29. Expérimentalement, la combinaison attractine, temptine et enticine induit un déplacement polarisé des géniteurs.



Figure 28 : Alignement de l'enticine chez 3 espèces d'aplysie.

Par ailleurs, la temptine serait un homologue des EGF de vertébrés, famille impliquée dans la formation de matrice extracellulaire (Cummins et al., 2007b). Elle formerait un complexe avec l'attractine, permettant de moduler sa fixation aux cellules sensorielles du rhinophore, facilitant ainsi la détection de la phéromone (Cummins et al., 2007b).



Figure 29 : Alignement des temptines identifiées dans le genre *Aplysia*.

Quant à la séductine il s'agit de la quatrième phéromone caractérisée chez l'aplysie (Cummins et al., 2005). Avec 192 résidus (28.9 kDa), 6 cystéines pouvant former 3 ponts intra-chaine et 3 sites de N-glycosylation, elle possède la masse moléculaire la plus élevée parmi les quatre phéromones d'aplysie identifiées (Figure 30A).

Elle est exprimée dans plusieurs organes : glandes de l'albumine et atriale, petit canal hermaphrodite et ovotestis. La séductine agit en synergie avec l'attractine, et comme cette dernière, elle ne déclenche une activité attractante qu'en présence d'autres phéromones.

(A)

MLRFLVFALPVAAVLLALAVTAQPPDNASGNICCORDLIN^YTVLSEN^GTSAGGKGVRRSINAKFNLD^FPKTRL
SSKGS^MVIFDES^GIKNIEFWVITKSDK^SIAIDEAQKSCGQIPLVWFPRFCVPSTAQKVG^SYSYGPAGQTFQTD
AYK^FRLGDSDF^FATIAPDCTIINLVQAVTSPNGGSLVSSVLT^DIQPTVDES^FELPPYCKESFDSTVA*

(B)

MRAIVTLFLLL^VVVALTPGSRAD^DDGDGDSNSHGILCRSACDVAQDKTGEATQLIKYMCRC^LGW^EK^FSTTAF^P
TTITP^RR^VKPVTTDL^PSSPPEATTNICDYLC^SVQLGGDAC^CQ^CSN^PSPGKK*

Figure 30 : Séductine et Alb-1 chez *A. californica*. Précurseurs de la séductine (A), et de Alb-1 (B). Séquence signale en jaune, peptide mature en gras, site de clivage dibasique en rouge, sites de N-glycosylation en bleu et cystéines soulignées.

Une cinquième phéromone, libérée pendant la ponte, a été décrite chez l'aplysie : Alb-1 (Cummins et al., 2008) (Figure 30B). Un précurseur de 123 acides aminés aboutit à la libération d'un peptide mature de 101 acides aminés possédant 8 cystéines. Un site de clivage dibasique se trouve sur le peptide mature, la partie N-terminale (située avant le site de clivage) déclenche

la contraction du rhinophore tandis que la partie C-terminale n'a pas d'activité. Les transcrits sont détectés dans la glande de l'albumine, l'ovotestis et plus faiblement dans la glande atriale. Les analyses immunocytochimiques montrent qu'Alb-1 est détectée à la fois dans la glande de l'albumine, dans les œufs et leur éluat.

C. Phéromones sexuelles chez *Sepia officinalis*

Chez la seiche, les études sur les phéromones sexuelles se sont appuyées sur les travaux réalisés chez le genre *Aplysia*. La proximité phylogénétique entre les deux Mollusques, associée à un comportement migrateur saisonnier très semblable pendant la reproduction, suggèrent la mise en œuvre de mécanismes similaires. Les premiers travaux réalisés chez la seiche concernent l'identification d'une phéromone d'origine ovarienne identifiée sur la base de son activité biologique (Zatylny et al., 2000b). Celle-ci est un tétrapeptide de séquence ILME, libéré par les pontes, qui facilite la libération d'ovocytes dans la cavité palléale en modulant les contractions de l'oviducte, et stimule la sécrétion des produits capsulaires. Parallèlement, les travaux de Boal et al. (2010) révèlent que des extraits d'ovaires déclenchent une hyperventilation en conditions *in vivo*.

En 2012, dans le cadre de sa thèse (Enault, 2012), Jérémy Enault identifie trois précurseurs protéiques structuralement apparentés et exprimés par la GOVI en ponte : SP α , SP α' et SP β (Figure 31A) (Enault et al., 2012). L'identification des précurseurs a été réalisée sur la base d'ESTs (Expressed Sequence Tags) issus d'une banque d'ADNc construite à partir de la GOVI et des GNP. Les précurseurs SP (pour Sex Pheromone) représentent à eux trois 47.8% des ESTs. Ces précurseurs ont été sélectionnés en prenant en compte les caractéristiques des phéromones d'*Aplysia* : présence d'un peptide signal, niveau d'expression supérieur à 20 % des transcrits pendant la fenêtre de ponte et produits de clivage de masse moléculaire supérieure à 6 kDa et possédant une relative abondance de cystéines. Ces travaux ont démontré l'existence d'un mode de maturation basé sur des clivages de type prohormone convertase au niveau de sites dibasiques, permettant ainsi la libération potentielle de douze peptides et polypeptides (Figure 31B).



(B)

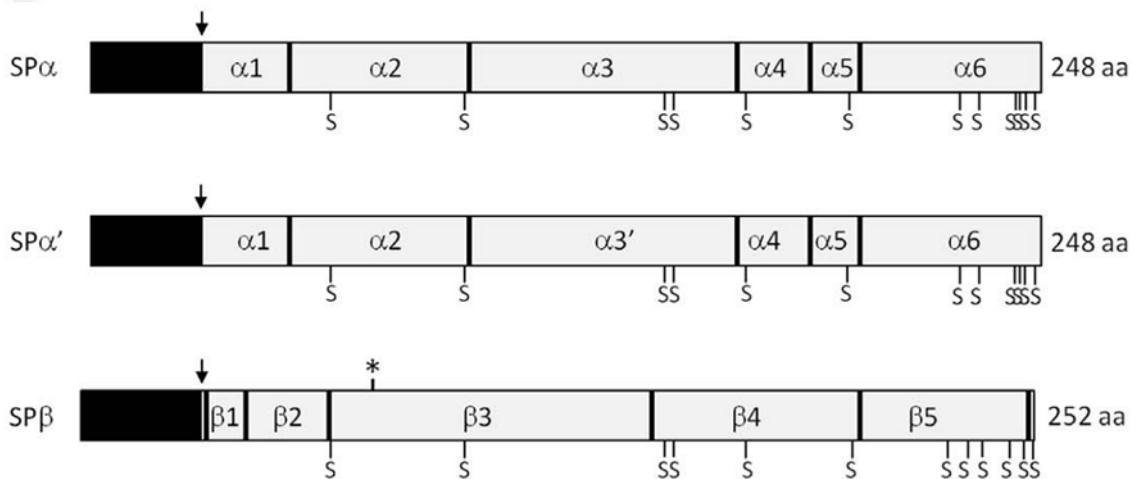


Figure 31 : Les précurseurs de phéromones sexuelles (SP) chez *Sepia officinalis*. (A) : Alignement des précurseurs SP. Peptide signal en jaune, sites de clivage di et tribasiques en rouge, amidation C-terminale en bleu-vert, cystéines soulignées et peptides en gras. (B) : Organisation des précurseurs. En noir : peptide signal, barres noires verticales : sites de clivage dibasiques prédits, étoile : prédiction du site de N-glycosylation, S : résidus cystéine. D'après Enault et al, 2012.

Les précurseurs SP α et SP α' sont très similaires (99.6% de similarité), comprenant 248 acides aminés, ils ne divergent que de quatre résidus situés sur les peptides $\alpha 3$ et $\alpha 3'$. Ils portent chacun douze cystéines pouvant former des ponts disulfures intra-chaine. Le peptide $\alpha 3$ qui est le seul peptide amidé, déclenche la cyclisation des contractions du pénis (Figure 32A). L'échantillonnage destiné à la construction de la première banque d'ADNc ayant été réalisé à partir d'individus provenant d'une part de la population se reproduisant sur les côtes de l'Ouest Cotentin et d'autre part de la population se reproduisant en Baie de Seine, on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit de deux isoformes liées au polymorphisme des deux populations. La phéromone α' étant la seule avec β à avoir été retrouvée dans les séquençages suivants, réalisés avec des individus de Baie de Seine, α serait donc une isoforme associée à la population de l'Ouest Cotentin. Cette hypothèse reste à démontrer expérimentalement.

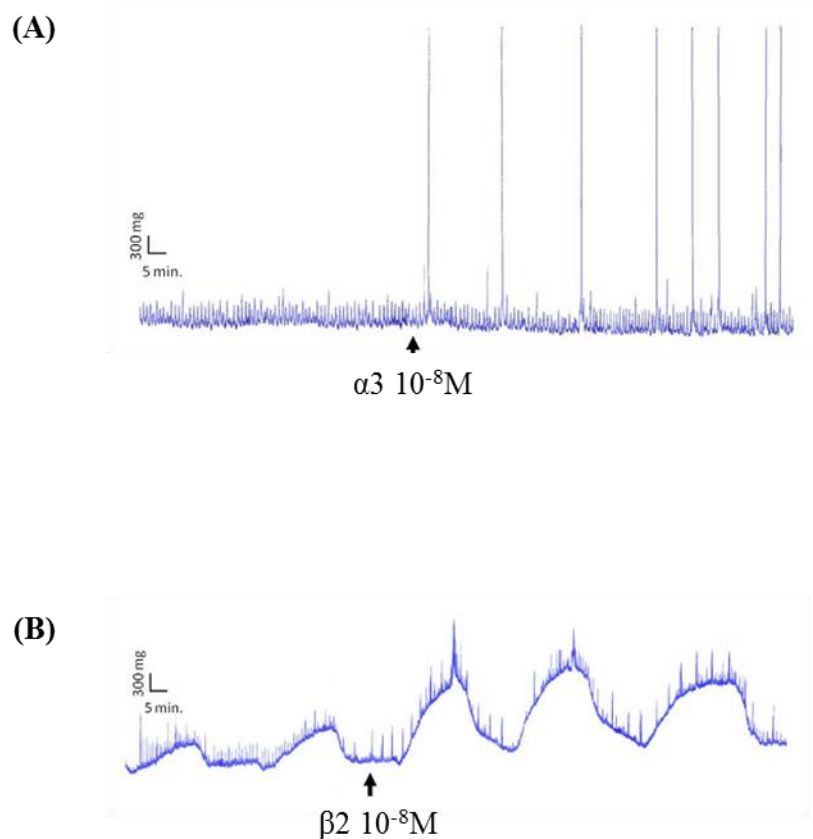


Figure 32 : Activité biologique des phéromones sexuelles de seiche sur le pénis de mâle mature. Le peptide $\alpha 3$ (A) déclenche des contractions de forte amplitude. Le peptide $\beta 2$ (B) augmente le tonus. La flèche indique l'arrivée du peptide testé dans la cuve (Enault et al, 2012).

Le précurseur SP β possède 56.7% de similarité avec précurseurs SP α et SP α' . Avec 252 acides aminés, il possède également douze cystéines. Certains produits de clivage prédits *in silico* ont été confirmés par spectrométrie de masse (Enault et al, 2012). Parmi ceux-ci, le peptide $\beta 2$ (20 acides aminés, amidé en C-terminal) déclenche une augmentation de l'amplitude des contractions du pénis chez les mâles matures (Figure 32B) ainsi que l'augmentation du tonus basal de l'oviducte et des GNP chez les femelles en ponte (Figure 33 A et B). Il déclenche aussi des contractions au niveau de la branchie, contractions qui pourraient être en lien avec l'hyperventilation observée lorsque les géniteurs sont à proximité des œufs afin d'accroître la dispersion de messagers chimiques telles que les phéromones (Boal et al., 2010).

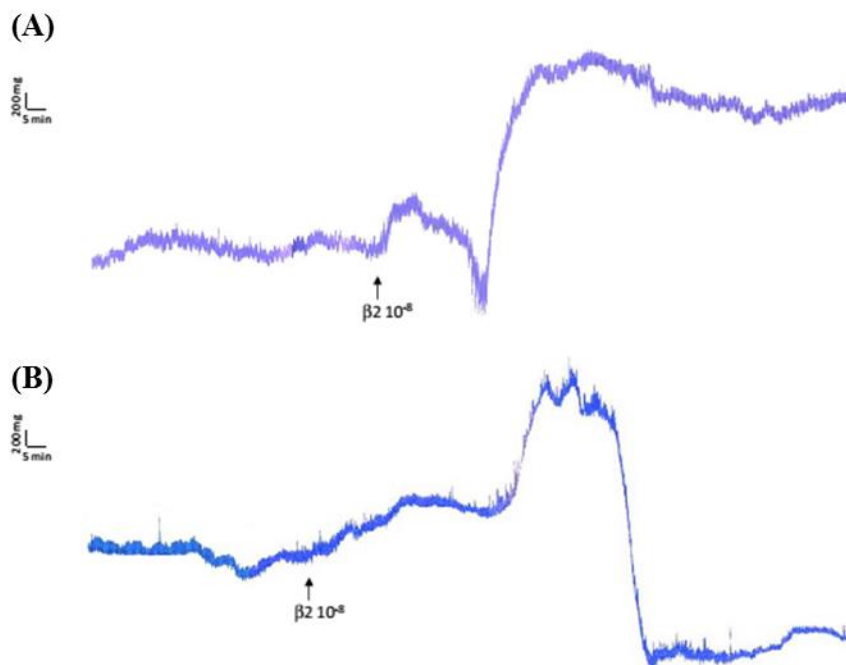


Figure 33 : Activité biologique du peptide $\beta 2$ synthétique sur le tractus génital des seiches femelles en ponte. Sur l'oviducte (A), le peptide synthétique déclenche la stimulation suivie de l'augmentation du tonus basal. Sur la GNP (B), l'effet est similaire et suivi d'une perte de tonus par rapport au tonus d'origine (Enault, 2012).

Ces résultats expérimentaux tendent à confirmer le rôle des phéromones sexuelles dans la stimulation de l'accouplement et de la ponte. L'expression strictement localisée dans la GOVI renforce encore une fois le parallèle fonctionnel avec les phéromones d'aplysie puisque celles-ci sont majoritairement exprimées par la glande de l'albumine qui est également responsable de la production et de la sécrétion de produits capsulaires.

Chez ces 2 modèles de mollusques marins, la sécrétion capsulaire apparaît comme étant étroitement associée à la sécrétion de phéromones sexuelles.

D. Objectifs

Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux menés par Jérémy Enault lors de sa thèse. Il s'agit de poursuivre la caractérisation des phéromones sexuelles aquatiques de seiche à partir des œufs et du milieu environnant. En effet, il semble que les pontes jouent un rôle clef dans l'attraction des géniteurs et leur regroupement sur des aires de ponte spécifiques situées en zone côtière, ainsi que dans la stimulation de l'accouplement et de la ponte.

Les observations en bassins montrent que les femelles portent un grand intérêt aux pontes fraîches déposées par leurs congénères avec notamment une phase plus ou moins longue de manipulation associée à une intense hyperventilation, ces 2 étapes précédant la ponte. Il a par ailleurs été démontré expérimentalement un effet attractant exercé par des pontes fraîches sur les géniteurs (Boal et al., 2010; Enault, 2012). L'hypothèse d'une libération de phéromones sexuelles par les œufs dans le milieu environnant et donc par conséquent dans les aires de pontes côtières doit être explorée expérimentalement.

L'expression des phéromones identifiées par Enault et al. (2012) est localisée dans la GOVI, glande annexe responsable de la sécrétion de la capsule la plus interne de l'œuf. De ce fait, il est envisageable que des peptides, polypeptides ou protéines sécrétées avec les protéines constitutives de la capsule interne puissent diffuser dans le milieu extérieur.

L'objectif de cette étude était donc initialement de caractériser des phéromones présentes dans les œufs et leur milieu d'incubation par une approche combinant peptidomique et protéomique afin de couvrir une large gamme de masses moléculaires. Ce type d'approche est rendu possible grâce aux 2 transcriptomes de la GOVI réalisés par Enault et al. (2012) contenant 226 transcrits (produits à partir de 576 ESTs) et plus récemment par Zatylny-Gaudin et al. (2016) avec cette fois 26832 transcrits obtenus en RNAseq (Illumina). Dans les 2 cas, les transcriptomes ont été construits à partir de glandes prélevées sur des femelles en ponte.

L'identification de nouveaux produits d'expression sera suivie par une approche fonctionnelle *ex vivo* et *in vivo*. Les travaux de Enault et al. (2012) ayant démontré une activité ciblée des peptides $\alpha 3$ et $\beta 2$ sur la contraction des appareils génitaux mâle et femelle, ce test *in vitro* sera réitéré avec les nouveaux produits identifiés.

En complément, des tests *in vivo* seront réalisés pour la première fois dans un aquarium de type « open space » afin d'identifier des modifications comportementales associées à la présence de phéromones synthétiques ou recombinantes.

Enfin, une première approche transcriptomique reposant sur une stratégie différentielle sera mise en œuvre afin d'établir une liste de récepteurs candidats à la liaison de phéromones sexuelles. Les organes ciblés sont l'organe olfactif des mâles prélevé à maturité et le pavillon de l'oviducte prélevé sur des femelles en ponte. L'organe olfactif situé en arrière de l'œil à proximité des flux d'eau associés à la ventilation branchiale (Figure 34) est suspecté de jouer un rôle dans la chemoréception (Polese et al., 2016; Gilly and Lucero, 1992; Woodhams and Messenger, 1974).

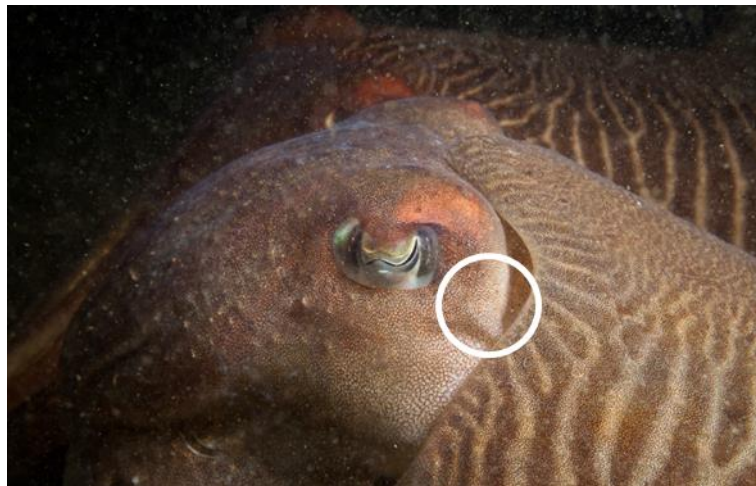


Figure 34 : Localisation de l'organe olfactif qui se trouve en arrière de l'œil, comme indiqué par le cercle blanc. Sa position l'expose au courant d'eau branchial inhalant. Photographie : <http://micksmarinebiology.blogspot.fr>

Le pavillon de l'oviducte correspond à l'extrémité distale de l'oviducte (et donc du tractus génitale femelle) qui baigne dans la cavité palléale (Figure 35). Le choix de cet organe est motivé par de multiples observations réalisées en conditions *ex vivo* qui démontrent que l'absence du pavillon ou parfois de simples lésions liées à la dissection entraînent la perte de sensibilité ou même l'absence totale de réponse à des stimulations classiques induites par des peptides myotropes bien connus chez les Mollusques (APGWamide, FMRFamide, etc., communication personnelle, J. Henry). L'oviducte distal associé au pavillon étant par ailleurs une cible des peptides phéromonaux $\alpha 3$ et $\beta 2$, le pavillon constitue une structure candidate majeure pour rechercher des récepteurs exprimés aux phéromones sexuelles de seiche.

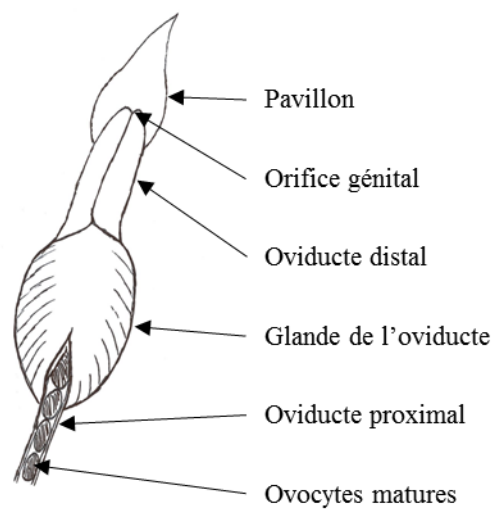


Figure 35 : Représentation schématique de l'extrémité distale du tractus génital d'une seiche femelle. La présence d'ovocytes matures dans l'oviducte proximal indique que la femelle est en ponte.

II. Résultats et discussion

A. Caractérisation structurale des précurseurs SP

1. À partir de la glande de l'oviducte

Les phéromones de la GOVI ont été extraites et purifiées selon deux méthodes. Une première méthode avec une extraction en HFBA 0.1%/DTT 50mM et purification par rpHPLC avec une colonne C18 (Figure 36). Une analyse MS est réalisée sur les fractions collectées pour connaître la masse moléculaire (MW) des produits présents, suivie d'une analyse MS/MS après RAD (Réduction/Alkylation/Digestion à la trypsine) pour connaître leur identité. Des peptides tryptiques issus du précurseur SP β ont été détectés dans les fractions 143 à 150. La couverture calculée de ces peptides indique que le produit de clivage a une MW d'au moins 20952 Da, si l'on se base sur les N et C terminaux des peptides tryptiques détectés. Cependant, l'analyse MS avant RAD n'a pas permis de détecter de MW dans cette gamme de masse, sans doute en raison d'une quantité de produit insuffisante, l'analyse en mode linéaire nécessitant une concentration plus importante d'analytes que l'analyse de digestats tryptiques pour obtenir un signal.

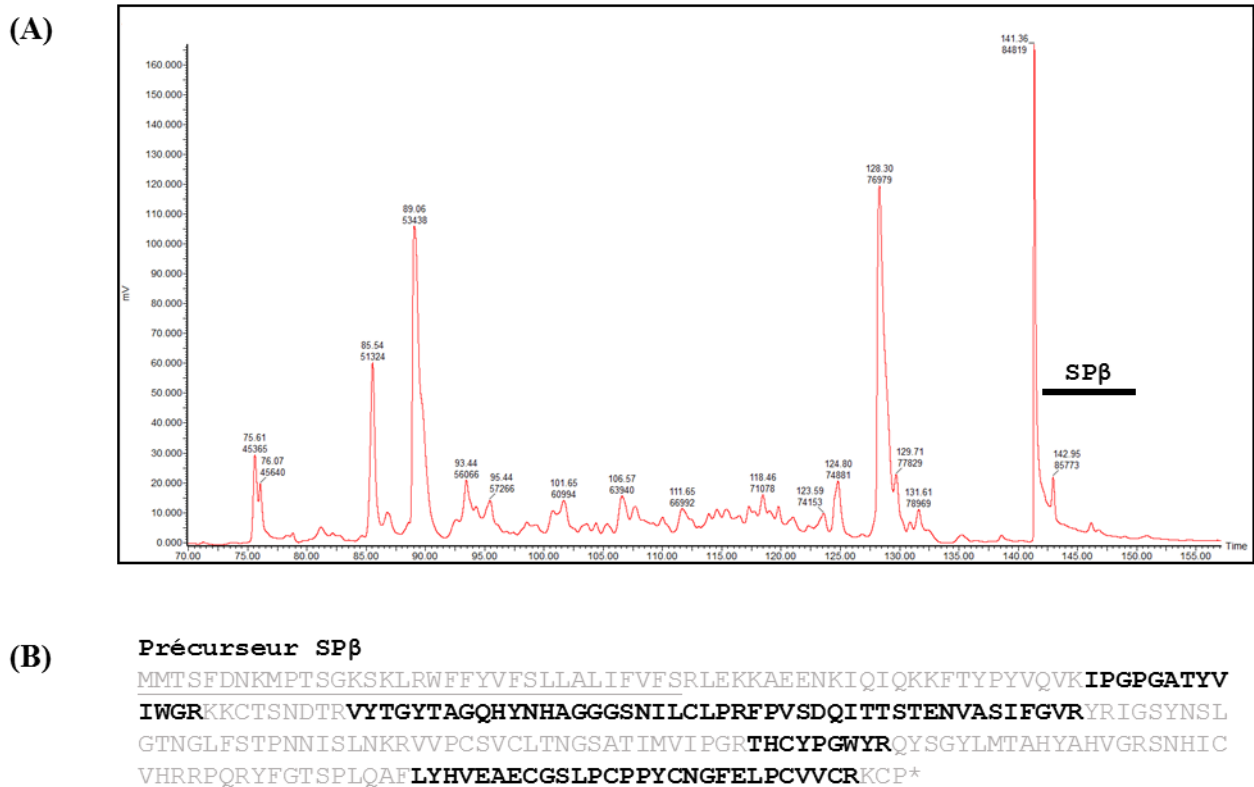


Figure 36 : Produits de clivage des précurseurs SP dans la GOVI. (A) : Chromatogramme d'un extrait de GOVI, séparation réalisée en rpHPLC C18. La barre noire indique la zone d'élution du ou des produits de clivage du précurseur SP β . (B) : Peptides tryptiques issus de la digestion des fractions 143 à 150.

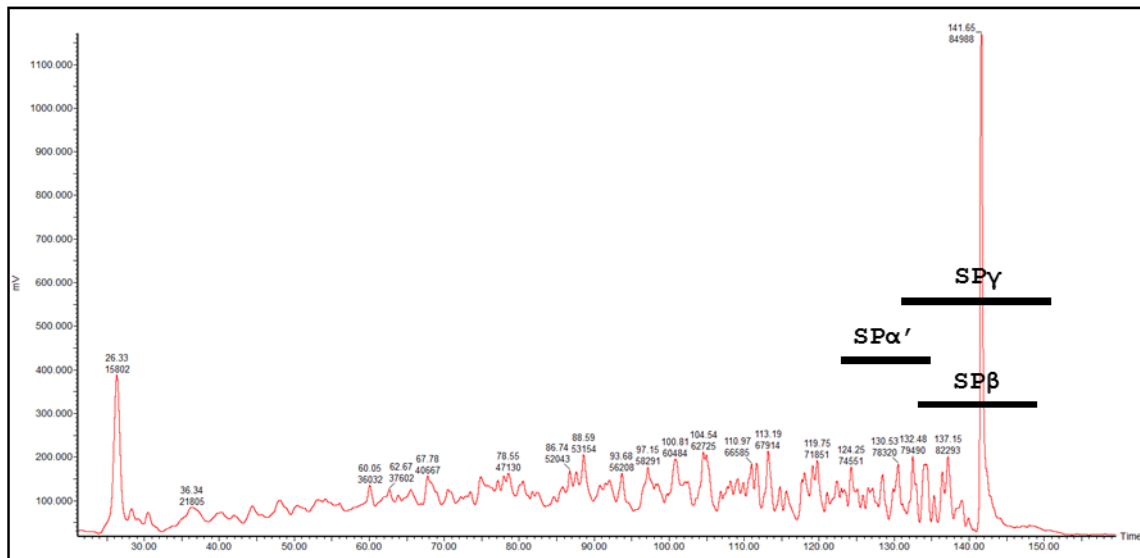
La seconde méthode couple une extraction en TFA 0.1%/DTT 50mM avec une séparation rpHPLC sur colonne C8. Avec cette méthode un mélange de 3 produits de clivage des précurseurs SP est mis en évidence (Figure 37). Le précurseur SP α' est élué en premier (entre les fractions 124 et 135), sa couverture en peptides trypsiques calculée est de 19218 Da et le spectre MS indique une m/z de 22720. La différence entre la MW calculée à partir de la couverture trypsique et la m/z issue du spectre MS, peut s'expliquer par la non détection des trypsiques situés aux extrémités N- et C-terminales de la séquence. Des peptides trypsiques appartenant aux précurseurs SP β (entre les fractions 134 et 149) et SP γ (fractions 132 à 151) sont aussi détectés. La couverture en peptides trypsiques est calculée à 16220 Da pour SP β et 22768 Da pour SP γ . Les deux méthodes n'ont pas permis d'identifier les séquences primaires des produits de clivage des précurseurs SP. Néanmoins elles mettent en évidence l'existence, dans la GOVI, de produits de clivage de MW comprises entre 16220 et 22768 Da (selon le calcul des couvertures en peptides trypsiques), et entre 22720 et 25900 Da (selon les analyses MS avant RAD). Par ailleurs, cette analyse démontre l'existence d'un quatrième précurseur de phéromone sexuelle : SP γ .

2. À partir des capsules d'œufs

Des produits de clivage des précurseurs SP ont été identifiés dans la capsule externe des œufs avec une extraction en HFBA 0.1%/DTT 50mM, couplée à une étape en rpHPLC sur une colonne C18 (Figure 38). Deux produits appartenant aux précurseurs SP sont détectés en MS/MS après RAD. L'un est issu de SP α' (élué dans les fractions 135 à 142) et l'autre est issu du clivage du précurseur SP β (fractions 137 à 148). La couverture en peptides trypsiques du produit de SP β est de 13437 Da, tandis que celle calculée pour SP α' est de 21750 Da. Une m/z proche de 22890 est détectée dans les fractions 141 à 146 où seul le produit issu de SP β est détecté. Cette donnée entre en contradiction avec les détections obtenues dans la GOVI, pour laquelle le produit issu de SP β à une m/z proche de 23900.

Les produits de clivage ont également été recherchés au niveau de la capsule interne des œufs, cependant aucun produit n'y a été détecté. L'hypothèse envisagée est que les œufs sélectionnés étant déjà âgés de plusieurs heures, avaient permis la migration des produits issus des précurseurs SP de la capsule interne vers la capsule externe. Il est cependant certain que ces produits sont présents au moins transitoirement au niveau de la capsule interne car ils sont sécrétés avec les composants de la capsule interne.

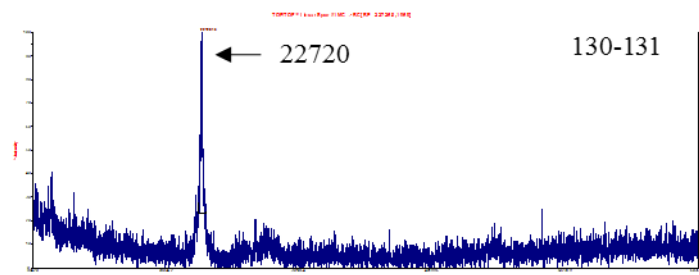
(A)



(B)

Précurseur SPα'

MDKPGKTSPLSWLVYVITALILVFFLARLEIRSNVQKAEFQHRARLLVSVRR**YYAAGPVFTR**WGNNRCPYRSYRV
 YEGIMGGQDKTHE**GGASNFLCLPRRPTWANLK**GGSQLGGLIYGTQYKLYPSQVNGFGLFFQTHLKPPHNDVPCAV
 CQVTKPATVLMIPGR**VCTPGWDLMYR**GYLMSEKRNAGRMITYCVDK**RPQVYWAGYLNENGATINHVE**SKCGSLP
 CPLYSNYKEVPCVCCKPI*



Précurseur SPβ

MMTSFDNKMP TSGKSKLRWFFYVFSLLALIFVFSRLEKKAENKIQIQKKFTYPVQVK**IPGPGATYVIWGR**KKCT
 SNDTR**VYTG**YTAGQHYNHAGGGSNILCLPRFPVSDQIT**TSTENVASI**FGVRYRIGSYNSLGTNGLFSTPNNISLNK
 RVVPCSVCLTNGSATIMVIPGR**THCYPGWYRQY**SGYLMTAHYAHVGRSNHICVHR**RPQRY**FGTSP**LQAF**LYHVEAE
 CGSLPCPPYCNFELPCVVCRKCP*

Précurseur SPγ

MFTPGKYGLYSWIGYLVAVSILVILVGRLENKFSANDVQLK**RGFGRPSITHFYAPGSVYTRWGR**TVCPRGSKVV
 YKIMAAPKHTNTGGGSYQCLPNNPVWGRRLPNFQSSGRLFGTEYK**ISLYLTQGVNGLFSNINAR**RVNFHNAPCA
 VCLTYMPRAVIMI PGRKRCDRGWKLEYSGYLMSERYTYRRTYVCVDK**DP**EASESGNGWQH**SAGLYHVEAR**CGSLP
 CPWVYQ**GFEMACVCSR**GPYPYYK**KIATQ**TSGSNNTSGNNATIG*

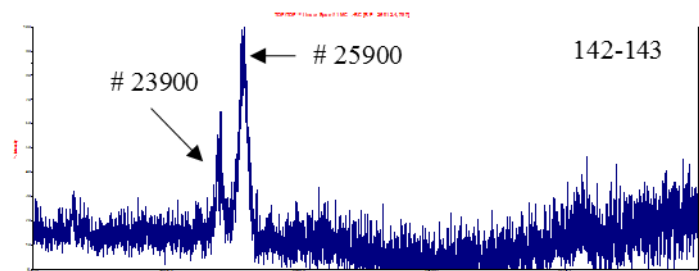
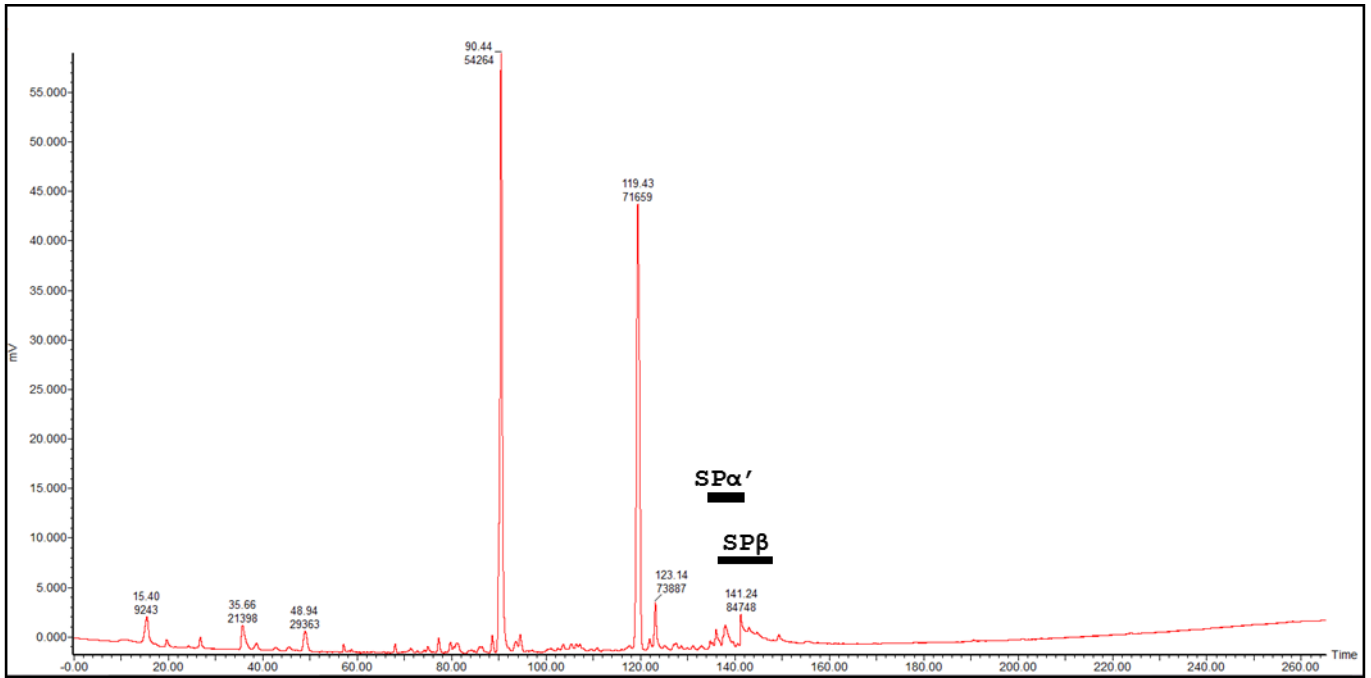


Figure 37 : Produits de clivage des précurseurs SP dans la GOVI. (A) : Chromatogramme d'un extrait de GOVI, séparation réalisée en rpHPLC C8. La barre noire indique la zone d'éluion du ou des produits de clivage des précurseurs SPα', β et γ. (B) : Spectres MS en mode linéaire de fractions natives et peptides trypsiniques issus de la digestion des fractions 130 à 151.



Précurseur SPβ

MMT SFDNKMP TSGKSKLRWFFYVFSLLALIFVFSRLEKKAENKIQIQKKFTYYPVQVKIPGPGATYVIWGRKKCTSNDTRV
 YTG YTAGQHYNHAGGGSNI LCLPR **FVSDQIT TSTENVASIFGVR YRIGSYNSLGTNGLFSTPNNISLNKR** VVPCSVCLTNG
 SATIMVI PGR **THCYPGWYR** QYSGYLMTAHYAHVGRSNHICVHRRPQRYFGT SPLQAFLYHVEAECGSLPCPPYCNGFELPCV
 VCRKCP*

Précurseur SPα'

MDKPGKT SPLSWLVYVIT ALI LVFFLARLEIRSNVQKAE FQHRAARLLVSVR **RYYAAGPVFTR** WGNRC PYRSYRVYEGIMG
 GQDKTHR **GGASNFLCLPR** RPTWANLKGGSLGGLI YGTQYKLYPSQVNGFGLFQTHLKPPHNDVPCAVCQVTKPATVLM I
 PGRKVCTPGWDLMYRGYLMSEKRNNAGRMTYVCVDRPQVYWAGYLNENGATINHVESK **CGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSK**
 PI*

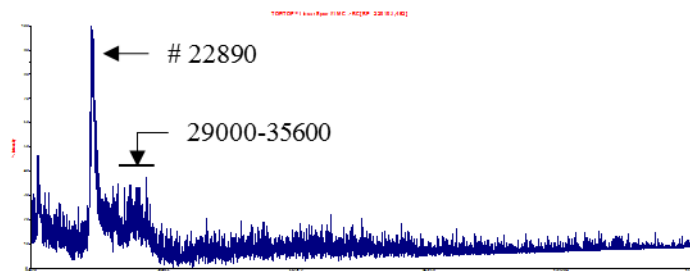


Figure 38 : Produits de clivage des précurseurs SP dans la capsule externe d'œufs. (A) : Chromatogramme d'un extrait de capsule externe, séparation réalisée en rpHPLC C8. La barre noire indique la zone d'élution du ou des produits de clivage des précurseurs SPα' et β. (B) : Spectre MS en mode linéaire de fractions natives et peptides tryptiques issus de la digestion des fractions 135 à 148.

3. À partir de l'eau d'incubation des œufs

Les nouveaux produits de clivage des précurseurs SP ont été isolés à partir d'eau d'incubation de pontes fraîches. Après 24h de baignade, l'eau d'incubation des œufs est filtrée et acidifiée. La concentration sur SepPack C18 permet également de dessaler l'échantillon pour permettre une analyse en spectrométrie de masse. Un premier contrôle post-concentration est réalisé en mode linéaire sur l'eau d'incubation concentrée (Figure 39). Plusieurs m/z correspondant à des masses moléculaires situées entre 22 et 26 kDa sont détectées. En parallèle, une analyse MS/MS de cet extrait est réalisée, après RAD. Seul un produit de clivage appartenant au précurseur SP β , le peptide β 2, est détecté.

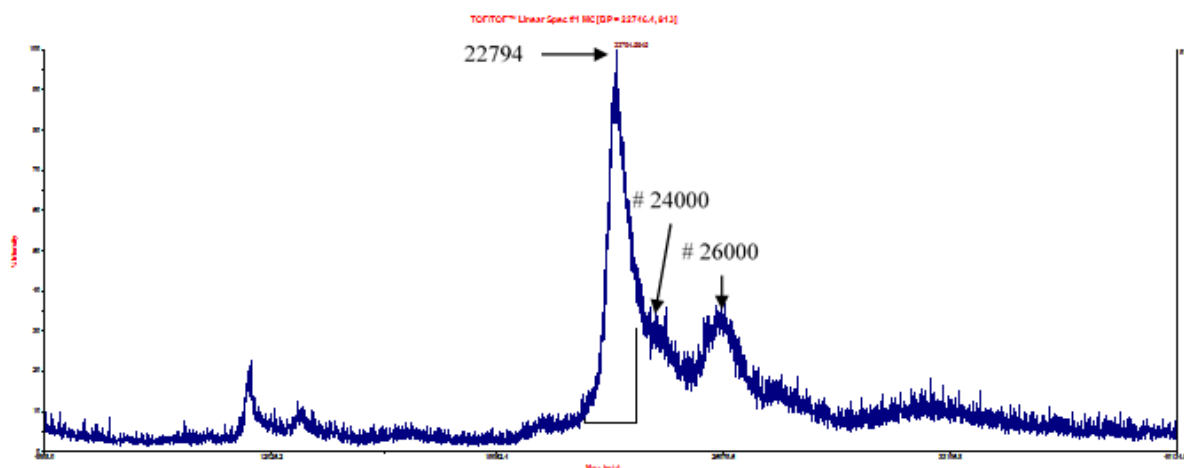


Figure 39 : Spectre MS, mode linéaire, d'extrait d'eau d'incubation de pontes fraîches concentré sur SepPack C18. Deux m/z sont observables : 22794, et #26000. L'analyse MS/MS après RAD indique que ces produits appartiennent aux précurseurs SP. Les deux pics situés sur la partie gauche du spectre correspondent au M²⁺.

4. À partir de l'eau d'incubation des œufs fractionnée en rpHPLC

Deux étapes de purification en rpHPLC ont été nécessaires pour purifier les phéromones. Après concentration et dessalage sur Sep Pak C18, la première étape de séparation rpHPLC C18 a abouti à la séparation et la collecte des produits les plus hydrophobes, élués entre 110 et 140 minutes, correspondant à 30-40% d'ACN (Figure 40). L'analyse du digestat trypsique en MS/MS révèle la présence de peptides tryptiques appartenant aux précurseurs SP dans les fractions 114 à 117. Ce qui démontre que les produits de clivage des différents précurseurs sont élués en mélange.

La fraction 114 a été utilisée pour la mise au point de la seconde étape de purification, de 0 à 80% d'ACN en 75 minutes (Figure 41A). Les fractions 46 à 50 ont été collectées (43.73% à

48% d'ACN), les masses moléculaires associées ont été déterminées en mode linéaire, et les produits présents identifiés après RAD (Figure 41B). Des produits de masse moléculaire variant de 22745 Da à 22884 Da ont été identifiés dans les fractions 46 à 50. L'analyse MS/MS après RAD confirme qu'il s'agit de produits issus des précurseurs SP α ' et SP β . Par ailleurs, des produits de clivage appartenant à un quatrième précurseur ont également été identifiés.

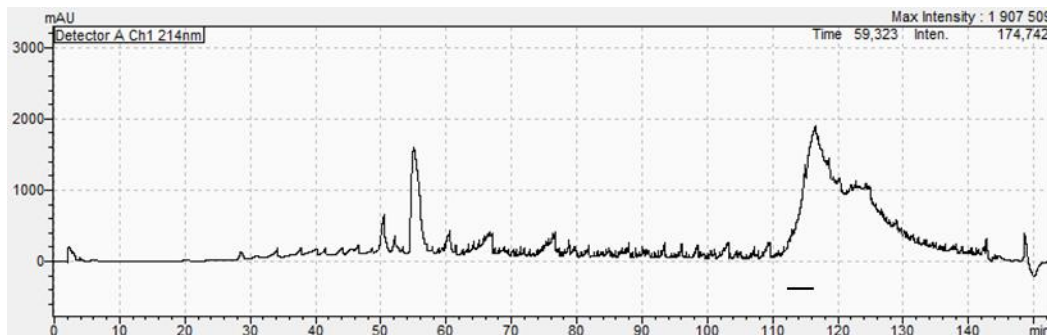
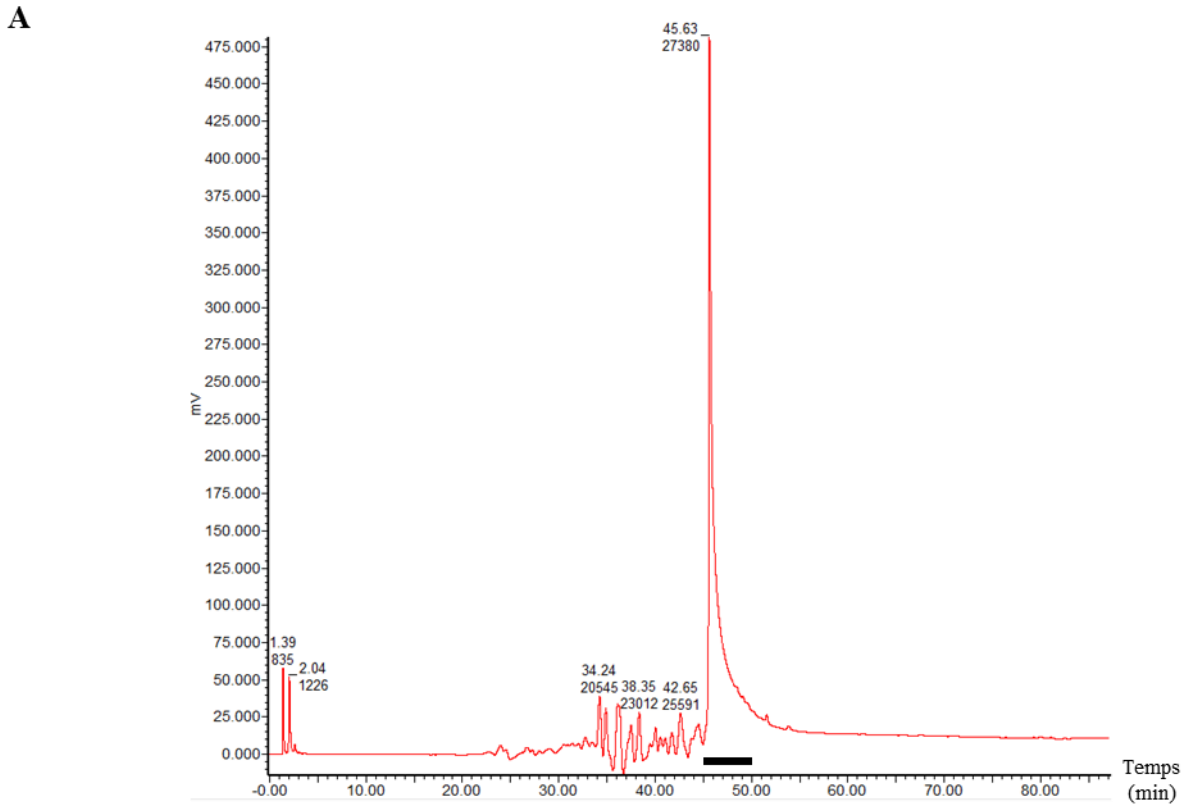


Figure 40 : Chromatogramme (214nm) de séparation, sur rpHPLC C18, d'eau de baignade de pontes fraîches. Première étape de purification des produits de clivages des précurseurs SP. La barre noire indique les fractions 114 à 117 contenant les produits de clivage des précurseurs SP.

Ce quatrième et nouveau précurseur a été appelé SP γ (Figure 42A). Son identification a été possible grâce au nouveau transcriptome réalisé par Zatylny-Gaudin et al (2016).

Il s'agit d'un précurseur de 273 acides aminés, avec un peptide signal, 10 résidus cystéines et 6 sites de clivages di- ou tribasiques potentiels pouvant libérer 9 peptides dont 2 sont potentiellement amidés en C-terminal. Ce précurseur est très fortement surexprimé dans la GOVI (Figure 42B), au même titre que SP α ' et SP β .

Le gradient de la seconde étape de séparation a été modifié afin d'être le plus isocratique possible dans les pourcentages d'élution des produits de clivage : de 39.2 à 40.8% d'ACN en 50 minutes, pour tenter de séparer au mieux les produits des fractions 115 à 117. À l'issue de cette seconde étape (Figure 43A), le spectre MS de contrôle (Figure 43B) indique la présence d'une masse proche de 22700 Da très abondante, ainsi qu'une masse proche de 25000 Da mais plus diffuse, et ce dans la fraction correspondant à la 37^{ème} minute du gradient. Il ne nous a pas été possible de séparer davantage les composés malgré un gradient de séparation déjà très plat. Aussi c'est cette fraction n°37 qui a été sélectionnée pour le séquençage des extrémités N-terminales.



B

N°	Spectre MS	Produits de clivage de SP α '	Produits de clivage de SP β	Produits de clivage de SP γ
46		YYAAGPVFTR WGNRCPYR RYYAAGPVFTR WGNRCPYRSYR	IPGPGATYVIWGR FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGR IGSYNSLGTNGLFSTPNNISLNKR FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGRK FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGRKK	GFGFRPSITHFYAPGSVYTR
47		YYAAGPVFTR WGNRCPYR RYYAAGPVFTR YYAAGPVFTRWGNRCPYR	IPGPGATYVIWGR FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGR FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGRK FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGRKK	GFGFRPSITHFYAPGSVYTR
48		YYAAGPVFTR RYYAAGPVFTR YYAAGPVFTRWGNRCPYR	IPGPGATYVIWGR FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGR	GFGFRPSITHFYAPGSVYTR
49		YYAAGPVFTR	FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGR FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGRKK	GFGFRPSITHFYAPGSVYTR
50		YYAAGPVFTR RYYAAGPVFTR		

Figure 41 : Deuxième étape de purification. (A) : Second run rpHPLC C18 à partir de la fraction 114. Les fractions de deuxième étape 46 à 50 sont collectées (barre noire) et analysées en spectrométrie de masse (B), en MS linéaire, et MS/MS après RAD. Les produits appartenant aux précurseurs SP sont présents dans ces fractions, en plus de produits appartenant à un nouveau précurseur : SP γ .

A

```

CTGAAGCAGGATTTAGTAAGGAGGGGGCCAGTTTGTCTTTATTCGGCAAAACAAAAGTAC
L K Q D L V R R G P V C L Y S A K Q K Y
TATAAGAGAGTGCCAACGTCATTCAGGACGTTTATTTGACCACTCGTCTTCTAATAAGT
Y K R V P T S F Q D V Y L T T R L L I S
TACCGATTGTATCAAATCCCAACAATGTTTACTCCCAGCAAAATATGGACTCTACTCTGG
Y R L Y Q I P T M F T P G K Y G L Y S W
ATCGGTTATTTGGTCGCCGTCTCCATCCTTGTAAATCCTTGTGGCAGACTGGAGAATAAA
I G Y L V A V S I L V I L V G R L E N K
TTTAGTGCGAACGACGTTTCAGTTAAAGAAAAGAGGATTCGGATTTCAGACCATCGATTACC
F S A N D V Q L K K R G F G F R P S I T
CATTTTTATGCTCCCGAAGTGTGTACACGCGTTGGGGCCGAACAGTATGTCCAGGGGT
H F Y A P G S V Y T R W G R T V C P R G
TCAAAAGTTGTATATAAGGGCATAATGGCTGCTCCAAAACACACAAATACCGGCGGAGGA
S K V V Y K G I M A A P K H T N T G G G
AGCGATTACCAATGTTGCCAACCAATCCAGTTTGGGGAAAGAAGATTGCCAAATTTCCAA
S D Y Q C L P N N P V W G R R L P N F Q
TCTTGTGAAGACTTTTCGGCACAGAATATAAAAATAAGTTTGTACTTGACCCAGGGTGA
S S G R L F G T E Y K I S L Y L T Q G V
AACGGCTTATTCTCCAACATCAATGCCAGACGTGTGAATTTTCATAACGCTCCATGTGCT
N G L F S N I N A R R V N F H N A P C A
GTATGTCTGACATATATGCCAAGAGCTGTGATTATGATTCCAGGTCGAAAAGAGATGCGAT
V C L T Y M P R A V I M I P G R K R C D
CGGGATGGAAGCTTGAATATTCGTTTATTTAATGTGGAAAGATATACATATAGAAGA
R G W K L E Y S G Y L M S E R Y T Y R R
ACGGAATATGTGTGTGTCGATAAGGATCCAGAGGCTAGCGAATCAGGAAACGGTTGGCAG
T E Y V C V D K D P E A S E S G N G W Q
CATAGCGCCGGTCTTTATCATGTAGAAGCGAGGTGCGGGTCACTCCCTTGTCCCTGGTAC
H S A G L Y H V E A R C G S L P C P W Y
GTACAGGATTTGAAATGGCTTGCGCCGTCTGTAGCCGGGACCTTATCCTTATTATTAT
V Q G G F E M A C A V C S R G P Y P Y Y
AAAAAATAGCAACACAAACTTCAGGGAGTAACAATACATCAGGCAATAACGCTACAATT
K K I A T Q T S G S N N T S G N N A T I
GGATAAAATACCTCATATCTATCTATCTATCTATCT
G * N T S Y L S I Y L S
    
```

B

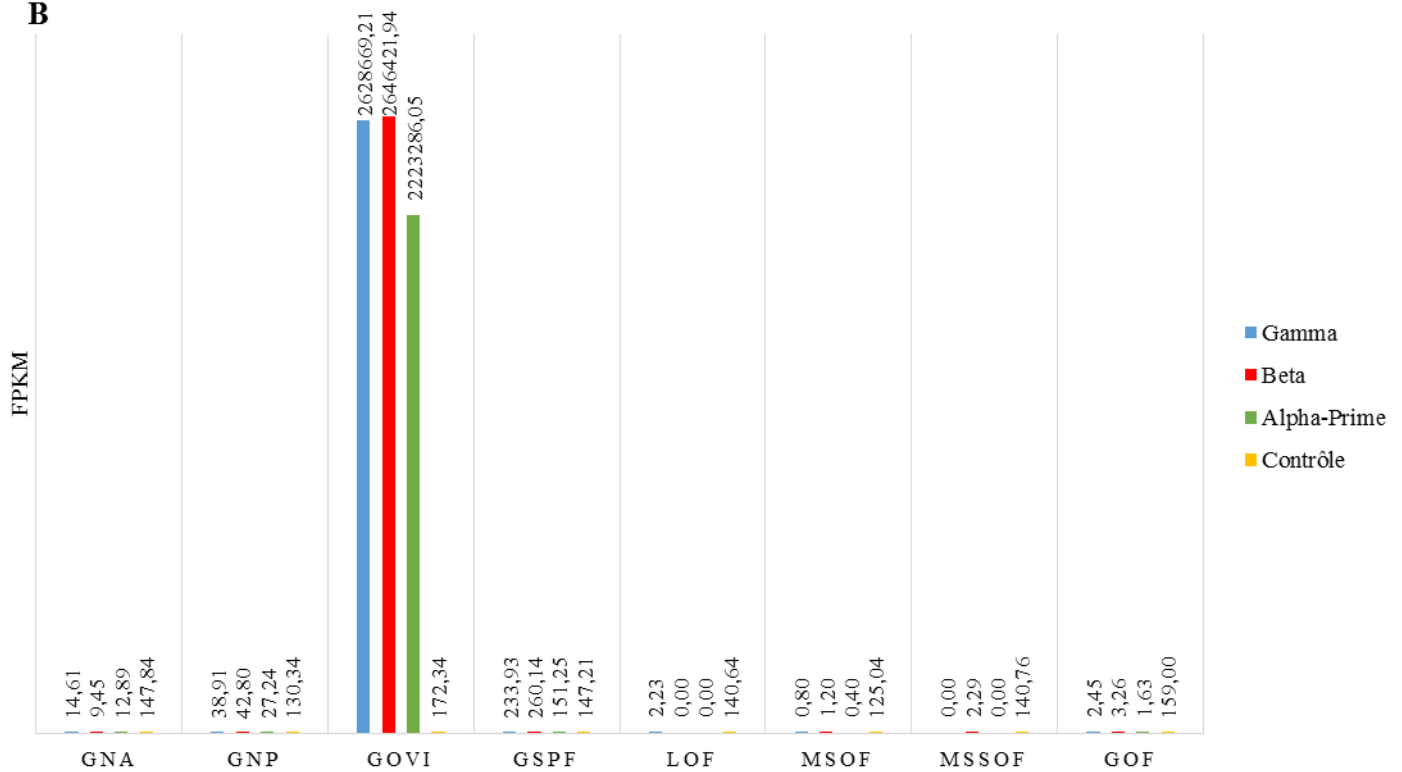


Figure 42 : Le précurseur SP γ : transcrit, séquence en acides aminés et profils d'expression. (A) : Séquence du transcrit du précurseur SP γ , et séquence en acides aminés après traduction dans l'ORF 5'3' Frame 1. Précurseur complet en gras, peptide signal en jaune, sites de clivages di et tri basiques en rouge. (B) : Niveaux d'expression des précurseurs SP chez la seiche femelle en ponte, exprimés en FPKM. Le contrôle est le gène de la protéine d'élongation 3 utilisé comme référence.

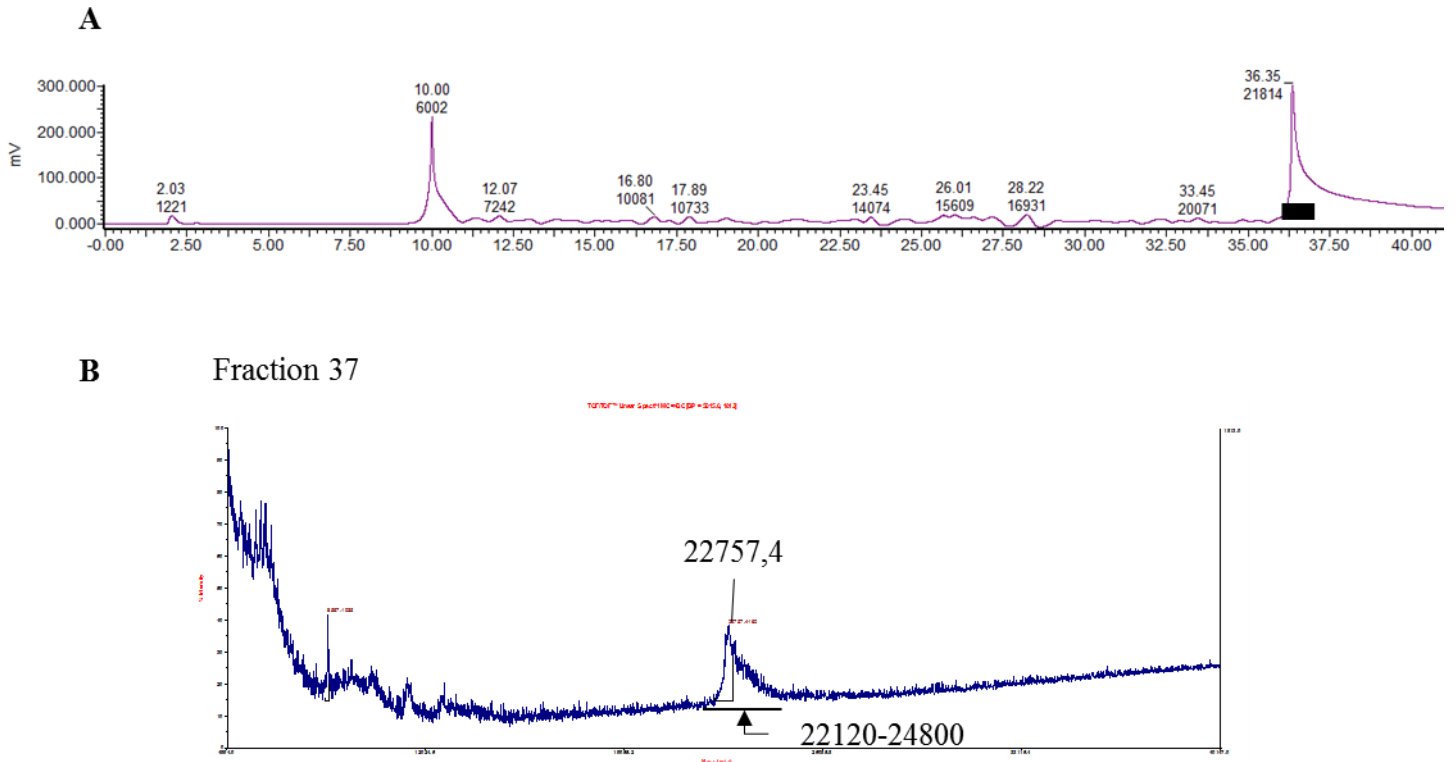


Figure 43 : Deuxième étape de purification des phéromones sexuelles à partir d'eau d'incubation de pontes fraîches. (A) : Chromatogramme rpHPLC C18 de deuxième étape de purification. La barre noire indique la fraction 37, dans laquelle ont été détectés en MS/MS, des produits des précurseurs SP. (B) : Spectre MS de la fraction 37. Un pic à la base très large avec une m/z maximale à 22757,4 couvrant une gamme de m/z de 22120 à 24800.

Précurseur SP α '

MDKPGKTSPLSWLVYVITALILVFFLARLEIIRSNVQKAEFQHRAARLLVSVRRYYAAGPVFTRWGNRC PYRSYRVYEGIMGGQDKT
 HRGGASNFLCLPRRPTWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPSQVNGFLFFQTHLKP PHNHDVPCAVCQVTKPATVLMIPGRKVC TPGW
 DLMYRGYLMSEKRNNAGRMTYVCVDKRPQVYWAGYLNENGATINHVESKCGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSKCP I*

Précurseur SP β

MMTSFDNKMPTSGKSKLRWFFYVFSLLALIFVFSRLEKKAENKIQIQKFFTPYVQVKIPGPGATYVIWGRKKCTSNDTRVYTG YT
 AGQHYNHAGGGSNILCLPRFPVSDQITTTSTENVASIFGVRYRIGSYNSLGTNGLFSTPNNISLNKRVVPCSVCLTNGSATIMVI PGR
 THCYPGWYRQYSGYLMTAHYAHVGRSNHICVHRRPQRYFGT SPLQAFLYHVEAECGSLPCPPYCNFELPCVVCRKCP*

Précurseur SP γ

MFTPGKYGLYSWIGYLVAVSILVILVGRLENKFSANDVQLKKR**GFGFRPS**ITHFYAPGSVYTRWGRTVC PRGSKVVYKIGIMAAPKHT
 NTGGGSDYQCLPNNPVWGRRLPNFQSSGRLFGTEYKISLYLTQGVNGLFSNINARRVNFHNAPCAVCLTYMPRAVIMIPGRKRC DRG
 WKLEYSGYLMSERYTYRTEYVCVDDKPEASESGNGWQH SAGLYHVEARCGSLPCPWYVQGFEMACAVCSRGPYPYYKKIATQTS G
 SNNTSGNNATIG*

Figure 44 : Les phéromones α ' , β et γ , issues du second mode de maturation. En gras : séquence en acides aminés du produit de clivage du précurseur, extrémité N-terminale séquencée par dégradation d'Edman surlignée en bleu et peptide signal surligné en jaune.

Le séquençage a révélé la présence des produits de clivage issus des trois précurseurs SP : SP α ' , SP β , et SP γ . Pour SP α ' (le plus abondant), la séquence de l'extrémité N-terminale séquencée est : LLVSVRR (Figure 44). L'extrémité N-terminale, combinée aux mesures en spectrométrie de masse permet de conclure que la séquence des phéromones comprend l'extrémité C-terminale du précurseur. La masse moléculaire brute calculée (prospector.ucsf.edu) est de 22731 Da. Cette masse est ensuite recalculée pour prendre en compte l'oxydation potentielle des résidus méthionine et la formation de ponts disulfures intra-chaine : 22799 Da. Finalement le pHi et la charge calculée à pH 1 sont respectivement de 9,48 et 31 (expasy.org).

Le même raisonnement est appliqué pour les autres produits (Figure 44). Pour la phéromone issue de SP β dont l'extrémité séquencée est FTYPYVQ, une masse finale de 22426 Da est calculée, pour une charge de 27 à pH1, et un pHi de 9.26. Pour le produit issu de SP γ , l'extrémité séquencée est GFGFRPS, la masse finale est de 25717 Da, pour une charge à pH 1 de 33 et un pHi de 9.49. Les trois masses moléculaires sont en accord avec les valeurs obtenues en MALDI TOF linéaire.

Nous avons ainsi identifié la séquence primaire de deux phéromones issues des précurseurs SP, ainsi qu'une phéromone issue d'un nouveau précurseur : SP γ . Au vu des résultats, on constate que ces phéromones ont des propriétés physico-chimiques très voisines. Leur MW, leur charge et leur pHi très proches expliquent les difficultés rencontrées lors de la séparation en HPLC. Ces produits issus du clivage de précurseurs de phéromones ont été mis en évidence dans l'eau d'incubation d'œufs frais, ce qui sous-entend une diffusion dans le milieu par le biais des œufs. Les précurseurs de ces produits sont très surexprimés dans la GOVI, organe responsable de la sécrétion capsulaire. Un parallèle peut être établi ici avec le modèle aplysie, chez lequel les phéromones sont exprimées et sécrétées par la glande de l'albumine (qui a une fonction similaire à la GOVI), et sont détectées dans les œufs et dans leur milieu d'incubation (Cummins et al., 2005; Cummins et al., 2004; Painter et al., 1998). De plus, les masses moléculaires des nouvelles phéromones putatives de seiche correspondent d'avantage à celles détectées chez l'aplysie. Enfin, chez l'aplysie, les phéromones diffusent par voie aquatique, bien que l'existence de phéromones de contact présentes dans les œufs et déclenchant la ponte soit suggérée (Begnoche et al., 1996).

B. Recherche de récepteurs candidats à la liaison des phéromones sexuelles

Dans cette étude très préliminaire visant à identifier des récepteurs associés aux phéromones sexuelles, une approche *in silico* a été réalisée en séquençant le transcriptome de deux structures suspectées de jouer un rôle dans les mécanismes régulés par les phéromones sexuelles : l'organe olfactif des mâles matures et le pavillon de l'oviducte. Ce dernier a fait l'objet de 2 séquençages pour disposer de 2 stades de maturité différents : vitellogenèse et maturité sexuelle.

Dans cette étude, l'organe olfactif est suspecté d'exercer une fonction homologue à celle du rhinophore décrite chez l'aplysie, lequel est impliqué dans la perception de phéromones sexuelles (Cummins et al., 2007a; Cummins et al., 2009; Cummins et al., 2009). Le pavillon est la structure la plus distale de l'oviducte, sa dégradation accidentelle (lors du prélèvement) altère ou supprime les réponses de l'oviducte aux différents peptides testés en conditions *in vitro*, suggérant la présence de nombreux récepteurs nécessaires à la régulation de l'activité de cette structure. Il est par ailleurs important de rappeler que l'oviducte distal et son pavillon sont sensibles aux stimulations des peptides $\alpha 3$ et $\beta 2$ décrits précédemment.

L'analyse comparative des transcriptomes révèle la présence d'au moins 2 récepteurs de type rhodopsine-like (GPCR de classe A ou 1) au niveau du pavillon et d'un unique récepteur de ce type au niveau de l'organe olfactif. La séquence complète de ce récepteur est présentée figure 45 avec les domaines transmembranaires prédits *in silico* avec l'utilitaire web HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>). Par ailleurs, ce récepteur n'est détecté dans aucun des transcriptomes dont nous disposons et qui sont : les 4 régions du SNC et les glandes salivaires des 2 sexes, 3 stades ovariens et les glandes annexes des femelles matures, soit 16 tissus, organes ou régions différents. Ce qui permet d'émettre l'hypothèse d'une expression localisée spécifiquement au niveau du pavillon et de l'organe olfactif. Si cette hypothèse était confirmée, il s'agirait alors d'un candidat très solide pour initier une approche en endocrinologie inversée avec les phéromones recombinantes comme ligants. On observe par ailleurs au niveau du pavillon la présence d'une isoforme très proche structurellement du récepteur d'intérêt, ce dernier est en outre exprimé dès la vitellogenèse, ce qui permet de suspecter une sensibilité précoce aux signaux phéromonaux. L'alignement des 4 phéromones α/α' , β et γ , permet de mettre en évidence un domaine heptapeptidique totalement conservé (figure 46). Il pourrait s'agir du domaine interagissant avec le récepteur ce qui permettrait de supposer l'existence d'un récepteur unique pour les phéromones α/α' , β et γ .

D'autre part, il est apparu intéressant de vérifier la présence des acteurs de la cascade intracellulaire associée aux GPCRs de classe A, à savoir la phospholipase C (PLC) et le récepteur à l'inositol triphosphate (I3PR). Dans le pavillon comme au niveau de l'organe olfactif, on détecte les transcrits recherchés : 5 transcrits de PLC dans le pavillon contre 3 dans l'organe olfactif. Concernant les I3PRs, on détecte 7 transcrits dans le pavillon et 3 dans l'organe olfactif. Bien que certains transcrits soient incomplets, ils permettent de confirmer la présence de PLCs et d'I3PRs au niveau de ces deux organes.

```

Receptor_01      MTNFTTNLTEVFNSSNPDSSAFNATPVYSVITAE EYNAKTL YVR TA AIVFLAILIPVGIM
Receptor_02      MTNFTTNLTEVFNSSNPDSSAFNATPVYSVITAE EYNAKTL YVR TA AIVFLAILIPVGIM
*****
                                TM1
Receptor_01      GNASVIYIYGFCLKKS NVQFFIVSLAILDIISSAVGMPLEMTEICHMNTYSSEALCKIQR
Receptor_02      GNASVIYIYGFCLKKS NVQFFIVSLAILDIISSAVGMPLEMTEICHMNTYSSEALCKIQR
*****
                                TM2
Receptor_01      IVNYSCNIGSAGVLLAISMERYIKVCRSTKKQ MTRGHCKLMSLAIAIMCVVFALPISYGY
Receptor_02      IVNYSCNIGSAGVLLAISMERYIKVCRSTKKQ MTRGHCKLMSLAIAIMCVVFALPISYGY
*****
                                TM3
Receptor_01      DRLPVKVDDNITVYQCAFSSSPIIFTYYVSFFPACIINFIIIFSLYFFVLR SARQHFNQL
Receptor_02      DRLPVKVDDNITVYQCAFSSSPIIFTYYVSFFPACIINFIIIFSLYFFVLR SARQHFNQL
*****
                                TM4
Receptor_01      QSRRKQPNTDLSSEFKRRFSRTNMSVLCCLTVVYALSFTPTLIIGMETKFFTVDYSP PVRG
Receptor_02      QSRRKQPNTDLSSEFKRRFSRTNMSVLCCLTVVYALSFTPTLIIGMETKFFTVDYSP PVRG
*****
                                TM5
Receptor_01      LLIVMYRSWALNCSINPLVYGFENKPYRKAFTKLAKKFICWKAPQTQPTKEFVSTSAIET
Receptor_02      LLIVMYRSWALNCSINPLVYGFENKPYRKAFTKLADRKSV-----
*****
Receptor_01      SM
Receptor_02      --

```

Figure 45 : Séquence primaire des deux récepteurs putatifs aux phéromones sexuelles. Le récepteur 01 est présent dans le pavillon de l'oviducte et l'organe olfactif du mâle mature, tandis que le récepteur 02 est détecté uniquement dans le pavillon de l'oviducte (en vitellogenèse et mature). Malgré l'absence de l'extrémité C-terminale du récepteur 02, on constate que les deux récepteurs possèdent une très forte homologie de séquence avec 7 domaines transmembranaires identiques, surlignés en rouge (www.enzim.hu/hmmtop).

C. Production de la phéromone β et tests fonctionnels

Ces résultats préliminaires nécessitent un approfondissement par la réalisation de tests fonctionnels complémentaires. Par ailleurs, les tests de cette étude ont porté exclusivement sur la stimulation de l'activité contractile d'organes associés au transport des ovocytes et à la sécrétion capsulaire, en raison des quantités restreintes de protéine recombinante disponibles.

Or, si les produits des précurseurs SP α , α' et β issus de clivages dibasiques, les peptides α_2 et β_3 par exemple, exercent une activité myotrope, les produits de clivage de masse moléculaire plus élevée (MM > 22 kDa) caractérisés dans cette étude ont d'avantage le profil de phéromones aquatiques telles que celles décrites chez l'aplysie. Ces phéromones provenant d'un second mode de maturation des précurseurs SP α , α' et β pourraient donc être impliquées dans les mécanismes qui pilotent l'agrégation des géniteurs sur les aires de ponte côtières. Seule une approche comportementale réalisée dans un labyrinthe en Y permettra de vérifier cette hypothèse.

III. Conclusions et perspectives

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un second mode de maturation des précurseurs SP. Ce second mode de maturation aboutit à la libération de produits de masse moléculaire supérieure à 22 kDa. Ces produits sont exprimés par la glande de l'oviducte, sécrétés avec la capsule interne et libérés par les œufs dans le milieu extérieur.

Un quatrième précurseur SP a par ailleurs été identifié : SP γ . La maturation de SP γ semble similaire à celle des autres précurseurs SP, avec une phéromone de masse moléculaire de 25771.43 Da (résidus Met et Cys oxydés), et potentiellement plusieurs peptides issus de clivages di et tribasiques. Deux de ces peptides pourraient être amidés en C-terminal, ce qui rendrait très probable l'existence d'une activité biologique.

Des homologues de séquence ont été recherchés chez d'autres Céphalopodes. Trois séquences complètes ont ainsi été identifiées à partir du génome d'*Octopus bimaculoïdes* (Figure 46A). L'analyse de ces séquences et l'observation des sites de clivage dibasiques montrent que ces derniers ne sont probablement pas clivés selon le premier mode de maturation décrit chez la seiche (Enault et al., 2012). Autre fait notable, pour deux des trois séquences (XP_014779273.1 et XP_014780685.1) le nombre de cystéines est impaire, contrairement aux phéromones de seiche pour lesquelles toutes les cystéines sont suspectées d'être impliquées dans la formation de ponts disulfures intrachaine.

L'alignement des séquences des deux espèces (Figure 46B) indique que plusieurs motifs sont bien conservés : GGGSNX(L/Q)CLP(N/R), ou (V/A)PC(A/S)VC(L/Q)(V/T) ou encore TRWGR qui est commun à toutes les séquences excepté pour SP β . Le motif CSGLPCP est quant à lui parfaitement conservé pour tous les précurseurs. Ce motif est de ce fait suspecté d'être le domaine interagissant avec le récepteur, au même titre que le motif IEECKTS commun à toutes les attractines d'aplysie (Cummins et al., 2004). À noter qu'aucune séquence n'a été identifiée chez *Loligo paeleii* puisqu'aucun des transcriptomes n'a été réalisé à partir des glandes annexes.

Dans cette étude, la phéromone β a été produite en système recombinant, mais les quantités produites et purifiées n'ont pas été suffisantes pour mener à bien les différents tests fonctionnels qui étaient prévus. Seuls quelques tests d'activité biologique préliminaires ont été réalisés mais sans résultats exploitables.

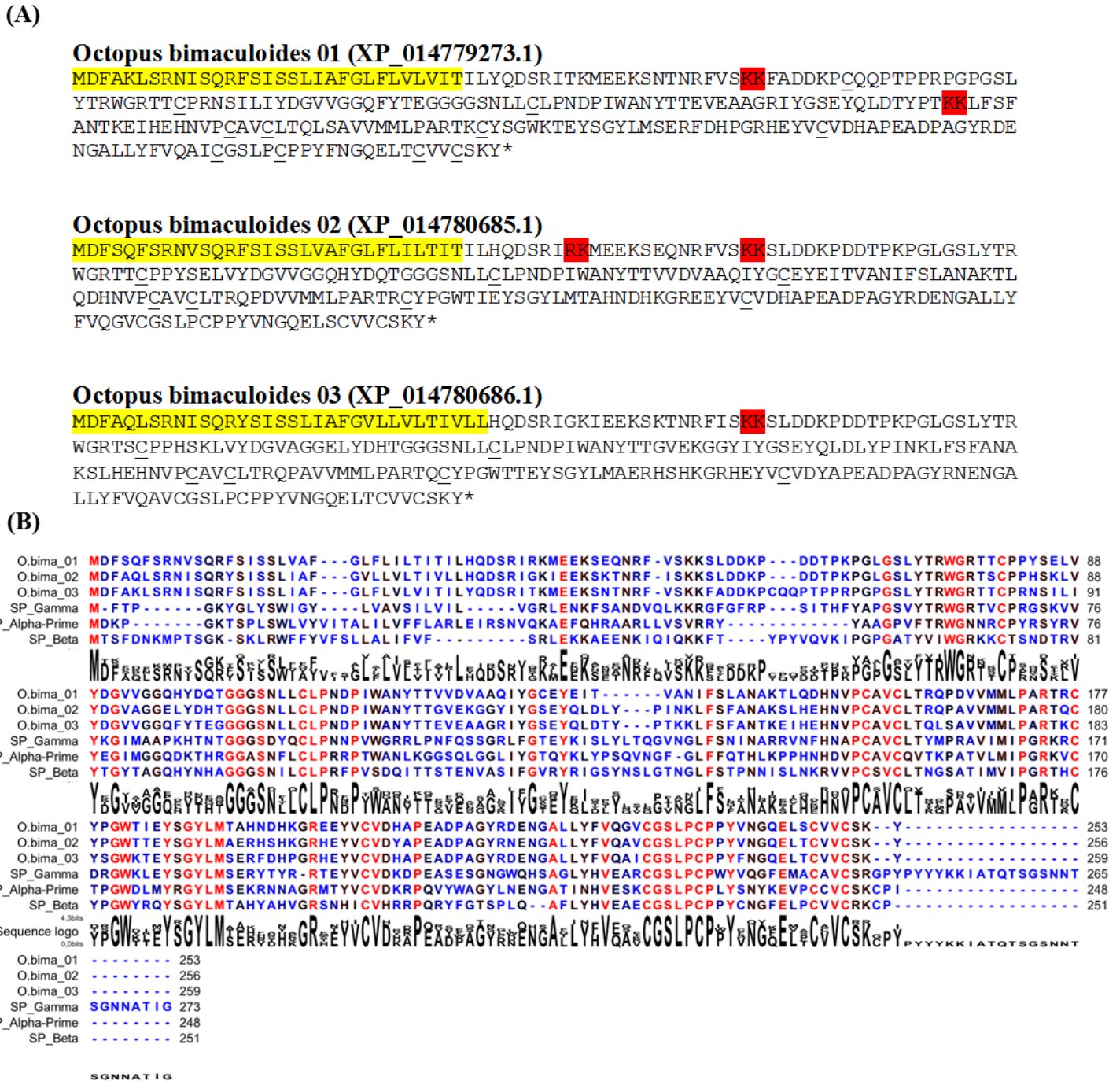


Figure 46 : Phéromones sexuelles chez *Octopus bimaculoides*. (A) : Précurseurs de phéromones sexuelles chez *O. bimaculoides* identifiés par Blast. Peptide signal en jaune, sites de clivage dibasique en rouge et cystéines soulignées. (B) : Alignement des précurseurs SP de *Sepia officinalis* avec les précurseurs identifiés chez *O. bimaculoides* : O.bima_01 (XP_014779273.1), O.bima_02 (XP_014780685.1) et O.bima_03 (XP_014780686.1).

Il apparaît donc nécessaire de réaliser des tests fonctionnels pour élucider le rôle des phéromones α , α' , β et γ issues du second mode de maturation des précurseurs.

Les phéromones α , α' et γ (la β étant déjà en cours de production) issues du second mode de maturation devront être produites afin de disposer de quantités adaptées à la réalisation de tests biologiques *ex vivo* et *in vivo*.

Les tests comportementaux *in vivo* seront réalisés dans des aquariums carrés de type "open space" d'une surface voisine d'un m², ou en labyrinthe de type Y avec un dispositif permettant de générer des courants laminaires. Quel que soit le type d'aquarium utilisé, l'objectif est de déterminer l'action des phéromones sur le comportement des géniteurs. L'open space est particulièrement adapté pour observer des variations de pattern, des déplacements inhabituels, des comportements en couple – distance entre les individus, accouplement, déplacements conjoints, etc. - lorsque le ou les animaux sont soumis à différentes concentrations de phéromones. Le labyrinthe en Y permet quant à lui de tester l'activité attractante des composés chimiques qui sont dispensés par l'une ou l'autre des 2 branches du Y. La difficulté provient de la vitesse de déplacement des seiches, animaux necto-benthiques, dont le déplacement en aquarium peut être motivé par de nombreux facteurs puisque ce déplacement est aisé et rapide. Les tests du même type réalisés avec des Gastéropodes comme l'aplysie sont beaucoup plus simples à interpréter puisque leur déplacement est lent ce qui bouleverse peu la stratification de la masse d'eau et permet de préserver le gradient de concentration du produit testé. Par ailleurs, la faible taille des aplysies permet de réaliser les tests dans des volumes réduits voisins de 5 à 6 litres (contre 100L pour les seiches), ce qui réduit considérablement la quantité de peptide ou de protéines nécessaire pour les tests comportementaux.

Les tests basés sur l'induction d'une variation d'expression en présence de concentrations croissantes de phéromones peuvent aussi permettre d'identifier les acteurs de la réponse à la stimulation phéromonale. L'induction peut être réalisée au niveau de l'animal mais aussi au niveau de l'organe cible si le prélèvement de celui-ci ne crée pas de biais au niveau expérimental lors de l'incubation. Un suivi d'expression en RNAseq prévoyant plusieurs réplicats biologiques est alors réalisable. Cette approche est d'autant plus puissante si un transcriptome de référence est disponible.

Enfin, la compilation d'observations répétées en aquarium du comportement des femelles qui s'apprentent à pondre révèle une étape de manipulation des œufs pondus par les autres femelles.

Ce comportement permet de suspecter la présence de phéromones de contact et de récepteurs localisés au niveau des bras.

Un comportement similaire est décrit chez les géniteurs d'aplysie : les animaux touchent les cordons d'œufs avec la bouche et les rhinophores. Ce comportement est suivi par l'initiation de la ponte environ 30 minutes après (Begnoche et al., 1996).

La recherche de récepteurs au niveau de l'épiderme des bras pourrait donc constituer une piste de recherche future intéressante. Quant aux messagers chimiques associés à cette stimulation, il peut s'agir des phéromones décrites dans cette étude mais aussi d'autres phéromones associées à la capsule externe et ne diffusant pas dans le milieu aquatique.

La présence de récepteurs au niveau des bras a été observée chez la seiche (Graziadei, 1964) mais l'auteur ne fait que spéculer quant aux aspects fonctionnels. Par ailleurs, chez le genre *Octopus* la présence de chémorécepteurs, notamment impliqués dans la reconnaissance des proies, a été mise en évidence (Anraku et al., 2005; Graziadei, 1962; Wells, 1963), il n'est donc pas à exclure que d'autres types de récepteurs soient aussi présents à ce niveau.

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Chez la seiche commune *Sepia officinalis*, la ponte est un processus stéréotypé dont la régulation repose sur au moins 3 types de régulateurs : les neuropeptides, les peptides ovariens et les phéromones sexuelles. Elle nécessite par ailleurs l'intervention d'un ensemble d'organes qui permettent la constitution d'un œuf riche en vitellus (téolécithe) protégé par une capsule glycoprotéique en mesure de permettre un développement de 90 jours sans protection parentale. La ponte fait appel à des structures contractiles qui assurent d'une part le transit de l'ovocyte depuis le cœlome génital jusqu'à la cavité palléale, l'oviducte, et d'autre part la sécrétion mécanique par des glandes spécialisées des glycoprotéines constitutives de la capsule disposées en couches concentriques autour de l'ovocyte.

Cette suite d'évènements qui aboutit au dépôt d'un œuf encapsulé avec une fréquence voisine d'un œuf toutes les 3 minutes pour finalement former une grappe de 200 à 1000 œufs selon la durée de la ponte et la taille de la femelle, requiert une coordination fine de l'ensemble des structures composant l'appareil génital femelle.

Les neuropeptides s'intègrent dans ce processus en jouant un rôle important dans la perception des paramètres environnementaux tels que la température de la masse d'eau, la photopériode et sans doute aussi la signature chimique des aires de ponte côtières. L'expression et la sécrétion des neuropeptides est donc la conséquence de l'intégration d'un ensemble de paramètres qui conduit au déclenchement de la ponte à la condition qu'un premier accouplement soit effectif. Dans le cas contraire, l'accouplement est l'évènement initiateur de la ponte comme il est possible de l'observer en début de saison de reproduction avec les animaux maintenus en captivité. Grâce à l'étude réalisée dans cette thèse, il a été démontré que 2 familles de neuropeptides identifiées récemment chez la seiche, CCAPs et orcokinines B (ex FLGamide) étaient impliquées dans la régulation de certains évènements constitutifs de la ponte. Ils sont exprimés dans plusieurs régions du SNC et en particulier dans le lobe palléoviscéral qui innerve les viscères, l'appareil génital et l'aire neurohémale de la veine cave. Leur action est confirmée par leur présence au niveau périphérique dans les terminaisons nerveuses des glandes sécrétrices de la capsule des œufs. Par ailleurs, l'approche immunocytochimique révèle aussi

la présence de cellules neurosécrétrices dans le tissu glandulaire pour les orcokinines B, ce qui constitue pour l'instant une particularité chez les Céphalopodes, mais a déjà été décrit chez les Arthropodes (Sakai et al., 2004).

L'analyse structurale réalisée sur l'un des CCAPs et celle en cours d'exploitation réalisée sur 2 orcokinines B révèlent une capacité de structuration de ces neuropeptides en présence de micelles de SDS, démontrant ainsi une aptitude à se structurer dans des conditions de milieu mimant un environnement membranaire. On peut légitimement supposer que la structuration observée est celle qu'adopte le peptide lors de son interaction avec les récepteurs membranaires.

Les CCAPs et les orcokinines B viennent donc compléter la liste des neuropeptides impliqués dans le contrôle de la reproduction chez la seiche : GWamide (Henry et al, 1997), FaRPs (Henry et al, 1999) et Sepiatocine (Henry et al, 2013). La ponte est donc régulée par plusieurs familles de neuropeptides qui agissent en synergie, comme le démontre les résultats obtenus dans cette étude avec la synergie orcokinine B / FaRPs. On peut donc supposer que la modulation de l'activité contractile de l'oviducte est le résultat de l'association de multiples stimulations dont la combinaison aboutit à un profil de contraction qu'il est difficile de reproduire expérimentalement, mais dont la conséquence est la propulsion des ovocytes à une fréquence d'un ovocyte toutes les 3 minutes.

On constate par ailleurs une certaine convergence fonctionnelle entre les Arthropodes et Céphalopodes. Dans ces 2 groupes, les CCAPs exercent une activité au niveau circulatoire, activité qui est à l'origine de leur nom (Stangier et al., 1987), mais aussi au niveau de l'émission des gamètes. Par ailleurs, chez l'insecte *Blattella germanica* (Ons et al., 2015), les orcokinines B possèdent une activité vitellogène. Bien que détectées en spectrométrie de masse dans le stroma ovarien, les orcokinines B n'ont pour l'instant aucune activité connue à ce niveau. Il s'agit donc d'une piste à explorer chez la seiche, aucun facteur vitellogène n'ayant encore été identifié chez les Céphalopodes.

La seconde partie de cette étude concerne les phéromones sexuelles libérées par les femelles ayant atteint la maturité sexuelle. Leur implication dans le processus de ponte a déjà été décrite (Enault et al., 2012). Dans cette étude, l'existence d'un second mécanisme de maturation des précurseurs protéiques a été établie par une approche protéomique. Les résultats démontrent que les œufs libèrent juste après la ponte dans le milieu environnant des produits de clivage des précurseurs α , α' et β de masses moléculaires supérieures à 22 kDa.

Ce qui signifie que α , α' , β et γ , cette dernière ayant été identifiée dans cette étude, sont à l'origine de la libération de 2 types de phéromones : des produits de clivage de faible masse moléculaire ayant probablement une durée de vie courte dans le milieu et ciblant les organes génitaux des couples, l'oviducte distal et le pénis en particulier qui baignent l'un et l'autre dans la cavité palléale, et un second type de phéromones correspondant à des produits de clivage de masse moléculaire plus élevée. La fonction principale de ces derniers serait de générer un signal chimique destiné à permettre le regroupement des géniteurs sur des aires de ponte spécifiques. Cette seconde catégorie présente de nombreuses similitudes avec le modèle aplysie et le bouquet de phéromones constitué de l'attractine, la temptine, l'enticine, la séductine et Alb-1 (Cummins et al., 2008, 2005; Cummins et al., 2004; Painter et al., 1998). Toutefois, l'approche fonctionnelle de cette seconde catégorie de phéromones reste à réaliser avec une étape initiale de production massive en système recombinant.

La présence d'un domaine heptapeptidique parfaitement conservé (y compris chez *O. bimaculoides*), CGSLPCP, constitue aussi un autre point commun avec les phéromones décrites chez l'aplysie dont l'heptapeptide conservé chez différentes espèces, IEECKTS, est fortement suspecté d'être l'un des domaines d'interaction avec le récepteur.

Les phéromones sont sécrétées par la glande de l'oviducte avec les protéines capsulaires qui constituent la capsule la plus interne de l'œuf. Elles migrent ensuite très rapidement vers la capsule externe pour rapidement être libérées dans l'eau de mer. La cohabitation de 2 modes de maturation au sein d'un même tissu permet de suspecter l'existence de 2 types de cellules sécrétrices dont l'un présenterait peut-être un déficit en proprotéines convertases. Cette hypothèse reste à démontrer expérimentalement.

Perspectives

Ce travail a permis de répondre à un certain nombre d'interrogations, mais il a aussi mis en évidence de nouvelles questions qui pour l'instant restent en suspens.

Parmi celles-ci, la nature des **facteurs vitellogènes** régulant la synthèse de vitellus mais aussi la synthèse des produits capsulaires restent à élucider. Les régulateurs candidats sont sans doute à rechercher parmi les neuropeptides surexprimés en vitellogenèse. Une approche différentielle en RNAseq, lobe palléoviscéral de femelles en vitellogenèse *versus* prévitellogenèse,

permettrait probablement de répondre à cette question avec un complément fonctionnel au niveau des cellules glandulaires sécrétrices.

Les analyses peptidomiques ciblant les CCAPs ont révélé la présence systématique de **peptides cryptiques** colocalisés avec les CCAPs prédits *in silico*. Ces résultats posent la question du rôle régulateur potentiel de cette catégorie de peptides (aussi appelée cryptome). Les CCAPs offrent un modèle d'étude très intéressant sur ce sujet puisque la presque totalité des peptides cryptiques est identifiée en spectrométrie de masse et que 2 de ces peptides présentent des homologies de structure. Par ailleurs, nous disposons de plusieurs tests myotropes pour répondre à la question fonctionnelle.

Le **pavillon de l'oviducte** est une structure prolongeant l'oviducte distal et baignant dans la cavité palléale. Sa fonction lors de l'émission des ovocytes est encore peu connue, mais il pourrait orienter les ovocytes vers l'orifice des glandes nidamentaires principales pour la sécrétion de la capsule externe. Le transcriptome de cette structure révèle la présence de nombreux récepteurs qui permettent de suspecter un rôle clé dans la réception de messagers chimiques aquatiques. Le pavillon de l'oviducte pourrait avoir une fonction similaire à celle des rhinophores de l'aplysie.

La question de la **localisation tissulaire des récepteurs aux phéromones α , α' , β et γ** reste entière même si des résultats préliminaires permettent d'identifier un transcrite candidat colocalisé au niveau de l'organe olfactif des mâles et du pavillon de l'oviducte des femelles matures. Une première approche par un criblage immunocytohistologique devrait permettre d'obtenir des informations quant aux distributions tissulaire et saisonnière du récepteur ciblé. Le profil d'expression saisonnier constituera aussi un indice important pour évaluer l'intérêt de ce récepteur.

Ces multiples pistes de recherche, dont la liste n'est pas exhaustive, montrent si cela était encore nécessaire, les nombreuses questions qui restent posées pour comprendre pleinement les mécanismes régulateurs qui pilotent la ponte chez la seiche *Sepia officinalis*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adamo, S. a, Hanlon, R.T., 1996. Do cuttlefish (Cephalopoda) signal their intentions to conspecifics during agonistic encounters? *Anim. Behav.* 52, 73–81. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/anbe.1996.0153>
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.C., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Miklos, G.L.G., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H., Andrews-pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P. V, Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., Pablos, B. De, Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., Mcintosh, T.C., Mcleod, M.P., Mcpherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V, Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D.C., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Side, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster* 287, 2185–2195.
- Ahn, S.J., Martin, R., Rao, S., Choi, M.Y., 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](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.05.005)
- Alevizos, A., Weiss, K.R., Koester, J., 1991. Synaptic actions of identified peptidergic neuron R15 in *Aplysia*. III. Activation of the large hermaphroditic duct. *J. Neurosci.* 11, 1282–1290.
- Alexandrowicz, J.S., 1965. The neurosecretory system of the vena cava in Cephalopoda II. *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris*. *J. mar. biol.* 209–228.

doi:10.1017/S0025315400024681

- Alexandrowicz, J.S., 1964. The Neurosecretory System of the Vena Cava In Cephalopoda I. *Eledone Cirrosa*. *J. mar. biol.* 111–132. doi:10.1017/S0025315400024681
- Alexandrowicz, J.S., 1960. Innervation of the Hearts of *Sepia officinalis*. *Acta Zool.* doi:10.1111/j.1463-6395.1960.tb00475.x
- Allen, J.J., Akkaynak, D., Schnell, A.K., Hanlon, R.T., 2017. Dramatic Fighting by Male Cuttlefish for a Female Mate. *Am. Nat.* 190, 144–151. doi:10.1086/692009
- Anraku, K., Archdale, M.V., Hatanaka, K., Marui, T., 2005. Chemical Stimuli and Feeding Behavior in Octopus, *Octopus vulgaris*. *Phuket Mar. Biol. Cent.* 66, 221–227.
- Arch, S., 1972. Biosynthesis of the egg-laying hormone (ELH) in the bag cell neurons of *Aplysia californica*. *J. Gen. Physiol.* 60, 102–119. doi:10.1085/jgp.60.1.102
- Arch, S., Smock, T., 1977. Egg-Laying Behavior in *Aplysia californica*. *Behav. Biol.* 19, 45–54.
- Audesirk, T.E., 1977. Chemoreception in *Aplysia californica* III. Evidence for pheromones influencing reproductive behavior. *Behav. Biol.* 20, 235–243. doi:10.1016/S0091-6773(77)90799-4
- Autelitano, D.J., Rajic, A., Smith, A.I., Berndt, M.C., Ilag, L.L., Vadas, M., 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
- Baker, J.D., McNabb, S.L., Truman, J.W., 1999. The hormonal coordination of behavior and physiology at adult ecdysis in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 202, 3037–3048.
- Bartelt, R.J., Schaner, A.M., Jackson, L.L., 1985. *cis*-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. *J. Chem. Ecol.* 11, 1747–1756. doi:10.1007/BF01012124
- Begnoche, V., Moore, S.K., Blum, N., Van Gils, C., Mayeri, E., 1996. Sign stimulus activates a peptidergic neural system controlling reproductive behavior in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 75, 2161–2166.
- Benton, R., 2007. Sensitivity and specificity in *Drosophila* pheromone perception. *Trends Neurosci.* 30, 512–519. doi:10.1016/j.tins.2007.07.004
- Bernay, B., Baudy-Floc'h, M., Gagnon, J., Henry, J., 2006a. Ovarian jelly-peptides (OJPs), a new family of regulatory peptides identified in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Peptides* 27, 1259–68. doi:10.1016/j.peptides.2005.11.025
- Bernay, B., Baudy-Floc'h, M., Zanuttini, B., Gagnon, J., Henry, J., 2005. Identification of SepCRP analogues in the cuttlefish *Sepia officinalis*: A novel family of ovarian regulatory peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1037–1047. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.034
- Bernay, B., Baudy-Floc'h, M., Zanuttini, B., Zatylny, C., Pouvreau, S., Henry, J., 2006b. Ovarian and sperm regulatory peptides regulate ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 607–616. doi:10.1002/mrd.20472

- Bernay, B., Gagnon, J., Henry, J., 2004. Egg capsule secretion in invertebrates: a new ovarian regulatory peptide identified by mass spectrometry comparative screening in *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 215–222. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.085
- Bernheim, S.M., Mayeri, E., 1995. Complex behavior induced by egg-laying hormone in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. A* 176, 131–136. doi:10.1007/BF00197759
- Bidder, A.M., Boletzky, M.V. v., Boletzky, S. v., Hochberg, F.G., Mangold, K., Marthy, H.-J., Portmann, A., Teichert, C., Worms, J., 1989. *Traité de zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome V : Céphalopodes.*, Masson. ed. Pierre-P. Grassé, Paris.
- Biggs, J., Epel, D., 1991. Egg capsule sheath of *Loligo opalescens* Berry: Structure and association with bacteria. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 259, 263–267.
- Blankenship, J.E., Haskins, J.T., 1979. Electrotonic coupling among neuroendocrine cells in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 42, 347–355.
- Bloodgood, R.A., 1977. The squid accessory nidamental gland: Ultrastructure and association with bacteria. *Tissue Cell* 9, 197–208. doi:10.1016/0040-8166(77)90016-7
- Boal, J.G., 1997. Female Choice of Males in Cuttlefish (Mollusca: Cephalopoda). *Behaviour* 134, 975–988.
- Boal, J.G., 1996. Absence of social recognition in laboratory-reared cuttlefish, *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Anim. Behav.* 52, 529–537. doi:10.1006/anbe.1996.0195
- Boal, J.G., Prosser, K.N., Holm, J.B., Simmons, T.L., Haas, R.E., Nagle, G.T., 2010. Sexually mature cuttlefish are attracted to the eggs of conspecifics. *J. Chem. Ecol.* 36, 834–6. doi:10.1007/s10886-010-9816-0
- Boletzky, S., 1987. Fecundity variation in relation to intermittent or chronic spawning in the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *Bull. Mar. Sci.* 40, 382–387.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bosso, A., Pirone, L., Gaglione, R., Pane, K., Del Gatto, A., Zaccaro, L., Di Gaetano, S., Diana, D., Fattorusso, R., Pedone, E., Cafaro, V., Haagsman, H.P., van Dijk, A., Scheenstra, M.R., Zanfardino, A., Crescenzi, O., Arciello, A., Varcamonti, M., Veldhuizen, E.J.A., Di Donato, A., Notomista, E., Pizzo, E., 2017. A new cryptic host defense peptide identified in human 11-hydroxysteroid dehydrogenase-1 β -like: from in silico identification to experimental evidence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1861, 2342–2353. doi:10.1016/j.bbagen.2017.04.009
- Boucaud-Camou, E., Boismery, J., 1989. The migration of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) in the English Channel, in: *La Seiche / The Cuttlefish*. Centre de publications de l'université de Caen, Caen, pp. 179–189.
- Boucaud-Camou, E., Koueta, N., Boismery, J., Medhioub, A., 1989. The sexual cycle of *Sepia officinalis* L. from the Bay of Seine, in: *La Seiche / The Cuttlefish*. Centre de publications de l'université de Caen, Caen, pp. 141–151.

- Boucaud-Camou, E., Medhioub, A., Catania, R., 1988. Développement du follicule ovarien chez la seiche *Sepia officinalis* L.: étude stéréologique. *Bull. la Société Zool. Fr.* 113, 257–262.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Branton, W.D., Arch, S., Smock, T., Mayeri, E., 1978. Evidence for mediation of a neuronal interaction by a behaviorally active peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5732–5736.
- Brown, R.O., Mayeri, E., 1989. Positive feedback by autoexcitatory neuropeptides in neuroendocrine bag cells of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 9, 1443–1451.
- Buresi, A., Croll, R.P., Tiozzo, S., Bonnaud, L., Baratte, S., 2014. Emergence of sensory structures in the developing epidermis in *sepia officinalis* and other coleoid cephalopods. *J. Comp. Neurol.* 522, 3004–3019. doi:10.1002/cne.23562
- Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D., 1961. On the sexattractant of silk-moths. II. Constitution and configuration of bombykol. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* 324, 84–87.
- Case, D.A., Cheatham III, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz JR., K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., 2005. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688. doi:10.1117/1.3103783.Extended-working-distance
- Chatenet, D., Dubessy, C., Boullaran, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Lihmann, I., Pacaud, P., Tonon, M.C., Vaudry, H., Leprince, J., 2006. Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogues: Identification of a urotensin II antagonist. *J. Med. Chem.* 49, 7234–7238. doi:10.1021/jm0602110
- Chatenet, D., Dubessy, C., Leprince, J., Boullaran, C., Carlier, L., Ségalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Oulyadi, H., Davoust, D., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Tonon, M.C., Lihmann, I., Pacaud, P., Vaudry, H., 2004. Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* 25, 1819–1830. doi:10.1016/j.peptides.2004.04.019
- Chichery, M.P., Chichery, R., 1992. Behavioural and neurohistological changes in aging *Sepia*. *Brain Res.* 574, 77–84. doi:10.1016/0006-8993(92)90802-G
- Chichery, M.P., Chichery, R., 1987. The Anterior Basal Lobe and Control of Prey-Capture in the Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Physiol. Behav.* 40, 329–336.
- Chiu, A.Y., Hunkapiller, M.W., Heller, E., Stuart, D.K., Hood, L.E., Strumwasser, F., 1979. Purification and primary structure of the neuropeptide egg-laying hormone of *Aplysia californica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 6656–6660. doi:10.1073/pnas.76.12.6656
- Chiu, A.Y., Strumwasser, F., 1984. Two neuronal populations in the head ganglia of *Aplysia californica* with egg-laying hormone-like immunoreactivity. *Brain Res.* 294, 83–93. doi:10.1016/0006-8993(84)91312-X
- Chiu, A.Y., Strumwasser, F., 1981. An Immunohistochemical Study of the Neuropeptidergic Bag Cells of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 1, 812–826.

- Christie, A.E., Roncalli, V., Cieslak, M.C., Pascual, M.G., Yu, A., Lameyer, T.J., Stanhope, M.E., Dickinson, P.S., 2017. Prediction of a neuropeptidome for the eyestalk ganglia of the lobster *Homarus americanus* using a tissue-specific de novo assembled transcriptome. *Gen. Comp. Endocrinol.* 243, 96–119. doi:10.1016/j.ygcen.2016.11.001
- Chung, J.S., Wilcockson, D.C., Zmora, N., Zohar, Y., Dirksen, H., Webster, S.G., 2006. Identification and developmental expression of mRNAs encoding crustacean cardioactive peptide (CCAP) in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 209, 3862–3872. doi:10.1242/jeb.02425
- Cornet, V., Henry, J., Corre, E., Le Corguillé, G., Zatylny-Gaudin, C., 2015a. The Toll/NF- κ B pathway in cuttlefish symbiotic accessory nidamental gland. *Dev. Comp. Immunol.* 53, 42–46. doi:10.1016/j.dci.2015.06.016
- Cornet, V., Henry, J., Goux, D., Duval, E., Bernay, B., Le Corguillé, G., Corre, E., Zatylny-Gaudin, C., 2015b. How Egg Case Proteins Can Protect Cuttlefish Offspring? *PLoS One* 10, e0132836. doi:10.1371/journal.pone.0132836
- Cummins, S.F., Boal, J.G., Buresch, K.C., Kuanpradit, C., Sobhon, P., Holm, J.B., Degnan, B.M., Nagle, G.T., Hanlon, R.T., 2011. Extreme Aggression in Male Squid Induced by a β -MSP-like Pheromone. *Curr. Biol.* 21, 322–327. doi:10.1016/j.cub.2011.01.038
- Cummins, S.F., De Vries, M.R., Hill, K.S., Boehning, D., Nagle, G.T., 2007a. Gene identification and evidence for expression of G protein alpha subunits, phospholipase C, and an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Aplysia californica* rhinophore. *Genomics* 90, 110–120. doi:10.1016/j.ygeno.2007.03.020
- Cummins, S.F., Degnan, B.M., Nagle, G.T., 2008. Characterization of *Aplysia* Alb-1, a candidate water-borne protein pheromone released during egg laying. *Peptides* 29, 152–61. doi:10.1016/j.peptides.2007.07.031
- Cummins, S.F., Erpenbeck, D., Zou, Z., Claudianos, C., Moroz, L.L., Nagle, G.T., Degnan, B.M., 2009. Candidate chemoreceptor subfamilies differentially expressed in the chemosensory organs of the mollusc *Aplysia*. *BMC Biol.* 7, 1–20. doi:10.1186/1741-7007-7-28
- Cummins, S.F., Leblanc, L., Degnan, B.M., Nagle, G.T., 2009. Molecular identification of candidate chemoreceptor genes and signal transduction components in the sensory epithelium of *Aplysia*. *J. Exp. Biol.* 212, 2037–2044. doi:10.1242/jeb.026427
- Cummins, S.F., Nichols, A.E., Amare, A., Hummon, A.B., Sweedler, J. V., Nagle, G.T., 2004. Characterization of *Aplysia* enticin and temptin, two novel water-borne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction. *J. Biol. Chem.* 279, 25614–25622. doi:10.1074/jbc.M313585200
- Cummins, S.F., Nichols, A.E., Rajarathnam, K., Nagle, G.T., 2004. A conserved heptapeptide sequence in the waterborne attractin pheromone stimulates mate attraction in *Aplysia*. *Peptides* 25, 185–9. doi:10.1016/j.peptides.2003.12.018
- Cummins, S.F., Nichols, A.E., Warso, C.J., Nagle, G.T., 2005. *Aplysia* seductin is a water-borne protein pheromone that acts in concert with attractin to stimulate mate attraction. *Peptides* 26, 351–9. doi:10.1016/j.peptides.2004.10.024
- Cummins, S.F., Xie, F., De Vries, M.R., Annangudi, S.P., Misra, M., Degnan, B.M., Sweedler,

- J. V., Nagle, G.T., Schein, C.H., 2007b. *Aplysia temptin* - The “glue” in the water-borne attractin pheromone complex. *FEBS J.* 274, 5425–5437. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06070.x
- da Silva, R., Lange, A.B., 2006. The association of crustacean cardioactive peptide with the spermatheca of the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 52, 399–409. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.01.006
- De Haes, W., Van Sinay, E., Detienne, G., Temmerman, L., Schoofs, L., Boonen, K., 2015. Functional neuropeptidomics in invertebrates. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1854, 812–826. doi:10.1016/j.bbapap.2014.12.011
- De Lisa, E., Salzano, A.M., Moccia, F., Scaloni, A., Di Cosmo, A., 2013. Sperm-attractant peptide influences the spermatozoa swimming behavior in internal fertilization in *Octopus vulgaris*. *J. Exp. Biol.* 216, 2229–2237. doi:10.1242/jeb.081885
- Dhainaut, A., Richard, A., 1976. Vitellogenèse chez les céphalopodes décapodes. Evolution de l’ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 65, 183–208.
- Di Cristo, C., Delli Bovi, P., Di Cosmo, A., 2003. Role of FMRFamide in the reproduction of *Octopus vulgaris*: Molecular analysis and effect on visual input. *Peptides* 24, 1525–1532. doi:10.1016/j.peptides.2003.07.018
- Dockray, G.J., 2004. The expanding family of RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol* 89, 229–235. doi:doi:10.1113/expphysiol.2004.027169
- Donini, A., Agricola, H.J., Lange, A.B., 2001. Crustacean cardioactive peptide is a modulator of oviduct contractions in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 47, 277–285. doi:10.1016/S0022-1910(00)00112-8
- Dulac, C., Torello, a. T., 2003. Sensory systems: Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 551–562. doi:10.1038/nrn1140
- Dulcis, D., Levine, R.B., 2003. Innervation of the heart of the adult fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 465, 560–578. doi:10.1002/cne.10869
- Dulcis, D., Levine, R.B., Ewer, J., 2005. Role of the neuropeptide CCAP in *Drosophila* cardiac function. *J. Neurobiol.* 64, 259–274. doi:10.1002/neu.20136
- Duval, P., Chichery, M.P., Chichery, R., 1984. Prey capture by the cuttlefish (*Sepia officinalis* L) An experimental study of two strategies. *Behav. Processes* 9, 13–21.
- Dylag, T., Pachuta, A., Raoof, H., Kotlinska, J., Silberring, J., 2008. A novel cryptic peptide derived from the rat neuropeptide FF precursor reverses antinociception and conditioned place preference induced by morphine. *Peptides* 29, 473–478. doi:10.1016/j.peptides.2007.09.014
- Ebberink, R.H., van Loenhout, H., Geraerts, W.P., Joosse, J., 1985. Purification and amino acid sequence of the ovulation neurohormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7767–71.
- Emery, D.G., 1975. The histology and fine structure of the olfactory organ of the squid *Lolliguncula brevis* Blainville. *Tissue Cell* 7, 357–367. doi:10.1016/0040-8166(75)90011-

- Enault, J., 2012. Identification et caractérisation de phéromones sexuelles impliquées dans l'accouplement et la ponte chez la seiche *Sepia officinalis* : Perturbations induites par la présence de PCBs dans le milieu marin.
- Enault, J., Zatylny-Gaudin, C., Bernay, B., Lefranc, B., Leprince, J., Baudy-Floc'h, M., Henry, J., 2012. A complex set of sex pheromones identified in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *PLoS One* 7, e46531. doi:10.1371/journal.pone.0046531
- Estévez-Lao, T.Y., Boyce, D.S., Honegger, H.-W., Hillyer, J.F., 2013. Cardioacceleratory function of the neurohormone CCAP in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 216, 601–13. doi:10.1242/jeb.077164
- Fan, X., Wu, B., Nagle, G.T., Painter, S.D., 1997. Molecular cloning of a cDNA encoding a potential water-borne pheromonal attractant released during *Aplysia* egg laying. *Mol. Brain Res.* 48, 167–170. doi:10.1016/S0169-328X(97)00154-X
- Ferguson, G.P., Ter Maat, A., Parsons, D.W., Pinsker, H.M., 1989. Egg laying in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. A* 164, 835–847.
- Fields, W.G., 1965. The Structure, Development, Food Relations, Reproduction, and Life History of the Squid *Loligo opalescens* Berry. *Calif. Fish Game Fish Bull.* 131, 1–108.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L.L., Tate, J., Punta, M., 2014. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42, 222–230. doi:10.1093/nar/gkt1223
- Fisher, T.E., Lin, C.H., Kaczmarek, L.K., 1993. The peptide FMRFa terminates a discharge in *Aplysia* bag cell neurons by modulating calcium, potassium, and chloride conductances. *J. Neurophysiol.* 69, 2164–2173.
- Furuya, K., Liao, S., Reynolds, S.E., Ota, R.B., Hackett, M., Schooley, D. a, 1993. Isolation and Identification of a Cardioactive Peptide From *Tenebrio Molitor* and *Spodoptera Eridania* 374, 1065–1074.
- Garcia, V.J., Daur, N., Temporal, S., Schulz, D.J., Bucher, D., 2015. Neuropeptide Receptor Transcript Expression Levels and Magnitude of Ionic Current Responses Show Cell Type-Specific Differences in a Small Motor Circuit. *J. Neurosci.* 35, 6786–6800. doi:10.1523/JNEUROSCI.0171-15.2015
- Geraerts, W.P.M., Cheeseman, P., Ebberink, R.H.M., Nuyt, K., Hogenes, T.M., 1983. Partial purification and characterization of the ovulation hormone of the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 51, 471–476. doi:10.1016/0016-6480(83)90064-3
- Gilly, W.F., Lucero, M.T., 1992. Behavioral responses to chemical stimulation of the olfactory organ in the squid *Loligo opalescens*. *J. Exp. Biol.* 162, 209–229.
- Gomez-diaz, C., Benton, R., 2013. The joy of sex pheromones. *EMBO Rep.* 14, 874–883. doi:10.1038/embor.2013.140
- Gonçalves, R.A., Aragão, C., Frias, P.A., Sykes, A. V., 2012. The use of different anaesthetics

- as welfare promoters during short-term human manipulation of European cuttlefish (*Sepia officinalis*) juveniles. *Aquaculture* 370–371, 130–135. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.014
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Friedman, N., Regev, A., 2013. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. doi:10.1038/nbt.1883.Trinity
- Graziadei, P., 1964. Receptors in the sucker of the cuttlefish. *Nature* 203, 384–386. doi:10.1038/201464a0
- Graziadei, P., 1962. Receptors in the suckers of Octopus. *Nature* 195, 57–59.
- Guerra, A., 2006. Ecology of *Sepia officinalis*. *Vie Milieu* 56, 97–107.
- Ha, T.S., Smith, D.P., 2006. A Pheromone Receptor Mediates 11-cis-Vaccenyl Acetate-Induced Responses in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 26, 8727–8733. doi:10.1523/JNEUROSCI.0876-06.2006
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Philip, D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc.* 8, 1494–1512. doi:doi:10.1038/nprot.2013.084.
- Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T., Touhara, K., 2010. The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature* 466, 118–122. doi:10.1038/nature09142
- Hanlon, R.T., Ament, S. a., Gabr, H., 1999. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). *Mar. Biol.* 134, 719–728. doi:10.1007/s002270050588
- Hanlon, R.T., Maxwell, M.R., Shashar, N., 1997. Behavioral dynamics that would lead to multiple paternity within egg capsules of the squid *Loligo pealei*. *Biol. Bull.* 193, 212–214.
- Hanlon, R.T., Messenger, J.B., 1996. *Cephalopod behaviour*. Cambridge Univ. Press.
- Hanlon, R.T., Messenger, J.B., 1988. Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.): the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. London* 320, 437–487.
- Haskins, J.T., Blankenship, J.E., 1979. Interactions between bilateral clusters of neuroendocrine cells in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 42, 356–367.
- Hattori, T., Osakada, T., Matsumoto, A., Matsuo, N., Haga-Yamanaka, S., Nishida, T., Mori, Y., Mogi, K., Touhara, K., Kikusui, T., 2016. Self-Exposure to the Male Pheromone ESP1 Enhances Male Aggressiveness in Mice. *Curr. Biol.* 26, 1229–1234. doi:10.1016/j.cub.2016.03.029

- Heller, E., Kaczmarek, L.K., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Strumwasser, F., 1980. Purification and primary structure of two neuroactive peptides that cause bag cell afterdischarge and egg-laying in *Aplysia*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77 (4), 2328–2332.
- Henry, J., Boucaud-Camou, E., 1993. Experimental evidence of a dual endocrine control of biosynthesis in the main nidamental glands of *Sepia officinalis* L. by factors from the central nervous system and the ovary. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 739–742.
- Henry, J., Cornet, V., Bernay, B., Zatylny-Gaudin, C., 2013. Identification and expression of two oxytocin/vasopressin-related peptides in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Peptides* 46, 159–66. doi:10.1016/j.peptides.2013.05.004
- Henry, J., Favrel, P., Boucaud-Camou, E., 1997. Isolation and identification of a novel Ala-Pro-Gly-Trp-amide-related peptide inhibiting the motility of the mature oviduct in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Peptides* 18, 1469–1474. doi:10.1016/S0196-9781(97)00241-6
- Henry, J., Zatylny, C., 2002. Identification and tissue mapping of APGWamide-related peptides in *Sepia officinalis* using LC-ESI-MS / MS 23, 1031–1037.
- Henry, J., Zatylny, C., Boucaud-Camou, E., 1999. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: Involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* 20, 1061–1070. doi:10.1016/S0196-9781(99)00102-3
- Honegger, H.W., Market, D., Pierce, L. a., Dewey, E.M., Kostron, B., Wilson, M., Choi, D., Klukas, K. a., Mesce, K. a., 2002. Cellular localization of bursicon using antisera against partial peptide sequences of this insect cuticle-sclerotizing neurohormone. *J. Comp. Neurol.* 452, 163–177. doi:10.1002/cne.10357
- In, V. Van, Ntalamagka, N., Connor, W.O., Wang, T., Powell, D., Cummins, S.F., Elizur, A., 2016. Peptides Reproductive neuropeptides that stimulate spawning in the Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*). *Peptides* 82, 109–119. doi:10.1016/j.peptides.2016.06.007
- Jackson, G.E., Mabula, A.N., Stone, S.R., Gäde, G., Kövér, K.E., Szilágyi, L., van der Spoel, D., 2009. Solution conformations of an insect neuropeptide: Crustacean cardioactive peptide (CCAP). *Peptides* 30, 557–564. doi:10.1016/j.peptides.2008.11.014
- Johnson, B.A., 2004. Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol. Biol.* 278, 313–352.
- Kauer, J.A., Fisher, T.E., Kaczmarek, L.K., 1987. Alpha bag cell peptide directly modulates the excitability of the neurons that release it. *J Neurosci* 7, 3623–3632.
- Kim, S., Martin, K.C., 2015. Neuron-wide RNA transport combines with netrin-mediated local translation to spatially regulate the synaptic proteome. *Elife* 2015, 1–24. doi:10.7554/eLife.04158
- King, A.J., Adamo, S. a, Hanlon, R.T., 2003. Squid egg mops provide sensory cues for increased agonistic behaviour between male squid. *Anim. Behav.* 66, 49–58. doi:10.1006/anbe.2003.2197
- Koradi, R., Billeter, M., Wüthrich, K., 1996. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* 14, 51–55. doi:10.1016/0263-

7855(96)00009-4

- Krieger, E., Koraimann, G., Vriend, G., 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - A self-parameterizing force field. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 47, 393–402. doi:10.1002/prot.10104
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
- Kupfermann, I., 1967. Stimulation of Egg Laying: Possible Neuroendocrine Function of Bag Cells of Abdominal Ganglion of *Aplysia californica*. *Nature* 216, 814–815.
- Kupfermann, I., Carew, T.J., 1974. Behavior patterns of *Aplysia californica* in its natural environment. *Behav. Biol.* 12, 317–337. doi:10.1016/S0091-6773(74)91503-X
- Kupfermann, I., Kandel, E.R., 1970. Electrophysiological properties and functional interconnections of two symmetrical neurosecretory clusters (bag cells) in abdominal ganglion of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 33, 865–876.
- Kurtovic, A., Widmer, A., Dickson, B.J., 2007. A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature* 446, 542–546. doi:10.1038/nature05672
- Labarrère, P., Chatenet, D., Leprince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M.-C., Dubessy, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Calas, B., Pacaud, P., Vaudry, H., 2003. Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 18, 77–88. doi:10.1080/1475636031000093507
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25
- Lee, D., Orchard, I., Lange, A.B., 2013. Evidence for a conserved CCAP-signaling pathway controlling ecdysis in a hemimetabolous insect, *Rhodnius prolixus*. *Front. Neurosci.* 7, 1–9. doi:10.3389/fnins.2013.00207
- Lehman, H.K., Murguic, C.M., Miller, T. a., Lee, T.D., Hildebrand, J.G., 1993. Crustacean cardioactive peptide in the sphinx moth, *Manduca sexta*. *Peptides*. doi:10.1016/0196-9781(93)90106-Q
- Leprince, J., Oulyadi, H., Vaudry, H., Masmoudi, O., Gandolfo, P., Patte, C., Costentin, J., Fauchère, J.-L., Davoust, D., Vaudry, H., Tonon, M., 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.
- Lewis, P.N., Momany, F.A., Scheraga, H.A., 1973. Chain reversals in proteins. *BBA - Protein Struct.* 303, 211–229. doi:10.1016/0005-2795(73)90350-4
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12. doi:10.1186/1471-2105-12-323
- Liu, Z., Donald, J., Hanna, P., Nuurai, P., Sobhon, P., 2009. Comparative distribution of a

- putative egg-laying hormone in neural and reproductive tissues of four Decapoda crustaceans. *Invertebr. Neurosci.* 9, 21–28. doi:10.1007/s10158-009-0087-9
- Liu, Z., Sobhon, P., Withyachumnarnkul, B., Hanna, P., 2006. Identification of a putative egg-laying hormone in neural and ovarian tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using immunocytochemistry. *Invertebr. Neurosci.* 6, 41–46. doi:10.1007/s10158-006-0016-0
- Loi, P.K., Emmal, S. a, Park, Y., Tublitz, N.J., 2001. Identification, sequence and expression of a crustacean cardioactive peptide (CCAP) gene in the moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 204, 2803–16.
- Loi, P.K., Tublitz, N., 1997. Molecular analysis of FMRFamide- and FMRFamide-related peptides (FaRPS) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* 200, 1483–1489.
- Loi, P.O.H.K., Tublitz, N.J., 2000. Roles of Glutamate and FMRFamide- Related Peptides at the Chromatophore Neuromuscular Junction in the Cuttlefish , *Sepia officinalis*. *J. Comp. Neurol.* 511, 499–511.
- Mayeri, E., Rothman, B.S., Brownell, P.H., Branton, W.D., Padgett, L., 1985. Nonsynaptic characteristics of neurotransmission mediated by egg- laying hormone in the Abdominal Ganglion of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 5, 2060–2077.
- McGaw, I.J., Wilkens, J.L., McMahon, B.R., Airriess, C.N., 1995. Crustacean cardioexcitatory peptides may inhibit the heart in vivo. *J. Exp. Biol.* 198, 2547–2550.
- McPherson, D.R., Blankenship, J.E., 1991. Retrograde labelling of serotonergic projections onto the neuroendocrine bag cells of *Aplysia*. *Neurosci. Lett.* 123, 148–151.
- Merianda, T., Twiss, J., 2013. Peripheral nerve axons contain machinery for co-translational secretion of axonally-generated proteins. *Neurosci. Bull.* 29, 493–500. doi:10.1007/s12264-013-1360-9
- Miloslavina, A., Ebert, C., Tietze, D., Ohlenschläger, O., Englert, C., Görlach, M., Imhof, D., 2010. An unusual peptide from *Conus viliepinii*: Synthesis, solution structure, and cardioactivity. *Peptides* 31, 1292–1300. doi:10.1016/j.peptides.2010.04.002
- Minakata, H., Ikeda, T., Fujita, T., Kiss, T., Hiripi, L., Muneoka, Y., Nomoto, K., 1992. Neuropeptides isolated from *Helix pomatia*: Part 2. FMRFamide-related peptides, S-amide peptides, FR peptides and other, in: Yanaihara, N. (Ed.), *Peptide Chemistry*. Leiden, pp. 579–582.
- Mo, H., Harwood, J.S., Yang, D., Post, C.B., 2017. A simple method for NMR t1 noise suppression. *J. Magn. Reson.* 276, 43–50. doi:10.1016/j.jmr.2016.12.014
- Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O., Minakata, H., 2010. Regulatory actions of neuropeptides and peptide hormones on the reproduction of molluscs. *Can. J. Zool.* 88, 825–845. doi:10.1139/Z10-041
- Muneoka, Y., Takahashi, T., Kobayashi, M., Ikeda, T., Minakata, H., Nomoto, K., 1994. Phylogenetic aspects of structure and action of molluscan neuropeptides., in: Davey, K. G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa, pp. 109–118.

- Nagata, K., Tanokura, M., 2005. Cardioacceleratory peptide (CCAP) of the fruit fly *Drosophila melanogaster*: solution structure analysis and docking simulation to the receptor CG6111. *Pept. Sci.* 41, 441–444.
- Nagle, G.T., de Jong-Brink, M., Painter, S.D., Bergamin-Sassen, M.M.J., Blankenship, J.E., Kurosky, A., 1990. Delta-bag cell peptide from the egg-laying hormone precursor of *Aplysia*. Processing, primary structure, and biological activity. *J. Biol. Chem.* 265, 22329–22335.
- Nagle, G.T., Painter, S.D., Blankenship, J.E., Dixon, J.D., Kurosky, a., 1986. Evidence for the expression of three genes encoding homologous atrial gland peptides that cause egg laying in *Aplysia*. *J. Biol. Chem.* 261, 7853–7859.
- Nässel, D.R., Larhammar, D., 2013. Neuropeptides and peptide hormones, in: Galizia, C.G., Lledo, P.-M. (Eds.), *Neurosciences - From Molecule to Behavior: A University Textbook*. Springer Spektrum, pp. 213–237.
- Ons, S., Bellés, X., Maestro, J.L., 2015. Orcokininins contribute to the regulation of vitellogenin transcription in the cockroach *Blattella germanica*. *J. Insect Physiol.* 82, 129–133. doi:10.1016/j.jinsphys.2015.10.002
- Painter, S.D., Chong, M.G., Wong, M.A., Gray, A., Cormier, J., Nagle, G., 1991. Relative contributions of the egg layer and egg cordon to pheromonal attraction and the induction of mating and egg-laying activity in *Aplysia*. *Biol. Bull.* 181, 81–94.
- Painter, S.D., Clough, B., Black, S., Nagle, G.T., 2003. Behavioral Characterization of Attractin , a Water- Borne Peptide Pheromone in the Genus *Aplysia* 16–25.
- Painter, S.D., Clough, B., Garden, R.W., Sweedler, J. V., Nagle, G.T., Nagle, G.T., 1998. Characterization of *Aplysia* Attractin, the First Water-borne Peptide Pheromone in Invertebrates. *Biol. Bull.* 194, 120–131. doi:10.2307/1543042
- Painter, S.D., Cummins, S.F., Nichols, A.E., Akalal, D.-B.G., Schein, C.H., Braun, W., Smith, J.S., Susswein, A.J., Levy, M., de Boer, P. a C.M., ter Maat, A., Miller, M.W., Scanlan, C., Milberg, R.M., Sweedler, J. V., Nagle, G.T., 2004. Structural and functional analysis of *Aplysia* attractins, a family of water-borne protein pheromones with interspecific attractiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6929–33. doi:10.1073/pnas.0306339101
- Painter, S.D., Greenberg, M.J., 1982. A survey of the responses of bivalve hearts to the molluscan neuropeptide FMRFamide and to 5-hydroxytryptamine. *Biol Bull* 162, 311. doi:doi:10.2307/1540986
- Painter, S.D., Kalman, V.K., Nagle, G.T., Blankenship, J.E., 1989. Localization of Immunoreactive Alpha-Bag-Cell Peptide in the Central Nervous System of *Aplysia*. *J. Comp. Neurobiol.* 287, 515–530.
- Painter, S.D., Rock, M.K., Nagle, G.T., Blankenship, J.E., 1988. Peptide B Induction of Bag-cell Activity in *Aplysia*: Localization of Sites of Action to the Cerebral and Pleural Ganglia. *J. Neurobiol.* 19, 695–706.
- Painter, S.D., Rock, M.K., Nagle, G.T., Blankenship, J.E., 1988. Peptide B induction of bag-cell activity in *Aplysia*: Localization of sites of action to the cerebral and pleural ganglia. *J. Neurobiol.* 19, 695–706. doi:10.1002/neu.480190804

- Person, P., Philpott, D.E., 1969. The nature and significance of invertebrate cartilages. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 44, 1–16. doi:10.1111/j.1469-185X.1969.tb00819.x
- Petersen, T.N., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786. doi:10.1038/nmeth.1701
- Polese, G., Bertapelle, C., Di Cosmo, A., 2016. Olfactory organ of *Octopus vulgaris*: morphology, plasticity, turnover and sensory characterization. *Biol. Open* 5, 611–619. doi:10.1242/bio.017764
- Price, D.A., Greenberg, M.J., 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* (80-.). 194, 670–671. doi:doi:10.1126/science.877582
- Pulst, S.-M., Gusman, D., Mayeri, E., 1988. Immunostaining for peptides of the egg-laying hormone/bag cell peptide precursor protein in the head ganglia of *Aplysia*. *Neuroscience* 27, 363–371.
- Quan, F.B., Dubessy, C., Galant, S., Kenigfest, N.B., Djenoune, L., Leprince, J., Wyart, C., Lihmann, I., Tostivint, H., 2015. Comparative distribution and in vitro activities of the urotensin II-related peptides URP1 and URP2 in zebrafish: Evidence for their colocalization in spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons. *PLoS One* 10, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0119290
- 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
- Roberts, S. a, Simpson, D.M., Armstrong, S.D., Davidson, A.J., Robertson, D.H., McLean, L., Beynon, R.J., Hurst, J.L., 2010. Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biol.* 8, 75. doi:10.1186/1741-7007-8-75
- Rothman, B.S., Hawke, D.H., Brown, R.O., Lee, T.D., Dehghan, a. a., Shively, J.E., Mayeri, E., 1986. Isolation and primary structure of the califins, three biologically active egg-laying hormone-like peptides from the atrial gland of *Aplysia californica*. *J. Biol. Chem.* 261, 1616–1623.
- Rothman, B.S., Mayeri, E., Brown, R.O., Yuan, P.M., Shively, J.E., 1983. Primary structure and neuronal effects of alpha-bag cell peptide, a second candidate neurotransmitter encoded by a single gene in bag cell neurons of *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 5753–7. doi:10.1073/pnas.80.18.5753
- Rothman, B.S., Weir, G., Dudek, F.E., 1983. Egg-laying hormone: Direct action on the ovotestis of *Aplysia*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 52, 134–141. doi:10.1016/0016-6480(83)90166-1
- Saitongdee, P., Apisawetakan, S., Anunruang, N., Poomthong, T., Hanna, P., Sobhon, P., 2005. Egg-laying-hormone immunoreactivity in the neural ganglia and ovary of *Haliothis asinina* Linnaeus. *Invertebr. Neurosci.* 5, 165–172. doi:10.1007/s10158-005-0032-5
- Sakai, T., Satake, H., Minakata, H., Takeda, M., 2004. Characterization of crustacean cardioactive peptide as a novel insect midgut factor: Isolation, localization, and stimulation of alpha-amylase activity and gut contraction. *Endocrinology* 145, 5671–5678.

doi:10.1210/en.2004-0722

- Scheel, D., Chancellor, S., Hing, M., Lawrence, M., Linqvist, S., Godfrey-Smith, P., 2017. A second site occupied by *Octopus tetricus* at high densities, with notes on their ecology and behavior David. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 1–7. doi:10.1080/10236244.2017.1369851
- Schein, C.H., Nagle, G.T., Page, J.S., Sweedler, J. V., Xu, Y., Painter, S.D., Braun, W., 2001. *Aplysia* attractin: Biophysical characterization and modeling of a water-borne pheromone. *Biophys. J.* 81, 463–472. doi:10.1016/S0006-3495(01)75714-1
- Scheller, R.H., Jackson, J.F., McAllister, L.B., Rothman, B.S., Mayeri, E., Axel, R., 1983. A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior. *Cell* 32, 7–22. doi:10.1016/0092-8674(83)90492-0
- Stangier, J., Hilbich, C., Beyreuther, K., Keller, R., 1987. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 575–579. doi:10.1073/pnas.84.2.575
- Stewart, M.J., Favrel, P., Rotgans, B.A., Wang, T., Zhao, M., Sohail, M., Connor, W.A.O., Elizur, A., Henry, J., Cummins, S.F., 2014. Neuropeptides encoded by the genomes of the Akoya pearl oyster *Pinctata fucata* and Pacific oyster *Crassostrea gigas* : a bioinformatic and peptidomic survey 1–16.
- Strumwasser, F., Jacklet, J.W., Alvarez, R.B., 1969. A seasonal rhythm in the neural extract induction of behavioural egg-laying in *Aplysia*. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, 197–206.
- Strumwasser, F., Schiller, D.L., Kent, S.B.H., 1987. Synthetic neuropeptide egg-laying hormone (ELH) of *Aplysia californica* induces normal egg-laying: structure-activity studies. *Soc Neurosci Abstr* 13, 38.
- Suggs, J.M., Jones, T.H., Murphree, S.C., Hillyer, J.F., 2016. CCAP and FMRamide-like peptides accelerate the contraction rate of the antennal accessory pulsatile organs (auxiliary hearts) of mosquitoes. *J. Exp. Biol.* 219, 2388–2395. doi:10.1242/jeb.141655
- Takuwa-Kuroda, K., Iwakoshi-Ukena, E., Kanda, A., Minakata, H., 2003. Octopus, which owns the most advanced brain in invertebrates, has two members of vasopressin/oxytocin superfamily as in vertebrates. *Regul. Pept.* 115, 139–149. doi:10.1016/S0167-0115(03)00151-4
- Tinbergen, L., 1939. Zur Fortpflanzungsethologie Von *Sepia Officinalis* L. *Arch. Néerlandaises Zool.* 3, 323–364. doi:10.1163/036551639X00363
- Tompset, D.H., 1939. *Sepia*. The University Press of Liverpool, Liverpool.
- Toullec, J., Corre, E., Mandon, P., Gonzalez-aravena, M., Ollivaux, C., Lee, C., 2017. Characterization of the neuropeptidome of a Southern Ocean decapod , the Antarctic shrimp *Chorismus antarcticus* : Focusing on a new decapod ITP-like peptide belonging to the CHH peptide family. *Gen. Comp. Endocrinol.* 252, 60–78. doi:10.1016/j.ygcen.2017.07.015
- Toullec, J.Y., Corre, E., Bernay, B., Thorne, M. a. S., Cascella, K., Ollivaux, C., Henry, J., Clark, M.S., 2013. Transcriptome and Peptidome Characterisation of the Main Neuropeptides and Peptidic Hormones of a Euphausiid: The Ice Krill, *Euphausia crystallorophias*. *PLoS One* 8, e71609. doi:10.1371/journal.pone.0071609

- Veenstra, J. a, 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
- Vehovszky, A., Agricola, H.-J., Elliott, C.J.H., Ohtani, M., Kárpáti, L., Hernádi, L., 2005. Crustacean cardioactive peptide (CCAP)-related molluscan peptides (M-CCAPs) are potential extrinsic modulators of the buccal feeding network in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci. Lett.* 373, 200–5. doi:10.1016/j.neulet.2004.10.020
- Vreugdenhil, E., Geraerts, W.P.M., Jackson, J.F., Joosse, J., 1985. The molecular basis of the neuro-endocrine control of egg-laying behaviour in *Lymnaea*. *Peptides* 6, 465–470. doi:10.1016/0196-9781(85)90415-2
- Wells, M.J., 1963. Taste By Touch: Some Experiments With Octopus. *J. Exp. Biol* 40, 187–193.
- Wilson, E.O., 1963. Pheromones. *Sci. Am.* 208, 100–115.
- Woodhams, P.L., Messenger, J.B., 1974. A note on the ultrastructure of the Octopus olfactory organ. *Cell Tissue Res.* 152, 253–258. doi:10.1007/BF00224699
- York, P.S., Cummins, S.F., Degnan, S.M., Woodcroft, B.J., Degnan, B.M., 2012. Marked changes in neuropeptide expression accompany broadcast spawnings in the gastropod *Haliotis asinina*. *Front. Zool.* 9, 9. doi:10.1186/1742-9994-9-9
- Yoshinaga, S., Sato, T., Hirakane, M., Esaki, K., Hamaguchi, T., Haga-Yamanaka, S., Tsunoda, M., Kimoto, H., Shimada, I., Touhara, K., Terasawa, H., 2013. Structure of the mouse sex peptide pheromone ESP1 reveals a molecular basis for specific binding to the class C G-protein-coupled vomeronasal receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 16064–16072. doi:10.1074/jbc.M112.436782
- Zatylny-Gaudin, C., Bernay, B., Zanuttini, B., Leprince, J., Vaudry, H., Henry, J., 2010. Characterization of a novel LFRFamide neuropeptide in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Peptides* 31, 207–214. doi:10.1016/j.peptides.2009.11.021
- 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. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00463
- Zatylny-Gaudin, C., Favrel, P., 2014. Diversity of the RFamide Peptide Family in Mollusks. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 178. doi:10.3389/fendo.2014.00178
- Zatylny, C., Durantou, F., Boucaud-Camou, E., Henry, J., 2000a. Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 182–188. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200002)55:2<182::AID-MRD7>3.0.CO;2-B
- Zatylny, C., Gagnon, J., Boucaud-Camou, E., Henry, J., 2000b. ILME: A Waterborne Pheromonal Peptide Released by the Eggs of *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 217–222. doi:10.1006/bbrc.2000.3286
- Zatylny, C., Gagnon, J., Boucaud-Camou, E., Henry, J., 2000c. The SepOvotropin: A New

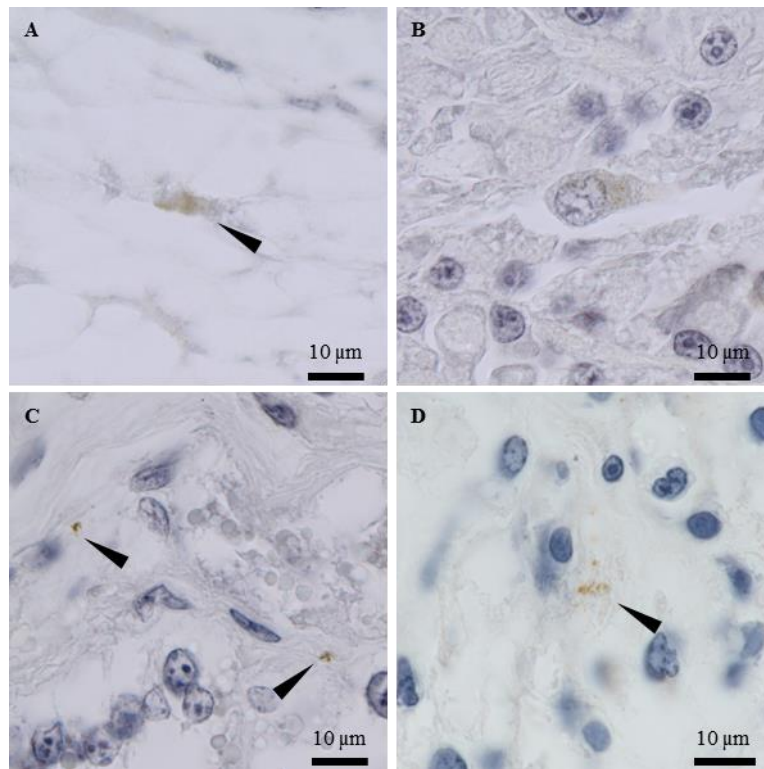
Ovarian Peptide Regulating Oocyte Transport in *Sepia officinalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1013–1018. doi:10.1006/bbrc.2000.3595

Zatylny, C., Marvin, L., Gagnon, J., Henry, J., 2002. Fertilization in *Sepia officinalis* : the first mollusc sperm-attracting peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1186–1193.

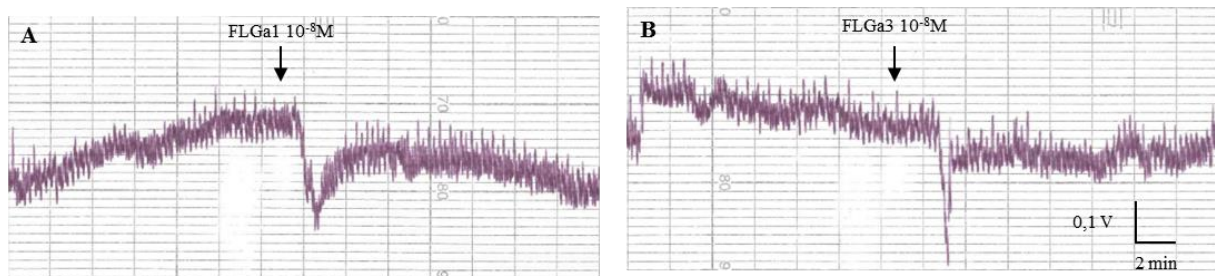
Annexes

Residue	H ^N	HA	HB2	HB3	HG2	HG3	HD1	HD2	Others
Val ¹	-	3.86	2.14		0.92	0.92			
Phe ²	8.41	4.66	3.17	3.24			7.30	7.30	HE1/2 HZ 7.18
Cys ³	8.13	4.55	3.09	3.09					
Asn ⁴	8.34	4.55	2.80	2.91					CONH ₂ 6.74/7.49
Ser ⁵	7.96	4.34	3.70	3.70					
Phe ⁶	8.03	4.56	3.00	3.20			7.25	7.25	HE1/2 HZ 7.18
Gly ⁷	8.14	3.87/4.04							
Gly ⁸	7.81	4.05/4.05							
Cys ⁹	8.37	4.69	3.11	3.24					
Thr ¹⁰	8.04	4.32	4.24		1.18				
Asn ¹¹	8.22	4.80	2.73	2.87					CONH ₂ 6.83/7.49
Ile ¹²	7.51	4.05	1.83		1.08/1.39	0.85	0.85		

Annexe 1 : Analyse RMN du SoCCAP1. Changements chimiques de ¹H du SoCCAP1 en présence de micelles de SDS.



Annexe 2 : Cartographie tissulaire en immunocytochimie des neuropeptides PYY et FLGa. Coupes transversales d'appareil génital de seiche femelle mature. **(A)** : Faisceaux de fibres marqués dans la partie distale de la GNP, anticorps anti-FLGa. **(B)** : Cellules au cytoplasme marqué dans la GOVI, anticorps anti-PYY. **(C)** : Terminaisons nerveuses marquées dans la GOVI, anticorps anti-FLGa. **(D)** : Terminaison nerveuse marquée dans le stroma ovarien, anticorps anti-FLGa. Les pointes de flèche indiquent les terminaisons nerveuses marquées.



Annexe 3 : Activité biologique des neuropeptides (A) : FLGa1 et (B) : FLGa3 sur l'oviducte distal de seiche mature.

(A) Précurseur SP α

MDKPGKTSPLSWLVYVITALILVFFLARLEIRSNVQKAEFQHRAARLLVSVRRYYAAGPVFTRWGNRCPYR
 SYRVYEGIMGGQDKTHRGGASNFLCLPRRPTWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPAHVNGFGLFITTHLKPPH
 NHDVPCAVCQVTKPATVLMIPGRKVCTPGWDLMYRGYLMSEKRNNAGRMTYVCVDKRPQVYWAGYLNENGAT
 INHVESKCGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSKCPI*

(B) Précurseur SP α'

MDKPGKTSPLSWLVYVITALILVFFLARLEIRSNVQKAEFQHRAARLLVSVRRYYAAGPVFTRWGNRCPYR
 SYRVYEGIMGGQDKTHRGGASNFLCLPRRPTWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPSQVNGFGLFFQTHLKPPH
 NHDVPCAVCQVTKPATVLMIPGRKVCTPGWDLMYRGYLMSEKRNNAGRMTYVCVDKRPQVYWAGYLNENGAT
 INHVESKCGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSKCPI*

(C) Peptides issus du premier mode de clivage

Peptide	Séquence	Modification post-traductionnelle putative	m/z monoisotopique
α/α' 1	EIRSNVQKAEFQHRAARLLVSV	Non	2551,42
α/α' 2	YYAAGPVFTRWGNRCPYRSYRVYEGIMGGQDKTHRGGASNFLCLP	Pont disulfure	5226,49
α 3	PTWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPAHVNGFGLFITTHLKPPHNHDVPCAVCQVTKPATVLMIPa	Pont disulfure et amidation C-terminale	6906,61
α' 3	PTWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPSQVNGFGLFFQTHLKPPHNHDVPCAVCQVTKPATVLMIPa	Pont disulfure et amidation C-terminale	6974,60
α/α' 4	VCTPGWDLMYRGYLMSE	Pont disulfure	2020,89
α/α' 5	NNAGRMTYVCVD	Pont disulfure	1342,59
α/α' 6	PQVYWAGYLNENGATINHVESKCGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSKCPI	Pont disulfure	5171,37

(D) Phéromones α et α' issues du second mode de clivage

Phéromone	Séquence	MW calculée brute	MW avec résidus Cys et Met oxydés
α	LLVSVRRYYAAGPVFTRWGNRCPYRSYRVYEGIMGGQDKTHRGGASNFLCLPRRPTWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPAHVNGFGLFITTHLKPPHNHDVPCAVCQVTKPATVLMIPGRKVCTPGWDLMYRGYLMSEKRNNAGRMTYVCVDKRPQVYWAGYLNENGATINHVESKCGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSKCPI	22648,23	22716,23
α'	LLVSVRRYYAAGPVFTRWGNRCPYRSYRVYEGIMGGQDKTHRGGASNFLCLPRRPTWANLKGGSQLGGLIYGTQYKLYPSQVNGFGLFFQTHLKPPHNHDVPCAVCQVTKPATVLMIPGRKVCTPGWDLMYRGYLMSEKRNNAGRMTYVCVDKRPQVYWAGYLNENGATINHVESKCGSLPCPLYSNYKEVPCCVCSKCPI	22716,22	22784,22

Annexe 4 : Précurseurs SP α , α' et produits de clivages. Les précurseurs SP α (A) et SP α' (B) avec le peptide signal encadré en jaune et les cystéines en gras. Les produits de clivages issus du premier mode de maturation (C) ont été identifiés par J.Enault et al. (2012). Les produits issus du second mode de clivage, les phéromones α et α' (D), ont été identifiés dans la présente étude.

(A) Précurseur SP β

MMTSFDNKMPTSGKSKLRWFFYVFSLLALIFVFSRLEKKAENKIQIQKKFTYPYVQVKIPGPGATYVIWGR
 KK**C**TSNDTRVYTG β YTAGQHYNHAGGGSNIL**C**LPRFPVSDQITTTSTENVASIFGVRYRIGSYNSLGTNGLFST
 PNNISLNKR β VVP**C**SV**C**LTNGSATIMVIPGRTH**C**YPGWYRQYSGYLMTAHYAHVGRSNHI**C**VHRRPQRYFGTS
 PLQAFLYHVEAECGSLPCPPY**C**NGFELPCV**V**CR**K**CP*

(B) Peptides issus du premier mode de clivage

Peptide	Séquence	Modification post-traductionnelle putative	m/z monoisotopique
β 1	AEENKIQIQ	Non	1072,56
β 2	FTYPYVQVKIPGPGATYVIWa	Amidation C-terminale	2298,23
β 3	CTSNDTRVYTG β YTAGQHYNHAGGGSNIL C LPRFPVSDQITTTSTENVASIFGVRYRIGSYNSLGTNGLFSTPNNISLN	Pont disulfure et N-glycosylation	8256,97
β 4	VVPCSVCLTNGSATIMVIPGRTHCYPGWYRQYSGYLMTAHYAHVGRSNHICVH	Pont disulfure	5901,80
β 5	PQRYFGTSPLQAFLYHVEAECGSLPCPPYCN GFELPCVVCRKCP	Pont disulfure	4913,27

(C) Phéromone β issue du seconde mode de clivage

Phéromone	Séquence	MW calculée brute	MW avec résidus Cys et Met oxydés
β	FTYPYVQVKIPGPGATYVIWGRKKCTSNDTRVYTG β YTAGQHYNHAGGGSNIL C LPRFPVSDQITTTSTENVASIFGVRYRIGSYNSLGTNGLFSTPNNISLNKR β VVP C SV C LTNGSATIMVIPGRTHCYPGWYRQYSGYLMTAHYAHVGRSNHICVHRRPQRYFGTSPLQAFLYHVEAECGSLPCPPYCN GFELPCVVCRKCP	22391,92	22411,9

Annexe 5 : Précurseurs SP β et produits de clivages. Le précurseur SP β (A) avec le peptide signal encadré en jaune et les cystéines en gras. Les produits de clivages issus du premier mode de maturation (B) ont été identifiés par J.Enault et *al.* (2012). Le produit issu du second mode de clivage, la phéromone β (), a été identifiée dans la présente étude.

(A) Précurseur SP γ

MFTPGKYGLYSWIGYLVAVSILVILVGRLENKFSANDVQLKKRGGFRPSITHFYAPGSVYTRWGRTVCPRG
 SKVVYKIGIMAAPKHTNTGGGSDYQCLPNNPVWGRRLPNFQSSGRLFGTEYKISLYLTQGVNGLFSNINARRV
 NFNAPCAVCLTYMPRAVIMIPGRKRCDRGWKLEYSGYLMSEERYTYRRTTEYVCVDDKPEASESGNGWQHSAG
 LYHVEARCGSLPCPWYVQGFEMACAVCSRGPYPYKYKIIATQTSGSNNTSGNNATIG*

(B) Peptides issus du premier mode de clivage

Peptide	Séquence	Modification post-traductionnelle putative	m/z monoisotopique
γ_1	LENKFSANDVQL	Non	1377,70
γ_2	GFGFRPSITHFYAPGSVYTRWGRTVCPRGSK VVYKIGIMAAPKHTNTGGGSDYQCLPNNPVWa	Pont disulfure et amidation C-terminale	6685,31
γ_3	LPNFQSSGRLFGTEYKISLYLTQGVNGLFSN INA	Non	3748,93
γ_4	VNFHNAPCAVCLTYMPRAVIMIPa	Pont disulfure et amidation C-terminale	2559,28
γ_5	CDRGWKLEYSGYLMSEERYTY	Pont disulfure	2520,13
γ_6	TEYVCVDDKPEASESGNGWQHSAGLYHVEAR CGSLPCPWYVQGFEMACAVCSRGPYPYKY	Pont disulfure	6725,91
γ_7	IATQTSGSNNTSGNNAT Ia	Amidation C-terminale	1806,85

(C) Phéromone γ issue du seconde mode de clivage

Phéromone	Séquence	MW calculée brute	MW avec résidus Cys et Met oxydés
γ	GFGFRPSITHFYAPGSVYTRWGRTVCPRGSKVVYKIGIM AAPKHTNTGGGSDYQCLPNNPVWGRRLPNFQSSGRLFG TEYKISLYLTQGVNGLFSNINARRVNFHNAPCAVCLTY MPRAVIMIPGRKRCDRGWKLEYSGYLMSEERYTYRRTTEY VCVDDKPEASESGNGWQHSAGLYHVEARCGSLPCPWYV QGFEMACAVCSRGPYPYKYKIIATQTSGSNNTSGNNAT IG	25701,43	25787,43

Annexe 6 : Précurseurs SP γ et produits de clivages. Le précurseur SP γ (A) avec le peptide signal encadré en jaune et les cystéines en gras. Les produits de clivages issus du premier mode de maturation (B) et le produit issu du second, la phéromone γ (C), ont été identifiés dans la présente étude.

La régulation de la ponte chez la seiche commune *Sepia officinalis* : neuropeptides et phéromones sexuelles

Résumé

La seiche commune *Sepia officinalis* est un Mollusque Céphalopode présent sur les côtes Normandes. En Baie de Seine, elle représente la troisième espèce visée par les flottilles hauturière et côtière, ce qui en fait une ressource économique importante pour la région. Dans un contexte de protection de la ressource, l'étude et la compréhension des mécanismes liés à la reproduction représentent un objectif majeur. Cette étude est donc focalisée sur les mécanismes régulateurs de la ponte, et en particulier sur les facteurs impliqués dans l'émission des ovocytes. Des recherches antérieures effectuées au laboratoire ont mis en évidence un contrôle multifactoriel du processus de ponte, avec trois niveaux de régulation. (i) Les neuropeptides sont impliqués dans la perception des paramètres environnementaux, (ii) les facteurs ovariens assurent la régulation paracrine du tractus génital, et (iii) les phéromones sexuelles, tout en interférant avec la ponte, sont suspectées de jouer un rôle important dans le comportement des géniteurs associé à la reproduction. Cette thèse met en lumière le rôle de 2 familles de neuropeptides identifiées récemment : les CCAPs et les FLGamides (ou So-orcokinines B). Ces deux familles participent au transport de l'ovocyte et à la sécrétion capsulaire en agissant sur l'activité contractile du complexe oviducte/glande de l'oviducte et des glandes nidamentaires principales. Ces neuropeptides sont par ailleurs suspectés de jouer un rôle dans la biosynthèse des protéines vitellines et des protéines capsulaires. Parallèlement, des phéromones sexuelles sont exprimées par la glande de l'oviducte et sécrétées avec les protéines capsulaires. Des travaux antérieurs ont permis de caractériser des produits d'expression issus de clivages de type prohormone convertase. Dans cette nouvelle étude, un second mode de clivage a été mis en évidence avec l'identification de produits de clivage de masse moléculaire supérieure à 20 kDa. L'un de ces produits, la phéromone beta, a été produit en système recombinant mais son activité biologique sur l'appareil génital mâle et sur l'oviducte n'a pas été démontrée. Quant aux tests comportementaux, ils n'ont pu être exploités du fait d'un nombre d'animaux testés trop restreint. Enfin, une approche transcriptomique comparative et différentielle réalisée à partir de l'organe olfactif mâle et du pavillon de l'oviducte a permis d'identifier un récepteur candidat à la liaison avec les phéromones sexuelles.

Egg-laying regulation in the cuttlefish *Sepia officinalis*: neuropeptides and sex pheromones

Abstract

The common cuttlefish (*Sepia officinalis*) is a Cephalopod mollusk found on the Normandy coasts. In the Bay of Seine, it is the third species targeted by offshore and coastal fleets, so it is an important economic resource for the whole region. In a context of resource protection, the study and understanding of its reproductive mechanisms is a major objective. This study is therefore focused on the regulatory mechanisms of egg-laying, and in particular on the factors involved in the release of oocytes. Previous research in the laboratory demonstrated multifactorial control of the egg-laying process, with three levels of regulation: (i) neuropeptides involved in the perception of environmental cues, (ii) ovarian factors providing paracrine regulation of the genital tract, and (iii) sexual pheromones, which are implied in egg-laying and are suspected to play a determining role in the reproductive behavior. This thesis highlights the role of two families of recently identified neuropeptides called CCAPs and FLGamides (or So-orcokinins B). These two families participate in oocyte transport and in egg capsule secretion by acting on the contractile activity of the oviduct/oviduct gland complex and of the main nidamental glands. These neuropeptides are also suspected to play a role in the biosynthesis of yolk and capsular proteins. At the same time, sex pheromones are expressed by the oviduct gland and secreted along with capsular proteins. Previous work made it possible to characterize expression products resulting from cleavages of the prohormone convertase type. In this new study, a second mode of cleavage is highlighted, evidenced by the identification of cleavage products with MWs greater than 20 kDa. One of these products, beta pheromone, was produced in a recombinant system but its biological activity on the male reproductive system and on the oviduct was not demonstrated. As for behavioral tests, they were not exploited because the number of animals tested was too small. Finally, a comparative and differential transcriptomic approach of the male olfactory organ and the oviduct pavilion evidenced a candidate receptor expected to bind to sex pheromones.

Mots-clefs

Mollusques marins, Céphalopodes, Seiches, Reproduction, Neuropeptides, Phéromones, Caractérisation structurale, Caractérisation fonctionnelle.