

# THÈSE



Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS UFR des sciences fondamentales et appliquées Ecologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers) (Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle) Secteur de recherche : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

> Présentée par : Benjamin Herran

### La voie de signalisation type insuline dans la différenciation sexuelle chez les Crustacés Isopodes - intégration de l'hormone androgène et de facteurs féminisants dans un nouveau contexte

Directeur(s) de Thèse : Pierre Grève, Joanne Bertaux

Soutenue le 10 décembre 2018 devant le jury

T	urv	•
J	ury	•

Président	<b>Didier Bouchon</b>	Professeur, EBI, Université de Poitiers
Rapporteur	Olivier Geffard	Directeur de recherche, IRSTEA, Villeurbanne
Rapporteur	Jerome Vicogne	Chargé de recherche, Université de Lille
Membre	Pierre Grève	Professeur, EBI, Université de Poitiers
Membre	Joanne Bertaux	Maître de conférences, EBI, Université de Poitiers
Membre	Vincent Laudet	Professeur, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer

#### Pour citer cette thèse :

Benjamin Herran. La voie de signalisation type insuline dans la différenciation sexuelle chez les Crustacés Isopodes - intégration de l'hormone androgène et de facteurs féminisants dans un nouveau contexte [En ligne]. Thèse Biologie de l'environnement, des populations, écologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2018. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

## THESE

Pour l'obtention du Grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées) (Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale nº 523 "Gay Lussac"

Secteur de Recherche : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Présentée par :

### **Benjamin HERRAN**

\*\*\*\*\*

# La voie de signalisation de type insuline dans la différenciation sexuelle chez les Crustacés Isopodes

Intégration de l'hormone androgène et de facteurs féminisants dans un nouveau contexte

\*\*\*\*\*

Directeurs de Thèse : Pierre Grève et Joanne Bertaux

\*\*\*\*\*

Soutenue le 10 décembre 2018

devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

### <u>JURY</u>

Olivier GEFFARD, Directeur de recherche, Irstea, Rapporteur Jérôme VICOGNE, Chargé de recherche, Université de Lille, Rapporteur Didier BOUCHON, Professeur, Université de Poitiers, Examinateur Vincent LAUDET, Professeur, Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, Examinateur Joanne BERTAUX, Maître de conférences, Université de Poitiers, Examinatrice Pierre GREVE, Professeur, Université de Poitiers, Examinateur

# Sommaire

AVANT-PROPOS	1
ABRÉVIATIONS	2
INTRODUCTION	3
I. Des Crustacés et des Hommes	3
II. Une glande pas si accessoire	6
Encadré n°1 - le dimorphisme sexuel des cloportes et sa mise en place	11
III. Une insuline androgénique	14
IV. La guerre des mondes	19
V. Le transporteur	20
VI. La ruée vers l'IR	23
VII. <i>Wolbachia</i> : pirate des cloportes	27
Encadré n°2 - les conséquences de la symbiose à <i>Wolbachia</i>	31
VIII. Des peptides plein la tête	36
IX. L'Isopode, un animal très perturbé	41
X. Objectifs et questions	43
MATÉRIEL ET MÉTHODES	45
I. Expériences de perturbations endocriniennes	45
A. Expérience de transinfection par <i>Wolbachia</i>	45
B. Expérience de contamination au bisphénol A	45
C. Expérience d'extinction de gènes par ARN interférent (ARNi)	48
II. Obtention et évolution des séquences d'intérêt	48
A. Approche par amorces dégénérées	48
B. Approche transcriptomique	49
C. Traitement bio-informatique	51
D. Analyses évolutives	56
III. Analyses d'expression	57
A. Animaux	57
B. Échantillonnage pour le suivi du développement	57
C. Analyses d'expression	58
CHAPITRE 1	60
Caractérisation de l'IGFBP-rP1	60
I. Séquence et structure de Av-IGFBP-rP1	61
II. Analyses d'expression de Av-IGFBP-rP1	62
A. Expression tissulaire chez l'adulte	62
B. Expression au cours du développement	64
III. Effets de l'extinction des gènes Av-IGFBP-rP1 et Av-AGH	66
IV. Evolution de l'IGFBP-rP1 au sein des Isopodes	69
V. IGFBP-rP1, a strongly conserved member of the androgenic hormone signalling pathway in	
Isopoda	73
VI. Evolution de l'IGFBP-rP1 au sein des Crustacés	91
CHAPITRE 2	94
Caractérisation des récepteurs à insuline (IR1 et IR2)	94
I. Contexte évolutif des récepteurs à insuline	94
A. Introduction	94
B. Résultats et discussion	96
C. Compléments d'analyses et de discussion	.103
II. Étude de l'IR1 et de l'IR2 chez <i>A. vulgare</i>	.123
A. Séquences et structures de Av-IR1 et Av-IR2	.123

B. Analyses d'expression de Av-IR1 et Av-IR2	129
- Expression tissulaire chez l'adulte	129
- Expression au cours du développement	133
C. Effets de l'extinction de l'expression de Av-IR1 et Av-IR2	135
D. Evolution des IR au sein des Isopodes	144
E. Discussion	154
CHAPITRE 3	161
Effets de perturbateurs endocriniens sur la différenciation sexuelle d'Armadillidium vulgare	161
I. Effets d'un perturbateur endocrinien endogène : <i>Wolbachia</i>	162
A. Effet de Wolbachia sur l'expression de l'HA et de la GIH chez l'adulte	162
B. Effet de Wolbachia sur l'expression de l'HA et de la GIH au cours du développement	165
C. Evolution de la charge bactérienne à <i>Wolbachia</i> au cours du développement	168
D. Impact d'une transinfection de mâles par Wolbachia sur la voie de signalisation de l'H	A 170
E. Discussion	177
II. Comparaison avec une perturbation ciblée de l'HA par ARNi	182
A. Contexte	182
B. Résultats	182
C. Discussion	186
III. Comparaison avec un perturbateur endocrinien exogène : le bisphénol A	188
DISCUSSION GÉNÉRALE	191
I. La différenciation sexuelle des Isopodes, un contexte d'étude en expansion	191
II. Carte d'identité et évolution des nouveaux acteurs de la voie de signalisation de l'HA	192
III. Des acteurs nécessaires à la différenciation mâle mais non suffisants	194
IV. L'approche par ARNi	205
1. Pour comprendre le rôle de ces nouveaux acteurs	205
2. Pour essayer de phénocopier <i>Wolbachia</i>	211
V. Un nouveau contexte de la différenciation déjà à élargir	214
1. La famille des ILP et récepteurs associés	214
2. Les neuropeptides et récepteurs associés	216
Références	218
ANNEXE	249

## **AVANT-PROPOS**

Je tiens tout d'abord à remercier vivement mes deux directeurs, Joanne Bertaux et Pierre Grève, pour m'avoir permis de travailler sur ce sujet de thèse. Je garderai longtemps le souvenir de ces trois années, pleines d'échanges scientifiques passionnés et de tout autant de moments à rigoler en faisant le plein de magnésium. Merci pour cette thèse que je qualifierais presque de "symbiotique", tant j'ai apprécié travailler au quotidien avec vous. Un remerciement particulier à Joanne pour m'avoir donné le goût de la littérature historique, si riche bien que trop souvent négligée, et pour tous les coups de main, en particulier sur les dissections de glandes androgènes et autres truites ou poussins. Un remerciement particulier à Pierre également pour m'avoir transmis le secret de la chasse aux *Sphaeroma* et aux *Tylos*, pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles, qu'il s'agisse de déterminer le sexe de cloportes de 2,9 mm ou de trouver, par une enquête fouillée, l'origine mystérieuse des dégradations d'ARN.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude envers tous les autres membres du laboratoire EBI avec qui j'ai eu l'opportunité d'interagir. Je remercie tout spécialement Catherine Debenest, Carine Delaunay, Tiffany Laverré et Maryline Raimond pour leur assistance précieuse au laboratoire. Merci également à Alexandra Lafitte pour le maintien d'un élevage de cloportes remarquable, à Bouziane Moumen pour son aide informatique et à Christelle Mirebeau pour tous les ordres de mission. Je n'oublie pas non plus les personnes m'ayant assisté dans ma fonction d'enseignant, Hélène Paulhac et Roland Raimond notamment. Une mention spéciale aux doctorants, ATER et post-docs que j'ai côtoyés pendant ces années, ainsi qu'à tous les étudiants ayant travaillé, avant ou avec moi, sur la thématique de cette thèse : Clémentine Bernier, Nicolas Cerveau, Sandrine Geniez, Camille Houdelet et Léa Moustrou.

Je suis par ailleurs reconnaissant à Didier Bouchon, Nicolas Cerveau, Tarik Issad et Thierry Rigaud pour leurs commentaires instructifs lors de mon comité de thèse. En outre, je remercie sincèrement Olivier Geffard et Jérôme Vicogne d'avoir accepté de rapporter cette thèse. Merci également à Didier Bouchon et Vincent Laudet d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Pour finir, j'ai une pensée chaleureuse pour toutes les personnes m'ayant soutenu sans relâche dès que j'ai pu en avoir besoin : ma famille évidemment, ainsi que mes amis Bruno Laurent, Claire Pennarun, Nadia Fernandez et Solveig Gimenez.

# **ABRÉVIATIONS**

- ARNi : ARN interférent
- Av : Armadillidium vulgare
- BPA : Bisphénol A
- CHH : Crustacean Hyperglycemic Hormone
- GA : Glande Androgène
- GIH : Gonad Inhibiting Hormone (synonyme de AIH et de VIH)
- HA : Hormone Androgène (AGH dans les figures : Androgenic Gland Hormone)
- IAG : Insulin-like Androgenic Gland hormone (nom de l'HA chez les Décapodes)
- iF / iM : intersexué femelle / intersexué mâle
- IGFBP(-rP) : Insulin-like Growth Factor Binding Protein(-related Protein)
- ILP : Insulin-like Peptide
- (TK)IR : (Tyrosine Kinase) Insulin Receptor ou Insulin-like Receptor
- MIH : Molt Inhibiting Hormone
- **PE** : Perturbateur Endocrinien
- RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
- SIBD : Single Insulin-like Binding Domain

Pour les analyses par organes :

- AG : Glande androgène (Androgenic gland)
- BR : Cerveau (Brain)
- $\mathbf{CK}: Caeca$
- **DT** : Tube digestif (*Digestive Tract*)
- **HE** : *Haemocytes*
- MF : Muscle/gras (Muscle/Fat)
- NC : Chaîne nerveuse (Nerve cord)
- OV : Ovaires (Ovaries)
- SV : Vésicule séminale (Seminal Vesicle)
- **UT** : Utricules (*Utricles*)
- VD : Canal déférent (Vas deferens)
- <u>Note</u> : Gonade mâle = AG+UT+SV+VD.

## **INTRODUCTION**

#### I. Des Crustacés et des Hommes

Les Crustacés forment un sous-embranchement d'arthropodes ancien, avec une origine estimée à plus de 500 Ma (Waloszek, 1998; VanHook and Patel, 2008). Ce groupe comporte actuellement au moins 50 000 à 70 000 espèces (Ahyong et al., 2011; WoRMS Editorial Board, 2017) qui occupent de très nombreuses niches écologiques (espèces marines, dulcicoles, terrestres, libres ou fixés, benthiques ou pélagiques, etc.). Elles montrent en parallèle une très grande variabilité morphologique, certaines espèces parasites étant particulièrement difficilement rapprochées des Crustacés. Les espèces de Crustacés sont principalement associées entre elles de par un de leurs stades larvaires, le stade nauplius, qui partage un même plan d'organisation fondamental (Grassé and Forest, 1996). L'ancienneté de leur radiation et leur grande variabilité morphologique rendent cependant leur histoire évolutive assez difficile à déchiffrer. La phylogénie des espèces au sein des Crustacés (Jenner, 2010; Marcus et al., 2014) tout comme leur intégration dans l'arbre des Arthropodes ne font ainsi toujours pas consensus (Wägele and Kück, 2014). Classiquement rapprochés des insectes, formant alors le clade des Pancrustacés, les Crustacés pourraient en fait présenter une position basale par rapport au clade des Tracheata, rapprochant quant à lui les Hexapodes des Myriapodes (Fig. I.1). Par ailleurs, la Fig. I.1 montre également que la paraphylie des Crustacés n'est pas non plus à exclure car les Crustacés autrefois appelés "supérieurs", aujourd'hui Malacostracés (Malacostraca, Latreille), sont parfois rapprochés phylogénétiquement des Hexapodes. Les différentes classes de Crustacés sont cependant assez bien définies et la monophylie des Malacostracés est communément acceptée. Représentant la majorité des espèces de Crustacés connues (~62% (WoRMS Editorial Board, 2017)), une partie des Malacostracés présente par ailleurs une importance commerciale notable (aquaculture pour l'alimentation humaine et animale, aquariophilie). C'est en particulier le cas des Crustacés Décapodes (Decapoda, Latreille) qui sont consommés largement à travers le monde (crevettes, crabes, homards, écrevisses, langoustes et langoustines). Dans un contexte d'érosion de la biodiversité et de surexploitation des ressources naturelles, ces animaux sont particulièrement intéressants car leur élevage est possible à grande échelle. Des fermes intensives se développent massivement, en Asie notamment, pour répondre à ce besoin et offrir une production maîtrisée en Crustacés. Entre 2014 et 2016, la production aquacole est ainsi passée de 6,9 à 7,9 millions de tonnes (36,2 à 57,1 milliards de dollars) (FAO, 2018). La maîtrise de leur reproduction est apparue comme un facteur clé dans la réussite de leur élevage. De plus, différentes études ont montré que les rendements des élevages de crevettes peuvent être améliorés en utilisant des populations de sexes séparés (mâles ou femelles seulement, selon les contextes et les espèces) (Sagi et al., 1986; Nair et al., 2006; Ventura and Sagi, 2012). Aujourd'hui, les recherches sur l'optimisation des élevages vont dans le sens d'un contrôle du sexe de ces Crustacés par voie biotechnologique (Ventura and Sagi, 2012; Aflalo and Sagi, 2014; Lezer et al., 2015). Des portées composées uniquement de femelles (Levy et al., 2016) ou exclusivement de mâles (Sagi and Aflalo, 2005; Aflalo et al., 2006) peuvent ainsi être obtenues. Ceci permet d'éviter des reproductions non-désirées, favorisant une allocation d'énergie à la seule croissance, et de sélectionner le sexe avant une plus grande valeur commerciale, c'est-à-dire celui dont la croissance est la plus rapide et la plus forte (Sagi et al., 1986; Nair et al., 2006; Gopal et al., 2010). De plus, la possibilité de contrôler leur sexe a permis d'envisager un contrôle biologique des nombreuses espèces de Crustacés invasives, telles que l'écrevisse de Louisiane, le crabe vert européen ou le crabe chinois (Ventura and Sagi, 2012). En relâchant des femelles ZZ ou des individus (mâles comme femelles) YY, on introduit en effet des géniteurs produisant des descendances 100% mâles, ce qui pourrait induire un biais mâle du sex ratio tel qu'il régulerait la démographie de l'espèce ciblée. Enfin, une bonne maîtrise du sexe et de la reproduction des Crustacés peut également offrir des possibilités de contrôle de parasites dangereux pour l'Homme comme le schistosome. En effet, en relâchant des crevettes mâles (plus grosses et moins migratrices) dans une zone à risques, la pression de prédation sur les escargots hôtes de ces schistosomes augmente (Savaya Alkalay et al., 2014). Afin de mettre en place toutes ces stratégies, une bonne connaissance des mécanismes responsables du déterminisme et de la différenciation sexuels apparaît indispensable.



<u>Figure I.1</u> : Rapprochements taxonomiques proposés dans la littérature au sein des Mandibulates (von Reumont and Wägele, 2014). Les hypothèses phylogénétiques sont fondées sur des données morphologiques et les données moléculaires les plus récentes.



<u>Figure I.2</u> : Phylogénie des Crustacés Malacostracés (Richter and Scholtz, 2001). Les Isopodes sont inclus dans un clade plus large appelé Mancoida, groupe frère des Amphipodes. Les Décapodes ont une position plus basale.

### II. Une glande pas si accessoire

Comme les Vertébrés, les Crustacés Malacostracés, dont les Décapodes font partie (Fig. I.2), présentent majoritairement un déterminisme génétique du sexe, avec présence de chromosomes sexuels XX/XY ou ZZ/ZW selon les espèces (Legrand et al., 1987; Rigaud et al., 1997b; Becking et al., 2017). Dans cette classe, la différenciation sexuelle (la mise en place effective, au cours du développement, du phénotype mâle ou femelle) est conditionnée par la présence ou l'absence d'une "glande accessoire" associée à la gonade, découverte initialement chez un Décapode, le crabe bleu (Callinectes sapidus), mais décrite sans fonction associée (Cronin, 1947; Ventura et al., 2011). Cette glande a ensuite été identifiée et véritablement étudiée chez les Crustacés Amphipodes (Charniaux-Cotton, 1954a) puis d'autres Décapodes (Charniaux-Cotton, 1956) et enfin chez les Isopodes (Asellus aquaticus d'abord, puis le cloporte Porcellio dilatatus) (Balesdent-Marquet, 1958; Legrand, 1958). Son existence est aussi avérée chez d'autres ordres de Malacostracés (Cumacea, Mysida, Tanaidacea) (Legrand and Juchault, 1961; Charniaux-Cotton, 1962; Juchault, 1963). Au contraire, la glande n'est à notre connaissance décrite chez aucun des Crustacés autrefois qualifiés "d'inférieurs" (Branchiopodes, Copépodes, Ostracodes, etc.), ce qui permet de supposer son absence en dehors des Malacostracés. Son nombre et sa position dans l'organisme sont assez variables selon les espèces, même au sein d'un ordre (Charniaux-Cotton et al., 1966). Par exemple chez les Isopodes, la ou les glandes sont accolées au canal déférent chez A. aquaticus (Balesdent-Marquet, 1958), à la vésicule séminale chez Sphaeroma serratum (Legrand and Juchault, 1960a), aux deux organes précités chez Helleria brevicornis (Legrand and Juchault, 1960b) et aux extrémités des testicules (utricules) chez P. dilatatus et Armadillidium vulgare (Legrand, 1958), comme pour tous les Isopodes de la tribu Crinocheta (Legrand and Juchault, 1960c) (Fig. I.3). C'est donc plutôt pour sa fonction dans la différenciation sexuelle mâle que Mme Charniaux-Cotton lui a choisi son nom : la glande androgène (GA) (Charniaux-Cotton, 1962). Différentes opérations sur les trois principaux modèles de Malacostracés ont ensuite permis d'attribuer une fonction commune à cette glande. L'encadré n°1 présente l'anatomie et le développement des gonades chez le modèle Isopode du cloporte commun (A. vulgare), prérequis dans le paragraphe suivant.

<u>Figure I.3</u> : Appareil génital mâle chez différentes espèces d'Isopodes - A. *Eurydice pulchra* (Flabellifère), B. *Helleria brevicornis* (Oniscidea, Tylidae), C. *Androniscus dentiger* (Oniscidea, Synocheta, Trichoniscidae), D. *Athelges paguri* (Epicaride) et E. *Porcellio dilatatus* (Oniscidea, Crinocheta, Porcellionidae). Les différentes positions possibles des GA chez les Péracarides sont récapitulées dans le tableau (Juchault, 1966).





Initialement, du fait de sa petite taille et de sa fragilité, et étant parfois vue comme une simple masse indifférenciée, la GA a souvent été ignorée ou perdue lors des dissections. Ainsi les inférences initiales sur le fonctionnement de la gonade étaient-elles souvent erronées : la fonction endocrine masculinisante était attribuée ou pas aux testicules lors de certaines expériences de greffes de gonades mâles (Charniaux-Cotton, 1954b; Legrand, 1955), tandis que les "castrations" n'avaient aucun effet (Takewaki and Nakamura, 1944; Charniaux, 1952, 1953; Legrand, 1956a). Contrairement aux premières expériences n'utilisant que les testicules, les greffes chez des femelles Isopodes adultes de gonades mâles vraiment complètes, ou de portions de gonades incluant au moins les GA, ont bien provoqué leur masculinisation. L'apparition de tous les caractères sexuels secondaires mâles (stylets copulateurs, soies mâles sur les péréiopodes) a ainsi pu être observée, de même que la masculinisation partielle des ovaires : régression des ovocytes, transformation du tractus thoracique th7 (Encadré 1) en ébauche de canal déférent et évolution de l'ovaire en vésicule séminale (De Lattin and Gross, 1953; Legrand, 1954a, 1954b; Balesdent-Marquet, 1958; Legrand, 1959a; Katakura, 1961). La différenciation du canal déférent précède souvent l'apparition du pénis (aussi appelé apophyse génitale). Les animaux partiellement masculinisés peuvent se reproduire comme femelle tant qu'il leur reste des ovocytes (Legrand, 1954a, 1959b) mais, à terme, ils évoluent vers un phénotype intersexué, stérile par faute de spermatogonies car les utricules ne se différencient pas ou très faiblement (Legrand, 1959a; Balesdent-Marquet, 1960). De façon marquante, les mêmes effets masculinisants ont été obtenus en utilisant les GA seules, chez les Amphipodes (Charniaux-Cotton, 1954a; Ginsburger-Vogel, 1972), les Isopodes (Katakura, 1959, 1960, 1961; Legrand and Noulin, 1961; Juchault and Legrand, 1964a; Legrand-Hamelin, 1976; Raimond and Juchault, 1983) et les Décapodes (Nagamine et al., 1980a; Nagamine and Knight, 1987; Malecha et al., 1992; Frelon et al., 1993; Taketomi and Nishikawa, 1996; Barki et al., 2003; Manor et al., 2004). Dans la majorité des cas, on observe selon l'âge auquel la femelle est opérée, soit une masculinisation partielle des adultes, telle que précédemment décrite, soit un changement de sexe complet (transformation de l'ovaire en testicule fonctionnel et néo-GA) lorsque les greffes sont réalisées avant que la différenciation sexuelle soit trop avancée, c'est-à-dire avant que les cellules mésenchymateuses des filaments suspenseurs soient définitivement orientées en cellules conjonctives (Katakura, 1960, 1961; Juchault and Legrand, 1964a; Malecha et al., 1992; Suzuki and Yamasaki, 1997). Cette masculinisation par greffe de GA est aussi efficace lorsque ces dernières sont inactivées par un traitement à l'éthanol (Suzuki and Yamasaki, 1998). Cette expérience suggère que les GA contiennent un principe actif diffusant en dehors des cellules tuées et permet de vérifier précisément la fenêtre dans laquelle une réversion du sexe est possible. Ainsi, chez les Isopodes, la masculinisation fonctionnelle des femelles d'A. vulgare est totale en cas de greffe de GA éthanolées aux stades de développement 4 à 7 (voir Encadré 1) mais impossible aux stades précédents ou ultérieurs (Suzuki, 1999). Les seules exceptions connues sont les Amphipodes du genre *Orchestia* et les Isopodes *S. serratum* et *P. dilatatus petiti*, dont le sexe est inversable même après la puberté (Legrand et al., 1974; Raimond and Juchault, 1983; Charniaux-Cotton and Payen, 1985). Ces expériences renforcent l'idée selon laquelle le facteur libéré à partir de la GA est un facteur de différenciation et non un facteur de détermination du sexe.

À l'inverse, les diverses expériences de castration de gonades mâles, lorsqu'elles incluent bien les GA, induisent une démasculinisation plus ou moins marquée des animaux opérés, aussi bien chez les Amphipodes (Charniaux-Cotton, 1955), les Isopodes (Suzuki and Yamasaki, 1991) que les Décapodes (Nagamine et al., 1980b; Sagi et al., 1990). Comme pour les greffes, une réversion totale du sexe peut être observée si la différenciation mâle n'est pas trop avancée. Les expériences de réversion de sexe ont par ailleurs permis de réaliser des croisements entre mâles génétiques ou entre femelles génétiques chez différentes espèces et ainsi de déterminer si l'homogamétie des chromosomes sexuels est femelle (e.g. *A. nasatum, P. dilatatus dilatatus*) ou mâle (e.g. *A. vulgare, P. dilatatus petiti*) (Juchault and Legrand, 1964b; Legrand, 1964; Juchault and Legrand, 1972; Legrand-Hamelin, 1976; Suzuki and Yamasaki, 1991; Juchault and Rigaud, 1995; Becking et al., 2017). Enfin, ces néo-femelles obtenues par castration sont particulièrement intéressantes dans les espèces à hétérogamétie femelle comme la crevette *Macrobrachium rosenbergii* car elles donnent une descendance exclusivement mâle, dont l'intérêt commercial a été discuté précédemment (Sagi and Aflalo, 2005; Aflalo et al., 2006; Ventura, 2018).

Cette glande semble donc être vraiment la source du facteur androgène car sa seule présence suffit à induire une différenciation sexuelle mâle. Elle n'est pourtant pas encore différenciée avant le stade 6 chez *A. vulgare* alors que la différenciation sexuelle mâle est visible dès le stade 4 au niveau des gonades (voir Encadré 1). Il existerait cependant des cellules précurseurs dans les territoires présomptifs de la GA, aux extrémités des filaments suspenseurs, se différenciant en GA sous l'action d'un "inducteur nucléaire" exprimé chez les mâles seulement (Legrand, 1964). Il s'agirait en ce sens d'un système "auto-différencié", ce qui est corroboré par le fait qu'une gonade indifférenciée de génotype mâle, greffée dans une femelle, évolue en testicule même en l'absence d'hormone mâle circulante (Juchault and Legrand, 1964c). De plus, une gonade indifférenciée de génotype mâle qui a été privée de l'ébauche de GA et qui a été greffée dans un mâle adulte évolue au contraire en ovaire atypique ("autodifférenciation ovarienne") (Juchault and Legrand, 1964c). Ce ne serait donc pas l'hormone mâle circulante qui provoque la différenciation de la gonade mâle mais un deuxième inducteur, produit par les ébauches de GA après leur propre différenciation, qui entraînerait par conduction la différenciation du reste des filaments suspenseurs en utricules testiculaires, puis des

glandes proprement dites. Les expériences historiques montrent d'ailleurs que la différenciation des utricules chez une jeune femelle greffée avec une GA, même inactivée à l'éthanol, est systématiquement précédée de la différenciation d'ébauches de GA autochtones à partir des filaments suspenseurs (Juchault and Legrand, 1964a; Suzuki and Yamasaki, 1998) (à l'exception d'Orchestia gammarellus et S. serratum (Raimond and Juchault, 1983), deux cas se distinguant aussi par leur capacité à se redifférencier à l'âge adulte). La GA greffée contient donc une substance qui ne serait que le facteur initiant la cascade, à l'instar de l'inducteur nucléaire des cellules précurseurs au cours du développement normal du mâle. Enfin, les gonades indifférenciées privées des territoires présomptifs de GA se différencient néanmoins systématiquement en gonade mâle, quel que soit le génotype du donneur et du porte-greffe, si elles sont mises au contact direct d'une GA d'adulte (Juchault and Legrand, 1966; Legrand and Juchault, 1972). La substance produite par la GA ectopique se substitue donc également à l'inducteur qui déclenche normalement la différenciation des utricules par conduction. Toutes ces observations ont donc amené à penser que l'inducteur à l'origine de l'auto-différenciation de la GA, celui à l'origine de la différenciation sexuelle primaire par conduction et celui, circulant, à l'origine de la différenciation sexuelle secondaire sont tous voisins (possiblement une hormone, son précurseur et un complexe protéique).

### Encadré n°1 - le dimorphisme sexuel des cloportes et sa mise en place

Les Isopodes présentent une segmentation en quatre parties : d'abord le céphalon (tête), suivi du péréion, constitué de 7 segments (les péréionites) qui portent les paires de pattes (les péréiopodes), puis le pléon, composé de 6 pléonites dont 5 sont libres et portent des paires de pléopodes et enfin le telson (Grassé and Forest, 1996). Les pattes sont toutes semblables en première approximation, d'où le nom Isopoda, mais présentent un dimorphisme sexuel. les mâles portant des brosses de soies facilitant la copulation. Outre les éventuelles différences de couleurs (les mâles adultes étant régulièrement plus foncés que les femelles), l'identification du sexe d'un cloporte passe ensuite par l'examen des organes génitaux externes. Ceux-ci sont par ailleurs à la base de la plupart des études sur la systématique des Isopodes (Vandel, 1943, 1960, 1962; Noël and Séchet, 2007). Ils incluent premièrement, chez le mâle, une apophyse génitale ("pénis"), c'està-dire un organe dérivé de la membrane articulaire reliant péréion et pléon et contenant la portion terminale des canaux déférents (Legrand, 1946). Ce pénis présente une coaptation avec la paire d'endopodites des pléopodes 1, allongés et présentant une gouttière spermatique. Ces pièces dites "paracopulatrices" (Mead, 1973), sont de plus associées à une paire de stylets copulateurs composée des endopodites des pléopodes 2 (Fig. E1.1). Ils permettent la fécondation interne lors de la copulation, au niveau des deux ouvertures génitales des femelles, présentes à la base des pattes, sur les péréionites 5. Ces ouvertures génitales femelles se différencient au cours du développement lors du contact des oviductes avec la cuticule. Concernant les gonades à proprement parler, elles se présentent sous la forme d'un cordon sexuellement indifférencié à la naissance du cloporte (Legrand and Vandel, 1948; Juchault, 1966). Celui-ci est prolongé par des filaments suspenseurs (tractus), métamérisés, nommés th2 à th7 en fonction de leur position vis-àvis des segments thoraciques.

Chez *A. vulgare*, au cours du développement post-embryonnaire mâle, des gonocytes migrent depuis le cordon sexuel jusque dans les filaments th2, 3 et 4 qui vont chacun se développer et se différencier en un testicule (l'utricule) surmonté d'une GA. Le filament th7 se différencie lui en canal déférent tandis que le reste de la gonade primordiale se différencie en vésicule séminale (Fig. E1.2). Chez la femelle, les gonocytes restent dans le cordon sexuel et c'est le filament th5 qui se développe et se différencie en un oviducte. La figure E1.2 représente la chronologie de ces étapes de différenciation de la gonade d'*A. vulgare* au cours développement post-embryonnaire (Suzuki and Yamasaki, 1995, 1997). Les larves naissent au stade 1 et les stades de développement ultérieurs correspondent chacun à une nouvelle mue. Les trois premiers stades

sont des stades larvaires, où la 7ème paire de pattes n'est pas encore fonctionnelle. La différenciation sexuelle de la gonade chez le juvénile est visible à partir du stade 4 mais pourrait être initiée au stade 3. Chez le mâle, l'apparition de l'appareil copulateur débute au stade 5 par l'élongation des endopodites 1, ce qui permet d'ailleurs de déterminer leur sexe sans dissection. Les premières GA apparaissent ensuite au stade 6, se différenciant d'abord à partir du th2. Au stade 7, les dernières GA sont apparues au niveau du th4 et les testicules produisent des spermatozoïdes. La maturité sexuelle est atteinte au stade 8, lorsque les spermatozoïdes ont atteint la vésicule séminale et le canal déférent.



<u>Figure E1.1</u> : Morphologie de la région génitale d'*Armadillidium vulgare*. Face ventrale du pléon chez le mâle (A.) et la femelle (B.) (Fortin, 2016). Seuls les mâles présentent une apophyse génitale (AP) et les endopodites (EN) des pléopodes 1 et 2 allongés (A. et C.) (Mead, 1973). Les femelles présentent deux ouvertures génitales (GO) à la base des péréiopodes 5 (B.).



<u>Figure E1.2</u> : Séquence de différenciation de la gonade d'*Armadillidium vulgare* au cours du développement (adapté de (Suzuki and Yamasaki, 1995)). Chaque nouveau stade est associé à une mue supplémentaire. La gonade commence à être sexuellement différenciée à partir du stade 4. À droite, les photos illustrent une gonade mâle et une gonade femelle d'adultes (©EBI).

### III. Une insuline androgénique

Après la découverte de la GA, une partie des études s'est concentrée sur la nature de sa sécrétion. Une première approche utilisant différentes colorations histochimiques n'a pas permis de trancher la question (Charniaux-Cotton et al., 1966). Les analyses ultrastructurales de GA ont elles montré un abondant réticulum endoplasmique granuleux, de nombreux ribosomes et nombreuses vésicules golgiennes, suggérant que ce tissu aurait la capacité de sécréter une hormone protéique (King, 1964; Malo, 1970a). Des injections chez des cloportes femelles des différentes fractions d'un extrait de GA ont ensuite permis de mettre en évidence que seule la fraction aqueuse présente les propriétés masculinisantes, la fraction lipidique et "stéroïdique" n'en avant aucune (Katakura, 1975; Juchault, 1978). Des traitements à la protéase lors de ces expériences ont permis de confirmer, deux fois indépendamment, ce résultat inédit : l'hormone à l'origine de la différenciation sexuelle mâle des Malacostracés est effectivement une protéine, hydrosoluble, de taille alors estimée soit entre 2 et 8 kDa (Juchault, 1978), soit entre 15 et 17 kDa (Katakura, 1975). Comme pour la greffe de la GA, l'injection chez des jeunes femelles de cet extrait protéique permet leur totale différenciation mâle (Katakura and Hasegawa, 1983). Reproduisant totalement l'effet masculinisant de la GA, cette protéine a par conséquent été appelée hormone androgène (HA) (AGH en anglais pour *androgenic* gland hormone) (Katakura, 1975).

Par la suite, en associant plusieurs étapes de précipitations, électrophorèses et chromatographies en phase liquide (HPLC), l'HA a été purifiée pour la première fois chez l'espèce modèle d'Isopodes, A. vulgare, d'abord en 1987 par l'équipe de Katakura (Japon) à partir de GA normales (Hasegawa et al., 1987), puis par notre laboratoire en 1990 à partir de GA hypertrophiées sous l'action de la bactérie endosymbiotique Wolbachia (Martin et al., 1990). Les deux équipes ont indépendamment décrit deux isoformes de l'HA (AH1 et AH2) avec un poids moléculaire compris entre 17 et 18 kDa environ. Une nouvelle purification en trois étapes, par RP-HPLC, associée à un nouveau test de digestion enzymatique ont confirmé que l'HA est bien une protéine, de taille moléculaire cette fois estimée entre 11 et 13 kDa (Okuno et al., 1997). C'est en 1998 puis 1999 que la structure précise de l'hormone a été établie par micro-séquençage (digestion enzymatique de type "dégradation d'Edman") et spectrométrie de masse (Martin et al., 1998, 1999). Cette étude a révélé l'existence d'un précurseur de l'HA ("AH3", 16,5 kDa) composé de trois chaînes peptidiques B-C-A de 44, 50 (avant excision) et 29 aa respectivement. L'HA mature est, elle, un hétéro-dimère présentant seulement les peptides B et A, ainsi que deux ponts disulfures inter-chaînes et deux ponts disulfures intra-chaînes (Fig. I.4.A). Les deux formes précédemment décrites (AH1 et AH2, 10-12 et 10,7 kDa respectivement), correspondent en réalité à des glycoformes de l'hormone mature (des molécules présentant des variations dans la nature et/ou la taille des glycosylations présentes sur la chaîne A). La présence de cette glycosylation a de plus été confirmée par l'affinité de l'HA pour des lectines (Okuno et al., 2001) et retrouvée chez Porcellio scaber (avec une seule glycoforme) (Grève et al., 2004). Ces modifications post-traductionnelles sont même indispensables pour que l'HA soit fonctionnelle, comme en témoignent les synthèses de protéines recombinantes en modèle bactérien (non glycosylées et inactives) (Okuno et al., 2001) ou eucaryote (glycosylées et actives) (Okuno et al., 2002). Ces protéines recombinantes ont également révélé que l'excision du peptide C (Okuno et al., 2002) et la formation correcte des ponts disulfures (Katayama et al., 2010) sont indispensables pour obtenir une activité biologique. Globalement, la structure protéique de l'HA est très similaire à celle de l'insuline des Vertébrés, maintenant bien connue grâce aux travaux de F. Sanger notamment, qui lui ont valu le prix Nobel de chimie en 1958. Ainsi l'insuline et l'HA sont-elles traduites sous forme de pro-hormone, dont le peptide C est clivé et dont les chaînes A et B sont liées par des ponts disulfures. Si leurs structures sont proches, ce n'est en revanche pas le cas de leurs séquences primaires, qui présentent une grande divergence. L'insuline de Vertébrés ne présente de plus aucune glycosylation contrairement à l'HA. Ces deux protéines appartiennent néanmoins à une même super-famille de peptides, dite de l'insuline. Ses autres membres sont classiquement répartis en deux familles : les Insulin-Like Peptides (ILP), proches de l'insuline (cette dernière pouvant être aussi incluse dans cette famille), et les Insulin-like Growth Factors (IGF) (Claeys et al., 2002; Wu and Brown, 2006; Shabanpoor et al., 2009). Dans les modèles bien décrits chez les Vertébrés, les ILP sont des peptides libres ayant des fonctions métaboliques comme la régulation de la glycémie tandis que les IGF sont des peptides liés à des protéines de transport et avant principalement des fonctions associées au développement. Comme l'HA, toutes ces protéines sont caractérisées par une synthèse sous la forme d'un précurseur présentant, outre un peptide signal, trois à cinq domaines (A, B et C pour toute la super-famille, ainsi que deux chaînes supplémentaires D et E uniquement chez les IGF). À l'exception des IGF qui conservent les domaines C et D, ces précurseurs subissent ensuite différentes étapes de maturation aboutissant à un peptide tel que décrit précédemment (Fig. I.4.A) (Adams et al., 1969; De Meyts, 2004). L'existence de l'ensemble de ces éléments caractéristiques a été retrouvée pour toutes les HA identifiées ultérieurement chez les Isopodes (Ohira et al., 2003; Cerveau et al., 2014).



<u>Figure I.4</u> : Domaines conservés de l'HA, chez *Armadillidium vulgare* (Isopoda) (A.), chez *Cherax quadricarinatus* (Cq-IAG) (Décapodes) (B.) et modélisation de la structure 3D de Cq-IAG (C.) d'après (Manor et al., 2007). La modélisation 3D de l'HA représente la protéine mature et est basée sur la structure connue d'un ILP (la bombyxine).

Bien avant la purification de l'HA, les diverses expériences de greffes hétérospécifiques de GA, notamment chez les Isopodes terrestres, ont suggéré que l'hormone présente une spécificité relative pour le récepteur de son espèce, introduisant les notions de variation de séquences et d'évolution. L'HA d'une espèce donnée semble être fonctionnelle la plupart du temps au sein du même genre mais les chances de succès diminuent globalement avec l'éloignement phylogénétique des espèces (Juchault, 1966, 1968; Martin and Juchault, 1999) (un bilan de ces expériences est résumé Fig. I.5). L'HA est cependant parfois fonctionnelle chez des espèces de familles différentes (par exemple l'HA de *Cylisticus convexus*) et il est fréquent que l'action interspécifique ne soit pas symétrique (par exemple entre A. vulgare et P. dilatatus (Juchault and Legrand, 1978)). Ces résultats ont ensuite été confirmés par des tests de réactivité croisée avec des anticorps anti-HA (Hasegawa et al., 1991, 2002) et suggèrent une possible évolution différentielle entre l'HA et ses récepteurs. L'exploration de cette question a nécessité de déterminer, pour commencer, des séquences nucléotidiques d'HA. Rapidement après le séquencage de la protéine, l'utilisation d'amorces dégénérées a permis d'amplifier l'ADNc de l'HA d'A. vulgare par RT-PCR (Okuno et al., 1999). Celui-ci code bien pour une préprohormone, contenant un peptide signal de 21 résidus en plus des trois chaînes peptidiques, confirmant ainsi que l'HA est une protéine sécrétée. L'obtention de l'ADNc a de plus permis de confirmer par northern blot la spécificité de l'expression de l'HA, trouvée uniquement dans la GA. Ce résultat a ensuite été confirmé par un immunomarquage de l'HA, positif uniquement dans la GA (Hasegawa et al., 2002), ainsi que par RT-PCR chez d'autres espèces de cloportes (Ohira et al., 2003; Grève et al., 2004). Enfin l'obtention de la séquence d'Av-HA a permis d'ouvrir la voie aux recherches in silico, aboutissant à l'identification de multiples HA d'Isopodes dont les liens phylogénétiques ont pu être confirmés (Cerveau et al., 2014). Les approches classiques (amorces dégénérées, BLAST, annotation de transcriptomes) n'ont cependant pas permis d'obtenir de nouvelles séquences d'HA en dehors de cet ordre (Sagi and Khalaila, 2001).

Des années plus tard, une librairie d'ADNc spécifiques de GA a été réalisée chez l'écrevisse *Cherax quadricarinatus*, par soustraction des ADNc exprimés dans d'autres organes (Manor et al., 2007). Cette approche a finalement permis l'identification de l'HA chez cette espèce, relançant les études sur la différenciation sexuelle au sein des Décapodes. Dans les espèces de cet ordre, l'HA a été plutôt appelée *Insulin-like Androgenic Gland hormone* (IAG) en raison de son appartenance à cette super-famille de peptides (Ventura et al., 2011). De structure très similaire à l'HA des Isopodes (Cerveau et al., 2014), l'hormone des Décapodes présente néanmoins un second site de N-glycosylation (aucun des deux n'ayant été confirmé à notre connaissance) et un unique pont disulfure intra-chaîne (dans la chaîne A) (Fig. I.4.B). Finalement, l'HA reste à ce jour non identifiée chez les Amphipodes, Cumacea, Mysida et Tanaidacea, malgré la présence de GA chez ces espèces.

		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
		Aoff	Cmur	Adep	Amac	Anas	Avul	Epur	Ccon	Oase	Pmus	Pdd	Pdp	Pgal	Plae	Pmon	Psca	Pop	Hbre	Teur	
	Aoff	YBS	Part <sup>s</sup>				Nos		No <sup>5</sup>	No <sup>s</sup>		No <sup>5</sup>	No								Aoff
-	Cmur	Yess	YBS																		Cmur
	Adep			Yes			Yess														Adep
-	Amac				YBS		Yes <sup>s</sup>														Amac
2	Anas					Yes	Yes⁵	Part <sup>s</sup>													Anas
	Avul	No <sup>5</sup>		Yes <sup>5</sup>	Yes <sup>s</sup>	Yes*	Yes 12	Part <sup>s</sup>	Nos	No <sup>5</sup>		Yes* Part <sup>s</sup> (Vec)		Yes <sup>s</sup>	Yes <sup>5</sup>		Part <sup>s</sup>	No <sup>s</sup>	No <sup>5</sup>		Avul
1000	Epur					?	No <sup>5</sup>	YBS	Yess	Nos		No <sup>5</sup>			?	?	?				Epur
3	Ccon	No <sup>s</sup>					Yes <sup>s</sup>	No <sup>5</sup>	Yes	No <sup>s</sup>		Yes <sup>5</sup>			Yes <sup>s</sup>		Yes <sup>5</sup>	Nos			Ccon
ų	Oase	No <sup>s</sup>					Nos	No <sup>5</sup>	No <sup>5</sup>	Yes	(Part)	No <sup>5</sup>					No <sup>s</sup>	No <sup>5</sup>	No <sup>6</sup>	No <sup>5</sup>	Oase
1	Pmus									?	Yas										Pmus
	Pdd	No <sup>5</sup>					No 4.5	No <sup>5</sup>	Yess	No <sup>s</sup> (Part)		YBS	Yes <sup>5</sup>		Yes 5	(Yes)	Yes <sup>5</sup> (Yes)	No <sup>5</sup>	No *5 (No)		Pdd
1	Pdp	?										Yess	Yas								Pdp
	Pgal						No <sup>5</sup>							Yas		?			2		Pgal
1	Plae			1			Yes <sup>s</sup>	(Yes)	Yes <sup>s</sup>			Yes <sup>s</sup>			Yes			Part®			Plae
1	Pmon					(Yes)		(Part)		(Yes)		(Yes)		(Yes)		Yes	(Yes)				Pmon
	Psca						No <sup>5</sup>	No <sup>5</sup>	Yes <sup>s</sup>	No <sup>5</sup> (Part)		Yes <sup>s</sup> (Yes)				(Yes)	YBS	No <sup>5</sup>			Psca
	Pop						Part <sup>s</sup>		Yess	No <sup>5</sup>		Yess			Yes <sup>s</sup>		Yess	Yes			Pop
-	Hbre						Nos			Nos		No *5 (No)							YES	No <sup>5</sup>	Hbre
	Teur									?									2	Yas	Teur
		Aoff	Cmur	Adep	Amac	Anas	Avul	Epur	Ccon	Oase	Pmus	Pdd	Pdp	Pgal	Plae	Pmon	Psca	Pop	Hbre	Teur	
		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	

Figure I.5 : Bilan des effets induits par des greffes intra- et interspécifiques de GA entre Isopodes. "Yes" indique que la greffe de GA du donneur (D) provoque la masculinisation du receveur (R), "Part" indique un effet partiel et "No" l'absence d'effet. Le fond vert indique que l'effet de la greffe est réciproque tandis que le fond rouge indique que la greffe ne marche que dans un sens. Sources : 1 (Katakura, 1960), 2 (Legrand and Juchault, 1972), 3 (Juchault and Legrand, 1979), 4 (Juchault and Legrand, 1978), 5 (Martin and Juchault, 1999), () (Juchault, 1966), \* (Juchault, 1968).

### IV. La guerre des mondes

La nature du facteur déclenchant la masculinisation chez les Crustacés reste pourtant débattue et non entièrement élucidée (Juchault et al., 1984). Contrairement au cas des Vertébrés, la différenciation sexuelle des Crustacés Malacostracés semble bien être pilotée par une protéine, l'HA. Les hormones stéroïdiennes telles la testostérone ou les œstrogènes, dérivées du cholestérol, sont cependant présentes chez tous les invertébrés (Lafont and Mathieu, 2007). Les ecdystéroïdes sont bien connus pour leur implication dans la mue des arthropodes mais il y a également des preuves de la synthèse de stéroïdes classiquement rencontrés chez les Vertébrés (progestérone, testostérone, œstradiol) chez les mollusques et les échinodermes, avec une fonction établie dans leur reproduction. La présence de ces hormones chez les Crustacés et insectes est également démontrée pour de nombreuses espèces (Köhler et al., 2007; Lafont and Mathieu, 2007). En revanche, la preuve de leur synthèse endogène reste incomplète et les expériences relatives à leur fonction biologique ne sont pas concordantes (Köhler et al., 2007; Lafont and Mathieu, 2007). Par exemple, l'injection de testostérone chez des femelles d'Isopodes terrestres (P. dilatatus, H. brevicornis) (Juchault, 1966; Juchault and Legrand, 1966) ou d'Amphipodes (Orchestia gammarella) (Charniaux-Cotton, 1962) ne provoque aucun signe de masculinisation, même externe. Chez un Décapode au contraire, cette injection inhiberait bien la croissance ovarienne, stimulerait la conversion d'ovaire en testicule chez un crabe et provoquerait l'hypertrophie des GA, stimulant ainsi le développement testiculaire (Sarojini, 1963; Nagabhushanam and Kulkarni, 1981). Les autres effets recensés correspondent largement à une stimulation de processus liés au fonctionnement des ovaires mais pas en terme de différenciation (Nagaraju, 2011). Par ailleurs, des récepteurs similaires aux récepteurs à œstrogènes (ERR (Gao et al., 2014)) ainsi qu'une protéine interagissant avec le récepteur à androgènes (SARIP1 (Hiransuchalert et al., 2013)) sont également identifiés chez plusieurs espèces de Crustacés (Décapodes, Amphipodes). Ils pourraient expliquer la sensibilité de certains Malacostracés à des stéroïdes de type Vertébré mais leurs effets physiologiques ne sont pas éclaircis non plus.

Si l'ensemble des études ne permet pas de conclure à une fonction des hormones stéroïdes dans la différenciation sexuelle des Crustacés, c'est le cas d'une autre famille de molécules lipidique : les terpénoïdes. Le farnesylacétone par exemple, purifié à partir de GA de Décapode, permet bien, après injection chez des femelles, l'arrêt de la vitellogenèse et l'apparition d'une coloration de type mâle chez des Amphipodes, même si cela ne déclenche pas de spermatogenèse pour autant (Berreur-Bonnenfant, 1973; Férézou et al., 1977). Cette molécule, produite par la GA (Férézou et al., 1978), inhiberait la synthèse de protéines en agissant sur l'étape de transcription

(Berreur-Bonnenfant and Lawrence, 1984). Le méthylfarnésoate, une molécule voisine de l'hormone juvénile (JH), a également été très étudié pour son possible rôle dans la régulation de la reproduction chez les Crustacés (Homola and Chang, 1997). De façon notable, cette molécule agit chez la daphnie comme un facteur de détermination du sexe mâle, à la génération N-1 chez la mère, en fonction des conditions environnementales qui déclenchent chez les femelles un passage de la parthénogenèse à la reproduction sexuée (LeBlanc and Medlock, 2015). La production des mâles est contrôlée de façon dose-dépendante par la sécrétion de méthylfarnésoate qui induit un sexe mâle dans les ovocytes durant la fin de la maturation ovarienne, avant même la fécondation et le développement embryonnaire (Olmstead and Leblanc, 2002). Chez les Malacostracés, cette molécule semble impliquée, directement ou indirectement, dans une grande variété de processus physiologiques, dont le comportement, la mue, l'osmorégulation, le stress, mais également la maturation ovarienne et le développement testiculaire (Nagaraju, 2007).

Au moins deux voies de signalisation liées à la différenciation sexuelle semblent ainsi coexister : une basée sur des hormones lipidiques (stéroïdes et/ou terpénoïdes), bien décrite chez les Vertébrés mais encore en partie obscure chez les invertébrés, et une autre basée sur une hormone peptidique, spécifique *a priori* des Crustacés Malacostracés. Les recherches menées sur ces deux voies étant réalisées par des équipes différentes et de manière assez indépendante, l'interaction et la complémentarité entre ces deux voies, ainsi que leur histoire évolutive à grande échelle sont encore à ce jour inconnues. Différentes études chez les insectes ont pourtant mis en évidence des cas de *crosstalk* entre la voie des stéroïdes (ecdystéroïdes notamment) et la voie des ILP dans le contexte de processus liés au métabolisme, la croissance et la reproduction (Colombani et al., 2005; Shingleton, 2005; Wu and Brown, 2006; Roy et al., 2007; Ables and Drummond-Barbosa, 2010; Francis et al., 2010). Suite à la découverte de l'HA, les études sur la différenciation sexuelle des Malacostracés se sont concentrées sur cette hormone, laissant en suspens les interrogations sur l'implication des stéroïdes dans ce processus.

#### V. Le transporteur

Plus récemment, l'exploitation de la banque d'ADNc de GA déjà utilisée pour identifier l'HA d'écrevisse a permis l'identification *in silico* de ses premiers partenaires. Le premier a ainsi été caractérisé en 2013 chez *C. quadricarinatus* (Rosen et al., 2013). Il s'agit d'une protéine globulaire avec un domaine conservé de liaison des IGF et donc nommé Cq-IGFBP car il appartient effectivement à la super-famille des IGFBP pour *Insulin Growth Factor Binding Protein*. Malgré sa

banque d'origine, censée contenir des transcrits spécifiques de la GA, des analyses d'expression ont révélé que Cq-IGFBP est exprimé dans tous les tissus testés et qu'il n'est pas spécifique de cette glande. Depuis, le développement des approches transcriptomiques a permis son identification *in silico* chez d'autres espèces de Décapodes : un homard (Chandler et al., 2015), trois crabes (Huang et al., 2015a, 2016; Song et al., 2018) et deux crevettes (F. Li et al., 2015a; Ventura-López et al., 2017). Dans chacun de ces modèles, l'IGFBP s'est avéré être aussi exprimé dans tous les tissus analysés, chez les mâles comme chez les femelles.

Comme l'HA, ce type de protéines appartient bien à la voie de signalisation insuline/IGF et est assez bien décrit chez les modèles de Vertébrés où il joue un double rôle vis-à-vis des IGF. D'une part, c'est le transporteur privilégié des IGF dans le milieu circulant mais il régulerait d'autre part la biodisponibilité de son ligand, en le séquestrant ou en le délivrant aux cellules cibles (Baxter, 2000; Kelley et al., 2002; Bach et al., 2005). Ainsi les IGFBP peuvent-ils à la fois faciliter l'action de leur ligand ou l'inhiber en régulant leur libération. Celle-ci peut être déclenchée soit par une protéolyse, soit par interaction avec une matrice extracellulaire (Forbes et al., 2012). Les IGFBP de Vertébrés présentent par ailleurs une affinité très faible pour l'insuline et les ILP au sens strict (Hwa et al., 1999). L'interaction entre l'IGFBP et l'HA semble donc au premier abord inattendue car l'HA des Crustacés appartient à la famille des ILP et non des IGF. Cette interaction a pourtant été mise en évidence de plusieurs manières chez les Décapodes. Dès 2013, l'utilisation d'une protéine recombinante rCq-IGFBP a montré lors de différents tests (pull-down, western blot / immunotransfert) que cette protéine lie de façon spécifique l'HA (ici Cq-IAG) (Rosen et al., 2013). L'interaction moléculaire a de plus été mise en évidence par un système de double-hybride chez la levure (Song et al., 2018). Une interaction au niveau génétique (directe ou indirecte) a également été montrée par ARN interférent (ARNi) : l'extinction de l'HA réduit la transcription de l'IGFBP et réciproquement, l'extinction de l'IGFBP réduit celle de l'HA (F. Li et al., 2015a). Enfin, l'interaction moléculaire a été étudiée informatiquement grâce à une modélisation en 3D de l'IGFBP et de son ligand (Chandler et al., 2017b). Cela a d'ailleurs mené Li et al. (2015) et Huang et al. (2016) à proposer de nommer ce partenaire de l'HA du fait de la nature de son ligand : respectivement IAGBP (IAG Binding Protein) (F. Li et al., 2015a) et ILPBP (ILP Binding Protein) (Huang et al., 2016).

Les études des domaines protéiques et les phylogénies moléculaires ont en fait révélé l'existence de deux sous-familles de ces transporteurs circulants (Hwa et al., 1999; Rodgers et al., 2008). Les IGFBP 1 à 6 sont les IGFBP *sensu* stricto, avec une affinité forte pour les IGF et faible pour l'insuline. Ils ne sont connus que chez les Vertébrés, chez lesquels ils partagent tous la même structure avec deux domaines conservés : un domaine de liaison aux IGF et un domaine thyroglobuline. Symétriquement, il existe une variété de protéines voisines (IGFBP 7 et ainsi de suite) qui présentent une affinité forte pour l'insuline (Yamanaka et al., 1997; Radulović et al., 2015) et faible pour les IGF (Oh et al., 1996; Radulović et al., 2015). Ces IGFBP sont trouvés chez les Vertébrés comme les invertébrés et présentent une architecture modulaire avec des domaines conservés variables (Hwa et al., 1999). Une nouvelle nomenclature s'est alors imposée et les membres de cette famille d'IGFBP ont été renommés à partir de 1998 en IGFBP-rP (IGFBP-related proteins) (Baxter et al., 1998). Compte tenu des données structurales, d'affinité et phylogénétiques, Huang et al. (2015a) puis Song et al. (2018) ont suggéré que Cq-IGFBP est en fait un homologue d'IGFBP-rP1, autrefois aussi appelé IGFBP7, comme tous les IGFBP de Crustacés découverts à ce jour. Ceux-ci partagent tous la même structure en trois domaines conservés : le domaine typique de liaison aux ILP (IB), suivi d'un domaine inhibiteur de protéases (Kazal) et d'un domaine immunoglobuline (Ig) (Fig. I.6). L'appartenance de tous ces IGFBP de Décapodes à la famille des IGFBP-rP1 explique donc bien la forte affinité de ce transporteur pour cet ILP qu'est l'HA. Les différentes études sur les IGFBP-rP et leurs ligands, les ILP, suggèrent qu'ils peuvent être impliqués dans des fonctions biologiques très variées : métabolisme, croissance, immunité (Mulenga and Khumthong, 2010; N. Li et al., 2012; Wang et al., 2015, 2016). Une nouvelle fonction de l'IGFBPrP1 dans la différenciation sexuelle des Malacostracés est maintenant également envisagée.

Il faut par ailleurs noter que les analyses transcriptomiques ont révélé la présence chez les invertébrés de plusieurs protéines voisines des IGFBP qui ne présentent que le domaine IB, d'où leur nom de SIBD (*Single IB Domain*) (Castellanos et al., 2008; Gai et al., 2010; Chandler et al., 2015). Une seule séquence de SIBD a pour l'instant été trouvée chez *Litopenaeus vannamei, Eriocheir sinensis* et *Scylla paramamosain*, alors que sept séquences différentes ont été identifiées chez *Sagmariasus verreauxi*. Ces SIBD ont des profils d'expression plus variables que l'IGFBP-rP1, certains étant assez spécifiques des gonades, et seraient aussi des transporteurs des ILP. Leur implication dans le système immunitaire (Castellanos et al., 2008; Gai et al., 2010) et dans le catabolisme (Huang et al., 2015b) est envisagée. Pour l'instant, aucun lien n'a pu être mis en évidence entre ces protéines et la différenciation du sexe.

Quoi qu'il en soit, l'IGFBP-rP1 est une protéine circulante qui aurait pour rôle de transporter l'HA. Un récepteur membranaire devrait alors entrer en jeu afin d'assurer la transduction du signal dans les tissus ciblés par cette hormone, à l'instar des récepteurs de l'insuline décrits chez les Vertébrés.



<u>Figure I.6</u> : Domaines conservés (A.) de l'IGFBP-rP1 chez *Sagmariasus verreauxi* (Sv-IGFBP) (Decapoda) et modélisation de la structure 3D correspondante (B.) (Rosen et al., 2013). La modélisation 3D du domaine IB et Kazal (à gauche) est basée sur la structure de HtrA1 de l'Homme et celle du domaine Ig (à droite) est basée sur la structure de *Roundabout homolog 2* de l'Homme.

### VI. La ruée vers l'IR

Ce n'est qu'à partir de 2016 que le schéma d'action de l'HA a été complété par la description de son récepteur cellulaire, appartenant sans surprise à la famille des récepteurs à insuline (Sharabi et al., 2016; Aizen et al., 2016; Guo et al., 2018). L'existence de récepteurs membranaires à l'insuline avait déjà été démontrée dans les années 90, suite à leur purification chez des crevettes du genre *Penaeus*, où l'insuline induit leur autophosphorylation (Lin et al., 1993; Chuang and Wang, 1994). L'activité d'autophosphorylation ainsi que la capacité à phosphoryler d'autres cibles a ensuite été confirmée chez un crabe (Kucharski et al., 1999). C'est grâce au premier génome de Crustacés, celui de la daphnie (*Daphnia pulex*, crustacé branchiopode) que la séquence de ce récepteur, appelé InR, a été décrite (Boucher et al., 2010). Chez cette espèce, quatre gènes d'InR (InR1-4) ont en fait

été identifiés, issus de plusieurs évènements de duplications. Jusque-là, inspirées par les connaissances sur les modèles de Vertébrés, les études sur la voie insuline des Crustacés lui cherchaient principalement un rôle dans le métabolisme du sucre ou la croissance. Aucune fonction du ou des récepteur(s) à insuline n'était cependant clairement établie. À l'inverse, la phosphorylation chez *C. quadricarinatus* de plusieurs peptides de testicules sous l'action de l'HA a bien été démontrée dès 2002 mais n'avait pas été reliée aux récepteurs à insuline (Khalaila et al., 2002).

Comme pour l'IGFBP-rP1, le développement de l'approche transcriptomique a permis de décrire des séquences de ces récepteurs chez de multiples espèces de Crustacés et ainsi d'accélérer les études sur leur sujet. Il existe en particulier deux variants d'épissage alternatif d'un récepteur d'ILP (ILPR) chez le copépode Calanus finmarchicus (1559-1862 aa) (Christie et al., 2016) et une séquence chez trois espèces de Décapodes : l'insulin-like receptor Mr-IR chez M. rosenbergii (1508 aa) (Sharabi et al., 2016), le tyrosine kinase insulin receptor Sv-TKIR chez S. verreauxi (2005 aa) (Aizen et al., 2016) et le récepteur d'IAG (IAGR) chez Fenneropenaeus chinensis (1812 aa) (Guo et al., 2018). Chez le crabe *E. sinensis*, ce sont trois séquences d'IR qui auraient été identifiées (sans que les séquences ne soient décrites ni publiées) (Fu et al., 2017). À nouveau, comme pour l'IGFBP-rP1, une nomenclature assez variable a été utilisée, insistant tantôt sur l'identité du ligand (IAGR), sur la nature du ligand (ILPR et IR) ou sur un des domaines typiques du récepteur (TKIR). En effet, ces récepteurs, bien connus chez les Vertébrés, appartiennent à la superfamille des récepteurs à domaine tyrosine kinase (RTK). Dans le modèle classiquement admis, c'est ce domaine intracellulaire qui est à l'origine de l'auto-phosphorylation croisée du dimère de récepteurs, suite à la liaison du ligand au domaine extracellulaire (Hubbard, 2013; Menting et al., 2013; De Meyts, 2015). Il s'en suit une cascade de phosphorylations dans la cellule aboutissant aux effets physiologiques associés à la voie de signalisation de l'insuline (Fig. I.7) (Sarfstein and Werner, 2015). Outre ce domaine TK, ces récepteurs partagent tous les mêmes domaines conservés : deux domaines de réception du ligand (L ou RL ou LCL) séparés par un domaine furine-like (Fu), puis un nombre variable de domaines de type fibronectine-3 (FN3), le domaine transmembranaire et enfin le domaine TK (Fig. I.8). Dans le reste de ce manuscrit, ce récepteur à ILP nouvellement identifié chez les Décapodes sera appelé IR (pour Insulin-like Receptor).



Figure I.7 : Voie de signalisation de l'insuline, d'après (Fu et al., 2017).

Parmi les espèces chez lesquelles un IR a été décrit, l'étude de l'expression de ce gène n'a été réalisée que chez trois espèces de Décapodes. Les données relatives aux patrons d'expression de ces trois IR sont non congruentes entre elles et rendent délicates les suppositions quant à une fonction du récepteur. Chez *M. rosenbergii*, l'IR s'exprime assez largement (gonades, cœur, ganglions, pédoncule oculaire) et dans les deux sexes. Le muscle et l'hépatopancréas semblent les seuls organes ne l'exprimant pas (Sharabi et al., 2016). Chez *S. verreauxi*, l'IR a une expression plus spécifique, forte seulement dans le testicule et dans la glande antennaire (glande verte), des mâles comme des femelles (Aizen et al., 2016). Chez *F. chinensis*, l'IR s'exprime principalement dans la GA et le testicule, et cette fois-ci uniquement chez le mâle (Guo et al., 2018). Des analyses complémentaires semblent donc nécessaires pour comprendre cette variabilité et trouver une cohérence aux patrons d'expression de l'IR.

L'attribution d'une fonction aux IR a par ailleurs été abordée par différentes approches. Chez *M. rosenbergii* en premier, l'extinction de l'expression de l'IR par ARNi provoque une hypertrophie des GA et une altération de la spermatogenèse (Sharabi et al., 2016). Chez F. chinensis, l'ARNi induit également un arrêt de la spermatogenèse et conforte donc les précédents résultats (Guo et al., 2018). Ceci semble confirmer l'implication de l'IR dans la physiologie sexuelle mâle mais aucun des deux groupes n'a réussi à obtenir la réversion de sexe des mâles, pourtant possible chez *M. rosenbergii* par extinction de l'HA (Ventura et al., 2012). L'hypothèse de l'existence de plusieurs récepteurs de l'HA a donc été envisagée. Elle semble corroborée chez le crabe chinois (*E. sinensis*) par l'identification de trois IR mais les auteurs ne fournissent néanmoins pas les séquences et continuent à parler de l'IR au singulier dans les analyses d'expression (Fu et al., 2017). Chez S. verreauxi et C. quadricarinatus, des essais expérimentaux ont permis d'aller plus loin en confirmant que l'IR lie bien l'HA (Aizen et al., 2016). En effet, une HA recombinante (rSv-IAG) permet d'activer le système rapporteur SRE-LUC dans des cultures de cellules (COS-7) exprimant Sv-TKIR. De plus, rSv-IAG, rCq-IAG et rMr-IAG permettent bien d'augmenter la phosphorylation des protéines MAPK1/2 dans les testicules de S. verreauxi, C. quadricarinatus et M. rosenbergii respectivement. Enfin, le modèle F. chinensis à nouveau, a permis grâce à la technique du doublehybride chez les levures de mettre en évidence l'interaction de l'HA (deux variants chez cette espèce, FcIAG1 et FcIAG2) avec la partie extracellulaire du récepteur (FcIAGR) et plus spécifiquement avec le domaine de liaison au ligand (ici appelé LCL) (Guo et al., 2018). Ces nouvelles découvertes confirment donc l'implication d'une voie de signalisation de type insuline dans un processus inédit, la différenciation sexuelle mâle des Malacostracés via l'HA et un ou plusieurs récepteur(s) tyrosine kinase. Une telle implication de la voie des insulines dans le déterminisme et la différenciation du sexe n'est néanmoins pas un cas unique puisqu'elle est observée chez les Vertébrés (Nef et al., 2003; Pitetti et al., 2013; Neirijnck et al., 2018) et les Mollusques (Gricourt et al., 2006).



<u>Figure I.8</u> : Structure du récepteur Tyrosine Kinase des ILP. Domaines conservés (A.) du TK-IR chez *Fenneropenaeus chinensis* (Fc-IAGR) (Decapoda) (Aizen et al., 2016), modélisation de la structure 3D de l'ectodomaine (B.) (Guo et al., 2018) et schéma de fonctionnement suite à la liaison du ligand par le récepteur (Ward et al., 2013).

#### VII. Wolbachia : pirate des cloportes

Dans le cadre de ma thèse, l'étude de la différenciation sexuelle s'est focalisée non pas sur l'ordre des Décapodes mais sur les Isopodes qui se révèlent également un modèle de choix pour étudier la voie de signalisation de l'HA et son implication sur la différenciation sexuelle des Malacostracés. Historiquement déjà, il s'agit du clade dans lequel l'HA a été initialement découverte et étudiée. Comme illustré précédemment, nous disposons dès lors d'un corpus bibliographique très riche quant au processus original de leur différenciation sexuelle, en particulier chez l'espèce modèle *A. vulgare*.

Par ailleurs, ce modèle est également étudié depuis des années car certaines populations présentent des forts biais de sex-ratio (monogénie), souvent en faveur des femelles (thélygénie), qui trahissaient une altération de la détermination ou de la différenciation sexuelle. Ces biais sont restés longtemps inexpliqués, jusqu'à ce que l'agent responsable soit identifié : la bactérie endosymbiotique féminisante Wolbachia. Associé à ce phénomène de monogénie, un nombre anormal d'individus présentait un phénotype dit intersexué car possédant des caractères mâles et femelles. En fait, tout un spectre de phénotypes a pu être observé, allant du mâle à la femelle, en passant dans l'ordre par l'intersexué mâle (iM), le gynandromorphe (♀) et l'intersexué femelle (iF) (Legrand and Juchault, 1969a). Les iM sont stériles, présentant des gonades mâles avec des GA hypertrophiées et des oviductes, donc des ouvertures génitales femelles (Legrand and Juchault, 1963) (Fig. I.9). Les iF sont généralement fertiles, présentant des ovaires et des appendices copulateurs mâles réduits (Juchault and Legrand, 1964d) (Fig. I.9). Les études se sont donc concentrées sur ces lignées, dites thélygènes, qui présentent manifestement des altérations de la voie de différenciation sexuelle. Des expériences de greffes et de croisements ont révélé l'existence d'un "agent féminisant" ou "facteur épigénétique féminisant", probablement cytoplasmique car principalement transmis verticalement par la mère (Legrand and Juchault, 1969b; Juchault and Legrand, 1981). Celui-ci peut également être transmis horizontalement par implantation de n'importe quel organe venant d'une femelle ou d'un intersexué de cette lignée thélygène, comme un "agent infectieux". Il induit alors à son tour la thélygénie dans la descendance des femelles normales greffées et des phénotypes intersexués chez les mâles greffés (Juchault and Legrand, 1964d, 1968, 1970; Legrand and Juchault, 1969b, 1969a, 1970; Juchault et al., 1974; Rigaud and Juchault, 1995). Ces expériences, complétées par des études tissulaires en microscopie électronique, ont permis de montrer que l'agent en question est un "micro-organisme intracytoplasmique d'allure bactérienne" ou "bactéroïde", dont la taille varie entre 0,4 µm et 1,3 µm et qui s'observe dans des vacuoles au sein des cellules (Martin et al., 1973). D'abord désignée "F", assimilée aux Chlamydiales (Legrand and Juchault, 1986) puis aux Rickettsiales (Martin et al., 1989), l'assignation de cette bactérie endosymbiotique au genre Wolbachia a été pressentie en 1991 sur la base d'observations microscopiques (Rigaud et al., 1991b) et démontrée l'année suivante par des phylogénies moléculaires (Rousset et al., 1992). Cette bactérie est en fait largement répandue chez les arthropodes dont 40% des espèces pourraient être infectées (Zug and Hammerstein, 2012), jusqu'à 47% des Crustacés Isopodes et 61% des cloportes (Bouchon et al., 2008). Chez A. vulgare, trois souches de Wolbachia qui diffèrent par leur prévalence et leur virulence ont été identifiées (wVulC, wVulM et wVulP) (Cordaux et al., 2004; Verne et al., 2007; Valette et al., 2013). Dans cette espèce, Wolbachia est présente chez les femelles seulement, aussi bien dans les ovaires (d'où sa

transmission verticale) que dans les tissus digestifs, nerveux et dans l'hémolymphe (d'où sa transmission horizontale occasionnelle (Rigaud and Juchault, 1995; Cordaux et al., 2001; Dittmer et al., 2014). N'étant transmis verticalement que par les femelles, différents mécanismes associés à cette symbiose parasitaire ont été sélectionnés car ils favorisent les femelles infectées et optimisent ainsi la transmission du symbiote (Werren et al., 2008; Cordaux et al., 2011). Les quatre effets majeurs induits par la présence de *Wolbachia* sur son hôte sont résumés dans l'encadré 2. À l'instar des champignons parasites de type microsporidies infectant des Amphipodes (Kelly et al., 2002; Haine et al., 2004) et de façon encore différente des sacculines (parasites Rhizocéphales) castrant des Décapodes (Delage, 1884; Giard, 1886, 1887, 1888; Reverberi, 1942; Reinhard, 1956; Kristensen et al., 2012), certaines souches de Wolbachia sont à l'origine d'un phénomène de féminisation de l'hôte (Juchault et al., 1994; Martin et al., 1994; Bouchon et al., 1998; Cordaux et al., 2004). Par un mécanisme encore inconnu, la bactérie altère la différenciation sexuelle des juvéniles génétiquement mâles qui se différencient alors en femelles phénotypiques fonctionnelles, expliquant la thélygénie. Suite au séquençage de plusieurs souches de *Wolbachia* (Wu et al., 2004; Fenn and Blaxter, 2006), dont celles infectant plusieurs Isopodes terrestres (P. Grève, communication personnelle), il a été suggéré que des facteurs de virulence pourraient être libérés par la bactérie grâce à des systèmes de sécrétion de type I ou de type IV, vraisemblablement fonctionnels chez cette bactérie. Des féminisations imparfaites, possiblement liées à une charge bactérienne insuffisante (Rigaud and Juchault, 1998), produisent cependant la large gamme de phénotypes intersexués présentés précédemment. La transmission de *Wolbachia* à la descendance n'est en effet pas totale. Elle est par exemple estimée à 88% chez Oniscus asellus (Rigaud et al., 1999), 82% pour wVulC, 73% pour wVulM (Cordaux et al., 2004), jusqu'à 87,6% selon (Genty et al., 2014) et ~90% selon (Cordaux et al., 2011) pour wVulC. Le succès de transmission du symbiote et de féminisation de l'hôte est notamment dépendant de la température (Juchault and Mocquard, 1988; Rigaud and Juchault, 1989; Rigaud et al., 1991a, 1997a), comme d'ailleurs celui des microsporidies féminisantes d'Amphipodes (Ginsburger-Vogel and Magniette-Mergault, 1981).



Figure I.9 : Gonades d'*Armadillidium vulgare* intersexué de type gynandromorphe. Celle de gauche présente une structure typique d'un intersexué mâle (iM) et celle de droite la structure d'un intersexué femelle (iF). G.a.a. glande androgène anormale, Spc spermatocyte, Spd spermatide, Spz spermatozoïde, C.g. cellule glandulaire, Ovc ovocytes, Ovd oviducte, V.s. vésicule séminale. C.d. canal déférent. Th2-3-4 tractus des 2ème, 3ème et 4ème segments thoraciques (Legrand and Juchault, 1986).
# Encadré n°2 - les conséquences de la symbiose à Wolbachia

Wolbachia est une alpha-protéobactérie endosymbiotique de très nombreux taxons d'arthropodes et de nématodes filaires (Taylor et al., 2005; Werren et al., 2008). Bien que la symbiose puisse être mutualiste chez les nématodes (e.g. souche wBm infectant Brugia malayi) et quelques souches d'arthropodes (e.g. souche wCle infectant Cimex lectularius (Hosokawa et al., 2010)), Wolbachia est surtout connue pour être un parasite de la reproduction au sein de la majorité des arthropodes. On distingue classiquement quatre types d'effets sur l'hôte induits par sa présence, ayant tous pour conséquence de favoriser sa transmission dans les populations (Fig. E2). Tout d'abord, la bactérie peut induire la mort des embryons mâles (*male killing*), comme le fait par exemple la souche wBol1 chez le papillon Hypolimnas bolina. Les femelles survivantes auraient alors plus de nourriture et donc une valeur sélective supérieure. Certaines souches, comme wUni chez la guêpe *Muscidifurax uniraptor*, induisent plutôt de la parthénogenèse thélytoque (les œufs non fécondés donnent des femelles par diploïdisation). D'autres encore, telles que *w*Vul chez le cloporte *A. vulgare*, provoquent la féminisation des mâles génétiques, qui se différencient au cours du développement en femelles fonctionnelles. En dehors des Crustacés Isopodes, des souches féminisantes n'ont été décrites que chez deux espèces d'insectes, le lépidoptère Eurema hecabe (Hiroki et al., 2002) et l'hémiptère Zyginidia pullula (Negri et al., 2006). Dans les trois cas précédents, les populations infectées présentent des biais de sex ratio en faveur des femelles. Une dernière catégorie de parasitisme, l'incompatibilité cytoplasmique (IC), est très répandue chez les insectes et peut être induite par certaines souches de Wolbachia (par exemple wPip chez le moustique Culex pipiens). Seules trois souches de Wolbachia induisant de l'IC ont été caractérisées chez les cloportes (wPet, wDil et wCon) (Legrand et al., 1978; Moret et al., 2001; Sicard et al., 2014). Dans ce cas de figure, la reproduction d'un mâle infecté n'est possible gu'avec une femelle également infectée par la même souche, ce qui diminue la valeur sélective de celles qui ne le sont pas ou qui sont infectées par une souche différente. Le *sex ratio* n'est en revanche pas biaisé. La phylogénie de Wolbachia comporte 13 supergroupes (A à F et H à N) (Augustinos et al., 2011). Les souches de bactéries infectant les Isopodes terrestres appartiennent toutes au super-groupe B de Wolbachia, qu'elles soient à l'origine de féminisation ou d'IC, et ne se regroupent pas en fonction de leurs effets sur l'hôte (Rousset et al., 1993; Bouchon et al., 1998; Cordaux et al., 2001, 2012).



<u>Figure E2</u> : Effets associés à la symbiose à *Wolbachia* chez les arthropodes et nématodes (adapté de (Werren et al., 2008)). Les mécanismes illustrés sont la parthénogenèse thélytoque, le "*male killing*", l'incompatibilité cytoplasmique et la féminisation. La phylogénie montre les relations entre les principaux super-groupes de *Wolbachia*. En haut à gauche, microscopie électronique à transmission de deux bactéries d'*Armadillidium vulgare* (wVulC).

Une conséquence notable de la thermosensibilité de la bactérie est le changement de déterminisme sexuel de son hôte qui passe de génétique à environnemental, dépendant ici de la température (souvent appelé TSD, *temperature-dependent sex determination*). Ce déterminisme est indirect, les mâles génétiques infectés se différenciant en mâle ou en femelle selon que la température permette ou pas la transmission du symbiote via l'ovocyte (Juchault and Mocquard, 1988; Rigaud and Juchault, 1989) ou l'action du symbiote au cours du développent (Rigaud et al., 1991a, 1997a). Ce système pourrait d'ailleurs expliquer le maintien d'un nombre suffisant de mâles pour la survie des populations infectées, en particulier dans certains contextes (composts (Rigaud et al., 1997a), régions méridionales (Rigaud and Juchault, 1989)). Outre la thermosensibilité du *sex* 

*ratio*, les *Wolbachia* d'Isopodes ont eu un autre effet majeur sur l'évolution du système de détermination du sexe. Les différentes expériences de croisements ainsi que les tests d'inactivation par la température ont révélé en effet que les populations infectées ne contiennent souvent que des mâles génétiques (ZZ) (Legrand, 1977; Juchault et al., 1980; Rigaud et al., 1990). Il en a été déduit que ces populations ont une forte tendance à "perdre" le chromosome W caractéristique de l'hétérogamétie femelle, de fait de la concurrence des femelles ZW avec les néo-femelles  $ZZ_{Wo+}$  (Fig. I.10). En cas de perte effective, le déterminisme du sexe du cloporte devient alors purement cytoplasmique dans ces populations (CSD, *cytoplasmic sex determination*), dépendant uniquement de la présence ou de l'absence de la bactérie (mâles ZZ, femelles  $ZZ_{Wo+}$ ) (Rigaud, 1997).



<u>Figure I.10</u> : Diagramme illustrant l'évolution du déterminisme du sexe chez *Armadillidium vulgare* (Rigaud et al., 1997b). Sous l'effet du symbiote intracytoplasmique *Wolbachia*, le déterminisme tend à devenir cytoplasmique mais peut redevenir nucléaire après intégration d'ADN bactérien (élément f) dans le génome de l'hôte. Le nouveau chromosome sexuel peut ensuite subir à nouveau ce cycle.

Par ailleurs, des populations monogènes existent aussi en l'absence de Wolbachia. Un second facteur féminisant, appelé "f", a donc été envisagé (Legrand and Juchault, 1984). Lorsque sa transmission est effective, l'élément f est en effet également responsable de thélvgénie. Néanmoins, étant plus labile que Wolbachia, il est aussi fréquemment responsable d'arrhénogénie lorsqu'il n'est pas transmis (ZZxZZ<sub>f</sub> donnant plus de ZZ que de ZZ<sub>f</sub> dans la descendance). À l'instar de la bactérie, cet élément f est transmissible maternellement et il est aussi thermosensible (Juchault and Legrand, 1986). En revanche, il n'est pas transmissible horizontalement et son effet peut être contré par une greffe de GA (Legrand and Juchault, 1984). Les premières hypothèses quant à sa nature ont concerné des virus de bactéries ou une partie d'ADN bactérien intégré plus ou moins stablement dans le génome de l'hôte (e.g. plasmide, élément transposable) (Legrand and Juchault, 1984; Juchault et al., 1992; Rigaud et al., 1992; Juchault and Mocquard, 1993). Le chromosome impacté (Z<sub>f</sub>) devient *de facto* un nouveau chromosome sexuel analogue du chromosome W (mâles ZZ et femelles ZZ<sub>f</sub>) (Juchault and Mocquard, 1993; Rigaud et al., 1997b). Plus récemment, les nouvelles technologies de séquençage ont permis de confirmer ces hypothèses chez A. vulgare et de démontrer ainsi l'insertion dans un chromosome d'une femelle ZZf d'ADN génomique ayant Wolbachia pour origine (Leclercq et al., 2016). Cet insert, aujourd'hui estimé à environ 3 Mb, correspond à une insertion d'au moins 83% du génome de la bactérie ayant depuis subi de nombreuses duplications de gènes. La faible divergence entre l'élément f et le génome de Wolbachia suggère cependant une intégration récente. L'existence de cette intégration est particulièrement intéressante car elle permet d'étudier le mécanisme de féminisation de Wolbachia et les gènes sous-jacents indirectement, dans un contexte eucaryote (par ARNi par exemple). De plus, grâce à la comparaison des génomes de Wolbachia de cloportes féminisantes (wVulC) et non féminisante (wCon, induisant de l'IC chez C. convexus), 216 gènes candidats pour provoquer la féminisation ont été récemment trouvés (Badawi et al., 2018). Parmi eux, 35 sont exprimés différentiellement au cours du développement de l'hôte et 27 sont retrouvés dans l'élément f. Ils constituent des cibles privilégiées pour les futures études sur la féminisation par Wolbachia.

De façon remarquable, grâce aux lignées infectées par *Wolbachia* et en particulier l'existence de ces intersexués, les expériences historiques ont permis de poser les premières briques d'un modèle de voie de signalisation de l'HA avant même que tous ses acteurs soient connus. Premièrement, contrairement à ce qui a été observé sur les lignées non infectées (dites amphogènes), la greffe de GA dans un iM ou une femelle infectés ne permet pas leur masculinisation (même externe) (Legrand and Juchault, 1963; Juchault and Legrand, 1964d; Legrand and Juchault, 1969a). De plus, la synthèse de vitellogénine, issue des adipocytes (Suzuki et

al., 1989), a pu être observée chez les iM alors que le processus est normalement inhibé par l'HA (Souty-Grosset and Juchault, 1987; Suzuki et al., 1990). Il a par ailleurs été confirmé que la greffe d'une GA d'iM est susceptible de masculiniser une femelle génétique (Legrand and Juchault, 1963; Juchault and Legrand, 1964d), tout comme un extrait d'hémolymphe des iM qui contient donc bien de l'HA active (Juchault and Legrand, 1985). Ceci traduit donc un état "réfractaire" de l'hôte à l'HA induit par la présence de *Wolbachia*, état réfractaire d'ailleurs non retrouvé dans la lignée "f" qui reste, elle, masculinisable. L'implication de la bactérie dans cet état a de plus été confirmée grâce à sa thermosensibilité : en inactivant le symbiote par la chaleur, une masculinisation des néo-femelles impubères (présentant encore les ébauches de GA) et de façon plus prononcée des iF (présentant des vestiges de GA même à l'âge adulte) peut être obtenue, aboutissant généralement sur des phénotypes intersexués de type iM (Legrand, 1956b; Juchault et al., 1980; Rigaud and Juchault, 1989, 1998). Ceci montre donc que les ébauches et vestiges de GA sont bien potentiellement masculinisants mais que la bactérie inhibe ce potentiel. Parallèlement, la hausse de la température a un effet similaire sur les intersexués de la lignée thélygène d'Amphipodes (Ginsburger-Vogel, 1975). Ainsi, dès 1985, l'hypothèse d'une inactivation des récepteurs à l'HA induite par Wolbachia a été avancée, 30 ans avant l'identification desdits récepteurs (Juchault and Legrand, 1985). Cependant, l'effet sur ces récepteurs est possiblement indirect. En effet, une greffe de protocérébron ou d'un ganglion de chaîne nerveuse de mâle dans un iM permet de relancer la masculinisation externe (Juchault and Legrand, 1968, 1974). Il semble donc que le système nerveux central ait pour effet de rendre ces animaux infectés à nouveau compétents à l'HA. L'état réfractaire revient néanmoins dans un second temps, une fois le greffon colonisé par la bactérie. Il a donc été supposé qu'il existe une "neurosécrétion androstimulante" qui potentialise l'action androgénique de l'HA et qui pourrait réguler le nombre ou le fonctionnement de ses récepteurs (Legrand and Juchault, 1986). Cette neurosécrétion pourrait aussi être une des cibles des Wolbachia féminisantes. L'étude des sacculines chez les crabes a d'ailleurs révélé que les différents centres neurosécréteurs sont la cible du parasite féminisant (Rubiliani and Payen, 1979), le contact entre ce dernier et les GA étant facultatif (Rubiliani-Durozoi et al., 1980).

## VIII. Des peptides plein la tête

Le système nerveux central des Crustacés, entre autres arthropodes, est réputé pour produire des peptides variés, connus sous le terme de neuropeptides. Ils contrôlent de très nombreuses fonctions et sont maintenant classés en deux familles. Les chromatophorotropines (la RPCH et la PDH : Red Pigment Concentrating Hormone et Pigment Dispersing Hormone) permettent de contrôler la coloration. La famille des CHH (Crustacean Hyperglycemic Hormone) inclut des neuropeptides permettant notamment de réguler la glycémie (via la CHH sensu stricto (Kegel et al., 1989; Fanjul-Moles, 2006)) et une sous-famille de neuropeptides régulant notamment la mue via la MIH (Molt Inhibiting Hormone) (Webster and Keller, 1986), la synthèse de méthylfarnésoate via la MOIH (Mandibular Organ Inhibiting Hormone) (Wainwright et al., 1996) et la fonction sexuelle via la GIH (Gonad Inhibiting Hormone) (Adivodi and Adivodi, 1970; Lacombe et al., 1999; Chan et al., 2003). Comme évoqué précédemment au sujet de Wolbachia, les neurosécrétions semblent en effet impliquées dans la physiologie sexuelle chez les Malacostracés (Legrand et al., 1982). Premièrement, de multiples approches ont montré que la partie médiane du protocérébron des Isopodes ainsi que l'organe X contenu dans le pédoncule oculaire des Décapodes produisent un neuropeptide régulant la croissance de la GA. La destruction chez les mâles de ces organes, a priori homologues, chez les Isopodes (Juchault et al., 1965; Reidenbach, 1966, 1971) comme chez les Décapodes (Demeusy and Veillet, 1958; Babon, 1959; Otsu, 1963; Meusy, 1965; Hoffman, 1968; Rangneker et al., 1971; Touir, 1973; Kracht, 1978; Sarojini and Gyananath, 1985; Khalaila et al., 2002; Srovrava et al., 2010) et un Euphausiacé (Le Roux, 1973) provoque en effet une hypertrophie des GA, par hypertrophie et hyperplasie de ses cellules, et parfois une hypertrophie du reste de la gonade, dont le bon fonctionnement semble variable selon les études. La conséquence en terme de surproduction de l'HA, par surexpression et/ou hypersécrétion, a parfois été remise en cause (Meusy, 1965) mais est néanmoins étoffée par les observations cytologiques (Malo, 1970b), par l'effet sur l'accroissement des appendices copulateurs (Legrand et al., 1968) et plus récemment par le profil polypeptidique de ces GA (Khalaila et al., 2002). L'ablation du protocérébron provoque de plus une accélération de la différenciation sexuelle des mâles (Juchault et al., 1965; Reidenbach, 1966; Demeusy, 1967; Legrand et al., 1968) et une hypertrophie des GA d'autant plus importante que l'ablation est précoce (Payen et al., 1971), suggérant que ce centre exerce une inhibition du développement de la gonade et de la différenciation sexuelle chez les animaux immatures. L'hypertrophie des GA post-ablation peut en outre être contrée par une greffe de protocérébron/lobe optique (mâle comme femelle) et une GA hypertrophiée peut même redevenir normale si elle est greffée dans un mâle ou une femelle de la même espèce (Juchault and Legrand, 1967; Legrand et al., 1968). Ces deux expériences prouvent l'existence d'un agent neurohumoral régulant de façon réversible la croissance de la GA. Une hypertrophie similaire des GA est par ailleurs observée chez le crabe lorsque qu'une sacculine infecte les régions neurosécrétrices (Rubiliani-Durozoi et al., 1980), de la même façon que chez les intersexués iM à *Wolbachia* chez *A. vulgare*. Ces résultats sont de plus cohérents avec l'hypertrophie des GA greffées de manière hétérospécifique, ce qui suggérait la perte d'une régulation de sa croissance lors de la transplantation dans une espèce différente (Juchault and Legrand, 1978). Comme chez les animaux au protocérébron lésé, il est aussi possible d'empêcher la dérégulation de la taille du greffon en milieu hétérospécifique en y associant une greffe de protocérébron de la même espèce (Juchault and Legrand, 1978). Du fait de son action inhibitrice, ce neuropeptide régulateur fut nommé AIH, pour *Androgenic Inhibiting Hormone* (Legrand et al., 1982).

Chez les femelles, la même région du système nerveux permet la régulation de la croissance et la maturation de l'ovaire chez les Décapodes (Panouse, 1943; Demeusy and Veillet, 1952; Otsu, 1963; Gomez, 1965; Bomirski and Klek, 1974) comme les Isopodes (Reidenbach, 1965; Besse, 1968; Besse et al., 1969), et plus particulièrement de réguler la vitellogenèse (Gohar, 1984). Le neuropeptide impliqué a donc été nommé VIH pour Vitellogenesis Inhibiting Hormone. De manière intéressante, l'effet de l'ablation du protocérébron/pédoncule oculaire d'une femelle peut être compensé par la greffe ou l'injection d'un extrait de ces organes provenant aussi bien de femelles que de mâles (Otsu, 1963; Besse, 1968; Besse et al., 1969; Bomirski et al., 1981). De plus, l'effet inhibiteur de la VIH est bien corrélé à l'état sexuel des femelles, comme le montrent les greffes de protocérébrons issus de femelles à différents stades du cycle ovarien (Besse, 1971). Enfin, des expériences de greffes de GA chez des femelles en vitellogenèse ou hors-vitellogenèse ont montré que ces GA ont moins ou pas d'effet masculinisant sur les femelles hors-vitellogenèse, suggérant que la VIH inhibe aussi bien la maturation de l'ovaire que la croissance de la GA (Juchault, 1977; Raimond and Juchault, 1983). De fait, l'identification subséquente de la VIH à partir de glandes de sinus des deux sexes, d'abord chez le homard (Soyez et al., 1987, 1991) puis en 1999 chez A. vulgare (Grève et al., 1999), a permis de démontrer qu'il s'agit d'un seul et même neuropeptide appartenant à la famille des CHH, de 77 aa et 83 aa (~9 kDa) respectivement. Inhibant la fonction sexuelle des deux sexes, celui-ci a finalement été appelé la GIH (Charmantier et al., 1997). Plus spécifiquement chez les mâles, il a été montré que l'inhibition par ARNi de la GIH entraîne une surexpression de l'HA équivalente à celle obtenue par ablation du protocérébron, confirmant sa fonction androinhibitrice (F. Li et al., 2015b). Après synthèse, ce neuropeptide est stocké dans la glande du sinus (Azzouna et al., 2003), comme suggéré historiquement par son ablation (Panouse, 1944) et ultérieurement par bioessais sur extrait purifié de cette glande (Soyez et al., 1982, 1987). Chez les Décapodes, on regroupe ainsi souvent les deux organes dans un système organe X (XO) - glande du sinus (SG), dit "XO/SG", responsable de la production et de la sécrétion des différents neuropeptides. Ce complexe s'intègre plus largement dans un axe endocrinien descendant "XO-SG-GA-Testicule", qui régule en cascade tout le fonctionnement de l'appareil reproducteur (Khalaila et al., 2002). Ce type d'axe est d'ailleurs analogue à celui existant chez les Vertébrés, où la fonction sexuelle est régulée par un axe gonadotrope hypothalamo-hypophysaire ("*Hypothalamic-pituitary-gonadal axis*" en anglais, ou "*HPG axis*").

De manière très intéressante, l'extinction de l'expression de l'HA chez *M. rosenbergii* provoque aussi l'hypertrophie des GA et suggère l'existence d'une boucle de rétrocontrôle sur la quantité d'HA circulante (Ventura et al., 2009). Deux hypothèses ont alors été avancées : soit l'existence d'un rétrocontrôle négatif directement dû à Mr-IAG par voie autrocrine sur la GA, soit l'existence d'un rétrocontrôle impliquant la GIH. Dans ce dernier cas, l'axe descendant "XO-SG-GA-Testicule" que nous avons décrit s'inscrit alors dans une longue boucle de rétrocontrôle : en cas de déficit en HA, la GIH serait également moins produite ou libérée, entraînant dès lors une levée d'inhibition de la croissance des GA, ce qui corrige la concentration en HA relevée au niveau du centre nerveux. La Fig. I.11 résume ces deux boucles, transposées sur un modèle Isopode dans l'état actuel des connaissances sur la voie de signalisation de l'HA.



Par ailleurs, des greffes de cerveau ou de ganglions thoraciques permettent de stimuler la croissance des gonades (mâles comme femelles) chez plusieurs Décapodes, évoquant la présence d'une autre neurosécrétion gonado-stimulante (Otsu, 1963; Gomez, 1965; Hasegawa et al., 1993). Comme mentionné précédemment, des expériences de greffes similaires ont permis, chez les Isopodes, de remasculiniser un iM, pourtant réfractaire à l'HA (Juchault and Legrand, 1968, 1974). Ceci suggère également qu'une neurosécrétion (autre que la GIH) serait produite par tout le système nerveux, régulant non pas la croissance mais le fonctionnement de la GA. Ce neuropeptide, appelé GSH (Gonad Stimulating Hormone) chez plusieurs espèces de Décapodes, n'a jamais pu être caractérisé chimiquement ou génétiquement (Fingerman, 1995; Sagi et al., 1997). De manière plus générale, de nombreuses études ont montré des régulations négatives assurées par les différents neuropeptides des Malacostracés mais l'identité de la ou des neurosécrétion(s) gonado-stimulante(s) (GSF au sens large, pour Gonad Stimulating Factors) est elle moins claire (Rotllant et al., 2018). L'attribution d'une fonction unique à chaque neuropeptide est de plus difficile à établir, le système apparaissant pléiotrope et redondant. Par exemple, la MIH et la RPCH sont également possiblement impliquées chez les femelles dans la vitellogenèse et la maturation ovarienne (Rotllant et al., 2018), tandis que l'inhibition chez les mâles de la MIH provoque une hausse de l'expression de l'HA similaire à celle induite par inhibition de la GIH (F. Li et al., 2015b). Enfin, il n'est pas à exclure que le fonctionnement du système neuroendocrinien soit très dépendant des espèces, rendant difficile la synthèse des analyses sur le sujet. Même au sein des Isopodes, des modèles différents ont été proposés selon les résultats issus alternativement d'expériences sur Anilocra physodes, Ligia oceanica, P. dilatatus ou encore A. vulgare (Legrand and Juchault, 1972).

<u>Figure I.11</u> : Modèle représentant les deux boucles de rétrocontrôle proposées pour la régulation de la quantité d'HA circulante. L'HA (en magenta) est produite par les GA, serait transportée par l'IGFBP-rP1 jusqu'aux récepteurs transmembranaires de type IR. La petite boucle correspond à un contrôle de la taille des GA par l'HA elle-même, de façon autocrine (A.). La grande boucle implique le protocérébron, où la voie de signalisation de l'HA pourrait provoquer la production ou la libération de la GIH, qui régule alors négativement la taille des GA (B.).

## IX. L'Isopode, un animal très perturbé

A l'heure actuelle, on observe une prise de conscience croissante quant aux conséquences possibles des différentes molécules d'origine anthropique sur la santé humaine et le bon fonctionnement des écosystèmes. Une partie de ces molécules, appelées perturbateurs endocriniens (PE), sont particulièrement surveillés pour l'impact qu'ils peuvent avoir sur les systèmes endocriniens et donc sur la santé de l'Homme et de la faune sauvage (Colborn et al., 1993; Damstra et al., 2002; Euling and Sonawane, 2005). Ces PE sont variés, provenant entre autres de l'industrie pharmaceutique (médicaments, notamment les hormones synthétiques), agroalimentaire (e.g. pesticides, peintures antifouling) ou encore de l'industrie des matériaux (notamment plastiques). Ces molécules pourraient avoir un spectre de conséquences large (maladies développementales, métaboliques, immunitaires, cancers, etc.) mais leur prévalence et leurs modes d'actions sont encore assez peu connus malgré un nombre d'études croissant à leur sujet. En effet, du fait de leur nature (actifs même faiblement concentrés (Welshons et al., 2003), dispersés et mélangés dans l'environnement), leur étude est difficile et le lien avec les perturbations endocriniennes n'est pas facile à établir. Néanmoins, différentes études ont aujourd'hui montré que les PE peuvent altérer les voies de signalisation cellulaires en jouant un rôle d'agoniste ou d'antagonistes auprès des récepteurs, membranaires comme nucléaires, d'une ou plusieurs de ces voies en même temps (Damstra et al., 2002; Brander, 2013; Kiyama and Wada-Kiyama, 2015). Dans le premier cas, une réponse cellulaire est déclenchée ou amplifiée par le PE agoniste, tandis que dans le second cas les antagonistes empêchent au contraire le fonctionnement des récepteurs. Les PE peuvent également altérer la biodisponibilité des hormones en perturbant leurs protéines de transport (Hampl et al., 2016).

La différenciation sexuelle et le bon fonctionnement du système reproducteur, étant particulièrement dépendants d'un système d'hormones, peuvent être dérégulés par ces PE. Ces dérèglements affectent alors directement la valeur sélective des êtres vivants impactés, aussi bien chez l'Homme (Kabir et al., 2015; Sweeney et al., 2015) que chez la faune sauvage (Damstra et al., 2002). Un premier indice de ces perturbations apparaît sous la forme de biais de *sex ratios* dans les populations (Van Larebeke et al., 2008), souvent en faveur des femelles, la différenciation sexuelle mâle étant généralement plus dépendante d'un ensemble précis d'hormones (Sharpe, 2006). De tels biais ont par exemple été observés chez l'Homme après une exposition à du PCB (polychlorobiphényle) (Weisskopf et al., 2003) et chez de nombreux animaux comme les amphibiens exposés à l'EE2 (éthinylestradiol) (Pettersson and Berg, 2007) ou les goélands exposés à des composés organochlorés (Fry et al., 1987). Ces biais peuvent être expliqués par des

perturbations de la différenciation sexuelle mâle (féminisation) ou indirectement par une mortalité accrue des mâles. Des preuves de féminisations dues aux PE existent bien, *in natura* et en laboratoire. L'exposition à l'atrazine (composant de pesticides) ou à l'EE2 chez différents amphibiens provoque ainsi une féminisation partielle (intersexués) à totale (Hayes et al., 2010; Tamschick et al., 2016). Au contraire, l'exposition à des PE peut conduire à une masculinisation des êtres affectés, comme en témoigne l'apparition de pénis chez des femelles ours polaires vivant dans des régions polluées par du PCB ainsi que l'apparition de pénis (*imposex*) et d'intersexués chez différents mollusques femelles touchés par le TBT (tributylétain des peintures *antifouling*) (Bryan et al., 1986; Smith and McVeagh, 1991; Matthiessen and Gibbs, 1998).

Parmi les molécules suspectées de perturber la différenciation sexuelle mâle, le 4,4'dihydroxy-2,2-diphénylpropane, ou plus simplement bisphénol A (BPA), est particulièrement surveillé pour son rôle de xénoestrogène (Euling and Sonawane, 2005; Welshons et al., 2006; Aschberger et al., 2010; Erler and Novak, 2010). Ses effets potentiels sur l'Homme ont eu pour conséquence son interdiction en France depuis le 1er janvier 2015 mais le BPA impacterait également la faune sauvage, Vertébrés comme invertébrés (Kang et al., 2007). Chez les Crustacés exposés au BPA, une partie des effets caractéristiques des PE sont observés, avec notamment un impact sur la reproduction ou la différenciation sexuelle. Il peut notamment moduler les concentrations en œstrogènes et testostérone chez le gammare (Lewis et al., 2012). Chez les copépodes, le BPA stimulerait en effet la maturation ovarienne (Andersen et al., 1999) mais pourrait aussi retarder la maturation sexuelle (Marcial et al., 2003). Chez l'aselle, un Isopode aquatique, la fréquence de mue est diminuée par l'exposition au BPA, ainsi que la croissance et la prise alimentaire (Plahuta et al., 2015). L'intermue est également rallongée chez la daphnie à cause du BPA (Mu et al., 2005). Au contraire, chez le cloporte *P. scaber*, le BPA accélère la mue, entraîne un biais du sex ratio en faveur des femelles et augmente la concentration en ecdystéroïdes ainsi que la fréquence d'avortements (Lemos et al., 2009, 2010a, 2010b, 2010c).

Les effets des PE, dont le BPA, sur le *sex ratio* ne sont pas sans rappeler ceux induits par *Wolbachia* chez les Isopodes. En élargissant le concept initial, les bactéries féminisantes du cloporte pourraient ainsi être assimilées à une catégorie de PE au sens large, endogènes de l'hôte, qui s'opposerait alors aux PE exogènes plus classiques. Il serait donc pertinent de comprendre les mécanismes d'action de ces PE afin de savoir si les effets délétères sur l'hôte sont "convergents" (hypothèse "mille et une façons de perturber le cloporte mâle") ou si ces différents perturbateurs ont des cibles communes. L'existence de cibles multiples est d'ailleurs à envisager.

Par ailleurs, cette sensibilité des cloportes pourrait également les rendre intéressants dans le cadre d'études d'écotoxicologie. En effet, l'ordre des Isopodes comprend une grande diversité d'espèces, présentes dans la plupart des niches écologiques (animaux marins, dulcicoles, terrestres, endogés, de l'océan Antarctique au désert du Sahara), où ils ont souvent une grande importance dans les écosystèmes en tant qu'organismes décomposeurs (Mocquard et al., 1987; Jambu et al., 1988). Mais, vivant généralement dans la litière ou les sédiments, ils sont très exposés aux PE exogènes, ce qui permet d'envisager leur utilisation comme bio-indicateurs des niveaux de pollution environnementale. Différents essais sont en cours chez des cladocères, copépodes, Décapodes et Amphipodes mais l'identification de biomarqueurs fiables de perturbation endocrinienne reste un préalable à cette application (Jubeaux et al., 2012b; Lafontaine et al., 2017; Song et al., 2017). Par exemple, la vitellogénine, longtemps pressentie comme un candidat idéal chez les Crustacés, serait finalement inadéquate (Jubeaux et al., 2012a; Boulangé-Lecomte et al., 2017).

# X. Objectifs et questions

Comprendre l'impact des PE, exogènes comme endogènes, requiert une vision globale du système endocrinien impacté. En contre-partie, leurs effets délétères apportent aussi des informations sur le fonctionnement de ces systèmes endocriniens. Les études basées sur une approche physiologique et "toxicologique" se répondent donc et se complètent. Dès lors, l'objectif de ma thèse est à la fois de clarifier le schéma d'action de l'HA, responsable de la différenciation sexuelle mâle des Malacostracés, ainsi que de comprendre comment ce schéma peut être altéré, que ce soit par un parasite ou un contaminant.

Pour ce faire, il s'agit dans un premier temps de préciser quels sont les acteurs putatifs en jeu dans la différenciation sexuelle mâle. L'HA et la GIH sont certes bien connues chez le modèle Isopode, mais pas les récepteurs de l'HA (circulants comme membranaires). M'appuyant sur les récentes découvertes faites sur les modèles de Décapodes, je me concentrerai sur l'identification et la caractérisation de ces récepteurs : combien de gènes sont impliqués ? Quelles sont leurs structures ? Des outils de biologie moléculaire, complétés par une approche transcriptomique, permettront de répondre à ces questions.

Une fois décrits, ces acteurs feront l'objet d'analyses évolutives à différents niveaux : quelle est leur histoire évolutive à l'échelle des Métazoaires, des Crustacés et des Isopodes ? Y a-t-il eu des duplications de gènes ? Des recombinaisons ? Des convergences ? Peut-on détecter des traces de sélection naturelle ?

Des analyses d'expressions spatiale et temporelle de ces acteurs chez notre espèce modèle, *A. vulgare*, permettront ensuite d'envisager leurs fonctions biologiques : y a-t-il des expressions

spécifiques de certains organes ou de certains stades de développement ? Le cas échéant, cette spécificité serait un premier indice de leur implication dans la physiologie de l'organe ou du processus développemental concerné. Cette question sera dans un premier temps abordée au niveau de la transcription des gènes.

Enfin, les différentes analyses seront menées en comparant une lignée amphogène (sans *Wolbachia*) et thélygène (infectée par *Wolbachia*) afin de détecter d'éventuels effets de *Wolbachia* sur les partenaires de l'HA. Ceci sera complété par des expériences de transinfection par *Wolbachia* et d'ARNi ciblé sur les récepteurs qui chercheront à altérer expérimentalement la voie de signalisation de l'HA afin de déceler les interactions en son sein. Enfin, un test toxicologique de contamination au BPA visera à reproduire les résultats de la littérature et à comparer l'impact des perturbations endogènes et exogènes : peut-on observer chez notre espèce modèle des impacts du BPA sur le *sex ratio* ou sur l'expression des gènes de la différenciation mâle ? Peut-on et comment altérer, voire inverser, le sexe d'un Isopode par un de ces perturbateurs ?

Ces différents objectifs devraient permettre d'avoir une meilleure compréhension du processus développemental original de la différenciation sexuelle chez les Malacostracés dont font partie les cloportes. Ils devraient aussi apporter une meilleure appréciation des différentes perturbations naturelles ou anthropiques susceptibles de les affecter. Plus largement, ces résultats affineront également notre vision de l'évolution d'une voie de signalisation cruciale et largement conservée à l'échelle du vivant, celle des hormones de type "insuline".

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## I. Expériences de perturbations endocriniennes

#### A. Expérience de transinfection par Wolbachia

Le symbiote *Wolbachia*, principalement transmis verticalement, peut aussi se transmettre horizontalement, de façon naturelle ou expérimentale. Pour ce faire, il suffit de disséquer cinq femelles infectées par la bactérie et de réaliser un extrait de leurs ovaires (organes riches en symbiotes) en les broyant dans 500 µL de Ringer avec un homogénéiseur de Dounce de 2 mL (piston B) et en filtrant à 1,2 µm (d'après (Rigaud and Juchault, 1995)). Les animaux à transinfecter sont injectés avec 1 µL de l'extrait filtré grâce à une seringue Hamilton. Lorsque les animaux injectés sont des mâles asymbiotiques, la transinfection aboutit après quelques mois à une féminisation partielle (ouvertures génitales femelles et GA hypertrophiées) donnant des intersexués iM.

#### B. Expérience de contamination au bisphénol A

La plupart des publications étudiant les effets du bisphénol A (BPA) se concentrent sur les animaux aquatiques exposés à des concentrations variables : par exemple de 10 ng/L à 20 mg/L chez l'Amphipode *Gammarus pulex* (Watts et al., 2001), de 0,2 à 20 µg/L chez le copépode *Acartia tonsa* (Andersen et al., 1999) et de 0,05 à 5 mg/L chez l'Isopode *Asellus aquaticus* (Plahuta et al., 2015). Dans ces publications, les solutions mères sont concentrées entre 40 mg/L et 100 mg/L. Étant donné que les PE ne répondent pas de manière linéaire avec leur concentration, il est important de réaliser les tests écotoxicologiques avec différence sur l'Isopode terrestre *P. scaber* (Lemos et al., 2003, 2006). Dans la publication de référence sur l'Isopode terrestre *P. scaber* (Lemos et al., 2009), le BPA a été dissous dans du méthanol avant son mélange avec le sol, pour obtenir une concentration entre 10 et 1000 mg/kg de terre sèche. Le sol a ensuite été laissé à l'air libre pour évaporation et l'humidité a été enfin réajustée à 20% avec de l'eau distillée avant expérience. Le méthanol étant toxique pour les animaux, cette méthode suppose un témoin solvant supplémentaire et rend l'interprétation des éventuels résultats plus indirecte. Pour notre étude, nous

avons opté pour une dissolution du BPA dans de l'eau du robinet, utilisée également pour humidifier la terre, afin de minimiser les effets confondants. Cette solution présente en contre partie deux inconvénients : la dissolution du BPA dans l'eau est plus longue et sa solubilité est moindre (jusqu'à ~300 mg/L). Ainsi est-il difficile d'obtenir de fortes concentrations du BPA dans l'eau sans rendre le sol inondé, impropre à l'élevage des cloportes. Préalablement, nous avons donc cherché quelles quantités d'eau requises pour la dissolution étaient compatibles avec une humidité du sol viable pour les animaux. Les résultats des mesures d'humidité du sol en fonction de la quantité d'eau ajoutée sont présentés dans la figure MM.1 (comm. pers. J. Roque). Nous avons d'abord retenu un volume de 480 mL d'eau par kg de terre, offrant une humidité théorique de 57%. Dans ces conditions, une concentration en BPA de 120 mg/kg de terre sèche peut être obtenue (Table MM.1). Le premier essai a porté sur des femelles P. scaber et A. vulgare gravides élevées sur des sols contaminés à 0, 5, 10, 30 ou 120 mg de BPA par kg de terreau. Une solution mère à 250 mg/L a été réalisée en dissolvant 500 mg de BPA dans 2 L d'eau avec agitation pendant une nuit. Les sols des cinq conditions ont été mouillés indépendamment dans des bacs de 500 g de terre, avant d'être répartis dans des boîtes cylindriques (Ø 8 cm) individuelles à hauteur de 55 g de terre. En raison de la forte mortalité, due vraisemblablement à l'excès d'humidité et la petitesse des boîtes, la deuxième expérience a fait l'objet des ajustements suivants : limitation à 240 mL d'eau par kg de terre (38% d'humidité théorique), d'où une limitation à 60 mg de BPA/kg de terre sèche (Table MM.2), contamination initiale dans des bacs de 3 kg de terre puis répartition dans des boîtes d'élevage plus grandes (18 x 24 x 9 cm), à hauteur de 400 g de terre. Les animaux sont nourris avec des feuilles de tilleul séchées, broyées et mélangées avec le sol, ce qui permet d'éviter qu'ils ne se réfugient dessus et favorise leur contact au substrat contaminé. Deux séries de 30 portées de P. scaber, non porteurs de la bactérie Wolbachia, ont été élevées dans ces conditions pour étudier l'effet du BPA au cours de la différenciation sexuelle. Le sex ratio des portées a ensuite été établi 8 semaines environ après la naissance des animaux. Une partie des mâles a été disséquée sous loupe binoculaire (Stemi 2000-C, Zeiss) pour vérifier la normalité des phénotypes (gonades notamment).



<u>Figure MM.1</u> : Humidité du sol (%) en fonction de la quantité d'eau ajoutée (mL).

mg BPA/kg terre	0	5	10	30	120
g terre	500	500	500	500	500
mL solution mère	0	10	20	60	240
mL eau robinet	240	230	220	180	0
mL eau total	240	240	240	240	240
mg BPA total	0	2,5	5	15	60

<u>Table MM.1</u> : Volumes d'eau et de solution mère de BPA utilisés dans l'expérience 1.

mg BPA/kg terre	0	5	10	30	60
g terre	3000	3000	3000	3000	3000
mL solution mère	0	60	120	360	720
mL eau robinet	720	660	600	360	0
mL eau total	720	720	720	720	720
mg BPA total	0	15	30	90	180

<u>Table MM.2</u> : Volumes d'eau et de solution mère de BPA utilisés dans l'expérience 2.

## C. Expérience d'extinction de gènes par ARN interférent (ARNi)

Pour chaque gène ciblé, une région d'environ 1 kpb a été amplifiée par RT-PCR en utilisant des ADNc d'A. vulgare mâles, adultes, et des amorces spécifiques flanguées d'une région T7 (T7-F et T7-R). Ces produits de PCR ont été purifiés sur colonnes QIAquick (Qiagen) selon le protocole standard. Ils ont ensuite été intégrés dans un vecteur pGEM®-T Easy (volume réactionnel de 10 µL, 50 ng de vecteur, 2 µL de produit de PCR, ligation pendant 16 h à 16°C). Des bactéries ont été transformées par choc thermique (90 s à 42°C, 2 min sur glace), élevées en milieu LB à 37°C pendant 1 h, puis étalées sur boîte pétri contenant un milieu LB-agar + ampicilline (100 mg/mL) + X-gal (40 mg/mL) + IPTG (200 mg/mL). La présence du plasmide avec l'insert désiré a été vérifiée sur les colonies blanches par PCR et séquençage Sanger, grâce aux amorces M13 qui l'encadrent. Les clones bactériens validés ont été utilisés pour amplifier les fragments T7-F - R et F - T7-R. Ces amplicons ont servi de matrice à la synthèse des ARN simples brins (ARNsb) avec le kit MEGAscript<sup>™</sup> (Ambion). La synthèse a été faite sur la nuit à 37°C, dans un volume de 20 µL et avec 200 ng de matrice. Les ARN ont été précipités à -80°C en ajoutant 30 µL d'eau + 30 µL de LiCl, centrifugés 15 min à 4°C, rincés à l'éthanol 70% et repris dans 20 uL d'eau. Les ARN sens et anti-sens ont été mélangés de façon équimolaire pendant 15 min à 70°C pour hybridation. La quantité d'ARN double-brin (ARNdb) a été vérifiée au Nanodrop 1000 et une solution d'ARNdb à 1 µg/µL a été réalisée pour injection. L'efficacité de l'inhibition a été testée par RT-PCRq à différents temps après l'injection.

# II. Obtention et évolution des séquences d'intérêt

#### A. Approche par amorces dégénérées

Jusqu'à récemment, les seules données de RNAseq disponibles chez les Isopodes provenaient du projet ERC PopPhyl (ID n°232971) de Nicolas Galtier (Institut des Sciences de l'Evolution, Montpellier), pour lequel le laboratoire avait fourni les ARN d'*A. vulgare, A. nasatum* et *Porcellio sp.* L'étude de l'IGFBP-rP1 et de l'IR chez les Isopodes a ainsi été amorcée par l'identification du gène chez ces espèces par Nicolas Cerveau, avec qui nous collaborons depuis le début de cette étude. Pour ce faire, il a utilisé la séquence de Cq-IGFBP comme requête de BLAST sur ces trois banques. Un stage de M1 réalisé par Clémentine Bernier au premier semestre 2015 sur l'IGFBP-rP1 de cloportes a permis l'obtention de 14 nouvelles séquences codantes par RT-PCR avec

des amorces dégénérées et séquençage Sanger. J'ai ensuite repris le projet au début de ma thèse (octobre 2015) en confirmant et complétant ce premier jeu de séquences par la même approche de RT-PCR. Cette méthode n'a cependant pas permis d'obtenir des séquences trop divergentes de celles ayant servi pour le dessin des amorces dégénérées.

### **B.** Approche transcriptomique

Nous avons donc démarré un projet de RNAseq qui permet d'étudier l'évolution des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle à l'échelle des Isopodes. Nous avons commencé par compléter l'échantillonnage d'animaux avec de nouvelles espèces élevées au laboratoire, des espèces achetées sur internet et surtout des espèces collectées sur le terrain pour inclure des cloportes avec une position systémique basale (Trichoniscidae, Ligiidae, Tylidae) et même des Isopodes aquatiques (Sphaeromatidae, Asellidae, Idoteidae). Deux missions d'échantillonnage à l'île de Ré, entre autres prospections, ont ainsi permis d'obtenir des animaux aux situations écologiques et évolutives nouvelles. En particulier, nous avons trouvé plusieurs espèces habitant sur un transect allant du 100 % terrestre, haut de plage, milieu de plage, zone intertidale, jusqu'au milieu 100 % marin. De plus, deux des espèces sont parthénogénétiques (Trichoniscus pusillus (Legrand et al., 1950) et Trichorhina tomentosa). Nous avons sélectionné 27 espèces représentatives de cette diversité d'Isopodes (Fig. MM2). Les animaux correspondants ont fait l'objet d'extractions d'ARN (kit Qiagen RNeasy), par groupe de 10 individus lorsque c'était possible (5 mâles et 5 femelles). Après contrôles des quantités et de la qualité, les ARN ont été envoyés à une plate-forme de séquençage nouvelle-génération (NGS), Eurofins. Une étape de sélection poly-A a permis d'enrichir les librairies en ARNm, avant séquençage avec la technologie Illumina HiSeq (lectures de deux fois 125 paires de base). Parallèlement, un autre projet RNAseq a été entrepris, toujours chez *A. vulgare*, qui considère les différents stades de développement de cette espèce (voir section MM.III.B).

<u>Figure MM.2</u> : Panorama de la diversité des Isopodes échantillonnés pour les transcriptomes (17 des 27 espèces sélectionnées). Les espèces sur fond bleu foncé sont marines, celle sur fond bleu clair est dulcicole, celle sur fond gris habite les littoraux rocheux, celles sur fond beige fréquentent les littoraux sableux et celles sur fond marron sont terrestres.



### C. Traitement bio-informatique

Les données brutes issues de nos 27 banques et des banques disponibles sur SRA (*Sequence Read Archive*) ont été nettoyées avec le logiciel Trimmomatic (Bolger et al., 2014) en utilisant les paramètres suivants : adaptateurs retirés, filtres de qualité (LEADING:5, TRAILING:5, SLIDINGWINDOW:4:15) et longueur minimale des lectures de 36 pb. Elles ont ensuite été assemblées avec le logiciel idba-tran (maxk 100, soit une taille de kmers comprise entre 20 et 100) (Peng et al., 2013) pour les données de type "*paired-end*" et avec le logiciel Trinity (paramètres par défaut, la taille des kmers étant donc de 25) (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013) pour celles de type "*single-end*" (principalement les banques publiées dans le cadre du projet PopPhyl). À titre de contrôle, nos 27 banques ont été assemblées avec les deux logiciels pour comparaison. La vérification de l'identité des espèces séquencées a été réalisée en comparant les marqueurs mitochondriaux assemblés (COI/16S) à ceux des bases de données de NCBI (Sayers et al., 2009), lorsqu'ils existent.

L'assemblage de nos 27 librairies et des données publiées a finalement permis d'obtenir des transcriptomes pour plus de 50 espèces d'Isopodes réparties dans 18 familles différentes. Lorsque des données de RNAseq étaient disponible à partir de projets différents (en particulier nos 27 banques et celles issues de (Becking et al., 2017)), celles-ci ont été additionnées et assemblées ensemble. Les statistiques sur les librairies et les assemblages correspondants sont reportées Table MM.3. La qualité des assemblages a de plus été confirmée par des analyses BUSCO 3.0.2, qui cherchent dans les transcriptomes la présence et la qualité d'une banque de gènes de références (base de données utilisée : arthropoda\_odb9) (Simão et al., 2015; Waterhouse et al., 2018). Les différents gènes d'intérêt pour l'étude de la différenciation sexuelle ont ensuite été recherchés par BLAST (Altschul et al., 1990). Leur identification a enfin été vérifiée en recherchant les domaines conservés grâce à CD-search (Marchler-Bauer et al., 2015) et par des approches phylogénétiques. Les séquences d'IR obtenues de façon fragmentée ont au préalable fait l'objet de RT-PCR et séquençages Sanger afin de les reconstituer.

<u>Table MM.3</u> : Bilan des transcriptomes d'Isopodes assemblés pour les différentes études d'évolution. Les banques proviennent de notre projet de séquençage ainsi que des données publiques. Le nombre de lectures de séquençage est indiqué avant (*Reads*) et après filtres (*Paired reads*). Sont enfin reportés le nombre de *contigs* assemblés et la valeur de N50 de chaque transcriptome.

	Ref	Tech	Layout	L reads	Base (G)	Size (Gb)	Yield (Mbp)	Reads R1	Paired reads (1 P.fastq)	% trimm	Sampling	Species	Ecology	Nb contigs	7
	Asellota :														11
P	ERR1433130	Illumina	Paired	100	5.1	3.6	×	26,035,936	24,891,536	95.6	NA	Proasellus spelaeus	Freshwater	58,566	1.0
N	ERR1433114	Illumina	Paired	100	5.2	3.7	×	26,365,456	25,336,569	95.1	NA	Proasellus jaloniacus	Freshwater	58,903	1.6
ω	ERR1437554	Illumina	Paired	100	6.1	3.9	×	30,950,274	26,702,759	86.3	NA	Proasellus cantabricus	Freshwater	59,695	
4	ERR1437551	Illumina	Paired	100	8.5	5.5	×	43,411,591	38,753,728	89.3	NA	Proasellus ortizi	Freshwater	62,499	
UT	ERR1437543	Illumina	Pared	100	8.6	5.4	×	43,720,165	41,361,703	94.6	NA	Proasellus assaforensis	Freshwater	69,731	
a	ERR1437541	Illumina	Paired	100	9	5.7	×	46,015,727	43,176,915	93.8	NA	Proasellus coxalis	Freshwater	80,364	
4	ERR1437552	Illumina	Paired	100	9.2	6	×	46,818,101	41,261,532	88.1	NA	Proasellus grafi	Freshwater	57,241	
00	ERR1437542	Illumina	Paired	100	9.3	5.8	×	47,471,317	44,669,474	94.1	NA	Proasellus parvulus	Freshwater	159,635	
9	ERR1437550	Illumina	Pared	100	9.5	6	×	48,550,204	45,046,200	92.8	NA	Proasellus escolai	Freshwater	170,638	A DESCRIPTION OF
10	ERR1437549	Illumina	Paired	100	10.1	6.4	×	51,336,685	48,022,831	93.5	NA	Proasellus racovitzai	Freshwater	91,261	1000000000
11	ERR1437536	Illumina	Paired	100	10.3	6.6	×	52,687,746	49,116,821	93.2	NA	Proasellus arthrodilus	Freshwater	93,953	11000
12	ERR1437535	Illumina	Paired	100	10.5	7	×	53,507,785	50,926,280	95.2	NA	Proasellus ibenicus	Freshwater	118,221	10000
13	ERR1437533	Illumina	Pared	100	10.8	7.3	×	54,937,131	52,954,492	96.4	NA	Bragas ellus pettatus	Freshwater	75,783	
14	ERR1437540	Illumina	Paired	100	10.9	6.9	×	55,611,669	52,648,031	94.7	NA	Proasellus solanasi	Freshwater	92,318	1.000
15	ERR1437553	Illumina	Paired	100	11.5	7.3	×	58,423,125	52,831,254	90.4	NA	Proasellus ebrensis	Freshwater	85,991	100310
16	ERR1437539	Illumina	Paired	100	11.7	7.3	×	59,824,350	55,194,580	92.3	NA	Proasellus granadensis	Freshwater	139,404	10000000
17	ERR1437534	Illumina	Paired	100	11.7	7.8	×	59,448,194	56,770,949	95.5	NA	Bragasellus molinai	Freshwater	149,172	1.000
18	ERR1437548	Illumina	Paired	100	13.3	8.5	×	67,907,793	64,173,797	94.5	NA	Proasellus cavaticus	Freshwater	110,283	1000
19	ERR1437547	Illumina	Paired	100	13.7	8.6	×	69,932,309	65,925,988	94.3	NA	Proasellus coiffaiti	Freshwater	97,903	15262
20	ERR1433129	Illumina	Paired	100	14.1	9.8	×	71,765,988	67,220,216	93.7	NA	Proasellus aragonensis	Freshwater	45,962	10000
21	ERR1437537	Illumina	Paired	100	14.3	8.8	×	72,942,970	68,446.511	93.8	NA	Proasellus margalefi	Freshwater	101.991	110000
22	ERR1437544	Illumina	Paired	100	15.2	9.5	×	77,551,884	73,359,137	94.6	NA	Proasellus rectus	Freshwater	108,805	10000
23	ERR1437538	Illumina	Paired	100	15.4	9.7	×	78,570,153	75,143,293	95.6	NA	Proasellus meridianus	Freshwater	117,833	1.1
24	ERR1437546	Illumina	Paired	100	17.2	10.9	×	87,514,806	81,307,357	92.9	NA	Proasellus hercegovinensis	Freshwater	130,130	4
125	ERR1437545	Illumina	Paired	100	17.7	11.4	×	90,305,042	83,830,643	92.8	NA	Proasellus karamani	Freshwater	127,130	
26	ERR1433113	Illumina	Paired	100	31.5	18.9	×	165,959,493	164,697,343	99.2	NA	Proasellus beticus	Freshwater	174,893	4

37	36	35	36	35	34	35	34	33	34	33	32	83	32	31	32	31	30	31	30	29	30	29	28	29	28	27	
27	26	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	ш	10	9	8	7	6	51	4	ω	2	1	Our Isopoda :
Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	
Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	
125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	
×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
3.516	4.214	3.762	3.953	3.225	3.225	1.261	3.523	2.745	1.74	3.007	3.05	3.538	1.862	2.094	3.873	3.55	2.837	2.859	3.579	2.859	2.825	3.055	5.637	3.63	3.647	3.571	
14,062,188	16,854,789	15,048,998	15,812,562	12,901,198	12,901,480	5,042,828	14,093,457	10,983,331	6,961,600	12,029,008	12,201,067	14,153,828	7,449,725	8,375,079	15,491,403	14,200,790	11,349,985	11,436,741	14,317,417	11,434,919	11,301,702	12,222,552	22,547,259	14,520,711	14,586,549	14,283,659	
13,683,651	16,428,667	14,755,222	15,379,637	12,350,553	12,405,411	4,860,087	13,068,679	10,194,945	6,605,893	11,288,614	11,631,258	13,827,606	7,144,951	8.074,282	14,958,494	13,763,278	10,878,599	10,451,234	13,775,743	10,647,851	10,479,523	11,599,081	21,881,934	14,125,982	13,966,856	13,741,949	
97.3	97.5	98.0	97.3	95.7	96.2	95.4	92.7	92.8	94.9	93.8	95.3	97.7	95.9	96.4	95.6	96.9	95.8	91.4	96.2	93.1	92.7	94.9	97.0	97.3	95.8	96.2	
Pool non sexé Souche Aqualiment	5 m/5 f Bac 102 (Wo+)	5 m/5 f 690, 691, 692, 693, 695	5 m/5 f 152, 153, 154, 155, 157	5 m/5 f Bac 245	? Bac 64	5 m/5 f Amberre, Ré	5 m/5 f Bac 75 (Wb-)	m/ f Oléron, Ré	8 m/8 f Bac 337	13 m/ 11 f/9 F Ré	13 m/8 f Pessac	1 pool m / 1 pool f Amberre	1 m Pouillé 2 pools de 10 f Amberre	5 m/5 f Ré	5 m/5 f Ré	5 m/5 f LaTeste, Ré	2 pools Ré	4 m/~10 f/~8 ? Olé/ Ré	2 pools Souche Insectmaster	5 m/5 f Bac 174	8 m/8 f Bac 87 (Wb-)	5 m/5 f Bac 287	5 m/5 f Bac 77 (Wo+)	5 m/5 f Bac 92 (Wo+)	5 m/5 f Bac 404 (???)	5 m/5 f Bac 74 (Wo+)	
Asellus aquaticus	Porcellio dispar	Porcellio dilatatus petiti	Porcellio dilatatus dilatatus	Porcellio scaber	Atlantoscia floridana	Philoscia muscorum	Eluma caelatum	Idotea balthica	Chaetophiloscía elongata	Ann adillidium album	Platyarthrus hoffmannseggii	Haplophthalmus danicus	Trichoniscus pusiilus	Tylos europaeus	Sphaerom a serratum	Ligia oceanica	Jaera hopeana	Dynamene bidentata	Trichorhina tomentosa	Orthometopon planum	Balloniscus sellowii	Am adillo officinalis	Helleria brevicomis	Oniscus asellus	Porcellionides pruinosus	Cylisticus convexus	
Freshwater	Terrestrial	Terrestrial CI Wolbachia	Terrestrial CI Wolbachia	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Marine	Terrestrial	Littoral	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Littoral Basal	Marine	Littoral Basal	Marine Symbiotic	Marine	Terrestrial Parth.	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial Basal	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial CI Wolbachia	
85,771	78,341	50,881	49,931	76,067	102,859	43,450	46,730	64,511	80,144	56,921	74,344	47,027	91,741	39,931	62,731	46,032	31,629	49,552	97,427	54,386	75,661	71,332	63,849	71,149	78,656	50,905	
1090	1325	1476	1516	1266	1084	1213	1720	1290	969	1263	1282	1507	1055	1442	1907	1720	1759	1370	1054	1389	1275	1255	1639	1330	1447	1725	

			46						45	44	4ω	42		41	40	98	38	35
			2															T.Becking Isopoda
Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina							
Paired	Pared	Paired	Pared	Paired	Paired	Paired	Pared	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	
125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	
×	х	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
х	×	x	×	x	×	x	×	×	×	×	×	x	×	×	×	x	×	
8,151,981	7,681,090	8,381,684	6,622,020	7,727,550	8,444,741	8,541,441	7,201,366	8,134,572	8,600,081	12,474,088	8,966,717	6,652,221	7,951,577	6,383,495	6,542,269	8,970,101	8,281,749	
7,804,449	7,446,625	8,055,031	6,206,347	7,563,812	8,328,142	7,587,817	6,923,023	7,882,941	8,325,823	11,977,699	8,700,013	6,434,134	7,688,639	6,042,841	6,124,889	8,802,676	8,056,249	
95.7	95.9	96.1	93.7	97.9	98.6	88.8	95.1	96.9	96.8	96.0	97.0	96.7	96.7	94.7	93.6	98.1	97.3	
m	m	1		4				Ξ				m		4		1	m)	
Pscaber	Ppninosus	Pmuscorum	Plaevis	Pdispar	Oasellus	Hbrevicomis	Epurpurascens	Celongafa	Aversicolor	Atunisiense	Asimoni	Asiculorum	Aofficinalis	Amaculatum	Agranulatum	Adepressum	Aassimile	
Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial Basal	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	
41,425	49,073	46,541	35,634	46,121	54,423	22,496	45,421	50,882	42,290	53,305	39,599	37,684	45,203	34,228	39,032	42,720	46,100	
1220	1478	1425	1137	1317	1238	855	1373	1336	1435	1542	1444	1268	1094	1241	1370	1606	1374	-

53			52	51	50		49	48	47											
pool	DRR054553	SRR3401392	SRR3401395	SRR4436643	Pool SRR4017484-5	Marine isopoda :	SRR5198726-7	Pool SRR1324798-9	Pool SRR1324800-09	Terrestrial isopoda :							X		× - 2	T.B. + B.H.
Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	lilumina		Illumina	Illumina	Illumina		Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	
Paired	Pared	Paired	Pared	Paired	Paired		Paired	Single	Single		Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	Paired	
x	143	100	100	150	100		100	100	100		125	125	125	125	125	125	125	125	125	
12.1	5.1	7	6.7	8.3	37.4		×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	×	×	
7.2	2.8	4.4	4.2	2.9	22.9		×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	×	×	
х	x	x	x	x	x		×	x	×		×	x	×	x	×	х	×	х	×	
53,234,947	18,005,391	35,228,556	33,257,135	27,757,586	187,387,514		118,955,427	15,552,480	155,679,139		21,053,179	22,267,639	13,424,512	24,582,339	22,965,452	31,088,700	21,294,823	15,096,172	20,174,129	
52,393,099	18,006,352	35,228,476	33,257,040	27,755,645	164,767,336		115,801,686	15,446,263	154,535,455		20,155,002	21,413,481	12,915,118	23,992,479	22,454,124	29,469,751	19,991,702	14,488,834	19,287,720	
98.4	100	100	100	100.0	97.9		97.3	99.3	99.3		95.7	96.2	96.2	97.6	97.8	94.8	93.9	96.0	95.6	
POOL	late embryo	China 2014	China 2014	Chins, body	Hepato - pool		pool (m+f) Head, legs, ventral muscle/nerve, gonads	whole body, sex missing	whole body, sex missing		m	m	1	1	1	ŧ	1	m	1	
Ligia exotica	Ligia exotica	Ligia exotica	Sphaeroma sp	Sphaerom a tenebrans	Glyptonus antarticus		Trachelipus rathkei	Armadillidium nasatum	Armadillidium vulgare		Pscaber	Ppruinosus	Pmuscorum	Pdispar	Oasellus	Hbrevicomia	Epurpurascens	Celongata	Aofficinalis	
Littoral	Littoral	Littoral	Marine	Marine	Marine		Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial		Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial Basal	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial	
69,388	61,313	21,896	37,256	88,604	82,808		127,044	48,850	179,193		92,131	102,485	64,957	96, <b>1</b> 67	99,291	69,863	65,696	111,325	92,248	
978	988	755	682	1659	949		1397	1357	871		1313	1485	1486	1405	1375	1619	1675	1179	1294	

## **D.** Analyses évolutives

Les arbres phylogénétiques ont été construits par maximum de vraisemblance avec le logiciel PhyML (Guindon and Gascuel, 2003), présent dans Seaview (Gouy et al., 2010). Les séquences ont été alignées avec Muscle (Edgar, 2004) et le jeu de données a été établi grâce à Gblocks (Castresana, 2000; Talavera and Castresana, 2007). Le modèle d'évolution a été établi avec jModelTest 2.1.9 (Darriba et al., 2012) pour les séquences nucléotidiques ou ProtTest 3.4.2 (Abascal et al., 2005; Darriba et al., 2011) pour les séquences protéiques. Les supports de branches ont été établis de trois façons : SH-aLRT (*Shimodaira-Hasegawa-like approximate Likelihood-Ratio Test*) (Anisimova and Gascuel, 2006; Guindon et al., 2010), 1000 répétitions de bootstraps (Felsenstein, 1985) et les probabilités postérieures avec BEAST 1.8.4 (50,000,000 répétitions, échantillonnage toutes les 1000 répétitions, horloge moléculaire relaxée) (Drummond et al., 2012).

Des traces de sélection naturelle ont été recherchées dans les alignements de séquences. Des calculs de dN/dS globaux ont été réalisés avec PAML (codeml, seqtype=1, model=0) (Yang, 1997, 2007) et sur chacun des sites avec Datamonkey (SLAC, FEL, REL) (Pond and Frost, 2005).

Les analyses de distances par paires de séquences (p-distance) ont été faites grâce à MEGA 7.0, avec les paramètres par défaut (Kumar et al., 2016).

Les prédictions des sites de phosphorylation, N-glycosylation et O-glycosylation ont été réalisées par les serveurs NetPhos 3.1 (Blom et al., 1999), NetNGlvc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc) et NetOGlyc 4.0 (Steentoft et al., 2013), avec la limite que les modèles prédictifs utilisés pour les glycosylations sont basées sur des protéines humaines ou mammaliennes malgré leur utilisation dans différentes études chez les invertébrés (Manor et al., 2007; Cerveau et al., 2014; Sharabi et al., 2016).

# III. Analyses d'expression

#### A. Animaux

Pour comprendre l'implication de la voie de signalisation de l'HA dans le processus de différenciation sexuelle des cloportes, nous avons mené des analyses de leur expression sur notre espèce modèle, *A. vulgare*. Deux lignées ont été utilisées : la lignée BF, collectée à Nice (06) en 1967, qui est non-infectée par *Wolbachia* et la lignée ZN, collectée à Celles s/ Belle (79) en 1991, qui se compose de néo-femelles (ZZ), infectées par la souche *w*VulC de *Wolbachia*, et de mâles asymbiotiques, permettant la comparaison aux mâles BF pour estimer l'effet de la lignée. La lignée ZN comporte également de rares intersexués mâles (iM) naturels. Des intersexués similaires ont également été générés à partir de mâles de la lignée BF, par inoculation d'un extrait d'ovaires issus de femelles ZN. Tous ces animaux ont servi pour une analyse d'expression spatiale chez l'adulte et une analyse d'expression temporelle, au cours du développement.

Pour l'analyse d'expression spatiale, nous avons, avec l'aide de Catherine Debenest, disséqué les animaux fraîchement sacrifiés dans une solution de Ringer filtré, sous loupe binoculaire (Stemi 2000-C, Zeiss). Au sein de chaque matricule (lignée/sexe), chaque tissu disséqué correspond au matériel provenant de plusieurs individus, afin de permettre le prélèvement de suffisamment de tissu pour les extractions d'ARN. Les organes ou tissus échantillonnés sont les suivants : les différentes parties de la gonade mâle (glandes androgènes, utricules, vésicule séminale et canal déférent), les ovaires, le cerveau et la chaîne nerveuse, les *caeca* (hépatopancréas) et le tube digestif (vidé), ainsi que les hémocytes et une association de muscle et de gras. Au fur et à mesure des dissections, les tissus et organes ont été congelés par l'azote liquide afin d'assurer la qualité des ARN. Cette série de dissections a été répétée trois fois.

#### B. Échantillonnage pour le suivi du développement

Des croisements d'*A. vulgare* des deux lignées BF et ZN ont été réalisés en isolant un couple d'adultes par boîte d'élevage, stimulés par une photopériode longue (Juchault et al., 1981; Mocquard et al., 1989). Un suivi régulier a permis de suivre des portées d'âge précisément connu et des prélèvements ont été réalisés pour chaque stade du développement (décrits dans l'encadré n°1). Les premiers stades ont été échantillonnés en fonction de l'âge des juvéniles, respectivement à la naissance (stade 1), puis à une semaine (stade 2), deux semaines (stade 3) et trois semaines (stade

4). Pour la même raison technique que dans le cas des tissus, les échantillons des semaines 0 à 3 ont fait l'objet de prélèvements et d'extractions par lots d'au moins une dizaine d'individus. Ces lots comprennent un mélange aléatoire d'individus des deux sexes car les animaux ne sont pas différenciables sexuellement à cet âge. Les stades 4 à 8 ont fait l'objet de prélèvements individuels, en s'appuyant non pas sur l'âge des juvéniles mais sur leur taille (indiquées entre crochets dans la figure E1.2). En effet, étant corrélés à des mues, une correspondance entre les stades de développement et la taille de l'animal a été établie (Suzuki and Yamasaki, 1995). Les individus des stades 5 et ultérieurs ont été sexés avant prélèvement. Des ADNc issus de croisements antérieurs, réalisés lors de la thèse de Sandrine Geniez, ont également été utilisés pour augmenter les effectifs à chaque stade de développement.

Afin d'étudier la différenciation sexuelle d'*A. vulgare*, nous avons de plus initié un second projet de RNAseq qui se concentre sur cette espèce à différents stades de développement. Nous avons décidé de sélectionner les échantillons prélevés à la naissance, après deux semaines, ainsi que les échantillons de stades 4, les femelles de stade 5, les mâles de stade 5, les femelles de stade 7 et les mâles de stade 7, et ce pour chacune des deux lignées de référence BF et ZN (à l'exception des mâles de stade 5 dans la lignée ZN). Les ARN proviennent des croisements décrits précédemment et ont été séquencés par Genewiz avec la technologie Illumina HiSeq et des lectures de deux fois 150 pb. Pour chacun des stades sélectionnés, trois lots indépendants de plusieurs échantillons ont été séquencés, soit 39 banques.

#### C. Analyses d'expression

L'expression des gènes de la voie de signalisation (HA, IGFBP-rP1, IR1, IR2 et VIH) a été évaluée sur tous ces échantillons de tissus et de stades de développement par RT-PCR et par RT-PCRq relative, en utilisant la protéine ribosomale RbL8 comme gène de référence, dont la stabilité de l'expression a déjà été testée chez le cloporte (Becking, 2017). Les détails techniques de ces analyses sont disponibles dans la section Matériel et méthodes du chapitre 1.

Les données issues du RNAseq au cours du développement ont été nettoyées avec Trimmomatic de la même façon que le premier projet sur la diversité des Isopodes. Afin d'alléger les fichiers et de faciliter l'assemblage, une étape de filtre des ARNr a été ajoutée à l'aide de SortMeRNA 2.1 (Kopylova et al., 2012). Les lectures ont été à nouveau appareillées grâce au script paired\_sequence\_match.py. Différentes stratégies d'assemblages sont en train d'être essayées. Une première série d'assemblages a été réalisée en utilisant Trinity 2.4.0 avec une normalisation *in silico* par banque et une taille des kmers de 25 ou 32. Des assemblages seront aussi réalisés en utilisant idba-tran (kmers entre 20 et 100). Les différents transcriptomes résultants seront enfin concaténés et la redondance sera retirée grâce à CD-HIT 4.6 (Li et al., 2001; Li and Godzik, 2006). Les analyses d'expressions ont été réalisées grâce au script align\_and\_estimate\_abundance.pl, fourni dans la suite Trinity, en utilisant la méthode Kallisto. Les valeurs de TPM (*Transcripts Per Kilobase Million*) ont ensuite été traitées sous R.

# **CHAPITRE 1**

# Caractérisation de l'IGFBP-rP1

Suite à sa découverte chez les Décapodes, nous avons réalisé la première caractérisation de l'IGFBP-rP1 des Isopodes, en particulier chez *A. vulgare*. Cette étude a fait l'objet d'un manuscrit en cours de révision pour publication chez *General and Comparative Endocrinology*. Celui-ci est fourni ci-dessous, précédé d'un résumé condensé en français qui récapitule les principaux résultats.

# I. Séquence et structure de Av-IGFBP-rP1

Par BLAST avec Cq-IGFBP comme requête, nous avons identifié une séquence unique dans le transcriptome d'A. *vulgare*, qui code pour une protéine homologue des IGFBP-rP1 de Décapodes. Cette protéine, Av-IGFBP-rP1, longue de 247 aa, contient un peptide signal de 22 aa et les trois domaines conservés canoniques : le domaine de liaison (IB), le domaine inhibiteur de protéases (Kazal) et le domaine immunoglobuline (Ig), conformément à ceux identifiés chez les IGFBP-rP1 de Décapodes (Fig. 1.1).



<u>Figure 1.1</u>: Comparison of the conserved domains in the published decapod IGFBP-rP1s and the newly characterized isopod IGFBP-rP1, the sequence of *A. vulgare* being shown for illustration. The conserved domains were mapped using CDsearch (Marchler-Bauer et al., 2015).

## II. Analyses d'expression de Av-IGFBP-rP1

#### A. Expression tissulaire chez l'adulte

Les analyses par RT-PCR et RT-PCRq montrent une expression globalement forte de Av-IGFBP-rP1 dans les différents tissus d'A. vulgare adultes des deux sexes (Fig. 1.2), en accord avec les observations chez les Décapodes. L'expression la plus forte est trouvée dans les ovaires, la chaîne nerveuse, le muscle/gras et le tube digestif, tandis que l'expression la plus faible est dans les caeca digestifs. La protéine étant néanmoins circulante, on peut imaginer que la protéine soit ubiquiste dans l'organisme. L'expression chez les femelles n'est pas incompatible avec un rôle dans la différenciation sexuelle mâle et est cohérente avec leur réceptivité à l'HA (De Lattin and Gross, 1953; Legrand, 1954b, 1954a; Katakura, 1959). Il est de plus probable que ce transporteur ait plusieurs fonctions, peut-être même indépendantes de ligands (Hwa et al., 1999). Des fonctions dans la nutrition au niveau de l'intestin (Huang et al., 2016) ou dans le développement ovarien (Huang et al., 2015a, 2017b) sont notamment à envisager. D'ailleurs l'HA s'exprime entre autres dans l'hépatopancréas et les ovaires chez certains Décapodes (S. Li et al., 2012; Chung, 2014; Huang et al., 2014; F. J. Li et al., 2015). Ces autres fonctions peuvent être aussi associées, outre l'HA, à des ligands additionnels de la famille des ILPs, comme ceux identifiés chez Daphnia pulex (Colbourne et al., 2011; Dircksen et al., 2011) ou S. verreauxi (Sv-ILP1 (Chandler et al., 2015) et Sv-ILP2 (Chandler et al., 2017b)), bien qu'à ce jour aucun autre ILP ne soit identifié chez A. vulgare.

Ce patron d'expression est le même dans la lignée naturellement infectée par *Wolbachia* ainsi que chez les intersexués (naturels ou générés expérimentalement) (Fig. 1.2). La bactérie n'altère donc pas la transcription d'Av-IGFBP-rP1.



<u>Figure 1.2</u>: Tissue expression of the Av-IGFBP-rP1 mRNA by RT-qPCR. The following tissues were dissected from *A. vulgare* adults of uninfected (A.) and *Wolbachia*-infected lineages (B.): HE: hemocytes, LE: legs, MF: muscle and fat, NC: nerve cord, BR: brain, SG: salivary glands, DT: digestive tract, CK: digestive *caeca*, OV: ovaries, SP: sperm cells, VD: *vas deferens*, SV: seminal vesicle, UT: utricles, AG: androgenic glands.

### B. Expression au cours du développement

Une analyse par RT-PCRq sur des animaux entiers à chaque stade de développement a été conduite pour explorer une éventuelle expression différentielle de ce gène au cours de la différenciation sexuelle (Fig. 1.3). Av-IGFBP-rP1 montre plutôt une expression constitutive au cours du développement, avec une expression un peu plus élevée après la naissance mais assez stable par la suite. Ce résultat diffère de l'augmentation progressive d'expression observée chez *Macrobrachium nipponense* (F. Li et al., 2015a) mais demanderait à être analysé chez plus d'espèces. Chez *A. vulgare*, l'IGFBP-rP1 ne semble en tout cas pas être ni un facteur limitant ni déclenchant lors de la différenciation sexuelle. Une analyse au niveau protéique permettrait de confirmer cette hypothèse.

Comme pour l'expression tissulaire, le patron d'expression au cours du développement n'est pas différent dans la lignée infectée par *Wolbachia*. Le parasite ne prévient donc pas l'expression normale du gène codant l'Av-IGFBP-rP1.

En complément de cette étude, l'analyse des données RNAseq confirme globalement les résultats obtenus en RT-PCRq (Fig. 1.3bis) malgré une différence de patron d'expression entre les deux lignées : l'expression de Av-IGFBP-rP1 semble stable à tous les stades de développement dans la lignée infectée, alors qu'une expression plus forte après la naissance est observée dans la lignée non-infectée, en accord avec ce qui a été observé dans l'expérience précédente.



<u>Figure 1.3</u>: RT-qPCR expression profiles of the Av-IGFBP-rP1 mRNA during development in uninfected (A.) and *Wolbachia*-infected lineages (B.). *Larvae* were sampled after birth (0w), one (1w), two (2w) and three weeks (3w) after birth. Then, each step represents a developmental stage (4-8), characterized by a new moult, until adulthood (AM for adult males, AF for adult females). External sex characters start to appear at stage 5, allowing gender-specific sampling.



<u>Figure 1.3bis</u> : Profils d'expression d'Av-IGFBP-rP1 au cours du développement, estimés *in silico* par RNAseq dans la lignée non-infectée (A.) et la lignée infectée par *Wolbachia* (B.). Les transcriptomes ont été générés à partir d'animaux prélevés à la naissance (*0w*), deux semaines après la naissance (*2w*), au stade 4 non différencié extérieurement et aux stades 5 et 7, dont le sexe est identifiable (M pour les mâles, F pour les femelles). Chaque point correspond à un lot de plusieurs de ces échantillons. Les lots ne contenant que des individus n'exprimant pas l'HA en RT-PCRq ont été indiqués en rouge, ceux ne contenant que des individus exprimant tous l'HA en RT-PCRq ont été indiqués en bleu et les lots contenant un mélange d'individus des deux catégories précédentes sont indiqués en violet.

# III. Effets de l'extinction des gènes Av-IGFBP-rP1 et Av-AGH

L'approche par ARN interférent a été utilisée pour explorer l'implication de Av-IGFBP-rP1 dans le maintien des caractères sexuels mâles chez l'adulte et son interaction avec l'expression de l'HA (Fig. 1.4). Quatre à 28 semaines après injection de l'ARNdb, l'inhibition de l'expression d'Av-IGFBP-rP1, efficace à ~90% (Fig. 1.4.B), provoque une hausse de l'expression de l'HA d'un facteur deux à sept (Fig. 1.4.D). Celle-ci s'accompagne d'un début d'hypertrophie des GA quatre semaines après l'injection (Fig. 1.5.E).


<u>Figure 1.4</u>: RT-qPCR expression profiles of the Av-AGH mRNA in the Av-AGH silencing experiment (A.), the Av-IGFBP-rP1 mRNA in the Av-IGFBP-rP1 silencing experiment (B.), the Av-IGFBP-rP1 mRNA in the Av-AGH silencing experiment (C.) and the Av-AGH mRNA in the Av-IGFBP-rP1 silencing experiment (D.). Two kinds of controls were included: animals which were not injected (NI, in green) and animals injected with water (in blue), which correspond to the vehicle group. The dsRNA-injected animals appear in red. Animal samplings were performed one, four, 12 and 28 weeks post-injection (wpi).

<u>Figure 1.5</u>: Phenotypes of the AG in the silencing experiment. Normal AG in the water-injected group (A.). Hypertrophied AG in the AGH silencing group at four (B.), 12 (C.) and 28 (D.) weeks post-injection of the dsRNA (wpi). Hypertrophied AG in the IGFBP-rP1 silencing group at four wpi (E.), then non-hypertrophied AG at 12 (F.) and 28 (G.) wpi. Female genital aperture observed during AGH silencing, 12 wpi (H.) but absent during IGFBP-rP1 silencing (I.). The dashed lines show the plane of bilateral symmetry whereas the dashed circle shows the female genital aperture.



Symétriquement, l'inhibition par ARNi de l'HA est aussi efficace à ~90% jusqu'à 12 semaines après injection et à 64% après 28 semaines (Fig. 1.4.A). Elle provoque également des débuts d'hypertrophie des GA quatre semaine après injection de l'ARNdb (Fig. 1.5.B) mais ce phénotype s'accentue à 12 et 28 semaines post-injection (Fig. 1.5.C-D). Il s'accompagne de plus de l'apparition d'ouvertures génitales femelles à partir de 12 semaines post-injection (Fig. 1.5.H). Dans cette expérience, l'extinction de l'HA n'altère pas le niveau d'expression de Av-IGFBP-rP1 (Fig. 1.4.C).

L'approche par ARNi s'est donc révélée efficace et durable chez notre espèce modèle, permettant de corroborer l'implication de l'IGFBP-rP1 dans la voie de signalisation de l'HA chez les Isopodes. Cela dit, l'effet de l'ARNi d'IGFBP-rP1 sur l'expression de l'HA diffère encore une fois de l'étude sur *M. nipponense*, chez lequel l'extinction du transporteur (Mn-IAGBP) réduit l'expression de l'HA (F. Li et al., 2015a). La transposition entre Décapodes et Isopodes n'est peut-être pas possible directement. Il serait néanmoins intéressant de savoir si ces expériences d'ARNi de l'IGFBP-rP1 ont aussi induit une hypertrophie des GA chez ce Décapode. Ce phénotype particulier peut par ailleurs également s'observer chez les intersexués de type iM dus à l'action de *Wolbachia* chez les Isopodes (Legrand and Juchault, 1963) et lorsque l'HA est inhibée chez les Décapodes mâles (Ventura et al., 2009). L'hypothèse de boucles de rétrocontrôle de l'HA a été proposée pour expliquer ces hypertrophies.

# IV. Evolution de l'IGFBP-rP1 au sein des Isopodes

Par séquençage Sanger et par RNAseq, nous avons obtenu un total de 68 séquences d'IGFBP-rP1 d'Isopodes, une par espèce, réparties dans 18 familles différentes (5 aquatiques, 13 terrestres) (Fig. 1.6). Elles contiennent toutes les trois domaines conservés typiques des IGFBP-rP1 et présentent une longueur entre 239 et 251 aa. Environ un tiers de la séquence en acides aminés est parfaitement conservé entre les espèces (74 aa), en particulier 18 cystéines. On retrouve chez les Isopodes un motif impliqué dans la liaison au ligand, CGCCxxC, identique à celui identifié chez les Vertébrés (Hwa et al., 1999; Daza et al., 2011). Un deuxième motif de liaison existe également, (I/V)xLxxL, similaire de celui identifié chez les Décapodes (RxLxxL (Rosen et al., 2013)), bien que l'alignement montre un décalage entre ces motifs.

Kazal: CECALESQUCSOGYTYSSCELMER AKING TYDER IG: PV|K\$PPKD\$=PPAES|LVLDCEA\_GYPVPTLTIIE\_YR=DGST40LPSDDSLVAV0APGQPEKHIN3GIIVQ|IIK4LPENVG|YTC|AJNE=QxAKASAKV\$ Multiple Align Sho PS()/TO B KAZAL ត

Figure 1.6: Analyses of IGFBP-rP1 conservation in isopod crustaceans. An analysis of the amino acid conservation was carried out with Multiple Align Show on the alignment of all the isopod IGFBP-rP1 sequences (A.). Fully conserved amino acids are highlighted in black, substitutions leading to a functional conservation of the amino acid are indicated in grey. The three conserved domains are framed in red. Sequence logos of the three conserved domains of the IGFBP-rP1 (IB, Kazal, Ig) were generated by WebLogo (B.). Positively charged amino acids (KRH) are depicted in red, negatively charged amino acids (DE) in blue, polar amino acids (STNQ) in green, apolar amino acids (AVLIWFM) in purple and the others (YGPC) in black. The conserved ligand-binding motifs are framed in green (CGCCxxC) and orange ((I/V)xLxxL). The region homologous to the decapod motif is framed in blue.

Une phylogénie sur la région codante des IGFBP-rP1 d'Isopodes montre que la phylogénie du gène est globalement congruente avec celle des espèces (Fig. 1.7). Les séquences d'Isopodes terrestres (Oniscidea) se rassemblent bien et la monophylie de la majorité des familles est également respectée. Les deux exceptions apparentes concernent les deux séquences de Platyarthridae et les quatre séquences de Philoscidae. La monophylie de ces derniers est cependant remise en question (Schmidt, 2008). Par ailleurs, les mâles n'existent pas chez l'espèce parthénogénétique *Trichorhina tomentosa*, expliquant peut-être la divergence de son IGFBP-rP1 par rapport à *Platyarthrus hoffmannseggi*. Les phylogénies par domaines conservés ont aussi été établies : elles ne révèlent pas d'histoire évolutive différente entre domaines mais sont peu informatives faute de signal évolutif.

La bonne conservation de l'IGFBP-rP1 chez les Isopodes a été confirmée par un rapport dN/dS compris entre 0,12 et 0,17, suggérant une forte sélection purifiante. Ce résultat va dans le sens d'une conservation de la fonction de l'IGFBP-rP1 au sein des Isopodes, suggérant un rôle clef dans la voie de signalisation des ILP. En revanche, les variations de patrons d'expression (II) et les différentes conséquences de l'ARNi (III) indiquent que la fonction n'est peut-être aussi bien conservée entre Décapodes et Isopodes.

<u>Figure 1.7</u>: Isopod IGFBP-rP1 phylogeny of the whole cDNA. Sequences aligned with Muscle were trimmed with Gblocks (723 nucleic sites left). A maximum likelihood tree was constructed using PhyML, with GTR+I+G model of evolution and 1000 bootstrap repetitions. Branch supports were confirmed with SH-aLRT and bayesian approaches. Family names are indicated in black except for families of aquatic species (in blue) and families in which the IGFBP-rP1 sequences did not cluster together (in red and purple).



# V. <u>IGFBP-rP1</u>, a strongly conserved member of the <u>androgenic hormone signalling pathway in Isopoda</u>

Benjamin Herran<sup>a</sup>, Nicolas Cerveau<sup>b</sup>, Camille Houdelet<sup>a</sup>, Clémentine Bernier<sup>a</sup>, Catherine Debenest<sup>a</sup>, Carine Delaunay<sup>a</sup>, Maryline Raimond<sup>a</sup>, Joanne Bertaux<sup>a,\*</sup>, Pierre Grève<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>: Université de Poitiers, UMR CNRS 7267 Écologie et Biologie des Interactions, Poitiers, France.
<sup>b</sup>: Georg-August-Universität Göttingen, Department of Geobiology, Göttingen, Germany.

\* <u>Correspondence</u>: Grève Pierre or Bertaux Joanne, Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions (EBI) - UMR CNRS 7267 Équipe Écologie Évolution Symbiose (EES) - Bâtiment B8-B35 - 5 rue Albert Turpain TSA 51106 F-86073 POITIERS Cedex 9, France. Tel.: +33 (0)5 49 45 39 79; fax: +33 (0)5 49 45 40 15;

e-mail: pierre.greve@univ-poitiers.fr or joanne.bertaux@univ-poitiers.fr

# Abstract

The first protein which has been described to interact with the malacostracan Androgenic Gland Hormone (AGH) is a binding protein called IGFBP-rP1. It has been identified and studied in several species of decapods, in which its interaction with the masculinizing hormone and its expression patterns have been established in several ways. However, this protein remains uncharacterised to date in the other malacostracan orders, like Amphipoda and Isopoda, although they were historically the first ones in which the androgenic gland and the corresponding hormone were respectively described. In this article, we identified the IGFBP-rP1 of isopods and established its implication in the pathway of the AGH with a silencing approach in the model species *Armadillidium vulgare*. We also showed that this gene is expressed in all the tissues of males and females, with a similar pattern in animals infected with *Wolbachia*, a feminizing endosymbiont of several isopod species. The expression pattern did not differ during the development of uninfected and infected animals either. We finally studied the evolution of the IGFBP-rP1 in 68 isopod species, looking for conserved motifs and evidence of natural selection. Altogether, our results showed that this gene is constitutively expressed and strongly conserved in isopods, in which it likely constitutes a key element of the insulin/IGF signalling pathway. However, we also illustrated that IGFBP-rP1 is not

sufficient on its own to explain the different developmental paths taken by the males and the females or feminized genetic males.

# Keywords (max 6)

Armadillidium vulgare Insulin-like Growth Factor Binding Protein-related Protein (IGFBP-rP) Insulin/IGF signalling pathway Isopoda Sexual differentiation Wolbachia

## Abbreviations

AGH, androgenic gland hormone; ILP, insulin-like peptide; IAG, insulin-like androgenic gland hormone; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; IGFBP-rP1, IGFBP-related protein; ISP, insulin/IGF signalling pathway; SIBD, single insulin-binding domain.

#### 1. Introduction

In malacostracan crustaceans (e.g. amphipods, decapods and isopods), sexual differentiation relies on a unique proteinaceous hormone, called the Androgenic Gland Hormone (AGH). The latter, produced by the so-called androgenic glands, is necessary and sufficient to induce male differentiation of the malacostracan juveniles. This hormone has been studied for several decades, revealing it belongs to the Insulin-Like Peptide (ILP) Signalling Pathway (ISP), which includes Insulin-like Growth Factors (IGFs) and insulin-related ILPs like the AGH, also called IAG for Insulin-like Androgenic Gland hormone (Ventura et al., 2011). Yet, the binding peptides of AGH remained unknown until a first discovery in a decapod cDNA library in 2013 (Rosen et al., 2013). This first AGH partner was called Cq-IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein) due to its belonging to the IGFBP superfamily. In the canonical ISP, these proteins regulate the distribution and bioavailability of their ligand by sequestering it (Baxter, 2000; Kelley et al., 2002; Bach et al., 2005). This way, they might either inhibit the action of the ligand or promote it by carrying and releasing it to its target receptors (as a result of various post-translational modifications or upon interactions with cell surface or matrix) (Forbes et al., 2012). Members of the IGFBP are found widely in metazoans and are particularly well known in vertebrates, in which they bind IGFs and not insulin (Hwa et al., 1999). However, using a recombinant Cq-IGFBP, Rosen et al. (2013) proved the specific binding of the AGH (i.e. Cq-IAG) by Cq-IGFBP, confirming the unusual interaction between this IGFBP and an insulin-related ILP. Moreover, this first description enabled the subsequent identification of IGFBPs in a variety of other decapod species (Chandler et al., 2015; Huang et al., 2015a, 2016; F. Li et al., 2015a; Ventura-López et al., 2017; Song et al., 2018). Interestingly, Li et al. (2015) and Huang et al. (2016) chose to call this protein IAGBP and ILPBP, respectively, referring to its specific function as a binding protein of the IAG hormone (belonging to the ILP family, and not IGF). Furthermore, Song et al. (2018) referred to this gene as IGFBP7 whereas Huang *et al.* (2015) preferred to call this protein an IGFBP-rP (IGFBP-related protein). Indeed, structural and phylogenetic studies have brought out the existence of two distinct families within the IGFBP superfamily (Hwa et al., 1999; Rodgers et al., 2008). The stricto sensu IGFBP (IGFBP1-6) have a high affinity for IGF peptides only (and a low one for insulin) and are found only in vertebrates. They all display two conserved domains: an insulin binding domain (IB), followed by a thyroglobulin domain. On the other hand, a variety of proteins (including IGFBP7) have been described in both vertebrates and invertebrates and belong to a family of proteins with a low affinity for IGF peptides (Oh et al., 1996; Radulović et al., 2015) and a high affinity for insulin (Yamanaka et al., 1997; Radulović et al., 2015). Contrary to IGFBP1-6, their modular architecture can display various structural domains (Hwa et al., 1999). Considering the structural, functional and phylogenetic evidence, members of this IGFBP family have been consensually renamed IGFBP-rP since 1998 (Baxter et al., 1998). Thus, as pointed out by Huang et al. (2015), given its structure (Rosen et al., 2013) and phylogenetic position (Chandler et al., 2015), Cq-IGFBP is actually a homologue of IGFBP-rP1 (also previously known as IGFBP7), just like all the crustaceans IGFBPs identified so far. The IGFBP-rP1 is characterized by an IB domain, followed by a Kazal domain (protease inhibitor) and an immunoglobulin domain (Ig), all domains also found in the described decapod IGFBPs. Its belonging to the IGFBP-rP family explains why Cq-IGFBP displays such an affinity for an insulin-related ILP (Cq-IAG). More recently, the molecular interaction between the AGH and IGFBP-rP1 was confirmed using a yeast-two hybrid assay (Song et al., 2018). In addition to the evidence at the molecular level, the interaction between decapod IGFBP-rP1 and the AGH was also demonstrated at the transcriptional level, using RNAi (F. Li et al., 2015a) and modelled in silico (Chandler et al., 2017b). Interestingly, Chandler et al. (2017) predicted that Sv-IGFBP could bind not only the AGH but also two other ILPs (ILP1 and ILP2), which remain undiscovered to date in other malacostracan orders. This characteristic is consistent with the fact that IGFBP-rPs seem to be involved in varied biological processes in invertebrate species with no AGH (metabolism, immunity, growth...) (N. Li et al., 2012; Mulenga and Khumthong, 2010; Wang et al., 2016, 2015). The crustacean IGFBP-rPs, due to their additional interaction with the AGH, are however the first ones potentially involved in sexual differentiation. Yet, the exact function of IGFBP-rP1 is still difficult to assess.

In crustacean isopods, using mostly the common woodlouse Armadillidium vulgare as a model species, the sexual development has been extensively studied since the late 1950's, revealing the precise anatomical sequence of male gonad differentiation that begins after the third moult following the release of the larvae from the female ventral pouch (stage 4) (Suzuki and Yamasaki, 1995). Moreover, the male differentiation seems to be especially sensitive and is often altered in isopods, leading to numerous pathological phenotypes such as various intersex individuals (Legrand and Juchault, 1986; Rigaud and Juchault, 1998). Notably, some strains of the well-known bacteria Wolbachia, a common endosymbiont of woodlice, can alter the sexual differentiation of their hosts (Bouchon et al., 1998). These strains, known as feminizing *Wolbachia*, have drawn attention as they induce the differentiation of genetic male larvae into functional females and occasionally into partially feminized males, called male intersexes. In the functional females induced by the presence of Wolbachia, the androgenic glands do not differentiate so that the AGH is not expressed at all. Besides, these infected females are refractory to the action of the AGH, as androgenic gland grafts do not masculinize them. In contrast, the male intersexes become refractory in the course of male differentiation, which results in mixed sexual characters, in particular the coexistence of hypertrophied androgenic glands and female genital apertures (Legrand and Juchault, 1986; Rigaud and Juchault, 1998). In this context, all the molecular partners of the AGH are putative targets of the feminizing Wolbachia (Juchault and Legrand, 1985). This includes IGFBP-rP1, as well as the transmembrane tyrosine kinase receptors recently described in decapods and now identified in A. vulgare (Herran et al., 2018). Interestingly, some interaction between Wolbachia and the ISP has been described in arthropods (Ikeva et al., 2009; Grönke et al., 2010). To date, the molecular investigations of the isopod sexual differentiation are however limited to the AGH, so that subsequent potential alterations in this pathway are not known on the molecular scale either. In this context, the discovery of IGFBP-rP1 in decapods thus raises several questions relating to its existence and function in isopods.

To tackle these issues, we performed the first characterisation of an isopod IGFBP-rP1 (Av-IGFBP-rP1). Its affiliation to the IGFBP-rP family was first established by structural analyses. We then investigated the expression pattern of this gene among tissues of adult males and females and looked for differential expression during development, in both *Wolbachia*-infected and uninfected lineages of *A. vulgare*. Av-IGFBP-rP1 displayed a broad and constitutive expression, suggesting a major functional importance. Silencing experiments of the AGH and of the IGFBP-rP1 confirmed their implication in the physiology of the androgenic glands, as some got hypertrophied following

the inhibition of these genes. The evolutionary conservation of IGFBP-rP1 was thus investigated in the Isopoda order. Using a transcriptomic approach, as well as RT-PCR and direct Sanger sequencing, we identified 68 IGFBP-rP1 sequences, one for each of the studied species. Homology to IGFBP-rP1 was confirmed by phylogenetic reconstructions. Negative selection was further demonstrated with dN/dS analyses. Altogether, our results showed that this gene is a key element of the ISP in Isopoda, although not responsible on its own for the different developmental process between male and female isopods and probably not the target of *Wolbachia*.

## 2. Material and methods

#### 2.1. Animals

Tissue and developmental expression studies were performed on two lineages of the common woodlouse (*A. vulgare*) coming from our laboratory rearing: the lineage harvested in Celles/Belle (France) in 1991, which is infected by the wVulC *Wolbachia* strain and the *Wolbachia*-free lineage, harvested in Nice (France) in 1967. Tissues from intersexes were collected from individuals of the *Wolbachia*-infected lineage or intersexes generated from males of the uninfected lineage that were previously experimentally infected with *Wolbachia* (Juchault and Legrand, 1985; Rigaud et al., 1991b). The silencing experiment was performed with the uninfected lineage only. For the phylogenetic analysis, we included isopod species for which RNAseq data were already available and species either sampled from our laboratory rearing or collected from various field sites in 2015 and 2016. These species represent a wide diversity of ecology (soil-dwelling, terrestrial, coastal, freshwater and marine species) and mostly a diversity in taxonomic ranks (Table S1).

#### 2.2. RNA extractions

To study the spatial expression of Av-IGFBP-rP1, six to eight *A. vulgare* adults for each sex (male, female, intersex) and each lineage were dissected in Ringer's solution (394 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>/2H<sub>2</sub>O, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>). The following tissues were gradually pooled and frozen in liquid nitrogen: hemolymph (HE), brain (BR), nerve cord (NC), emptied digestive tract (DT), digestive *caeca* (CK), muscle/fat (MF), legs (LE) and the different parts of the gonads (ovaries (OV) in females; androgenic glands (AG), utricles (UC), seminal vesicles (SV), *vasa deferens* (VD) and sperm (SP) in males). All the dissections were repeated three times independently (four times for males of the uninfected lineage), requiring around a hundred animals in total. For all the other analyses (RT-PCR as well as RNAseq and RNAi experiments), whole animals were used. To study

Av-IGFBP-rP1 expression during development, we sampled pools of *larvae* just after birth (i.e. when they were released from the ventral pouch, week 0), and one, two, three weeks later. From the fourth week on, juveniles were sampled individually and measured to infer their developmental stage (4-8) according to (Suzuki and Yamasaki, 1995). Both dissected tissues or whole animals were homogenized using a Vibra Cell 75185 sonicator (amplitude of 35%). Total RNA was then extracted using the RNeasy kit (Qiagen) or TRIzol® reagent and treated with RNase-free DNase I (Qiagen), according to the manufacturer's protocols. After quantification with NanoDrop<sup>™</sup> technology, the RNAs were stored at -80°C.

#### 2.3. RT-PCR and RT-qPCR

Reverse transcriptions were achieved on 500 ng of the previously extracted total RNA using the SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) following the supplier's instructions. Degenerated primers (Sigma-Aldrich) were manually designed using the three sequences of the IGFBP-rP1 of *A. vulgare, A. nasatum* and *Porcellio dilatatus* (Table S2), identified by TBLASTX in the corresponding public cDNA libraries, using Cq-IGFBP as query. RT-PCR were carried out using Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase and annealing temperatures varying between 45°C and 60°C according to the characteristics of the primers (Table S2), with an elongation time of 60 s. The amplification products were separated on 1.5% agarose gels and visualised with ethidium bromide and UV.

RT-qPCR were performed using Applied Biosystems<sup>TM</sup> SYBR<sup>TM</sup> Green master mixes (5 µL Sybergreen 5X, 0.5 µL of each primer, 2.5 µL cDNA and sterile water to 10 µL). Primer sequences are given in Table S2. The reactions were performed on a LightCycler<sup>®</sup> 480 System (Roche), using the following program: 95°C for 10 min followed by 45 cycles of (95°C for 10 s, 60°C for 10 s, 72°C for 20 s). Melting curves were established (65°C-97°C) to check the specificity of the PCR products. The Av-IGFBP-rP1 expression levels were analysed relatively to the ribosomal protein RbL8 expression (Chevalier et al., 2012), using LightCycler<sup>®</sup> 480 Software. Statistics on the tissue and development RT-qPCR data were calculated using the Kruskal-Wallis test, complemented by Dunn's *post-hoc* tests implemented in the R package PMCMR (Pohlert, 2014). The resulting p-values were adjusted using Holm's correction in order to take multiple comparisons into account. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to assess the efficiency of the gene silencing in the RNAi experiment.

#### 2.4. Sequencing

The 26 IGFBP-rP1 sequences amplified by RT-PCR were treated with 2  $\mu$ L of EXOAnP

solution (0.05 µL of exonuclease I (1 u), 0.1 µL of AnP (0.5 u) and 1.85 µL of sterile water) at 37°C for 1 h. Enzymes deactivation was achieved at 80°C for 20 minutes. New PCR using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) were then performed (3 µL of PCR product, 0.5 µL of BDT, 0.32 µL of primer, 3 µL of 5X buffer and sterile water to 15 µL). The products of the PCR were precipitated with a mix of 50 µL ethanol (100%), 2.2 µL NaOAc (3M, pH 5.2) and 10 µL water. Pellets were washed with 70% ethanol and solubilized in deionized formamide. Finally, DNAs were sequenced on both strands using Sanger method. The final 68 IGFBP-rP1 sequences were deposited in GenBank.

#### 2.5. RNA silencing

Av-AGH and Av-IGFBP-rP1 cDNAs were first generated by RT-PCR as described above, with specific primers (Table S2). Amplicons were purified using the OIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and then cloned using the pGEM®-T Easy Vector system, according to the supplier's instructions. Inserts were checked with Sanger sequencing as previously described. Single-stranded RNAs were generated in both directions, overnight, at 37°C the using MEGAscript T7 Kit (Ambion), treated with TURBO DNase (15 minutes at 37°C), precipitated with LiCl, washed with 70% ethanol and dissolved in nuclease-free water, according to manufacturer's instructions. Hybridisation of forward and reverse RNAs was performed first for 15 minutes at 70°C followed by 10 minutes at room temperature. Double-stranded RNAs (dsRNAs) were quantified and diluted to 1 µg/µL. Adult males were injected with 1 µL of dsRNA (Av-AGH or Av-IGFBP-rP1) or 1 µL of nuclease free water (vehicle group), to account for the trauma response, ageing and environmental rearing conditions. These injections were performed using a Hamilton syringe through a hole drilled on the lateral side of the fifth segment of the pereion. Another control group was not injected at all. At one, four, 12 and 28 weeks post-injection, five animals of each group were frozen individually in liquid nitrogen for RNA extraction and another two were dissected to investigate the morphology of the androgenic glands (six per males) and the presence of female genital apertures.

#### 2.6. Bioinformatics

The assembly of both newly generated and already published reads was achieved on our servers (Table S1). The raw reads were first filtered with Trimmomatic (leading and trailing quality of 5, minimum length of 36 bp, Illumina adapters removed) (Bolger et al., 2014). The trimmed data were then assembled with IDBA-tran assembler (maximum k-mer size of 100 bp) (Peng et al., 2013). The IGFBP-rP1 sequences were searched locally with TBLASTX, using first Cq-IGFBP and then Av-IGFBP-rP1 as queries.

The post-translational modifications were predicted using CBS prediction servers (SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011), NetPhos 3.1 (Blom et al., 1999), ProP 1.0 (Duckert et al., 2004)). The conserved domains of the IGFBP-rP1 sequences were obtained using the Conserved Domain Search service (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</u>) (Marchler-Bauer et al., 2015). Coding sequences were retrieved with ORF Finder from the Sequence Manipulation Suite (<u>http://www.bioinformatics.org/sms2/orf\_find.html</u>). Sequences logos were drawn using the WebLogo toolsite (<u>http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi</u>) (Crooks et al., 2004).

Phylogeny reconstructions were carried out using the programs implemented in Seaview (Gouy et al., 2010). Nucleotidic coding sequences were aligned using Muscle (Edgar, 2004). The final set of sites was determined with Gblocks (Castresana, 2000; Talavera and Castresana, 2007). The reconstructions themselves were performed using PhyML (maximum likelihood method (Guindon and Gascuel, 2003)), using GTR+I+G model of evolution as determined using jModelTest 2.1.9 (Darriba et al., 2012; Guindon and Gascuel, 2003). Branch support was estimated with both the non parametric Shimodaira-Hasegawa-like approximate Likelihood-Ratio Test (SH-like aLRT) (Anisimova and Gascuel, 2006; Guindon et al., 2010) and the bootstrap proportions (1000 repetitions) (Felsenstein, 1985). Branch supports were further checked with a bayesian method using BEAST 1.8.4 (Drummond et al., 2012), using the same model of evolution, an uncorrelated relaxed clock (log normal) and a run of 50,000,000 generations (log sampling every 1000 generations). Posterior probabilities (PP) were retrieved using TreeAnnotator.

Evidence for natural selection in our IGFBP-rP1 dataset was investigated using PAML (Yang, 1997, 2007). An overall dN/dS value was calculated with codeml (seqtype=1, model=0). A dN/dS value was calculated for each site with the tools available on the Datamonkey server (SLAC, FEL, REL (Kosakovsky Pond, 2005; Murrell et al., 2012)) (http://datamonkey.org) (Pond et al., 2005; Pond and Frost, 2005).

#### 3. Results

#### 3.1. Av-IGFBP-rP1 sequence and structure

With a transcriptomic approach using publicly available reads, we identified in *A. vulgare* a unique transcript coding for the decapod homologue of IGFBP-rP1, named Av-IGFBP-rP1. Its sequence was confirmed using the Sanger method, revealing a coding sequence of 744 bp (247 amino acids). A signal peptide was predicted, with a cleavage site between positions 22 and 23. Two sites of phosphorylation (Ser145, Ser232) but no R/K cleavage site were predicted.

In keeping with descriptions in Decapoda, three conserved domains were predicted in Av-IGFBP-rP1. It included the IB domain itself, to which the ligand binds, followed by the Kazal domain (a serine protease inhibitor) and finally an Immunoglobulin I-set domain (Fig. I.1).

#### 3.2. Expression analysis of Av-IGFBP-rP1

The spatial expression of the Av-IGFBP-rP1 mRNA was investigated by RT-PCR (Fig. I.S1) and RT-qPCR (Fig. I.2) in adult *A. vulgare*. Av-IGFBP-rP1 was expressed in all the individuals, regardless of their sex (male, female or male intersex) or their *Wolbachia*-infection status. In all cases, we found a broad expression of Av-IGFBP-rP1 in the analysed tissues. The RT-qPCR analyses in the uninfected lineage showed that this expression was especially strong in the nerve cord (NC), the muscles and fat (MF), the digestive tract (DT) and the ovaries (OV) (Fig. I.2A). In contrast, this expression was especially weaker in the digestive *caeca* (CK). The same expression pattern was observed in the *Wolbachia*-infected lineage (Fig. I.2B) and in the intersexes generated experimentally by injecting *Wolbachia* in uninfected males (Fig. I.2A).

The expression of the Av-IGFBP-rP1 mRNA was also investigated in whole individuals at each developmental stage by RT-qPCR (Fig. I.3). In the uninfected lineage, Av-IGFBP-rP1 gene expression was elevated after birth (week 0), decreased after the first and second weeks and remained stable until adulthood (stages 4-9) (Fig. I.3A). A similar expression pattern was observed during the development in the *Wolbachia*-infected lineage (Fig. I.3B). Overall, this gene was found continuously expressed throughout development.

#### 3.3. Silencing of Av-IGFBP-rP1 and Av-AGH

To confirm the implication of Av-IGFBP-rP1 in the ISP, its cross-talk with Av-AGH was investigated using a RNA silencing approach (Fig. I.4). One week post-injection (wpi) of the Av-AGH dsRNA, the expression of Av-AGH was successfully inhibited by 98% compared to the vehicle group (p=0.001). The silencing efficiency was still of 95% (p=0.001), 89% (p=0.002) and 64% (p=0.032) at four, 12 and 28 wpi, respectively (Fig. I.4A). In the same way, the expression of Av-IGFBP-rP1 in the IGFBP-rP1 silencing experiment was reduced by 88% (p=0.001), 86% (p=0.001), 94% (p=0.002) and 92% (p=0.008) at one, four, 12 and 28 wpi, respectively (Fig. I.4B). Whereas the inhibition of the Av-AGH gene did not impact the expression of the Av-IGFBP-rP1 gene (Fig. I.4C), the silencing of Av-IGFBP-rP1 gene induced an increase in the Av-AGH mRNA level, which significantly reached a two-fold increase at four (p=0.019) and 12 wpi (p=0.002), and an up to a seven-fold increase at 28 wpi (p=0.016) (Fig. I.4D).

The impact of these two silencing experiments on the gonad phenotypes was also investigated (Fig. 5). No altered phenotype could be observed one week after the silencing of both genes. Four weeks after AGH dsRNA injection, half of the investigated androgenic glands appeared hypertrophied (bigger and more nodular) (5/10) (Fig. 5B). Four weeks after IGFBP-rP1 dsRNA injection, hypertrophied androgenic glands also began to appear (2/10) (Fig. 5E). At 12 and 28 wpi, we observed hypertrophy for all of the androgenic glands in the AGH silencing experiment (12/12) (Figs. 5C and 5D), as well as the appearance of female genital apertures in half cases (Fig. 5H). In contrast, at 12 and 28 wpi in the IGFBP-rP1 silencing experiment, the androgenic glands seemed normal (hypertrophy: 0/12 and 0/9) in the two dissected individuals (Figs. 5F and 5G), which did not display female genital apertures either (Fig. 5I).

#### 3.4. IGFBP-rP1 in Isopoda: sequences, structure and evolution

Considering the constitutive expression of the IGFBP-rP1 gene in the different tissues and during the development of *A. vulgare*, as well as the consequence of the silencing experiment, we suspected an essential role of Av-IGFBP-rP1 in the ISP and thus investigated its global conservation in isopods. IGFBP-rP1 sequences were obtained using two complementary approaches: by RT-PCR with degenerated primers and by using both public and newly generated cDNA libraries. After the sequencing of the PCR fragments and assembly of the RNAseq data, a total of 68 IGFBP-rP1 sequences was obtained from isopod species belonging to 18 different families: five consisting of aquatic species and 13 comprising terrestrial species (Table S1).

All of the sequences shared the canonical domains of this protein: the IB domain, the Kazal domain and an Immunoglobulin domain (Ig, Ig 3) or Immunoglobulin I-set domain (Fig. I.6). The open reading frame length varied between 720 bp (239 amino acids) for Bragasellus peltatus and Proasellus ibericus and 756 bp (251 amino acids) for Armadillo officinalis. About 68% (26/38) of the terrestrial isopods (Oniscidea) displayed an IGFBP-rP1 coding sequence of 744 bp (247 amino acids) (Fig. I.6). Decapod IGFBP-rP1 sequences have a length within the same range, from 747 bp (248 amino acids) for Cq-IGFBP but up to 771 bp (256 amino acids) for Sagmariasus verreauxi. In isopods, 74 amino acids were found completely conserved in all the sequences (Fig. I.6). They constituted ~30% of the total sequence and were especially represented in the Ig domain (47/101). Among them, ~25% were cysteines (18 residues), mainly distributed in the IB domain (10/60) and the Kazal domain (4/39) but rare in the Ig domain (2/101) or out of the conserved domains (2). Several conserved motifs are described as being implicated in ligand binding: (R/L)xLxxLL in humans (Imai et al., 2000; Hong et al., 2002), RxLxxL in decapods (Rosen et al., 2013) and CGCCxxC in vertebrates (Hwa et al., 1999; Daza et al., 2011). We found in isopod IGFBP-rP1 the same CGCCxxC determinant as the one identified in vertebrates (Fig. I.6, framed in green). In contrast, the homologue region of the decapod motif RxLxxL (Fig. I.6, framed in blue) did not correspond to the same sequence. However, a close and overlapping region was found to be similar to the described motif (Fig. I.6, framed in orange), even if not fully conserved: (I/V)xLxxL (or (I/V)xxLxL in *Proasellus sp.*). In this conserved determinant, the second conserved leucine in Isopoda was found homologous to the first conserved leucine of Decapoda.

A phylogeny of all the IGFBP-rP1 sequences in isopods was reconstructed using the whole coding sequence (Fig. I.7). The phylogenetic tree of the gene was globally congruent with the known phylogeny of isopod species. In particular, the IGFBP-rP1 of terrestrial isopods clustered together, which is consistent with the monophyly of Oniscidea. More extensively, the monophyly of every isopod family was respected with two exceptions. Indeed, our two representatives of Platyarthridae (Fig. I.7, in red) as well as the four species of Philoscidae (Fig. I.7, in purple) did not cluster together. The monophyly of species classified in Philoscidae is however deemed unlikely (Schmidt, 2008). Because of the modularity of the IGFBP superfamily members, we also constructed phylogenies of the different IGFBP-rP1 conserved domains separately, to check whether they evolved similarly or not. However, considering the very high conservation of these domains (e.g. half of the amino acids in the Ig domain strictly conserved in Isopoda), the resolution of these trees was rather poor (data not shown).

To confirm the apparent good conservation of the isopod IGFBP-rP1, we calculated the dN/dS ratios for the whole sequence set and then for each site of the coding sequence. The overall dN/dS ratio of the isopod IGFBP-rP1 alignment was between 0.12 (codeml, model 0) and 0.17 (SLAC and REL), implying a strong purifying selection on this sequence. This was further confirmed by SLAC, FEL and IFEL methods that predicted 177 (73%), 191 (79%) and 173 (72%) negatively selected codons, respectively, 166 (69%) of these codons being found under purifying selection by these three methods.

## 4. Discussion

In this study, we identified and described the first molecular partner of the AGH in Isopoda, namely the malacostracan order in which this unique sex hormone was initially identified and characterized (Hasegawa et al., 1987; Martin et al., 1990). In the model *A. vulgare*, we found Av-IGFBP-rP1 expressed constitutively, without significant difference between males, females or intersex individuals. The lack of clear differential expression between males and females in isopods is consistent with the fact that *Wolbachia*-uninfected females are still responsive to the AGH, as shown by the grafts of androgenic glands or the AGH injections (De Lattin and Gross, 1953; Legrand, 1954b; Katakura, 1959; Katakura and Hasegawa, 1983). Yet, the expression of IGFBP-rP1 in females could be surprising considering its putative role in male differentiation and that they do not express the AGH. Actually, it is likely that IGFBP-rP1 ensures several functions simultaneously

within the organism, including ligand-independent functions (Hwa et al., 1999) and functions associated with additional ligands. Indeed, the AGH is not the only known member of the ILP family in Crustacea, and thus, not the only candidate ligand for IGFBP-rP1. For instance, four ILPs had already been discovered in 2011 in the branchiopod crustacean *Daphnia pulex* (Colbourne et al., 2011; Dircksen et al., 2011) and two others were described in the decapod *Sagmariasus verreauxi* in 2015 (Sv-ILP1, a possible homologue of DILP7) (Chandler et al., 2015) and in 2017 (Sv-ILP2, a possible homologue of DILP8) (Chandler et al., 2017b). To this date, the function of these ligands cannot be investigated in Isopoda as no homologue of ILP1 or ILP2 was described in any isopod species. Lastly, the exact interactions between the mobile IGFBP-rP1 and its target tissues are not described yet in crustaceans, so that we cannot exclude variations in its function according to the targets, such as feeding activity in the midgut (Huang et al., 2016) or ovarian development (Huang et al., 2015a, 2017b) for instance.

The analysis of Av-IGFBP-rP1 expression in the different tissues revealed that its spatial expression in adults was very broad, despite the variation in intensity. This is consistent with previous descriptions in decapod models in which IGFBP-rP1 is also expressed in all of the investigated tissues but hemocytes in Scylla paramamosain (Rosen et al., 2013; Chandler et al., 2015; Huang et al., 2015a, 2016; F. Li et al., 2015a; Song et al., 2018). More precisely, we found the highest Av-IGFBP-rP1 expression in the nerve cord, muscles and digestive tracts, and the lowest expression in the hemocytes, testis and most notably in the digestive *caeca*. A similar expression level of IGFBP-rP1 is reported in the hepatopancreas (i.e. digestive caeca) of Callinectes sapidus and Eriocher sinensis (Huang et al., 2016; Song et al., 2018), whereas the other decapod IGFBPrP1s display a high gene expression in this tissue. Contrary to Av-IGFBP-rP1, all of them also show an elevated expression in the testis. It seems however difficult to conclude on functional differences between these homologues on the basis of their gene expression patterns only. Considering both its broad expression and its role as a binding protein, circulating freely in the hemolymph, it seems plausible that IGFBP-rP1 protein is ubiquitous in the organism despite local transcriptional variations. Besides, this broad spatial expression pattern is consistent with the fact that the AGH action is not restricted to the male gonads, as this hormone indeed acts on several secondary sex characters (copulatory organs (Suzuki and Yamasaki, 1991; Takewaki and Nakamura, 1944), brushes on the pereiopods, behaviour (Barki et al., 2006, 2003; Karplus et al., 2003)) and is expressed, in some decapod species, by several organs besides the androgenic glands (ovaries, hepatopancreas, nerve cord) (S. Li et al., 2012; Chung, 2014; Huang et al., 2014; F. Li et al., 2015a). Likewise, the broad occurrence in the organism is in line with IGFPB-rP1 binding several ILPs with different spatial expression profiles (e.g. Sv-ILP1, Sv-ILP2, Sv-IAG; (Chandler et al., 2015, 2017b)).

We also investigated the differential gene expression of Av-IGFBP-rP1 during A. vulgare development. In crustaceans, a similar analysis was performed on *Macrobrachium nipponense* only, in which Mn-IAGBP transcription tends to the increase, particularly at the beginning of sexual differentiation (F. Li et al., 2015a). By contrast, we observed a significant decrease of Av-IGFBPrP1 expression after birth, followed by a relatively constant expression. Moreover, the Av-IGFBPrP1 expression patterns between males and females and between infected and uninfected lineages were similar. This suggests that Av-IGFBP-rP1 is required throughout the life of the animal but that other factors may account for the different developmental paths taken from stage four on by the males and the females or feminized genetic males. Despite the absence of differential gene expression patterns, there are other ways to modulate IGFBP-rP1 activity besides variations of transcription intensity. First, the amount of proteins could be regulated at the translation level, which would require quantifying the IGFBP-rP1 protein. Then, the responsiveness of the different tissues, in particular the gonads, may also fluctuate: undifferentiated gonads may not interact in the same way with IGFBP-rP1 during development or according to their Wolbachia-infection status. Further studies should also investigate the affinity of isopod IGFBP-rP1 for its ligand in different contexts. IGFBP-rP1 pull-down combined with AGH antibodies may reveal affinity variations between sexes or between infected and uninfected lineages.

In that respect, a role of IGFBP-rP1 in the sex differentiation cannot be excluded, particularly since its implication in the AGH pathway is now well established in decapods (molecular interaction, modelling, silencing...). The isopod model also appeared particularly wellsuited for the gene silencing approach, as only one injection of Av-AGH or Av-IGFBP-rP1 dsRNA could successfully inhibit the expression of the target genes for at least six months. This way, the implication of Av-IGFBP-rP1 in the AGH pathway was also confirmed in Isopoda with RNAi experiments. Indeed, both Av-AGH and Av-IGFBP-rP1 knock-down could induce the hypertrophy of the androgenic glands, which is also observed in naturally Wolbachia-induced intersexes. However, only the silencing of the Av-AGH induced the appearance of female genital apertures like in intersexes, leading to a more feminized phenotype. Moreover, the silencing of the Av-AGH did not affect the transcriptional level of Av-IGFBP-rP1, whereas the silencing of the latter induced the overexpression of the Av-AGH gene. Interestingly, the genetic interactions between Av-AGH and Av-IGFBP-rP1 are not consistent with the observations on *M. nipponense*, in which Mn-IAGBP silencing reduces the transcriptional level of Mn-IAG in the androgenic glands and conversely (F. Li et al., 2015a). To better understand the divergent results, it would be interesting to know whether the authors also observed altered phenotypes of the androgenic glands during the Mn-IAGBP

silencing experiment.

The importance of IGFBP-rP1 in isopod biology was finally considered on the evolutionary scale. In the whole Isopoda order, each of the 68 studied species, both aquatic and terrestrial, displayed a single sequence of IGFBP-rP1. All of them featured the three same conserved domains already described in decapods (Rosen et al., 2013; Chandler et al., 2015; Huang et al., 2015a, 2016; F. Li et al., 2015a; Song et al., 2018). This description, associated with the monophyly of this gene in all Metazoa (Huang et al., 2015a), definitely proves that, despite the varying nomenclature, all homologue genes identified in crustaceans derived from only one ancestral sequence. Furthermore, the various sequences quite grouped according to their taxonomic origin in the phylogenies, both on the isopod (present study) or metazoan scales (Chandler et al., 2015; Huang et al., 2015a, 2016). This is inconsistent with the observation of Li *et al.* (2015) regarding a clade gathering vertebrate and arachnid sequences, which can be explained by the absence of tree root in their analysis. Our study, in addition with the purifying selection brought out by the dN/dS analyses, strongly suggests that the function of the IGFBP-rP1 has been well conserved during malacostracan evolution. This is also supported by the conservation in the isopod sequences of most of the negatively charged amino acids in the N-terminal region of IGFBP-rP1 identified in Decapoda to be involved in electrostatic interaction with the ligands (Chandler et al., 2017b).

Studies on the evolution of IGFBP1-6 in vertebrates already revealed a complicated scenario although they are all composed of the same two conserved domains and form a clear monophyletic group (Daza et al., 2011). By contrast, the evolutionary story of the IGFBP superfamily in invertebrates appears even trickier to decipher, all the more so because various proteins sharing partial similarity have now been identified in this superfamily. In Hexapoda for instance, the gene called IGFBP7 but also known as ImpL2 (Ecdysone-inducible gene L2) displays only the Ig domain, so that only this part of the sequence is homologue to the other members of the IGFBP-rP1 family (Bader et al., 2013). This receptor is however able to bind ILPs (Bader et al., 2013; Honegger et al., 2008). The Insulin-related peptide-Binding Proteins (IBPs) display only Ig domains as well, and are also able to bind several ILPs, including vertebrate ones (Gao et al., 2012; Sloth Andersen, 2000). Rosen et al. (2013) reported ImpL2 and IBPs to be, together with Cq-IGFBP, three IGFBP homologues but their structural domains clearly differ, explaining why they were excluded in broader analyses such as in (Huang et al., 2015a). In the same way, Single Insulin Binding Domain proteins (SIBDs), as their name implies, only display the IB domain, like neuroparsins (NP), which are also invertebrate peptides with only the IB domain (Badisco et al., 2007). All these proteins (IGFBP, IGFBP-rP, IBP, ImpL2, NP, SIBD) are visibly related, yet distantly (Rodgers et al., 2008). But considering the divergence between their sequences and given that none of the conserved domain is shared by all of them, establishing global phylogenies of this superfamily by classical means is impracticable, all the more so when exon shuffling events are likely to be involved (Rodgers et al., 2008).

The high conservation of the IGFBP-rP1 sequences in malacostracans, as reflected by the same transcript structure and the close homology, suggests that Av-IGFBP-rP1 is a key element of the ISP, which plays the same role previously described with the decapod IGFBP-rP1, that is the binding of the AGH, among other ILPs. However, the different IGFBP-rP1 expression patterns during development and the different consequences of the IGFBP-rP1 silencing experiments also suggest that its exact function is not that well conserved between the decapod and isopod models. Further studies on the sexual differentiation in Isopoda will likely focus on a more direct evidence of the interaction between the IGFBP-rP1 and the AGH, as well as a more global integration of these two interacting molecules in the ISP. Indeed, several other promising binding or receptor proteins of ILPs have now been characterized in crustaceans. Firstly, SIBDs have been described in several decapod species, in which they were thought to be involved in the immune response (Castellanos et al., 2008; Gai et al., 2010) but likely ensure several functions (Chandler et al., 2015). Lastly, new transmembrane receptors of the AGH were recently described in three decapod species: the Tyrosine Kinase Insulin-like Receptors (TKIR), also called IAG receptors (IAGR) (Aizen et al., 2016; Sharabi et al., 2016; Guo et al., 2018). Two of these receptors have just been identified in the isopod species *P. beticus* and *A. vulgare* (Herran et al., 2018), whereas the AGH remains the only ILP identified in this order so far.

#### Acknowledgements

We are thankful to Alexandra Lafitte, who is responsible for the laboratory husbandries and to Daniel Guyonnet, who is in charge of the Sanger sequencing platform. This study was supported by the French National Centre for Scientific Research (CNRS), the University of Poitiers (France), the 2015–2020 State-Region Planning Contract and the European Regional Development Fund. The work of B.H. is funded by a PhD fellowship from the French Research Ministry.



<u>Figure 1.S1</u>: Tissue expression of the Av-IGFBP-rP1 mRNA by RT-PCR. The following tissues were dissected from *A. vulgare* adults of each sex (F: females, M: males, iM: male intersex) from uninfected (Wo-) and *Wolbachia*-infected (Wo+) lineages. AG: androgenic glands, BR: brain, CK: digestive *caeca*, DT: digestive tract, HE: hemocytes, MF: muscle and fat, NC: nerve cord, OV: ovaries, SV: seminal vesicle, UT: utricles, VD: *vas deferens*.

<u>Table 1.S1</u>: Species for which an IGFBP-rP1 sequence was obtained using RT-PCR or RNAseq. GenBank accession numbers are given for the cDNA libraries assembled using publicly available reads and for all IGFBP-rP1 sequences identified in this study.

N°	Family	Species	Origin	RT- PCR	RNAseq	SRA accession n°	IGFBP-rP1 GenBank access n°
1	Armadillidae	Armadillo officinalis	Rearing			SRX2600480	
2		Armadillidiwn albwn	Les Portes-en-Ré, France	v			MH880874
3		Armadillidium assimile	Rearing	v		SRX2600476	MH880875
4		Armadillidium depressum	Rearing	v		SRX2600477	MH880876
5		Armadillidium granulatum	Rearing	v		SRX2600478	MH880877
6		Armadillidium maculatum	Rearing	v		SRX2600479	MH880878
7	Armadillidiidae	Armadillidium nasatum	Rearing	v		SRX564993 + SRX564994	MH880879
8		Armadillidium simoni	Rearing	v		SRX2600482	MH880880
9		Armadillidium siculorum	Rearing	v		SRX2600481	MH880881
10		Armadillidium tunisiense	Rearing	v		SRX2600483	MH880882
11		Armadillidium versicolor	Rearing	v		SRX2600484	MH880883
12		Armadillidium vulgare	Rearing	v		SRX564996 - SRX565004	MH880884
13		Eluma caelatum	Rearing	v		SRX2600486	MH880885
14		Asellus aquaticus	Purchased from Aqualiment		v	SRX1097282-83-86-90	MH880900
15	Asellidae	Bragasellus peltatus	SRA			SR 4- ERD015221	
16-36		Proasellus sp	SRA			BioProject: PRJEB14193	
37	Balloniscidae	- Balloniscus sellowi	Rearing		v		MH880901
38	Chaetiliidae	Givetonotus antarcticus	SRA			SRR4017484 + SRR4017485	
39	Cylisticidae	Colisticus convexus	Rearing	v			MH880886
			St-Georges-d'Oléron				
40	Idoteidae	Idotsa baithica	France			SR3C2458835	
41	Janiridae	Jaera hopeana	La Rochelle, France		v		MH880902
42	Ligidae	Ligia exotica	SRA			SRX1712529; DRX049402	
43	-	Ligia oceanica	La Teste-de-Buch, France		v		MH880903
44	Oniscidae	Oniscus asellus	Rearing	v		SRX2600488	MH880887
45		Atlantoscia floridana	Rearing		v		MH880904
46	Dhilosciidaa	Chaetophiloscia elongata	Rearing			SRX2600485	
47		Philoscia affinis	Cazaux, France	v			MH880888
48		Philoscia muscorum	Amberre, France	v		SRX2600489	MH880889
49	Distvarthridae	Platvarthrus hoffmannseggi	Pessac, France	v			MH880890
50	T haty a latitude	Trichorhina tomentosa	Insectmaster		v		MH880905
51		Porcellio dilatatus dilatatus	Rearing	v			MH880891
52		Porcellio dilatatus petiti	Rearing	v			MH880892
53		Porcellio dispar	Rearing	v		SRX2600490	MH880893
54	Dorcellionidae	Porcellio laevis	Rearing	v		SRX2600491	MH880894
55	Porcellionidae	Porcellio orarum	Rearing	v			MH880895
56		Porcellio scaber	Rearing	v		SRX2600493	MH880896
57		Porcellionides cingendus	Ste-Marie-de-Ré, France	v			MH880897
58		Porcellionides pruinosus	Rearing	v		SRX2600492	MH880898
59		Dynamene bidentata	St-Georges-d'Oléron, France		v		MH880906
60	Sphaeromatidae	Sphaeroma serratum	La Rochelle, France		v		MH880907
61	1	Sphaeroma sp	SRA			SRX1712532	
62		Sphaeroma terebrans	SRA			SRX2255748	
63	Agnaridae	Orthometopon planum	Rearing	v			MH880899
64	Trachelipodidae	Trachelipus rathkei	SRA			SRX2514202 + SRX2514203	
65		Haplophthalmus danicus	Amberre, France		v		MH880908
66	Trichoniscidae	Trichoniscus pusillus	Amberre, France		v		MH880909
67		Helleria. brevicornis	Rearing			SRX2600487	
68	Tylidae	Tylos europaeus	Les Portes-en-Ré, France		v		MH880910

Experiment	Name	Sequence	Size	Tm (°C)
	IGFBP-rP1_F1	AAYATTGTGTCATMATAARAGG	22	55.3
DT DCD	IGFBP-rP1_R1	AAAATGGCAGTGATTTTATCTT	22	58.7
KI-PCK	IGFBP-rP1_F2	MTTWTCAAATTTTAACKATGGTAC	25	56.1
	IGFBP-rP1_R2	TCCTYTAATATTTCTTCACWGG	22	57.0
	qAv-IGFBP-rP1_F	TGTGGTTGCTGCGACATTTG	20	68.6
DT aDCD	qAv-IGFBP-rP1_R	CAGATCCACACACTTGGCCT		65.6
RI-qPCK	qAv-RbL8_F	AACTGGAGATAGAGGCAAA		57.0
	qAv-RbL8_R	CCACCAGCAGCAATTC	16	59.4
	(T7-)AH-F	(TAATACGACTCACTATAGGG) CTCGAAGATAAGTCCATTACG	21 (41)	66.4
DNIA	(T7-)AH-R	(TAATACGACTCACTATAGGG) CCTCGCGTTAAGTGAAATTCC	21 (41)	68.7
KINAI	(T7-)IGFBP-rP1_F	( <i>TAATACGACTCACTATAGGG</i> ) ATGGTACAAAAAATTTTATTTAGTT	25 (45)	60.8
	(T7-)IGFBP-rP1_R	(TAATACGACTCACTATAGGG) TCACTGGGCCTTTTCCTTTA	20 (40)	68.1

Table 1.S2: Primers used to amplify the IGFBP-rP1 sequences by RT-PCR, to amplify the Av-IGFBP-rP1 and RbL8 sequences by RT-qPCR and to amplify the Av-AGH and Av-IGFBP-rP1 sequences for gene silencing. The IGFBP-rP1 primers were designed to amplify only the cDNA and do not amplify genomic DNA.

# VI. Evolution de l'IGFBP-rP1 au sein des Crustacés

Nous avons vu chez les Isopodes que l'IGFBP-rP1 présente une forte conservation de sa séquence, soulignée par des traces de sélection purifiante et une évolution qui suit celle des espèces. Dans le cadre d'une collaboration avec Nicolas Cerveau (Georg-August-Universität, Göttingen), nous avons élargi l'étude de l'IGFBP-rP1 à l'échelle des Crustacés puis des Métazoaires, afin de voir jusqu'où ces conclusions peuvent se généraliser. La question d'une évolution spécifique relative à sa fonction dans la différenciation sexuelle des Malacostracés n'a en effet pas encore été résolue.

Nous avons établi une phylogénie comprenant 125 séquences d'IGFBP-rP1 de Crustacés (Fig. 1.8). Elle montre une topologie respectant bien la taxonomie des espèces généralement admise. En particulier, on observe la monophylie des séquences de Pancrustacés (sH-ALRT=0,98, BP=53, PP=0,79), et en particulier de Malacostracés (sH-ALRT=0,92, BP=87, PP=1,0), ainsi que celle de tous les ordres composant la classe (Amphipoda, Decapoda, Euphausiacea, Isopoda et Stomatopoda). De plus, les séquences de Malacostracés ne présentent pas de divergence marquée par rapport aux séquences du reste des Pancrustacés. Ceci suggère que l'évolution du gène a été homogène au sein de ce groupe, sans évolution majeure liée aux nouvelles fonctions dans la voie de signalisation de l'HA.

<u>Figure 1.8</u> : Phylogénie des séquences codantes d'IGFBP-rP1 à l'échelle des Métazoaires, avec emphase sur les Crustacés. Les séquences ont été alignées avec Muscle, puis les sites utilisés ont été sélectionnés grâce à Gblocks (173 acides aminés). L'arbre a été reconstruit par maximum de vraisemblance par PhyML (modèle LG) avec 1000 répétitions de *bootstrap*. La robustesse des branches a également été estimée par SH-aLRT et probabilités postérieures. Deux séquences d'IGFBP-rP10 (aussi appelé KazalD1) ont été utilisées pour enraciner l'arbre car elles présentent les mêmes domaines conservés que l'IGFBP-rP1 (en pourpre).



Évidemment, cette étude nécessite maintenant des analyses plus approfondies, en particulier en ce qui concerne l'évolution des motifs de liaison au ligand. Il serait également intéressant de s'intéresser à la modélisation 3D de ces protéines pour regarder quelles sont les charges exposées en surface. En effet, une étude pilote sur ce sujet a montré que chez les Décapodes, l'IGFBP-rP1 présente des résidus chargés négativement, complémentaires des charges positives des trois ILP identifiés dans leur modèle, tandis que les IGFBP1-6 (présentés à tort comme des homologues de IGFBP-rP1 dans leur article) présentent chez les Vertébrés des charges inversées (Chandler et al., 2017b). Des analyses de dN/dS viendront enfin compléter ce travail pour identifier les régions de la séquence évoluant sous sélection.

# **CHAPITRE 2**

# Caractérisation des récepteurs à insuline (IR1 et IR2)

Au sein des Crustacés Malacostracés, les deux premiers récepteurs à ILP de la famille des TK ont été identifiés en 2016 chez deux espèces de Décapodes (Sharabi et al., 2016; Aizen et al., 2016). Nous avons par la suite identifié deux récepteurs TK similaires chez *A. vulgare*, Av-IR1 et Av-IR2, ainsi que chez de nombreuses autres espèces de Crustacés. Nous avons alors étudié plus globalement le contexte évolutif de ces récepteurs à ILP. Ce travail a fait l'objet d'un article dans *General and Comparative Endocrinology* (Herran et al., 2018), joint en annexe. La première partie de ce chapitre correspond à une traduction en français de cette '*Short Communication*' (pour le matériel et méthodes correspondant, se référer directement à l'article), étendue d'analyses et d'une discussion complémentaires prenant en compte les publications parues depuis. La suite du chapitre traite de l'analyse de la structure et de l'expression des récepteurs Av-IR1 et Av-IR2 nouvellement identifiés chez *A. vulgare*, ainsi que des effets de leur extinction par ARN interférent (ARNi). Finalement, l'évolution de ces récepteurs a été étudiée au sein des Isopodes.

# I. Contexte évolutif des récepteurs à insuline

#### A. Introduction

Depuis 2016, un récepteur à ILP de la famille des TK a été identifié et fonctionnellement caractérisé chez la crevette *M. rosenbergii* (Mr-IR) (Sharabi et al., 2016) et ensuite décrit chez le homard *S. verreauxi* (Sv-TKIR) (Aizen et al., 2016). Dans les deux cas, il s'agit d'un récepteur présentant une structure typique de cette famille : deux domaines extracellulaires de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine TK intracellulaire (d'où le nom TKIR). L'implication de ce récepteur dans la voie de signalisation de l'HA a été établie de plusieurs façons. Premièrement, l'interaction moléculaire avec l'HA a été prouvée en utilisant une hormone recombinante, ce qui a permis d'induire *in vitro* la cascade de phosphorylations typique de ce récepteur (Aizen et al., 2016). Enfin, l'extinction par ARNi du récepteur provoque de plus des

altérations des caractères sexuels (hypertrophie des GA et dysfonctionnement de la spermatogenèse) (Sharabi et al., 2016). Cependant, une féminisation totale (changement de sexe des mâles en femelles) n'a pas pu être obtenue par cette méthode, contrairement à ce qui est observé par extinction de l'expression de l'HA (Ventura et al., 2012). L'implication de plusieurs récepteurs a donc été envisagée. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que trois IR auraient récemment été identifiés chez une autre espèce de Décapode, le crabe *E. sinensis*, les séquences n'étant malheureusement pas fournies (Fu et al., 2017). En outre, il ne peut pas être exclu que tous les récepteurs identifiés participent à plusieurs fonctions, notamment parce qu'ils sont aussi exprimés chez les femelles (au moins chez (Sharabi et al., 2016; Aizen et al., 2016)). Ils pourraient par exemple être impliqués dans le métabolisme des glucides, comme le suggère (Trapp et al., 2018) (l'auteur ne fournissant cependant pas de preuves directes mais seulement des variations de niveaux de phosphorylations). Une identification claire des récepteurs présents chez les Crustacés nous a parue indispensable avant d'entamer leur étude fonctionnelle chez notre modèle Isopode.

Une première phylogénie incluant Sv-TKIR parmi d'autres IR déjà identifiés de Métazoaires, confirme son appartenance à la famille des IR (Aizen et al., 2016). Les auteurs ont néanmoins relevé des groupements de séquences surprenants. L'IR du papillon Bombyx mori ne se rapproche par exemple pas des IR d'arthropodes mais plutôt de la séquence de Caenorhabditis elegans. De la même manière, Sv-TKIR ne se regroupe ni avec les IR de Daphnia pulex (Dappu-InR1-4, les seuls IR de Crustacés connus à l'époque de la publication), ni même avec ceux d'arthropodes mais plutôt avec ceux de plathelminthes. Les auteurs postulent que ces divergences de position entre Sv-TKIR et Dappu-InR1-4 résultent probablement de la "variabilité" intrinsèque des Dappu-InR. Ils suggèrent également qu'un seul IR existe en général chez les invertébrés, conformément à la littérature du moment. Des duplications conservées n'auraient eu lieu que chez les Vertébrés, donnant naissance à trois gènes (IR, IGFR et IRR) (Hernández-Sánchez et al., 2008). L'évolution divergente et les duplications d'IR de daphnies ont donc été considérées comme des "anomalies" (Aizen et al., 2016). Avec seulement ces deux espèces de Crustacés dans leur analyse, ces hypothèses ne pouvaient pas être vérifiées. De son côté, Veenstra (2016) a identifié six séquences supplémentaires d'IR chez des Décapodes mais n'a utilisé ni Sv-TKIR ni aucune séquence d'IR d'autres clades dans sa reconstruction phylogénétique. Cette analyse ne permet donc pas non plus de vérifier ces hypothèses ni d'explorer l'homologie et l'évolution de ces récepteurs.

Mon premier objectif a donc été de confirmer l'homologie entre ces récepteurs et ceux bien décrits chez le reste des Métazoaires. Pour confirmer leur appartenance à cette famille, les récepteurs phylogénétiquement voisins ont aussi été utilisés. J'ai ensuite tenté de clarifier la nomenclature assez hétérogène entre ces récepteurs. Mon dernier objectif a été d'étudier l'évolution

des récepteurs TK de l'HA en utilisant un jeu de séquences plus exhaustif, en particulier en ce qui concerne les Crustacés. Pour ce faire, j'ai assemblé *de novo* les données de séquençage massif RNAseq issues des nombreuses études sur les Crustacés, dont les Malacostracés pour lesquels la différenciation sexuelle est basée sur l'HA, ainsi que les Crustacés anciennement dits "inférieurs", chez lesquels l'HA n'est pas connue. Les domaines conservés ont été recherchés et comparés. Un effort particulier a enfin été fait pour chercher les éventuels paralogues ou récepteurs voisins qui pourraient expliquer l'absence de changement de sexe par ARNi.

#### **B.** Résultats et discussion

Une première phylogénie au périmètre large a été établie en utilisant les IR et les récepteurs voisins évolutivement au sein de la famille des récepteur à domaine TK (VKR, ALK, CCK, DDR, LTK, ROR, ROS) (Vanderstraete et al., 2013; Hunter, 2014), aussi bien de Vertébrés que d'invertébrés (Fig. 2.1, Table 2.S1). Cette analyse, associée à la comparaison des domaines conservés, confirme que Mr-IR et Sv-TKIR appartiennent à la famille des IR, qui forme bien un groupe monophylétique distinct des autres récepteurs à domaine TK. La famille de récepteurs la plus apparentée aux IR semble être celle des VKR. Il est à noter la séquence d'IR de *Zootermopsis nevadensis* utilisée dans la phylogénie de Aizen et al. (2016) se situe dans le groupe des VKR dans notre phylogénie, révélant une erreur d'annotation de la banque de données. Celle-ci est confirmée par l'analyse des domaines conservés : cette séquence contient en effet un domaine de liaison au ligand de type GABAb, caractéristique des VKR. Ceci explique pourquoi cet "IR" ne se situait pas avec les autres arthropodes dans la phylogénie publiée précédemment (Aizen et al., 2016). Cette séquence peut en revanche servir de groupe externe dans la phylogénie.

Pour explorer l'évolution des IR, nous avons cherché et trouvé des séquences de ce récepteur chez 22 espèces de Crustacés. Notre jeu de données contient ainsi des séquences de 13 espèces de Malacostracés (caractérisés par l'existence de la GA) et 9 espèces de non-Malacostracés (dont la différenciation sexuelle semble indépendante de l'HA). Pour représenter la diversité des Métazoaires, nous avons réutilisé l'essentiel des séquences précédemment utilisées par Aizen et al. (2016) (Table 2.S2).



<u>Figure 2.1</u> : Position phylogénétique des Mr-IR et Sv-TKIR récemment caractérisés au sein de la superfamille des récepteurs de type TK. L'arbre phylogénétique a été construit grâce à PhyML avec la méthode du maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*) et le modèle d'évolution LG. La robustesse des branches est indiquée par les valeurs de *bootstrap* (1000 répétitions), les valeurs de SH-aLRT et les probabilités postérieures (PP). Elles ont été réparties dans trois catégories : faiblement soutenu en rouge (*bootstrap* < 50, SH-aLRT < 0,75, PP < 0,75), moyennement soutenu en jaune (*bootstrap* entre 50 et 70, SH-aLRT et PP entre 0,75 and 0,95) et robuste en vert (*bootstrap* > 70 (Hillis and Bull, 1993), SH-aLRT et PP > 0,95 (Guindon et al., 2010)). L'échelle indique le nombre de substitutions d'acides aminés par site. Les groupes monophylétiques des IR et des VKR sont accentués en rouge et en bleu, respectivement. Mr-IR et Sv-TKIR sont signalés en gras.

Nous avons d'abord observé que les noms des séquences publiées forment une nomenclature relativement hétéroclite et dont la base évolutive n'est pas claire (Table 2.S2) : Insulin Receptor (InR ou IR), Insulin-like Receptor (aussi IR), Tyrosine Kinase IR (TKIR), Insulin-Like Peptide Receptor (ILPR), Insulin receptor Related Receptor (INSRR ou IRR), Insulin Growth Factor Receptor (IGFR), Insulin Receptors-like (IR-like) ou encore Insulin Receptor-Related protein-like (IRR-like). Dans le cas bien documenté de l'Homme, entre autres Vertébrés, il existe effectivement trois protéines indépendantes (IR, IGFR et IRR) depuis la double duplication, spécifique des Vertébrés, du gène ancestral (Hernández-Sánchez et al., 2008). Au contraire, malgré la nomenclature variable, la majorité des animaux ne présente encore qu'un seul gène de la famille des IR (Fig. 2.2), comme décrit jusqu'à présent (Leevers, 2001; Antonova et al., 2012). Nous pouvons donc supposer que toutes ces séquences d'invertébrés sont homologues et proposons donc de les appeler conjointement IR (pour Insulin-like receptor), ce que nous ferons par la suite.

Malgré la faible robustesse des branches concernées, la séquence d'IR de *B. mori* qui semblait proche de celle de *C. elegans* dans la phylogénie de Aizen et al. (2016) est bien apparentée aux autres IR d'insectes (SH-aLRT de 0,93, boostrap de 36 et probabilité postérieure de 0,70, Fig. 2.2), dont *Drosophila melanogaster* et *Aedes aegypti* précédemment utilisés. Notre reconstruction phylogénétique concorde donc avec celle d'Antonova et al. (2012), dans laquelle aucune divergence particulière de cette séquence n'avait été notée.

<u>Figure 2.2</u> : Phylogénie des IR au sein des Métazoaires, avec emphase sur la position des taxons de Crustacés. La reconstruction phylogénétique et le calcul du soutien des branches ont été réalisés comme décrit en Fig. 2.1. Le soutien des branches est indiqué avec le même code couleur et les catégories décrites précédemment. Les valeurs discutées dans le texte ont été reportées dans l'arbre. Les séquences de Pancrustacés sont accentuées en bleu, tandis que les autres Ecdysozoaires sont indiqués en vert, les Spiraliens en orange et les Deutérostomiens en rouge. Mr-IR and Sv-TKIR sont signalés en gras.



Au contraire, nous avons remarqué une divergence inattendue des IR provenant des 27 Pancrustacés (Fig. 2.2, Table 2.S2) qui ne se rassemblent pas du tout en un groupe monophylétique. La phylogénie révèle un groupe principal rassemblant tous les IR de Malacostracés, représentés ici par les ordres des Amphipodes, Bathynellacés, Décapodes, Euphausiacés, Isopodes et Stomatopodes (SH-aLRT de 0,99, boostrap de 83 et probabilité postérieure de 0,99). À l'opposé, les IR de Crustacés non-Malacostracés (issus des Branchiopodes, Cirripèdes, Copépodes, Ichthostraca et Hexapodes) sont dispersés à différents endroits de la phylogénie. Étonnamment, tous ces IR de non-Malacostracés sont présents dans un deuxième groupe monophylétique rassemblant la majorité des séquences d'IR (toutes celles de deutérostomiens, toutes celles d'ecdysozoaires sauf les Malacostracés et toutes celles de spiraliens sauf les vers plats) (SH-aLRT de 0,96, boostrap de 73 et probabilité postérieure de 1,0). À la lumière de ce résultat, l'anomalie phylogénétique de notre reconstruction semble bien être les IR de Malacostracés et non pas ceux de daphnie. La longueur importante des branches portant les IR de Malacostracés suggère fortement qu'une évolution divergente a eu lieu de façon spécifique dans ce clade. Les Malacostracés présentent par ailleurs la particularité d'avoir recruté des membres de la voie de signalisation de l'insuline pour leur différenciation sexuelle (HA, IGFBP-rP, IR). Nous pouvons donc supposer que la divergence de leur IR est liée à sa spécialisation lors de la mise en place du nouveau système endocrinien de l'HA.

L'examen plus précis des IR de Malacostracés révèle de plus des copies multiples chez la plupart des espèces (Figs. 2.2, 2.S2). Elles présentent une divergence claire le long de toute la séquence, avec absence de codon stop additionnel, ce qui suggère fortement que ces copies ne sont ni des variants d'épissage alternatif, ni des allèles avec SNP, ni des pseudogènes mais probablement des paralogues (Fig. 2.S3). Dans notre jeu de données, deux copies sont trouvées chez les Amphipodes (Gammarus fosssarum), Décapodes (Astacus astacus, Cherax quadricarinatus, M. rosenbergii) et Isopodes (A. vulgare, Proasellus beticus). En ajoutant les séquences partielles dans la phylogénie, il apparaît que les Décapodes A. astacus, C. quadricarinatus, M. nipponense et *M. rosenbergii* n'ont pas deux mais trois copies (Fig. 2.S1). A contrario, aucune troisième copie, même partielle, n'a pu être trouvée dans aucun autre ordre de Malacostracés. Globalement, toutes ces copies forment donc trois groupes : deux principaux contenant une séquence dans chaque ordre de Malacostracés (moins de données disponibles pour les Bathynellacea et Stomatopoda) et un troisième avec uniquement des IR de Décapodes, dont Sv-TKIR (Figs. 2.2 et 2.S1). L'appartenance de toutes ces séquences à la famille des IR a été confirmée par la présence des domaines conservés caractéristiques (deux domaines RL et un domaine TK). Nous proposons donc de définir trois sousfamilles d'IR de Malacostracés. Nous appellerons le premier IR découvert (Mr-IR), Mr-IR1, tandis que la nouvelle séquence découverte dans la même espèce (*M. rosenbergii*) sera appelée Mr-IR2. Le dernier groupe, pour l'instant spécifique des Décapodes, sera désigné IR3. Ces observations impliquent l'existence d'au moins une première duplication d'IR avant la divergence des ordres de Malacostracés. Sauf si de nouvelles séguences d'IR3 étaient découvertes chez des non-Décapodes, il faut également admettre soit qu'il existe une autre duplication d'IR au début de l'évolution des Décapodes (IR3 dérivant de l'IR1, Fig. 2.2), soit que l'IR1/2 dérive de l'IR3, conservé ensuite seulement chez les Décapodes (Figs. 2.S1 et 2.S2). L'origine du paralogue IR3 ne peut pas être élucidée par notre analyse à cause de la faible robustesse de la dichotomie IR1/IR3 de la Fig. 2.2 et de la dichotomie IR1/IR2 des Figs. 2.S1 et 2.S2. Dans tous les cas, ces duplications peuvent expliquer les résultats d'ARNi de Sharabi et al. (2016). En effet, les copies dupliquées montrent une forte divergence (~70% entre Mr-IR1 et Mr-IR2, ~67% entre Mn-IR1 et Mn-IR3), de sorte que l'extinction de l'expression de Mr-IR1 n'a probablement pas affecté ses orthologues. Même si l'extinction des trois ne suffisait pas à induire une féminisation totale, il n'en resterait pas moins que l'hypothèse de récepteurs multiples de l'HA était donc correcte. En effet, à travers les diverses données expérimentales, il a été démontré que Mr-IR et Sv-TKIR interagissent bien avec l'HA alors qu'ils appartiennent à deux sous-familles distinctes (IR1 pour le premier, IR3 pour le second). De telles preuves restent encore à apporter concernant la sous-famille des IR2.

Les duplications de gène sont des évènements communs dans l'évolution des génomes (Ohno, 1970). Bien qu'il existe en général une seule copie d'IR chez les invertébrés, les premières études recherchant ce gène ont révélé des duplications récurrentes du gène (Antonova et al., 2012; Aizen et al., 2016). La Fig. 2.2 montre également de telles duplications chez Aplysia californica (Mollusque), Limulus polyphemus (Chélicérate), en plus de celles déjà connues chez Schistosoma mansoni (Plathelminthes) (Khayath et al., 2007) et D. pulex (Crustacés) (Boucher et al., 2010). Dans ces cas, les duplications semblent indépendantes et peuvent être considérées spécifiques de l'espèce, jusqu'à preuve du contraire. Les duplications peuvent cependant concerner des clades entiers. Chez les Vertébrés notamment, les paralogues IGFR et l'IR au sens strict ont été conservés après duplication et ont divergé en lien avec la spécialisation des IGF et des ILP (insuline) (Hernández-Sánchez et al., 2008). Dès 2012, une autre duplication de clade a été envisagée chez les insectes (Antonova et al., 2012). Notre étude suggère cependant que les duplications chez les Malacostracés et les insectes sont indépendantes (Figs. 2.2 et 2.S2). Quoiqu'il en soit, au moins deux duplications de gène ont abouti à la coexistence des IR1 et IR2 chez les Malacostracés et d'un IR3 chez les Décapodes. Ces évènements ont ensuite été suivis d'une forte divergence des paralogues (~70% comme mentionné précédemment), bien supérieure à celle entre paralogues de Vertébrés (par exemple chez l'Homme, ~41% entre Hs-IR et Hs-IGFR, ~46% entre Hs-IR et Hs-IRR).

Quand les duplications de gènes se fixent dans le génome, les paralogues subissent souvent une évolution rapide d'au moins une des copies à cause du relâchement des pressions de sélection (Ohno, 1970). Il en résulte fréquemment la perte ou la division des fonctions pré-existantes et parfois l'apparition de nouvelles fonctions (Innan and Kondrashov, 2010). Les duplications sont donc généralement considérées comme un contexte favorable pour l'innovation évolutive car elles génèrent du nouveau matériel génétique. De manière analogue à la divergence entre IR et IGFR chez les Vertébrés, nous pouvons émettre l'hypothèse que les paralogues d'IR de Malacostracés ont divergé en lien avec l'apparition de l'HA, un nouvel ILP montrant lui aussi une évolution divergente au sein de sa famille (Antonova et al., 2012). Des analyses supplémentaires sont maintenant nécessaires pour déchiffrer les rôles de chacun des membres de cette voie de signalisation, en particulier les possibles spécialisations post-duplications. Les variations des patrons d'expression entre et au sein des sous-familles d'IR de Malacostracés (Sharabi et al., 2016; Aizen et al., 2016) suggèrent en effet que leurs fonctions ont pu varier au sein de leur histoire ancienne ou récente. De façon symétrique concernant l'HA, on retrouve chez les Décapodes une duplication récente du gène chez *M. nipponense* (F. Li et al., 2015a), de l'épissage alternatif chez *C. sapidus* et *F. chinensis* (S. Li et al., 2012; Huang et al., 2017b) et une expression hors des GA (hépatopancréas, ovaires) (Chung et al., 2011; F. J. Li et al., 2015; F. Li et al., 2015a; Huang et al., 2017b). En parallèle, des nouvelles études suggèrent que l'HA peut être impliquée dans des fonctions autres que la différenciation sexuelle : métabolisme (Chung, 2014) et vitellogenèse (Huang et al., 2014, 2017b). Ces observations sont cohérentes avec des scénarios de sous-fontionnalisation ou de néofonctionnalisation mais requièrent évidemment des confirmations expérimentales. Ce type de confirmation s'avère d'autant plus important que de nouveaux ILP sont en train d'être découverts (Sv-ILP1 et Sv-ILP2 (Chandler et al., 2015, 2017b), ainsi qu'un autre ILP nommé "insuline" décrite uniquement in silico (Veenstra, 2016)), ce qui augmente le nombre d'acteurs dans la voie de signalisation type insuline. Le fait que tous ceux-ci soient potentiellement impliqués dans différentes fonctions et qu'ils soient potentiellement complémentaires ou redondants, rend le décryptage de cette voie de signalisation particulièrement délicat.
# C. Compléments d'analyses et de discussion

Depuis la soumission de ce manuscrit, un autre IR de Crustacés présentant tous les domaines caractéristiques de ce type de récepteurs a été identifié chez une autre crevette F. chinensis (Fc-IAGR) (Guo et al., 2018). Dans cet article, les auteurs ont confirmé l'interaction de l'HA avec ce récepteur par un système de double-hybride chez la levure. De plus, la colocalisation du récepteur et de l'HA a été établie avec des protéines de fusions en cultures cellulaires. L'extinction par ARNi du récepteur chez cette espèce provoque également un dysfonctionnement de la spermatogenèse, comme cela a été montré chez M. rosenbergii (Sharabi et al., 2016), renforçant l'hypothèse d'une action de l'HA via ces récepteurs TK. L'homologie entre Mr-IR et Sv-TKIR, publiés de façon concomitante, a été vérifiée dans cet article, mais la phylogénie présentée n'incluait, en plus de ceux de Daphnia pulex, que ces trois récepteurs de Crustacés (Guo et al., 2018). Afin de vérifier sa position phylogénétique, la séquence de Fc-IAGR a été ajoutée à celles utilisées dans les phylogénies de (Herran et al., 2018). La première analyse a positionné sans surprise la séquence Fc-IAGR dans le même groupe que les séquences de Mr-IR et Sv-TKIR, parmi les récepteurs de type IR (Fig. 2.3). L'analyse phylogénétique de Fc-IAGR avec l'ensemble des séquences de Crustacés précédemment identifiées a permis d'identifier Fc-IAGR comme un récepteur de type IR3, dans le même groupe que Sv-TKIR (Fig. 2.4).



Figure 2.3 : Mise à jour de la figure 2.1, intégrant Fc-IAGR dans la reconstruction phylogénétique.





La longueur importante des branches portant les IR de Malacostracés conforte qu'une évolution divergente a eu lieu de façon spécifique dans ce clade. La position basale qui résulte de cette divergence peut probablement être interprétée comme un cas de "*taxon slippage*" (un des artefacts des longues branches dû à une érosion du signal phylogénétique (Wägele and Mayer, 2007)), ce qui ne fait que renforcer l'interprétation d'une divergence des IR de Malacostracés (Fig. 2.5). Une analyse comparant la divergence des séquences d'IR et de l'ARNr 18S pour chacune des paires d'espèces permet d'estimer les vitesses relatives d'évolution des IR (inspirée de (Ihara et al., 1999)). Bien que les régressions linéaires ne soient pas optimales, elles confirment que les IR de Malacostracés ont divergé plus rapidement que les IR d'autres espèces (taux de 2,4 : 2,0 : 1,1 : 1 pour les IR1 : IR2 : IR3 : autres IR) (Fig. 2.6).



<u>Figure 2.5</u> : Schéma illustrant le phénomène de "*taxon slippage*". Ce phénomène correspond à un artefact des longues branches, lié à un manque de signal évolutif au niveau d'un "groupe-tronc" par rapport au signal abondant dans la longue branche. Dans ce cas, cette dernière peut glisser dans l'arbre, en fonction des similarités avec les autres lignées. Figure tirée de (Wägele and Kück, 2014).

#### **Distance in IRs**



<u>Figure 2.6</u> : Rythmes d'évolution des différentes séquences d'IR. D'après une méthode inspirée de (Ihara et al., 1999), pour chaque paire d'espèces étudiées, la divergence de leurs séquences d'IR a été calculée et mise au regard de celle des séquences de 18S (un marqueur neutre). Les trois paralogues d'IR de Malacostracés ont été traités séparément. Des régressions linéaires permettent d'estimer approximativement les taux relatifs de divergence dans chacune des quatre conditions.

Toujours concernant la divergence des séquences d'IR de Malacostracés, nous avons cherché à confirmer un des résultats de (Sharabi et al., 2016) sur la conservation d'un motif tyrosine kinase. Les auteurs ont recherché le motif conservé YETDYY décrit pour son implication dans la régulation de l'activité catalytique des IR et IGFR de Vertébrés dans leurs séquences. De façon notable, ils retrouvent ce motif aussi bien chez les Vertébrés que chez deux espèces d'insectes et la daphnie mais pas chez Mr-IR. A la place, ils décrivent un motif voisin, YLANDYY. Grâce à notre échantillonnage, nous avons pu confirmer que le motif YETDYY est bien strictement conservé chez les chordés mais qu'il se retrouve également chez tous les Mollusques, tous les insectes, les daphnies et un Crustacé Copépode (Fig. 2.7). Des motifs très voisins existent chez les autres Crustacés non-Malacostracés. Au contraire, le motif présente une forte divergence chez les nématodes, les plathelminthes et les Malacostracés. Cette région régulatrice n'est donc pas aussi conservée dans ces trois clades, suggérant que cette divergence a bien des conséquences fonctionnelles.

		sel=0	3225	Se	q:54	Pos: 330	07 1253	
	- 1	Euphausiacea Thysano	KISDFG	LMR	RLHH	DDFHDDY	MKL-TE	EGLLPIK
		Amphipoda Gammarus f	KIADFG	CSR	R	LKTESGYY	HYQLDFLH	RGRISLK
		Isopoda_Armadillidiu	KVADFG	RAR	YL	SEDEIN	VQA-T-	DRPIPVR
	R	Isopoda_Proasellus_b	KISDFG	LTR	B	QEDGY	FLQSDGK	YRVVPVR
	_	Decapoda_Macrobrachi	<b>KIGDFG</b>	LTR	¥	LANDYY	KKR-G-	EAVLPVR
JS		Decapoda_Astacus_ast	KIGDFG	FTR	¥	LKTDY	RKQ-G-	WGLLPVR
a	ļ	Decapoda_Cherax_quad	RIGDFG	FTR	<u>¥</u>	LNTDYY	(RKQ-G-	QEFLPVR
a		Euphausiacea_Euphaus	KISDFG	MTR	<b>I</b>	VTNY	CIQ-E-	PRTIPVR
st		Amphipoda_Gammarus_f	KVSDFG.	LSR	PI	ETDSRDF	QMLDG	RREIPFR
õ	~ .	Amphipoda_Hyalella_a	KISDFG	LSR	PI	AAGGSEY	QVLDG	TRRIPVR
a	8	Isopoda_Armadillidiu	KICDEG	MSR	<u>M</u>	VEGDY	KIK-E-	SKPVPIR
a	_	Isopoda_Proasellus_b	RVSDFG	MAR	V	MQDNI	IST-GE	NRPVPVR
2		Decapoda Astacus ast	RISDEG	MTR		TDNDY	BTR-F-	TRIPPVR
		Decapoda Macrobrachi	RVSDFG	MAR	V	TDNNY		ARSVPVR
	i	Bathynellacea_Alloba	RISDIG	TMD			B-TRE-	TRUT DUP
	m	Decapoda Cherax quad	RIGDIG			I K CDV	P P C	OCUL DUK
	щ	Decapoda Macrobiachi	RIGDIG				P	OCAMPUK
	i	Branchionoda Diplost	RICDEC	L.TR	DV	VETOVY	RRC-DA	OCLUPVE
	JS	Branchiopoda Diplost	RIGDEG	TTR	DT	VETDV	RKG-G-	KGLLPVR
	a	Branchiopoda Notostr	KVGDEG	MTR	DT	YATDY	RKG-G-	KGLLPVR
	ğ	Cirripedia Sessilia	KIGDEG	MTR	HL	YEKNYY	KKG-G-	KGLLPVR
	st	Ichthvostraca Argulo	KIGDEG	MTR	DV	NYTNY	RKD-G-	KGLLPVR
	5	Ichthyostraca Argulo	KIGDFG	MTR		NYTNY	RKD-G-	KGLLPVR
	2	Copepoda Tigriopus k	KIADFG	MAR	EI	YSIX	TKN-D-	KGMMPIR
	Other	Copepoda Tigriopus k	KIADFG	MAR	QV	YDNY	KHG	QGKMPVR
		Copepoda Lepeophthei	KIGDFG	LSH	DI	YTKGYI	RKD	KGMMPVR
	~1	Copepoda Calanus fin*	KVGDFG	MAR	DV	YETEYY	RKE-G-	RGLLPVR
	s	Athropoda_Chelicerat*	KIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KGLLPVR
	8	Athropoda_Chelicerat*	KIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KGLLPVR
	do	Athropoda_Chelicerat*	RIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KGLLPVR
	h	Athropoda_Hexapoda_N*	KIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-T-	KGLLPVR
	t l	Athropoda_Hexapoda_N*	RIGDEC	MTR	DI	YETDY	RKG-T-	KGLLPIR
	5	Athropoda_Hexapoda_T*	KIGDFG	MTR	<b>D1</b>	YETDY	RKG-T-	KGLLPVR
	Å,	Athropoda_Hexapoda_B	RVGDFG	MTR		YETDY	KKG-T-	RGLMPVR
	đ	Athropoda Hexapoda D:	RIGDEG	MTR		IETDI	KKG-T-	RGLLPVR
		Nomatoda Caeparbabdi	RIGDEG	MAD			N DO C	REMADUR
		Nematoda Caenornabur	RICDEC	MAD			P	PPIMDUP
		Nematoda Brugia mala	RIGDEC	MAR	DT	VVHEVY	KPA-G-	KRIMPUR
		Platyhelminths Schis	KIADEG	LAR	TV	NNOFY	RKT-G-	OARLPVR
		Platyhelminths Schis	KIGDEG	LCR	DV	YGHNY	HKT-S-	HAKLPIR
		Platyhelminths Echin	KVGDFG	LCR	DI	YERNY	HKV-G-	AGKLPVR
		Mollusca Pinctada fu*	KIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KALLPVR
		Mollusca Crassostrea*	KIADFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KALLPVR
		Mollusca Aplysia cal*	KIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KGMLPVR
		Mollusca Aplysia cal	KIADFG	MAR		YMTDY	RKD-Q-	RALLPVR
		Hemichordata_Saccogl*	KIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KGLLPVR
		Echinodermata_Strong	KVADFG	LAR	DI	YQSDYY	RKERG-	-GMLPIR
		Chordata_Homo_sapien*	KIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KGLLPVR
		Chordata_Homo_sapien*	KIGDFG	MTR	DI	YETDYY	RKG-G-	KGLLPVR
		Chordata_Homo_sapien*	KIGDFG	MTR		YETDYY	RKG-G-	KGLLPVR
		Cephalochordata_Bran*	KIGDFG	MTR	<b>DI</b>	YETDYY	RKG-G-	KGLLPVR
		Chidaria_Hydra_vulga	<b>NIGDE</b> G	MAR	DI	TERNY	KKD-G-	KSLLPIR

<u>Figure 2.7</u> : Évolution du motif TK au sein des IR à l'échelle des Métazoaires. Cette partie de l'alignement de séquences met en évidence le motif TK classiquement décrit, YETDYY, trouvé à l'identique (\* blanches) ou légèrement modifié chez la plupart des animaux. Au contraire, de fortes variations sont observables au sein des Malacostracés, ainsi que des Nématodes et des Plathelminthes.

Une analyse plus exhaustive de la littérature a permis de confirmer les hypothèses de duplications précédemment émises, notamment grâce à l'accumulation de données génomiques ayant permis l'identification de paires d'IR chez *Apis mellifera* (de Azevedo and Hartfelder, 2008), *Solenopsis invicta* (Lu and Pietrantonio, 2011), *Nilaparvata lugens* (Xu et al., 2015; Xu and Zhang, 2017), *Acyrthosiphon pisum* (Guo et al., 2016), *Tribolium castaneum* (Sang et al., 2016), *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Ding et al., 2017). Une étude récente, utilisant plusieurs dizaines d'espèces d'insectes, a finalement montré qu'une duplication de l'IR a eu lieu avant la divergence des insectes, donnant naissance il y a au moins 400 millions d'années à un InR1 et InR2 (Kremer et al., 2018). De façon curieuse, un troisième IR a également été trouvé, InR3, qui proviendrait de la duplication de l'InR1, spécifique des Blattodea (Kremer et al., 2018). On pourrait donc aller jusqu'à envisager la possibilité d'une duplication ancienne de l'IR, avant la divergence des Pancrustacés, qui serait alors commune aux insectes et aux Malacostracés. La seule analyse phylogénétique de ces séquences ne nous permet pas d'appuyer cette hypothèse mais elle pourra peut-être être explorée à l'avenir grâce à l'outil génomique.

Figures supplémentaires :



<u>Figure 2.S1</u> : Phylogénie des IR au sein des Crustacés, avec emphase sur la position des Malacostracés. La reconstruction phylogénétique et le calcul de la robustesse des branches ont été réalisés comme décrit en Fig. 2.1. La robustesse des branches est indiquée avec le même code couleur et les catégories décrites précédemment. Les séquences de Crustacés Malacostracés sont accentuées en bleu. Des séquences partielles (un domaine conservé manquant), des séquences très partielles (plusieurs domaines conservés manquants) et des séquences concaténées (provenant de plusieurs *contigs*) ont été incluses pour montrer la présence simultanée de trois IR chez les espèces de Décapodes qui sont indiquées en gras.

<u>Figure 2.S2</u> : Phylogénie des IR d'espèces possédant plusieurs séquences. La reconstruction phylogénétique et le calcul de la robustesse des branches ont été réalisés comme décrit en Fig. 2.1. La robustesse des branches est indiquée avec le même code couleur et les catégories décrites précédemment. De la même façon, les séquences de Pancrustacés sont accentuées en bleu, celles des autres Ecdysozoaires sont indiquées en vert, celles des Spiraliens en orange et celles des Deutérostomiens en rouge.



#### The Sequence Manipulation Suite: Multiple Align Show

VM. 099712.6 Drosphile melensester ThR, transcript veries A, RDMA WIMPROVY KOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOCOGAMIDAVOSPASTEAN SSNOSSCASSTSAETVETS MM 00144413. DRosphile melensester ThR, transcript veries A, BUMA WIMPROVY KOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOCOGAMIDTOSSTEAN SSNOSSCASSTSAETVETS MM 0014422.2 Drosphile melensester ThR, transcript veries C, BUMA WIMPROVY KOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOCOGAMIDTOSSTEAN SSNOSSCASSTSAETVETS MM 0014442.2 Drosphile melensester ThR, transcript veries C, BUMA WIMPROVY KOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOCOGAMIDTOSSTEAN SSNOSSCASSTSAETVETS MM 0014442.2 Drosphile melensester ThR, transcript veries C, BUMA WIMPROVY KOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOCOGAMIDTOSSTEAN SSNOSSCASSTSAETVETS M 0014442.2 Drosphile melensester ThR, transcript veries C, BUMA WIMPROVY KOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOCOGAMIDTOSCA M 0014442.2 Drosphile melensester ThR, transcript veries C, BUMA WIMPROVY KOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOSCA M 0014442.2 Drosphile melensester ThR, transcript veries C, BUMA WIMPROVY KOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOSCA M 0014442.2 Drosphile melensester ThR, transcript veries C, BUMA WIMPROVYKOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOSCA M 0014442.2 DROSPHILE MELENSE C, BUMA WIMPROVYKOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOSCA M 0014442.2 DROSPHILE MELENSE C, BUMA WIMPROVYKOSKANCKIKHENDNAAATTACTICHTOVICOGAMIDTOSCA M 0014443.2 DROSPHILE MELENSE M 0014	BDDIVLC HDDIVLC HDDIVLC	100 100 100
NM_079712.6 Drosophila melanogaster InA, transcript variant A, mENA, BEXFORVETTGKKROVECSAHOCOMECODESTENNBOGRENENTFSNCHNILDT-GSLLLLHVNCGFFKRABBADHOOGHNNNY GHENOGHN NM_00144621.3 Drosophila melanogaster InA, transcript variant B, mENA, BEXFORVETTGKKROVECSAHOCOMECODESTENNBOGRENENTFSNCHNILDT-GSLLLHVNCGFFKRABBADHOOGHNNNY GHENOGHN	QQHHQRQ QQHHQRQ QQHHQRQ	200 200 200
NM_DOI144623.2 Drosophils melanogaster InR, transcript variant D, mRNA BRFKFDEVETTGKKRDVKCSGHQCSNECDDGSTKNNRQORENTNIFSNCHNILERL_QSLLLKFNCGIFNKRRRRPNQQQHHHHYQHHHQHH ING_079712.4 Drosophila melanogaster InR, transcript variant A, mRNA GANVSYKKILLGOTLAATTRALSLSFKNVKQQQQLQHHQLFAATGQZQRQEKGBKCFNKFNVSS633LLFILAATTAQAVVIPA MG 00144621.3 Drosophila melanogaster InG, transcript variant A, mRNA GANVSYKKILLGOTLAATTRALSLSFKNVKQQQQLQHHQLFAATGQZQRQEKGBKCFNKFNVFSS633LLFILAATTAQAVVIPA MG 00144621.3 Drosophila melanogaster InG, transcript variant A, mRNA GANVSYKKILLGOTLAATTRALSLSFKNVKQQQLQQHQLFAATGQZQRQEKGBKCFNKFNVFSS633LLFILAATTAQAVVIPA MG 00144621.3 Drosophila melanogaster InG, transcript variant A, mRNA GANVSYKKILGOTLAATTRALSLSFKNVKGQQQLQHHQLFAATGQZQRGEKGBKCFNVFNVFSS533LLFILAATTAQAVVIPA MG 00144621.3 Drosophila melanogaster InG, transcript variant A, mRNA GANVSYKKILGOTLAATTRALSLSFKNVKGQQQLQHNQLFAATGQZQRGEKGBKCFNVFNVFSS533LLFILAATTAQAVVIPA MG 00144621.3 Drosophila melanogaster InG, transcript variant A, dAVVSYKKILGOTLAATTRALSLSFKNVFSS53 MG 00144621.3 Drosophila MG 014621.3 Drosophila MG 014621.3 Drosophila MG 0147421.3 Drosophil	QQHHQRQ HQQHLLH HQQHLLH	200 300
NY 0011446222 Drosophils melanogaster InR, transcript variant C, EDNA GANYSYTKYLLLIGTIAAATTRISLSPKNYKGOOGLOHMGGIPRATPOCKODEKORKKCHYKHNYSYSFGISLLIFILANTIA GAVVIPA NY 00114463.2 Drosophils melanogaster InR, transcript variant D, BNNA GANYSYTKYLLLIGTIAAATTRISLSPKNYKGOOGLOHMGGIPRATPOCKODEKORKKCHYKHNYSYSFGISLLIFILANTIA GAVVIPA	HOGHTTH	300 300
NM CO114421.3 Drosophila melengaster Ind, transcript variant B, REMA NO IAOGLOTTASYSTOTSENETARSONVEPCSSNOTANVOVEPCGENTIGGTLIDLIDASPLASFRKITTVDVIIV ME CO114422.3 Drosophila melengaster Ind, transcript variant C, REMA NO IAOGLOTTASYSTOTSENETARSSNYTHRSONVEPCSSNOTANVOVEPCGENTIGGTLIDLINDASPLASFRKITTVDVIIVA NM_CO114423.2 Drosophila melengaster Ind, transcript variant D, MEMA NO IAOGLOKTALSYSTOTSENETARSSNYTHRSONVEPCSSNOTANVOVEPCGENTIGGTLIDLINDASPLASFRKITTVDVIIVA	VTGLHSL VTGLHSL VTGLHSL	400 400 400
IN_079712.6 Drosophila melanogaster InR, transcript variant A, mRNA SKIFPNLSVIRGNKLEDGYALVVYSNFDLHDLGLHKLRSITRGGVRIEKNHKLCYDRTIDWLEILAENETQLVVIENGKEKECALSKCPGEI SM_00114462.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant D, mRNA SKIFPNLSVIRGNKLEDGYALVVYSNFDLHDLGLHKLRSITRGGVRIEKNHKLCYDRTIDWLEILAENETQLVVIENOKEKECALSKCPGEI SM_00114462.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant D, mRNA SKIFPNLSVIRGNKLEDGYALVVYSNFDLHDLGHKLRSITRGGVRIEKNHKLCYDRTIDWLEILAENETQLVVIENOKEKECALSKCPGEI SM_00114462.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant D, mRNA SKIFPNLSVIRGNKLEDGYALVVYSNFDLHDLGHKLRSITRGGVRIEKNHKLCYDRTIDWLEILAENETQLVVIENOKEKECALSKCPGEI SM_00114462.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant D, mRNA SKIFPNLSVIRGNKLEDGYALVVYSNFDLHDLGHKLRSITRGGVRIEKNHKLCYDRTIDWLEILAENETQLVVIENOKEKECALSKCPGEI	RIEEGHD RIEEGHD RIEEGHD RIEEGHD	500 500 500 500
IN 079712.6 Drosophils melanogaster InE, transcript variant A, HRMA TTAIEGELNASCQLENNRRLCWNSKLCQTKCPEKCRNNCIDENTCCSQDCLGGCVIDKNGNESCISCRNVSFNNICNOSCPKGYYQFDSRCVT IN 001144621.3 Drosophila melanogaster InE, transcript variant B, HRMA TTAIEGELNASCQLENNRRLCWNSKLCQTKCPEKCRNNCIDENTCCSQDCLGGCVIDKNGNESCISCRNVSFNNICNOSCPKGYYQFDSRCVT INM 00114462.2 Drosophila melanogaster InE, transcript variant C, HRMA TTAIEGELNASCQLENNRRLCWNSKLCQTKCPEKCRNNCIDENTCCSQDCLGGCVIDKNGNESCISCRNVSFNNICNOSCPKGYYQFDSRCVT INM 00114462.3 Drosophila melanogaster InE, transcript variant C, HRMA TTAIEGELNASCQLENNRRLCWNSKLCQTKCPEKCRNNCIDENTCCSQDCLGGCVIDKNGNESCISCRNVSFNNICNOSCPKGYYQFDSRCVT INM 00114462.3 Drosophila melanogaster InE, transcript variant C, HRMA TTAIEGELNASCQLENNRRLCWNSKLCQTKCPEKCRNNCIDENTCCSQDCLGGCVIDKNGNESCISCRNVSFNNICNOSCPKGYYQFDSRCVT	ANECITL ANECITL ANECITL	600 600 600
DM_079712.6 Drosophila melanogaster InA, transcript variant A, mäHA, TKFINSVYSGIEVNOQCITHCPTGYQKSENKERCEPCPGGKCDKESSGGIDSLEBAAFE/GCTIITGTEDITISLKAKAGGAUVDDELKYGL IM_00114422.3 Drosophila melanogaster InA, transcript variant B, mäHA, TKFINSVYSGIEVNOQCITHCPTGYQKSENKERCEPCGRGCDKESSGDIDSLEBAAFE/GCTIITGTEDITISLKAKASGAUVDDELKYGL	AAVHKIQ AAVHKIQ	700 700 700
INC_00144623.2 Drosophile melenogaster InR, transcript variant D, mXHA TKFETNSVYSGIPYNGQCIFHCPTGYQKSENKRMCERCPGGKCDKECSSGLIDJERAREFHGCTIITGTEPLTISIKRESGANVMDELKYGL IMC_019712.6 Drosophile melenogaster InR, transcript variant A, mXHA SSIAVHLTYGKSEKEFGSLTEISGEPHABKYALVULNHRGLDELHGENGTYFIRKGGVFHVEPLCVST NUDLEMLASKEFFEKSGOV MOD144623.2 Drosophile melenogaster InR, transcript variant S, mXHA TKFETNSVYSGIPYNGQCIFHCPTGYQKSENKRMCERCPGGKCDKECSSGLIDJERAREFHGCTIITGTEPLTISIKRESGANVMDELKYGL MOD144623.2 Drosophile melenogaster InR, transcript variant S, mXHA SSIAVHLTYGKSEKEFGSLTEISGEPHABKYALVULNHRGLDELHGENGTVFIRKGUFHVEPLCVST NUDLEMLASKEFFEKSGOV MOD144623.2 Drosophile melenogaster InR, transcript variant S, mXHA SSIAVHLTYGKSEKEFGSLTEISGEPHABKYALVULNHRGLDELHGENGTVFIRKGUFHVEPLCVST NUDLEMLASKEFFEKSGOV MOD144623.2 Drosophile melenogaster InR, transcript variant S, mXHA SSIAVHLTYGKSEKEFGSLTEISGEPHABKYALVULNHRGLDELHGENGTVFIRKGUFHVEPLCVST NUDLEMLASKEFFEKSGOV MOD144623.2 Drosophile melenogaster InR, transcript variant S, mXHA SSIAVHLTYGKSEFGSLTEISGEPHABKYALVULNHRGLDELHGENGTVFIRKGUFHVEPLCVST NUDLEMLASKEFFEKSGOV MOD144623.2 Drosophile melenogaster INR, transcript variant S, mXHA SSIAVHLTYGKSEFKSGN MOD144623.2 Drosophile MELENGTASKEFKSGN MOD144623.2 DROSOPHABKYSANV NUDELKSKEFKSGN MOD144623.2 DROSOPHABKYSANV NUDELKSKEFKSGN MOD144623.2 DROSOPHABKYSANV NUDELKSKEFKSGN MOD144623.2 DROSOPHABKYSANV NUDELKSKEFKSGN MOD144623.2 DROSOPHABKYSANV NUDELKSKEFKSGN MOD144623.2 DROSOPHABKYSANV NUDELKSK	GADSNGN	700 800
NM CO114422.2 Dromophila melanogaster InA, transcript variant C, RANA SSIAVALTYGIKSKERGSITEISGOPPHUADKYALVYLUDROLDELWGENQTVFIFKGGVFFHPRECVSTINQLLPHLASKERFERSOV MM_CO1144623.2 Dromophila melanogaster InA, transcript variant D, RANA SSIAVALTYGIKSKERGSITEISGOPPHUADKYALVYLUDROLDELWGENQTVFIFKGGVFFHPRECVSTINQLLPHLASKERFERSOV	GADSNGN GADSNGN	800 800
NM GOI144623.3 Drosophila meleogaster Ind, transcript variant B, mälla GisGoTAVINVI LOSVGANSANINVITIKVI DEGORSSNATIVERDERAFIGEVYVMI DEVANSTASSDODCODERKVSSERKSONVI.SNI 180.00144623.2 Drosophila meleogaster Ind, transcript variant D, mälla GisGoTAVINVILOSVGANSANINVITIKVEIGEPORSSNATIVERDERFIGEVYVMI DEVANSTASSDODCODERKVSSERKSONVI.SNI 180.001144623.2 Drosophila meleogaster Ind, transcript variant D, mälla GisGoTAVINVILOSVGANSANINVITIKVEIGEPORSSNATIVERDERFIGEVEVINIDEVANSTASSDODCODERKVSSERKSONVI.SNI	IPYTNYS IPYTNYS IPYTNYS	900 900 900
IM 019712.6 Drosophila melanogaster InR, transcript variant A, HENA YYVRTMAISSELTMAESOVKNFRTNPGRPSKVTEVVATAISDSKINVT%SYLDKPYGVLTRYFIAAKLINRPTRNNNRDYCTEPLVKAMENOL NM 00114462.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant B, BXNA YYVRTMAISSELTMAESOVKNFRTNPGRPSKVTEVVATAISDSKINVT%SYLDKPYGVLTRYFIAAKLINRPTRNNNRDYCTEPLVKAMENOL IMD 00114462.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant D, mRNA YYVRTMAISSELTMAESOVKNFRTNPGRPSKVTEVVATAISDSKINVT%SYLDKPYGVLTRYFIAAKLINRPTRNNNRDYCTEPLVKAMENOL NM 00114462.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant D, mRNA YYVRTMAISSELTMAESOVKNFRTNPGRPSKVTEVVATAISDSKINVT%SYLDKPYGVLTRYFIAAKLINRPTRNNNRDYCTEPLVKAMENOL	PATTPTK PATTPTK PATTPTK PATTPTK	1000 1000 1000 1000
NN 079712.6 Drosophila melanogaster InR, transcript variant A, mSNA KISDPLAGDCKCVEGSKKTSSQEYDDRKVQAGNEFENALQNFIFVPNIRKSKNGSSDKSDGAEGAALDSNAIPNGGATNPSRRRBVALEPEL NM 001144621.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, mSNA KISDPLAGDCKCVEGSKKTSSQEYDDRKVQAGNEFENALQNFIFVPNIRKSKNGSSDKSDGAEGAALDSNAIPNGGATNPSRRRBVALEPEL NM 001144621.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, mSNA KISDPLAGDCKCVEGSKKTSSQEYDDRKVQAGNEFENALQNFIFVPNIRKSKNGSDKSDGAEGAALDSNAIPNGGATNPSRRRBVALEPEL MM 001144621.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, mSNA KISDPLAGDCKCVEGSKKTSSQEYDDRKVQAGNEFENALQNFIFVPNIRKSKNGSDKSDGAEGAALDSNAIPNGGATNPSRRRBVALEPEL	DDVEGSV DDVEGSV DDVEGSV DDVEGSV	1100 1100 1100 1100
NN 079712.6 Drosophila melanogaster InR, transcript variant A, ERVA LLEHVRSITDDTDAFFEKDDENTYKDEEDLSSNKQFYEVFAKELPPNQTHFVFEKLEHFTYAIFVVACEEEIPSEKLEDTSFEKSLCSDYDT NN 001144621.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant B, mENA LLEHVRSITDDTDAFFEKDDENTYKDEEDLSSNKQFYEVFAKELPPNQTHFVFEKLEHFTYAIFVVACEEEIPSEKLEDTSFEKSLCSDYDT NN 00114462.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant D, mENA LLEHVRSITDDTDAFFEKDDENTYKDEEDLSSNKQFYEVFAKELPPNQTHFVFEKLEHFTYAIFVVACEEEIPSEKLEDTSFEKSLCSDYDT 180 00114462.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant D, mENA LLEHVRSITDDTDAFFEKDDENTYKDEEDLSSNKQFYEVFAKELPPNQTHFVFEKLEHFTYAIFVVACEEIPSEKLEDTSFEKSLCSDYDT	VFQTTKR VFQTTKR VFQTTKR VFQTTKR	1200 1200 1200 1200
NM_079712.6 Drosophila melanogaster InR, transcript variant A, MRNA KKADIVMOLKVOLEMANNTESPVRVAMTPPVDPNGEIVTYEVAYKLQKPGQVEEKKCIPAADFNQTAGYLIKLNEGLYSFRVRANSIAGYGD NM_001144621.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant S, MRNA KKFADIVMOLKVOLEMANNTESPVRVRATPPVDPNGEIVTYEVAYKLQKPGQVEEKKCIPAADFNQTAGYLIKLNEGLYSFRVRANSIAGYGD NM_00114462.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, MRNA KKFADIVMOLKVOLEMANNTESPVRVRATPPVDPNGEIVTYEVAYKLQKPGQVEEKKCIPAADFNQTAGYLIKLNEGLYSFRVRANSIAGYGD VM_00114462.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, MRNA KKFADIVMOLKVOLEMANNTESPVRVRATPPVDPNGEIVTYEVAYKLQKPGQVEEKKCIPAADFNQTAGYLIKLNEGLYSFRVRANSIAGYGD VM_00114622.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, MRNA KKFADIVMOLKVOLEMANNTESPVRVRATPPVDPNGEIVTYEVAYKLQKPGQVEEKKCIPAADFNQTAGYLIKLNEGLYSFRVRANSIAGYGD	FTEVEHI FTEVEHI FTEVEHI	1300 1300 1300
NG 00144621.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant A, mANA VZEPPSYAXVFFMLLGIGLAFLIVSLFGVVCIMKRKVPSNDLHMNTEVNPFVASNQYIPDDMEVIRENIQLAPLGQGSFGVVYEGILKSF NM 00144621.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant B, mANA KVEPPSYAXVFFMLLGIGLAFLIVSLFGVVCIMKRKVPSNDLHMNTEVNPFVASNQYIPDDMEVIRENIQLAPLGQGSFGVYEGILKSF NM 00144621.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, mANA VZEPPSYAXVFFMLLGIGLAFLIVSLFGVVCIMKRKVPSNDLHMNTEVNPFVASNQYIPDDMEVIRENIQLAPLGQGSFGVYEGILKSF	PPNGVDR PPNGVDR PPNGVDR	1400 1400 1400
INC_001144623.2 Drosophila melanopaster InR, transcript variant D, MRNA KVEPPPSYAKVFFALLGIGLAPLIVSLFGVVCYLHKRKVPSNDLHNTEVNPFYASNqVIPDDWEVLRENIQLAPLGQGSFGVVYEGILKSF INM_079712.6 Drosophila melanopaster InR, transcript variant A, MRNA ECAIKTVNENATORERTNFLSEASVNKEFDTYHVVRLLGVCSRGQPALVVMELMKKGDLKSYLRAHRPEERDEAMMTYLNRIGVTGNVQPFTY INM_001144621.5 Drosophila melanopaster InR, transcript variant B, MRNA ECAIXTVNENATORERTNFLSEASVNKEFDTYHVVRLLGVCSRGQPALVVMELMKKGDLKSYLRAHRPEERDEAMMTYLNRIGVTGNVQPFTY	PPNGVDR GRIYQMA GRIYQMA	1400 1500 1500
NE OD14462:2 DESSEDBILS BELANGESTER INK, EINANDELP VALIAN C, MANA KCALIVENATOREKTYLSZASYNKEYDTINVALLOVSKOLDAVINELKKODLASYNKAMPPERREAMITINEI (VIONVOPFY NE OD14462:2 DESSEDBILS BELANGESTER INK, EINANDELF VALIAN KARAFERREAMITINEI (VIONVOPFY) NE OT3712:6 DESSEDBILS BELANGESTER INK, EINANDELF VALIANK KEVHERLEASYNKEYDTINVALLOVSKOLDAVINELKKODLASYNKAMPPERSE NE OT3712:6 DESSEDBILS BELANGESTER INK, EINANDELF VALIANK KEVHERLEASYNKEYDTINVALLOVSKOLDAVINELKKODLASYNKAMPPERSE	GRIYQMA GRIYQMA	1500
NR_0014461.3 Drosophia melanogaster ink, transcript variant 5, mANA ILIADOMAYLAAKKYVHEDLAAANCYVADDITVKICDFGdTRDIVETOYYKKTKCLPVNNHPESLRBOVYSSABOVYSFGVVLMENATLA NR_0014462.2 Drosophia melanogaster ink, transcript variant 5, mANA IEIADOMAYLAAKKYVHEDLAAANCYVADDITVKICDFGHTRDIVETOYYKKTKCLPVNNHPESLRBOVYSSABOVYSFGVVLMENATLA NR_0014462.2 Drosophia melanogaster ink, transcript variant 5, mANA	AQPYQGL AQPYQGL	1600 1600 1600
NE OFFILE DECOMPLIE RELATIONSTEELE (M. TEAMORTE VALUE A. MARKA MARKARENE OFFILEN KORMENES AAFSEDDIATEPOCHSOFKVEHNSKADOHAKAREN (DA AVFED ME OOII4415 DECOMPLIE RELATIONSTEELE MET VALUE DE MARKARENE OFFILEN KORMENES AAFSEDDIATEPOCHSOFKVEHNSKADOHAKARENKEN (DA AVFED ME OOII4452:2 DECOMPLIE RELATIONSTEELE MET VALUE DE MARKARENE OFFILEN KORMENES AAFSEDDIATEPOCHSOFKVEHNSKADOHAKARENE OFTIGEN ME OOII4452:2 DECOMPLIE RELATIONSTEELE MET VALUE DE MARKARENE OFFILEN KORMENES AAFSEDDIATEPOCHSOFKVEHNSKADOHAKARENE OFTIGEN AAVFED ME OOII4452:2 DECOMPLIE RELATIONSTEELE VALUE VA	QDLQDRE QDLQDRE QDLQDRE QDLQDRE	1700 1700 1700 1700
NN_079712.6 Drosophila melanogaster InR, transcript variant A, mBNA QQEDATTPLENGGYQQNSSLDQPPESPIANYDDQGSHLPFSLPSGFIASSTPDGQYVNATAFQNIPAAQGDISATYVVPDADALDGDRGYEIY NM_00114621.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, mBNA QQEDATTPLENGGYQQNSSLDQPPESPIANYDDQGSHLPFSLPSGFIASSTPDGQYVNATAFQNIPAAQGDISATYVVPDADALDGDRGYEIY NM_00114623.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, mBNA QQEDATTPLENGGYQQNSSLDQPPESPIANYDDQGSHLPFSLPSGFIASSTPDGQYVNATAFQNIPAAQGDISATYVVPDADALDGDRGYEIY	DPSPKCA DPSPKCA DPSPKCA DPSPKCA	1800 1800 1800 1800
IN 079712.6 Drosophils melanogaster InR, transcript variant A, DENA ELPTSRSGSTAGGKLSGEQHLLPRKGRQPTINSSSMPDDVIGGSSLQPSTASAGSSNASSHTGRPSLKXTVADSVANKANFINRHLFNHKRTG IN 001144621.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant B, DENA ELPTSRSGSTGGKLSGEQHLLPRKGRQPTINSSSMPDDVIGGSSLQPSTASAGSSNASSHTGRPSLKXTVADSVANKANFINRHLFNHKRTG ING 00114462.2 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, DENA ELPTSRSGSTGGKLSGEQHLLPRKGRQPTINSSSMPDDVIGGSSLQPSTASAGSSNASSHTGRPSLKXTVADSVANKANFINRHLFNHKRTG M0 0011462.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, DENA ELPTSRSGSTGGKLSGEQHLLPRKGRQPTINSSSMPDDVIGGSSLQPSTASAGSSNASSHTGRPSLKXTVADSVANKANFINRHLFNHKRTG M0 0011462.3 Drosophila melanogaster InR, transcript variant C, DENA ELPTSRSGSTGGKLSGEQMLLPRKGRQPTINSSSMPDDVIGGSSLQPSTASAGSSNASSHTGRPSLKXTVADSVANKANFINRHLFNHKRTG	SNASHKS SNASHKS SNASHKS SNASHKS	1900 1900 1900
NN 079712.6 Drosophila melanogaster InB, transcript variant A, MRNA NASNAPSTSSNTNLTSHPVANGNLGTIESGGSGSAGSYTGTPRFYTPSATPGGGSGNAISDNPNYALLDESIASEQATILTTSSPNPNYKMM NM 001144621.5 Drosophila melanogaster InB, transcript variant B, MRNA NASNAPSTSSNTNLTSHPVANGNLGTIESGGSGSAGSYTGTPRFYTPSATPGGGSGNAISDNPNYALLDESIASEQATILTTSSPNPNYKMM NM 001144622.2 Drosophila melanogaster InB, transcript variant C, MRNA MASNAPSTSSNTNLTSHPVANGNLGTIESGGSGSAGSYTGTPRFYTPSATPGGGSGNAISDNPNYALLDESIASEQATILTTSSPNPNYKMM NM 001144622.2 Drosophila melanogaster InB, transcript variant C, MRNA MASNAPSTSSNTNLTSHPVANGNLGTIESGGSGSAGSYTGTPRFYTPSATPGGGSGNAISDNPNYALLDESIASEQATILTTSSPNPNYKMM	PPISLVS PPISLVS PPISLVS	2000 2000 2000
AUVALTWERVE WARRANDESSET INN, TERDECIPT VEIGHT U, FRAG HASAAFFISSTIGUISSEVAKURGETESGUSGAESTETERTTESTPOUSSKAISUNEN KELDESIASEGATULTISSENEN YKKA NM 0019712.6 Drosophila melanogaster Inn, transcript variant 8, mRNA THPRYKENMETFYVARGOTISHEPNYQPMQAFLNARQSGSSSGEDNEQEEDDEVEDDEVDEHVEHIKKERKPLSAFEGALPSKTQPPSAS NM 001144621.3 Drosophila melanogaster Inn, transcript variant 5, mRNA THPRYKENKETPYQNAVTISHEPNYQPMQAFLNARQSSSGEDNEQEEDDEVEDDEVDEHVEHIKKERKPLSAFEGALPSKTQPPSAS	VSQTRKS VSQTRKS VSQTRKS	2100 2100 2100
NM_001144623.2 Drosophila melanopaster InR, transcript variant D, mBNA TNFNYMEMNETPVQNAGVTISHNFNYQFVQAFLNARQSQSSSSDEDNEQEEDDEDDEDDDVDDENVEHIZMERMELSRERQRALFSKTQFFRSRS NN_079712.6 Drosophila melanopaster InR, transcript variant A, mBNA PYNFNSGIGATGAGNESNILKENNLERFASTFRFFFFNGFIGREA NN_001144621.3 Drosophila melanopaster InR, transcript variant B, mENA FINFNSGIGATGAGNESNILKENNLERFASTFRFFFPNGFIGREA	VSQTRKS	2100 2144 2144
am_uviittee.e urooppila meanogastei irk, tianerist veilant C, shka ferikusteakaynakastekstekstekstekstekstekste 18.0011463.2 Deooppila meänogastei irk, tianerist veilant J, shka ferikastokstukustekstekstekstekstekstekstekst		2144

Transcript variants A, B, C and D of *Drosophila melanogaster*: variation in UTRs only (not visible here).



Transcript variants Calfi-ILPR Ia, Ib (2 sequences) and Ic (2 sequences) in *Calanus finmarchicus*: SNP and splicing variation.

The Sequence Manipulation Suite: Multiple Align Show		
InR1 DAPPUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaff10 InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaff1108 InR3 SNAP_00036418 (Nico) Dappul_248185 scaff106 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaff10	YVV DRITNDPD	89 89 70 71
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scafflo InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaffl08 InR3 SNAP_00036454 (Nico) Dappul_268485 scaffl04_644 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffl0	GPQQFBELEGCRVVEG <mark>I</mark> LHIVLMENLDFASDLNNRSFPALREITGYLLFYRV <mark>F</mark> GLRSIGQLFPNLAVIRGQQLLFDFSFVVYELMQL GPQQFBELEGCRVVEGILHIVLMENLDFASDLNNRSFPALREITGYLLFYRV <sup>G</sup> GLSIGQLFPNLAVIRGQQLLFPSFVVYELMQL GPQQFELEGCRVVEGILHIVLMENLDFASDLNNBRSFPALREITGYLLFYRV <sup>G</sup> GLSIGQLFPNLAVIRGQQLLFDFSFVVYELMQL GPQQFTQLEGCRVVEGNLHIVLMENLDFASDLNBRSFPALREITGYLLFYRV <sup>G</sup> GLSIGQLFPNLAVIRGQQLLFDFSFVVYELMQL GEIGLKSLAELQR	189 176 170 171
InR1 DAFFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaffl0 InR2 SNAF_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaffl08 InR3 SNAF_00036543 (Nico) Dappul_263685 scaffl0d_644 InR4 SNAF_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffl0	GSVLIEKNPNLCYVESIDWGRIGHSGRLNHFI <mark>G</mark> GNWIA <mark>BECPKCQDRCPAGGDG</mark> AILCWNNDGQWYCDQCGQGVSGACSVMTRDVGRPSEMRCCHEECA GSVLIEKNPNLCYVESIDWGRIGHSGRLNHFIGGNKIABECPKCQDRCPAGGDGAILCWNNDGCQWVCDQCGQGVSGACSVMTRDVGRPSEMRCCHEECA GSVLIEKNPNLCYVESIDWGRIGHSGRLNHFIGGNS IBECPKCQDRCPAGGDSGCILCWNNDGCQWVCDHCVSGACSVTTEVGRPSEMRCCHEECA	289 210 270 268
InR1 DAPFUDRAFT 237995 (Nico) Dappul 237995 scaffio InR2 SNAF_00038106 (Nico) Dappul 270048 scaffil0 InR3 SNAF_00036453 (Nico) Dappul_268485 scaffil0_644 InR4_SNAF_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffi0	GGCSGGQSNQCDVCKHVIHNDECRSVCPP <b>D</b> HYLFMKRRCVTDVECITHLPPRQSVQEYPYVKNKKVFAESGECILECPPGFQEQKRHHNDILHYFTCVP GGCSGGQSNQCDVCKHVIHNDECRSVCPF <b>D</b> HYLFMKRRCVTDVECITMLPPRQSVQEYPYVKNMKVFAESGECILECPPGFQEQKRHHNDILHYFTCVP GGCSGGQSNQCDVCKHVIHNGECRSACPP <b>D</b> YFLFMERRCVTOVECITMLPPRQSVQEYPYDKKKKVFAESGECILECPPGFQEQKIHHDILHYFTCVP	389 212 370 368
InRl DAFFUDRAFT 237995 (Nico) Dappul 237995 scafflo InR2 SNAF_00038106 (Nico) Dappul 270048 scafflo InR3 SNAF_00036433 (Nico) Dappul_268485 scafflod_644 InR4 SNAF_00005849 (Nico) Dappul_237791 scafflo	CQGPCPKVCKGLFVSN[ETVQKLRGCTTIDGDLENQIKGGDNIIQELERSLGSIEVIKGVLKITREFF1[SLSFFKSLR]ITGKPI]HSSGSNPDDEY 	489 297 470 468
InR: DAFFUDRAFI 237995 (Nico) Dappul 237995 scaffl) InR: SNAF 00038106 (Nico) Dappul 270048 scaffl) InR: SNAF 00038543 (Nico) Dappul 265485 scaffl)d_644 InR4 SNAF_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffl)	ALTVODNONLQQLWPKTQNLTIHKKNIFHENPKLCLNEFEELVNSSTVPGTLAFKHSOVDISPKSNGDKATCDEQVLNYTIÖNKSOKKOLSKUNPRAHL Altvodnonloglwpktqnltihkknifhenpklcln feelvnsstvpgtlafkhsovdispesngdkatcdeqvlnytiönksok. Altvodnonloglwpktqnltihkknifhsnpklclnyfeelvnsstvpgtspyknyddispesngdkatcdeqvlnytiönkssv melennyfrahl Alfvonnonloglwpktqnltihkknifhsnpklclnyfeelvnsstvpgtspyknyddispesngdkatcdeqvlnytiönkssv melennyfrahl	589 397 570 568
InR1 DAPFUDRAFT 237995 (Nico) Dappul 237995 scaffio InR3 SNAP_00038106 (Nico) Dappul 270048 scaffil08 InR3 SNAP_00036543 (Nico) Dappul_268455 scaffil04_644 InR4_SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffi0	ADKRCLEGY ISY EAP (KNYSY GRADACGODGNTIIGNAANDAA PLENEMNII) YE MPYTCYA. WCGYTVAPCOIGKR GARSP LYERTSPAEPG ADKRCLGY ISY EAP (KNYSY GRADACGODGNTIIGNAANDAA PLENEMNII YE MPYTCYA. WCGYTVAPCOIGKR GARSP LYERTSPAEPG DOKRCLGY ISY EAP (KNYSY GRADACGODG WYNNAANDAA PLENEMNII HE GYTCYAI WCGYTVAPCO GKN GARSP LYERTSPAEPG ADKRCLGY ISY CAF (KNYSY GRADACGODG WYNNAANDAA PLENEMNII HE GYTCYAI WCGYTVALCO GKN GARSP LYERTSPAEPG ADKRCLGY ISY CAF (KNYSY GRADACGVGONTING WAN BA PLENEMNII HE GYTCYAI WCGYTVALCO GKN GARSP LYERTSPAEPG	689 497 670 668
InR1 DAPFUDRAFT 237995 (Nico) Dappul 237995 scafflo InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul 270048 scafflo InR3 SNAP_00036434 (Nico) Dappul 270048 scafflod_644 InR4_SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scafflo	QPEDLRAS NSSSELVID NKPP NPNGIVIHYIVIGSWRKDDQDY GKLEICAEHASSLUVSE KKEVIT ISDON ISIFGDPSIFAASPEGNNNPESG QPEDLRAS NSSSELVID NKPP NPNGVIHYIVIGSWRKDDQDY GKLEICAEHASSLUVSE KKEVITEISDON ISIFGDPSIFAASPEGNNNPESG PFEDLRAS NSSSELVI ISTFODPSIFAASPEGNNNPESG QPEDLRAY NSSSELVI GWKEP NPNGIVIHYIVIGSWRKDDQDY GSLDAAEHAVPSICDN KKEVILEISGN ISIFGDPSIFAASPEGNNNPESG	789 597 770 743
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaffl0 InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaffl08 InR3 SNAP_00036454 (Nico) Dappul_269485 scaffl04_644 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffl0	GSSGSAQQGKCCQCTGTNDKVILEN K2 EQ QFKLEFEN LNDK YIKUT GSSGSAQQGKCCQCTGTNDKVILEN K2 K2 QFKLEFEN LNDK YIKUT GSSGSAQQGKCCQCTGTNDKVILEN K2 QFKLEFEN LNDK YIKUT GSSGSAQQGKCCQCTGTNDKVILEN K2 QFKLEFEN LNDK YIKUT K4QA	889 656 829 779
InRl DAPFUDRAFT 237995 (Nico) Dappul 237995 scafflo InR2 SNAF_00038106 (Nico) Dappul 270045 scafflo InR3 SNAF_00036453 (Nico) Dappul 267645 scafflod_644 InR4 SNAF_00005849 (Nico) Dappul_237791 scafflo	FYDGNNRLITFYQKVTGTSYTVVGVRHYAEYTIKVIACHDHDFFTNRTLCSMTAALTSARTKQSDFADDIVGGVVRYESNNTSRSIKIGMMEPEDPNGLI	989 656 829 779
InRl DAPFUDRAFT 237995 (Nico) Dappul 237995 scaffio InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul 270048 scaffilo InR3 SNAP_00036543 (Nico) Dappul_269485 scaffilo InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffio	KKYLLEYRRSDNGKVVRECVRRKDFVESQRTKLMADLIPGNYCVQVRAVSLAGPGPPTKDVCFLIENKDDHGTVSINPDYHKYVPDEWEVARDNVVILRE	1089 656 829 779
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaff10 InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaff1105 InR3 SNAP_00036543 (Nico) Dappul_265485 scaff10d_644 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaff10	LGQGSFGMVYEGLLENTVPNQPEVECAIRTVNEKANVKERMEFLTEASVHKEFNANHVLKLLGVVSKAQPTLVIMELMANGDLNILGRKKEQAD DITTI DITTI OTTITI GITTITG GITTITG	1189 663 836 786
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaff10 InR3 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaff1108 InR3 SNAP_00036843 (Nico) Dappul_2678485 scaff10d_644 InR4_SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaff10	DHDN HDNNIVEFFFYFI SSHNQAIGIVFGENHTNIVE-NHALFFYQXVFGTSYTVVGVRHYAEYTICU ACHDHDFVRHSLCSLI-AVTSAHT DFDNAIEFFEDXFIISSHNQAIGIACENHUNFVDGUNALFFYQXVFGTSYTVVGVRHYAEYTICU ACHDHDFTRHECSHTAALFSAHT MYDN HDNNIVEFFYFIISSHNQAIGIVFGENHUNTVD-NHAFFYQXVFGTSYTVVGVRHYAEYTICU ACHDHDFVRHSLCSLI-AVTSAH DHDNVIDEFFEHFIISSHNQAIGISFGENHSMYCDUNALFFYQXVFGSYTVVGVRHYAEYTICU ACHDHDFVRHSLCSLI-AVTSAH DHDNVIDEFFEH-FIISSHNQAIGISFGENHSMYCDUNALFFYQXVFGSYTVVGVRHYAEYTIKUAACHDHDFIRHRF	1285 758 932 880
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaffl0 InR3 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaffl06 InR3 SNAP_00036453 (Nico) Dappul_2786485 scaffl0d_644 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffl0	RCSDFAD IVGG VRYDSNSTTSSIKIGNSEPEDPNGLITKYLLEYKRIDN <mark>G K V EC RAKDFVES KI MADL PONYCVHARAFSLAGFOFD K -</mark> MCSDFAD IVGG VRYESNTTSSIKIGMEPEDPNGLIKYLLEYRRIDN <mark>G K V EC GRAKDFVES KI MADL PONYCVGVRAVSLAGFOFD V -</mark> GSDFAD IVGG VRYESNTTSSIKIGMEPEDPNGLIKYLLEYRRIDNG K V EC RAKDFVES KI MADL PONYCVGVRAVSLAGFOFD F MSDFED IVGG VRYESNTTSSIKIGMSEPEDPNGLIKYLLEYRRIDNG K V EC RAKDFVES KI MADL PONYCVGVRAVSLAGFOFD F MSDFED IVGG VRYESNTTSSIKIGMSEPEDPNGLIKYLLEYRRIDNG K V EC RAKDFVES KI MADL PONYCVGVRAVSLAGFOFD F	1384 858 1031 942
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scafflo InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaffl08 InR3 SNAP_00036543 (Nico) Dappul_263485 scaffl03_644 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaffl0	NROGIGINSINFEYILTYEO NEVADDYYI APKOCOSFGNYYEG LASNGSEIRCAIK WE ADWIE ADWIE NAA-WKEFNAH CFLIEREDGINSINFEYILTYEO NEVADDYYI AFKOCOSFGNYYEG LANITYNCH YE NAA-WKEMFI DAA-WKEFNAH CFLIEREN KN KNYSTLONGAN YVYN HEYADWYI AFFC GSFGNYYEG LANITYNCH YCAIK YFF AF AS-WKEFNAH CFLIENSKN KNYSTLONGAN YVYN NY MANYYI AFGC SGFGNYYEG LANAYPKOFFYKAIK YFF AF	1472 954 1119 1042
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaffl0 InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaffl08 INR3 SNAP_00036543 (Nico) Dappul_265485 scaffl04_644 InR4 SNAP_0005849 (Nico) Dappul_237791 scaffl0	V # LLGVVSKA OP LIMELMANGDLKT LRS RPC EENVIGGROPPILKCILKMAIEIADGNHYLSEKRYVHEDAARNEMVA GLIVKIGDIGLTA V # LLGVVSKA OP LINELMANGDLKG LES RPC EENVIGGROPPILKCILKMAIEIADGNHYLSEKRYVHEDAARNEMVA GNIVKIGG GLI V # LLGVVSKA OP LINELMANGDLKI LES RPC EENVIGGROPPIL CILKNAIEIADGNHYLSEKRYVHEDAARNEMVA GNIVKIGGROLTA V CLLGVVIN OP LINELMANGDLKG LRS RPD WEYASKGROLT LKSKLKNAIEIADGNHYLSENTWHES NA OCHVAR GIVKIGGROLTA	1572 1054 1215 1142
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaff10 InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaff108 InR3 SNAP_00036453 (Nico) Dappul_265485 scaff104 644 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaff10	UYETDYY RGDAQCHLPYRWA DESLAGAVYTS SDVWSFGVULWEMATLAS GYGGLFM EV YYWGGRUMHRPEGCPMRL ILMESCWGUHPR RPT YYETDYY RGGR-GLLFYRWA PESLAGGVTYGCOVWSFGVULWEMATLAS GYGGLFM EV RYUGGGWERPEGCPMRL ILMESCWGUYAR APT YYETDYY RGDAGLLFYRWA PESLAGNYTS SOVWSFGVULWEMATLAS GYGGLFM EV RYWGGGWERPEGCPMRL MLMESCWGUYAR APT SEGGYY MNELIYLLF RWA PESLGGYTYTS COVWSFGVULWEMATLAS HEMGLTM GY YYWGGGUCRPEGCPMRL MLMESCWG PPGRP	1672 1153 1315 1242
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaff10 InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaff108 InR3 SNAP_00036434 (Nico) Dappul_268485 scaff108 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaff10	FIGUVEN LPBV	1754 1246 1397 1308
InR1 DAPFUDRAFT_237995 (Nico) Dappul_237995 scaff10 InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul_270048 scaff1108 InR3 SNAP_00036543 (Nico) Dappul_256455 scaff108 InR4 SNAP_00005849 (Nico) Dappul_237791 scaff10	PFSSLQLGNSRKAVHEEGIRDDEVGDDDEVFF FFHER-RAIIYVKNPGGHIAANGNGSKSESSKGTTSNASEDSKGSYVSNGSASNGYVLGILKQRRHN LTSNLLESRRSDEGEEGIREEEVGDDDHVFF FFHDRGGAYLUXNPGGHIAANGNGSKSESSKGTTSNASEDSKGSYVSNGSASNGYVLGILKQRHN PFSSLQLGNSRKAVHEEGIRDDEVGDDDVFF FFHER-RAIIYVKNPGGHIAANGNGSKSESSKGTTSNASEDSKGSYVSNGSASNGYVLGILKQRHN - HYQT	1853 1346 1496 1313
InRi DAPFUDRAFT 237995 (Nico) Dappul 237995 scaffio InR2 SNAP_00038106 (Nico) Dappul 270048 scaffil08 InR3 SNAP_00036843 (Nico) Dappul 268455 scaffold_644 InR4 SNAP_00036949 (Nico) Dappul 237791 scaffio	NTESQQLLYLIY NTE NTEYSY	1865 1349 1502 1313

IR1-4 paralogs in *Daphnia pulex*: gene duplication (Boucher et al., 2010).

IR paralogs in *Aplysia californica*: putative gene duplication.

The Sequence Manipulation Suite: Multiple Align S	how	
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	NOFIHD AT IIDM FIG-RESKFCIVCLYA CV DRGQSASGODGRUCONIDIRNSV QFKK ENCTVVEGFL (IVLIDNGT SYF LSFFKLR	95
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	Mlfig As SM LLCORTASORCICINCLYI FV GIXHDVIG QEFYGRNIDIRNSV OFKK ENCTVVEGFL IVLIDNGT SYF LSFFKLR	100
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	EITGYLLUYRAFGM <mark>T</mark> SIGK <mark>H</mark> FPELTVIRGNHLFQNYALVIYEMFQLQEIGI <mark>R</mark> SLT <mark>NINRGSVRIEKNEM</mark> LCYV <mark>R</mark> SIDMDLIAK <mark>H</mark> GQGGHFIKENQESRHC	195
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	EITGYLFLYRAFGM <mark>E</mark> SIGK FPELTVIRGNHLFQNYALVIYEMFQLQEIGI <mark>S</mark> SLT <mark>DIN</mark> RGSVRIEKNEYLCYVNSIDMDLIAKHGQGGHFIKENREPRHC	200
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2 Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	DNACQSHCDLNTRSCPLSQRLCWNSQWCQXVCHSXCQS/NXTCD/SGFCCHXECLGGGSINDDFSGD/SCRNVVYNN/GYEKCHIGFYQHMGWRCINDD FSVCPLNCDLNTRNGF ITRLCWNSHLCQXVGSITCQSTCD/GGRCCHXECLGGGN-GISSDG SCRNVVYVD/CLEXCBSL TYQHNGWRCIDBNY	295 297
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	CRNIT <mark>B</mark> RLTEB <sup>I</sup> VIYWKPIVILOSCNQDCEASYVEADDDRNSCKKCI <mark>G</mark> HCPKVCPGTVVDSV AAQKLSGCTHINGSLIQINSGAN IEELEEN	390
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	CRSNV <mark>B</mark> NEIL <mark>G</mark> SEGNT BIYWKPIDILSCNQDCPVGYVINSTDRHSCIKCSGHCPKVCPGTVVDSVAAAQKLSGCTHINGSLIIQIHSGAN IEELEEN	397
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	lkyikzitgflkvfrsyslsvenflkni iiegoor kosvelvynnonledlmukilinyticsockiffhfnykkuu u sech nys vednd rr	490
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	Lkyionitgflkvfrsyslsvelkni diegeef konyelvydnonledladksensknytir Rockiffhfnykkof Hitel nys veskd rr	497
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	vspssngdrvacnvtslovfor vcshvagi kænfrekvgd casllgyt hyrkansknithfogdacennvnkyfovsat dysk-et bittef	589
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	Vspssngdrvacnvtsleasørssasidenenfrekvgdhasllgyt hyrkaksknithfogdacennvkkyforsatedhurkyf	597
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	FTQYAFYYQTYNLAQAAKGAKSEIKYFN <mark>U</mark> XPDTPSPPLNYH QAI GEIRIKWQPPKRPNGN THYIYEGKRELOFVIGVPI AN <mark>y</mark> AISLAVCINIEIL	689
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	FTQYAFYYQTYNLAQAAKGAKSEIKYFT <mark>I</mark> SPDTPSPPLNYH QAI GEIRIKWQPPKRPNGN THYIY <mark>H</mark> GKRELD TD <mark>H</mark> IRQRDYC	684
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	DVDTHYLDHITKVIGSKAROLVERAICHKALMINUSYK PNVISDISSE MNGKCCFCIKKEKKHEVBAEDQIQFEDAIHNTVYIKNESFR K	787
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1		775
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	NDRP A HITLSSRSTEGIVERRSDEL TLEBEVR HITTYISKGNVIENGVY FGIIATHTS TVSQL HYTEYTIEV GAGHYIDRE-ENTR	882
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	SSRSIA YUSKNPRRVTESCSTEISENLISSILLEG TSTSRPRSE <mark>NVIENGVY FS</mark> INV <mark>THTS TVSQL HYTEYTIEV</mark> AGQDIDRETCESS	873
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	CPFYYRCSTVATASIRTLPLSNADDIDSATILY 9DNTS KTVHICKDEPKDENGVIVSYS EYTHLD:GNPKFAVVCITCLGYKA KGH LTALSFGRY	982
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	Chlhcrcsteatasirtlplsnaddidshtili tonss ktmlikwdepknengvivsys eythlongspketvvcithlgygt kgh Ltalspgny	973
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	SLRLQATSLAGNGNWTR <mark>WTEGTIPDET IGGLTTEVLALVVC</mark> TWUTETTEMC WIFVTRKLAS <mark>R PGLVLYASVNPEYNSTWYLPDEWEV</mark> SRDKVCL RE	1082
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	Slrlqatslagngnwtr <mark>wyte</mark> riptesgglttevlalvvctwate if wyg wifvtrklafr pogvlyasvnpeynsavyerdeveverdevcl re	1073
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	lgqgsfgmvwegeakdlvegkf <mark>m</mark> vkcavktvnesaslrerieflqeasvmk <mark>m</mark> fmChhvvkllgvvskghptlvimelm <mark>t</mark> ngdlksylr <mark>m</mark> hrdneen <mark>f</mark> gk	1182
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	lgqgsfgmvwegeakdlvegkp <mark>m</mark> vkcavktvnesaslrerieflqeasvmkmfmChhvvkllgvvskghptlvimelm <mark>a</mark> ngdlksylr <mark>m</mark> hrdneen <mark>l</mark> gk	1173
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	QPPTL QT <mark>H</mark> MAVEIADGMAYLSAKKFVHRDLAARNCKVSED <mark>K</mark> TVKIGDFGNTRDIYETDYYRKGGKGLLPVRNMAPESLKDGVFTSQSDVNSYGVVLWE	1282
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	QPPTL RI <mark>D</mark> QMAIEIADGMAYLSAKKFVHRDLAARNCKVREDI	1273
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2 Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	Matlasqpyrglsneqvvnyvynyrgrgvmempeycfyklyclyrelchyfnyrarftyfeligyllfdyfdsgwysglsneqvvyrglsgevyrglsneqvyrglsneqvvyrgrggysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsneqvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsnegvvyrgesgysglsnegvvyrgesglsnegvvyrg	1381 1373
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2	ID I HACDIIQSSEEGUA FFATYIEISTULINCSCSICKEHQSPLNGGIRG (DSKHAA YSFDDSK)	1461
Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	Gen Cosideschqhekeverffresathmacskahmdcscsicgeghtq-secpdn Edskeverchetski siassdeskgskystysngslandk	1472
Limulus_polyphemus_XM_013919674.2 Limulus_polyphemus_XM022397973.1_XP013785403.1	WEITIGE KH	1470 1483

IR paralogs in *Limulus polyphemus*: putative gene duplication.

The Sequence Mani	pulation Suite: Multiple Align Show * -> S	NP
HUMINSR_M10051.1 INSRR_NM014215.2 IGF-IR_X04434.1 IGF-IR_AAB22215.1	MTPAGQRRAPDPRRPRAPAAMGTGGRRGA AAPLLVAVAALL AAGHLYPGEVG-PMDIRNNLTR HELENCSVTEGHQILLMFKTRPED RDLS 	97 72 74 74
HUMINSR_M10051.1	FPRLIMITTYLLLFRVYGLESLKDLFPNLTVIRGS: LFFNYALVIFEMVHLKELGLYNLMNITRGSVRIEKNNSLCYLATIOWSRILDSVEDNHIVLNKD	197
INSRR_NM014215.2	FPRLTQVTTYLLLFRVYGLESLRDLFPNLAVIRGT: LFLGYALVIFEMPHLRDVALPALGAVLRGAVRVEKNQSLCHLSTIDWSLIQPAPGANHIVGNKL	172
IGF-IR_X04434.1	FPRLTVITTYLLLFRVAGLESLGDLFPNLTVIRGM: LFYNYALVIFEMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRMEKNADLCYLSTVDWSLIDAVSNNYLVGNKP	174
IGF-IR_AAB22215.1	FPRLTVITTYLLLFRVAGLESLGDLFPNLTVIRGM: LFYNYALVIFEMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRMEKNADLCYLSTVDWSLILDAVSNNYLVGNKP	174
HUMINSR_M10051.1 INSRR_NM014215.2 IGF-IR_X04434.1 IGF-IR_AAB22215.1	DNEEC DL CPGTAKGKINCPATVINGQFVERCWIHS CQAVCFTICKSH CTAEGLCCHSECLGNCSCPEDPIKCVACRNFYLDGRC EICPPPYH G-EC. DVCPGVLGAAGEP-CAKTIFSGHIDYRCWISS CQAVCPCPHGM-ACTARGECCHTECLGGCSOPEDPRACVACRHYFQGAC NACPPGIYQ P-KEC DLCPGIMEEKPMCEKTIINNEYNYRCWIIN CQAMCPSIGKRACTENNECCHPECLGSCSAPINDIACVACRHYYAGVC FACPPNIYR P-KEC DLCPGIMEEKPMCEKTIINNEYNYRCWIIN CQAMCPSIGKRACTENNECCHPECLGSCSAPINDIACVACRHYYAGVC FACPPNIYR P-KEC DLCPGIMEEKPMCEKTIINNEYNYRCWIIN CQAMCPSICGKRACTENNECCHPECLGSCSAPINDIACVACRHYYAGVC FACPPNIYR	295 269 271 271
HUMINSR_M10051.1	QDWRCVNFSFCQDIHHKCKNSRRQGCHQIVIHNNKCIPECPSGNIMNSS-NLLCIPCLGPCPKVCHLLEGEKTIDSVISAQELRGCTVINGSLINIRG	394
INSRR_NM014215.2	ESWRCVTAERCASI-HSVPGRASIGHQGSGLAQCPSGIRNSS-SIFCHKGEGLCPKECKVGIKTIDSIGAQDIVGCHVEGSLINIRQG	361
IGF-IR_X04434.1	EGWRCVDRDFCANI-LSAESSDSEGVHHDGECMQECPSGIRNSSQSMYCIPGEGPCPKVGEEEKKIKTIDSVISAQMAQGCTIFKGNLINIRRG	367
IGF-IR_AAB22215.1	EGWRCVDRDFCANI-LSAESSDSEGVHHDGECMQECPSGIRNGSQSMYCIPGEGPCPKVGEEEKKIKTIDSVISAQMAQGCTIFKGNLINIRRG	367
HUMINSR_M10051.1	NN AAELEANLGLIEE SGYIKIR SYALVSLEFEKLALIRGETLEIGNYSFYALDNQNLRQUWDWSKHNLTTIQGKLEH NPKLC SETH MEEVSG	494
INSRR_NM014215.2	YN EPQLQHSIGLVET IGFIKIKHSFALVSLEFENLKIIRG AMVDGNYTLYVLDNQNLQQLGSWVAAGLTIPVGKIYFA NPHLCIEHIYRLEEVIG	461
IGF-IR_X04434.1	NN ASELENFMGIEVTIGVVKIR SHALVSLEFENLKLILGEQLEGNYSFYVLDNQNLQQLMDWDHRNLTKKAGKMYFA NPHLCVSEIYMEEVIG	467
IGF-IR_AAB22215.1	NN ASELENFMGLEVTIGVVKIR SHALVSLEE NLHLILGEQLEGNYSFYVLDNQNLQQLWDWDHRNLTKKAGKMYFA NPHLCVSEIYMEEVIG	467
HUMINSR_M10051.1	TYGRQEENDIALKINGDYASCENELLYFSYIRISFDYILLRWEPYWPPIFRDL.GEMLYYKEYPCNVTEFDGCDACGSISWIVYDIDPELRSNDPKSQN	594
INSRR_NM014215.2	TRGRQNYALINPRINGDRARCQIRILYFVSNVTEADRILRWERYEPLARDLISFIYYYKEYPCNATEHVGPDACGISSKILDYLLFLSRIQ	556
IGF-IR_X04434.1	TYGRQSYGFINTRYNGFRASCESDVLFISITISKNIIITWRYRPPYRDLISFIYYYKEYPKNVTEYDGODACGSISW MYDVDLPPNKDV	562
IGF-IR_AAB22215.1	TYGRQSYGFINTRYNGFRASCESDVLFISITISKNIIITWRYRPPYRDLISFIYYYKEYPKNVTEYDGODACGSISW, MYDVDLPPNKDV	562
HUMINSR_M10051.1	HPGWLMRGLKPWTQYAI VYT - VTESTERRTYGAKSDI YYCTDATNESY PLDPI SVSNSSSÇII. XXKPPSDPNGNITHKIVFWERQAEDSEL ELDY	693
INSRR_NM014215.2	EPGVTLASLKPWTQYAV VRA TITTE DSPHQGAQSPIVY RTLPAAPTVEQDVISTSNSSSHLVRWKPPTQRNGNITYYJVLWQRLAEDGDLILNDY	656
IGF-IR_X04434.1	EPGILLH LKPWTQYAV VRATTIHV NDHIRGAKSEI Y RTNASVOSIPLDVISASNSSSQLIVKNNPPSLPNGNI SYY VRMQRQPO YLKRNNY	662
IGF-IR_AAB22215.1	EPGILLH LKPWTQYAV VRATTIHV NDHIRGAKSEI Y RTNASVOSIPLDVISASNSSSQLIVKNNPPSLPNGNI SYY VRMQRQPO YLKRNNY	662
HUMINSR_M10051.1 INSRR_NM014215.2 IGF-IR_X04434.1 IGF-IR_AAB22215.1	CLIGLY ESRTWS-PPF SE SQKHNQSEY-EDSACECCSCEKTDSQILKELEES S RKTFEDILHNVVF PRKTSSGTGAEDERPSRKRRS GD G CHIGLP ETSN-NDPRF GEGDPEAEME DCGPCQHPEPGQVLPPLEAQES OKKFEN LHNAIT	788 734 746 746
HUMINSR_M10051.1 INSRR_NM014215.2 IGF-IR_X04434.1 IGF-IR_AAB22215.1	NVTVAVFT-VAAFPNTSSTSVFTSPEEHRPFEVVNNESLVISGLRHFTGYRIELQACMQDTPEERCSVAVVSARTMFEAKADDIVGEVTHEIFEN KSPQRDSGRHRRAAGPLRLGGNSSDFEIQED VP-RERAVISGLRHFTEYRID HACNHAAHTVGCSAAT VFARTMEHREADGIPGKVAWEASSKN NTIMSSRSRNTTAADTYNITDEELETEYFFFS VDN:CHTVISNLRFFTEYRID HACNHEAEKLGCSASN-VFARTMEAEGADDIFGEVTWEPRPEN NTIMSSRSRNTTAADTYNITDEELETEYFFFS VDN:CHTVISNLRFFTEYRID HACNHEAEKLGCSASN-VFARTMEAEGADDIFGEVTWEPRPEN NTIMSSRSRNTTAADTYNITDEELETEYFFFS VDN:CHTVISNLRFFTEYRID HACNHEAEKLGCSASN-VFARTMEAEGADDIFGEVTWEPRPEN	885 830 846 846
HUMINSR_M10051.1	V HEMMQEBKEPNGLI LYENSYRRYGD ELHLCVSRKH ALERECELRGLSPGNYSVR RATSLAGNGSWT PTYFYD - TDYLDVPSNIAK IIGP I	983
INSRR_NM014215.2	SVLENLEDDDNGLI KYE KYRRLG ATVLCVSRLRVAKFGGVHEALL PGNYSAR RATSLAGNGSWT SVAFYILGPEEDAGGHHUL TATP'G	930
IGF-IR_X04434.1	SIFEKNPEBENPNGLI MYE KYGSQUD QRE-CVSRQEYRKYGGAR MNRENGGNYTAR QATSL GNGSWT PVFFYD - QAKIGYENFHHL IALP'A	943
IGF-IR_AAB22215.1	SIFEKNPEBENPNGLI MYE KYGSQUD QRE-CVSRQEYRKYGGAR MNRENGGNYTAR QATSL GNGSWT PVFFYD - QAKIGYENFHHL IALP'A	943
HUMINSR_M10051.1	FVF FSV IGSI'LE LEKR, PDG-PLGPLYASSNPEYLGASDVFPCSVYVPDEWEVGREKTILLRELGQGSFGMVYEGNARD IKGEAETRVAKTVNES	1082
INSRR_NM014215.2	LIL I-V AALG FYGKKRRLYASVNPEYFSASDMYVPDEWEVBREGISIRELGQGSFGMVYEGVAKG VKDEPETRVAKTVNEL	1018
IGF-IR_X04434.1	VLL VGG VIML V HKKRNNSRLGNGVLYASVNPEYFSASDVYVPDEWEVAREKTIMSRELGQGSFGMVYEGVAKG VKDEPETRVAKTVNEA	1038
IGF-IR_AAB22215.1	VLL VGG VIML V HKKRNNSRLGNGVLYASVNPEYFSASDVYVPDEWEVAREKTIMSRELGQGSFGMVYEGVAKG VKDEPETRVAKTVNEA	1038
HUMINSR_M10051.1	ASLRERIEFLNEASVMKGFTCHHVVRLLGVVSKGQPTLVMMELMAHGDLKSVLRSLRPEAENNPGRPPPTLQEMIQMAHEIADGMAYLNAKKFVHRDLAA	1182
INSRR_NM014215.2	ASFRRCIFFLKEASVMKAFKCHHVVRLLGVVSQGQPTLVIMELMTKGDLKSULKSLRPEAENNFGLPQPALGEMIQMAHEIADGMAYLAANKFVHRDLAA	1118
IGF-IR_X04434.1	ASMRERIEFLNEASVMKEFNCHHVVRLLGVVSQGQPTLVIMELMTRGDLKSVLRSLRPEMENNPVLAPPSLSKMIQMAHEIADGMAYLNANKFVHRDLAA	1138
IGF-IR_AAB22215.1	ASMRERIEFLNEASVMKEFNCHHVVRLLGVVSQGQPTLVIMELMTRGDLKSVLRSLRPEMENNPVLAPPSLSKMIQMAHEIADGMAYLNANKFVHRDLAA	1138
HUMINSR_M10051.1	RNCMVÄHDFTVKIGDFGMTRDIVETDYYRKGGKGLLPVRWMÄPESLKDGVFTTSSDMWSFGVVLWEITSLAEQPYQGLSNEQVLKFVMDGGYLDQPDNCP	1282
INSRR_NM014215.2	RNCMVSQDFTVKIGDFGMTRDIVETDYYRKGGKGLLPVRWMÄPESLKDGIFTTHSDYWSFGVVLWEIVTLAEQPYQGLSNEQVLKFVMDGGYLEIDGCP	1218
IGF-IR_X04434.1	RNCMVÄEDFTVKIGDFGMTRDIVETDYYRKGGKGLLPVRWMSPESLKDGVFTTYSDYWSFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLRFVMEGGLDKFNNCP	1238
IGF-IR_AAB22215.1	RNCMVÄEDFTVKIGDFGMTRDIVETDYYRKGGKGLLPVRWMSPESLKDGVFTTYSDYWSFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLRFVMEGGLUKFVNCG	1238
HUMINSR_M10051.1 INSRR_NM014215.2 IGF-IR_X04434.1 IGF-IR_AAB22215.1	ER TO LMRMCNOFNE MRETELEIVNI KOLLESEPEVSE HEEEN APESEELEMEFEDMEN ELDR SHCQREAGRDGS LGFKR LQIQ LMSRCNOPMELRSSTHIJDS QELREFRLISEVYBEC DM FILMRMCNOVNE MRESELISS KEMEPEREVSEVBEEN LPEPEELDLEPENMESVELDE ASSSSLPPENH GHK ENGE POVIVIRA DM FILMRMCNOVNE MRESELISS KEMEPEREVSEVYBEEN LPEPEELDLEPENMESVELDE ASSSSLPPENH GHK ENGE POVIVIRA DM FILMRMCNOVNE MRESELISS KEMEPEREVSEVYBEEN LPEPEELDLEPENMESVELDE ASSSSLPPENH GHK ENGE POVIVIRA	1373 1297 1338 1338
HUMINSR_M10051.1 INSRR_NM014215.2 IGF-IR_X04434.1 IGF-IR_AAB22215.1	SYEEHIPYTHMNGGKKNGRILTLPRSNPS SFDERQPYAHMNGGRKNERALPLPQSSTC SFDERQPYAHMNGGRKNERALPLPQSSTC	1402 1297 1367 1367

IR, IGF1R and IRR in *Homo sapiens*: gene duplication (specific to vertebrates).



IR1 and IR2 paralogs in *Macrobrachium rosenbergii*: gene duplication (specific to malacostracans).

The Sequence Manipulation Suite: Multiple Align Show

Macrobrachium_nipponense_1	-MIT SA MS LNVMASGI FØGNAA-	26
Macrobrachium_nipponense_3	MFLITLRCPMSLNSQKQNCFLINPLDTEVSLWQLRFFCSASNAVILRNRSKCFSVYRSLHSMIG I SE TVKIKT SKA RØEKATKKWREFFRRSHIPLMK	100
Macrobrachium_nipponense_1 Macrobrachium_nipponense_3	- TANRP SINGE YH	42 200
Macrobrachium_nipponense_1 Macrobrachium_nipponense_3	LFØLSVTØMVI SCØVØNL	64 300
Macrobrachium_nipponense_1 Macrobrachium_nipponense_3	SPRTCKSWEIT	85 400
Macrobrachium_nipponense_1	DIRECCHWEGHLHLQDIBEE WEDEEE VE LSFPNDVQCHEYWYYRSFDRSDER LDDDSVIRGHEMFHGYALWIIGNTYDER GL	174
Macrobrachium_nipponense_3	LDLRNNISALDDLCKCRIHGHLHFVLQDQCHDESIAR NOW-SFFCHREIGHH YR YN FNDTSDRH FFNL VIRGDVLFHNYALVIYDVPSDED GL	499
Macrobrachium_nipponense_1	dnu toll ngsvrip knu ilg poldnum brink. Beak nut unn viyciydpgeidnsg pievrsnnkugsu vg gg (gg (gg qChhecag	263
Macrobrachium_nipponense_3	Vn svil rgsvrip nprlgvuntidnnii -vhrla bytirn ragreceps petsdg rskpcgsprgwsknhcgrigg for kongegeged tog gg (gg	598
Macrobrachium_nipponense_1	GCLRPNDESRGVACRNYYMPRNNSGVASCDMDQSYMVSGNRYLCIGSVSCSBPDGA-DGSSSGCRGKDNS	336
Macrobrachium_nipponense_3	GCSRPNDEIRGHACRKLRQNGRGVSAGSKHMMKVDDMRCGKWSFGAGNSKSS3GHIEGYFIKNGIQECURGCQ3GYKEAVVREGWQNVSIG.PCENKE	696
Macrobrachium_nipponense_1	CVENSCROTNITSNDLASLIGCEYVDGNLINNIGGWNVIGQLEENLKNIRNVTGYJRVSGENTIFSLNFLINLEVTEGKEKKEDFYVDYMENEHLQE	436
Macrobrachium_nipponense_3	ACSKYCICKIIRSVGE QWFRACKIVDGSLTHIEGG-DIERELEENLSSIEEVTGYVKIFRSN-VISLNFLSLKKIGGCHFIRSNYSLEIL NANLOS	794
Macrobrachium_nipponense_1	LWZGAKKLT GNNGTFYFRYNESLCRQLTYDDAD SGVARDI-VYDC SINGQT PCYDSEMKAE HEDREVGTVI WTWD-HFYKG DHRMVIGYNV	531
Macrobrachium_nipponense_3	LWnwterdpeftrgkveaqsnrklclhhqkutni tnicgssetdusytsngdvyrcnvtsikak (germyst i veveddyrog)	886
Macrobrachium_nipponense_1	FY EASEN ID GNRDAG DELLMNRYFWEYEK BOC STRTEN KED KONTRYAVYYMAYYTD EKTG REGILWYKT BINGSNUWD TRKHRT YSD	631
Macrobrachium_nipponense_3	TY KASEN SE YESEGFEDQ-GWSTMEKRITA G-EFKNHFS INHOG FRYAVYYKTYPLG TSKG QSDIMMATT FFNDTKPVG KWDSPD NSL	984
Macrobrachium_nipponense_1	I TENRSOSEINGNFSMY GEYKEATENTHOLDESCSHPSFROM PSESYOS SPAGR NATSSEVKAN ISALADMXCC	712
Macrobrachium_nipponense_3	Dewnodesnengiidhyyyy Lillkey phypplirfce Einly dn-Markengske diswasrialeeeekkokkyod odde ckasatesco	1083
Macrobrachium_nipponense_1	CQDQNQLFASIKNDRQFTAFEDY DNY YAKIENDSKPPNATITRSPIQKKSRT GPITIVPPITEASTQSFVMTETE RSTV KPT KDPQVDG	810
Macrobrachium_nipponense_3	SRSSESGQQDVIG TQFEDF MDN YVWKVFITRIRSE SYMMHAEDISFE GLQFKYSSGCRPSGTNTRK	1157
Macrobrachium_nipponense_1	II LKDK IIR NFYTLIGLCHFIDYEIG SCNN DODONFLC SPTVCIKIMADPO DIIIGFEIMLOGOGRW RF RR BRQ	896
Macrobrachium_nipponense_3	TERNIE PAR RLNSL-GDASKRNLSSGUL GGYGANVFSTYCNOVYFV PSEESIVGRYLCHHEMLIMFERDPSNGDILL OF RITGIRLRISSLR	1256
Macrobrachium_nipponense_1	A AESA SERVEGGELLR EGVEK AKPYV RKCHANYH LSLP IDP PEPYSSHYKK VISHIPTINPNGKPRYTID VDIDAGERKEIGP	992
Macrobrachium_nipponense_3	Filysv vaacqepdannikless partaikpse vom Ibrdlivvnisl di eutrspekspngaviayiinQMQGEG	1342
Macrobrachium_nipponense_1	OSEE ASKKGVIHRLKGF POSMUSS K KSEGOPOIIEMIR DPYLVH V PMGVMV VCHMKFHLO R RALGAVIE RC-	1082
Macrobrachium_nipponense_3	Id Cysscifee R V-RLPDL PCNYSER QVRSK RYGNESSPVIFVIVDDV PTYFS I VSSLAV GALV AVICWOR YGSRYIPFILD	1438
Macrobrachium_nipponense_1	VVT NRCHGELLGCTRCKI- DK. HIHPKDIE AL KKIGKGYFGVV OGVEKEPSCAK VA KOLNKPDKLNGAKCABEEVHHMGDINSHF VPD GV	1181
Macrobrachium_nipponense_3	KVD NPYNREGFAPGEIFFE HFWRDDRVFH KPHGCGYFGMV OGOUTR-MGVVS VAVKTHRESATTEISQF KEAAVMONEKCHH VOL GV	1535
Macrobrachium_nipponense_1	mitkps <mark>iv vmelm</mark> ergol t <mark>fliset gth</mark> kpommieman eaadgmaylaar klvhrolaarnomlda <mark>nitlkigdfgltrit</mark> andyy kroes vlpv	1281
Macrobrachium_nipponense_3	Vgdyap vvymelmpegolksflkkas nehteoxliemameaadgmaylad klvhrolaarnomld <mark>d nitlkigdfgltrnh</mark> ksdyy kroos vlpvk	1635
Macrobrachium_nipponense_1	MLAPEALEF RYTSRSDYWSYGVLLWEIYARG O PYQGYENQQWHEXWAAGILREQQAPCHDFMYA MNQCWRREBKERPFFQ IIIILPRAVPYL	1381
Macrobrachium_nipponense_3	MMAPE HQFMYTIQSDYWSYGVLLWEMATRGY FYKNHINDEVIRLYYEXYATHGRERNCERPLQRIMEQCMNYMPKERPKETA INFLLKQISSIYQQ	1735
Macrobrachium_nipponense_1 Macrobrachium_nipponense_3	FMERVSS HK	1408 1835
Macrobrachium_nipponense_1 Macrobrachium_nipponense_3	- ASGS DPSL	1417 1935
Macrobrachium_nipponense_1 Macrobrachium_nipponense_3	LHVPLSAFARAPSHVLKPSTSIPTLLPAVLGSSSSYPQCIVDITNRTLPGHSISIPASPTRNRKSSLKTGSRSDDIIRTSSVSEHGQYYNMQPSLPSTE	1417 2035
Macrobrachium_nipponense_1	- 2 DG 2 KD 2 N D DI G-	1434
Macrobrachium_nipponense_3	Adsmmstklvptkagaiescsfsahnnlsesllscdddd o DG fng i Do cromerg tdasrgdrhilqqkpteephlaksrrysletmitrpltidd	2135
Macrobrachium_nipponense_1	DHS SKS-V:SLHNTED.VCLPDDHYNKRMSCGSLSC NENBER MEIRDTPTKDTSYQLLYH	1498
Macrobrachium_nipponense_3	SYLSKS SKSNHLENMPILQSTVIPGSDIP SCRCRKIY VCGKILLDELDP VVEHYSRPKRKAREHMGALDS RTT SRADPKSCHRKMSSL	2235
Macrobrachium_nipponense_1	KPISFA	1504
Macrobrachium_nipponense_3	EDFDLL	2241

IR1 and IR3 paralogs in *Macrobrachium nipponense*: gene duplication (specific to malacostracans).

<u>Figure 2.S3</u>: Alignments of the IR sequences in representative species of Fig. S2. In *D. melanogaster*, the four sequences available ("transcript variants" A, B, C and D) reveal no variation in the coding sequences (only in UTRs, not visible here). In *Calanus finmarchicus*, the five sequences are almost identical except for a few SNPs and mostly for the 5'-end which shows alternative splicing. In *D. pulex*, the four sequences, coming from gene duplication (Boucher et al., 2010), show numerous variations along the whole sequence and not only some SNPs. The same pattern is observed between sequences in *A. californica, L. polyphemus, H. sapiens* and finally, at an even higher degree in *Macrobrachium* sp.

Classification	Species	Gene	Accession n°		
Deuterostomia					
Vertebrata	Homo sapiens	Anaplastic Lymphoma tyrosine Kinase receptor (ALK)	NM_004304.4		
Vertebrata	Homo sapiens	Colon Carcinoma Kinase-4 (CCK4) = PTK7	U33635.1		
Vertebrata	Homo sapiens	Discoidin Domain Receptor tyrosine kinase 1 ( <b>DDR1</b> )	NM_001954.4		
Vertebrata	Homo sapiens	Insulin Receptor (INSR = IR)	M10051.1		
Vertebrata	Homo sapiens	Insulin receptor Related Receptor (INSRR = IRR)	NM_014215.2		
Vertebrata	Homo sapiens	Insulin-like Growth Factor I Receptor (IGF1R)	AAB22215.1		
Echinodermata	Strongylocentrotus purpuratus	Insulin Receptor precursor (IR)	ABC61312.1 XM_011669992.1		
Vertebrata	Homo sapiens	Leukocyte receptor Tyrosine Kinase (LTK) (variant 1)	NM_002344.5		
Vertebrata	Homo sapiens	Protein Tyrosine Kinase 7 (PTK7) = CCK4	BC071557.1		
Vertebrata	Homo sapiens	Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 1 ( <b>ROR1</b> )	NM_005012.3		
Vertebrata	Homo sapiens	ROS proto-oncogene 1 (ROS1)	NM_002944.2		
Echinodermata	Strongylocentrotus purpuratus	Venus Kinase Receptor (VKR)	XM_011678951.1		
		Protostomia			
Nematoda	Caenorhabditis elegans	Insulin Receptor homolog (IR = DAF-2)	AF012437.1		
Arthropoda	Drosophila melanogaster	Insulin-like Receptor (IR) (isoform A)	AAF55903.2		
Arthropoda	Macrobrachium rosenbergii	Insulin-like Receptor (IR)	KP064092.1		
Arthropoda	Sagmariasus verreauxi	Tyrosine Kinase Insulin Receptor (TKIR)	KT163378.1		
Arthropoda	Zootermopsis nevadensis	"Insulin-like peptide Receptor" (IR) $\rightarrow$ VKR	KDR10688.1		
Arthropoda	Tribolium castaneum	Venus Kinase Receptor (VKR)	EU878395.1		
Arthropoda	Drosophila melanogaster	Discoidin Domain Receptor (DDR) (variant F)	NM_001298737.1		
Arthropoda	Drosophila melanogaster	Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (variant A)	NM_144343.3		
Arthropoda	Drosophila melanogaster	Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor ( <b>ROR</b> )	NM_057614.3		

<u>Table 2.S1</u>: List of species and sequences used in the phylogenetic reconstruction of the Insulin Receptors (IRs) and other closely related Tyrosine Kinase (TK) receptors (Fig. 2.1).

Classification	Classification Species Gene		Accession n°	
Deuterostomia				
Echinodermata	Strongylocentrotus purpuratus	Insulin Receptor (IR) precursor (predicted)	XM_011669992.1	
Hemichordata	Saccoglossus kowalevskii	IGF Receptor (predicted)	XP_006823829.1	
Cephalochordata	Branchiostoma lanceolatum	Insulin-like peptide Receptor (ILP-R)	AAB50848.1	
		Insulin Receptor (INSR = IR)	M10051.1	
Chordata	Homo sapiens	IGF I Receptor (IGF-1R)	AAB22215.1	
		Insulin receptor Related Receptor (INSRR)	NM 014215.2	
	Prot	ostomia - Pancrustaceans	-	
		Insulin Receptor (IR) (putative)	EFX63421.1	
		InR1	Dappu1 237995	
Branchiopoda -	Daphnia pulex	InR2	Dappu1_270048	
Diplostraca		InR3	Dappu1 268485	
		InR4	Dappu1_237791	
	Daphnia magna	Insulin Growth Factor 1 Receptor (IGF1R)	JAN50641.1	
	Lepeophtheirus salmonis	Insulin Receptor (INSR)	HACA01029296.1	
		Insulin-Like Peptide Receptor (ILPR Ia)	GAXK01194612.1	
		Insulin-Like Peptide Receptor (ILPR Ib)	GBFB01186101.1	
Copepoda	Calanus finmarchicus	Insulin-Like Peptide Receptor (ILPR Ib)	GBFB01186100.1	
		Insulin-Like Peptide Receptor (ILPR Ic)	GBFB01186096.1	
		Insulin-Like Peptide Receptor (ILPR Ic)	GBFB01186095.1	
Malacostraca: Amphipoda	Hyalella azteca	Insulin Receptor-Related protein-Like	XP_018020614.1	
Malacostraca: Decapoda - Achelata	Sagmariasus verreauxi	Tyrosine Kinase Insulin Receptor (TKIR)	KT163378.1	
Malacostraca: Decapoda - Caridea	Macrobrachium rosenbergii	Insulin-like Receptor (IR)	KP064092.1	
	Acurthosinhon nisum	Insulin-like peptide receptor	XP 001942660.2	
	Acyrthostphon pisun	Insulin-like receptor-like	XP_001952079.2	
	Ander comunit	Insulin receptor (IR)	AAB17094.1	
	леаез авдури	Insulin Receptor-Related protein-Like XP_0180206   Tyrosine Kinase Insulin Receptor (TKIR) KT163378   Insulin-like Receptor (IR) KP064092   Insulin-like peptide receptor XP 0019426   Insulin-like receptor (IR) XP_0019520   Insulin receptor (IR) AAB17094   Insulin receptor (IR) XM_0016511   Insulin-like peptide receptor XM_39477		
	Anis mallifara	Insulin-like peptide receptor	XM_394771.6	
	лры темуеги	Insulin-like receptor-like (InR-2)	NM 001246667.1	
Hexapoda	Bombyx mori	Insulin receptor (IR) precursor	NP_001037011.1	
		Insulin-like receptor, isoform A Insulin-like receptor (InR), transcript variant A	AAF55903.2 NM 079712.6	
	Drosophila melanogaster	Insulin-like receptor (InR), transcript variant B	NM_001144621.3	
		Insulin-like receptor (InR), transcript variant C	NM 001144622.2	
		Insulin-like receptor (InR), transcript variant D	NM_001144623.2	
	Nilaparvata lugens	Insulin receptor 1 (IR1)	AIY24638.1 KF974333.1	

		Insulin receptor 2 (IR2)	AIY24639.1 KF974334.1
	Salamonsis invista	InR1	JF304723.1
	Solenopsis invicia	InR2	JF304722.1
		Insulin-like receptor 1 (IR1)	AHF20214.1
	Tribolium castaneum	Insulin-like receptor, transcript variant X1-4	XM_008201193.2 XM_008201194.2 XM_015979252.1 XM_015979260.1
		Insulin-like Growth Factor Receptor	TC007370
		Insulin-like Receptor	TC007371
	Protos	tomia - Other ecdysozoans	
Chalimente	Limulus polyphemus	Insulin receptor-like (predicted)	XP_013785403.1 XM_013929949.1 XM022397973.1
		Insulin receptor-like (predicted)	XM 013919674.2
	Ixodes scapularis	Insulin receptor (IR) (putative)	EEC19891.1
	Caenorhabditis elegans	Insulin-like receptor (IR) = DAF2	Q968Y9.2
Nematoda	Trichinella spiralis	Insulin receptor (IR)	XM 003380772.1
	Brugia malayi	DAF2	AY856075.1
	Pı	rotostomia - Spiralians	
	Schistosoma mansoni	Insulin Receptor protein kinase (IR-1)	AF314754.1
	зспізіозота тальопі	Insulin Receptor tyrosine kinase (IR-2)	AY649844.2
Platyhelminthes		Insulin-like Receptor (IR)	EUB63052.1
	Echinococcus granulosus	Insulin receptor (putative)	CAD30260.1
		Insulin receptor 2	CDG15326.1
	Pinctada fucata	Insulin-Related peptide Receptor (IRR)	AGA94627.1 JX121113.1
Mollusca	Crassostrea gigas	Insulin-Like Peptide Receptor (ILPR) ( <i>predicted</i> )	XP_011456321.1
	Anhisia californica	Insulin-related peptide Receptor (predicted)	XP_005096967.1
	Apiysia canjornica	Insulin-related peptide Receptor (predicted)	XM 013080393.1

Protostomia - Crustaceans: new assemblies				
Branchiopoda - Notostraca	Triops newberryi	1 BLAST hit	SRR3212077/87-88 + SRR3209182 + SRR3212081/84	
Cirripedia	Amphibalanus amphitrite	1 BLAST hit (merged)	SRR2034945/94 + SRR2034885 + SRR1525781 + SRR2034931/95 + SRR426836	
Lahthwastraga	Argulus foliaceus	1 BLAST hit (partial)	SRR3183279	
ichuiyosuaca	Argulus siamensis	1 BLAST hit	SRR514120	
Copepoda	Tigriopus kingsejongensis	2 BLAST hits (1 partial)	SRR2034718	
Malacostraca:	Allobathynella bangokensis	1 BLAST hit (very partial)	SRR4198914	

Bathynellacea			+ SRR4198915
Malacostraca:	Thysanoessa inermis	2 BLAST hits (1 merged, only in FigS1)	SRR2174568
Euphausiacea	Euphausia superba	1 BLAST hit	SRR3089571
Malacostraca: Amphipoda	Gammarus fossarum	2 BLAST hits	ERR386132
Malacostraca:	Astacus astacus	3 BLAST hits (1 partial; 1 very p. in FigS1)	SRR2961887
Astacidea	Cherax quadricarinatus	3 BLAST hits (1 merged; 1 very p. in FigS1)	ERR391750
Malacostraca:	Macrobrachium nipponense	3 BLAST hits (1 very partial, 2 only in FigS1)	SRR4292179
Caridea	Macrobrachium rosenbergii	2 BLAST hits (1 identical to KP064092.1)	SRR1653452 + SRR1653454
Malacostraca:	Armadillidium vulgare	2 BLAST hits	SRR5253654-55 + SRR1324800-09
Isopoda	Proasellus beticus	2 BLAST hits	ERR1433113
Malacostraca: Stomatopoda	Oratosquilla oratoria	1 BLAST hit (very partial)	SRR5145906

<u>Table 2.S2</u>: IR sequences included in the phylogenetic reconstructions of Fig. 2.2, Fig. 2.S1 and Fig. 2.S2. Sequences which display all the characteristic conserved domains of IRs were considered complete. Merged sequences (coming from two contigs), partial sequences (lacking one conserved domain) and very partial sequences (several conserved domains missing) are pointed out in red. Accession numbers in the first sub-table refer to sequences published in GenBank whereas those in the second sub-table refer to RNAseq data from SRA database, which we newly assembled. Overall, 28 new IR sequences were identified (23 used in Fig. 2.2; all of them in Fig. 2.S1).

# II. Étude de l'IR1 et de l'IR2 chez A. vulgare

Nous venons de voir qu'il existe chez *A. vulgare*, comme chez d'autres Isopodes et Amphipodes, deux gènes du récepteur tyrosine kinase : Av-IR1 et Av-IR2. Nous avons étudié dans un premier temps ces transcrits d'un point de vue structural. Nous avons ensuite analysé leur expression spatiale et leur expression au cours du développement. Des premiers éléments fonctionnels ont été recherchés par ARNi. Enfin, l'évolution de ces protéines a été envisagée plus largement au sein des Isopodes.

#### A. Séquences et structures de Av-IR1 et Av-IR2

Le transcrit d'Av-IR1 contient une ORF de 4440 pb, soit 1479 aa. De façon remarquable, de nouvelles analyses bioinformatiques ont montré que le transcriptome d'*A. vulgare* présente en fait deux isoformes de l'IR2. La plus courte, que nous appellerons dorénavant Av-IR2a, présente une ORF de 4356 pb, soit 1451 aa, tandis que la seconde, appelée Av-IR2b et utilisée dans Herran et al. (2018), présente une ORF de 4566 pb, soit une protéine de 1521 aa. Ces deux séquences sont identiques à l'exception d'un *indel* de 210 pb (70 aa), dont l'existence a été confirmée par RT-PCR et séquençage Sanger (Fig. 2.8).

Un peptide signal est prédit dans chacun des récepteurs, avec clivage entre les positions 18 et 19 pour Av-IR1 (ISC-DL) et entre les positions 20 et 21 pour Av-IR2a/b. Ces trois séquences d'IR présentent ensuite à leur extrémité N-terminale deux domaines conservés de liaison au ligand (RL) séparés par un domaine Furin-like riche en cystéines, ainsi qu'un domaine Tyrosine Kinase (TK) à l'origine des capacités de phosphorylation du côté C-terminal (Fig. 2.9). Entre les deux, un nombre variable de domaines conservés de type fibronectine (FN3) est détecté (aucun pour Av-IR1, un ou deux pour Av-IR2a, selon l'outil utilisé, et deux pour Av-IR2b), peut-être dû aux capacités de prédictions *in silico*. Ces domaines FN3 sont caractérisés par une structure en sandwich  $\beta$  et peuvent être impliqués dans différentes fonctions d'interaction. Les trois séquences d'IR d'*A. vulgare* partagent tous ces motifs conservés avec ceux déjà décrits chez les IR de Décapodes. Le domaine transmembranaire, non prédit par CDsearch, est bien présent lors des analyses SMART (22 aa aux positions 1020-1042, 954-976 et 1024-1046 respectivement pour les séquences protéiques d'IR1, IR2a et IR2b).



<u>Figure 2.8</u> : Alignement des séquences d'IR2a et d'IR2b, centré sur l'*indel* qui permet leur distinction. L'alignement inclut ici les espèces d'Armadillididae (genres *Armadillidium* et *Eluma*) ainsi que *Porcellionides pruinosus* (Porcellionidae), car il présente un *indel* similaire.



<u>Figure 2.9</u> : Comparaison des domaines conservés entre les IR de Décapodes publiés et les IR d'Isopodes nouvellement caractérisés, représentés par *A. vulgare*. Les domaines conservés ont été localisés et représentés grâce à CDsearch (Marchler-Bauer et al., 2015).

Des sites de N-glycosylation sont par ailleurs prédits sur ces trois protéines (12 pour l'IR1, 18 pour l'IR2a, 20 pour l'IR2b) (Fig. 2.10) ainsi que de multiples sites de phosphorylation. Enfin, un site de clivage peptidique est prédit pour Av-IR1 (FQSRKKR|ST) tandis que quatre de ces sites sont prédits pour Av-IR2a/b (Fig. 2.11). Parmi ces quatre sites, les trois premiers (NKARRKR|RD ; KARRKRR|DT ; IDGQVKR|SI) sont voisins, les deux premiers étant même chevauchants. Comme celui prédit chez Av-IR1, ils sont situés vers le milieu des transcrits, du côté extracellulaire. Le quatrième site prédit (KGLRKKR|KK) est lui situé juste après le domaine transmembranaire, du côté intracellulaire. À l'image de l'IR de Vertébrés, Av-IR1 et Av-IR2 sont donc probablement composés d'au moins deux sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) après maturation post-traductionnelle dans l'appareil de Golgi.

Concernant le motif tyrosine kinase discuté précédemment (Chapitre 2, I.C.), la forte divergence de sa séquence observée chez les Malacostracés concerne bien *A. vulgare* de la même façon. Ainsi, en lieu et place du motif YETDYY, Av-IR1 présente un motif YLSEDEIY tandis qu'Av-IR2 présente un motif VVEGDYY. En contrepartie, des motifs voisins existent dans d'autres régions du gène Av-IR1 (YRILYY) et Av-IR2 (YMEYY, YLPKNEILYY) mais dont l'importance fonctionnelle reste à explorer.



<u>Figure 2.10</u> : Localisation des sites de N-glycosylation, prédits pour Av-IR1, Av-IR2a et Av-IR2b. Chaque site retenu est matérialisé par une barre verticale verte dépassant le seuil en rouge. Figure générée par le serveur NetNGlyc 1.0.





### B. Analyses d'expression de Av-IR1 et Av-IR2

#### - Expression tissulaire chez l'adulte

L'analyse par RT-PCR révèle que Av-IR1 s'exprime dans tous les tissus étudiés, chez les femelles comme chez les mâles et les intersexués (Fig. 2.13). L'approche par RT-PCRq confirme ce résultat et montre que l'expression d'Av-IR1 est la moins forte dans les *caeca* digestifs (hépatopancréas) et les hémocytes et la plus forte dans le tube digestif, les ovaires et les différentes parties de la gonade des mâles (Fig. 2.12). Ce patron d'expression est similaire entre les lignées infectées ou non par *Wolbachia*.

Concernant le second récepteur, les amorces utilisées pour les analyses d'expression se situent sur les parties conservées des deux isoformes, et ne permettent donc pas de discriminer les éventuelles différences à ce niveau. J'appellerai donc ce récepteur Av-IR2 pour indiquer l'absence de distinction entre l'expression de IR2a et celle de IR2b. Av-IR2 présente une expression apparemment assez large en RT-PCR, encore une fois dans les deux sexes (Fig. 2.14). La RT-PCRq, plus sensible, révèle en réalité une expression prépondérante dans les ovaires chez les femelles, dans la GA chez les mâles et dans une moindre mesure dans le muscle/gras, les pattes et la chaîne nerveuse des deux sexes (Fig. 2.12). Comme pour Av-IR1, la lignée infectée par *Wolbachia* présente le même patron d'expression d'Av-IR2 que la lignée non infectée. La seule différence notable concerne les intersexués, naturels ou expérimentaux, chez lesquels l'expression d'Av-IR2 semble bien plus élevée dans la GA (hypertrophiée) que dans celle des mâles normaux, le faible nombre de mesures ne permettant pas de le confirmer statistiquement.



<u>Figure 2.12</u> : Expression tissulaire des ARNm d'Av-IR1 (A., B.) et Av-IR2 (C., D.) amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8. Les tissus suivants ont été disséqués à partir d'*A. vulgare* adultes de la lignée non infectée (A., C.) et de la lignée infectée par *Wolbachia* (B., D.) : hémocytes (HE), pattes (LE), muscle et tissu adipeux (MF), chaîne nerveuse (NC), cerveau (BR), glandes salivaires (SG), tube digestif (DT), *caeca* (CK), ovaires (OV), spermatozoïdes (SP), *vas deferens* (VD), vésicule séminale (SV), utricules (UT), glandes androgènes (AG).



<u>Figure 2.13</u> : Expression tissulaire des ARNm d'Av-IR1 amplifiés par RT-PCR. Les tissus suivants ont été disséqués à partir d'A. *vulgare* adultes de la lignée non infectée (Wo-) et de la lignée infectée par *Wolbachia* (Wo+) : hémocytes (HE), pattes (LE), muscle et tissu adipeux (MF), chaîne nerveuse (NC), cerveau (BR), glandes salivaires (SG), tube digestif (DT), *caeca* (CK), ovaires (OV), spermatozoïdes (SP), *vas deferens* (VD), vésicule séminale (SV), utricules (UT), glandes androgènes (AG).



<u>Figure 2.14</u> : Expression tissulaire des ARNm d'Av-IR2 amplifiés par RT-PCR. Les tissus suivants ont été disséqués à partir d'A. *vulgare* adultes de la lignée non infectée (Wo-) et de la lignée infectée par *Wolbachia* (Wo+) : hémocytes (HE), pattes (LE), muscle et tissu adipeux (MF), chaîne nerveuse (NC), cerveau (BR), glandes salivaires (SG), tube digestif (DT), *caeca* (CK), ovaires (OV), spermatozoïdes (SP), *vas deferens* (VD), vésicule séminale (SV), utricules (UT), glandes androgènes (AG).

# - Expression au cours du développement

En RT-PCRq (Fig. 2.15) comme en RNAseq (Fig. 2.16), l'expression de l'IR1, mesurée sur animaux entiers, est relativement stable au cours du développement d'*A. vulgare*. Elle est légèrement plus forte chez les mâles mais il n'y a, *a priori*, pas de profil d'expression spécifique d'une des phases de la différenciation sexuelle, ce gène étant exprimé à tous les stades.

De même, l'expression d'Av-IR2 reste plutôt faible et stable au cours du développement, notamment chez les mâles (Figs. 2.15 et 2.16). L'expression de l'IR2, ainsi que la variabilité interindividuelle, augmentent seulement chez les femelles adultes, peut-être en lien avec des stades différents du cycle de vitellogenèse.

<u>Figure 2.15</u> : Profils de l'expression d'Av-IR1 (A., B.) et Av-IR2 (C., D.) amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8, au cours du développement dans la lignée non infectée (A., C.) et dans la lignée infectée par *Wolbachia* (B., D.). Les larves ont été échantillonnées à la naissance (0w), une semaine (1w), deux semaines (2w) et trois semaines (3w) après la naissance. Ensuite, chaque échantillonnage est individuel et représente un stade de développement (4-8), caractérisé par une nouvelle mue, jusqu'au stade adulte (AM pour les mâles, AF pour les femelles). Les caractères sexuels externes commencent à apparaître au stade 5, ce qui permet de sexer les individus.

<u>Figure 2.16</u> : Profils d'expression d'Av-IR1 (A., B.) et Av-IR2 (C., D.) au cours du développement, estimés *in silico* par RNAseq dans la lignée non-infectée (A., C.) et la lignée infectée par *Wolbachia* (B., D.). Les transcriptomes ont été générés à partir d'animaux prélevés à la naissance (*0w*), deux semaines après la naissance (*2w*), au stade 4 non différencié extérieurement et aux stades 5 et 7, dont le sexe est identifiable (M pour les mâles, F pour les femelles). Chaque point correspond à un lot de plusieurs de ces échantillons. Les lots ne contenant que des individus n'exprimant pas l'HA en RT-PCRq ont été indiqués en rouge, ceux ne contenant que des individus exprimant tous l'HA en RT-PCRq ont été indiqués en bleu et les lots contenant un mélange d'individus des deux catégories précédentes sont indiqués en violet.









B. Relative expression of Av-IR1 during development of the Wolbachia-infected lineage







# C. Effets de l'extinction de l'expression de Av-IR1 et Av-IR2

Dans le cadre du stage de M2 de Camille Houdelet que j'ai coencadré, nous avons cherché à inhiber par ARNi l'expression des récepteurs de l'HA chez des mâles adultes de la lignée noninfectée par Wolbachia pour établir leur implication dans cette voie de signalisation. Dans chaque condition, les effets de l'extinction sur les autres gènes de la voie ont été mesurés par RT-PCRq (n=5) et deux animaux supplémentaires ont été disségués pour observer l'effet de l'ARNi sur le phénotype des gonades. Dans cette première série expérimentale, outre l'inhibition de l'IGFBP-rP1 traitée précédemment dans le chapitre I, nous avons réussi à inhiber significativement l'expression de Av-IR1 jusqu'à 28 semaines après injection de l'ARNdb (comparativement au groupe injecté par l'eau, - 85% à 1 semaine, - 90% à 4 semaines, - 65% à 12 semaines et - 69% à 28 semaines, Fig. 2.17.C) mais pas celle de Av-IR2. Les analyses de RT-PCRq, sur animaux entiers, ont montré que l'extinction d'Av-IR1 induit une hausse significative de l'expression de l'HA à une, quatre, 12 et 28 semaines post-injection (Fig. 2.17.A). Une tendance à la hausse de l'expression de l'IGFBP-rP1 est également observée, significative à une semaine post-injection seulement (Fig. 2.17.B), ainsi qu'une légère surexpression de la GIH après quatre semaines (Fig. 2.17.E). Une tendance à la hausse de l'expression de l'IR2 est également observable 4 semaines après injection (non significative par faute d'effectifs suffisants à ce pas de temps) (Fig. 2.17.D).

Ultérieurement, une deuxième série d'expériences d'ARNi a été réalisée, sur des effectifs plus réduits (n=3), pour tester différentes conditions et obtenir l'inhibition de l'expression du second récepteur transmembranaire (Fig. 2.18). Plusieurs concentrations d'ARNdb ont été testées ainsi qu'un nouvel ARNdb correspondant à une région différente du gène. Les RT-PCRq ont cette fois été réalisées sur une partie des gonades uniquement (utricules et GA associées) afin d'avoir un signal plus fort et montrent une inhibition notable de Av-IR2 un jour et une semaine après l'injection de l'ARNdb. La seule exception relevée concerne les échantillons prélevés le lendemain de l'injection par 4,5 µg/µL du premier fragment d'ARNdb. Il n'est pas à exclure qu'une partie de cet ARNdb concentré ne soit pas encore dégradée après un jour et qu'elle soit ensuite mesurée par la RT-PCRq. Par ailleurs, il semble que le nouvel ARNdb soit plus efficace, inhibant l'expression de Av-IR2 à toutes les concentrations, dès le premier jour suivant l'injection. C'est donc cet ARNdb qui a été validé pour la suite de l'étude.



<u>Figure 2.17</u> : Première série expérimentale d'extinction par ARNi de l'expression des récepteurs de l'HA. Dynamique de l'expression d'Av-AGH (A.), Av-IGFBP-rP1 (B.), Av-IR1 (C.), Av-IR2 (D.) et Av-GIH (E.), amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8, suite à l'extinction de l'expression d'Av-IR1. Les animaux entiers ont été échantillonnés une semaine (1 wpi), quatre semaines (4 wpi), 12 semaines (12 wpi) et 28 semaines (28 wpi) après l'injection de l'ARNdb. Deux types de contrôles ont été réalisés : des animaux non injectés (NI, en vert) et des animaux injectés avec de l'eau (en bleu).



<u>Figure 2.18</u> : Deuxième série expérimentale d'extinction par ARNi de l'expression des récepteurs de l'HA. Profils de l'expression de Av-IR2 amplifié par RT-PCRq, normalisée suivant l'expression du gène RbL8, suite à l'extinction de l'expression du gène d'Av-IR2 par l'injection d'un ARNdb qui n'avait pas fonctionné dans la série expérimentale précédente (*RNAi IR2*) et un nouvel ARNdb à tester (*RNAi IR2bis*), à différentes concentrations. Cette fois l'extraction d'ARN a été réalisée sur utricules et GA uniquement, pour favoriser la détection d'Av-IR2 dont le site d'expression majoritaire est la GA. Les animaux ont été échantillonnés un jour (*1d*) et une semaine (*1w*) après l'injection de l'ARNdb. Deux types de contrôles ont été réalisés : des animaux non injectés (0, en vert) et des animaux injectés avec de l'eau (en bleu). Les effectifs réduits (n=3) n'ont pas permis d'appliquer de tests statistiques.

Une dernière série d'expériences d'ARNi avec plus d'effectifs (n=6) a finalement permis de reproduire l'extinction d'Av-IR1 (inhibition de 84%, 83%, 51% après une, quatre et 12 semaines) et d'Av-IR2 (inhibition de 71%, 85%, 82% après une, guatre et 12 semaines) pour étudier leurs effets sur les autres gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'HA. L'injection simultanée d'ARNdb correspondant à l'IR1 et d'ARNdb correspondant à l'IR2 s'est également révélée efficace, permettant d'inhiber l'expression des trois récepteurs TK en même temps (pendant une semaine pour Av-IR2 et quatre semaines pour Av-IR1) (Fig. 2.19.I-L). Les mesures d'expression par RT-PCRq, encore une fois sur utricules et GA associées, ont montré que l'inhibition de Av-IR2 ainsi que l'inhibition groupée de Av-IR1 et Av-IR2 induisent une hausse de l'expression de l'IGFBP-rP1 une semaine après l'injection d'un facteur 1,9 et 2,1 respectivement (Fig. 2.19.F&J). À cette date, aucune hausse significative de l'expression de l'HA dans aucune des conditions, ni d'altération croisée entre récepteurs TK n'est mesurée (Fig. 2.19). En revanche, à partir d'un mois post-injection, une forte expression de l'HA (d'un facteur 22 puis 27) et de l'IR2 (d'un facteur 3,4 puis 7,2) sont mesurées lors de l'inhibition de Av-IR1 (Fig. 2.19.A&D). Lors de l'inhibition combinée de IR1+IR2 aux mêmes temps, seule la hausse d'expression de l'HA est observable (d'un facteur 34 après 4 semaines et d'un facteur 15 après 12 semaines) (Fig. 2.19.I). L'inhibition de Av-IR2 seul ne provoque aucune altération de l'expression de l'HA ou de l'IR1 (Fig. 2.19.E&G).

Concernant les phénotypes observés, l'extinction de l'IR1 a provoqué dans les deux séries expérimentales l'hypertrophie des GA (Figs. 2.20-2.21). Des débuts d'hypertrophies des GA ont été notés à la quatrième semaine post-injection (6/10 des GA des deux mâles de la première série et 30/36 des six mâles de la seconde série) ainsi que de fortes hypertrophies à la 12ème semaine (12/12 des GA des deux mâles de la première série et 52/52 des 6+3 mâles de la seconde série). La réversibilité de l'hypertrophie est attestée par son absence à 28 semaines post-injection. Dans la majorité des cas, aucune ouverture génitale de type femelle n'a été remarquée, à l'exception d'un individu dans la seconde série expérimentale. L'extinction de l'IR2 n'a provoqué qu'exceptionnellement une altération visible du phénotype des GA (2/54 GA des 6+3 mâles de la seconde série) (Fig. 2.22.A). En revanche, une partie des individus injectés par l'ARNdb d'IR2 présentent trois mois après des ouvertures génitale du côté de la piqûre) (Fig. 2.22.B&C).


<u>Figure 2.19</u> : Troisième série expérimentale d'extinction par ARNi de l'expression des récepteurs de l'HA. Dynamique de l'expression d'Av-AGH (A., E., I.), Av-IGFBP-rP1 (B., F., J.), Av-IR1 (C., G., K.) et Av-IR2 (D., H., L.), amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8, suite à l'extinction par ARNi de l'expression de Av-IR1 (A.-D.), Av-IR2 (E.-H.) et de leur combinaison (I.-L.). Les échantillons (utricules et GA) ont été prélevés une semaine (*1 week*), quatre semaines (*4 weeks*) et 12 semaines (*12 weeks*) semaines après l'injection de l'ARNdb. Deux types de contrôles ont été réalisés : des animaux non injectés (0, en vert) et des animaux injectés avec de l'eau (en bleu).



<u>Figure 2.20</u> : Phénotypes des GA suite à la première série expérimentale d'ARNi, sur Av-IR1. Les glandes sont normales dans le groupe injecté avec de l'eau (A.). Des débuts d'hypertrophie sont observés quatre semaines après l'injection d'ARNdb (B.) et des hypertrophies nettes 12 semaines après l'injection d'ARNdb (C.). Après 28 semaines, les glandes sont à nouveau de phénotype normal (D.).



<u>Figure 2.21</u> : Phénotypes des GA suite à la troisième série expérimentale d'ARNi, sur Av-IR1. Une forte hypertrophie de toutes les GA est observable 12 semaines après l'injection de l'ARNdb d'Av-IR1.



Figure 2.22 : Phénotypes des GA suite à la troisième série expérimentale d'ARNi, sur Av-IR2. Absence d'hypertrophie des GA (12 semaines, A.) et apparition, du côté de l'injection (la perforation est toujours visible dorsalement, B.), d'ouvertures génitales femelles chez certains individus (12 semaines, C.), suite à l'extinction de l'expression d'Av-IR2 par ARNi. En pointillés (C.), le cercle marque l'emplacement de l'ouverture génitale sur le cinquième péréionite. Pour comparaison, ce motif n'est pas visible sur le sixième péréionite.

# D. Evolution des IR au sein des Isopodes

En l'étudiant à l'échelle des Métazoaires, nous avons vu que l'IR a connu une évolution divergente chez tous les Malacostracés. La question se posait donc au sein de l'ordre des Isopodes. Une première série de phylogénies a été réalisée en utilisant toutes les séquences d'IR1 (Fig. 2.23) et d'IR2 (Fig. 2.24) que nos assemblages de transcriptomes ont pu fournir, y compris des séquences partielles, complétées par des séquençages Sanger dans la mesure du possible. Ces transcrits sont en effet difficiles à obtenir dans leur intégralité au sein des transcriptomes car ils sont longs (~4,5 kb) et, sur la base des résultats chez A. vulgare, pas très fortement exprimés. Ces analyses révèlent néanmoins que l'IR1 est bien présent dans chacune des 18 familles d'Isopodes considérées et que l'IR2 est présent dans au moins 15 d'entre elles. Les deux phylogénies présentent par ailleurs une topologie très proche de celle des IGFBP-rP1. Les relations entre séquences d'IR reflètent ainsi les différentes familles taxonomiques, à l'exception des deux Platyarthridae et des Philoscidae qui présentent la même paraphylie chez les trois gènes sus-cités. Les mêmes explications que celles apportées pour l'IGFBP-rP1 (chapitre I) peuvent être avancées : véritable paraphylie des Philoscidae et possible divergence de Trichorhina tomentosa, le Platyarthridae parthénogénétique. Concernant l'IR1, les deux séquences de Tylidae ne se regroupent pas bien non plus mais ces séquences sont très partielles et les branches correspondantes sont donc peu soutenues. Enfin, la phylogénie de l'IR2 révèle que des variants IR2a et IR2b existent chez plusieurs *Armadillidium* (*A. nasatum*, *A. simoni*, A. tunisiense et A. vulgare). L'examen des alignements de séquences montre que la variation correspond à un même indel au niveau des domaines FN3 dans chacune des paires IR2a/IR2b et que le reste de la séquence est identique, suggérant qu'il s'agit d'un épissage alternatif plutôt que d'une duplication car des paralogues auraient probablement plus divergé (Fig. 2.8). De plus, le motif nucléique AAG|indel|G, caractéristique des frontières d'exon, est bien retrouvé de part et d'autre de la lacune d'IR2a. L'examen de la région supplémentaire d'IR2b ne révèle que la moitié de ce motif, laissant penser que l'exon en aval est le même que celui d'IR2a avec une insertion côté 5', et qu'il n'y a donc pas d'exon supplémentaire chez IR2b (Fig. 2.25). D'après notre jeu de données, cet épissage est spécifique du genre Armadillidium mais il existe cependant un variant voisin chez *Porcellionides pruinosus* (étendu de 48 pb en amont), ce qui permet d'envisager que ce phénomène d'épissage alternatif est peut-être plus général mais difficile à détecter (Fig. 2.8). Enfin, la comparaison de ces isoformes avec les séquences d'IR2 issues d'autres familles d'Isopodes suggère que la forme longue, Av-IR2b, ressemble le plus probablement à la forme ancestrale.

<u>Figure 2.23</u> : Phylogénie d'IR1 chez les Isopodes. Les séquences ont été alignées avec Muscle et les sites utilisés ont été sélectionnés avec Gblocks (1305 acides aminés). Un arbre a été généré par maximum de vraisemblance avec PhyML, suivant le modèle d'évolution LG et 1000 répétitions de *bootstrap*. La robustesse des branches a été confirmée par les approches de SH-aLRT et bayésiennes. Les codes couleur correspondants sont ceux utilisés précédemment. Les noms des familles sont indiqués en noir, excepté les familles d'espèces aquatiques (en bleu) et les familles dont les IR ne se regroupent pas (en rouge, ocre et violet).

<u>Figure 2.24</u> : Phylogénie d'IR2 chez les Isopodes. Les séquences ont été alignées avec Muscle et les sites utilisés ont été sélectionnés avec Gblocks (1409 acides aminés). Un arbre a été généré par maximum de vraisemblance avec PhyML, suivant le modèle d'évolution LG et 1000 répétitions de *bootstrap*. La robustesse des branches a été confirmée par les approches de SH-aLRT et bayésiennes. Les codes couleur correspondants sont ceux utilisés précédemment. Les noms des familles sont indiqués en noir, excepté les familles d'espèces aquatiques (en bleu) et les familles dont les IR ne se regroupent pas (en rouge et violet).







<u>Figure 2.25</u> : Modèle d'épissage alternatif d'Av-IR2 expliquant la différence entre Av-IR2a et Av-IR2b. L'examen des motifs d'épissage AAG|G semble indiquer que la partie de séquence additionnelle d'Av-IR2b ne correspond pas à un exon supplémentaire (A.). L'interprétation d'un exon existant en deux variants de longueurs différentes est proposée au niveau du génome (B.). Il est possible que ces deux variants coexistent sur le même chromosome, des suites d'une duplication.

Bien que les topologies de leurs phylogénies soient semblables, les analyses des distances permettent de constater que la divergence entre les IR est environ deux fois supérieure à celle observée pour l'IGFBP-rP1 (Figs. 2.26-2.27-2.28). Par exemple, entre *A. vulgare* et *C. convexus*, la divergence est de ~12% pour l'IGFBP-rP1, de ~27% pour l'IR1 et de ~21-22% pour l'IR2. De même, entre *A. vulgare* et *P. scaber*, la divergence est de ~12% pour l'IGFBP-rP1, ~28% pour l'IR1 et de ~23-25% pour l'IR2. Enfin, entre *A. vulgare* et *Sphaeroma sp.*, on observe une divergence de ~36% pour l'IGFBP-rP1 mais une divergence de ~63% pour l'IR1 et de ~60-61% pour l'IR2. Une phylogénie regroupant uniquement les séquences entières d'IR1 et d'IR2 permet de plus de voir des longueurs de branches équivalentes pour les deux paralogues, suggérant des rythmes de divergence similaires (Fig. 2.29).



<u>Figure 2.26</u> : Analyse des distances entre séquences d'IGFBP-rP1 d'Isopodes. Les calculs par paires de séquences (*p-distance*) ont été réalisés avec MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Les valeurs sont colorées en fonction de l'intensité de la divergence (séquences d'autant plus proches qu'elles sont vertes, d'autant plus éloignées qu'elles sont rouges).



<u>Figure 2.27</u> : Analyse des distances entre séquences d'IR1 d'Isopodes. Les calculs par paires de séquences (*p-distance*) ont été réalisés avec MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Les valeurs sont colorées en fonction de l'intensité de la divergence (séquences d'autant plus proches qu'elles sont vertes, d'autant plus éloignées qu'elles sont rouges).



<u>Figure 2.28</u> : Analyse des distances entre séquences d'IR2 d'Isopodes. Les calculs par paires de séquences (*p-distance*) ont été réalisés avec MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Les valeurs sont colorées en fonction de l'intensité de la divergence (séquences d'autant plus proches qu'elles sont vertes, d'autant plus éloignées qu'elles sont rouges).

Les analyses de taux dN/dS indiquent que les gènes des deux récepteurs transmembranaires ont globalement évolué sous sélection purifiante au sein des Isopodes. Pour l'IR1, on trouve une valeur de dN/dS globale de 0,30 avec PAML et de 0,37 avec SLAC. Par ailleurs, les outils SLAC, FEL et IFEL prédisent respectivement 4 sites, 9 sites et 10 sites sous sélection positive, ainsi que 432, 553 et 442 sites sous sélection négative (p<0,05). Pour l'IR2, PAML indique une valeur de dN/dS de 0,28 et SLAC une valeur de 0,35. De la même façon, les outils SLAC, FEL et IFEL prédisent respectivement 1, 5 et 13 sites sous sélection positive, ainsi que 306, 478 et 433 sites sous sélection négative (p<0,05).

<u>Figure 2.29</u> : Phylogénie d'IR1 et d'IR2 chez les Isopodes, réalisée à partir des séquences codantes complètes. Les séquences ont été alignées avec Muscle et les sites utilisés ont été sélectionnés avec Gblocks (705 acides aminés). Un arbre a été généré par maximum de vraisemblance avec PhyML, suivant le modèle d'évolution LG et 1000 répétitions de *bootstrap*. La robustesse des branches a été confirmée par les approches de SH-aLRT et bayésiennes. Les codes couleur correspondants sont ceux utilisés précédemment.



# E. Discussion

Nous avons mis en évidence qu'il existe chez les Crustacés Malacostracés non pas un mais jusqu'à trois récepteurs à ILP de type Tyrosine Kinase (TK), les IR1, IR2 et IR3 (Herran et al., 2018). Ces récepteurs partagent tous les mêmes domaines conservés, en particulier les domaines de liaison au ligand extracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine TK intracellulaire. Plusieurs sites de N-glycosylation sont également prédits pour ces IR de Crustacés, caractéristique qu'ils partagent avec leurs homologues de Vertébrés (Sarfstein and Werner, 2015). Chez toutes les espèces d'Isopodes, seuls deux de ces récepteurs ont pu être trouvés, l'IR1 et l'IR2, correspondant vraisemblablement à deux gènes issus de duplication. Chez A. vulgare, comme dans différentes espèces du même genre, une troisième séquence a pu être trouvée. Elle correspond probablement à un variant d'épissage de l'IR2, IR2a présentant un exon tronqué par rapport à IR2b. La publication attendue prochainement du génome d'A. vulgare (Chebbi et al., en préparation) et d'A. nasatum (Becking et al., en préparation) permettra de confirmer le nombre de gènes d'IR présents chez ces deux espèces. Curieusement, il existe aussi un variant d'épissage de l'IR chez l'Homme aboutissant à la coexistence de deux récepteurs fonctionnels de l'insuline. IR-A et IR-B, différents d'un *indel* de 12 aa (Seino et al., 1989). Ces deux récepteurs n'ont pas le même patron d'expression dans l'organisme ni la même affinité pour leurs ligands (IR-A pouvant lier l'IGF2 et la proinsuline en sus de l'insuline) (Westermeier et al., 2016). De façon intéressante, il semble que l'insuline soit ellemême capable d'orienter l'épissage alternatif de son récepteur et que les deux isoformes aient des fonctions différentes, l'une d'entre elles étant liée à la survie cellulaire (Malakar et al., 2016). Des amorces de PCR sont donc en cours d'essai pour permettre la discrimination de Av-IR2a et Av-IR2b afin d'établir, dans un premier temps, si ces variants ont le même patron d'expression ou non chez A. vulgare (en particulier entre les deux sexes et dans la lignée infectée par Wolbachia).

À l'heure actuelle, nous n'avons pas de données chez *A. vulgare* démontrant l'interaction entre l'HA et les deux IR à l'échelle moléculaire. Ceci a cependant été bien démontré par différentes méthodes chez les Crustacés Décapodes pour l'IR1 ("*ligand blot assay*" avec Mr-IR) (Sharabi et al., 2016) et l'IR3 ("*receptor activation assay*" en culture cellulaire pour Sv-TKIR et colocalisation en culture cellulaire ainsi que double hybride chez des levures pour Fc-IAGR) (Aizen et al., 2016; Guo et al., 2018). Nos analyses phylogénétiques de l'IR à l'échelle des Métazoaires ont par ailleurs montré que les séquences d'Isopodes sont proches de celles des Amphipodes et des Décapodes et ce au sein de chaque *cluster* (IR1 et IR2) (Herran et al., 2018). Elles suggèrent donc qu'il n'y a pas eu de forte évolution divergente de ces deux récepteurs au sein des Malacostracés et que leur fonction pourrait être conservée. De plus, différentes données indirectes obtenues chez *A. vulgare* suggèrent que Av-IR1 comme Av-IR2 sont effectivement des récepteurs de l'HA.

- D'une part, nous avons montré que l'extinction de Av-IR1 par ARNi provoque une forte hypertrophie des GA ainsi qu'une forte augmentation de l'expression de l'HA, deux effets également observés lors de l'extinction de Mr-IR (Sharabi et al., 2016).

- D'autre part nous avons montré que Av-IR2 s'exprime préférentiellement dans une partie des organes génitaux : les GA et les ovaires. Ainsi, chez un mâle, ce récepteur s'exprime quasi-spécifiquement dans les seules GA, suggérant une implication dans leur physiologie. En effet, contrairement à l'IGFBP-rP1, ce récepteur est membranaire, ce qui permet de proposer un lien entre son patron d'expression et des effets tissus-spécifiques. L'apparition d'ouvertures génitales femelles par ARNi de Av-IR2 indique également une implication de ce récepteur dans le maintien du phénotype mâle. Malheureusement, il n'y a, à ce jour, aucune donnée d'expression ou d'ARNi publiées sur les IR2 de Décapodes que l'on puisse comparer à nos résultats.

Cependant, les Décapodes présentent un troisième récepteur qui leur est propre, ce qui implique que la voie de signalisation entre cet ordre et les autres Malacostracés présente vraisemblablement des différences fondamentales. En outre, les deux IR3 connus actuellement ont des profils d'expression différents bien qu'ils appartiennent au même cluster. Sv-TKIR est exprimé spécifiquement dans les testicules et les glandes antennaires des deux sexes (Aizen et al., 2016), tandis que Fc-IAGR s'exprimerait lui uniquement chez les mâles, quasi-spécifiquement dans les testicules et la GA, plus légèrement dans l'intestin (Guo et al., 2018). Aucune donnée n'est cependant présentée à propos de l'expression de Fc-IAGR ni dans les glandes antennaires ni sur animaux entiers (femelles en particulier), ce qui rend impossible une comparaison exhaustive entre ces deux IR3 et autorise un doute quant à la spécificité mâle de l'expression de Fc-IAGR. De la même façon, le patron d'expression entre Mr-IR et Av-IR1, également orthologues, sont aussi différents : Mr-IR est exprimé dans tous les tissus (glande antennaire et ovaires principalement) sauf le muscle et l'hépatopancréas (Sharabi et al., 2016) alors que Av-IR1 s'exprime partout de manière plus homogène. Par ailleurs, Aizen et al. (2016) annoncent l'existence d'un autre acteur supplémentaire appelé "leurre de TKIR" (decoy) car il ne présenterait que la partie extracellulaire du récepteur et ne pourrait donc pas entraîner de réponse cellulaire. Ce récepteur serait exprimé spécifiquement dans les GA et les ovaires, à l'instar d'Av-IR2, qui présente d'ailleurs un site potentiel de clivage peptidique après le domaine transmembranaire. L'appartenance de ce leurre présumé à un des trois *clusters* n'a cependant pas pu être vérifiée car aucune séguence et aucune donnée de RNAseq n'ont été publiées à ce jour. Comme mentionné précédemment, l'obtention des séquences d'IR est particulièrement délicate du fait de leur longueur et de leur profil d'expression. Il n'est donc pas à exclure que cette séquence corresponde à une forme tronquée à cause d'un décalage

du cadre de lecture induit lors de l'assemblage des lectures de séquençage. Tout ceci suggère que les résultats issus des différentes espèces modèles ne sont pas tous transposables directement à l'identique. D'ailleurs, différents éléments à l'échelle évolutive vont également dans le sens d'une conservation modérée des IR. Nous avons montré que la vitesse de divergence au sein des IR de Malacostracés est deux fois plus grande que chez le reste des Métazoaires. Nous avons aussi observé que le motif TK révèle d'importantes variations chez les Malacostracés alors qu'il est connu pour être très conservé chez la plupart des Métazoaires. À l'échelle des Isopodes enfin, les IR montrent une divergence des séquences ainsi qu'un taux dN/dS deux à trois fois supérieurs, comparativement à ce que nous avons décrit chez les IGFBP-rP1. Ainsi, si l'implication de tous ces IR de Malacostracés dans la même voie de signalisation de l'HA ne fait pas trop de doute, chaque modèle doit vraisemblablement présenter des spécificités.

Dans le modèle A. vulgare, la large expression de Av-IR1, opposée à la relative spécificité de Av-IR2 dans les GA et ovaires, permet de poser comme première hypothèse que Av-IR1 pourrait être le récepteur impliqué dans l'établissement des caractères sexuels mâles en présence de l'HA (gonades, brosses de soies sur les péréiopodes et appendices copulateurs). De plus, l'expérience d'ARNi ne montre une hypertrophie des GA qu'avec l'inhibition de l'IR1, ce qui impliquerait également ce récepteur dans le contrôle de la taille de la GA. De façon remarquable, les GA retrouvent une dimension classique lors de la diminution de l'inhibition d'Av-IR1 (28 semaines après l'injection). Ce résultat conforte le lien entre taille des GA et expression de Av-IR1. La possibilité des réversions d'hypertrophie de GA n'est par ailleurs pas nouvelle. Par exemple, une GA hypertrophiée par l'action de Wolbachia ou par ablation de protocérébron retrouve une taille normale lorsqu'elle est greffée dans un mâle ou une femelle normal(e) (Juchault, 1966; Juchault and Legrand, 1967). Ces observations ne sont pas sans rappeler les résultats récents sur les IR de l'Homme suggérant que ce récepteur peut réguler la mort ou la prolifération cellulaire, en plus de leurs fonctions métaboliques (Belfiore et al., 2017) : d'une part, l'hypertrophie des GA est en grande partie due à l'hyperplasie, qu'elle soit provoquée par ablation de protocérébron (Legrand et al., 1968), par ARNi de l'HA (Ventura et al., 2009) ou par l'action de Wolbachia (Malo, 1969), d'autre part, le retour à une taille normale est associé à des observations de mort cellulaire (Legrand et al., 1968). Comme lors de l'inhibition de l'expression de l'HA par ARNi, l'hypertrophie des GA résultant de l'ARNi de Av-IR1 peut être interprétée comme une réaction compensatoire visant à stimuler la sécrétion de l'hormone qui n'est plus perçue (Ventura et al., 2009). Cette réaction peut s'inscrire dans le cadre de deux boucles de rétrocontrôle affectant la taille de la GA (Fig. I.11). Nos travaux ne permettent pas d'exclure que ce contrôle passe par une grande boucle impliquant également la GIH, connue pour inhiber la croissance de la GA (Grève et al., 1999). En effet, l'IR1 est bien exprimé dans le cerveau d'A. vulgare comme dans celui de M. rosenbergii (Sharabi et al., 2016) et pourrait donc moduler la production de GIH par le protocérébron des Isopodes et le pédoncule oculaire des Décapodes. Le contrôle de la taille de la GA serait ainsi indirect et sous l'action d'un centre nerveux distant. Chez M. rosenbergii, il a été montré que l'inhibition de Mr-IR chez des mâles en début de différenciation n'affecte pas la croissance générale mais accélère la différenciation sexuelle de l'appendix masculina (Sharabi et al., 2016). Cette différenciation anticipée rappelle celle obtenue par ablation du protocérébron ou des pédoncules oculaires (Juchault et al., 1965; Reidenbach, 1966; Demeusy, 1967; Legrand et al., 1968) et serait cohérente avec une régulation positive de la GIH par le couple IR1/HA au niveau du protocérébron. L'IR1 étant aussi exprimé dans la GA, une régulation autocrine et indépendante du protocérébron peut au contraire être envisagée. Cependant, la suppression du protocérébron s'accompagne systématiquement d'une hypertrophie des GA, qui n'est donc pas compensée localement par une telle boucle malgré la surproduction d'HA. Pour conserver l'hypothèse de la petite boucle, il faut alors envisager une implication supplémentaire de la GIH, qui pourrait par exemple potentialiser l'effet de l'HA sur Av-IR1. Dans ce scénario, on peut imaginer que le contrôle de la croissance de la GA reste directement dépendant de la quantité d'HA circulante mais aussi d'une quantité suffisante de GIH. Les deux types de boucles auraient alors les mêmes effecteurs, les mêmes symptômes et les mêmes contraintes. La différence réside dans le positionnement du rétrocontrôle par l'IR1 : au niveau du protocérébron dans la grande boucle ou sur la GA en duplex avec le récepteur de la GIH dans cette petite boucle adaptée.

Chez les mâles, la spécificité de l'expression d'Av-IR2 dans les GA indique qu'il pourrait, pour sa part, être également impliqué dans un type de régulation autocrine de la glande. Si l'absence d'hypertrophie suite à son inhibition suggère qu'Av-IR2 ne contrôle pas la taille de la GA, peut-être régule-t-il sa différenciation ou son fonctionnement (synthèse et/ou libération de l'HA). L'absence d'effet de l'expérience d'ARNi d'IR2 sur l'expression de l'HA suggère néanmoins qu'Av-IR2 n'est pas directement impliqué dans la production de l'HA. Plus largement, l'absence d'hypertrophie des GA lors de cette même expérience suggère que la quantité d'HA libérée est normale, sans quoi la boucle de rétrocontrôle impliquant Av-IR1 (petite ou grande) aurait compensé le déficit. Par élimination, il semble plus probable que Av-IR2 soit impliqué dans la différenciation des gonades au cours du développement. De façon intéressante, les expériences de masculinisation de femelles immatures par greffe de GA allient différenciation et régulation autocrine : en effet, l'apport d'HA par les greffons déclenche la différenciation des GA autochtones, ce qui montre qu'elles sont sensibles à l'HA (Legrand and Juchault, 1972), sans que nous ayons d'éléments pour l'instant permettant d'attribuer ce rôle à l'IR2 plutôt que l'IR1. Cependant, l'ARNi a montré un rôle possible d'IR2 en tant que répresseur de la différenciation du filament suspenseur th5 en oviducte, qui se traduit par l'apparition d'ouvertures génitales femelles en cas d'inhibition. À l'inverse, une fonction de Av-IR2 en tant que leurre peut également être envisagée s'il y a bien un clivage peptidique au niveau du site prédit du côté intracellulaire. Dans ce cas, il pourrait remplir une fonction de puits pour HA, empêchant la transduction du signal dans la cellule, en particulier au sein des ovaires.

Pour établir précisément l'implication respective des deux IR dans le processus de différenciation sexuelle, les prochaines expériences d'ARNi sur ces récepteurs seront réalisées sur des animaux dont une partie des pattes et la moitié des endopodites des pléopodes 1 seront sectionnées. En effet, après une ou deux mues, ces organes se régénèrent et subissent une nouvelle différenciation sexuelle, soit mâle soit femelle (Legrand, 1947; Juchault, 1966), ce qui permettra de confirmer que l'un et/ou l'autre des IR est responsable des caractères sexuels secondaires. Il faudra ensuite envisager de réutiliser l'approche par ARNi avant que la différenciation sexuelle soit terminée. En effet, l'inhibition de Mr-IR ou de Fc-IAGR chez de jeunes mâles arrête la spermatogenèse mais échoue à inverser leur sexe. Il sera particulièrement intéressant de savoir si l'inhibition de Av-IR1, Av-IR2 et des deux combinés permet de reproduire ces effets et réussir à faire que les mâles génétiques se différencient en femelles. La principale difficulté réside dans la capacité technique à injecter des larves de taille inférieure à 2 mm. Par ailleurs, nous n'avons à l'heure actuelle encore aucun marqueur génétique du sexe chez A. vulgare permettant de s'assurer que les animaux injectés soient mâles. En attendant la publication du génome, la technique des réversions de sexe des jeunes mâles par ablation des GA peut être envisagée car elle permet d'obtenir 100% de mâles lors de l'accouplement avec un mâle normal (Suzuki and Yamasaki, 1991).

De façon un peu intrigante, Av-IR2 s'exprime à la fois très majoritairement dans les GA, issues chez *A. vulgare* des filaments suspenseurs th2, th3 et th4 (Juchault, 1966) et dans l'ovaire, qui dérive lui du cordon sexuel indifférencié (donnant la vésicule séminale chez les mâles). Les deux organes exprimant fortement l'IR2 ne sont donc pas homologues et il sera particulièrement intéressant de regarder où s'exprime Av-IR2 avant la différenciation des gonades, en distinguant le cordon sexuel primordial des filaments suspenseurs. Cette analyse permettra en effet de déterminer si Av-IR2 est exprimé dès la naissance dans tout le cordon sexuel avant de voir son expression s'éteindre dans la vésicule séminale et les testicules des mâles, ou si au contraire l'expression est spécifique des filaments suspenseurs et que l'expression s'étend lors de la différenciation des ovaires chez les femelles. Les analyses d'expression au cours du développement d'*A. vulgare* ont d'ores et déjà montré que les deux IR s'expriment à tous les stades du développement et de manière équivalente dans les deux sexes (discernables extérieurement à partir du stade 5). Ce résultat est en accord avec les observations de Sharabi et al. (2016) sur l'expression de Mr-IR, similaire entre larves et post-larves. De telles analyses restent encore à effectuer concernant les IR3 Sv-TKIR et

Fc-IAGR. Comme discuté précédemment à propos de Av-IGFBP-rP1, l'expression régulière des IR au cours de la différenciation sexuelle suggère que ces récepteurs confèrent une compétence potentielle à l'HA dès la naissance des animaux. On peut supposer que c'est l'expression différentielle d'autres facteurs, telles l'HA ou la GIH, qui est responsable de ce processus de différenciation sexuelle. Une approche *in situ* par immunofluorescence permettra de confirmer et préciser l'évolution de ce patron d'expression des IR au cours du développement chez *A. vulgare*. De plus, l'approche *in situ* permettra peut-être de déterminer s'il existe des récepteurs hybrides entre IR1 et IR2 chez le cloporte, à l'image de ce qui a été démontré chez l'Homme (récepteurs hybrides IR-A/IGF1R et IR-B/IGF1R) (Wheeler and Yarden, 2015).

Évidemment, l'expression de ces récepteurs chez les femelles de Crustacés Décapodes (Mr-IR (Sharabi et al., 2016) et Sv-TKIR (Aizen et al., 2016)) et Isopodes (Av-IR1 et Av-IR2) pose la question de leur fonction dans ce sexe. Comme évoqué à la fin du chapitre 1, il faut prendre en compte l'existence d'au moins trois ILP différents de l'HA chez les Décapodes : l'ILP1 (Chandler et al., 2015) et l'ILP2 (Chandler et al., 2017b) identifiés chez S. verreauxi, ainsi qu'une "insuline" détectée dans le transcriptome de sept espèces de Décapodes (Veenstra, 2016). Comme cela a été ensuite démontré pour l'IGFBP-rP1 (Chandler et al., 2017b), Aizen et al. (2016) avaient suggéré que les IR ont potentiellement plusieurs ligands dont il faut établir l'affinité relative. Les IR auraient donc plusieurs fonctions putatives, dont la différenciation sexuelle des mâles. Ces ILP additionnels n'ont pas encore été identifiés chez aucune espèce d'Isopode, les approches par BLAST sur ces séquences courtes et divergentes ayant été infructueuses jusque-là. Des recherches sur les motifs à cystéines sont envisagées pour identifier ces potentiels ILP. Encore une fois, la parution attendue des génomes d'Armadillidium permettra aussi probablement de combler cette lacune. Quoiqu'il en soit, la présence des IR dans les deux sexes est cohérente avec la possibilité de masculiniser une femelle à tout âge (de façon plus ou moins complète) par greffe de GA ou injection d'HA. En revanche, le tissu mésenchymateux des ébauches de GA perd lui sa compétence à réagir à l'HA au cours du développement, rendant le sexe des femelles adultes non inversable (Legrand, 1964). Cette perte de compétence vis-à-vis de l'HA ne s'explique ainsi probablement pas par l'arrêt de l'expression de ses récepteurs mais vraisemblablement par une différenciation trop avancée du tissu vers la voie conjonctive.

Par ailleurs, les récepteurs sont exprimés de façon identique chez les animaux infectés par *Wolbachia*. En supposant que la traduction des ARNm ne soit pas altérée par *Wolbachia*, nous pouvons conclure que l'état réfractaire à l'HA des néofemelles et des intersexués iM n'est pas dû à une absence d'expression de ces récepteurs au cours du développement ni chez l'adulte. Encore une fois, l'approche *in situ* offrira une résolution plus fine pour confirmer que le patron d'expression des

IR est non altéré chez les larves. Dans la dernière section, nous avons cherché à mieux caractériser l'effet de *Wolbachia* sur la différenciation sexuelle d'*A. vulgare* et à le reproduire expérimentalement.

# **CHAPITRE 3**

# Effets de perturbateurs endocriniens sur la différenciation sexuelle d'*Armadillidium vulgare*

La différenciation sexuelle des Isopodes terrestres est un processus particulièrement sensible. Lorsqu'il est altéré, divers phénotypes intersexués ou encore des biais de sex ratio témoignent de cette perturbation (Legrand and Juchault, 1969a; Juchault and Legrand, 1970; Legrand and Juchault, 1986; Lemos et al., 2009). Il est maintenant bien établi que Wolbachia induit un état réfractaire à l'HA qui prévient la différenciation mâle au cours du développement ainsi que la masculinisation des néo-femelles et intersexués adultes (Legrand and Juchault, 1963; Juchault and Legrand, 1964d; Legrand and Juchault, 1969a). Ce blocage de la voie de signalisation de l'HA par un symbiote peut être considéré comme une perturbation endocrinienne d'origine endogène. Le niveau de la perturbation n'est pour l'instant pas identifié. Nous avons montré précédemment que le transporteur de l'HA (Chapitre 1) et ses récepteurs transmembranaires (Chapitre 2) semblent s'exprimer normalement au cours du développement des larves infectées ainsi que dans les différents tissus des néo-femelles et intersexués adultes. Outre les analyses complémentaires sur le fonctionnement de ces récepteurs, il reste à établir si le patron d'expression du ligand, l'HA, est lui altéré dans toutes ces conditions. Nous avons par ailleurs mené des analyses similaires sur l'expression de la GIH, un acteur qui s'inscrit vraisemblablement également dans la voie de signalisation de l'HA car ce neuropeptide contrôle la taille des GA (Azzouna et al., 2003). De plus, afin de confirmer ou non les observations faites lors de la perturbation naturelle de Wolbachia au cours du développement, une approche expérimentale de transinfection par la bactérie de mâles adultes nous a permis de rechercher ses effets sur cette voie de signalisation lorsqu'elle est déjà fonctionnelle. Par la suite, nous nous sommes demandé si l'inhibition de l'HA par la technique d'ARN interférent (ARNi) pouvait récapituler toute ou partie des effets féminisants de Wolbachia. Enfin, nous avons à nouveau cherché à induire expérimentalement une féminisation des cloportes mâles grâce à l'action d'un perturbateur endocrinien exogène bien connu, le bisphénol A (BPA).

# I. Effets d'un perturbateur endocrinien endogène : Wolbachia

#### A. Effet de Wolbachia sur l'expression de l'HA et de la GIH chez l'adulte

Nous avons d'abord recherché par RT-PCRq l'expression du gène codant l'HA dans les néofemelles adultes (individus ZZ infectés par Wolbachia), comparativement au patron d'expression chez les femelles adultes non infectées. Nous avons également vérifié sa spécificité tissulaire chez les mâles. Cette analyse confirme que le gène s'exprime dans les GA des mâles (phénotypiques) des deux lignées, infectée et non-infectée par Wolbachia (Fig. 3.1). L'expression de l'HA chez les mâles de la lignée infectée n'est pas inattendue étant donné qu'ils ne sont, eux, pas porteurs de la bactérie. L'expression de l'HA est également confirmée dans les GA hypertrophiées des intersexués mâles (iM), qu'ils soient naturels (lignée infectée) ou induits expérimentalement (individus transinfectés de la lignée non-infectée). Le niveau d'expression de l'HA est 7 à 24 fois plus fort dans ces GA hypertrophiées que dans les GA normales. Une expression notable est également retrouvée dans les utricules et le muscle/gras des intersexués naturels. Il n'est cependant pas à exclure qu'une petite partie des GA hypertrophiées, très fragiles et adhérentes, ait été échantillonnée en même temps que ces tissus qui sont au contact des GA. Enfin, une très faible expression de l'HA peut être mesurée dans la plupart des tissus, aussi bien chez la femelle que chez le mâle, symbiotique ou non (par exemple dans les ovaires, elle est en moyenne 200 000 fois inférieure à celle des GA du mâle normal). Globalement, les néo-femelles à Wolbachia n'expriment pas l'HA de façon significative, à l'instar des femelles génétiques. Une analyse in situ permettra de confirmer la spécificité de l'expression de l'HA chez A. vulgare.

Concernant le gène codant la GIH, notre analyse d'expression tissulaire confirme la forte spécificité de ce transcrit, dont la présence a été détectée très majoritairement dans le cerveau des deux sexes (Fig. 3.2). Ce gène s'exprime de plus avec la même intensité dans les mâles, femelles et intersexués de la lignée infectée par *Wolbachia*. Comme pour l'HA, une très faible expression dans d'autres tissus est parfois détectable, en particulier dans le tube digestif (960 fois plus faible que dans le cerveau en moyenne) ou la chaîne nerveuse (12 000 fois plus faible).



<u>Figure 3.1</u> : Expression tissulaire des ARNm d'Av-AGH amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8. Les tissus suivants ont été disséqués à partir d'*A. vulgare* adultes de la lignée non infectée (A.) et de la lignée infectée par *Wolbachia* (B.) : hémocytes (HE), pattes (LE), muscle et tissu adipeux (MF), chaîne nerveuse (NC), cerveau (BR), glandes salivaires (SG), tube digestif (DT), *caeca* (CK), ovaires (OV), spermatozoïdes (SP), *vas deferens* (VD), vésicule séminale (SV), utricules (UT). Les expressions plus fortes obtenues dans les glandes androgènes (AG) ont été séparées en encart. D'autre part, les expressions dans les GA chez les intersexués (iM) et mâles ont été dissociées sur deux colonnes pour comparaison.



<u>Figure 3.2</u> : Expression tissulaire des ARNm d'Av-GIH amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8. Les tissus suivants ont été disséqués à partir d'*A. vulgare* adultes de la lignée non infectée (A.) et de la lignée infectée par *Wolbachia* (B.) : hémocytes (HE), pattes (LE), muscle et tissu adipeux (MF), chaîne nerveuse (NC), glandes salivaires (SG), tube digestif (DT), *caeca* (CK), ovaires (OV), spermatozoïdes (SP), *vas deferens* (VD), vésicule séminale (SV), utricules (UT), glandes androgènes (AG). Les expressions plus fortes obtenues dans le cerveau (BR) ont été séparées en encart. D'autre part, les expressions dans le cerveau chez les femelles, intersexués (iM) et mâles ont été dissociées sur trois colonnes pour comparaison.

# B. Effet de Wolbachia sur l'expression de l'HA et de la GIH au cours du développement

L'effet de la bactérie sur l'expression des gènes codant l'HA et la GIH a ensuite été mesuré au cours de la différenciation sexuelle pour voir comment leur expression est affectée par *Wolbachia* chez les mâles ayant hérité de la bactérie au stade embryonnaire. Dans la lignée noninfectée comme dans la lignée infectée, l'expression de l'HA, mesurée par RT-PCRq et par RNAseq, augmente de façon exponentielle chez les mâles au cours du développement (Fig. 3.3). Il est à noter que l'expression de l'HA est non nulle dès la naissance et augmente dès les stades 4 puis 5, alors que les GA produisant cette hormone n'apparaissent en tant que telles qu'à partir du stade 6. L'expression de l'HA au sein des femelles et néo-femelles est nulle chez les juvéniles (stades 5F, 6F) et extrêmement faible chez les femelles adultes (AF) (presque nulle, en moyenne 2600 fois plus faible que chez les mâles). De façon remarquable, dans la lignée infectée par *Wolbachia*, 31% des stades 4 (5/16) et 14% des stades 5 (2/14) montrent une expression inattendue de l'HA associée à une charge bactérienne non nulle. De tels cas n'ont pas été relevés aux stades 6 (0/11), stades 7 (0/18) et stades 8 (0/14).

Le gène codant la GIH présente, au contraire de l'HA, un patron d'expression décroissant au cours du développement (Fig. 3.4). L'expression est ainsi maximale après la naissance des larves et minimale chez les adultes des deux sexes (diminution moyenne d'un facteur 7 dans la lignée non-infectée et d'un facteur 15 dans la lignée infectée en RT-PCRq).



Figure 3.3 : Profils de l'expression d'Av-AGH au cours du développement dans la lignée non infectée (A.) et dans la lignée infectée par *Wolbachia* (B.), en RT-PCRq, normalisée suivant l'expression du gène RbL8 (gauche) et par une approche de type RNAseq (droite). Les larves ont été échantillonnées à la naissance (*0w*), une semaine (*1w*), deux semaines (*2w*) et trois semaines (*3w*) après la naissance. Ensuite, chaque échantillonnage est individuel et représente un stade de développement (4-8), caractérisé par une nouvelle mue, jusqu'au stade adulte (AM pour les mâles, AF pour les femelles). Les caractères sexuels externes commencent à apparaître au stade 5, ce qui permet de déterminer le sexe des individus. Les transcriptomes utilisés pour le RNAseq ont été générés à partir d'animaux prélevés à la naissance (*0w*), deux semaines après la naissance (*2w*), au stade 4, non différencié extérieurement, et aux stades 5 et 7 (M pour les mâles, F pour les femelles). Chaque point correspond à un lot de plusieurs de ces échantillons. Les lots ne contenant que des individus n'exprimant pas l'HA en RT-PCRq ont été indiqués en rouge, ceux ne contenant que des individus exprimant tous l'HA en RT-PCRq ont été indiqués en violet.



Figure 3.4 : Profils de l'expression d'Av-GIH au cours du développement dans la lignée non infectée (A.) et dans la lignée infectée par *Wolbachia* (B.), en RT-PCRq, normalisée suivant l'expression du gène RbL8 (gauche) et par une approche de type RNAseq (droite). Les larves ont été échantillonnées à la naissance (*0w*), une semaine (*1w*), deux semaines (*2w*) et trois semaines (*3w*) après la naissance. Ensuite, chaque échantillonnage est individuel et représente un stade de développement (4-8), caractérisé par une nouvelle mue, jusqu'au stade adulte (AM pour les mâles, AF pour les femelles). Les caractères sexuels externes commencent à apparaître au stade 5, ce qui permet de déterminer le sexe des individus. Les transcriptomes utilisés pour le RNAseq ont été générés à partir d'animaux prélevés à la naissance (*0w*), deux semaines après la naissance (*2w*), au stade 4, non différencié extérieurement, et aux stades 5 et 7 (M pour les mâles, F pour les femelles). Chaque point correspond à un lot de plusieurs de ces échantillons. Les lots ne contenant que des individus n'exprimant pas l'HA en RT-PCRq ont été indiqués en rouge, ceux ne contenant que des individus exprimant tous l'HA en RT-PCRq ont été indiqués en violet.

# C. Evolution de la charge bactérienne à Wolbachia au cours du développement

L'évolution de la charge bactérienne a été établie par PCRq sur ces mêmes échantillons afin de déterminer si la multiplication de la bactérie a atteint un maximum aux stades précédant la différenciation sexuelle ou si elle évolue régulièrement tout au long du développement des néofemelles. Nous avons quantifié le nombre de bactéries par cellule hôte par le nombre relatif de copies de deux gènes présents en un exemplaire dans leur génome respectif : le gène *wsp* pour le nombre de génomes bactériens et le gène de l'HA pour quantifier le nombre de cellules hôtes. De manière intéressante, le nombre de bactéries augmente exponentiellement jusqu'au stade 4 (Fig. 3.5.A). Les taux maximums de bactéries sont mesurés aux stades 4 et 5, au moment de la différenciation de la gonade embryonnaire. Ce taux se stabilise ensuite dans les stades suivants, ce qui suggère que la charge bactérienne totale chez l'adulte est atteinte dès les stades juvéniles.

En parallèle, afin de mesurer l'évolution de la virulence de Wolbachia, l'expression des gènes codants les systèmes de sécrétion de la bactérie a été mesurée par RT-PCRq (Fig. 3.5.B-C-D) car ils sont suspectés de libérer dans le cytoplasme de la cellule hôte les facteurs bactériens responsables de la féminisation. Deux systèmes de sécrétion ont pu être mis en évidence chez wVulC : le système de sécrétion de type I (TISS) et le système de sécrétion de type IV (TIVSS) (Liu et al., In prep.). Ces systèmes de sécrétion sont présents dans tous les génomes de Wolbachia séquencés à ce jour, sous la forme d'un opéron pour le TISS et de deux opérons pour le TIVSS, et sont vraisemblablement impliqués dans la sécrétion des facteurs utiles à la bactérie pour interagir avec les cellules hôtes, y compris les facteurs de virulence impliqués dans le phénomène de féminisation. Nous avons donc étudié l'expression du gène codant TolC (opéron TISS) et des gènes codant virB3 et virB8 (opérons TIVSS) au cours du développement d'A. vulgare, en utilisant les ARN des mêmes échantillons pour lesquels la charge bactérienne a été déterminée. La figure 3.5.B-C-D montre que ces gènes s'expriment de manière synchrone, selon le même patron, avec une première phase au cours de laquelle l'expression augmente, de la naissance au stade 5, puis une seconde phase où elle se stabilise jusqu'au stade adulte, parallèlement à l'évolution de la charge bactérienne. Une expérience pilote réalisée au cours de la thèse de Sandrine Geniez avait permis d'observer une tendance similaire de l'évolution de la charge bactérienne et de l'expression des systèmes de sécrétion, ce qui conforte les résultats obtenus réalisés sur un plus grand nombre d'échantillons et à des pas de temps plus précis.



Figure 3.5 : Dynamique d'infection par *Wolbachia* au cours du développement dans la lignée infectée, suivant la charge bactérienne (A.) et l'expression de gènes de virulence bactériens (B.-D.). La charge bactérienne (A.) a été mesurée en PCRq par le nombre de copies du gène bactérien *wsp* (soit le nombre de bactéries), normalisé par le nombre de copies d'un gène de l'hôte, l'HA (soit le nombre de cellules). Les expressions en RT-PCRq des gènes de virulence de *Wolbachia* (B. *virB3*, C. *virB8*, D. *tolC*) ont été normalisées suivant l'expression du gène de l'hôte RbL8. Les larves ont été échantillonnées à la naissance (*0w*), une semaine (*1w*), deux semaines (*2w*) et trois semaines (*3w*) après la naissance. Ensuite, chaque échantillonnage est individuel et représente un stade de développement (4-8), caractérisé par une nouvelle mue, jusqu'au stade adulte (AM pour les mâles, AF pour les femelles). Les caractères sexuels externes commencent à apparaître au stade 5, ce qui permet de déterminer le sexe des individus. Les animaux qui ne sont pas du tout infectés par *Wolbachia* n'ont pas été inclus dans ce graphique.

## D. Impact d'une transinfection de mâles par Wolbachia sur la voie de signalisation de l'HA

On peut se demander quel impact a la bactérie sur l'HA et les autres gènes de cette voie de signalisation lorsqu'elle n'est pas héritée verticalement mais transmise horizontalement. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de transinfection (voir section Matériel et méthodes pour le protocole), consistant à inoculer la bactérie chez des animaux asymbiotiques, en l'occurrence des mâles adultes. Ces transinfections sont connues pour induire un phénotype intersexué de type iM, avec apparition de GA hypertrophiées puis d'ouvertures génitales femelles. Outre les mesures d'expression des gènes d'intérêt, un suivi de la charge bactérienne au cours de la transinfection a également été réalisé.

Lors d'une première série d'expériences, des mâles ont été échantillonnés et leurs gonades ont été disséquées 1, 4, 12 et 24 semaines après transinfection. Les mesures de RT-PCRq sur ces gonades ont révélé une baisse de l'expression de l'HA à 1 et 4 semaines post-injection (-83% et -82%, respectivement), suivie d'une forte augmentation à 12 et 24 semaines (d'un facteur 31 et 178, respectivement ; Fig. 3.6.A). Cette hausse est de plus corrélée avec celle de l'IR2 à 24 semaines (d'un facteur 38, Fig. 3.6.D) et dans une moindre mesure avec celle de l'IGFBP-rP1 (d'un facteur 3, Fig. 3.6.B) et de l'IR1 (d'un facteur 2, Fig. 3.6.C). En parallèle, les GA disséquées ont toutes présenté une forte hypertrophie à 24 semaines post-injection (Fig. 3.7).

Pour mieux comprendre la cinétique d'action de *Wolbachia*, nous avons réalisé une seconde série de transinfections de mâles, avec des échantillonnages d'animaux entiers cette fois, mais à des pas de temps plus nombreux, de 6 h à 1 an post-injection. Les RT-PCRq montrent à nouveau la hausse d'expression, à partir de 6 mois, de l'HA (d'un facteur 60 à cette date, Fig. 3.8.A) et de l'IR2 (d'un facteur 4, Fig. 3.8.D, n.s.). Cette augmentation est plus tardive et moins significative que dans la première série mais ces gènes sont exprimés essentiellement dans les GA et le signal est donc moins fort sur les animaux entiers. Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé d'altération du patron d'expression ni de Av-IGFBP-rP1 (Fig. 3.8.B), ni de Av-IR1 (Fig. 3.8.C). Comme cette série inclut les têtes (animaux échantillonnés entiers), l'expression de la GIH a également été étudiée mais elle s'est avérée très faible dans toutes les conditions et aucune variation significative n'a été relevée (Fig. 3.8.E).



<u>Figure 3.6</u> : Première série expérimentale d'une transinfection par *Wolbachia*. Dynamique de l'expression d'Av-AGH (A.), Av-IGFBP-rP1 (B.), Av-IR1 (C.) et Av-IR2 (D.), amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8. Les échantillons (gonades seules) ont été prélevés une semaine (*1w*), quatre semaines (*4w*), 12 semaines (*12w*) et 24 semaines (*24w*) après la transinfection. Deux types de contrôles ont été réalisés : des animaux non injectés (NI, en vert) et des animaux injectés avec du Ringer (en bleu). L'encart (en A.) correspond à un agrandissement de la moitié gauche du graphique.



<u>Figure 3.7</u> : Phénotypes des GA suite à la première série expérimentale de transinfection par *Wolbachia*. Les GA des animaux injectés avec du Ringer présentent un phénotype normal (A.). Suite à la transinfection avec *Wolbachia*, les GA présentent des hypertrophies qui sont particulièrement fortes à 24 semaines post-transinfection, avec un aspect globuleux (B.).

<u>Figure 3.8</u> : Seconde série expérimentale d'une transinfection par *Wolbachia*. Dynamique de l'expression d'Av-AGH (A.), Av-IGFBP-rP1 (B.), Av-IR1 (C.), Av-IR2 (D.) et GIH (E.) amplifiés par RT-qPCR et normalisée suivant l'expression du gène RbL8. Les animaux ont été échantillonnés entiers, aussitôt après transinfection (0h), six heures (6h), un jour (1d), trois jours (3d), cinq jours (5d), une semaine (1w), deux semaines (2w), trois semaines (3w), un mois (1m), trois mois (3m), six mois (6m) et un an (1y) après la transinfection. Deux types de contrôles ont été réalisés : des animaux non injectés (NI, en noir) et des animaux injectés avec du Ringer (en bleu). L'encart (en A.) correspond à un agrandissement de la partie basse du graphique.



Toujours dans la seconde série, un suivi systématique des phénotypes a été réalisé (Fig. 3.9). Des débuts d'hypertrophie des GA sont visibles occasionnellement à partir de la première semaine après injection et plus régulièrement à partir de la troisième semaine post-injection. Les premières glandes nettement hypertrophiées apparaissent après deux mois et plus de la moitié des glandes sont hypertrophiées après 3 mois. C'est également à partir de 3 mois que des ouvertures génitales femelles et des oviductes sont apparus.

Dans les deux séries d'expériences, le suivi de la charge bactérienne par PCRq montre une forte augmentation à partir du troisième mois suivant l'inoculation, visible dès le deuxième mois dans la seconde série (Fig. 3.10). Dans cette seconde série expérimentale, l'augmentation de la charge bactérienne, légère, est cependant significative dès la deuxième semaine post-injection (Fig. 3.10.B). Une très légère charge bactérienne est par ailleurs relevée jusqu'à six heures après inoculation, avant d'être non détectable à un jour post-injection.


<u>Figure 3.9</u> : Phénotypes des GA suite à la seconde série expérimentale de transinfection par *Wolbachia*. Les GA des animaux injectés avec du Ringer présentent un phénotype normal (A.). Suite à la transinfection avec *Wolbachia*, des débuts d'hypertrophie sont visibles occasionnellement dès la première semaine post-injection (B.). Les hypertrophies nettes ne sont pas encore visibles après un mois (C.) mais apparaissent clairement après deux mois et trois mois (D.). Elles sont encore plus fortes après six mois (E.) et un an (F.), avec un aspect globuleux.



<u>Figure 3.10</u> : Suivi de la charge bactérienne lors des deux transinfections. Dynamique d'infection par *Wolbachia* dans la première (A.) et la seconde (B.) série expérimentale de transinfection, aux pas de temps décrits en figures 3.6 et 3.8. La charge bactérienne a été mesurée en PCRq par le nombre de copies du gène bactérien *wsp* (soit le nombre de bactéries), normalisé par le nombre de copies d'un gène de l'hôte, l'HA (soit le nombre de cellules). Deux types de contrôles ont été réalisés : des animaux non injectés (NI, en vert (A.) et en noir (B.)) et des animaux injectés avec du Ringer (en bleu). L'encart (en B.) correspond à un agrandissement de la partie gauche du graphique.

#### **E. Discussion**

Depuis l'identification de l'HA chez de multiples Décapodes, les analyses d'expression ont révélé de facon surprenante un patron variable selon les espèces. Elle est exprimée exclusivement dans la GA chez l'écrevisse C. quadricarinatus (Manor et al., 2007) ainsi que chez les crevettes M. rosenbergii (Ventura et al., 2009) et Pengeus monodon (Mareddy et al., 2011). Au contraire, l'expression de l'HA a été trouvée plusieurs fois en dehors de la GA : dans la chaîne nerveuse et l'hépatopancréas des deux sexes chez F. chinensis (RT-PCR) (S. Li et al., 2012), dans l'hépatopancréas chez *M. nipponense* (1% de l'expression de la GA) (F. J. Li et al., 2015), dans l'hépatopancréas et l'ovaire du crabe *C. sapidus* (RT-PCR) (Chung et al., 2011; Chung, 2014; Huang et al., 2017b), au niveau du vas deferens chez Marsupenaeus japonicus (inclut peut-être une partie de GA) (Banzai et al., 2011), dans le testicule chez E. sinensis (~1% de l'expression de la GA) (Song et al., 2018), dans le testicule et même le muscle des deux sexes chez l'écrevisse Procambarus fallax (RT-PCR) (Levy et al., 2017). Par ailleurs, le profil d'expression de l'HA diffère entre les deux études chez le homard *S. verreauxi* (Chandler et al., 2015; Ventura et al., 2015), ainsi qu'entre celles sur le crabe *S. paramamosain* (Huang et al., 2014: Zhang et al., 2014), soulevant la question d'une variabilité interindividuelle ou temporelle dans ce patron d'expression. Il faut de plus noter que la voie de l'HA chez les Décapodes doit différer de celle des Isopodes car, outre l'IR3 supplémentaire, ils présentent parfois plusieurs transcrits de l'HA (deux variants alternatifs chez *F. chinensis* (S. Li et al., 2012), trois transcrits chez *C. sapidus* (Chung, 2014; Huang et al., 2017b)), même si cela ne suffit pas à expliquer la présence d'expression de l'HA hors des GA. Chez A. vulgare, nous avons d'abord montré que l'HA ne s'exprime significativement que dans les GA des mâles, malgré un signal extrêmement faible parfois détecté chez les femelles ou dans des organes autres que la GA. S'il ne s'agit pas de contamination, ce signal pourrait correspondre à une très faible expression constitutive du gène, ne provoquant pas de réponse biologique in vivo. Nos analyses vont donc dans le sens du dogme historique : cette hormone masculinisante peut être considérée comme absente chez les femelles et ne s'exprime significativement que dans les GA des mâles (Okuno et al., 1999; Ohira et al., 2003; Grève et al., 2004).

Nous avons par ailleurs montré qu'au cours du développement, l'expression de l'HA est observée dès la naissance et avant la différenciation des GA, possiblement due aux cellules dites primordiales ou initiales des GA. Celles-ci ont en effet été observées dès les stades indifférenciés dans la partie distale des filaments suspenseurs de la gonade (th2 et th3 d'abord) et supputées dans le cordon sexuel avant l'émergence, plus tardive, du filament suspenseur th4 (Juchault, 1966). Par ailleurs, cette observation va dans le sens d'une hypothèse historique concernant un inducteur responsable de la différenciation des GA et des utricules. Il a en effet été postulé que cet inducteur aurait une nature proche de celle de l'HA, voire qu'il pourrait s'agir de son précurseur ou de la même molécule plus fortement concentrée (Juchault and Legrand, 1964c, 1966). Dans ce cas, c'est bien le même gène qui s'exprimerait, ce que nous mettons en évidence par RT-PCRq bien avant la différenciation des GA. De manière intéressante, il a été mis en évidence que les gonades indifférenciées de génotype femelle sont insensibles à une greffe de GA traitée à l'éthanol aux stades 2, 3 et souvent 4 (Suzuki, 1999). Ces éléments semblent indiquer que ces gonades sont non réceptives à l'action de l'HA jusqu'au stade 4. Peut-être faut-il invoquer un contrôle de la compétence à l'HA au cours de la différenciation, qui pourrait être régulée par exemple par le système nerveux. Nous avons par exemple mis en évidence que le neuropeptide inhibiteur GIH est fortement exprimé de la naissance jusqu'au stade 4, ce qui pourrait expliquer la non-différenciation des jeunes gonades exposées à l'HA, conformément aux ablations de protocérébrons résultant en une maturation sexuelle anticipée (Juchault et al., 1965; Reidenbach, 1965, 1966; Juchault, 1977).

À propos de l'action de *Wolbachia* sur la différenciation sexuelle de son hôte, nous avons montré que le patron d'expression de l'HA chez les néo-femelles (génétiquement mâles) est identique à celui des femelles génétiques, au cours du développement comme chez l'adulte. Ainsi, non seulement les embryons génétiquement mâles infectés par *Wolbachia* sont réfractaires à l'HA (Juchault and Legrand, 1985), mais la majorité ne l'expriment de toute manière dans aucun organe et à aucun stade de leur développement, d'où leur différenciation en néo-femelles. Nous avons néanmoins observé plusieurs cas de juvéniles de stades 4 et 5 où l'HA s'exprime malgré la présence de *Wolbachia*. Ces cas correspondent peut-être à des intersexués mais leur proportion relativement élevée suggère que la bactérie a parfois du retard dans le processus de féminisation, en général rattrapé au stade 6, puisqu'au-delà nous ne faisons plus de telles observations. Les cas où le retard n'est pas rattrapable et aboutit sur un phénotype intersexué restent en effet exceptionnels.

Le suivi au cours du développement a également permis de montrer que la charge bactérienne à *Wolbachia* augmente de façon exponentielle entre la naissance et le début de la différenciation sexuelle au stade 4. À partir du stade 5, les animaux sont sexables, ce qui nous a permis de montrer l'absence de bactéries chez les individus phénotypiquement mâles et une charge bactérienne stable chez les femelles. Vu le plateau, on peut supposer qu'à partir des stades 5-6, le nombre de bactéries évolue parallèlement au nombre de cellules hôtes et que la prolifération bactérienne est terminée. Outre la variabilité interindividuelle, les différences de mesure à un stade donné chez les femelles différenciées pourraient s'expliquer par l'état des ovaires dans leur cycle de reproduction, car les densités bactériennes augmentent en même temps que la maturation des ovocytes (Bertaux, pers. comm.) et le nombre d'ovocytes infectés augmente au cours de la maturation ovarienne (Genty et al., 2014). Nous avons montré que l'expression des gènes codant les systèmes de sécrétion évolue parallèlement à la charge bactérienne, suggérant qu'ils présentent une expression constitutive. L'expression relative de ces gènes par rapport à celle d'un gène bactérien de référence (*wsp* par exemple) permettra de le confirmer. Ces résultats semblent indiquer que ces systèmes de sécrétion sont fonctionnels et permettent la libération des facteurs bactériens directement dans le cytoplasme des cellules hôtes afin de maintenir les relations symbiotiques entre les deux partenaires. Une analyse fine *in situ* de la distribution de *Wolbachia* au sein des tissus des différents stades de développement sera particulièrement importante pour déterminer si la colonisation se fait de manière préférentielle dans les organes sexuels et si elle prédétermine celle observée chez l'adulte (Dittmer et al., 2014). En fait, il a été montré chez les nématodes filaires que la localisation de *Wolbachia* au cours du développement de l'hôte n'était pas en accord avec celle observée chez l'adulte, en particulier dans les gonades qui ne sont pas infectées par la bactérie jusqu'au troisième stade larvaire, les ovaires étant néo-colonisés à partir des cordes latérales (Landmann et al., 2010; Fischer et al., 2011).

Lorsque la bactérie échoue à féminiser totalement son hôte au cours du développement, ce dernier peut se différencier en différents types d'intersexués. Les iM sont notamment bien connus pour leur GA qui présentent une forte hypertrophie (Legrand and Juchault, 1963). Que les extinctions de l'HA (Chapitre 1) et de l'IR1 (Chapitre 2) provoquent également une hypertrophie de GA conforte l'idée que Wolbachia puisse cibler les membres de cette voie de signalisation. En dehors du patron d'expression de l'HA, ceux de son transporteur et de ses récepteurs membranaires ne semblent pas anormaux chez les animaux naturellement infectés (Chapitres 1 et 2). Nous avons alors utilisé une approche de transinfection d'animaux non-porteurs de la bactérie afin d'observer si cette situation déclenche un déséquilibre provoquant une réponse sur la voie de signalisation de l'HA. La première expérience de transinfection a montré une baisse transitoire de l'expression de l'HA dans les gonades mâles peu après l'infection. Ce résultat semble corroborer, dans un premier temps, l'idée selon laquelle Wolbachia aurait un effet négatif sur l'expression de l'HA. Dans notre deuxième expérience de transinfection, les mesures, sur animaux entiers, n'ont pas permis de retrouver cet effet négatif de Wolbachia sur la production de l'HA. Pour expliquer l'incongruence entre les deux séries expérimentales sur cet effet, il peut être envisagé qu'elle est moins visible sur les échantillons d'animaux entiers (signal plus dilué), voire que la baisse d'expression de l'HA n'est pas systématique ou pas toujours aussi marquée. Elle pourrait également dépendre de la quantité de bactéries injectées (un extrait ovarien différent ayant été utilisé dans chaque transinfection.). Il est encore possible que la compensation par hypertrophie ait été plus rapide dans la seconde série ou qu'un autre organe ait compensé la baisse d'expression dans la GA (moins probable étant donné les analyses d'expression tissulaire précédentes). D'autres expériences seront nécessaires pour trancher entre ces hypothèses, car différents paramètres ont varié entre nos deux séries expérimentales (extrait bactérien utilisé, échantillons utilisés pour la RT-PCRq).

Dans les deux expériences cependant, une forte hausse tardive de l'expression de l'HA et de l'IR2 a été mesurée, associée à une féminisation de type iM (hypertrophie des GA et ouvertures génitales femelles) et à l'augmentation de la charge bactérienne qui atteint un niveau équivalent voire supérieur à celui observé au cours du développement après le stade 4. Par ailleurs, une hausse plus modeste de l'expression de l'IGFBP-rP1 et de l'IR1 ont également été relevées sur gonades seulement (1ère série), évoquant une possible réponse locale, non détectable à l'échelle de l'organisme entier. Comme discuté dans les chapitres précédents, l'hypertrophie qui s'observe après quelques semaines pourrait être liée à une réponse compensatoire de l'hôte. En effet, nous avons également montré que les GA hypertrophiées produisent plus d'HA, non seulement parce qu'elles sont plus grandes, mais aussi parce qu'elles expriment plus fortement le gène de l'HA (voir expression tissulaire en Fig. 3.1). Contrairement à ce qui avait été postulé initialement, il est par ailleurs connu que cette HA est bien libérée dans l'hémolymphe car cette dernière conserve son pouvoir masculinisant en cas d'injection d'extrait d'hémolymphe chez de jeunes femelles (Juchault and Legrand, 1985). Des observations similaires ont été faites dans le chapitre précédent à propos de Av-IR1 et Av-IR2, dont l'expression semble accrue au sein des GA hypertrophiées (Fig. 2.12). Ainsi, nos résultats suggèrent que la réponse compensatoire implique une production accrue d'hormone masculinisante et s'étend aux molécules avec lesquelles elle interagit. Leurs surexpressions pourraient participer à l'amplification de l'HA via des boucles de rétrocontrôle.

Au moins deux hypothèses ont été précédemment avancées quant au niveau du rétrocontrôle (Fig. I.11). La première boucle possible implique directement les récepteurs de l'HA au niveau de la GA, le rétrocontrôle étant alors autocrine. Cette hypothèse est en accord avec la sur-expression des deux récepteurs IR mesurée dans les GA hypertrophiées. La seconde boucle implique le protocérébron et la GIH, le neuropeptide régulant la taille des GA (Grève et al., 1999). Le suivi de l'expression de la GIH n'a pu être réalisé que lors de la seconde transinfection sur animaux entiers. Il ne révèle pas de variation significative mais ce gène étant exprimé spécifiquement dans quatre cellules seulement (cellules B) (Azzouna et al., 2003), nous nous sommes trouvés à la limite du seuil de détection. L'expérience sera reproduite ultérieurement en prélevant les têtes séparément afin d'augmenter le signal. Nos résultats n'excluent pas cependant que *Wolbachia* affecte l'action du protocérébron sur les GA. En effet, il est connu que la bactérie infecte et affecte tout le système nerveux central (cerveau et chaîne nerveuse) de son hôte (Martin, 1981). Chez les iM en particulier, les terminaisons nerveuses au niveau de la glande du sinus de type 1 (associées aux cellules β du

protocérébron) et de type 2 (associées aux cellules B du protocérébron) ne présentent plus de figure d'exocytose et les vésicules à l'intérieur de l'axoplasme sont claires voire absentes (Martin, 1981; Azzouna et al., 2003). Chez ces individus, une partie des cellules B du protocérébron présente également un très faible nombre de granules de neurosécrétion associé à une forte présence de Wolbachia. Ces observations ne sont pas incompatibles avec une expression relativement stable de la GIH dans les cellules B, telle que nous avons pu la mesurer. En particulier, Martin (1981) a envisagé que la charge bactérienne dans les neurones pourrait provoquer un déficit en ATP à l'origine d'un dysfonctionnement du transport axonal des vésicules contenant différentes neurohormones dont la GIH (Martin, 1981). Il serait intéressant d'étudier ces neuropeptides par immunofluorescence afin de confirmer si nous avons bien une transcription mais pas de protéine in situ. Cette action de Wolbachia expliquerait l'hypertrophie des GA lors de la transinfection par un déficit en GIH, que ce soit dans le cadre de la petite boucle (dans l'hypothèse où le neuropeptide potentialise le récepteur de l'HA. Chapitre 2) ou dans le cadre de la grande boucle (arrêt de l'action directement inhibitrice du neuropeptide). Cependant, cette action n'explique pas la féminisation au cours du développement. En effet, l'ablation du protocérébron accélère la différenciation sexuelle mais ne l'altère pas (Juchault et al., 1965; Reidenbach, 1965, 1966; Besse et al., 1969; Juchault, 1977). La bactérie semble bien avoir un second effet sur son hôte, provoquant une féminisation malgré la présence de l'hormone masculinisante. En effet, la compensation de l'hôte sur l'HA et ses récepteurs n'est pas suffisante pour contrer Wolbachia car la transinfection aboutit systématiquement à l'apparition du phénotype iM, stérile et présentant en particulier des ouvertures génitales femelles. Il a été envisagé que les récepteurs de l'HA soient non présents ou non fonctionnels faute d'une neurosécrétion androstimulante (Juchault and Legrand, 1985). L'origine exacte de l'état réfractaire à l'HA associé à la féminisation reste à déterminer, qu'il implique des neuropeptides ou encore d'autres mécanismes. Pour explorer ces hypothèses, il faudra étendre nos connaissances du neuropeptidome d'A. vulgare et utiliser des outils permettant d'interférer de façon ciblée avec les acteurs de la boucle de rétrocontrôle, comme par l'approche utilisant l'ARNi.

## II. Comparaison avec une perturbation ciblée de l'HA par ARNi

#### A. Contexte

Dans ce deuxième volet, nous avons utilisé l'approche par ARNi sur l'HA afin d'essayer de reproduire artificiellement l'effet inhibiteur de *Wolbachia* sur l'HA et ainsi féminiser expérimentalement les cloportes. Une expérience pilote d'ARNi sur l'HA a été réalisée lors du stage de M1 de L. Moustrou, sous la direction de P. Grève en 2011. L'extinction de l'HA, très efficace, avait conduit à l'hypertrophie des GA. Nous avons alors cherché à reproduire ce résultat, à en étudier la dynamique et à le compléter par une analyse de RT-PCRq afin d'examiner les éventuels effets croisés que peut avoir l'inhibition de ce gène sur le reste de la voie de signalisation. Comme pour la transinfection par *Wolbachia*, deux séries d'expériences successives ont eu lieu. La seconde a été présentée pour partie dans le chapitre 1 (III), lors de l'étude de l'interaction entre l'expression de Av-IGFBP-rP1 et celle de l'HA. Cette section reprend ces résultats, additionnés des effets de l'inhibition de l'HA sur les récepteurs transmembranaires. Enfin, les effets sur l'expression de la GIH ont également été recherchés pour déterminer si le protocérébron est impliqué dans la boucle de rétrocontrôle de l'HA. Les mêmes études ont été réalisées sur la première série expérimentale (à l'exception de la GIH car seules les gonades ont été prélevées dans ces échantillons).

## **B.** Résultats

Dans la première série expérimentale, les RT-PCRq sur gonades montrent une inhibition de l'HA de 98% à 1 et 4 semaines post-injection de l'ARNdb et d'encore 81% après 12 semaines (Fig. 3.11.A). Une légère hausse de l'expression de l'IGFBP-rP1 a été mesurée après 12 semaines seulement (x2,8) (Fig. 3.11.B). Une hausse de l'expression de l'IR2 est également mesurée après 12 semaines (x5,8), visible encore après 24 semaines (x4,7) (Fig. 3.11.D), en corrélation avec l'apparition d'une hypertrophie des GA (Fig. 3.12.A).



<u>Figure 3.11</u> : Première série expérimentale d'extinction par ARNi de l'expression de l'HA. Dynamique de l'expression d'Av-AGH (A.), Av-IGFBP-rP1 (B.), Av-IR1 (C.) et Av-IR2 (D.) amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8. Les échantillons (gonades seules) ont été prélevés une semaine (*1 wpi*), quatre semaines (*4 wpi*), 12 semaines (*12 wpi*) et 24 semaines (*24 wpi*) après l'injection de l'ARNdb. Deux types de contrôles ont été réalisés : des animaux non injectés (NI, en vert) et des animaux injectés avec de l'eau (en bleu).



<u>Figure 3.12</u> : Phénotypes des GA suite aux deux séries expérimentales d'ARNi, sur Av-HA. Les GA hypertrophiées sont ici illustrées 24 semaines après injection de l'ARNdb pour la première série (A.) et 12 semaines après injection pour la seconde série (C.). Les GA normales sont illustrées 24 semaines après l'injection d'eau dans la première série (B.).

Dans la seconde série, sur animaux entiers, nous avons reproduit l'inhibition de l'HA à hauteur de 98%, 95% et 89% après 1, 4 et 12 semaines respectivement (Fig. 3.13.A). Cette fois, l'inhibition est encore significative après 24 semaines, bien qu'amoindrie (64%). Les RT-PCRq ne montrent cette fois aucun effet significatif de l'ARNi de l'HA sur ses partenaires (Fig. 3.13.B-C-D). Bien que non-significative, une hausse moyenne d'un facteur 1,8 de l'expression de l'IR2 après 12 et 28 semaines peut néanmoins être observée. Il est probable qu'en utilisant les animaux entiers, on perde en sensibilité concernant ce gène exprimé quasi-exclusivement dans les GA. Le suivi des phénotypes confirme une fois encore l'hypertrophie graduelle des GA : la moitié d'entre elles commencent à s'hypertrophier après 4 semaines (4/9) et le processus semble total après 12 et 28 semaines (10/10 et 12/12) (Fig. 3.12.C pour illustration à 12 semaines). De façon remarquable, après 4, 12 et 28 semaines, la moitié des animaux disséqués présentaient en plus des ouvertures génitales femelles (2/4 à chaque pas de temps). Ainsi, ces animaux présentent visiblement un phénotype de type iM tel que pourrait l'induire *Wolbachia*.

Toujours dans cette seconde série, l'analyse de l'expression de la GIH montre une légère hausse transitoire, 4 semaines après injection (x1,6), puis une baisse d'expression 28 semaines après injection (- 64%) (Fig. 3.13.E). Ces résultats n'étant pas fortement significatifs et le signal étant très faible, il faudra les confirmer ou les infirmer en réitérant l'expérience avec un prélèvement séparé des têtes.



<u>Figure 3.13</u> : Seconde série expérimentale d'extinction par ARNi de l'expression de l'HA. Dynamique de l'expression d'Av-AGH (A.), Av-IGFBP-rP1 (B.), Av-IR1 (C.) et Av-IR2 (D.) amplifiés par RT-PCRq et normalisée suivant l'expression du gène RbL8. Les animaux entiers ont été échantillonnés une semaine (*1 wpi*), quatre semaines (*4 wpi*), 12 semaines (*12 wpi*) et 24 semaines (*24 wpi*) après l'injection de l'ARNdb. Deux types de contrôles ont été réalisés : des animaux non injectés (NI, en vert) et des animaux injectés avec de l'eau (en bleu).

#### **C. Discussion**

L'approche par ARNi s'est avérée fructueuse à plusieurs reprises chez A. vulgare, sur l'IGFBP-rP1 (Chapitre 1), sur Av-IR1 et Av-IR2 (Chapitre 2), ainsi que sur leur ligand commun, l'HA. L'extinction de ce dernier, permet bien de reproduire le phénotype induit par la transinfection par Wolbachia, c'est-à-dire la nette hypertrophie des GA et l'apparition d'ouvertures génitales femelles. Des effets similaires ont par ailleurs été observés sur les GA lorsque l'expression des IAG de Décapodes est inhibée (Ventura et al., 2009; Rosen et al., 2010). L'hypertrophie a également été décrite et commentée précédemment lors de l'ARNi sur Av-IGFBP-rP1 et Av-IR1. Des différences dans l'intensité du phénomène se dégagent néanmoins. Les hypertrophies les plus fortes ont été observées par transinfection après 6 mois. Le phénomène est également très marqué lors de l'inhibition de l'HA et de l'IR1 pendant trois mois, atteignant une hypertrophie comparable à celle induite par la bactérie au même pas de temps. Il est probable que la différence observée ensuite à 6 mois soit liée au fait que la bactérie ait continué à coloniser son hôte tandis que l'efficacité de l'ARNi commence à décroître, comme nous l'avons observé dans nos deux séries expérimentales. Réitérer l'injection (trois mois après la première par exemple) permettrait peut-être d'obtenir des hypertrophies par ARNi encore plus fortes et des ouvertures génitales femelles de manière plus systématique. Cette approche s'est avérée indispensable pour induire une hypertrophie des GA de *M. rosenbergii* pour lesquels jusqu'à trois injections d'ARNi par semaine ont été réalisées sur une période de 55 jours (Ventura et al., 2009). C'est enfin l'inhibition de l'IGFBP-rP1 qui provoque l'hypertrophie la moins marquée, possiblement liée à son rôle plus indirect de transport. Cette approche permet néanmoins de confirmer l'implication de toutes ces molécules dans la voie régulant le fonctionnement des GA. Des expériences similaires sur des larves (stades 4 ou 5) sont envisagées pour étudier l'impact de l'ARNi au cours de leur différenciation sexuelle. Si l'inhibition a lieu avant que ce processus soit trop avancé, nous devrions pouvoir ainsi obtenir des portées 100% femelles (50% ZZ, 50% ZW). Des injections répétées d'ARNi pourront également être envisagées, puisque deux injections par semaine ont été nécessaires pour induire une réversion totale des mâles de *M. rosenbergii* (Ventura et al., 2012).

Cette approche a également permis d'examiner les conséquences d'un déséquilibre dans la boucle de rétrocontrôle de l'HA, qu'elle soit courte (régulation autocrine) et/ou longue (régulation par le système nerveux central). En particulier, nous n'avons pas mis en évidence d'impact significatif d'une baisse de l'expression de l'HA sur l'expression de Av-IR1, le candidat préférentiel pour le contrôle de la croissance des GA. Nous ne reproduisons donc pas la légère hausse d'expression d'Av-IR1 observée dans les gonades lors d'une transinfection (Fig. III.6.C), mais

confirmons plutôt les résultats du chapitre 2 qui suggèrent que l'expression de ce récepteur semble assez constitutive. Concernant la régulation de l'HA par le système nerveux central, nous avions mentionné précédemment que le scénario de la petite boucle implique aussi forcément la GIH, étant donné les hypertrophies de GA obtenues par ablation du protocérébron. L'hypertrophie des GA observées lors de l'inhibition de l'HA reste cohérente avec l'hypothèse de régulation négative des GA par l'action conjointe de l'HA et de la GIH. Dans ce cas de figure, l'inhibition de l'HA est suffisante pour rompre la petite boucle, malgré l'expression de l'IR1 et quel que soit le patron d'expression de la GIH. Nous avons bien montré des variations de la transcription de la GIH lors de l'inhibition de l'HA mais elles ne sont pas de grandes amplitudes. Il faudra reproduire cette expérience en réalisant les RT-PCRq sur les têtes seules afin d'avoir un signal plus clair. Les hypothèses d'une régulation lors de la traduction de la GIH ou lors de sa sécrétion restent par ailleurs à explorer, en particulier à la lumière des travaux de Martin (1981).

Outre le fait que l'inhibition par ARNi de l'HA et la transinfection par *Wolbachia* induisent les mêmes phénotypes, les deux types de perturbations provoquent des conséquences semblables sur les patrons d'expression des acteurs de la voie de signalisation de l'HA. En effet, nous observons localement (dans les séries sur partie de gonades) une sur-expression de Av-IGFBP-rP1 et Av-IR2 après 12 et/ou 24 semaines. La transinfection par *Wolbachia* provoque en outre une légère surexpression d'Av-IR1, significative après 24 semaines. Globalement (dans les séries sur animaux entiers), les variations d'expression de Av-IGFBP-rP1 ne sont pas détectables du tout dans aucun des deux cas de figure, tandis que celles d'Av-IR2 sont encore visibles, bien que non significatives. Dans les deux cas, la voie de signalisation est interrompue de façon assez drastique (symptômes de démasculinisation), soit par suppression du ligand (ARNi de l'HA), soit par inactivation ou suppression des récepteurs de l'HA via la suppression de neurosécrétions, comme suggéré historiquement par (Juchault and Legrand, 1985; Legrand and Juchault, 1986).

## III. Comparaison avec un perturbateur endocrinien exogène : le bisphénol A

#### A. Contexte

Depuis les années 40-50, le BPA a été très largement utilisé dans l'industrie des plastiques pour produire notamment des résines époxy, polycarbonates et polyesters. Sa production mondiale a dépassé les trois à quatre millions de tonnes en 2005-2006. L'Homme ainsi que les animaux sauvages se trouvent depuis exposés à ce PE, présent dans l'alimentation et l'environnement (eau, air) (Vandenberg et al., 2007; Geens et al., 2011; Ribeiro et al., 2017). Le BPA s'accumule principalement dans le réseau hydrographique (eau et sédiments) via les eaux usées par exemple (Fürhacker et al., 2000). Son effet en tant que PE a donc été principalement étudié sur les organismes aquatiques. Des études se sont néanmoins intéressées à sa prévalence en milieu terrestre et les conséquences pour les espèces qui y vivent (Fent et al., 2003). Les boues d'épuration notamment, également contaminées, seraient parfois utilisées pour enrichir les sols agricoles, les contaminant à leur tour au BPA (Lee and Peart, 2000; Staples et al., 2010). Bien que ces études suggèrent plutôt une faible stabilité et une faible mobilité du BPA dans les sols, le groupe de M. F. L. Lemos a rapporté à plusieurs reprises des effets du BPA sur la mue et une fois des biais de sex ratio en faveur des femelles chez un cloporte, P. scaber (Lemos et al., 2009, 2010b, 2010a, 2010c). Ces résultats sont surprenants car ils suggèrent qu'un xénoestrogène pourrait affecter la différenciation sexuelle du cloporte alors que celle-ci dépend de l'HA, protéique, chez tous les Malacostracés.

#### **B. Résultats**

Nous avons donc tenté de reproduire ce résultat en élevant des portées de *P. scaber* sur un sol contaminé expérimentalement à différentes concentrations de BPA. Après une première série d'expériences ayant préalablement permis d'optimiser le protocole, nous avons finalement élevé 60 portées dans cinq conditions de contamination du sol, de 0 à 60 mg de BPA par kilogramme de terre (voir Matériel et méthodes). Les résultats de *sex ratio* établis 8 semaines après exposition sont présentés en Fig. 3.14. Aucune différence significative n'est relevable entre les différentes conditions. La dissection de plusieurs individus de chaque catégorie n'a révélé aucun phénotype de type intersexué.



<u>Figure 3.14</u> : Absence d'effets d'une exposition environnementale au BPA (de 0 à 60 mg/kg de terre) sur le *male ratio* au sein de portées de *Porcellio scaber*.

#### **C. Discussion**

L'absence d'effets visibles du BPA dans notre expérience soulève plusieurs questions. Il est d'abord envisageable que nous n'ayons pas réussi à effectuer une contamination efficace (problème de solubilité dans l'eau, d'oxydation du BPA, d'assimilation par les cloportes, etc.). Il est aussi possible que le résultat obtenu par Lemos et al. (2009) ne soit pas facilement reproductible. Ils obtiennent en effet un biais de *sex ratio*, légèrement significatif, dans une seule des concentrations testées (10 mg/kg de sol). Ils n'ont par ailleurs pas regardé les phénotypes des animaux testés (notamment celui des gonades) et ne peuvent pas écarter une mortalité supérieure des mâles au contact du BPA. Enfin, ils ne mentionnent ni ne recherchent la présence de *Wolbachia* dans leurs animaux, qui, si elle est présente, pourrait biaiser les résultats (un phénotype féminisant de cette souche est suspecté chez cette espèce).

Par ailleurs, leur résultat peut sembler contre-intuitif étant donné que la voie de signalisation des œstrogènes est *a priori* non fonctionnelle chez les Crustacés (Köhler et al., 2007; Lafont and Mathieu, 2007; LeBlanc, 2007). Le BPA pourrait interagir directement avec un ou des acteurs résiduels de cette voie de signalisation des stéroïdes comme l'ERR (*Estrogen-Related Receptor*), que nous avons justement détecté dans le transcriptome d'*A. vulgare*. Dans ce cas d'une voie non-

fonctionnelle, les effets du BPA sur les concentrations en œstrogène ou en testostérone, tels que décrits sur un modèle d'Amphipode (Lewis et al., 2012), peuvent très bien rester sans effet physiologique sur le sexe. Néanmoins, ce PE semble avoir des effets additionnels en altérant notamment la voie de signalisation des ecdystéroïdes, molécules de structure voisine (Mu et al., 2005; LeBlanc, 2007). Ce dernier est en effet connu pour activer plusieurs cibles dont les récepteurs aux œstrogènes (Krishnan et al., 1993; Gould et al., 1998) mais aussi ceux aux androgènes (Lee et al., 2003), aux hormones thyroïdiennes (Moriyama et al., 2002; Zoeller et al., 2005) ainsi que le récepteur à l'ecdysone (Dinan et al., 2001; Planelló et al., 2008).

Quoiqu'il en soit, le *sex ratio* des cloportes ne semble clairement pas être un biomarqueur efficace pour évaluer la présence de BPA. Si ce PE affecte les caractères sexuels des Crustacés, ce doit effectivement être de façon indirecte, voire secondaire. La littérature sur les Crustacés montre d'ailleurs quasi-systématiquement que le BPA a principalement des effets sur la mue, suggérant que c'est plus largement le système des ecdystéroïdes qui est perturbé (Marcial et al., 2003; Mu et al., 2005; Lemos et al., 2009; Plahuta et al., 2015). Le même constat est de plus établi avec plusieurs autres PE (Plahuta et al., 2017; Gismondi, 2018).

# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

#### I. La différenciation sexuelle des Isopodes, un contexte d'étude en expansion

Le déterminisme et la différenciation sexuelle des Crustacés Isopodes sont deux domaines avant fait l'objet de nombreuses études depuis les années 1950. Les travaux fondateurs de chercheurs tels J.J. Legrand (Legrand, 1954c, 1958), P. Juchault (Juchault, 1966, 1978; Juchault and Legrand, 1978) et G. Martin (Martin, 1981; Martin et al., 1990, 1999) ont permis de donner ses lettres de noblesse au cloporte comme modèle d'étude dans ces domaines. Ils ont ainsi mis en évidence l'existence d'un système de différenciation mâle basée sur des GA qui produisent une HA, la seule hormone sexuelle protéique connue à ce jour. Ils ont également été pionniers dans la caractérisation d'un facteur féminisant, prenant la forme d'une bactérie endosymbiotique, Wolbachia (Juchault and Legrand, 1964d; Legrand and Juchault, 1969b; Martin et al., 1973). Le contrôle de la physiologie sexuelle par le système nerveux central a enfin été démontré chez plusieurs espèces d'Isopodes (Juchault et al., 1965; Legrand et al., 1968). Les avancées dans la compréhension du modèle, très nombreuses jusqu'à la fin du XX° siècle, n'ont cependant pas permis d'en élucider tous les aspects. En particulier, l'HA et la GIH était alors les seules molécules identifiées à agir sur la différenciation et le fonctionnement sexuels. Dans les années 2000, avec le développement des outils de biologie moléculaire et de bio-informatique, de nombreux auteurs ont pu caractériser l'HA dans de nouveaux modèles, notamment de Décapodes, chez lesquels elle restait encore inconnue (Manor et al., 2007; Ventura et al., 2011). Ce n'est que dans les années 2010 que de nouveaux acteurs de la différenciation sexuelle de Malacostracés ont été identifiés : l'IGFBP-rP1, un transporteur circulant de l'HA (entre autres ILP) (Rosen et al., 2013; Chandler et al., 2017b), puis l'IR, un récepteur TK transmembranaire (Sharabi et al., 2016; Aizen et al., 2016; Guo et al., 2018). Ces découvertes, initiées cette fois sur le modèle Décapode, ont élargi l'étude de l'HA à ses différents partenaires moléculaires. Ils ont ainsi permis de relancer une nouvelle phase de la recherche sur la différenciation sexuelle des Malacostracés. Dans le cadre de ma thèse, nous avons cherché à identifier ces nouveaux acteurs et à les caractériser dans le modèle Isopode, en particulier sur le cloporte commun A. vulgare. En outre, l'étude de ces molécules chez les cloportes rejoint celle de la symbiose à Wolbachia. En effet, la bactérie induit un état réfractaire à l'HA (Legrand and Juchault, 1963), qui pourrait provenir des récepteurs de l'HA ou d'une neurosécrétion contrôlant leur état (nombre, affinité) (Juchault and Legrand, 1985; Legrand and Juchault, 1986). Nous avons donc recherché l'interaction entre le parasite féminisant et l'expression des récepteurs nouvellement identifiés.

## II. <u>Carte d'identité et évolution des nouveaux acteurs de la voie de signalisation</u> <u>de l'HA</u>

L'IGFBP-rP1, le transporteur circulant de l'HA, ainsi que l'IR, son récepteur membranaire, ont été cherchés *in silico* chez *A. vulgare*, par homologie avec des séquences orthologues de Décapodes. Le premier identifié, Av-IGFBP-rP1, possède bien les trois domaines conservés caractéristiques de tous les autres IGFBP-rP1 décrits jusqu'à présent, ainsi que les motifs canoniques de liaisons aux ILP (Chapitre 1). Contrairement à l'IGFBP-rP1 qui semble codé par un gène unique, nous avons identifié deux récepteurs TK transmembranaires : Av-IR1 et Av-IR2 (Chapitre 2). Ces récepteurs appartiennent bien à la même famille des IR mais ils sont assez divergents l'un de l'autre, provenant vraisemblablement d'une duplication d'un gène ancestral (Herran et al., 2018). Ce résultat s'ajoute aux duplications observées ponctuellement chez des espèces de Mollusques, Plathelminthes, Chélicérates, daphnies et plus récemment à large échelle chez les insectes, permettant de réfuter l'hypothèse historique d'un gène unique de l'IR chez tous les invertébrés.

De façon similaire à ce qui avait été évalué chez les Isopodes grâce aux greffes hétérospécifiques de GA (Martin and Juchault, 1999), la spécificité de l'IR pour son ligand a été suggérée sur le seul exemple étudié à ce jour, celui de Sv-TKIR. En effet, ce récepteur est capable de lier Sv-IAG (et l'insuline humaine de façon surprenante) mais faiblement Mr-IAG et pas du tout Cq-IAG, des HA d'espèces pourtant voisines (Aizen et al., 2016). L'affinité des IR pour les autres ILP (ILP1, ILP2) n'a, elle, pas encore été étudiée. Pour sa part, l'IGFBP-rP1 de Décapodes semble avoir une affinité plus large pour les différents ILP, lui permettant de lier l'HA mais également les ILP1 et ILP2 (Chandler et al., 2017b) et peut-être même l'insuline et l'IGF de Vertébrés dans une moindre mesure (Rosen et al., 2013; Huang et al., 2015a). Cette possible incongruence entre les spécificités de l'IGFBP-rP1 et de l'IR est par ailleurs corrélée à des histoires phylogénétiques contrastées. En effet, nous avons constaté que l'IGFBP-rP1 a évolué sous forte sélection négative, aboutissant à une forte conservation de sa structure et une phylogénie du gène calquant celle des espèces, que ce soit à l'échelle des Isopodes ou à l'échelle des Pancrustacés (Chapitre 1). Ce n'est pas le cas des IR de Malacostracés dont nous avons pu mettre en évidence une forte divergence visà-vis des Pancrustacés non-Malacostracés, en plus de la duplication qui semble également spécifique de la classe (Herran et al., 2018). La divergence entre ces IR se constate également sur la variabilité du nombre de domaines FN3 détectable, le nombre et la position des domaines transmembranaires prédits, ainsi que par la variabilité du motif TK pourtant bien conservé chez la plupart des autres animaux (Chapitre 2). Tout ceci nous amène à penser que l'IGFBP-rP1 est un acteur généraliste, à l'évolution contrainte par son interaction avec plusieurs ligands. Au contraire, l'IR semble avoir connu une évolution spécifique, possiblement parallèle à l'évolution de la voie de signalisation à ILP (apparition de l'HA chez les Malacostracés) et renforcée par sa duplication. Cela dit, le patron général apparaît d'ores et déjà plus complexe car il existe d'une part un troisième paralogue d'IR spécifique des Décapodes et d'autre part deux variants d'épissage de l'IR2, spécifiques du genre Armadillidium. L'étude du modèle humain nous révèle par ailleurs qu'une variation (d'épissage) de seulement 12 aa de l'IR suffit à changer significativement son affinité et que les variants présentent des patrons d'expression différents dans l'espace et le temps, probablement sous-jacents à une sous-fonctionnalisation (Belfiore et al., 2017). Ainsi, dans ce modèle, IR-A peut lier l'IGF2, déclenchant la voie de signalisation mitogène de type MAPK/ERK connue pour son implication dans la différenciation sexuelle mâle des Mammifères (Bogani et al., 2009; Pearlman et al., 2010; Warr et al., 2012; Pitetti et al., 2013), tandis que IR-B ne lie que l'insuline et déclenche ainsi la seule voie PI3K/AKT/mTOR qui est responsable des effets métaboliques. Il semblerait de plus que le fonctionnement dans une voie ou l'autre des récepteurs IR avec un même ligand soit dépendant de leur degré d'autophosphorylation, la voie MAPK étant plus difficile à activer (Bedinger et al., 2015). Ce niveau d'autophosphorylation dépendrait, lui, de facteurs comme la concentration en ligand (une forte concentration en insuline pouvant en particulier déclencher la voie MAPK/ERK) (Bedinger and Adams, 2015). Par analogie, il serait donc raisonnable de penser que l'HA, fortement concentrée uniquement chez les mâles, serait suffisante pour induire la différenciation sexuelle mâle via la voie MAPK/ERK, tandis que les autres ILP sont susceptibles de déclencher des effets métaboliques dans les deux sexes, uniquement grâce à la voie PI3K/AKT/mTOR. Ce modèle a l'avantage d'expliquer en outre l'expression de ces récepteurs chez les femelles de Malacostracés. Il est de plus conforme aux expériences indiquant que l'insuline (ici bovine) stimule la vitellogenèse par la voie PI3K/AKT/mTOR (Huang et al., 2017a).

Chez le cloporte, les outils de biologie moléculaire devront être développés pour confirmer les interactions protéiques entre l'HA, l'IGFBP-rP1 et les IR, puis déterminer quelle voie de signalisation est activée au niveau intracellulaire (MAPK/ERK et/ou PI3K/AKT/mTOR). Chez les Décapodes, l'approche utilisant un système de double-hybride chez la levure a ainsi permis de mettre en évidence l'interaction entre l'IGFBP-rP1 et l'HA (Song et al., 2018), ainsi qu'entre l'IR (portion extracellulaire) et l'HA (Guo et al., 2018). Parmi les autres outils susceptibles d'apporter ces réponses figurent la synthèse de protéines recombinantes pour réaliser des co-précipitations (*pull-down*) (Rosen et al., 2013), les réactions-croisées avec des anticorps (*cross reactivity*) (Sharabi et al., 2016), la colocalisation de protéines de fusion fluorescentes (Guo et al., 2018), les tests biologiques de type SRE-LUC en cultures cellulaires (adaptés aux voies de type MAPK) ou encore les tests de phosphorylation *in vitro* pour les IR (Aizen et al., 2016). L'utilisation d'anticorps dirigés contre les phospho-MAPK et contre toutes les MAPK a par ailleurs permis de montrer sur *Western blot* que les HA recombinantes de trois espèces de Décapodes induisent bien la phosphorylation des MAPK1/2 dans les testicules de chacune de ces espèces (Aizen et al., 2016), ce qui est conforme à la hausse de la phosphorylation des peptides de testicules observée *in vitro* sous l'effet d'un extrait de GA (Khalaila et al., 2002) et conforte bien le scénario proposé précédemment. Dans cette dernière approche, nous ne pouvons cependant pas relier la phosphorylation des MAPK1/2 à un des trois IR présents dans leur modèle. Chez *A. vulgare*, nous essaierons dans un premier temps l'approche par double-hybride chez la levure et les analyses de phosphorylation *in vitro* afin de confirmer l'ensemble de ces interactions et le déclenchement de la cascade de réactions intracellulaires.

Enfin, nous avons obtenu des jeux de séquences de tous les acteurs connus de la voie de l'HA (IGFBP-rP1, IR1, IR2) pour une grande variété d'espèces d'Isopodes, dont nous avons établi les phylogénies. Ne connaissant pas encore leurs affinités relatives pour l'HA, nous voudrions continuer à explorer l'aspect évolutif en intégrant ces résultats dans un contexte de coévolution. Pour ce faire, nous allons tout d'abord réaliser les cophylogénies entre l'HA et ses récepteurs. Ce travail devra en particulier être réalisé sur les domaines d'intérêts, impliqués dans l'interaction moléculaire ligand-récepteur. Il permettra de confirmer ou non si l'évolution d'un ou des IR est plus spécifique de l'HA que celle de l'IGFBP-rP1. Une étude similaire sera nécessaire après l'identification de nouveaux ILP dont l'existence a été supposée à plusieurs reprises. Ce travail sera enfin exploité au regard des résultats de greffes hétérospécifiques de GA (Fig. I.5), afin de chercher les sites susceptibles d'expliquer la réussite de la liaison ligand-récepteur. La comparaison avec les prédictions de sites sous sélection naturelle par dN/dS pourra alors être menée.

## III. Des acteurs nécessaires à la différenciation mâle mais non suffisants

Suite à leur identification et l'étude de leur structure, nous avons décrit par RT-PCRq le patron d'expression de tous les acteurs précédemment cités. Parmi ces gènes, Av-IGFBP-rP1 et Av-IR1 se sont avérés être largement exprimés dans tous les organes étudiés des deux sexes, ainsi que chez les intersexués et mâles féminisés (Chapitres 1 et 2). De plus, ils sont tous deux exprimés de

façon constitutive au cours du développement chez les mâles comme les femelles. Un tel patron d'expression suggère que Av-IGFBP-rP1 et Av-IR1 sont deux protéines assez ubiquistes et qu'elles doivent être requises chez le cloporte indépendamment des conditions d'âge ou de sexe. En ce qui concerne l'IGFBP-rP1, ces éléments sont de plus confortés par la forte conservation du transcrit à l'échelle des Isopodes et même des Pancrustacés, ce qui suggère une forte importance biologique de cette protéine (Chapitre 1). Ainsi, nous pouvons envisager que ces protéines présentent plusieurs fonctions associées à différents ligands (HA et autres ILP), les impliquant dès lors dans plusieurs de voies de signalisation (par exemple une voie mitogénique spécifique des mâles et une voie métabolique commune aux deux sexes). Av-IR2 présente au contraire un patron d'expression tissulaire très différent, étant presque spécifique des ovaires chez les femelles et des GA chez les mâles (Chapitre 2). Ces deux organes n'étant *a priori* pas homologues (l'ovaire provient du cordon sexuel primordial et les GA des filaments suspenseurs (Juchault, 1966)), la question de la mise en place de ce patron d'expression au cours du développement se pose. Cependant les approches *in situ* par marquage immunofluorescent sont difficiles à mettre en place sur de si petits animaux. Il serait donc intéressant de masculiniser des femelles adultes par greffe de GA pour voir si l'IR2 cesse de s'exprimer dans les ovaires changés en vésicule séminale (pas d'expression du gène dans ce tissu chez les mâles), les femelles adultes étant par ailleurs incapables de différencier des GA autochtones puisque les territoires sont déjà irréversiblement différenciés en tissu conjonctif (Legrand, 1959a). Nous avons de plus développé des amorces qui permettent de distinguer l'expression des deux isoformes d'Av-IR2 afin d'explorer prochainement des potentielles sous-fonctionnalisations de ce récepteur. Quoiqu'il en soit, ce patron d'expression suggère une implication préférentielle dans la physiologie sexuelle. Néanmoins, ce récepteur est également exprimé de façon constitutive au cours du développement, dans les deux sexes, ce qui permet de poser les mêmes hypothèses de fonctions additionnelles que pour l'IGFBP-rP1 et l'IR1. Là encore, l'utilisation des amorces spécifiques permettra de confirmer ce résultat pour les deux variants d'Av-IR2.

Globalement, aucun des deux récepteurs et du transporteur ne présente de patron d'expression qui puisse suggérer une implication comme modérateur de la différenciation sexuelle. La régulation des fonctions associées à ces protéines passe donc probablement par d'autres molécules, comme par exemple leurs ligands. L'HA en particulier est effectivement exprimée différentiellement entre les sexes et entre les différents stades du développement (Chapitre 3). Son expression dès la naissance, alors que les femelles sont non-masculinisables jusqu'au stade 3 inclus (Suzuki, 1999), suggère néanmoins l'implication d'un acteur supplémentaire dans le bon fonctionnement des récepteurs IR. Différents éléments historiques suggèrent que ce niveau supplémentaire de régulation pourrait correspondre à une ou plusieurs neurosécrétions. En effet, la possibilité de remasculiniser un iM par la seule greffe de protocérébron ou d'un ganglion de chaîne nerveuse (Juchault and Legrand, 1968, 1974), combinée aux observations microscopiques de systèmes nerveux infectés (Martin, 1981), suggère fortement que la bactérie Wolbachia affecte une neurosécrétion régulant d'une certaine façon les récepteurs de l'HA, soit sur leur nombre, soit sur leur affinité pour le ligand ou encore leur capacité de fonctionnement (Juchault and Legrand, 1985). La comparaison des patrons d'expression de l'IGFBP-rP1 et des IR entre une lignée infectée par Wolbachia et une lignée non-infectée n'a révélé aucune différence notable que ce soit au cours du développement ou dans les organes des adultes (Chapitres 1 et 2). Ils sont également exprimés avec au moins la même intensité dans tous les organes d'iM (naturels comme induits). Pour confirmer que ces protéines sont bien traduites conformément aux patrons d'expression obtenues par RT-PCRq, nous avons fait synthétiser deux anticorps, anti-IR1 et anti-IR2 dans le cadre d'un projet interne sélectionné et financé par le laboratoire (projet "MASCARA"). Les résultats préliminaires des analyses d'expression *in situ*, au niveau protéigue, confirment la présence des deux récepteurs dans les gonades mâles d'iM (Fig. D.1). Parallèlement, des protocoles de purification de l'HA sont en cours de mise au point avec nos collaborateurs de l'équipe MDE d'EBI. Le marguage fluorescent de l'hormone purifiée permettra de l'utiliser comme traceur pour identifier précisément ses sites d'action et vérifier la co-localisation avec ses récepteurs. L'approche par in situ permettra de plus d'affiner la résolution des patrons d'expression au sein d'un organe et surtout de les étudier au cours du développement sur des individus de petite taille, au cours de la différenciation sexuelle. Nous espérons par exemple pouvoir déterminer si Av-IR2 s'exprime dans toute la gonade indifférenciée ou préférentiellement dans les filaments suspenseurs ou le cordon initial.

La traduction des ARNm n'étant donc pas altérée par la bactérie, nos résultats permettent d'écarter l'hypothèse expliquant l'état réfractaire à l'HA par l'absence des récepteurs associés. La neurosécrétion ciblée par *Wolbachia* permettrait plutôt le bon fonctionnement des récepteurs en place. Bien que leurs récepteurs ne soient pas formellement identifiés, les neuropeptides agiraient via des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG, ou GPCR en anglais) (Webster et al., 2012), famille de récepteurs connue pour pouvoir former des plateformes de signalisation avec les récepteurs de type TK. Dans ce cas de figure, tel que décrit dans le modèle Mammifères, l'activation d'un RCPG par le neuropeptide potentialiserait ensuite l'activation des IR par leur déglycosylation, autorisant le changement de conformation qui déclenche la cascade de phosphorylations et donc la transduction du signal (Pyne and Pyne, 2011; Abdulkhalek et al., 2013; Alghamdi et al., 2014). Ce modèle est particulièrement parcimonieux car il suffit que *Wolbachia* altère cette neurosécrétion pour dépotentialiser les IR partout dans l'animal, sans avoir à en infecter chaque cellule. De fait, les tissus des individus infectés sont des mosaïques de cellules infectées et non infectées, jusqu'aux ovaires qui sont le vecteur de la transmission verticale de Wolbachia (Genty, 2013; Genty et al., 2014). L'étude in situ de la localisation de Wolbachia au cours d'une transinfection suggère d'ailleurs que les centres nerveux sont infectés bien avant les gonades (Genty, 2013). Ce modèle serait de plus cohérent avec l'observation selon laquelle un ovaire normal implanté dans un iM ne se transforme pas en vésicule séminale malgré la présence d'HA circulante (Juchault and Legrand, 1985). Dans ce cas, l'ovaire, encore non infecté, serait rendu très rapidement réfractaire à l'HA par absence de la neurosécrétion potentialisant ses IR. Un tel neuropeptide nécessaire à la masculinisation, bien qu'encore non identifié, est depuis longtemps évoqué par Juchault et Legrand sous le nom de sécrétion andro-stimulante, qui pourrait correspondre à la GSH (Gonad Stimulating Hormone) (Fingerman, 1995). En effet, la sécrétion de GIH n'est pas la seule à être impactée par l'infection à Wolbachia : les terminaisons axonales des cellules sécrétant la CHH sont aussi vides et des figures de crinophagie (destruction des sécrétions) ont été observées dans les cellules de la chaîne nerveuse qui pourraient correspondre au centre andro-stimulant (Martin, 1981). Ainsi, il est probable que Wolbachia ait un impact plus global sur le système nerveux de son hôte et que la GIH ne soit pas spécifiquement ciblée, d'autant plus que l'absence de ce facteur andro-inhibiteur ne devrait *a priori* pas provoquer de féminisation. Un modèle d'action au cours du développement de la féminisation par Wolbachia est proposé Fig. D.4, comparativement à la différenciation d'un mâle normal (Fig. D.2) et d'une femelle normale (Fig. D.3).

<u>Figure D.1</u> : Détection en immunofluorescence de l'expression protéique d'Av-IR1 (gauche) et Av-IR2 (droite) dans les GA hypertrophiées d'iM. Ces intersexués ont été générés par transinfection et disséqués sept mois après injection de l'extrait contenant la bactérie. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et les IR en rouge (immunomarquage). Échelles : 100 µm. Les glandes présentent de nombreux noyaux, dont la répartition montre que le tissu est organisé sous forme de filaments et d'îlots (mieux visibles à droite). Les îlots sont globuleux et comprennent plusieurs noyaux, qui pourraient appartenir ou non à une même cellule. Des noyaux polylobés et hypertrophiés n'ont pas été observés. Le marquage des deux IR est hétérogène : certaines cellules ne semblent pas l'exprimer ou l'exprimer plus faiblement (mêmes observations chez les mâles normaux, non illustré). Le marquage d'Av-IR2 est globalement beaucoup plus intense que celui d'Av-IR1.





Figure D.2 : Modèle d'implication de la voie de l'HA et des neuropeptides dans la différenciation sexuelle d'un mâle génétique normal. Dès la naissance, l'HA (en magenta) commence à s'exprimer (Chapitre 3), possiblement sous l'action des gènes de la détermination du sexe, notamment ceux à domaine DM dont Dsx et les Dmrt. Les expériences d'ARNi suggèrent en effet qu'ils contrôlent l'expression de l'HA (Yu et al., 2014; Li et al., 2018). Les processus de déterminisme et de différenciation du sexe seraient ainsi directement imbriqués (Chandler et al., 2017a). Le transporteur et les récepteurs de l'HA sont également exprimés dès la naissance (Chapitres 1 et 2). Jusqu'au stade 3, la forte expression de la GIH (en jaune) (Chapitre 3), associée à la faible expression de la GSH, réprimerait néanmoins toute différenciation sexuelle. À partir du stade 4, l'expression de la GIH a baissé, tandis que celle de la GSH (en orange) augmenterait graduellement, autorisant la différenciation des utricules grâce à l'action de l'HA issue des ébauches de GA (modèle de potentialisation). Cette HA des ébauches, localement concentrée, suffirait à induire la différenciation du tissu Sertolien, déclenchant par la suite la migration des gonocytes dans ces utricules en cours de la différenciation (modèle de "conduction") (Juchault, 1966). Sous l'action de leur propre hormone (effet autocrine), les ébauches se différencient ensuite en GA, principalement à partir du stade 6. La GIH, même basse, conserve un rôle de régulateur de la taille de la GA, soit en agissant en duplex avec un IR localisé sur la GA (hypothèse 1 : potentialisation), soit en agissant directement sur la GA, tandis que la production de la GIH par le protocérébron est régulée par un IR1 localisé dans le protocérébron (hypothèse 2). Les illustrations de gonades proviennent de (Suzuki and Yamasaki, 1995).



Figure D.3 : Modèle d'implication de la voie de l'HA et des neuropeptides dans la différenciation sexuelle d'une femelle génétique normale. Du fait de leur génotype femelle, l'HA ne s'exprimerait pas dans les filaments suspenseurs de la gonade indifférenciée. Le transporteur et les récepteurs de l'HA sont néanmoins exprimés dès la naissance (Chapitres 1 et 2). Jusqu'au stade 3, la forte expression de la GIH (Chapitre 3), associée à la faible expression de la GSH, réprimerait toute différenciation sexuelle. L'état réfractaire à la masculinisation des jeunes femelles, total jusqu'au stade 3 et encore très marqué au stade 4 (Suzuki, 1999), suggère que les IR sont encore noncompétents à ces stades, possiblement à cause d'un retard dans l'expression de la GSH (modèle de potentialisation). Aux stades suivants, l'absence d'HA, associée à la baisse de l'expression de la GIH et la hausse de celle de la GSH, induirait la différenciation femelle. En particulier, l'absence de voie de signalisation associée à l'IR2 autoriserait l'expression d'un inducteur femelle et donc la différenciation d'un oviducte (Chapitre 2). À partir du stade 5, les niveaux de GSH et de GIH seraient similaires à ceux d'un mâle, expliquant qu'un greffon de GA ne s'hypertrophie pas (sous le contrôle de la GIH de la femelle) et que la femelle soit masculinisable par greffe de GA (via l'HA du greffon et la GSH de la femelle) (Legrand and Juchault, 1972). La réversion totale en mâle est conditionnée par la possibilité de différencier les ébauches de GA autochtone, qui s'orientent définitivement en tissu mésenchymateux au stade 8 ou 9 (Suzuki and Yamasaki, 1997; Suzuki, 1999). Les illustrations de gonades proviennent de (Suzuki and Yamasaki, 1995).



Figure D.4 : Modèle d'implication de la voie de l'HA et des neuropeptides dans la différenciation sexuelle d'un mâle génétique infecté par *Wolbachia*. Jusqu'au stade 3, la forte expression de la GIH (Chapitre 3), associée à la faible expression de la GSH, réprimerait toute différenciation sexuelle. À partir du stade 4, l'expression de la GIH a baissé mais *Wolbachia* (en vert dans le système nerveux) réprimerait celle de la GSH (Martin, 1981), rendant ainsi les récepteurs IR non compétents à la transduction du signal de l'HA (en magenta) (Juchault and Legrand, 1985), qui est pourtant produite par les ébauches de GA (Chapitre 3). En conséquence, la différenciation des utricules n'a pas lieu et les ébauches de GA n'évoluent pas en véritables en GA. L'absence de voie de signalisation associée à l'IR2 autoriserait l'expression d'un inducteur femelle et la différenciation d'un oviducte (Chapitre 2). Les rares cas d'intersexués correspondraient à des cas où la GSH n'était pas suffisamment réprimée, ou pas assez rapidement, pour empêcher la différenciation de tout (iM) ou partie (iF) des GA. Chez les iM, l'absence de GIH neutraliserait les voies de rétrocontrôle de la taille des GA (flèches jaunes), qui s'hypertrophient. Les illustrations de gonades proviennent de (Suzuki and Yamasaki, 1995).

## IV. <u>L'approche par ARNi...</u>

#### 1. Pour comprendre le rôle de ces nouveaux acteurs

L'approche par ARNi s'est avérée efficace chez A. vulgare sur tous les acteurs testés à l'exception de la GIH. Toutefois, les mesures de RT-PCRq avant été réalisées sur animaux entiers, nous étions à la limite de la résolution concernant l'expression de ce gène a priori spécifique de seulement quatre cellules du protocérébron (Azzouna et al., 2003). Il faudra donc réessayer l'inhibition de l'expression de ce gène en la mesurant sur des échantillons de têtes afin de dépasser ce seuil de sensibilité. Si encore aucune inhibition n'est observée, nous chercherons à adapter le protocole comme nous avons pu le faire avec l'IR2. L'inhibition de l'expression de neuropeptides tels que la CHH (Lugo et al., 2006), la MIH (Tiu and Chan, 2007) et la GIH (Treerattrakool et al., 2008, 2011; F. Li et al., 2015b), réalisée avec succès chez les Décapodes, montre que cette approche est possible pour cette famille de gènes. Dans notre modèle, une unique injection d'ARNdb d'HA chez un mâle adulte suffit à inhiber durablement l'expression du gène et à provoquer l'apparition en quelques semaines de l'hypertrophie des GA ainsi que la différenciation d'ouvertures génitales femelles (Chapitre 3). Lors de l'inhibition de l'IGFBP-rP1 chez des mâles équivalents, nous avons montré une hausse significative de l'expression de l'HA à l'échelle de l'organisme, parfois associée à une légère hypertrophie des GA (Chapitre 2). L'effet est encore plus marqué lors de l'inhibition de Av-IR1, qui provoque également une hausse de l'expression de l'HA mais de fortes hypertrophies des GA (Chapitre 3). Enfin, l'inhibition de Av-IR2 n'a pas affecté les GA mais semble provoquer la différenciation d'ouvertures génitales femelles (Chapitre 3). La similitude des effets de l'ARNi dans ces conditions nous conforte donc dans l'idée d'une implication de l'IGFBP-rP1 et des IR dans la voie de signalisation de l'HA et donc dans le maintien du phénotype sexuel mâle d'A. vulgare (Table D.1). Cependant leurs rôles diffèrent manifestement les uns des autres. En particulier, l'IR2 ne semble pas du tout impliqué dans le développement de la GA alors qu'il s'agit de son site d'expression. Les effets des deux récepteurs IR ne semblent donc pas simplement additifs. Que leurs fonctions diffèrent n'est cela dit pas très étonnant étant donné leur divergence protéique et leurs différents patrons d'expression. Pour comparaison, il existe deux gènes de l'IR chez la plupart des insectes, en particulier chez N. lugens où il a été montré que InR1 et InR2 ont des effets totalement antagonistes sur la voie de signalisation PI3K-AKT (Xu et al., 2015). Plus marquant encore, il existe chez la drosophile (Fernandez et al., 1995) et chez l'Homme (Westermeier et al., 2016) deux isoformes de l'IR, pourtant issues d'un même gène, mais susceptibles d'activer les voies de signalisation intracellulaires de façon différente.

		AGH	IGFBP-rP1	IR1	IR2	GIH	AG	OG
<b>AGHi</b> (gonade/entier)	<b>1</b> s	/	ns / ns	ns / ns	ns	x / ns	norm.	0 (/4)
	4s	- /	ns / ns	- / ns	ns	x / +	d.h.	<b>2</b> (/4)
	12s	/	++ / ns	ns / ns	++	x / ns	hyp.	<b>2</b> (/4)
	24s	ns / -	ns / ns	ns / ns	++	x/-	hyp.	<b>2</b> (/4)
<b>IGFBPi</b> (animal entier)	<b>1</b> s	ns		ns	ns	ns	norm.	0 (/4)
	4s	+		ns	ns	ns	d.h.	0 (/4)
	12s	++		ns	ns	-	norm.	0 (/4)
	24s	+		ns	ns	ns	norm.	0 (/4)
<b>IR1i</b> (gonade/entier)	<b>1</b> s	ns / ++	ns / +	/	ns / ns	x / ns	norm.	0 (/16)
	4s	++/+++	ns / ns	/	<b>++</b> / (+)	x / +	d.h hyp.	0 (/16)
	12s	++/++	ns / ns	- / ns	++ / ns	x / ns	hyp.	1?(/22)
	24s	x / ++	x / ns	x/-	x / ns	x / ns	norm.	0 (/4)
<b>IR2i</b> (gonade)	<b>1</b> s	ns	+	ns		$\setminus$	norm.	0 (/12)
	4s	ns	ns	ns			norm.	0 (/12)
	12s	ns	ns	ns	-		norm.	<b>4</b> (/18)
<b>IR1i + IR2i</b> (gonade)	<b>1</b> s	ns	++			$\land$	norm.	0 (/12)
	4s	++	ns		ns		d.h.	0 (/12)
	12s	+	ns	ns	ns	$\bigvee$	hyp.	0 (/18)
<b>Wolbachia</b> (gonade/entier)	<b>1</b> s	- / ns	ns / ns	ns / ns	ns / ns	x/ns	norm.	0 (/4)
	4s	/ ns	ns / ns	ns / ns	ns / ns	x / ns	d.h.	0 (/4)
	12s	+ / ns	ns / ns	ns / ns	ns / ns	x / ns	hyp.	<b>4</b> (/4)
	24s	++/++	+ / ns	+ / ns	++ / (+)	x/ns	hyp.	<b>4</b> (/4)

<u>Table D.1</u> : Bilan des expériences d'inhibition par ARNi et de transinfection par *Wolbachia*. Les surexpressions de gènes sont indiquées par des "+" rouges, les sous-expressions par des "-" bleus. Les résultats non significatifs sont indiqués par "ns". Le phénotype des GA est normal (norm.), en début d'hypertrophie (d.h.) ou en nette hypertrophie (hyp.). Le nombre d'ouvertures génitales femelles (OG) est enfin reporté.

Les hypertrophies observées lors de l'inhibition de Av-IGFBP-rP1 et de Av-IR1 sont associées à une hausse de l'expression de l'HA et nous indiquent qu'ils sont impliqués dans le rétrocontrôle de la taille des GA. Cette réaction d'hypertrophie est interprétée comme une surcompensation de l'organisme pour produire de l'HA (Ventura et al., 2009). Des interprétations similaires ont d'ailleurs été proposées dans le modèle Mammifère dans le contexte du métabolisme à l'insuline. En effet, l'inhibition (par KO conditionnel) de l'IR dans le foie provoque une hyperinsulinémie associée à une hypertrophie des îlots β du pancréas, producteurs de l'insuline (Michael et al., 2000; Escribano et al., 2009). Lors de l'inhibition d'Av-IGFBP-rP1 (Chapitre 1), cette réaction de compensation nous indique que Av-IGFBP-rP1 agirait, non pas en séquestrant l'HA, mais en ayant au contraire un effet positif sur l'HA, la protégeant de la dégradation ou la rendant plus disponible ou efficace. Toutefois, il est à noter que l'inhibition de l'IGFBP-rP1, réalisée sur un seul modèle de Décapodes, a abouti au résultat contraire, c'est-à-dire une baisse de l'expression de l'HA (le phénotype des GA n'étant pas indiqué) (F. Li et al., 2015a). L'effet de l'inhibition de l'IR1 sur l'expression de l'HA est par contre convergent entre A. vulgare et *M. rosenbergii* (Sharabi et al., 2016). Concernant l'origine du rétrocontrôle, il peut être envisagé par fixation de l'HA sur Av-IR1, soit directement au niveau de la gonade, soit au niveau du protocérébron après le transport de l'hormone, où elle activerait la production ou la libération de la GIH (Fig. I.11). Av-IR1 est en effet bien exprimé dans ces deux organes (récapitulé Fig. D.5). Chez les Mammifères, l'IR est d'ailleurs également exprimé dans le cerveau, où il assurerait diverses fonctions dont la régulation de la reproduction, via l'hypothalamus notamment (Belfiore et al., 2017). Nous possédons déjà toutes les têtes des animaux de la dernière série expérimentale sur ARNi de Av-IR1, Av-IR2 et Av-IR1+IR2. Les analyses par RT-PCRq seront prochainement menées sur ces échantillons afin de vérifier si l'expression de la GIH est réellement dérégulée. Bien que le patron d'expression d'Av-IR2 suggère aussi une implication dans un rétrocontrôle autocrine, son rôle reste encore à élucider. En particulier, sa surexpression lors de l'ARNi de Av-IR1 est délicate à interpréter en tant que rétrocontrôle car Av-IR2 est spécifique de la GA et cette hausse pourrait donc être uniquement le reflet mécanique de l'augmentation du nombre de cellules des GA (Fig. D.6). Néanmoins, l'apparition d'ouvertures génitales femelles qui résulte de l'extinction d'Av-IR2 suggère bien une implication dans la différenciation des gonades. Il n'est pas à exclure que son action soit particulièrement marquée au cours du développement, à l'instar de l'isoforme IR-A chez l'Homme (Belfiore et al., 2017). Av-IR2 pourrait par exemple réprimer l'expression ou l'action d'un inducteur sexuel femelle supposé responsable notamment de la différenciation du filament suspenseur th5 en oviducte (Juchault and Legrand, 1964c).



<u>Figure D.5</u> : Modèle représentant l'HA dans son nouveau contexte au sein de la voie de signalisation des ILP. L'HA (en magenta) est exprimée par les GA (Chapitre 3), transportée par l'IGFBP-rP1 (Chapitre 1) jusqu'aux récepteurs transmembranaires de type IR (Chapitre 2). Le récepteur IR1 est susceptible d'être impliqué dans une ou deux boucles de rétrocontrôle de la taille des GA (Chapitre 2). La petite boucle correspond à un contrôle par l'HA de type autocrine. La grande boucle implique le protocérébron, où la voie de signalisation de l'HA pourrait provoquer la production ou la libération de la GIH. Un autre neuropeptide, produit par le protocérébron ainsi que la chaîne nerveuse, la GSH, pourrait être responsable de l'état de compétence des IR à l'HA (Juchault and Legrand, 1985). Ce mécanisme de potentialisation n'est représenté qu'une fois sur le schéma, mais serait généralisable à tous les IR.



<u>Figure D.6</u> : Méthode d'interprétation des hausses d'expression dans le cadre de RT-PCRq relative. Pour un gène exprimé de façon homogène au sein de l'organisme (ici IR1 pour l'exemple), l'utilisation d'individus entiers ou d'organes donnera des résultats identiques. Dans l'exemple d'un gène spécifique d'un organe (ici l'HA dans la GA, cas transposable à l'IR2), il apparaît qu'une hausse relative d'expression peut-être mesurée en cas d'hyperplasie de cet organe, s'il n'est pas prélevé seul (animal entier ou utricule+GA), indépendamment de toute hausse d'expression au sein de chaque cellule. Cet effet n'exclut cependant pas une hausse réelle de l'expression cellulaire du gène, ce qui se confirme par analyse sur l'organe prélevé seul (comme en Fig. 2.12 et Fig. 3.1 dans les GA hypertrophiées d'iM).

Pour explorer la fonction de nos nouveaux acteurs de la voie de signalisation de l'HA, nous allons reproduire leur extinction chez des mâles adultes avant préalablement subi une ablation d'une partie des péréiopodes et des appendices copulateurs (sur une moitié de l'animal, l'autre moitié pouvant servir de contrôle). Dans un mâle normal, on assiste normalement à la régénération des péréiopodes et des appendices sous forme mâle. Cette même expérience avec l'ARNi permettra d'établir si un de nos IR est responsable de la différenciation des caractères sexuels secondaires. Chez les Décapodes, il est déjà connu que l'extinction de l'HA provoque un fort retard de la régénération de l'appendix masculina (Ventura et al., 2009) alors que l'extinction de l'IR1 au cours du développement provoque au contraire sa différenciation anticipée (Sharabi et al., 2016). Cette observation peut paraître surprenante car elle semble suggérer que l'IR1, censé médier la masculinisation, agit au contraire à son encontre en la retardant. Cependant, il est également connu chez les Isopodes comme les Décapodes que l'ablation du protocérébron de jeunes mâles entraîne également la différenciation anticipée de cet appendice (Juchault et al., 1965; Reidenbach, 1966; Demeusy, 1967; Juchault, 1977). C'est donc en fait la GIH qui est impliquée dans la temporisation de la réalisation du phénotype mâle : on peut concevoir que l'extinction de l'IR1, impliqué dans le rétrocontrôle de l'expression de la GIH, revient à réguler négativement l'expression ou la libération de la GIH, ce qui permet la différenciation sexuelle anticipée.

Enfin, pour confirmer de façon encore différente l'implication des IR dans la voie de signalisation de l'HA chez A. vulgare, nous envisageons une expérience réutilisant l'ARNi mais sur des femelles. Si l'inhibition est aussi efficace que chez les mâles, on peut s'attendre à ce qu'un ovaire ayant subi l'extinction de Av-IR1 et/ou Av-IR2 devienne réfractaire à la masculinisation. Deux approches sont ensuite possibles pour vérifier cela. Après ARNi, la masculinisation des ovaires peut être obtenue soit en greffant une GA dans la femelle (ce qui aboutit normalement à sa transformation en vésicule séminale avec canal déférent et appendices copulateurs, ainsi que l'apparition des brosses de soies sur les péréiopodes 1 à 6 (Legrand, 1954a, 1956c, 1959a, 1964)), soit en greffant quelques jours plus tard l'ovaire dans un mâle adulte (ce qui aboutit normalement à la dégénérescence totale des ovocytes et sa transformation en vésicule séminale atypique (Legrand, 1954d; Katakura, 1961)). Ces deux approches nous permettront ainsi de clarifier l'implication des IR dans le processus même de la différenciation sexuelle d'une gonade et des caractères sexuels secondaires. Elles sont d'autant plus pertinentes que technologiquement, nous ne maîtrisons pas pour l'instant les techniques d'injection d'ARNi sur les individus indifférenciés, de trop petite taille. L'utilisation de l'espèce modèle H. brevicornis, dont les filaments suspenseurs gardent une compétence plus durable (Legrand, 1964), permettrait en théorie d'injecter des animaux moins jeunes afin de résoudre le problème. Toujours dans l'objectif de contourner ce verrou technologique,
nous avons également lancé une expérience pilote permettant de tester la transmission verticale de l'inhibition par ARNi, dont l'effet semble durer au moins trois à six mois pour les quatre gènes étudiés jusqu'à présent. Nous avons commencé par injecter des femelles avec de l'ARNdb d'HA et les avons mises en croisement afin de vérifier si l'inhibition du gène peut se transmettre à leur descendance et affecter leur différenciation sexuelle dès les premiers stades du développement. Les portées actuellement en cours d'obtention seront sexées dès que l'âge des juvéniles le permettra.

#### 2. Pour essayer de phénocopier Wolbachia

Le phénotype des GA lors de l'inhibition de Av-IGFBP-rP1 et Av-IR1, ainsi que l'apparition d'ouvertures génitales femelles lors de l'inhibition de Av-IR2, sont par ailleurs caractéristiques d'une démasculinisation partielle, semblable à celle des individus intersexués à *Wolbachia* de type iM (Legrand and Juchault, 1963). Ces protéines sont donc bien des candidats potentiels comme cibles de *Wolbachia* (probablement indirectes, selon le modèle avec neurosécrétions). Contrairement à l'action de *Wolbachia* qui est durable, l'effet de l'ARNi lors d'une injection unique commence en général à s'estomper après six mois. Une injection répétée d'ARNdb permettrait probablement de faire durer la démasculinisation encore plus longtemps. Pour confirmer que nous opérons bien une féminisation partielle des mâles par ARNi sur Av-IGFBP-rP1 et sur les IR, nous avons aussi pour projet d'étudier l'expression de la vitellogénine (VTG), afin d'utiliser ce gène comme marqueur supplémentaire de la féminisation. Il est en effet connu au niveau protéique que les mâles castrés (Suzuki et al., 1990) et les iM à *Wolbachia* produisent la VTG alors que l'HA inhibe sa synthèse (Souty-Grosset and Juchault, 1987). Il sera aussi intéressant d'étudier la cinétique d'expression du gène lors de la transinfection avec *Wolbachia* pour la comparer à celles issues d'expériences d'ARNi.

Chez les iM infectés, l'hypertrophie des GA correspond à la fois à une prolifération cellulaire (hyperplasie) et une croissance cellulaire accrue (hypertrophie), souvent accompagnée de noyaux plurilobés (Malo, 1969). La même association des phénomènes d'hyperplasie et hypertrophie cellulaire a été observée chez les Décapodes lors de l'inhibition de l'HA (Ventura et al., 2009; Rosen et al., 2010) et de Mr-IR (un IR1) (Sharabi et al., 2016). Pour confirmer que nous avons cette même dualité d'effets, la série expérimentale d'ARNi portant sur Av-IR1, Av-IR2 et Av-IR1+Av-IR2 va être complétée par l'observation en microscopie optique et électronique des GA dans chaque condition. Pour vérifier la similarité des GA avec celles dont l'hypertrophie est causée par *Wolbachia*, nous avons complété ces échantillons par des GA d'intersexués de type iM induits expérimentalement, à différents stades d'infection (trois, huit et 30 mois), ainsi que des GA

hypertrophiées par ARNi sur l'HA. Les travaux historiques du laboratoire nous permettront par ailleurs de comparer l'ultrastructure de ces GA hypertrophiées avec celles provoquées par destruction du protocérébron (Legrand et al., 1968; Malo, 1969, 1970b), en particulier au regard de la taille des cellules et des noyaux. La comparaison avec des GA normales sera également facilitée par l'existence de descriptions détaillées déjà publiées, chez *A. vulgare* et deux espèces voisines (*O. asellus* et *P. scaber*) (Malo, 1970a; Radu and Craciun, 1976; Negishi et al., 2001). Nous pouvons déjà prédire que l'ultrastructure des glandes hypertrophiées par *Wolbachia* ou suivant l'inhibition par ARNi de l'HA devrait présenter des patrons différents : on sait que la glande des iM produit l'hormone en grandes quantités (l'HA a ainsi été purifiée à partir de telles glandes (Martin et al., 1990)), alors que l'inhibition de l'HA par ARNi devrait aboutir à une suppression de la sécrétion. Par comparaison, le patron d'ultrastructure lors de l'inhibition d'IR1 devrait ressembler à celui des iM puisque nous observons une sur-expression de l'HA dans les deux cas. Les conséquences de l'ensemble des différentes perturbations de la voie de l'HA, réalisées au cours de cette thèse et dans la littérature, sur le modèle présenté précédemment sont illustrées Fig. D.7.

Figure D.7 : Effets de différents types de perturbations sur le modèle intégrant l'HA, ses récepteurs et les neuropeptides. (A.) L'inhibition par ARNi de l'HA bloque les deux boucles possibles de rétrocontrôle des GA, menant à leur hypertrophie (Chapitres 1 et 3). (B.) L'ablation du protocérébron empêche la grande boucle mais doit aussi altérer la petite boucle, car les GA s'hypertrophient également (Juchault et al., 1965). (C.) L'inhibition par ARNi de l'IGFBP-rP1 pourrait limiter le transport de l'HA jusqu'au protocérébron mais impacter moins le rétrocontrôle autocrine, expliquant les plus faibles hypertrophies (Chapitre 1). (D.) L'inhibition par ARNi de l'IR1 provoque de fortes hypertrophies des GA, par rupture d'une et/ou l'autre de leurs boucles de rétrocontrôle (Chapitre 2). (E.) L'inhibition par ARNi de l'IR2 ne provoque pas d'altération des boucles contrôlant la croissance des GA mais peut déclencher la différenciation d'ouvertures génitales femelles (Chapitre 2). (F.) La transinfection avec *Wolbachia* n'empêche pas l'expression des récepteurs de l'HA mais induit néanmoins une forte hypertrophie des GA. Les récepteurs seraient non compétents par manque de neurosécrétions androstimulantes (GSH), dégradées au niveau des cellules du système nerveux central par crinophagie.



## V. Un nouveau contexte de la différenciation déjà à élargir

Au cours de cette thèse, nous nous sommes efforcés de décrire trois nouveaux acteurs de la voie de signalisation de l'HA chez les Isopodes. Cependant les études sur le sujet dans d'autres modèles, de Décapodes notamment, révèlent assez clairement que ces acteurs ne sont pas les seuls à prendre en considération. Dans cette partie, nous présentons plusieurs molécules d'intérêt que nous envisageons de rechercher ultérieurement *in silico* dans nos transcriptomes d'Isopodes et nos transcriptomes d'*A. vulgare* au cours du développement. Grâce à ces derniers, nous chercherons en particulier les possibles expressions différentielles des gènes candidats au cours de la différenciation et selon le sexe. Les plus intéressants pourront faire l'objet d'analyse d'expression par RT-PCRq avec le matériel déjà disponible (issus de tissus, des larves et juvéniles d'*A. vulgare* mais aussi des expériences d'ARNi et de transinfection).

#### 1. La famille des ILP et récepteurs associés

La voie de signalisation de type insuline, incluant l'HA, implique de nombreuses molécules. Une partie de celles-ci sont des membres de la famille des ILP, retrouvés chez de nombreuses espèces de Crustacés grâce aux données acquises par les NGS : des IRP (Insulin-Related Peptides) trouvés dans le génome de la daphnie (Dircksen et al., 2011), un précurseur d'ILP de Triops (Christie et al., 2018b), un à quatre précurseurs d'ILP chez des Copépodes (Christie, 2014; Christie et al., 2016), l'ILP1 et l'ILP2 décrits chez deux Décapodes (Chandler et al., 2017b) et une "insuline" identifiée informatiquement chez plusieurs espèces du même ordre (Veenstra, 2015, 2016). Les recherches actuelles n'ont pas encore permis d'identifier ce type d'ILP chez les Amphipodes ou les Isopodes (Christie, 2017; Christie et al., 2018a). Nous sommes actuellement en train de rechercher de nouveaux ILP candidats dans nos transcriptomes sur la base du motif cystéine bien conservé dans cette famille. Du côté des protéines de liaison, il est maintenant connu que la superfamille des IGFBP inclut également une diversité de SIBD (Single Insulin-like Binding Domain) qui seraient impliqués chez différents Décapodes dans la réponse immunitaire (Castellanos et al., 2008; Gai et al., 2010) et dans le métabolisme (Huang et al., 2015b). Les protéines de type insuline et leurs protéines de liaisons semblent donc impliquées dans différentes fonctions. L'HA est d'ailleurs ellemême supposée avoir des fonctions liées au métabolisme dans l'hépatopancréas (Chung, 2014) et son expression a parfois même été rapportée dans des ovaires (Chung, 2014; Huang et al., 2014, 2017b). Dans ces exemples, les fonctions additionnelles semblent liées à de nouvelles séquences

d'HA (une hépatopancréatique et une ovarienne), *a priori* inexistantes chez les Isopodes, à l'exception peut-être de *Porcellio gallicus* qui présente deux formes de l'HA (Cerveau et al., 2014). L'exploration de ces nouvelles molécules pourrait nous éloigner de la thématique de la différenciation sexuelle mais semble nécessaire pour clarifier la détection des IGFBP-rP1 et IR chez les deux sexes, ou encore découvrir de nouvelles molécules bifonctionnelles (sexe et métabolisme, sexe et immunité...). Enfin, la voie de signalisation des ILP inclut une diversité de protéines canoniques associées aux récepteurs TK, appartenant principalement à deux cascades intracellulaires : la voie MAPK/ERK et la voie PI3K/AKT/mTOR. Ces protéines pourraient représenter d'autres acteurs de la cascade de différenciation : leur expression sera également prochainement étudiée grâce aux transcriptomes générés à différents stades du développement.

Par ailleurs, il faut aussi considérer que les récepteurs canoniques des ILP appartiennent à deux familles : les récepteurs tyrosine kinase (TK) et les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Gontijo and Garelli, 2018) (Fig. D.8). Associées à cette dernière voie sont retrouvées des protéines telles la protéine G, les adenvlyl et guanylyl cyclases et la PKA. Deux candidats appartenant aux RCPG ont été identifiés récemment par BLAST sur des banques de reads publiques (SRA) (Veenstra, 2016). Ils semblent similaires aux récepteurs RXFP1 et RXFP2 des Vertébrés et aux récepteurs de type C1 de *D. melanogaster*, LGR3 et LGR4. Chez cette dernière, LGR3 et son ligand, DILP8, sont impliqués dans la régulation de la croissance (Colombani et al., 2015; Garelli et al., 2015; Jaszczak et al., 2016; Gontijo and Garelli, 2018). De façon notable, l'expression de LGR3 est régulée de façon spécifique du sexe (Meissner et al., 2016). Veenstra (2016) a fait l'hypothèse que l'HA et DILP8 seraient orthologues. Selon l'auteur, il serait clair que les DILP1-6 agissent via les récepteurs TK (ce qui est actuellement démontré pour DILP5 uniquement), tandis que DILP7 agirait via LGR4 car la présence de l'un est corrélée à la présence de l'autre dans les génomes actuellement disponibles. Par élimination, il en déduit ainsi que le RCPG restant, LGR3, est le récepteur de l'HA et donc par implication que l'HA est l'orthologue de DILP8 car ils partageraient le même récepteur. Malheureusement, ces conclusions ne s'appuient sur aucune donnée fonctionnelle relative à ces RCPG de Crustacés (LGR3 comme LGR4). Ainsi, nous estimons que rien ne permet actuellement de corroborer sérieusement cette suite d'hypothèses. Ce raisonnement semble d'autant plus compliqué à tenir qu'il est maintenant établi qu'il existe de nombreuses interférences croisées des cascades de signalisation (crosstalks) associées aux récepteurs TK et aux récepteurs RCPG (Natarajan and Berk, 2006). Il apparaît qu'en réalité les RCPG peuvent interagir de différentes façons avec des récepteurs TK, directement ou indirectement, en amont ou en aval. Le cloisonnement des voies de signalisation ne correspond potentiellement pas aux mécanismes moléculaires réels. L'HA ne s'inscrit peut-être pas dans une voie unique et descendante mais plutôt dans un réseau de voies impliquant différentes molécules dont une partie sont en interaction. Chaque cellule réalise ensuite l'intégration de l'ensemble des signaux perçus.



<u>Figure D.8</u> : Bilan des interactions entre les membres de la super-famille des ILP et leurs récepteurs. Les ILP sont susceptibles de se lier à des récepteurs de type TK (InR, IGF-R, d-InR) et des récepteurs couplés aux protéines G (RXFP1-4, Lgr3-4). Les interactions avec les ILP en gras ne sont pas confirmées expérimentalement à ce jour. Figure tirée de (Gontijo and Garelli, 2018).

### 2. Les neuropeptides et récepteurs associés

Différentes études ont montré que les neuropeptides sont impliqués dans la régulation de la physiologie sexuelle (Legrand et al., 1982). Le cas le plus documenté est bien sûr celui de la GIH qui contrôle négativement la croissance de la GA chez les mâles. Il a de plus été montré par ARNi que la GIH et la MIH régulent toutes deux négativement l'expression de l'HA au sein de la GA (indépendamment de la taille de la GA) (F. Li et al., 2015b). Les MIH de type 2, exprimées aussi bien dans le cerveau que dans la chaîne nerveuse, réguleraient aussi la maturation des gonades et

ont parfois été considérées comme des GSF (Nakatsuji et al., 2009). Les fonctions exactes des neuropeptides de Crustacés restent encore mal connues mais ces études mettent bien en évidence qu'ils sont susceptibles d'assurer plusieurs rôles, formant un système probablement pléiotrope et redondant (Chung et al., 2010). Concernant *A. vulgare*, il semble crucial d'identifier la ou les GSH. Une première approche sera d'établir le neuropeptidome de l'espèce puis de chercher quelles neurohormones sont susceptibles d'être différentiellement exprimées dans les banques au cours du développement. Dans l'hypothèse où *Wolbachia* agit en aval de sa transcription, la comparaison entre la lignée infectée et non-infectée ne devrait pas aider à l'identification de cette GSH. Par contre l'inhibition par ARNi des différents neuropeptides devrait permettre de distinguer ceux indispensables au fonctionnement des récepteurs de l'HA.

De façon intéressante, il est supposé que les récepteurs des neuropeptides de la superfamille CHH (incluant la CHH mais aussi la MIH, la MOIH et la GIH) aient, comme certains ILP, des RCPG pour récepteurs, car les voies de signalisation qui leur semblent associées impliquent des cGMP ou des cAMP (Webster et al., 2012). Cependant, un seul récepteur de neuropeptide a pu être caractérisé pharmacologiquement : il s'agit de Dappu-RPCHR, le récepteur de l'hormone de concentration des pigments rouges (RPCH, de la famille des neuropeptides de type AKH) (Marco et al., 2017). Les récepteurs des CHH seront néanmoins probablement décrits prochainement, d'autant plus que plusieurs candidats ont déjà été identifiés *in silico* (Buckley et al., 2016; Bao et al., 2018).

Enfin, une dernière catégorie de récepteurs, récemment découverte, pourrait présenter un intérêt particulier pour l'étude de la différenciation sexuelle. Il s'agit des récepteurs de type Venus Kinase (VKR). Ces récepteurs, maintenant découverts chez de nombreux invertébrés, sont intéressants car ils présentent un domaine de liaison extracellulaire de type Venus FlyTrap caractéristique des RCPG de classe C et un domaine intracellulaire TK, typique des IR (Vicogne et al., 2003; Vanderstraete et al., 2013; Dissous et al., 2014). Ces récepteurs n'ont encore été étudiés que dans peu de modèles mais ils sont capables de lier des acides aminés (L-Arginine notamment), un neuropeptide de type neuroparsine, appelé l'OEH (*Ovary Ecdysteroidogenic Hormone*), et semblent impliqués dans la production l'ecdystéroïdes et dans l'ovogenèse (Dissous, 2015; Vogel et al., 2015; Lenaerts et al., 2017). De façon intéressante, la liaison de leur ligand induit également la dimérisation du récepteur et active les deux voies MAPK and PI3K/AKT dont nous avons précédemment discuté (Vanderstraete et al., 2014; Vogel et al., 2015). Nos prospections ont d'ores et déjà montré l'existence chez *A. vulgare* de deux gènes de ce récepteur, Av-VKR1 et Av-VKR2, à l'instar de *Schistosoma mansoni* (Gouignard et al., 2012).

# **Références**

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinforma. Oxf. Engl. 21, 2104–2105. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti263
- Abdulkhalek, S., Hrynyk, M., Szewczuk, M.R., 2013. A novel G-protein-coupled receptor-signaling platform and its targeted translation in human disease. Res. Rep. Biochem. 2013, 17–30.
- Ables, E.T., Drummond-Barbosa, D., 2010. The steroid hormone ecdysone functions with intrinsic chromatin remodeling factors to control female germline stem cells in *Drosophila*. Cell Stem Cell 7, 581–592.
- Adams, M.J., Blundell, T.L., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Vijayan, M., Baker, E.N., Harding, M.M., Hodgkin, D.C., Rimmer, B., Sheat, S., 1969. Structure of rhombohedral 2 zinc insulin crystals. Nature 224, 491. https://doi.org/10.1038/224491a0
- Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G., 1970. Endocrine control of reproduction in decapod Crustacea. Biol. Rev. 45, 121–164. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1970.tb01627.x
- Aflalo, E.D., Hoang, T.T.T., Nguyen, V.H., Lam, Q., Nguyen, D.M., Trinh, Q.S., Raviv, S., Sagi, A., 2006. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 256, 468–478. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.035
- Aflalo, E.D., Sagi, A., 2014. Sustainable aquaculture biotechnology using temporal RNA interference in crustaceans: the case of the Insulin-like androgenic gland hormone and prawn monosex culture. Anim. Biotechnol. 319–331.
- Ahyong, S.T., Lowry, J.K., Alonso, M., Bamber, R.N., Boxshall, G.A., Castro, P., Gerken, S., Karaman, G.S., Goy, J.W., Jones, D.S., 2011. Subphylum Crustacea Brünnich, 1772. Zootaxa 3148, 165–191.
- Aizen, J., Chandler, J.C., Fitzgibbon, Q.P., Sagi, A., Battaglene, S.C., Elizur, A., Ventura, T., 2016. Production of recombinant insulin-like androgenic gland hormones from three decapod species: In vitro testicular phosphorylation and activation of a newly identified tyrosine kinase receptor from the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*. Gen. Comp. Endocrinol. 229, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02.013
- Alghamdi, F., Guo, M., Abdulkhalek, S., Crawford, N., Amith, S.R., Szewczuk, M.R., 2014. A novel insulin receptor-signaling platform and its link to insulin resistance and type 2 diabetes. Cell. Signal. 26, 1355–1368.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Andersen, H.R., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O., 1999. A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 56–61. https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1800
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. Syst. Biol. 55, 539–552. https://doi.org/10.1080/10635150600755453
- Antonova, Y., Arik, A.J., Moore, W., Riehle, M.A., Brown, M.R., 2012. Insulin-like Peptides: structure, signaling, and function, in: Insect Endocrinology. Elsevier, pp. 63–92. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10002-0
- Aschberger, K., Munn, S., Olsson, H., Institute for Health and Consumer Protection, 2010. Updated European Union risk assessment report: 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol-A

- Augustinos, A.A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A.F., Borges, P.A., 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? PloS One 6, e28695.
- Azzouna, A., Philippe, M., Jarry, T., Grève, P., Martin, G., 2003. Localization of crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in separate cell types in the protocerebrum of the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). Gen. Comp. Endocrinol. 131, 134–142. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00645-7
- Babon, C., 1959. Influence de l'ablation des pédoncules oculaires sur la mue et les caractères sexuels de l'écrevisse américaine *Orconectes limosus* Rafinesque. Diplôme Etudes Supér. Univ. Nancy.
- Bach, L., Headey, S., Norton, R., 2005. IGF-binding proteins the pieces are falling into place. Trends Endocrinol. Metab. 16, 228–234. https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.05.005
- Badawi, M., Moumen, B., Giraud, I., Grève, P., Cordaux, R., 2018. Investigating the molecular genetic basis of cytoplasmic sex determination caused by *Wolbachia* endosymbionts in terrestrial Isopods. Genes 9, 290. https://doi.org/10.3390/genes9060290
- Bader, R., Sarraf-Zadeh, L., Peters, M., Moderau, N., Stocker, H., Köhler, K., Pankratz, M.J., Hafen, E., 2013. The IGFBP7 homolog Imp-L2 promotes insulin signaling in distinct neurons of the *Drosophila* brain. J Cell Sci 126, 2571–2576. https://doi.org/10.1242/jcs.120261
- Badisco, L., Claeys, I., Van Loy, T., Van Hiel, M., Franssens, V., Simonet, G., Vanden Broeck, J., 2007. Neuroparsins, a family of conserved arthropod neuropeptides. Gen. Comp. Endocrinol. 153, 64–71. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.03.008
- Balesdent-Marquet, M.L., 1960. Disposition, structure et mode d'action de la glande androgène d'*Asellus aquaticus* L. (Crustacé Isopode) 803–805.
- Balesdent-Marquet, M.L., 1958. Présence d'une glande androgène chez le Crustacé Isopode *Asellus aquaticus* L. CR Acad Sci Paris 247, 534–536.
- Banzai, K., Ishizaka, N., Asahina, K., Suitoh, K., Izumi, S., Ohira, T., 2011. Molecular cloning of a cDNA encoding insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* and analysis of its expression. Fish. Sci. 77, 329–335. https://doi.org/10.1007/s12562-011-0337-8
- Bao, C., Yang, Y., Zeng, C., Huang, H., Ye, H., 2018. Identifying neuropeptide GPCRs in the mud crab, *Scylla paramamosain*, by combinatorial bioinformatics analysis. Gen. Comp. Endocrinol.
- Barki, A., Karplus, I., Khalaila, I., Manor, R., Sagi, A., 2003. Male-like behavioral patterns and physiological alterations induced by androgenic gland implantation in female crayfish. J. Exp. Biol. 206, 1791–1797.
- Barki, A., Karplus, I., Manor, R., Sagi, A., 2006. Intersexuality and behavior in crayfish: The demasculinization effects of androgenic gland ablation. Horm. Behav. 50, 322–331. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.03.017
- Baxter, R.C., 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. 278, E967–E976.
- Baxter, R.C., Binoux, M.A., Clemmons, D.R., Conover, C.A., Drop, S.L.S., Holly, J.M.P., Mohan, S., Oh, Y., Rosenfeld, R.G., 1998. Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83, 3213–3213.
- Becking, T., 2017. Impact des bactéries féminisantes du genre Wolbachia sur l'évolution des chromosomes sexuels d'isopodes terrestres. Université de Poitiers.
- Becking, T., Giraud, I., Raimond, M., Moumen, B., Chandler, C., Cordaux, R., Gilbert, C., 2017. Diversity and evolution of sex determination systems in terrestrial isopods. Sci. Rep. 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01195-4

- Bedinger, D.H., Adams, S.H., 2015. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: a tissuespecific perspective for insulin receptor activators. Mol. Cell. Endocrinol. 415, 143–156.
- Bedinger, D.H., Goldfine, I.D., Corbin, J.A., Roell, M.K., Adams, S.H., 2015. Differential pathway coupling of the activated insulin receptor drives signaling selectivity by XMetA, an allosteric partial agonist antibody. J. Pharmacol. Exp. Ther. 353, 35–43.
- Belfiore, A., Malaguarnera, R., Vella, V., Lawrence, M.C., Sciacca, L., Frasca, F., Morrione, A., Vigneri, R., 2017. Insulin receptor isoforms in physiology and disease: an updated view. Endocr. Rev. 38, 379–431.
- Berreur-Bonnenfant, J., 1973. Recherches sur la sécrétion de la glande androgène des Crustacés Malacostracés: purification d'une substance à activité androgène. CR Acad Sci Ser D 277, 971–974.
- Berreur-Bonnenfant, J., Lawrence, F., 1984. Comparative effect of farnesylacetone on macromolecular synthesis in gonads of crustaceans. Gen. Comp. Endocrinol. 54, 462–468. https://doi.org/10.1016/0016-6480(84)90163-1
- Besse, G., 1971. Mise en évidence d'une variation dans le temps de la fonction gonado-inhibitrice du protocérébron chez des femelles vierges et fécondées.
- Besse, G., 1968. Contribution à l'étude du contrôle neurohumoral de la maturation ovarienne et de la mue parturielle chez l'Oniscoïde *Porcellio dilatatus* Brandt. CR Acad Sci Paris 266, 917–919.
- Besse, G., Juchault, P., Legrand, J.J., Mocquard, J.P., 1969. Contribution à l'étude de la physiologie sexuelle femelle de *Ligia oceanica* L. (Crustacé Oniscoïde). Différenciation des oostégites et contrôle neuro-humoral de la maturation ovarienne. Acad Sci Paris Sér D 269, 733–736.
- Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S., 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. J. Mol. Biol. 294, 1351–1362. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3310
- Bogani, D., Siggers, P., Brixey, R., Warr, N., Beddow, S., Edwards, J., Williams, D., Wilhelm, D., Koopman, P., Flavell, R.A., Chi, H., Ostrer, H., Wells, S., Cheeseman, M., Greenfield, A., 2009. Loss of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4 (MAP3K4) Reveals a Requirement for MAPK Signalling in Mouse Sex Determination. PLoS Biol. 7, e1000196. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000196
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170
- Bomirski, A., Arendarczyk, M., Kawinska, E., Kleinholz, L.H., 1981. Partial characterization of crustacean gonad-inhibiting hormone. Int. J. Invertebr. Reprod. 3, 213–219.
- Bomirski, A., Klek, E., 1974. Action of eyestalks on the ovary in *Rhithropanopeus harrisii* and *Crangon crangon* (Crustacea: Decapoda). Mar. Biol. 24, 329–337.
- Boucher, P., Ditlecadet, D., Dubé, C., Dufresne, F., 2010. Unusual duplication of the insulin-like receptor in the crustacean *Daphnia pulex*. BMC Evol. Biol. 10, 305. https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-305
- Bouchon, D., Cordaux, R., Grève, P., 2008. Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods, in: Bourtzis, K., Miller, T. (Eds.), Insect Symbiosis, Volume 3. CRC Press, pp. 273–294. https://doi.org/10.1201/9781420064117.ch12
- Bouchon, D., Rigaud, T., Juchault, P., 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 265, 1081–1090.
- Boulangé-Lecomte, C., Xuereb, B., Trémolet, G., Duflot, A., Giusti, N., Olivier, S., Legrand, E., Forget-Leray, J., 2017. Controversial use of vitellogenin as a biomarker of endocrine disruption in crustaceans: New adverse pieces of evidence in the copepod *Eurytemora affinis*. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 201, 66–75. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.09.011

- Brander, S.M., 2013. Thinking outside the box: Assessing endocrine disruption in aquatic life. Monit. Water Qual. Pollut. Assess. Anal. Remediat. 395.
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 66, 611–640.
- Buckley, S.J., Fitzgibbon, Q.P., Smith, G.G., Ventura, T., 2016. In silico prediction of the G-protein coupled receptors expressed during the metamorphic molt of *Sagmariasus verreauxi* (Crustacea: Decapoda) by mining transcriptomic data: RNA-seq to repertoire. Gen. Comp. Endocrinol. 228, 111–127.
- Castellanos, M., Jiménez-Vega, F., Vargas-Albores, F., 2008. Single IB domain (SIBD) protein from *Litopenaeus vannamei*, a novel member for the IGFBP family. Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics 3, 270–274. https://doi.org/10.1016/j.cbd.2008.07.002
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol. Biol. Evol. 17, 540–552.
- Cerveau, N., Bouchon, D., Bergès, T., Grève, P., 2014. Molecular evolution of the androgenic hormone in terrestrial isopods. Gene 540, 71–77. https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.02.024
- Chan, S.-M., Gu, P.-L., Chu, K.-H., Tobe, S.S., 2003. Crustacean neuropeptide genes of the CHH/MIH/GIH family: implications from molecular studies. Gen. Comp. Endocrinol. 134, 214–219. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00263-6
- Chandler, J.C., Aizen, J., Elizur, A., Hollander-Cohen, L., Battaglene, S.C., Ventura, T., 2015. Discovery of a novel insulin-like peptide and insulin binding proteins in the Eastern rock lobster *Sagmariasus verreauxi*. Gen. Comp. Endocrinol. 215, 76–87. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.08.018
- Chandler, J.C., Elizur, A., Ventura, T., 2017a. The decapod researcher's guide to the galaxy of sex determination. Hydrobiologia. https://doi.org/10.1007/s10750-017-3452-4
- Chandler, J.C., Gandhi, N.S., Mancera, R.L., Smith, G., Elizur, A., Ventura, T., 2017b. Understanding insulin endocrinology in decapod Crustacea: molecular modelling characterization of an insulin-binding protein and insulin-like peptides in the eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*. Int. J. Mol. Sci. 18, 1832. https://doi.org/10.3390/ijms18091832
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aiken, D.E., 1997. Hormonal regulation of growth and reproduction in Crustaceans. Recent Adv. Mar. Biotechnol. 1, 109–161.
- Charniaux, 1953. Etude du déteminisme des caractères sexuels secondaires par castration chirurgicale et implantation d'ovaire chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*). Comptes Rendus Académie Sci. 236, 141–143.
- Charniaux, 1952. Castration chirurgicale chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) et déterminisme des caractères sexuels secondaires. Comptes Rendus Académie Sci. 234, 2570–2572.
- Charniaux-Cotton, H., 1962. Androgenic gland of crustaceans. Gen. Comp. Endocrinol. 1, 241–247.
- Charniaux-Cotton, H., 1956. Existence d'un organe analogue à la « glande androgène » chez un Pagure et un Crabe. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 243, 1168–1169.
- Charniaux-Cotton, H., 1955. Le déterminisme hormonal des caractéres sexuels d'*Orchestia gammarella* (Crustacté Amphipode).
- Charniaux-Cotton, H., 1954a. Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires mâles. Comptes Rendus Académie Sci. 239, 780–782.
- Charniaux-Cotton, H., 1954b. Implantation de gonades de sexe opposé à des mâles et des femelles chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*). Comptes Rendus Académie Sci. 238, 953–955.
- Charniaux-Cotton, H., Payen, G., 1985. The biology of Crustacea. Acad. N. Y. 9, 217–299.

- Charniaux-Cotton, H., Zerbib, C., Meusy, J.-J., 1966. Monographie de la glande androgène des Crustacés supérieurs. Crustaceana 10, 113–136. https://doi.org/10.1163/156854066X00658
- Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Charif, D., Mitta, G., Gavory, F., Wincker, P., Grève, P., Braquart-Varnier, C., Bouchon, D., 2012. Feminizing *Wolbachia*: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. BMC Microbiol. 12, S1. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S1
- Christie, A.E., 2017. Neuropeptide discovery in *Proasellus cavaticus*: Prediction of the first largescale peptidome for a member of the Isopoda using a publicly accessible transcriptome. Peptides 97, 29–45.
- Christie, A.E., 2014. *In silico* characterization of the peptidome of the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Crustacea, Copepoda). Gen. Comp. Endocrinol. 204, 248–260.
- Christie, A.E., Cieslak, M.C., Roncalli, V., Lenz, P.H., Major, K.M., Poynton, H.C., 2018a. Prediction of a peptidome for the ecotoxicological model *Hyalella azteca* (Crustacea; Amphipoda) using a de novo assembled transcriptome. Mar. Genomics 38, 67–88.
- Christie, A.E., Pascual, M.G., Yu, A., 2018b. Peptidergic signaling in the tadpole shrimp *Triops newberryi*: a potential model for investigating the roles played by peptide paracrines/hormones in adaptation to environmental change. Mar. Genomics 39, 45–63. https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.01.005
- Christie, A.E., Roncalli, V., Lenz, P.H., 2016. Diversity of insulin-like peptide signaling system proteins in *Calanus finmarchicus* (Crustacea; Copepoda) Possible contributors to seasonal pre-adult diapause. Gen. Comp. Endocrinol. 236, 157–173. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.07.016
- Chuang, N.-N., Wang, P.-C., 1994. Characterization of insulin receptor from the muscle of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 108, 289–297.
- Chung, J.S., 2014. An insulin-like growth factor found in hepatopancreas implicates carbohydrate metabolism of the blue crab *Callinectes sapidus*. Gen. Comp. Endocrinol. 199, 56–64. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.01.012
- Chung, J.S., Manor, R., Sagi, A., 2011. Cloning of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) from the blue crab, *Callinectes sapidus*: Implications for eyestalk regulation of IAG expression. Gen. Comp. Endocrinol. 173, 4–10. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.04.017
- Chung, J.S., Zmora, N., Katayama, H., Tsutsui, N., 2010. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptidesfamily: Functions, titer, and binding to target tissues. Gen. Comp. Endocrinol. 166, 447–454. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.12.011
- Claeys, I., Simonet, G., Poels, J., Van Loy, T., Vercammen, L., De Loof, A., Vanden Broeck, J., 2002. Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. Peptides 23, 807–816.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health Perspect. 101, 378.
- Colbourne, J.K., Pfrender, M.E., Gilbert, D., Thomas, W.K., Tucker, A., Oakley, T.H., Tokishita, S., Aerts, A., Arnold, G.J., Basu, M.K., Bauer, D.J., Cáceres, C.E., Carmel, L., Casola, C., Choi, J.-H., Detter, J.C., Dong, Q., Dusheyko, S., Eads, B.D., Fröhlich, T., Geiler-Samerotte, K.A., Gerlach, D., Hatcher, P., Jogdeo, S., Krijgsveld, J., Kriventseva, E.V., Kültz, D., Laforsch, C., Lindquist, E., Lopez, J., Manak, J.R., Muller, J., Pangilinan, J., Patwardhan, R.P., Pitluck, S., Pritham, E.J., Rechtsteiner, A., Rho, M., Rogozin, I.B., Sakarya, O., Salamov, A., Schaack, S., Shapiro, H., Shiga, Y., Skalitzky, C., Smith, Z., Souvorov, A., Sung, W., Tang, Z., Tsuchiya, D., Tu, H., Vos, H., Wang, M., Wolf, Y.I., Yamagata, H., Yamada, T., Ye, Y., Shaw, J.R., Andrews, J., Crease, T.J., Tang, H., Lucas, S.M., Robertson, H.M., Bork, P., Koonin, E.V., Zdobnov, E.M., Grigoriev, I.V., Lynch, M., Boore, J.L., 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. Science 331, 555–561.

https://doi.org/10.1126/science.1197761

- Colombani, J., Andersen, D.S., Boulan, L., Boone, E., Romero, N., Virolle, V., Texada, M., Léopold, P., 2015. *Drosophila* Lgr3 couples organ growth with maturation and ensures developmental stability. Curr. Biol. CB 25, 2723–2729. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.020
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carré, C., Noselli, S., Léopold, P., 2005. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. Science 310, 667–670.
- Cordaux, R., Bouchon, D., Grève, P., 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. Trends Genet. 27, 332–341. https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.002
- Cordaux, R., Michel-Salzat, A., Bouchon, D., 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. J. Evol. Biol. 14, 237–243. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00279.x
- Cordaux, R., Michel-Salzat, A., Frelon-Raimond, M., Rigaud, T., Bouchon, D., 2004. Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. Heredity 93, 78–84. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800482
- Cordaux, R., Pichon, S., Hatira, H.B.A., Doublet, V., Grève, P., Marcadé, I., Braquart-Varnier, C., Souty-Grosset, C., Charfi-Cheikhrouha, F., Bouchon, D., 2012. Widespread *Wolbachia* infection in terrestrial isopods and other crustaceans. Zookeys 123.
- Cronin, L.E., 1947. Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. J. Morphol. 81, 209–239. https://doi.org/10.1002/jmor.1050810205
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: a sequence logo generator. Genome Res. 14, 1188–1190.
- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., Van Der Kraak, G., 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva World Health Organ.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9, 772. https://doi.org/10.1038/nmeth.2109
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. Bioinforma. Oxf. Engl. 27, 1164–1165. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088
- Daza, D.O., Sundström, G., Bergqvist, C.A., Duan, C., Larhammar, D., 2011. Evolution of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) family. Endocrinology 152, 2278–2289. https://doi.org/10.1210/en.2011-0047
- de Azevedo, S.V., Hartfelder, K., 2008. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. J. Insect Physiol. 54, 1064–1071. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.009
- De Lattin, G., Gross, F.-J., 1953. Die Beeinflussbarkeit sekundärer Geschlechtsmerkmale von *Oniscus asellus* durch die Gonaden. Experientia 9, 338–339. https://doi.org/10.1007/BF02155837
- De Meyts, P., 2015. Insulin/receptor binding: The last piece of the puzzle? What recent progress on the structure of the insulin/ receptor complex tells us (or not) about negative cooperativity and activation. BioEssays 37, 389–397. https://doi.org/10.1002/bies.201400190
- De Meyts, P., 2004. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. Bioessays 26, 1351–1362.
- Delage, Y., 1884. Évolution de la Sacculine (*Sacculina carcini* Thomps.), Crustacé endoparasite de l'ordre nouveau des Kentrogonides. Arch. Zool. Exp. Gen. 2, 417–436.
- Demeusy, N., 1967. Modalités d'action du controle inhibiteur pédonculaire exercé sur les caractères sexuels externes mâles du Décapode Brachyoure *Carcinus maenas* L. COMPTES RENDUS

Hebd. SEANCES Acad. Sci. Ser. D 265, 628–630.

- Demeusy, N., Veillet, A., 1958. Influence de l'ablation des pédoncules oculaires sur la glande androgène de *Carcinus maenas*. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 246, 1104–1107.
- Demeusy, N., Veillet, A., 1952. Déclenchement de la ponte chez le crabe *Carcinus maenas* Pennant par ablation des pédoncules oculaires. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 234, 1224–1226.
- Dinan, L., Bourne, P., Whiting, P., Dhadialla, T.S., Hutchinson, T.H., 2001. Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* BII cell in vitro assay. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2038–2046.
- Ding, B.-Y., Shang, F., Zhang, Q., Xiong, Y., Yang, Q., Niu, J.-Z., Smagghe, G., Wang, J.-J., 2017. Silencing of Two Insulin Receptor Genes Disrupts Nymph-Adult Transition of Alate Brown Citrus Aphid. Int. J. Mol. Sci. 18, 357. https://doi.org/10.3390/ijms18020357
- Dircksen, H., Neupert, S., Predel, R., Verleyen, P., Huybrechts, J., Strauss, J., Hauser, F., Stafflinger, E., Schneider, M., Pauwels, K., Schoofs, L., Grimmelikhuijzen, C.J.P., 2011. Genomics, transcriptomics, and peptidomics of *Daphnia pulex* neuropeptides and protein hormones. J. Proteome Res. 10, 4478–4504. https://doi.org/10.1021/pr200284e
- Dissous, C., 2015. Venus kinase receptors at the crossroads of insulin signaling: their role in reproduction for helminths and insects. Front. Endocrinol. 6, 118.
- Dissous, C., Morel, M., Vanderstraete, M., 2014. Venus kinase receptors: prospects in signaling and biological functions of these invertebrate kinases. Front. Endocrinol. 5, 72.
- Dittmer, J., Beltran-Bech, S., Lesobre, J., Raimond, M., Johnson, M., Bouchon, D., 2014. Host tissues as microhabitats for *Wolbachia* and quantitative insights into the bacterial community in terrestrial isopods. Mol. Ecol. 23, 2619–2635. https://doi.org/10.1111/mec.12760
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol. 29, 1969–1973. https://doi.org/10.1093/molbev/mss075
- Duckert, P., Brunak, S., Blom, N., 2004. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. Protein Eng. Des. Sel. 17, 107–112. https://doi.org/10.1093/protein/gzh013
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32, 1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340
- Erler, C., Novak, J., 2010. Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy. J. Pediatr. Nurs. 25, 400–407. https://doi.org/10.1016/j.pedn.2009.05.006
- Escribano, O., Guillén, C., Nevado, C., Gómez-Hernández, A., Kahn, C.R., Benito, M., 2009. β-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. Diabetes 58, 820–828.
- Euling, S.Y., Sonawane, B.R., 2005. A cross-species mode of action information assessment: a case study of bisphenol A. Environ. Prot. Agency Wash. DC EPA600R-05 F 44.
- Fanjul-Moles, M.L., 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 142, 390–400.
- FAO, 2018. FAO Aquaculture Newsletter No. 58, April 2018, in: FAO Aquaculture Newsletter. FAO, Rome, Italy.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783–791. https://doi.org/10.2307/2408678
- Fenn, K., Blaxter, M., 2006. *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. Trends Parasitol. 22, 60–65.
- Fent, G., Hein, W.J., Moendel, M.J., Kubiak, R., 2003. Fate of 14C-bisphenol A in soils. Chemosphere 51, 735–746. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00100-0
- Férézou, J.-P., Barbier, M., Berreur-Bonnenfant, J., 1978. Biosynthèse de la farnésylacétone-(E, E)

par les glandes androgènes du crabe *Carcinus maenas*. Helv. Chim. Acta 61, 669–674. https://doi.org/10.1002/hlca.19780610214

- Férézou, J.P., Berreur-Bonnenfant, J., Meusy, J.J., Barbier, M., Suchý, M., Wipf, H.K., 1977. 6, 10, 14-Trimethylpentadecan-2-one and 6, 10, 14-trimethyl-5-trans, 9-trans, 13-pentadecatrien-2one from the androgenic glands of the male crab *Carcinus maenas*. Experientia 33, 290– 290.
- Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M., Schlessinger, J., 1995. The *Drosophila* insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. EMBO J. 14, 3373–3384.
- Fingerman, M., 1995. Endocrine mechanisms in crayfish, with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of hormone release. Am. Zool. 35, 68–78.
- Fischer, K., Beatty, W.L., Jiang, D., Weil, G.J., Fischer, P.U., 2011. Tissue and stage-specific distribution of *Wolbachia* in *Brugia malayi*. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1174.
- Forbes, B.E., McCarthy, P., Norton, R.S., 2012. Insulin-like growth factor binding proteins: a structural perspective. Front. Endocrinol. 3, 38. https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00038
- Fortin, M., 2016. Influence de la bactérie féminisante *Wolbachia* sur le comportement de choix du partenaire et la fitness de son hôte *Armadillidium vulgare*. Poitiers.
- Francis, V.A., Zorzano, A., Teleman, A.A., 2010. dDOR is an EcR coactivator that forms a feed-forward loop connecting insulin and ecdysone signaling. Curr. Biol. 20, 1799–1808.
- Frelon, M., Debenest, C., Martin, G., 1993. Masculinization of the ditch shrimp *Palaemonetes varians* (Leach, 1814). A re-evaluation using scanning electron microscopy (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). Crustaceana 65, 105–110. https://doi.org/10.1163/156854093X00423
- Fry, D.M., TooNE, C.K., Speich, S.M., Peard, R.J., 1987. Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: demographic and toxicological considerations. Stud Avian Biol 10, 26–43.
- Fu, C., Zeng, Q., Li, F., Wang, Huicui, Sun, J., Wang, Hui, 2017. Comparative Transcriptome Analysis Reveals Related Regulatory Mechanisms of Androgenic Gland in *Eriocheir sinensis*. BioMed Res. Int. 2017, 1–12. https://doi.org/10.1155/2017/4956216
- Fürhacker, M., Scharf, S., Weber, H., 2000. Bisphenol A: emissions from point sources. Chemosphere 41, 751–756.
- Gai, Y., Wang, L., Song, L., Zhao, J., Qiu, L., Xing, K., 2010. A putative endocrine factor SIBD (single insulin binding domain protein) involved in immune response of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Fish Shellfish Immunol. 28, 10–17. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.09.013
- Gao, J., Wang, X., Zou, Z., Jia, X., Wang, Y., Zhang, Z., 2014. Transcriptome analysis of the differences in gene expression between testis and ovary in green mud crab (*Scylla paramamosain*). BMC Genomics 15, 1.
- Gao, K., Deng, X., Qian, H.-Y., Wu, P., Qin, G., Liu, T., Shen, Z., Guo, X., 2012. Novel protein of IBP from silkworm, *Bombyx mori*, involved in cytoplasmic polyhedrosis virus infection. J. Invertebr. Pathol. 110, 83–91. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.011
- Garelli, A., Heredia, F., Casimiro, A.P., Macedo, A., Nunes, C., Garcez, M., Dias, A.R.M., Volonte, Y.A., Uhlmann, T., Caparros, E., Koyama, T., Gontijo, A.M., 2015. Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing. Nat. Commun. 6. https://doi.org/10.1038/ncomms9732
- Geens, T., Goeyens, L., Covaci, A., 2011. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 339–347. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.04.005
- Genty, L.-M., 2013. Approche in situ de la régulation des interactions arthropode-symbiote.
- Genty, L.-M., Bouchon, D., Raimond, M., Bertaux, J., 2014. *Wolbachia* infect ovaries in the course of their maturation: last minute passengers and priority travellers? PloS One 9, e94577.

Giard, A., 1888. La castration parasitaire. Nouvelles recherches. Bull. Sci. Fr. Belg. 19, 12–45.

- Giard, A., 1887. La castration parasitaire et son influence sur les caractères extérieurs du sexe male chez les Crustacés Décapodes. Doin.
- Giard, A., 1886. De l'influence de certains parasites Rhizocéphales sur les caractères sexuels extérieurs de leur hôte. Comptes Rendus Hebd. Séances L'Académie Sci. Paris 103, 84–86.
- Ginsburger-Vogel, T., 1975. Temperature-sensitive intersexuality and its determinism in *Orchestia gammarella* Pallas, in: Intersexuality in the Animal Kingdom. Springer, pp. 106–120.
- Ginsburger-Vogel, T., 1972. Inversion des femelles d'*Orchestia gammarella* Pallas (Crustacé Amphipode Talitridae) en néo-mâles fonctionnels par greffe de glandes androgènes avant la mue de première différenciation externe du sexe. CR Acad Sci Sér D 274, 3606–3609.
- Ginsburger-Vogel, T., Magniette-Mergault, F., 1981. The effects of temperature on sexual differentiation in the temperature sensitive thelygenic intersexual offspring of *Orchestia gammarellus* (Pallas) (Amphidopa; Crustacea: II. Effects of temperature during embryonic and post-embryonic development. Int. J. Invertebr. Reprod. 4, 51–65. https://doi.org/10.1080/01651269.1981.10553418
- Gismondi, E., 2018. Identification of molt-inhibiting hormone and ecdysteroid receptor cDNA sequences in *Gammarus pulex* and variations after endocrine disruptor exposures. Ecotoxicol. Environ. Saf. 158, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.017
- Gohar, M., 1984. Mise en évidence d'une inhibition de la synthèse de la vitellogénine par un facteur neurohumoral (VIH) chez le Crustacé Isopode terrestre *Porcellio dilatatus* Brandt. CR Acad Sci Paris Sér III 299, 785–787.
- Gomez, R., 1965. Acceleration of development of gonads by implantation of brain in the crab *Paratelphusa hydrodromous*. Naturwissenschaften 52, 216–216.
- Gontijo, A.M., Garelli, A., 2018. The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: A relaxinlike pathway coupling tissue growth and developmental timing control. Mech. Dev. https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.04.005
- Gopal, C., Gopikrishna, G., Krishna, G., Jahageerdar, S.S., Rye, M., Hayes, B.J., Paulpandi, S., Kiran, R.P., Pillai, S.M., Ravichandran, P., 2010. Weight and time of onset of female-superior sexual dimorphism in pond reared *Penaeus monodon*. Aquaculture 300, 237–239.
- Gouignard, N., Vanderstraete, M., Cailliau, K., Lescuyer, A., Browaeys, E., Dissous, C., 2012. *Schistosoma mansoni*: structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. Exp. Parasitol. 132, 32–39.
- Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P., Gaido, K.W., 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. Mol. Cell. Endocrinol. 142, 203–214. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00084-7
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol. Biol. Evol. 27, 221–224. https://doi.org/10.1093/molbev/msp259
- 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., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat. Biotechnol. 29, 644–652. https://doi.org/10.1038/nbt.1883
- Grassé, P.P., Forest, J., 1996. Traité de zoologie : anatomie, systématique, biologie (tome VII, Crustacés. Fascicule 1 : morphologie, physiologie, reproduction, systèmatique).
- Grève, P., Braquart-Varnier, C., Strub, J.-M., Félix, C., Dorsselaer, A.V., Martin, G., 2004. The glycosylated androgenic hormone of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea). Gen. Comp. Endocrinol. 136, 389–397. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.01.015
- Grève, P., Sorokine, O., Berges, T., Lacombe, C., Van Dorsselaer, A., Martin, G., 1999. Isolation

and amino acid sequence of a peptide with vitellogenesis inhibiting activity from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea). Gen. Comp. Endocrinol. 115, 406–414. https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7330

- Gricourt, L., Mathieu, M., Kellner, K., 2006. An insulin-like system involved in the control of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reproduction: hrIGF-1 effect on germinal cell proliferation and maturation associated with expression of an homologous insulin receptor-related receptor. Aquaculture 251, 85–98.
- Grönke, S., Clarke, D.-F., Broughton, S., Andrews, T.D., Partridge, L., 2010. Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. PLoS Genet. 6, e1000857. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000857
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 59, 307–321. https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52, 696–704.
- Guo, Q., Li, S., Lv, X., Xiang, J., Sagi, A., Manor, R., Li, F., 2018. A putative insulin-like androgenic gland hormone receptor gene specifically expressed in male Chinese shrimp. Endocrinology 159, 2173–2185. https://doi.org/10.1210/en.2017-03253
- Guo, S.-S., Zhang, M., Liu, T.-X., 2016. Insulin-Related Peptide 5 is Involved in Regulating Embryo Development and Biochemical Composition in Pea Aphid with Wing Polyphenism. Front. Physiol. 7. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00031
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., 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. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084
- Haine, E.R., Brondani, E., Hume, K.D., Perrot-Minnot, M.-J., Gaillard, M., Rigaud, T., 2004.
   Coexistence of three microsporidia parasites in populations of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*: evidence for vertical transmission and positive effect on reproduction.
   Int. J. Parasitol. 34, 1137–1146. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.006
- Hampl, R., Kubátová, J., Stárka, L., 2016. Steroids and endocrine disruptors History, recent state of art and open questions. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 155, 217–223.
- Hasegawa, Y., Haino-Fukushima, K., Katakura, Y., 1991. An immunoassay for the androgenic gland hormone of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. Invertebr. Reprod. Dev. 20, 59–66.
- Hasegawa, Y., Haino-Fukushima, K., Katakura, Y., 1987. Isolation and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. Gen. Comp. Endocrinol. 67, 101–110.
- Hasegawa, Y., Hirose, E., Katakura, Y., 1993. Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. Am. Zool. 33, 403–411. https://doi.org/10.1080/07924259.1991.9672178
- Hasegawa, Y., Okuno, A., Nagasawa, H., 2002. Immunohistochemical Study of Androgenic Gland Hormone: Localization in the Male Reproductive System and Species Specificity in the Terrestrial Isopods. Gen. Comp. Endocrinol. 125, 218–225. https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7753
- Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 4612–4617. https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107
- Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., de Pablo, F., Zardoya, R., 2008. Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. Mol. Biol. Evol. 25, 1043–

1053. https://doi.org/10.1093/molbev/msn036

- Herran, B., Bertaux, J., Grève, P., 2018. Divergent evolution and clade-specific duplications of the Insulin-like Receptor in malacostracan crustaceans. Gen. Comp. Endocrinol. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.07.013
- Hillis, D.M., Bull, J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst. Biol. 42, 182–192. https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182
- Hiransuchalert, R., Yocawibun, P., Klinbunga, S., Khamnamtong, B., Menasveta, P., 2013. Isolation of cDNA, genomic organization and expression of small androgen receptor-interacting protein 1 (PmSARIP1) in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 412–413, 151–159. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.011
- Hiroki, M., Kato, Y., Kamito, T., Miura, K., 2002. Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). Naturwissenschaften 89, 167–170.
- Hoffman, D.L., 1968. Seasonal eyestalk inhibition on the androgenic glands of a protandric shrimp. Nature 218, 170.
- Homola, E., Chang, E.S., 1997. Methyl farnesoate: crustacean juvenile hormone in search of functions. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 117, 347–356. https://doi.org/10.1016/S0305-0491(96)00337-9
- Honegger, B., Galic, M., Köhler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E., Stocker, H., 2008. Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. J. Biol. 7, 10. https://doi.org/10.1186/jbiol72
- Hong, J., Zhang, G., Dong, F., Rechler, M.M., 2002. Insulin-like Growth Factor (IGF)-Binding Protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. J. Biol. Chem. 277, 10489–10497. https://doi.org/10.1074/jbc.M109604200
- Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.-Y., Fukatsu, T., 2010. Wolbachia as a bacteriocyteassociated nutritional mutualist. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 769–774.
- Huang, X., Bae, S.-H., Bachvaroff, T.R., Schott, E.J., Ye, H., Chung, J.S., 2016. Does a blue crab putative insulin-like peptide binding protein (ILPBP) play a role in a virus infection? Fish Shellfish Immunol. 58, 340–348. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.036
- Huang, X., Feng, B., Huang, H., Ye, H., 2017a. *In vitro* stimulation of vitellogenin expression by insulin in the mud crab, *Scylla paramamosain*, mediated through PI3K/Akt/TOR pathway. Gen. Comp. Endocrinol. 250, 175–180.
- Huang, X., Ye, H., Chung, J.S., 2017b. The presence of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) and insulin-like peptide binding protein (ILPBP) in the ovary of the blue crab, *Callinectes sapidus* and their roles in ovarian development. Gen. Comp. Endocrinol. 249, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.001
- Huang, X., Ye, H., Feng, B., Huang, H., 2015a. Insights into insulin-like peptide system in invertebrates from studies on IGF binding domain-containing proteins in the female mud crab, *Scylla paramamosain*. Mol. Cell. Endocrinol. 416, 36–45. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.019
- Huang, X., Ye, H., Huang, H., Liu, A., Feng, B., 2015b. Implication for the regulation of catabolism drawn from the single insulin-like growth factor binding domain protein (SIBD) gene in the mud crab, *Scylla paramamosain*. Gen. Comp. Endocrinol. 216, 24–32. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.04.014
- Huang, X., Ye, H., Huang, H., Yang, Y., Gong, J., 2014. An insulin-like androgenic gland hormone gene in the mud crab, *Scylla paramamosain*, extensively expressed and involved in the processes of growth and female reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 204, 229–238. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.002

Hubbard, S.R., 2013. Structural biology: Insulin meets its receptor. Nature 493, 171.

- Hunter, T., 2014. The genesis of tyrosine phosphorylation. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6, a020644–a020644. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020644
- Hwa, V., Oh, Y., Rosenfeld, R.G., 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. Endocr. Rev. 20, 761–787.
- Ihara, K., Umemura, T., Katagiri, I., Kitajima-Ihara, T., Sugiyama, Y., Kimura, Y., Mukohata, Y., 1999. Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. J. Mol. Biol. 285, 163–174. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2286
- Ikeya, T., Broughton, S., Alic, N., Grandison, R., Partridge, L., 2009. The endosymbiont Wolbachia increases insulin/IGF-like signalling in Drosophila. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 276, 3799– 3807. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0778
- Imai, Y., Moralez, A., Andag, U., Clarke, J.B., Busby, W.H., Clemmons, D.R., 2000. Substitutions for hydrophobic amino acids in the N-terminal domains of IGFBP-3 and -5 markedly reduce IGF-I binding and alter their biologic actions. J. Biol. Chem. 275, 18188–18194. https://doi.org/10.1074/jbc.M000070200
- Innan, H., Kondrashov, F., 2010. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. Nat. Rev. Genet. 11, 97–108. https://doi.org/10.1038/nrg2689
- Jambu, P., Juchault, P., Mocquard, J.P., 1988. Étude expérimentale de la contribution du crustacé isopode *Oniscus asellus* à la transformation des litières forestières sous chêne sessile. Pedobiologia.
- Jaszczak, J.S., Wolpe, J.B., Bhandari, R., Jaszczak, R.G., Halme, A., 2016. Growth coordination during *Drosophila melanogaster* imaginal disc regeneration is mediated by signaling through the relaxin receptor Lgr3 in the prothoracic gland. Genetics 204, 703–709. https://doi.org/10.1534/genetics.116.193706
- Jenner, R.A., 2010. Higher-level crustacean phylogeny: Consensus and conflicting hypotheses. Arthropod Struct. Dev. 39, 143–153. https://doi.org/10.1016/j.asd.2009.11.001
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Lopes, C., Lacaze, E., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O., 2012a. Vitellogenin-like protein measurement in caged *Gammarus fossarum* males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: Inconclusive experience. Aquat. Toxicol. 122–123, 9–18. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.007
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O., 2012b. Vitellogeninlike proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. Aquat. Toxicol. 112–113, 72–82. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.011
- Juchault, P., 1978. Caractérisation chimique d'une substance ayant les effets biologiques de l'hormone androgène chez le Crustacé Isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latreille. CR Acad Sci Ser D 286, 73–76.
- Juchault, P., 1977. Corrélation entre différenciation sexuelle mâle externe et fonction androinhibitrice de la région médiane du protocérébron chez le Crustacé *Sphaeroma serratum* Fabr. (Isopoda, Flabellifera). Comptes Rendus Acad. Sci. Paris 285, 179–182.
- Juchault, P., 1968. Spécificité de l'hormone mâle chez les Oniscoïdes des séries Tylienne et Ligienne. Bull Soc Zool Fr 93, 459–465.
- Juchault, P., 1966. Contribution à l'étude de la différenciation sexuelle mâle chez les Crustacés Isopodes. Thèse Dr. Etat Univ. Poitiers.
- Juchault, P., 1963. Sur la glande androgène d'un certain nombre de Péracarides (Cumacés, Mysidacés, Tanaïdacés). Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil. 157, 613-.
- Juchault, P., Frelon, M., Bouchon, D., Rigaud, T., 1994. New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications. CR Acad Sci Ser Life Sci 317, 225–230.

- Juchault, P., Legrand, J.J., 1986. Thermosensibilité de l'expression ou de la transmission d'un facteur féminisant responsable de certaines formes de monogénie chez le Crustacé Oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latreille. Genet. Sel. Evol. 18, 393.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1985. Contribution à l'étude du mécanisme de l'état réfractaire à l'hormone androgène chez les *Armadillidium vulgare* Latr., (Crustacé, Isopode, Oniscoïde) hébergeant une bactérie féminisante. Gen. Comp. Endocrinol. 60, 463–467. https://doi.org/10.1016/0016-6480(85)90082-6
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1981. Contribution à l'étude qualitative et quantitative des facteurs contrôlant le sexe dans les populations du crustacé isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latreille. II. Populations hebergeant le facteur feminisant F (Bacteroïde intracytoplasmique). Arch. Zool. Expérimentale Générale 122, 65–74.
- Juchault, P., Legrand, J.-J., 1979. Analyse génétique et physiologique de la détermination du sexe dans une population du Crustacé Isopode Oniscoïde *Armadillidium nasatum* Budde-Lund. Arch Zool Exp Géné 120, 25–43.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1978. Etude du fonctionnement de la glande androgène dans le cas d'implantations croisées entre deux espèces de crustacés isopodes terrestres, *Porcellio dilatatus* Brandt et *Armadillidium vulgare* Latreille: Notion de spécificité de l'hormone androgène et des neurohormones impliquées dans le contrôle de la fonction androgène. Gen. Comp. Endocrinol. 36, 175–186. https://doi.org/10.1016/0016-6480(78)90020-5
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1974. Nature et action interspécifique du facteur épigénétique féminisant responsable d'une perturbation totale ou partielle de l'équilibre endocrinien contrôlant le phénotype sexuel du crustacé *Armadillium vulgare* (Isopode Oniscoïde). Ann Endocr Paris 35, 387–392.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1972. Croisements de néo-mâles expérimentaux chez *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé Isopode Oniscoïde). Mise en évidence d'une hétérogamétie femelle. Acad Sci Paris CR Ser D.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1970. Intersexualité et monogénie chez les Crustacés isopodes terrestres : induction de la thélygénie chez *Armadillidium vulgare*; facteurs contrôlant le pseudohermaphrodisme masculin externe chez *Porcellio dilatatus*. Ann Endocrinol Paris 31, 525– 530.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1968. Rôle des hormones sexuelles, des neurohormones et d'un facteur épigénétique dans la physiologie sexuelle d'individus intersexués d'*Armadillidium vulgare* Latr. (Isopode Oniscoïde). CR Acad Sci Fr 267, 2014–2016.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1967. Contribution à l'étude du contrôle neurohumoral de la glande androgène chez les Oniscoïdes. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. Ser. D 264, 1644–1646.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1966. Contribution à l'étude expérimentale de l'inducteur sexuel mâle chez les Crustacés Isopodes terrestres, in: Annales d'endocrinologie. pp. 205–209.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1964a. Transformation de femelles génétiques en mâles physiologiques chez Oniscoïdes *Porcellio dilatatus* et *Helleria brevicornis*. CR Acad Sci Paris 258, 2197–2199.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1964b. Démonstration de l'homogamétie femelle par croisement de deux femelles génétiques, chez les Oniscoïdes *Porcellio dilatatus* et *Helleria brevicornis*. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 258, 2685–2686.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1964c. Mise en évidence d'un inducteur sexuel mâle distinct de l'hormone adulte et contribution à l'étude de l'autodifférenciation ovarienne chez l'Oniscoïde *Helleria brevicornis*. Comptes Rendus Acad. Sci. Paris 258, 2416–2419.
- Juchault, P., Legrand, J.J., 1964d. Contribution à l'étude de différents types d'intersexualité chez l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latreille. Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil. 158, 2424.

- Juchault, P., Legrand, J.J., Maissiat, J., 1984. Present state of knowledge on the chemical nature of the androgenic hormone in higher crustaceans, in: Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones. Springer, pp. 155–160.
- Juchault, P., Legrand, J.J., Martin, G., 1974. Action interspécifique du facteur épigénétique féminisant responsable de la thélygénie et de l'intersexualité du crustacé *Armadillidium vulgare* (Isopode Oniscoïde), in: Annales d'Embryologie et de Morphogenese. pp. 265–276.
- Juchault, P., Legrand, J.J., Mocquard, J.P., 1965. Mise en évidence d'une inhibition protocérébrale de la glande androgène et de la croissance des variants sexuels mâles chez l'Oniscoïde *Porcellio dilatatus* Brandt. Comptes Rendus Acad. Sci. Paris 261, 1116–1118.
- Juchault, P., Martin, G., Legrand, J.J., 1980. Induction par la température d'une physiologie mâle chez les néo-femelles et les intersexués du Crustacé Oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr., hébergeant un bactéroïde à action féminisante. Int. J. Invertebr. Reprod. 2, 223–235.
- Juchault, P., Mocquard, J.P., 1993. Transfer of a parasitic sex factor to the nuclear genome of the host: a hypothesis on the evolution of sex-determining mechanisms in the terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare* Latr. J. Evol. Biol. 6, 511–528.
- Juchault, P., Mocquard, J.P., 1988. Effets de la température sur le sex ratio de la descendance et la physiologie sexuelle des femelles d'*Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea) hébergeant une bactérie féminisante. Comptes Rendus Académie Sci. Sér. 3 Sci. Vie 306, 321–324.
- Juchault, P., Mocquard, J.P., Legrand, J.J., 1981. Déterminisme de la reproduction saisonnière des femelles d'*Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé, Isopode, Oniscoïde). III. Suppression ou prolongation de la période de repos sexuel saisonnier obtenu par application de programmes photopériodiques. Ann Sci Nat Zool Paris 3, 141–145.
- Juchault, P., Rigaud, T., 1995. Evidence for female heterogamety in two terrestrial crustaceans and the problem of sex chromosome evolution in isopods. Heredity 75, 466–471.
- Juchault, P., Rigaud, T., Mocquard, J.P., 1992. Evolution of sex-determining mechanisms in a wild population of *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Isopoda): competition between two feminizing parasitic sex factors. Heredity 69, 382–390.
- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ. Toxicol. Pharmacol. 40, 241–258. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009
- Kang, J.-H., Aasi, D., Katayama, Y., 2007. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. Crit. Rev. Toxicol. 37, 607–625.
- Karplus, I., Sagi, A., Khalaila, I., Barki, A., 2003. The influence of androgenic gland implantation on the agonistic behavior of female crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in interactions with males. Behaviour 140, 649–663.
- Katakura, Y., 1975. Partial purification and characterization of androgenic gland hormone from the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. Annot Zool Jpn. 48, 203–209.
- Katakura, Y., 1961. Hormonal control of development of sexual characters in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. Annot. Zool. Jpn. 34, 60–71.
- Katakura, Y., 1960. Transformation of ovary into testis following implantation of androgenous glands in *Armadillidium vulgare*, an isopod crustacean. Annot. Zool. Jpn. 33, 241–244.
- Katakura, Y., 1959. Masculinization through implanting testes into the female *Armadillidium vulgare*, an isopod crustacean. Proc. Jpn. Acad. 35, 95–98.
- Katakura, Y., Hasegawa, Y., 1983. Masculinization of females of the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*, following injections of an active extract of the androgenic gland. Gen. Comp. Endocrinol. 49, 57–62.
- Katayama, H., Hojo, H., Ohira, T., Ishii, A., Nozaki, T., Goto, K., Nakahara, Yuko, Takahashi, T., Hasegawa, Y., Nagasawa, H., Nakahara, Yoshiaki, 2010. Correct disulfide pairing is required for the biological activity of crustacean androgenic gland hormone (AGH): synthetic studies

of AGH. Biochemistry 49, 1798-1807. https://doi.org/10.1021/bi902100f

- Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Kataliníc, J., Keller, R., 1989. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. FEBS Lett. 255, 10–14.
- Kelley, K.M., Schmidt, K.E., Berg, L., Sak, K., Galima, M.M., Gillespie, C., Balogh, L., Hawayek, A., Reyes, J.A., Jamison, M., 2002. Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. J. Endocrinol. 175, 3–18.
- Kelly, A., Dunn, A.M., Hatcher, M.J., 2002. Incomplete feminisation by the microsporidian sex ratio distorter, *Nosema granulosis*, and reduced transmission and feminisation efficiency at low temperatures. Int. J. Parasitol. 32, 825–831.
- Khalaila, I., Manor, R., Weil, S., Granot, Y., Keller, R., Sagi, A., 2002. The eyestalk–androgenic gland–testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 127, 147–156.
- Khayath, N., Vicogne, J., Ahier, A., BenYounes, A., Konrad, C., Trolet, J., Viscogliosi, E., Brehm, K., Dissous, C., 2007. Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. FEBS J. 274, 659–676. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05610.x
- King, D.S., 1964. Fine structure of the androgenic gland of the crab, *Pachygrapsus crassipes*. Gen. Comp. Endocrinol. 4, 533–544. https://doi.org/10.1016/0016-6480(64)90062-0
- Kiyama, R., Wada-Kiyama, Y., 2015. Estrogenic endocrine disruptors: molecular mechanisms of action. Environ. Int. 83, 11–40. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.05.012
- Köhler, H.-R., Kloas, W., Schirling, M., Lutz, I., Reye, A.L., Langen, J.-S., Triebskorn, R., Nagel, R., Schönfelder, G., 2007. Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. Ecotoxicol. Lond. Engl. 16, 131–143. https://doi.org/10.1007/s10646-006-0111-3
- Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H., 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. Bioinformatics 28, 3211–3217. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611
- Kosakovsky Pond, S.L., 2005. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. Mol. Biol. Evol. 22, 1208–1222. https://doi.org/10.1093/molbev/msi105
- Kracht, D., 1978. Intervention de quelques facteurs dans le contrôle du rythme annuel de la croissance et de l'évolution des caractères sexuels de l'écrevisse : *Orconectes limosus* (Rafinesque) Crustacé Décapode.
- Kremer, L.P.M., Korb, J., Bornberg-Bauer, E., 2018. Reconstructed evolution of insulin receptors in insects reveals duplications in early insects and cockroaches. J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol. https://doi.org/10.1002/jez.b.22809
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology 132, 2279–2286.
- Kristensen, T., Nielsen, A.I., Jørgensen, A.I., Mouritsen, K.N., Glenner, H., Christensen, J.T., Lützen, J., Høeg, J.T., 2012. The selective advantage of host feminization: a case study of the green crab *Carcinus maenas* and the parasitic barnacle *Sacculina carcini*. Mar. Biol. 159, 2015–2023.
- Kucharski, L.C., Capp, E., Chitto, A.L.F., Trapp, M., da Silva, R.S.M., Marques, M., 1999. Insulin signaling: Tyrosine kinase activity in the crab *Chasmagnathus granulata* gills. J. Exp. Zool. 283, 91–94. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990101)283:1<91::AID-JEZ10>3.0.CO;2-F
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 33, 1870–1874.

https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

- Lacombe, C., Grève, P., Martin, G., 1999. Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. Neuropeptides 33, 71–80. https://doi.org/10.1054/npep.1999.0016
- Lafont, R., Mathieu, M., 2007. Steroids in aquatic invertebrates. Ecotoxicol. Lond. Engl. 16, 109–130. https://doi.org/10.1007/s10646-006-0113-1
- Lafontaine, A., Baiwir, D., Joaquim-Justo, C., De Pauw, E., Lemoine, S., Boulangé-Lecomte, C., Forget-Leray, J., Thomé, J.-P., Gismondi, E., 2017. Proteomic response of *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas exposed to chlordecone: Identification of endocrine disruption biomarkers? Ecotoxicol. Environ. Saf. 141, 306–314. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.043
- Landmann, F., Foster, J.M., Slatko, B., Sullivan, W., 2010. Asymmetric *Wolbachia* segregation during early *Brugia malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e758.
- Le Roux, A., 1973. Influence de l'ablation des pédoncules oculaires sur *Nyctiphanes couchi* (Bell) (Crustacé: Euphausiacé). CR Acad Sci Paris 276, 1317–1320.
- LeBlanc, G.A., 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. Ecotoxicology 16, 61–81. https://doi.org/10.1007/s10646-006-0115-z
- LeBlanc, G.A., Medlock, E.K., 2015. Males on demand: the environmental–neuro-endocrine control of male sex determination in daphnids. FEBS J. 282, 4080–4093.
- Leclercq, S., Thézé, J., Chebbi, M.A., Giraud, I., Moumen, B., Ernenwein, L., Grève, P., Gilbert, C., Cordaux, R., 2016. Birth of a W sex chromosome by horizontal transfer of *Wolbachia* bacterial symbiont genome. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 15036–15041. https://doi.org/10.1073/pnas.1608979113
- Lee, H.-B., Peart, T.E., 2000. Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. Water Qual. Res. J. 35, 283–298.
- Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.-Y., Ahn, R.S., Lee, K., 2003. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. Toxicol. Sci. 75, 40–46.
- Leevers, S.J., 2001. Growth control: Invertebrate insulin surprises! Curr. Biol. 11, R209–R212. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00107-5
- Legrand, J.J., 1977. Déterminisme génétique et épigénétique du sexe chez les Crustacés Isopodes terrestres. Corrélation entre monogénie et intersexualité. Bull. Soc. Sci. nat. Tunisie 12, 3–12.
- Legrand, J.J., 1964. La différenciation sexuelle chez les Oniscoïdes gonochoriques. Comptes Rendus Séances Société Biol. CLVIII, 340.
- Legrand, J.J., 1959a. Effets de l'implantation testiculaire sur la structure de l'ovaire chez les Oniscoïdes supérieurs. C. R. Acad. Sc. Paris 1240–1243.
- Legrand, J.J., 1959b. Modifications du cycle sexuel chez les femelles des Oniscoïdes supérieurs ayant reçu un implantat testiculaire. C. R. Acad. Sc. Paris 1043–1046.
- Legrand, J.J., 1958. Mise en évidence histologique et expérimentale d'un tissu androgène chez les Oniscoïdes. C. R. Acad. Sc. Paris 1238–1261.
- Legrand, J.J., 1956a. Détermination polyfactorielle du sexe et double déterminisme des caractères sexuels mâles chez les Oniscoïdes. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 243, 1565–1568.
- Legrand, J.J., 1956b. Sur un nouveau type d'intersexualité chez l'Oniscoïde *Porcellio dilatatus*, révélé par l'élevage au laboratoire. C. R. Acad. Sc. Paris 1363–1365.
- Legrand, J.J., 1956c. Etude biométrique de la différenciation mâle des Oniscoïdes femelles ayant recu un implantat testiculaire - invalidité de la loi du tout ou rien. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 242, 686–688.
- Legrand, J.J., 1955. Rôle endocrinien du tissu nourricier dans le testicule des Crustacés Isopodes

terrestres. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 240, 120–122.

- Legrand, J.J., 1954a. Effets de l'implantation d'un testicule chez les femelles des Crustacés Isopodes terrestres. C. R. Acad. Sc. Paris 321–323.
- Legrand, J.J., 1954b. Induction des caractères sexuels secondaires mâles chez les femelles des Crustacés Isopodes terrestres par implantation testiculaire. C. R. Acad. Sc. Paris 2030–2032.
- Legrand, J.J., 1954c. Contribution à l'étude expérimentale de la différenciation du sexe chez les Crustacés Isopodes terrestres. Extr. Ann. Univ.
- Legrand, J.J., 1954d. Etude experimentale de la différenciation du sexe chez les Crustacés Isopodes terrestres par implantation homoplastique et héteroplastique d'ovaires chez les mâles. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 239, 108–110.
- Legrand, J.J., 1947. Modalité de la régénération des organes mâles externes chez les Oniscoïdes intesexués. Comptes Rendus Séances Société Biol. 141, 382–383.
- Legrand, J.J., 1946. Les coaptations sexuelles des Oniscoidea. Bull. biol. Fr. Belg. 80, 241–389.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1986. Rôle des bactéries symbiotiques dans l'intersexualité, la monogénie et la spéciation chez des Crustacés Oniscoïdes. Bolletino Zool. 53, 161–171. https://doi.org/10.1080/11250008609355500
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1984. Nouvelles données sur le déterminisme génétique et épigénétique de la monogénie.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1972. Le contrôle humoral de la sexualité chez les Crustacés Isopodes gonochoriques. Horm. Differ. Sex. Chez Invertebres Gordon Breach Paris Fr. 179–218.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1970. Modification expérimentale de la proportion des sexes chez les Crustacés Isopodes terrestres: induction de la thélygénie chez *Armadillidium vulgare* Latr. Acad Sci Paris CR Ser D 706–708.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1969a. Le déterminisme de l'intersexualité chez les Crustacés Isopodes terrestres; corrélation entre intersexualité et monogénie. CR Acad Sci Paris 268, 1647–1649.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1969b. Le déterminisme de la monogénie chez les Oniscoïdes. C. R. Acad. Sc. Paris 1774–1777.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1963. Description et analyse expérimentale d'un type d'intersexualité chez l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr. CR Acad. Sci. Paris 1606–1608.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1961. Sur la glande androgène d'un certain nombre de Péracarides, en particulier d'Isopodes marins. Comptes Rendus Séances Société Biol. CLV, 1360.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1960a. Mise en évidence anatomique et expérimentale des glandes androgènes de *Sphaeroma serratum* Fabricius (Isopode, Flabellifère). COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 250, 3401–3402.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1960b. Structure et origine de la glande androgène chez *Helleria brevicornis* Ebner (Oniscoidea, Tylidae). Comptes Rendus Séances Société Biol. CLIV, 676.
- Legrand, J.J., Juchault, P., 1960c. Disposition métamérique du tissu sécréteur de l'hormone mâle chez les différents types d'Oniscoïdes. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 250, 764–766.
- Legrand, J.J., Juchault, P., Artault, J.C., Mocquard, J.P., Picaud, J.L., 1974. Le statut systématique de la «forme» petiti Vandel de *Porcellio dilatatus* Brandt, récoltée à l'île Saint-Honorat (Alpes-Maritimes). Critères morphologiques, génétiques et physiologiques. Bull Soc Zool Fr 99, 461–471.
- Legrand, J.J., Juchault, P., Mocquard, J.P., Noulin, G., 1968. Contribution à l'étude du contrôle neurohumoral de la physiologie sexuelle mâle chez les Crustacés Isopodes terrestres. Ann Embryol Morphol 1, 97–105.
- Legrand, J.J., Legrand-Hamelin, E., Juchault, P., 1987. Sex determination in Crustacea. Biol. Rev. 62, 439–470.
- Legrand, J.J., Martin, G., Juchault, P., Besse, G., 1982. Contrôle neuroendocrine de la reproduction chez les Crustacés. J Physiol Paris 78, 543–552.

- Legrand, J.J., Noulin, G., 1961. Accélération de la différenciation sexuelle des régénérats d'appendices chez les femelles masculinisées de *Porcellio dilatatus* Brandt. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 252, 2151-.
- Legrand, J.J., Strouhal, H., Vandel, A., 1950. Remarques critiques sur quelques Trichoniscidae (Isopodes terrestres). Bull Soc Zool Fr. 75, 307–312.
- Legrand, J.J., Vandel, A., 1948. Le développement post-embryonnaire de la gonade chez les Isopodes terrestres normaux et intersexués. Evolution morphologique de la gonade. Bull Biol Fr Belg 82, 79–94.
- Legrand-Hamelin, E., 1976. Obtention de néo-mâles fonctionnels et démonstration expérimentale de l'hétérogamétie femelle chez *ldotea balthica* (Crustacé Isopode). Comptes Rendus Séances Société Biol. 171, 176–180.
- Lemos, Cristina Esteves, A., Samyn, B., Timperman, I., van Beeumen, J., Correia, A., van Gestel, C.A.M., Soares, A.M.V.M., 2010a. Protein differential expression induced by endocrine disrupting compounds in a terrestrial isopod. Chemosphere 79, 570–576. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.01.055
- Lemos, van Gestel, C.A.M., Soares, A.M.V.M., 2010b. Developmental toxicity of endocrine disrupters bisphenol A and vinclozolin in a terrestrial isopod. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 59, 274–281. https://doi.org/10.1007/s00244-010-9474-9
- Lemos, van Gestel, C.A.M., Soares, A.M.V.M., 2010c. Reproductive toxicity of the endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804). Chemosphere 78, 907–913. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.063
- Lemos, van Gestel, C.A.M., Soares, A.M.V.M., 2009. Endocrine disruption in a terrestrial isopod under exposure to bisphenol A and vinclozolin. J. Soils Sediments 9, 492–500. https://doi.org/10.1007/s11368-009-0104-y
- Lenaerts, C., Palmans, J., Marchal, E., Verdonck, R., Vanden Broeck, J., 2017. Role of the venus kinase receptor in the female reproductive physiology of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Sci. Rep. 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11434-3
- Levy, T., Rosen, O., Eilam, B., Azulay, D., Aflalo, E.D., Manor, R., Shechter, A., Sagi, A., 2016. A single injection of hypertrophied androgenic gland cells produces all-female aquaculture. Mar. Biotechnol. N. Y. N 18, 554–563. https://doi.org/10.1007/s10126-016-9717-5
- Levy, T., Rosen, O., Simons, O., Savaya Alkalay, A., Sagi, A., 2017. The gene encoding the insulinlike androgenic gland hormone in an all-female parthenogenetic crayfish. PLOS ONE 12, e0189982. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189982
- Lewis, S.E., Yokofich, A., Mohr, M., Kurth, C., Giuliani, R., Baldridge, M.G., 2012. Exposure to bisphenol A modulates hormone concentrations in *Gammarus pseudolimnaeus*. Can. J. Zool. 90, 1414–1421. https://doi.org/10.1139/cjz-2012-0178
- Lezer, Y., Aflalo, E.D., Manor, R., Sharabi, O., Abilevich, L.K., Sagi, A., 2015. On the safety of RNAi usage in aquaculture: The case of all-male prawn stocks generated through manipulation of the insulin-like androgenic gland hormone. Aquaculture 435, 157–166. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.040
- Li, F., Bai, H., Xiong, Y., Fu, H., Jiang, S., Jiang, F., Jin, S., Sun, S., Qiao, H., Zhang, W., 2015a. Molecular characterization of insulin-like androgenic gland hormone-binding protein gene from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and investigation of its transcriptional relationship with the insulin-like androgenic gland hormone gene. Gen. Comp. Endocrinol. 216, 152–160. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.007
- Li, F., Bai, H., Zhang, W., Fu, H., Jiang, F., Liang, G., Jin, S., Sun, S., Qiao, H., 2015b. Cloning of genomic sequences of three crustacean hyperglycemic hormone superfamily genes and elucidation of their roles of regulating insulin-like androgenic gland hormone gene. Gene 561, 68–75. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.012
- Li, F.J., Jiang, F.W., Bai, H.K., Fu, H.T., Jin, S.B., Sun, S.M., Qiao, H., Zhang, W.Y., 2015.

Genomic cloning, expression, and single nucleotide polymorphism association analysis of the insulin-like androgenic gland hormone gene in the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). Genet. Mol. Res. 14, 5910–5921. https://doi.org/10.4238/2015.June.1.8

- Li, N., Zhang, Z., Zhang, L., Wang, S., Zou, Z., Wang, G., Wang, Y., 2012. Insulin-like growth factor binding protein 7, a member of insulin-like growth factor signal pathway, involved in immune response of small abalone *Haliotis diversicolor*. Fish Shellfish Immunol. 33, 229–242. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.04.016
- Li, S., Li, F., Sun, Z., Xiang, J., 2012. Two spliced variants of insulin-like androgenic gland hormone gene in the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Gen. Comp. Endocrinol. 177, 246–255. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.010
- Li, S., Li, F., Yu, K., Xiang, J., 2018. Identification and characterization of a doublesex gene which regulates the expression of insulin-like androgenic gland hormone in *Fenneropenaeus chinensis*. Gene. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.043
- Li, W., Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics 22, 1658–1659. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158
- Li, W., Jaroszewski, L., Godzik, A., 2001. Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. Bioinforma. Oxf. Engl. 17, 282–283.
- Lin, C.-L., Wang, P.-C., Chuang, N.-N., 1993. Specific phosphorylation of membrane proteins of Mr 44, 000 and Mr 32,000 by the autophosphorylated insulin receptor from the hepatopancreas of the Shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). J. Exp. Zool. 267, 113–119. https://doi.org/10.1002/jez.1402670204
- Liu, C., Chen, L., Pichon, S., Felix, C., Cerveau, N., Leclercq, S., Lesobre, J., Moumen, B., Bourtzis, K., Cordaux, R., Bouchon, D., Garrett, R., Grève, P., In prep. Genome sequence of the feminizing *Wolbachia* wVulC from the isopod crustacean *Armadillidium vulgare* identifies multiple secretion/export systems and putative effectors in a bacterial endosymbiont. Prep.
- Lu, H.-L., Pietrantonio, P.V., 2011. Insect insulin receptors: insights from sequence and caste expression analyses of two cloned hymenopteran insulin receptor cDNAs from the fire ant: Two insulin receptors in social insects. Insect Mol. Biol. 20, 637–649. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01094.x
- Lugo, J.M., Morera, Y., Rodríguez, T., Huberman, A., Ramos, L., Estrada, M.P., 2006. Molecular cloning and characterization of the crustacean hyperglycemic hormone cDNA from *Litopenaeus schmitti*: Functional analysis by double-stranded RNA interference technique. FEBS J. 273, 5669–5677. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05555.x
- Malakar, P., Chartarifsky, L., Hija, A., Leibowitz, G., Glaser, B., Dor, Y., Karni, R., 2016. Insulin receptor alternative splicing is regulated by insulin signaling and modulates beta cell survival. Sci. Rep. 6, 31222.
- Malecha, S.R., Nevin, P.A., Ha, P., Barck, L.E., Lamadrid-Rose, Y., Masuno, S., Hedgecock, D., 1992. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 105, 201–218.
- Malo, N., 1970a. Premières observations ultrastructurales de la glande androgène d'*Oniscus asellus*, Crustacé Isopode, et ses modifications en fonction de la température d'élevage. CR Acad SciParis 270, 2483–2485.
- Malo, N., 1970b. Contribution à l'étude des variations ultrastructurale de la glande androgène des Oniscoïdes supérieurs (Crustacés Isopodes), à la suite de la décérébration. CR Acad Sci Ser D 271, 230–232.
- Malo, N., 1969. Ultrastructure de la glande androgène chez les Oniscoïdes, ses variations en fonction de différents facteurs externes et internes.
- Manor, R., Aflalo, E.D., Segall, C., Weil, S., Azulay, D., Ventura, T., Sagi, A., 2004. Androgenic

gland implantation promotes growth and inhibits vitellogenesis in *Cherax quadricarinatus* females held in individual compartments. Invertebr. Reprod. Dev. 45, 151–159. https://doi.org/10.1080/07924259.2004.9652584

- Manor, R., Weil, S., Oren, S., Glazer, L., Aflalo, E.D., Ventura, T., Chalifa-Caspi, V., Lapidot, M., Sagi, A., 2007. Insulin and gender: An insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. Gen. Comp. Endocrinol. 150, 326–336. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.09.006
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Bryant, S.H., 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. Nucleic Acids Res. 43, D222-226. https://doi.org/10.1093/nar/gku1221
- Marcial, H.S., Hagiwara, A., Snell, T.W., 2003. Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. Environ. Toxicol. Chem. 22, 3025–3030.
- Marco, H.G., Verlinden, H., Vanden Broeck, J., Gäde, G., 2017. Characterisation and pharmacological analysis of a crustacean G protein-coupled receptor: the red pigmentconcentrating hormone receptor of *Daphnia pulex*. Sci. Rep. 7, 6851. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06805-9
- Marcus, B., Wägele, R., Wägele, J.W., 2014. Advances in molecular phylogeny of crustaceans in the light of phylogenomic data, in: Wägele, J.W., Bartolomaeus, T. (Eds.), Deep Metazoan Phylogeny: The Backbone of the Tree of Life. DE GRUYTER, Berlin, Boston. https://doi.org/10.1515/9783110277524.385
- Mareddy, V.R., Rosen, O., Thaggard, H.B., Manor, R., Kuballa, A.V., Aflalo, E.D., Sagi, A., Paterson, B., Elizur, A., 2011. Isolation and characterization of the complete cDNA sequence encoding a putative insulin-like peptide from the androgenic gland of *Penaeus monodon*. Aquaculture 318, 364–370. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.027
- Martin, G., 1981. Contribution à l'étude cytologique et fonctionnelle des systèmes de neurosécrétion des Crustacés Isopodes.
- Martin, G., Gruppe, S.G., Laulier, M., Bouchon, D., Rigaud, T., Juchault, P., 1994. Evidence for *Wolbachia spp.* in the estuarine isopod *Sphaeroma rugicauda* (Crustacea): a likely cytoplasmic sex ratio distorter. Endocytobiosis Cell Res. 10, 215–215.
- Martin, G., Juchault, P., 1999. Androgenic hormone specificity in terrestrial isopods (Oniscidea): systematic involvements. J. Crustac. Biol. 19, 684–689.
- Martin, G., Juchault, P., Legrand, J.J., 1973. Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* Latr., dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation total des males génétiques de la lignée thélygène. CR Acad Sci Paris 276, 2313–2316.
- Martin, G., Juchault, P., Mocquard, J.P., Raimond, R., Rigaud, T., Souty-Grosset, C., 1989. Feminizing endocellular bacteria in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea Oniscidea), in: Endocyotobiology IV. Nardon, P., pp. 403–408.
- Martin, G., Juchault, P., Sorokine, O., van Dorsselaer, A., 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). Gen. Comp. Endocrinol. 80, 349–354.
- Martin, G., Sorokine, O., Moniatte, M., Bulet, P., Hetru, C., Van Dorsselaer, A., 1999. The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*. Eur. J. Biochem. FEBS 262, 727–736.
- Martin, G., Sorokine, O., Moniatte, M., Vandorsselaer, A., 1998. The androgenic hormone of the crustacean isopod *Armadillidium vulgare*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 839, 111–117.
- Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. Environ. Toxicol. Chem. 17, 37–43.

Mead, F., 1973. Recherches sur la reproduction et le comportement sexuel des Isopodes terrestres.

- Meissner, G.W., Luo, S.D., Dias, B.G., Texada, M.J., Baker, B.S., 2016. Sex-specific regulation of Lgr3 in *Drosophila* neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, E1256–E1265. https://doi.org/10.1073/pnas.1600241113
- Menting, J.G., Whittaker, J., Margetts, M.B., Whittaker, L.J., Kong, G.K.-W., Smith, B.J., Watson, C.J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., 2013. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. Nature 493, 241. https://doi.org/10.1038/nature11781
- Meusy, J.J., 1965. Modifications ultrastructurales des glandes androgènes de *Carcinus maenas* L. (Crustacé Decapode) consécutives à l'ablation des pédoncules oculaires. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 260, 5901–5903.
- Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., Kahn, C.R., 2000. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. Mol. Cell 6, 87–97.
- Mocquard, J.P., HUCHAULT, P., Jambu, P., Fustec, E., 1987. Essai d'évaluation du rôle des crustacés oniscoïdes dans la transformation des litières végétales dans une forêt feuillue de l'ouest de la France. Rev. Ecol. Biol. Sol 24, 311–327.
- Mocquard, J.P., Juchault, P., Souty-Grosset, C., 1989. The role of environmental factors (temperature and photoperiod) in the reproduction of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804).
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87, 5185–5190.
- Mu, X., Rider, C.V., Hwang, G.S., Hoy, H., LeBlanc, G.A., 2005. Covert signal disruption: antiecdysteroidal activity of bisphenol a involves cross talk between signaling pathways. Environ. Toxicol. Chem. 24, 146–152.
- Mulenga, A., Khumthong, R., 2010. Silencing of three *Amblyomma americanum* (L.) insulin-like growth factor binding protein-related proteins prevents ticks from feeding to repletion. J. Exp. Biol. 213, 1153–1161. https://doi.org/10.1242/jeb.035204
- Murrell, B., Wertheim, J.O., Moola, S., Weighill, T., Scheffler, K., Kosakovsky Pond, S.L., 2012. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. PLoS Genet. 8, e1002764. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002764
- Nagabhushanam, R., Kulkarni, G.K., 1981. Effect of exogenous testosterone on the androgenic gland and testis of a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture 23, 19–27.
- Nagamine, C., Knight, A.W., 1987. Masculinization of female crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). Int. J. Invertebr. Reprod. Dev. 11, 77–87. https://doi.org/10.1080/01688170.1987.10510268
- Nagamine, C., Knight, A.W., Maggenti, A., Paxman, G., 1980a. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. Gen. Comp. Endocrinol. 41, 442–457.
- Nagamine, C., Knight, A.W., Maggenti, A., Paxman, G., 1980b. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. Gen. Comp. Endocrinol. 41, 423– 441.
- Nagaraju, G.P.C., 2011. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. J. Exp. Biol. 214, 3–16.
- Nagaraju, G.P.C., 2007. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? Aquaculture 1, 39–54.
- Nair, C.M., Salin, K.R., Raju, M.S., Sebastian, M., 2006. Economic analysis of monosex culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man): a case study. Aquac. Res. 37,

949–954.

- Nakatsuji, T., Lee, C.-Y., Watson, R.D., 2009. Crustacean molt-inhibiting hormone: structure, function, and cellular mode of action. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 152, 139–148.
- Natarajan, K., Berk, B.C., 2006. Crosstalk Coregulation Mechanisms of G Protein-Coupled Receptors and Receptor Tyrosine Kinases, in: Transmembrane Signaling Protocols. Humana Press, New Jersey, pp. 51–78. https://doi.org/10.1385/1-59745-048-0:51
- Nef, S., Verma-Kurvari, S., Merenmies, J., Vassalli, J.-D., Efstratiadis, A., Accili, D., Parada, L.F., 2003. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. Nature 426, 291–295. https://doi.org/10.1038/nature02059
- Negishi, S., Hasegawa, Y., Nakajima, Y., 2001. Novel Structures in Secreting the Androgenic Gland Hormone. Zoolog. Sci. 18, 1237–1243. https://doi.org/10.2108/zsj.18.1237
- Negri, I., Pellecchia, M., Mazzoglio, P.J., Patetta, A., Alma, A., 2006. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 273, 2409–2416.
- Neirijnck, Y., Calvel, P., Kilcoyne, K.R., Kühne, F., Stévant, I., Griffeth, R.J., Pitetti, J.-L., Andric, S.A., Hu, M.-C., Pralong, F., Smith, L.B., Nef, S., 2018. Insulin and IGF1 receptors are essential for the development and steroidogenic function of adult Leydig cells. FASEB J. 32, 3321–3335. https://doi.org/10.1096/fj.201700769RR
- Noël, F., Séchet, E., 2007. Crustacés Isopodes terrestres du Nord-Ouest de la France (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). Invertébr. Armor. 1–48.
- Oh, Y., Nagalla, S.R., Yamanaka, Y., Kim, H.-S., Wilson, E., Rosenfeld, R.G., 1996. Synthesis and characterization of Insulin-like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP)-7 recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and-II. J. Biol. Chem. 271, 30322–30325. https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30322
- Ohira, T., Hasegawa, Y., Tominaga, S., Okuno, A., Nagasawa, H., 2003. Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding androgenic gland hormone precursors from two Porcellionidae species, *Porcellio scaber* and *P. dilatatus*. Zoolog. Sci. 20, 75–81. https://doi.org/10.2108/zsj.20.75
- Ohno, S., 1970. Evolution by Gene Duplication. Springer, New York.
- Okuno, A., Hasegawa, Y., Nagasawa, H., 1997. Purification and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*. Zoolog. Sci. 14, 837–842. https://doi.org/10.2108/zsj.14.837
- Okuno, A., Hasegawa, Y., Nishiyama, M., Ohira, T., Ko, R., Kurihara, M., Matsumoto, S., Nagasawa, H., 2002. Preparation of an active recombinant peptide of crustacean androgenic gland hormone. Peptides 23, 567–572.
- Okuno, A., Hasegawa, Y., Ohira, T., Katakura, Y., Nagasawa, H., 1999. Characterization and cDNA cloning of androgenic gland hormone of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 264, 419–423. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1522
- Okuno, A., Hasegawa, Y., Ohira, T., Nagasawa, H., 2001. Immunological identification of crustacean androgenic gland hormone, a glycopeptide. Peptides 22, 175–181.
- Olmstead, A.W., Leblanc, G.A., 2002. Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna*. J. Exp. Zool. 293, 736–739.
- Otsu, T., 1963. Bihormonal control of sexual cycle in the freshwater crab, *Potamon dehaani*. Embryologia (Nagoya) 8, 1–20.
- Panouse, J.B., 1944. L'action de la glande du sinus sur l'ovaire chez crevette *Leander serratus*. CR Acad Sci Paris 218, 293–294.
- Panouse, J.B., 1943. Influence de l'ablation du pédoncule oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette </i>Leander serratus</i>. CR Acad. Sci. 553–555.
- Payen, G., Costlow Jr, J.D., Charniaux-Cotton, H., 1971. Etude comparative de l'ultrastructure des

glandes androgènes de crabes normaux et pédonculectomisés pendant la vie larvaire ou après la puberté chez les espèces: *Rhithropanopeus harrisii* (Gould) et *Callinectes sapidus* Rathbun. Gen. Comp. Endocrinol. 17, 526–542. https://doi.org/10.1016/0016-6480(71)90187-0

- Pearlman, A., Loke, J., Le Caignec, C., White, S., Chin, L., Friedman, A., Warr, N., Willan, J., Brauer, D., Farmer, C., 2010. Mutations in MAP3K1 cause 46, XY disorders of sex development and implicate a common signal transduction pathway in human testis determination. Am. J. Hum. Genet. 87, 898–904.
- Peng, Y., Leung, H.C.M., Yiu, S.-M., Lv, M.-J., Zhu, X.-G., Chin, F.Y.L., 2013. IDBA-tran: a more robust *de novo* de Bruijn graph assembler for transcriptomes with uneven expression levels. Bioinformatics 29, i326–i334. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt219
- 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. https://doi.org/10.1038/nmeth.1701
- Pettersson, I., Berg, C., 2007. Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. Environ. Toxicol. Chem. 26, 1005–1009.
- Pitetti, J.-L., Calvel, P., Romero, Y., Conne, B., Truong, V., Papaioannou, M.D., Schaad, O., Docquier, M., Herrera, P.L., Wilhelm, D., Nef, S., 2013. Insulin and IGF1 Receptors Are Essential for XX and XY Gonadal Differentiation and Adrenal Development in Mice. PLoS Genet. 9, e1003160. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003160
- Plahuta, M., Tišler, T., Pintar, A., Toman, M.J., 2015. Adverse effects of bisphenol A on water louse (*Asellus aquaticus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 117, 81–88. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.031
- Plahuta, M., Tišler, T., Toman, M.J., Pintar, A., 2017. Toxic and endocrine disrupting effects of wastewater treatment plant influents and effluents on a freshwater isopod *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). Chemosphere 174, 342–353. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.137
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2008. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. Chemosphere 71, 1870–1876.
- Pohlert, 2014. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR).
- Pond, S.L.K., Frost, S.D.W., 2005. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. Bioinformatics 21, 2531–2533. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti320
- Pond, S.L.K., Frost, S.D.W., Muse, S.V., 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. Bioinformatics 21, 676–679. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti079
- Pyne, N.J., Pyne, S., 2011. Receptor tyrosine kinase–G-protein-coupled receptor signalling platforms: out of the shadow? Trends Pharmacol. Sci. 32, 443–450.
- Radu, V.G., Craciun, C., 1976. The ultrastructure of the androgenic gland in *Porcellio scaber* Latr. (terrestrial isopods). Cell Tissue Res. 175, 245–263.
- Radulović, Ž.M., Porter, L.M., Kim, T.K., Bakshi, M., Mulenga, A., 2015. *Amblyomma americanum* tick saliva insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 binds insulin but not insulin-like growth factors. Insect Mol. Biol. 24, 539–550. https://doi.org/10.1111/imb.12180
- Raimond, R., Juchault, P., 1983. Masculinisation des femelles prépubères et pubères de *Sphaeroma serratum* Fabr., (Crustacé Isopode Flabellifère) par implantation d'une glande androgène de mâle pubère. Gen. Comp. Endocrinol. 50, 146–155.
- Rangneker, P.V., Madhyastha, M.N., Latey, A.N., 1971. Hormonal control of reproduction in the male crab, *Scylla serrata* (Forskal). J Anim Morphol Physiol 18, 17–29.

- Reidenbach, J.M., 1971. Les mécanismes endocriniens dans le contrôle de la différenciation du sexe, la physiologie sexuelle et la mue chez le Crustacé Isopode marine: *Idotea balthica* (Pallas). These Dr. Etat Arch. CNRS No 4874 1–335.
- Reidenbach, J.M., 1966. Mise en évidence d'une intervention du complexe neurosécréteur céphalique dans la physiologie sexuelle chez le Crustacé, Isopode marin *Idotea balthica basteri* Audouin. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. Ser. D 262, 682–684.
- Reidenbach, J.M., 1965. Effets de l'ablation du complexe neurosécréteur céphalique chez les femelles du Crustacé Isopode marin *Idotea balthica basteri* Audouin. Premiers resultats. COMPTES RENDUS Hebd. SEANCES Acad. Sci. 261, 4237-+.
- Reinhard, E.G., 1956. Parasitic castration of Crustacea. Exp. Parasitol. 5, 79–107. https://doi.org/10.1016/0014-4894(56)90007-8
- Reverberi, G., 1942. Sul significato della "castrazione parassitaria". La transformazione del sesso nei Crostacei parassitati da Bopiridi e da Rizocefali. Pubblicazioni Della Stazione Zool. Napoli 19, 225–316.
- Ribeiro, E., Ladeira, C., Viegas, S., 2017. Occupational exposure to bisphenol A (BPA): a reality that still needs to be unveiled. Toxics 5, 22. https://doi.org/10.3390/toxics5030022
- Richter, S., Scholtz, G., 2001. Phylogenetic analysis of the Malacostraca (Crustacea). J. Zool. Syst. Evol. Res. 39, 113–136.
- Rigaud, T., 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts. Influ. Passeng. Inherit. Microorg. Arthropod Reprod. 81–101.
- Rigaud, T., Antoine, D., Marcadé, I., Juchault, P., 1997a. The effect of temperature on sex ratio in the Isopod *Porcellionides pruinosus*: Environmental sex determination or a by-product of cytoplasmic sex determination? Evol. Ecol. 11, 205–215.
- Rigaud, T., Juchault, P., 1998. Sterile intersexuality in an Isopod induced by the interaction between a bacterium (*Wolbachia*) and the environment. Can. J. Zool. 76, 493–499. https://doi.org/10.1139/z97-216
- Rigaud, T., Juchault, P., 1995. Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. J. Evol. Biol. 8, 249–255. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1995.8020249.x
- Rigaud, T., Juchault, P., 1989. Effets de la température sur la bactérie symbiotique féminisante d'*Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé, Isopode terrestre); conséquences physiologiques et populationnelles. Bull. Société Décophysiologie 14, 91–98.
- Rigaud, T., Juchault, P., Mocquard, J.-P., 1997b. The evolution of sex determination in isopod crustaceans. Bioessays 19, 409–416.
- Rigaud, T., Juchault, P., Mocquard, J.P., 1991a. Experimental study of temperature effects on the sex ratio of broods in terrestrial Crustacea *Armadillidium vulgare* Latr. Possible implications in natural populations. J. Evol. Biol. 4, 603–617. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1991.4040603.x
- Rigaud, T., Juchault, P., Mocquard, J.-P., Martin, G., Raimond, R., Souty-Grosset, C., 1990. Thermosensitivity of the feminizing endocytobiote of the terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea): effects on the sexual physiology of the host and the sex ratio of the broods., in: Endocytobiology IV: 4th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis. Institut National de la Recherche Agronomique, p. 409.
- Rigaud, T., Mocquard, J.P., Juchault, P., 1992. The spread of parasitic sex factors in populations of *Armadillidium vulgare* Latr (Crustacea, Oniscidea): effects on sex ratio. Genet. Sel. Evol. 24, 3.
- Rigaud, T., Moreau, J., Juchault, P., 1999. *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: sex ratio distortion and effect on fecundity. Heredity 83, 469–475.
- Rigaud, T., Souty-Grosset, C., Raimond, R., Mocquard, J.P., Juchault, P., 1991b. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent

acquisitions. Endocyto Cell Res 7, 259–273.

- Rodgers, B.D., Roalson, E.H., Thompson, C., 2008. Phylogenetic analysis of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) and IGFBP-related protein gene families. Gen. Comp. Endocrinol. 155, 201–207. https://doi.org/10.1016/j.vgcen.2007.04.013
- Rosen, O., Manor, R., Weil, S., Gafni, O., Linial, A., Aflalo, E.D., Ventura, T., Sagi, A., 2010. A sexual shift induced by silencing of a single insulin-like gene in crayfish: ovarian upregulation and testicular degeneration. PLoS ONE 5, e15281. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015281
- Rosen, O., Weil, S., Manor, R., Roth, Z., Khalaila, I., Sagi, A., 2013. A Crayfish Insulin-likebinding Protein: another piece in the androgenic gland insulin-like hormone puzzle is revealed. J. Biol. Chem. 288, 22289–22298. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484279
- Rotllant, G., Nguyen, T.V., Aizen, J., Suwansa-ard, S., Ventura, T., 2018. Toward the identification of female gonad-stimulating factors in crustaceans. Hydrobiologia. https://doi.org/10.1007/s10750-017-3497-4
- Rousset, F., Bouchon, D., Juchault, P., Pintureau, B., Solignac, M., 1993. Molecular diversity of *Wolbachia*, endosymbiont of Arthropod, in: Endocytobiology V: 5th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Phillips University-Japan, Uji-Kyoto, June 23-27, 1992. Tübingen University Press, p. 127.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P., Solignac, M., 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in Arthropods. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 250, 91–98. https://doi.org/10.1098/rspb.1992.0135
- Roy, S.G., Hansen, I.A., Raikhel, A.S., 2007. Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 1317–1326.
- Rubiliani, C., Payen, G.G., 1979. Modalités de la destruction des régions neurosécrétrices des crabes *Carcinus maenas* (L.) et *C. mediterraneus* Czerniavsky infestés par la sacculine. Gen. Comp. Endocrinol. 38, 215–228. https://doi.org/10.1016/0016-6480(79)90209-0
- Rubiliani-Durozoi, M., Rubiliani, C., Payen, G.G., 1980. Déroulement des gamétogenèses chez les crabes *Carcinus maenas* (L.) et *C. mediterraneus* Czerniavsky parasités par la Sacculine. Int. J. Invertebr. Reprod. 2, 107–120. https://doi.org/10.1080/01651269.1980.10553346
- Sagi, A., Aflalo, E.D., 2005. The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man): a biotechnological perspective. Aquac. Res. 36, 231– 237. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01238.x
- Sagi, A., Cohen, D., Milner, Y., 1990. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Gen. Comp. Endocrinol. 77, 15–22.
- Sagi, A., Khalaila, I., 2001. The Crustacean androgen: a hormone in an Isopod and androgenic activity in Decapods. Am. Zool. 41, 477–484. https://doi.org/10.1668/0003-1569(2001)041[0477:TCAAHI]2.0.CO;2
- Sagi, A., Ra'anan, Z., Cohen, D., Wax, Y., 1986. Production of *Macrobrachium rosenbergii* in monosex populations: Yield characteristics under intensive monoculture conditions in cages. Aquaculture 51, 265–275. https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90318-2
- Sagi, A., Snir, E., Khalaila, I., 1997. Sexual differentiation in Decapod crustaceans: role of the androgenic gland. Invertebr. Reprod. Dev. 31, 55–61. https://doi.org/10.1080/07924259.1997.9672563
- Sang, M., Li, C., Wu, W., Li, B., 2016. Identification and evolution of two insulin receptor genes involved in *Tribolium castaneum* development and reproduction. Gene 585, 196–204. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.034
- Sarfstein, R., Werner, H., 2015. The INSR/IGF1R Receptor Family, in: Wheeler, D.L., Yarden, Y. (Eds.), Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies. Springer International

Publishing, Cham, pp. 297–320.

- Sarojini, R., Gyananath, G., 1985. Seasonal variations and the role of neurosecretory hormones on the androgenic gland of the prawn *Macrohrachium lamerrii*. Proc. Anim. Sci. 94, 503–508.
- Sarojini, S., 1963. Comparison of the effects of androgenic hormone and testosterone propionate on the female ocypod crab. Curr. Sci. 32, 411–412.
- Savaya Alkalay, A., Rosen, O., Sokolow, S.H., Faye, Y.P.W., Faye, D.S., Aflalo, E.D., Jouanard, N., Zilberg, D., Huttinger, E., Sagi, A., 2014. The prawn *Macrobrachium vollenhovenii* in the Senegal river basin: towards sustainable restocking of all-male populations for biological control of schistosomiasis. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, e3060. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003060
- Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L.Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D.J., Madden, T.L., Maglott, D.R., Miller, V., Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Sequeira, E., Sherry, S.T., Shumway, M., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T.A., Wagner, L., Yaschenko, E., Ye, J., 2009. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 37, D5–D15. https://doi.org/10.1093/nar/gkn741
- Schmidt, C., 2008. Phylogeny of the terrestrial Isopoda (Oniscidea): a review. Arthropod Syst. Phylogeny 66, 191 226.
- Seino, S., Seino, M., Nishi, S., Bell, G.I., 1989. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 114–118.
- Shabanpoor, F., Separovic, F., Wade, J.D., 2009. The human insulin superfamily of polypeptide hormones. Vitam. Horm. 80, 1–31.
- Sharabi, O., Manor, R., Weil, S., Aflalo, E.D., Lezer, Y., Levy, T., Aizen, J., Ventura, T., Mather, P.B., Khalaila, I., Sagi, A., 2016. Identification and characterization of an insulin-like receptor involved in crustacean reproduction. Endocrinology 157, 928–941. https://doi.org/10.1210/en.2015-1391
- Sharpe, R.M., 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 20, 91–110. https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.005
- Shingleton, A.W., 2005. Body-size regulation: combining genetics and physiology. Curr. Biol. 15, R825–R827.
- Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V., Zdobnov, E.M., 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31, 3210–3212. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351
- Sloth Andersen, A., 2000. A new secreted insect protein belonging to the immunoglobulin superfamily binds insulin and related peptides and inhibits their activities. J. Biol. Chem. 275, 16948–16953. https://doi.org/10.1074/jbc.M001578200
- Smith, P.J., McVeagh, M., 1991. Widespread organotin pollution in New Zealand coastal waters as indicated by imposex in dogwhelks. Mar. Pollut. Bull. 22, 409–413.
- Song, K., Xu, T., Zang, Y., Serwadda, A., Dai, T., Ma, Y., Shen, H., 2018. Insulin-like androgenic gland hormone gene in the freshwater chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA cloning, expression pattern, and interaction with EsIGFBP7. Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 18, 17–25.
- Song, Y., Evenseth, L.M., Iguchi, T., Tollefsen, K.E., 2017. Release of chitobiase as an indicator of potential molting disruption in juvenile *Daphnia magna* exposed to the ecdysone receptor agonist 20-hydroxyecdysone. J. Toxicol. Environ. Health A 80, 954–962. https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1352215
- Souty-Grosset, C., Juchault, P., 1987. Etude de la synthèse de la vitellogénine chez les mâles intersexués d'*Armadillidium vulgare* Latreille (Crustacé Isopode Oniscoïde): comparaison

avec les mâles et les femelles intactes ou ovariectomisées. Gen. Comp. Endocrinol. 66, 163–170.

- Soyez, D., Feijen, J., Van Deijnen, J.E., 1982. Preliminary results on the separation of *Homarus americanus* (L.) neuropeptides by high performance liquid chromatography using four bioassays. J Endocrinol 94, 23p.
- Soyez, D., Le Caer, J.P., Noel, P.Y., Rossier, J., 1991. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. Neuropeptides 20, 25–32. https://doi.org/10.1016/0143-4179(91)90036-I
- Soyez, D., Van Deijnen, J.E., Martin, M., 1987. Isolation and characterization of a vitellogenesisinhibiting factor from sinus glands of the lobster, *Homarus americanus*. J. Exp. Zool. 244, 479–484. https://doi.org/10.1002/jez.1402440314
- Sroyraya, M., Chotwiwatthanakun, C., Stewart, M.J., Soonklang, N., Kornthong, N., Phoungpetchara, I., Hanna, P.J., Sobhon, P., 2010. Bilateral eyestalk ablation of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, produces hypertrophy of the androgenic gland and an increase of cells producing insulin-like androgenic gland hormone. Tissue Cell 42, 293–300. https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.07.003
- Staples, C., Friederich, U., Hall, T., Klečka, G., Mihaich, E., Ortego, L., Caspers, N., Hentges, S., 2010. Estimating potential risks to terrestrial invertebrates and plants exposed to bisphenol A in soil amended with activated sludge biosolids. Environ. Toxicol. Chem. 29, 467–475. https://doi.org/10.1002/etc.49
- Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T.-B.G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Paul Bennett, E., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H.H., Levery, S.B., Clausen, H., 2013.
  Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. EMBO J. 32, 1478–1488. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79
- Suzuki, S., 1999. Androgenic gland hormone is a sex-reversing factor but cannot be a sexdetermining factor in the female crustacean isopods *Armadillidium vulgare*. Gen. Comp. Endocrinol. 115, 370–378. https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7324
- Suzuki, S., Yamasaki, K., 1998. Sex reversal by implantations of ethanol-treated androgenic glands of female isopods, *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). Gen. Comp. Endocrinol. 111, 367–375.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., 1997. Sexual bipotentiality of developing ovaries in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). Gen. Comp. Endocrinol. 107, 136–146. https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6914
- Suzuki, S., Yamasaki, K., 1995. Morphological studies on sexual differentiation in *Armadillidium vulgare*. Crustac. Res. 24, 93–103.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., 1991. Sex-reversal of male *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Malacostraca, Crustacea) following andrectomy and partial gonadectomy. Gen. Comp. Endocrinol. 83, 375–378.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., Katakura, Y., 1990. Vitellogenin synthesis in andrectomized males of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare* (Malacostracan Crustacea). Gen. Comp. Endocrinol. 77, 283–291.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., Katakura, Y., 1989. Vitellogenin synthesis by fat body and ovary in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. Gen. Comp. Endocrinol. 74, 120–126.
- Sweeney, M.F., Hasan, N., Soto, A.M., Sonnenschein, C., 2015. Environmental endocrine disruptors: effects on the human male reproductive system. Rev. Endocr. Metab. Disord. 16, 341–357. https://doi.org/10.1007/s11154-016-9337-4
- Taketomi, Y., Nishikawa, S., 1996. Implantation of androgenic glands into immature female crayfish, *Procambarus clarkii*, with masculinization of sexual characteristics. J. Crustac. Biol. 16, 232–239. https://doi.org/10.2307/1548879

Takewaki, K., Nakamura, N., 1944. The effects of gonadectomy on the sex characters of *Armadillidium vulgare*, an isopod crustacean. J Fac Sci Tokyo Univ 4, 369–382.

- Talavera, G., Castresana, J., 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. Syst. Biol. 56, 564–577. https://doi.org/10.1080/10635150701472164
- Tamschick, S., Rozenblut-Kościsty, B., Ogielska, M., Lehmann, A., Lymberakis, P., Hoffmann, F., Lutz, I., Kloas, W., Stöck, M., 2016. Sex reversal assessments reveal different vulnerability to endocrine disruption between deeply diverged anuran lineages. Sci. Rep. 6, 23825.
- Taylor, M.J., Bandi, C., Hoerauf, A., 2005. *Wolbachia*. Bacterial endosymbionts of filarial nematodes. Adv. Parasitol. 60, 245–284.
- Tiu, S.H.-K., Chan, S.-M., 2007. The use of recombinant protein and RNA interference approaches to study the reproductive functions of a gonad-stimulating hormone from the shrimp *Metapenaeus ensis*: functional study of crustacean neuropeptide. FEBS J. 274, 4385–4395. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05968.x
- Touir, A., 1973. Influence de l'ablation des pédoncules oculaires sur les glandes androgènes, les gonades, les caractères externes mâles et l'inversion sexuelle chez la crevette hermaphrodite *Lysmata seticaudata* (Risso). CR Acad Sci Paris Ser D 277, 2541–2544.
- Trapp, M., Valle, S.C., Pöppl, A.G., Chittó, A.L.F., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2018. Insulin-like receptors and carbohydrate metabolism in gills of the euryhaline crab *Neohelice granulata* : effects of osmotic stress. Gen. Comp. Endocrinol. 262, 81–89. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.03.017
- Treerattrakool, S., Panyim, S., Chan, S.-M., Withyachumnarnkul, B., Udomkit, A., 2008. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference: *P. monodon* GIH cDNA and its role in Vg expression. FEBS J. 275, 970–980. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06266.x
- Treerattrakool, S., Panyim, S., Udomkit, A., 2011. Induction of Ovarian Maturation and Spawning in *Penaeus monodon* Broodstock by Double-Stranded RNA. Mar. Biotechnol. 13, 163–169. https://doi.org/10.1007/s10126-010-9276-0
- Valette, V., Bitome Essono, P.-Y., Le Clec'h, W., Johnson, M., Bech, N., Grandjean, F., 2013. Multiinfections of feminizing *Wolbachia* strains in natural populations of the terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*. PLoS ONE 8, e82633. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082633
- Van Larebeke, N.A., Sasco, A.J., Brophy, J.T., Keith, M.M., Gilbertson, M., Watterson, A., 2008. Sex ratio changes as sentinel health events of endocrine disruption. Int. J. Occup. Environ. Health 14, 138–143.
- Vandel, A., 1962. Faune de France, Isopodes terrestres (deuxième Partie) 417–931.
- Vandel, A., 1960. Faune de France, Vol. 64, Isopodes terrestres (première partie). Lechevalier Paris 416.
- Vandel, A., 1943. Essai sur l'origine, l'évolution et la classification des Oniscoïdes (Isopodes terrestres). Bull. Biol. Fr. Belg. 30, 1–136.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). Reprod. Toxicol. 24, 139–177. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010
- Vanderstraete, M., Gouignard, N., Ahier, A., Morel, M., Vicogne, J., Dissous, C., 2013. The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. BMC Genomics 14, 1.
- Vanderstraete, M., Gouignard, N., Cailliau, K., Morel, M., Hahnel, S., Leutner, S., Beckmann, S., Grevelding, C.G., Dissous, C., 2014. Venus kinase receptors control reproduction in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog. 10, e1004138.

VanHook, A.M., Patel, N.H., 2008. Crustaceans. Curr. Biol. 18, R547–R550.

Veenstra, J.A., 2016. Similarities between decapod and insect neuropeptidomes. PeerJ 4, e2043.

https://doi.org/10.7717/peerj.2043

- Veenstra, J.A., 2015. The power of next-generation sequencing as illustrated by the neuropeptidome of the crayfish *Procambarus clarkii*. Gen. Comp. Endocrinol. 224, 84–95. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.06.013
- Ventura, T., 2018. Monosex in Aquaculture, in: Kloc, M., Kubiak, J.Z. (Eds.), Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine. Springer International Publishing, Cham, pp. 91– 101. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1\_6
- Ventura, T., Fitzgibbon, Q., Battaglene, S., Sagi, A., Elizur, A., 2015. Identification and characterization of androgenic gland specific insulin-like peptide-encoding transcripts in two spiny lobster species: *Sagmariasus verreauxi* and *Jasus edwardsii*. Gen. Comp. Endocrinol. 214, 126–133. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.027
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E.D., Weil, S., Raviv, S., Glazer, L., Sagi, A., 2009. Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. Endocrinology 150, 1278–1286. https://doi.org/10.1210/en.2008-0906
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E.D., Weil, S., Rosen, O., Sagi, A., 2012. Timing sexual differentiation: full functional sex reversal achieved through silencing of a single insulinlike gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol. Reprod. 86, 90. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097261
- Ventura, T., Rosen, O., Sagi, A., 2011. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. Gen. Comp. Endocrinol. 173, 381–388. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.05.018
- Ventura, T., Sagi, A., 2012. The insulin-like androgenic gland hormone in crustaceans: From a single gene silencing to a wide array of sexual manipulation-based biotechnologies. Biotechnol. Adv. 30, 1543–1550. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.008
- Ventura-López, C., Galindo-Torres, P.E., Arcos, F.G., Galindo-Sánchez, C., Racotta, I.S., Escobedo-Fregoso, C., Llera-Herrera, R., Ibarra, A.M., 2017. Transcriptomic information from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ovary and eyestalk, and expression patterns for genes putatively involved in the reproductive process. Gen. Comp. Endocrinol. 246, 164–182. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.12.005
- Verne, S., Johnson, M., Bouchon, D., Grandjean, F., 2007. Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. Gene 397, 58–66. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.006
- Vicogne, J., Pin, J.-P., Lardans, V., Capron, M., Noël, C., Dissous, C., 2003. An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. Mol. Biochem. Parasitol. 126, 51–62.
- Vogel, K.J., Brown, M.R., Strand, M.R., 2015. Ovary ecdysteroidogenic hormone requires a receptor tyrosine kinase to activate egg formation in the mosquito *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 5057–5062. https://doi.org/10.1073/pnas.1501814112
- von Reumont, B.M., Wägele, J.W., 2014. 15 Advances in molecular phylogeny of crustaceans in the light of phylogenomic data.
- Wägele, J.W., Kück, P., 2014. Arthropod phylogeny and the origin of Tracheata (= Atelocerata) from Remipedia-like ancestors. Deep Metazoan Phylogeny Backbone Tree Life Berl. Gruyter 286–341.
- Wägele, J.W., Mayer, C., 2007. Visualizing differences in phylogenetic information content of alignments and distinction of three classes of long-branch effects. BMC Evol. Biol. 7, 147.
- Wainwright, G., Webster, S.G., Wilkinson, M.C., Chung, J.S., Rees, H.H., 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus* involvement in multihormonal regulation of growth and reproduction. J. Biol. Chem. 271, 12749–12754.
- Waloszek, D., 1998. Early arthropod phylogeny in light of the Cambrian "Orsten" fossil. Arthopod Foss. Phylogeny 185–231.
- Wang, G., Li, N., Zhang, Lili, Zhang, Longhui, Zhang, Z., Wang, Y., 2016. IGFBP7 is involved in abalone metamorphosis. Aquaculture 451, 377–384. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.031
- Wang, G., Li, N., Zhang, Lili, Zhang, Longhui, Zhang, Z., Wang, Y., 2015. IGFBP7 promotes hemocyte proliferation in small abalone *Haliotis diversicolor*, proved by dsRNA and cap mRNA exposure. Gene 571, 65–70. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.051
- Ward, C.W., Menting, J.G., Lawrence, M.C., 2013. The insulin receptor changes conformation in unforeseen ways on ligand binding: sharpening the picture of insulin receptor activation. Bioessays 35, 945–954.
- Warr, N., Carre, G.-A., Siggers, P., Faleato, J.V., Brixey, R., Pope, M., Bogani, D., Childers, M.,
  Wells, S., Scudamore, C.L., Tedesco, M., del Barco Barrantes, I., Nebreda, A.R., Trainor,
  P.A., Greenfield, A., 2012. Gadd45γ and Map3k4 interactions regulate mouse testis
  determination via p38 MAPK-mediated control of Sry expression. Dev. Cell 23, 1020–1031.
  https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.09.016
- Waterhouse, R.M., Seppey, M., Simão, F.A., Manni, M., Ioannidis, P., Klioutchnikov, G., Kriventseva, E.V., Zdobnov, E.M., 2018. BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. Mol. Biol. Evol. 35, 543–548. https://doi.org/10.1093/molbev/msx319
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001. Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. Water Res. 35, 2347–2352. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00537-6
- Webster, S.G., Keller, R., 1986. Purification, characterisation and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). J. Comp. Physiol. B 156, 617–624.
- Webster, S.G., Keller, R., Dircksen, H., 2012. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 175, 217–233. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.035
- Weisskopf, M.G., Anderson, H.A., Hanrahan, L.P., 2003. Decreased sex ratio following maternal exposure to polychlorinated biphenyls from contaminated Great Lakes sport-caught fish: a retrospective cohort study. Environ. Health 2, 2.
- Welshons, W.V., Nagel, S.C., vom Saal, F.S., 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. Endocrinology 147, s56–s69. https://doi.org/10.1210/en.2005-1159
- Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., Vom Saal, F.S., 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. Environ. Health Perspect. 111, 994.
- Werren, J.H., Baldo, L., Clark, M.E., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nat. Rev. Microbiol. 6, 741–751. https://doi.org/10.1038/nrmicro1969
- Westermeier, F., Sáez, T., Arroyo, P., Toledo, F., Gutierrez, J., Sanhueza, C., Pardo, F., Leiva, A., Sobrevia, L., 2016. Insulin receptor isoforms: an integrated view focused on gestational diabetes mellitus. Diabetes Metab. Res. Rev. 32, 350–365.
- Wheeler, D.L., Yarden, Y. (Eds.), 2015. Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies. Springer International Publishing, Cham.
- WoRMS Editorial Board, 2017. World Register of Marine Species. https://doi.org/10.14284/170
- Wu, M., Sun, L.V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. PLoS Biol. 2, e69.

- Wu, Q., Brown, M.R., 2006. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. Annu. Rev. Entomol. 51, 1–24. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151011
- Xu, H.-J., Xue, J., Lu, B., Zhang, X.-C., Zhuo, J.-C., He, S.-F., Ma, X.-F., Jiang, Y.-Q., Fan, H.-W., Xu, J.-Y., Ye, Y.-X., Pan, P.-L., Li, Q., Bao, Y.-Y., Nijhout, H.F., Zhang, C.-X., 2015. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. Nature 519, 464–467. https://doi.org/10.1038/nature14286
- Xu, H.-J., Zhang, C.-X., 2017. Insulin receptors and wing dimorphism in rice planthoppers. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 372, 20150489. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0489
- Yamanaka, Y., Wilson, E.M., Rosenfeld, R.G., Oh, Y., 1997. Inhibition of insulin receptor activation by insulin-like growth factor binding proteins. J. Biol. Chem. 272, 30729–30734.
- Yang, Z., 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. Mol. Biol. Evol. 24, 1586– 1591. https://doi.org/10.1093/molbev/msm088
- Yang, Z., 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Comput. Appl. Biosci. CABIOS 13, 555–556.
- Yu, Y.-Q., Ma, W.-M., Zeng, Q.-G., Qian, Y.-Q., Yang, J.-S., Yang, W.-J., 2014. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of two Dmrt genes in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Agric. Res. 3, 181–191. https://doi.org/10.1007/s40003-014-0106-x
- Zhang, Y., Qiao, K., Wang, S., Peng, H., Shan, Z., Wang, K., 2014. Molecular identification of a new androgenic gland-specific insulin-like gene from the mud crab, *Scylla paramamosain*. Aquaculture 433, 325–334. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.033
- Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. Endocrinology 146, 607–612.
- Zug, R., Hammerstein, P., 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. PloS One 7, e38544.

# **ANNEXE**



Contents lists available at ScienceDirect

### General and Comparative Endocrinology

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

Short Communication

## Divergent evolution and clade-specific duplications of the Insulin-like Receptor in malacostracan crustaceans



### Herran Benjamin, Bertaux Joanne\*, Grève Pierre\*

Université de Poitiers, UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des Interactions (EBI), Equipe Ecologie Evolution Symbiose (EES), TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

ARTICLE INFO	A B S T R A C T
Keywords: Insulin-like receptors Phylogeny Gene duplication Crustaceans Sexual differentiation	The Insulin-like Receptors (IRs) are an important protein family, represented by three members in vertebrates, two of which are well-known for their implication in metabolism (Insulin Receptor) and growth (IGF Receptor). In contrast, little is known about these receptors in invertebrates, in which a single gene generally exists except for a part of insects and other occasional species-specific duplications. In this study, we used publicly available sequences as well as <i>de novo</i> assembled transcriptomes to investigate the IR evolution in malacostracan crus- taceans, animals in which the Insulin/IGF pathway is known to be implicated in sexual development through the androgenic gland hormone. We described the evolutionary divergence of malacostracan IRs compared to all the other metazoan sequences, including other pancrustaceans. We also demonstrated two well conserved dupli-

potential implications for malacostracan biology are discussed.

#### 1. Introduction

Sexual differentiation in malacostracan crustaceans depends on a specific hormone called the Androgenic Gland Hormone (AGH). Discovered and described in isopod crustaceans in the late 1980s, this hormone is the only known case of proteinaceous sexual hormone (Hasegawa et al., 1987; Martin et al., 1990). Discovered twenty years later in decapod crustaceans (Manor et al., 2007), it also became known as the Insulin-like Androgenic Gland hormone (IAG) (Ventura et al., 2011), in reference to its structure, similar to the Insulin-Like Peptides (ILPs) (Martin et al., 1999). This sexual hormone is thus of particular interest both in terms of animal physiology and of gene network evolution. Indeed, it represents the sole member of the Insulin/Insulin Growth Factor (IGF) Signalling (IIS) pathway, canonically involved in metabolism and growth, directly responsible for male gender (Ventura et al., 2011).

For decades, the AGH remained the only described member of the IIS pathway implicated in the sexual differentiation of malacostracan crustaceans. In 2013, a new partner of this hormone was first discovered *in silico* from a transcriptome of crayfish (Decapoda) (Rosen et al., 2013). This molecule, called Insulin Growth Factor Binding Protein-related Protein (IGFBP-rP), belongs to the superfamily of

IGFBPs, that comprises proteins known to bind various ILPs (Hwa et al., 1999). By doing so, they protect their ligands, enhancing their half-life, and carry them to their targets. However, their role is dual as they also regulate the bioavailability of the ligands by sequestrating them. The ligands are then released after specific interactions with the target cells, their matrix, or upon IGFBP proteolysis (modulated by post-translational modifications such as glycosylation, phosphorylation) (Forbes et al., 2012). The implication of the decapod IGFBP-rP in the AGH pathway is supported by proof of interaction with this ligand (Rosen et al., 2013; Song et al., 2018), silencing experiments (Li et al., 2015) and *in silico* binding modelling (Chandler et al., 2017).

cations of IRs: one specific to the whole malacostracan class, another one specific to the decapod order. The

Yet, this protein is a circulating molecule and is unlikely to initiate the signalling pathway of the AGH, which results in male sexual differentiation. This elicited a new search for a cellular receptor of the AGH within receptors of the conserved IIS pathway, known to belong to the superfamily of the Tyrosine Kinase (TK) receptors and to the superfamily of G protein–coupled receptors. Interestingly, a TK receptor was identified by the same team a few years later in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Mr-Insulin-like Receptor or Mr-IR) (Sharabi et al., 2016) and the lobster *Sagmariasus verreauxi* (Sv-TKIR) (Aizen et al., 2016). They described a typical membrane receptor with conserved domains specific to the insulin/ILP receptors: two extracellular

https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.07.013 Received 17 November 2017; Received in revised form 8 June 2018; Accepted 24 July 2018

Available online 25 July 2018

Abbreviations: AGH, androgenic gland hormone; IAG, insulin-like androgenic gland hormone; IGF, insulin-like growth factor; IGFBP, IGF binding protein; IGFBP-rP, IGFBP-related protein; IIS, insulin/IGF signalling; ILP, insulin-like peptide; IR, insulin-like receptor; TK, tyrosine kinase

<sup>\*</sup> Corresponding authors at: Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions (EBI), UMR CNRS 7267 Equipe Ecologie Evolution Symbiose (EES), Bâtiment B8-B35 5, rue Albert Turpin TSA 51106, F-86073 Poitiers Cedex 9, France.

E-mail addresses: joanne.bertaux@univ-poitiers.fr (J. Bertaux), pierre.greve@univ-poitiers.fr (P. Grève).

<sup>0016-6480/ © 2018</sup> Elsevier Inc. All rights reserved.

ligand-binding domains, a transmembrane domain and an intracellular TK domain, hence the name of TKIR (Aizen et al., 2016), or just IR (Sharabi et al., 2016). The functional implication of this receptor in the AGH pathway has been established in several ways. First, the interaction with the AGH was demonstrated in a functional bioassay, using a recombinant AGH, which can induce *in vitro* the phosphorylation cascade (Aizen et al., 2016). The silencing of Mr-IR was also performed, causing alterations of sexual characters (notably androgenic gland hypertrophy and impaired spermatogenesis) (Sharabi et al., 2016). However, contrary to the silencing of the AGH (Ventura et al., 2012), it did not result in full sex reversal, leading the authors to suspect that more receptors might be implicated. Besides, the implication of these receptors in other functions (carbohydrate metabolism for instance; Trapp et al., 2018) cannot be excluded, especially since they are also expressed in females (Aizen et al., 2016; Sharabi et al., 2016).

A preliminary phylogeny that included the Sv-TKIR sequence, among other previously identified IRs in Metazoa, supported its belonging to the IR family (Aizen et al., 2016). However, the authors raised a few issues related to unexpected (yet with weak support) clusterings in their phylogenetic reconstruction. For instance, the Bombyx mori IR did not cluster with the other arthropod IRs but appeared to be more closely related to the sequence of Caenorhabditis elegans. Likewise, the new decapod Sv-TKIR did not cluster with Daphnia pulex IR sequences (the sole crustacean IRs published at that time) and not even with the arthropod IRs included in this analysis but appeared closer to the sequences of platyhelminthes. Aizen et al. (2016) postulated that the different phylogenetic positions of Sv-TKIR and the four D. pulex IRs (DpIR1-4) are likely to result from the variability in DpIR nature. In accordance with the literature at that time, they also suggested that only a single copy of the IR gene exists in general (Aizen et al., 2016), and that conserved duplications of the latter occurred only in vertebrates, leading to the subsequent diversification of the IR family in this clade (Hernández-Sánchez et al., 2008). The divergent evolution and duplication events in *D. pulex* were referred to as being "anomalies" (Aizen et al., 2016). Having only these two species of crustaceans in their analysis, these hypotheses could not be confirmed. Moreover, the homology and phylogenetic relationship between Sv-TKIR and Mr-IR, published concomitantly, remain uninvestigated to this date. The exact phylogenetic position of these two new sequences can now be clarified with a more extensive data set, especially within crustaceans.

The aim of this work was to investigate the evolution of the AGH receptor using numerous published data from RNAseq studies. The first goal was to establish with a more exhaustive data set the orthology between Mr-IR, Sv-TKIR and the well-described metazoan IRs. In order to confirm the molecular family they belong to, closely related TK receptors were integrated. We also intended to clarify the nomenclature between the IR and related receptors. Using newly assembled transcriptomes, we further looked for the existence and phylogenetic relationships of this receptor in different taxa of crustaceans, including malacostracans and those for which an AGH-based sexual differentiation is not present or described. Conserved domains of the corresponding sequences were analysed and compared. Finally, we looked for possible paralogs or other closely related receptors which might account for the lack of sex reversal following the Mr-IR silencing.

#### 2. Materials and methods

The protein sequences of TK receptors analysed in Fig. 1 were retrieved from GenBank (Benson et al., 2005). This data set includes (TK) IRs, alongside with Venus Kinase Receptors (VKRs), Anaplastic Lymphoma Kinase receptors (ALKs), a Colon Carcinoma Kinase receptor (CCK), Discoidin Domain Receptors (DDRs), a Leukocyte Tyrosine Kinase receptor (LTK), Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptors (RORs) and a ROS proto-oncogene receptor (ROS) (Vanderstraete et al., 2013; Hunter, 2014). In order to establish a more exhaustive data set of IRs (Fig. 2), additional sequences were searched for in GenBank. In addition, several crustacean transcriptomes were newly assembled from RNAseq data available in SRA database and screened for IRs by TBLASTX, using Sv-TKIR and Mr-IR sequences as query. When very close sequences (SNP variants, splicing variants) were identified for a given species (in GenBank as well as in the new transcriptomes), only one of them was kept in the following phylogenetic analyses (Figs. 1 and 2 and S1). An additional phylogeny focusing only on species with several published IR sequences allows to discriminate close variants from real paralogs (Fig. S2). Several sequence alignments were further generated to illustrate these different cases (Fig. S3). The accession numbers of the receptors retrieved from GenBank and of the RNAseq data from the SRA database are presented in Table S1 (for Fig. 1) and Table S2 (for Figs. 2, S1 and S2). Several accession numbers for a same transcriptome indicate that all the reads from different RNAseq projects were pooled before assembly. The conserved domains of the sequences were identified with the online tool from NCBI: CD search (https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) (Marchler-Bauer et al., 2015). Protein sequences were aligned using Muscle (Edgar, 2004). The subset of sites used for the phylogenetic analyses was determined with Gblocks, using Less Stringent Selection parameters, and checked by hand (Talavera and Castresana, 2007). The reconstruction of the phylogenetic trees was first performed with the Maximum Likelihood method using PhyML (Guindon and Gascuel, 2003), implemented in Seaview (Gouy et al., 2010). The selected model evolution, determined with ProtTest 3.4.2 (Darriba et al., 2011), was LG + I + G (Le and Gascuel, 2008). Tree topology was searched with best of Nearest-Neighbor Interchange (NNI) and Subtree Pruning and Regrafting (SPR) methods. The supports of the internal branches were tested using a bootstrap analysis with 1000 repetitions (Felsenstein, 1985) and the non parametric Shimodaira-Hasegawa-like approximate Likelihood-Ratio Test (SH-like aLRT), which is considered less liberal than parametric aLRT, a metric close itself to bayesian posteriors (Anisimova and Gascuel, 2006; Guindon et al., 2010). Branch supports were further checked with a bayesian method using BEAST 1.8.4 (Drummond et al., 2012). Tree calculations were performed with the same LG + I + G model of evolution and uncorrelated relaxed clock (log normal). Analyses were run for 20,000,000 generations (Fig. 1) or 50,000,000 generations (Figs. 2, S1 and S2) to get adequate Effective Sample Size for each parameter. Log sampling was performed every 1000 generations. Posterior probabilities (PP) were retrieved using the maximum likelihood topologies as "target trees" on TreeAnnotator.

#### 3. Results and discussion

We first constructed an extended phylogeny that includes representative members of the IR family, as well as the most closely related receptors within the TK receptor superfamily (VKR, ALK, CCK, DDR, LTK, ROR, ROS) (Vanderstraete et al., 2013; Hunter, 2014), in both vertebrates and invertebrates (Fig. 1, Table S1). This analysis, alongside the comparison of conserved domains, confirmed that both Mr-IR and Sv-TKIR belong to the IR family, which constitutes a monophyletic group, distinct from all the other TK receptors. It also appeared that the closest receptors of the IRs are the VKRs. Interestingly, the sequence identified as Zootermopsis nevadensis IR, used in the phylogeny of Aizen et al. (2016), clustered in the VKR group, revealing a mis-annotation in the database: indeed, when looking at the conserved domains of this sequence, we found a ligand-binding domain of GABAb receptors in the N-terminal region, which is characteristic of the VKRs, and not of IRs. This result explains why the Z. nevadensis IR did not cluster with the other arthropod IRs in the previously published phylogeny (Aizen et al., 2016). This sequence can rather be used as an outgroup of the IRs.

To further investigate the Sv-TKIR phylogenetic position and the evolution of this receptor family, we searched for and found IR sequences in 22 crustacean species of various taxonomic ranks. In particular, our data set includes 13 species of malacostracan crustaceans,



**Fig. 1.** Phylogenetic position of the recently characterized Mr-IR and Sv-TKIR within the TK receptor superfamily. The phylogenetic tree was constructed using PHYML with Maximum Likelihood method and LG model of evolution. Branch supports are indicated with bootstrap values (1000 repetitions), SH-aLRT values and posterior probabilities (PP). They were divided in three categories: weak in red (bootstrap < 50, SH-aLRT < 0.75, PP < 0.75), intermediate in yellow (bootstrap between 50 and 70, SH-aLRT and PP between 0.75 and 0.95) and robust in green (bootstrap > 70 (Hillis and Bull, 1993), SH-aLRT and PP > 0.95 (Guindon et al., 2010)). The scale bar indicates number of amino acid substitutions per site. The monophyletic groups of IRs and VKRs are highlighted in red and blue, respectively. Mr-IR and Sv-TKIR are indicated in bold letters. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

characterized by the existence of the androgenic glands and the related AGH, supplemented by 9 species of non-malacostracan crustaceans for which no AGH is known, the sexual differentiation seeming independent of the IIS pathway. To represent the metazoan diversity, these IR sequences were analysed alongside most of those previously used in Aizen et al. (2016) (Table S2).

We first observed that the names of the various sequences from our data set represent a complex nomenclature with little underlying evolutionary support (Fig. 2, Table S2): Insulin Receptor (InR or IR), Insulin-like Receptor (also IR), Tyrosine Kinase IR (TKIR), Insulin-Like Peptide Receptor (ILPR), Insulin receptor Related Receptor (INSRR or IRR), Insulin Growth Factor Receptor (IGFR), Insulin Receptors-like (IR-like) and even Insulin Receptor-Related protein-like (IRR-like). In the well-documented case of *Homo sapiens*, the three proteins IR, IRR and IGFR correspond to three different coexisting receptors, coming from vertebrate-specific duplications (Hernández-Sánchez et al., 2008). By contrast, despite the variable nomenclature, most of the other animals displayed only one member of the IR family, as described so far (Leevers, 2001; Antonova et al., 2012). We thus suggest that, given that

there is no new evidence to the contrary, all these invertebrate sequences are likely to be homologue and can be jointly designated as IRs (for Insulin-like Receptors), which we will do hereafter.

Secondly, despite low branch support, the *B. mori* sequence of IR, which surprisingly clustered with that of *C. elegans* in the phylogeny of Aizen et al. (2016), appeared closely related to the other insect IR sequences (SH-aLRT of 0.93; bootstrap of 36; PP of 0.70; Fig. 2), including those of *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti*, also used in their data set. Our phylogenetic reconstruction rather matches the one of Antonova et al. (2012), where no peculiar divergence of this sequence was detected.

In contrast, it was unexpected that the different IR sequences of the 27 pancrustacean species (Fig. 2, Table S2) definitely did not cluster into one monophyletic group. The phylogeny revealed a major cluster of IR sequences specific to the malacostracan crustaceans, here represented by the Amphipoda, Bathynellacea, Decapoda, Euphausiacea, Isopoda and Stomatopoda orders (SH-aLRT of 0.99; bootstrap of 83; PP of 0.99). On the contrary, the IR sequences from the various non-malacostracans (Branchiopoda, Cirripedia, Copepoda, Ichthyostraca and



Fig. 2. Phylogeny of the IRs in Metazoa, with further focus on crustacean taxa. Phylogenetic reconstruction and branch support calculations were performed as in Fig. 1. Branch support values are indicated with the same colour code, using the previously described categories. Those discussed in the text are specified. Sequences from pancrustaceans are highlighted in blue whereas the other ecdysozoans are indicated in green, spiralians in orange and deuterostoms in red. Mr-IR and Sv-TKIR are indicated in bold letters. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

37

Hexapoda) were dispersed, clustering at different positions in the phylogeny. Interestingly, the latter clusters gathered within a major monophyletic group, which included most of the IR sequences (all of the deuterostoms, all of the ecdysozoans except malacostracans and all of the spiralians except the flatworms), supported by a SH-aLRT value of 0.96, a bootstrap value of 73 and a PP of 1.0. Within this perspective, the phylogenetic "anomaly" in our reconstruction seems to be the malacostracan IRs rather than the D. pulex IRs. Besides, the very long branches observed for the malacostracan IR sequences strongly suggest that a divergent evolution specifically occurred during the evolution of Malacostraca, accounting for their distinct position in the phylogenetic tree. Interestingly, the malacostracan crustaceans display this unique feature of having recruited some members of the IIS pathway (AGH. IGFBP-rP, IR) for a novel sexual endocrine system. We hypothesize that the divergent evolution of malacostracan IR we observed may be linked to the evolution of the IIS pathway function in this clade, the receptor possibly specializing during the establishment of an AGH-based sexual differentiation.

Moreover, focusing on the cluster of malacostracan IRs revealed the existence of several sequences in most of the investigated species (Figs. 2 and S2). They show clear divergence along the whole sequence and no additional stop-codon, which strongly suggests they are neither alternative splicing variants, nor SNP variants, nor pseudogenes but probably paralogs (Fig. S3). In our data set, two copies were found within Amphipoda (Gammarus fosssarum), Decapoda (Astacus astacus, Cherax quadricarinatus, M. rosenbergii) and Isopoda (Armadillidium vulgare, Proasellus beticus). When partial sequences were included in the phylogeny, it appeared that the decapods A. astacus, C. quadricarinatus, M. nipponense and M. rosenbergii displayed not two, but three IR sequences (Fig. S1). In contrast, no third IR sequence, even partial, could be found in any other Malacostraca order. In the end, these copies formed three clusters: two major clusters gathered one copy in each of the main Malacostraca orders (less data are available for Bathynellacea and Stomatopoda), the third one gathered only sequences of decapod species (including Sv-TKIR) (Figs. 2 and S1). The fact that all these sequences are members of the IR family was confirmed by the presence of the IR conserved domains (primarily two Receptor L domains and one TK domain). Therefore, we propose to define three IR subfamilies in Malacostraca: we will refer to the firstly discovered Mr-IR (Sharabi et al., 2016) as Mr-IR1, whereas the new sequence of IR we discovered in the same species (M. rosenbergii) will be called Mr-IR2, and the last IR cluster, currently specific to decapods, will be designated as IR3. These observations imply the existence of at least a first IR duplication before the divergence of all the malacostracan orders. Furthermore, unless new IR3 sequences were found outside decapods, we must also consider either another IR duplication in the early Decapoda evolution (IR3 coming from IR1, Fig. 2), or that IR1/IR2 derived from an ancestral IR3, which was then conserved only in Decapoda (Figs. S1 and S2). The origin of the IR3 paralog cannot be elucidated by our analysis because of the relatively low robustness of the IR1/IR3 dichotomy in Fig. 2 and IR1/IR2 dichotomy in Figs. S1 and S2. In any case, these duplications might well account for the RNAi results of Sharabi et al. (2016). Indeed, the duplicated copies display a high divergence (p-distance of  $\sim 70\%$ between Mr-IR1 and Mr-IR2, ~67% between Mn-IR1 and Mn-IR3) so that the silencing is likely to have affected only one of them. Whether a triple silencing would successfully revert the sex of males or not, it remains that their hypothesis of more than one AGH receptor turned out to be true. Indeed, through biochemical and experimental evidence (Sharabi et al., 2016; Aizen et al., 2016), both Mr-IR and Sv-TKIR were proven to interact with the AGH while belonging to two distinct clusters (IR1 and IR3, respectively) of the malacostracan IRs. In contrast, this now needs to be investigated in the IR2 cluster.

Gene duplications are very common events in genome evolution (Ohno, 1970). Although a single IR usually exists in invertebrates, the first surveys on IR diversity suggested recurrent duplications of this gene (Antonova et al., 2012; Aizen et al., 2016). Fig. 2 also highlights

the existence of several IR duplications such as in Aplysia californica (Mollusca) or Limulus polyphemus (Chelicerata), besides the already known cases in Schistosoma mansoni (Platyhelminthes) (Khayath et al., 2007) and D. pulex (Crustacea) (Boucher et al., 2010). In these cases, the duplication events are likely to be independent, and should be considered species-specific unless new IRs were to be discovered. Duplication can however concern whole clades. In vertebrates notably, the paralogs IGFR and sensu stricto IR were retained after an early duplication event and diverged in correlation with the functional specialization of IGFs and ILPs (insulin) (Hernández-Sánchez et al., 2008). Another clade-specific duplication was hypothesized in insect evolution, the copies being however poorly conserved (Antonova et al., 2012). Although mounting evidence coming from genomic data tends to support this assumption (Sang et al., 2016; Ding et al., 2017; Xu and Zhang, 2017), the exact perimeter of this duplication and the functional implications remain unclear to date. Interestingly, our study revealed no link between the IR duplications in Malacostraca and in Hexapoda, suggesting that these two events were independent (Figs. 2 and S2). In any case, two clade-specific duplications of IRs led to the conserved coexistence of IR1, IR2 in Malacostraca and IR3 in Decapoda. These events were however followed by a high sequence divergence between the paralogs (~70% as stated above), much higher than between vertebrate IR/IGFR/IRR (for instance in human, p-distance of ~41% between Hs-IR and Hs-IGFR, ~46% between Hs-IR and Hs-IRR).

When gene duplications are fixed, they are often followed by the rapid evolution of at least one of the copies because of relaxed selection on it (Ohno, 1970). This results frequently in the loss or split of the preexisting functions, but also sometimes in the appearance of new ones (Innan and Kondrashov, 2010). Duplications are thus classically regarded as a favourable context for evolutionary innovation as they provide new genetic material. Similarly to the IR/IGFR divergence in vertebrates, we could hypothesize that IR paralogs in Malacostraca diverged in accordance with the appearance of the AGH, a new ILP which also displays divergent evolution (Antonova et al., 2012). Further analyses are thus needed to decipher the function of each member in this unique IIS pathway, notably their possible post-duplication specialization. Indeed, Mr-IR and Sv-TKIR not only belong to different IR subfamilies, their spatial expression also differs (Mr-IR being expressed in ovaries and androgenic glands among other tissues, whereas Sv-TKIR is not) (Sharabi et al., 2016; Aizen et al., 2016). Furthermore, in Decapoda, the AGH gene displays a recent duplication in M. nipponense (Li et al., 2015), alternative splicing in Callinectes sapidus (Huang et al., 2017) and expression in unexpected tissues outside the androgenic glands (hepatopancreas, ovaries) (Chung et al., 2011; Li et al., 2015; Huang et al., 2017). In parallel, there is new evidence of AGH implication in functions unrelated to sex differentiation in these decapod species: metabolism (Chung, 2014) and vitellogenesis (Huang et al., 2014, 2017). These observations are consistent with subfunctionalisation or neofunctionalisation scenarios but still require experimental confirmation, in particular in the newly identified IR2 subfamily for which there is no information about binding affinity or function. This should be all the more investigated that the ligands Sv-ILP1 and Sv-ILP2, new members of the malacostracan IIS pathway apparently not linked to sex differentiation, have been recently described (Chandler et al., 2015, 2017), as well as another ILP named Insulin discovered in silico in decapod transcriptomes (Veenstra, 2016). Conversely, it seems especially important that further studies, including silencing experiments, consider all of the receptors in presence because of a possible functional complementarity and/or redundancy. More generally, integrative analyses will be required to decipher the visibly complex evolution of this IIS pathway.

#### Acknowledgements

This work was partly funded by the 2015–2020 State-Region Planning Contract and European Regional Development Fund (FEDER),

intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the French Ministry of Higher Education and Research.

We are grateful to Patricia Bertaux, a native speaker of English (British) and former international officer at the ESPE, Université de Lorraine (France), for English-language proofreading. We are also thankful to Didier Bouchon, Nicolas Cerveau and Thomas Becking for their assistance with bioinformatics.

#### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.07.013.

#### References

- Aizen, J., Chandler, J.C., Fitzgibbon, Q.P., Sagi, A., Battaglene, S.C., Elizur, A., Ventura, T., 2016. Production of recombinant insulin-like androgenic gland hormones from three decapod species: in vitro testicular phosphorylation and activation of a newly identified tyrosine kinase receptor from the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*. Gen. Comp. Endocrinol. 229, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02. 013.
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. Syst. Biol. 55, 539–552. https://doi.org/10.1080/ 10635150600755453.
- Antonova, Y., Arik, A.J., Moore, W., Riehle, M.A., Brown, M.R., 2012. Insulin-like peptides: structure, signaling, and function. In: Insect Endocrinology. Elsevier, pp. 63–92. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10002-0.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L., 2005. GenBank. Nucleic Acids Res. 33, D34–D38. https://doi.org/10.1093/nar/gki063.
- Boucher, P., Ditlecadet, D., Dubé, C., Dufresne, F., 2010. Unusual duplication of the insulin-like receptor in the crustacean *Daphnia pulex*. BMC Evol. Biol. 10, 305. https:// doi.org/10.1186/1471-2148-10-305.
- Chandler, J.C., Aizen, J., Elizur, A., Hollander-Cohen, L., Battaglene, S.C., Ventura, T., 2015. Discovery of a novel insulin-like peptide and insulin binding proteins in the Eastern rock lobster Sagmariasus verreauxi. Gen. Comp. Endocrinol. 215, 76–87. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.08.018.
- Chandler, J.C., Gandhi, N.S., Mancera, R.L., Smith, G., Elizur, A., Ventura, T., 2017. Understanding insulin endocrinology in decapod Crustacea: molecular modelling characterization of an insulin-binding protein and insulin-like peptides in the eastern spiny lobster, *Sagnariasus verreauxi*. Int. J. Mol. Sci. 18. https://doi.org/10.3390/ ijms18091832.
- Chung, J.S., 2014. An insulin-like growth factor found in hepatopancreas implicates carbohydrate metabolism of the blue crab *Callinectes sapidus*. Gen. Comp. Endocrinol. 199, 56–64. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.01.012.
- Chung, J.S., Manor, R., Sagi, A., 2011. Cloning of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) from the blue crab, *Callinectes sapidus*: implications for eyestalk regulation of IAG expression. Gen. Comp. Endocrinol. 173, 4–10. https://doi.org/10.1016/j.ygcen. 2011.04.017.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2011. ProtTest 3: fast selection of bestfit models of protein evolution. Bioinform. Oxf. Engl. 27, 1164–1165. https://doi. org/10.1093/bioinformatics/btr088.
- Ding, B.-Y., Shang, F., Zhang, Q., Xiong, Y., Yang, Q., Niu, J.-Z., Smagghe, G., Wang, J.-J., 2017. Silencing of two insulin receptor genes disrupts nymph-adult transition of alate brown citrus aphid. Int. J. Mol. Sci. 18, 357. https://doi.org/10.3390/ijms18020357.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol. 29, 1969–1973. https://doi.org/10.1093/ molbev/mss075.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32, 1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/ gkh340.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783–791. https://doi.org/10.2307/2408678.
- Forbes, B.E., McCarthy, P., Norton, R.S., 2012. Insulin-like growth factor binding proteins: a structural perspective. Front. Endocrinol. 3. https://doi.org/10.3389/fendo. 2012.00038.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol. Biol. Evol. 27, 221–224. https://doi.org/10.1093/molbev/msp259.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 59, 307–321. https://doi.org/10.1093/ sysbio/syq010.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52, 696–704.
- Hasegawa, Y., Haino-Fukushima, K., Katakura, Y., 1987. Isolation and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. Gen. Comp. Endocrinol. 67, 101–110.
- Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., de Pablo, F., Zardoya, R., 2008. Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. Mol. Biol. Evol. 25, 1043–1053. https://doi.org/10.1093/molbev/msn036.

- Hillis, D.M., Bull, J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst. Biol. 42, 182–192. https://doi.org/10. 1093/sysbio/42.2.182.
- Huang, X., Ye, H., Chung, J.S., 2017. The presence of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) and insulin-like peptide binding protein (ILPBP) in the ovary of the blue crab, *Callinectes sapidus* and their roles in ovarian development. Gen. Comp. Endocrinol. 249, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.001.
- Huang, X., Ye, H., Huang, H., Yang, Y., Gong, J., 2014. An insulin-like androgenic gland hormone gene in the mud crab, *Scylla paramamosain*, extensively expressed and involved in the processes of growth and female reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 204, 229–238. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.002.
- Hunter, T., 2014. The genesis of tyrosine phosphorylation. a020644–a020644. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020644.
- Hwa, V., Oh, Y., Rosenfeld, R.G., 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. Endocr. Rev. 20, 761–787.
- Innan, H., Kondrashov, F., 2010. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. Nat. Rev. Genet. 11, 97–108. https://doi.org/10. 1038/nrg2689.
- Khayath, N., Vicogne, J., Ahier, A., BenYounes, A., Konrad, C., Trolet, J., Viscogliosi, E., Brehm, K., Dissous, C., 2007. Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. FEBS J. 274, 659–676. https://doi.org/10. 1111/j.1742-4658.2006.05610.x.
- Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An improved general amino acid replacement matrix. Mol. Biol. Evol. 25, 1307–1320. https://doi.org/10.1093/molbev/msn067.
- Leevers, S.J., 2001. Growth control: Invertebrate insulin surprises!. Curr. Biol. 11, R209–R212. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00107-5.
- Li, F., Bai, H., Xiong, Y., Fu, H., Jiang, S., Jiang, F., Jin, S., Sun, S., Qiao, H., Zhang, W., 2015. Molecular characterization of insulin-like androgenic gland hormone-binding protein gene from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and investigation of its transcriptional relationship with the insulin-like androgenic gland hormone gene. Gen. Comp. Endocrinol. 216, 152–160. https://doi.org/10.1016/j. ygcen.2014.12.007.
- Manor, R., Weil, S., Oren, S., Glazer, L., Aflalo, E.D., Ventura, T., Chalifa-Caspi, V., Lapidot, M., Sagi, A., 2007. Insulin and gender: an insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. Gen. Comp. Endocrinol. 150, 326–336. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.09.006.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Bryant, S.H., 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. Nucleic Acids Res. 43, D222–226. https:// doi.org/10.1093/nar/gku1221.
- Martin, G., Juchault, P., Sorokine, O., van Dorsselaer, A., 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod Armadillidium vulgare Latr. (Crustacea, Oniscidea). Gen. Comp. Endocrinol. 80, 349–354.
- Martin, G., Sorokine, O., Moniatte, M., Bulet, P., Hetru, C., Van Dorsselaer, A., 1999. The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, Armadillidium vulgare. Eur. J. Biochem. FEBS 262, 727–736.
- Ohno, S., 1970. Evolution by Gene Duplication. Springer, New York.
- Rosen, O., Weil, S., Manor, R., Roth, Z., Khalaila, I., Sagi, A., 2013. A Crayfish Insulin-likebinding protein: another piece in the androgenic gland insulin-like hormone puzzle is revealed. J. Biol. Chem. 288, 22289–22298. https://doi.org/10.1074/jbc.M113. 484279.
- Sang, M., Li, C., Wu, W., Li, B., 2016. Identification and evolution of two insulin receptor genes involved in *Tribolium castaneum* development and reproduction. Gene 585, 196–204. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.034.
- Sharabi, O., Manor, R., Weil, S., Aflalo, E.D., Lezer, Y., Levy, T., Aizen, J., Ventura, T., Mather, P.B., Khalaila, I., Sagi, A., 2016. Identification and characterization of an insulin-like receptor involved in crustacean reproduction. Endocrinology 157, 928–941. https://doi.org/10.1210/en.2015-1391.
- Song, K., Xu, T., Zang, Y., Serwadda, A., Dai, T., Ma, Y., Shen, H., 2018. Insulin-like androgenic gland hormone gene in the freshwater chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA cloning, expression pattern, and interaction with EsIGFBP7. Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 18, 17–25.
- Talavera, G., Castresana, J., 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. Syst. Biol. 56, 564–577. https://doi.org/10.1080/10635150701472164.
- Trapp, M., Valle, S.C., Pöppl, A.G., Chittó, A.L.F., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2018. Insulin-like receptors and carbohydrate metabolism in gills of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: Effects of osmotic stress. Gen. Comp. Endocrinol. 262, 81–89. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.03.017.

Vanderstraete, M., Gouignard, N., Ahier, A., Morel, M., Vicogne, J., Dissous, C., 2013. The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. BMC Genomics 14, 1.

- Veenstra, J.A., 2016. Similarities between decapod and insect neuropeptidomes. PeerJ 4, e2043. https://doi.org/10.7717/peerj.2043.
- Ventura, T., Manor, R., Aflalo, E.D., Weil, S., Rosen, O., Sagi, A., 2012. Timing sexual differentiation: full functional sex reversal achieved through silencing of a single insulin-like gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol. Reprod. 86, 90. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097261.
- Ventura, T., Rosen, O., Sagi, A., 2011. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. Gen. Comp. Endocrinol. 173, 381–388. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.05.018.
- Xu, H.-J., Zhang, C.-X., 2017. Insulin receptors and wing dimorphism in rice planthoppers. Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci. 372, 20150489. https://doi.org/10.1098/rstb. 2015.0489.