

Université de Montréal

**Études comparatives de la nociception chez
Caenorhabditis elegans souche sauvage (N2) et mutants
(*egl-3* et *egl-21*)**

par **Bruno Nkambeu**

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *maître ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option pharmacologie

Août 2018
© Bruno Nkambeu, 2018

Résumé

L'objectif de cette étude était de vérifier l'hypothèse selon laquelle, les mutants *C. elegans* (*egl-3*, *egl-21*, *flp-18* et *flp-21*) auraient une diminution significative dans la production de neuropeptides matures bioactifs et présenteraient donc une diminution significative de la sensibilité aux stimuli nociceptifs. La nociception est une fonction défensive, une sorte d'alarme qui permet l'intégration de stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme. L'intégration du stimulus au niveau du système nerveux se fait via l'activation de nocicepteurs. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) est un petit nématode majoritairement hermaphrodite, transparent, non parasite et non segmenté qui se nourrit de bactéries du genre *Escherichia coli* (*E. coli*). Il a un cycle de développement d'environ 3 jours à 22°C et une durée de vie d'environ 3 semaines. *C. elegans* est un organisme modèle largement utilisé pour examiner la réponse nocifensive aux stimuli nocifs. Une analyse complète de la séquence du génome révèle plusieurs gènes codant pour des pro-neuropeptides menant à une série de neuropeptides bioactifs. Les neuropeptides de *C. elegans* sont impliqués dans la modulation de tous les comportements, y compris la locomotion, la mécanosensation, la thermosensation et la chimiosensation. Nous avons soumis nos nématodes à des stimuli thermiques (30°C - 35°C) afin d'observer le comportement des souches sauvages et mutantes. Les résultats de nos études ont révélé une altération du comportement d'évitement thermique chez les mutants. Ce comportement d'évitement thermique des *C. elegans* mutants *egl-3* et *egl-21* était significativement entravé par rapport à la souche sauvage (N2). De plus, les *C. elegans* mutants *flp-18* et *flp-21* présentaient un phénotype similaire à *egl-3* et *egl-21*. EGL-3 pro-protéine convertase et EGL-21 carboxypeptidase E sont des enzymes essentielles pour la maturation des pro-neuropeptides en neuropeptides actifs chez *C. elegans*. Les analyses d'abondance relative avec des homogénats de *C. elegans* mutants *egl-3* et *egl-21* ont démontré que la protéolyse de ProFLP-18 et ProFLP-21 était gravement entravée, conduisant à un manque de neuropeptides bioactifs matures. Pour déclencher une réponse nocifensive de *C. elegans* au stimuli thermique, les voies de signalisation des neuropeptides FLP-18 ou FLP-21 / NPR-1 sont nécessaires.

Mots-clés : *Caenorhabditis elegans*, neuropeptides, thermosensation, chimiosensation, carboxypeptidase E, sensibilité, stimuli, phénotype, abondance relative.

Abstract

This study's objective was to test the hypothesis that *C. elegans* mutants (*egl-3*, *egl-21*, *flp-18* and *flp-21*) will have a significant decrease in mature bioactive neuropeptides production and that they will have a significant decrease in sensitivity to stimuli. Nociception is a defensive function, an alarm that allows integration of potentially harmful stimuli. The integration of the stimulus into the nervous system is done by activation of nociceptors. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a small, non-parasitic, non segmented nematode. It is easily grown in petri dishes where it is fed with bacteria, specifically *Escherichia coli* (*E. coli*). *C. elegans* is a transparent worm, mostly hermaphrodite, with a development cycle and a lifespan of about three days at 22° C and three weeks respectively. *C. elegans* is a model organism widely used to examine the harmful response to stimulation. A complete analysis of the genome sequence reveals several pro-neuropeptide genes, encoding a series of bioactive neuropeptides. The neuropeptides of *C. elegans* are involved in the modulation of all behaviors, including locomotion, mechanosensation, thermosensation and chemiosensation. We exposed our nematodes on thermal stimuli (30°C - 35°C) to observe the behavior of wild strains and mutants. Our results revealed that only mutants had impaired thermal avoidance behavior. This thermal avoidance behavior of *C. elegans* mutants *egl-3* and *egl-21* was significantly impaired compared to the wild-type strain (N2). In addition, *C. elegans* mutants *flp-18* and *flp-21* exhibited a phenotype similar to *egl-3* and *egl-21*. EGL-3 pro-protein convertase and EGL-21 carboxypeptidase E are essential enzymes for the maturation of pro-neuropeptides to the mature bioactive neuropeptides in *C. elegans*. Relative abundance analyzes with *egl-3* and *egl-21* mutant *C. elegans* homogenates demonstrate that proteolysis of ProFLP-18 and ProFLP-21 are severely impeded, leading to a lack of mature bioactive neuropeptides. FLP-18 or FLP-21/NPR-1 neuropeptide signaling pathways are needed to trigger nocifensive response of *C. elegans* to thermal stimuli.

Keywords : *Caenorhabditis elegans*, neuropeptides, thermosensation, chimiosensation, carboxypeptidase E, sensitivity, stimuli, phenotype, relative abundance.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	ix
Introduction :	1
Chapitre 1 : Introduction à la nociception.....	5
1.1 Évaluation de la nociception chez <i>C. elegans</i>	5
1.2 Méthode expérimentale	9
1.3 Présentation de <i>C. elegans</i>	9
1.4 Neuroanatomie et Neurophysiologie de <i>C. elegans</i>	10
1.5 Introduction sur les mécanismes de neurotransmission chez <i>C. elegans</i>	13
Chapitre 2 : Spectrométrie de masse.....	33
2.1 Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide à haute performance.....	33
2.1.1 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	33
2.1.2 Spectrométrie de masse.....	34
2.1.2.1 Sources d'ionisation.....	35
2.1.2.2 Les analyseurs.....	37
2.2 Mode d'analyse MS	38
2.3 Mode d'analyse MS/MS (MS ²)	39
2.4 Détermination de la structure primaire d'un peptide à l'aide des spectres MS et MS/MS	40
2.5 Mode Multiple Reaction Monitoring (MRM), Single Reaction Monitoring (SRM).....	41
2.6 Stratégie de quantification	42
Hypothèse(s) et Objectifs :	44
Chapitre 3 : Article de recherche	46
Chapitre 4 : Description détaillée des résultats & Discussion générale.....	79
Chapitre 5 : Conclusion	86
Bibliographie.....	88
ANNEXES.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de choix du type de source d'ionisation selon le type de l'échantillon à analyser37

Tableau 2 : Différents types de spectre de masse ainsi que leurs principes 38

Tableau 3 : Résultats études phénotypique et peptidomique 80

Liste des figures

Figure 1 : Le système nerveux de <i>C. elegans</i> adulte	11
Figure 2 : Analyse électrophysiologique d'un <i>C. elegans</i> mutant de transmission synaptique.....	12
Figure 3 : Diagramme de Dendrogramme des canaux TRP de 17 <i>C. elegans</i>	15
Figure 4 : L'expression de TRPV4 : Évitement osmotique et du toucher du nez chez les mutants <i>osm-9</i> de <i>C. elegans</i>	i (Annexes)
Figure 5 : Polymodalité et spécificité de OCR-2 / OSM-9 <i>in vivo</i>	iii (Annexes)
Figure 6 : Le système nerveux de <i>C. elegans</i>	iv (Annexes)
Figure 7 : Vue d'ensemble du système nerveux de <i>C. elegans</i> et du système neurotransmetteur.....	v (Annexes)
Figure 8 : Transmission de l'influx Nerveux [5].....	vi (Annexes)
Figure 9 : Processus de maturation des neuropeptides	26
Figure 10 : Localisation et expression de <i>egl-3</i>	28
Figure 11 : Expression EGL-21 (CPE) et EGL-3 chez <i>C. elegans</i> de type sauvage et des mutants <i>unc-104KIF1A</i>	31
Figure 12 : Composantes d'un spectre de masse	35
Figure 13 : Mécanisme d'ionisation en spectrométrie de masse.....	36
Figure 14 : Résolution d'un spectromètre de masse.....	37
Figure 15 : Schéma de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	40
Figure 16 : Schéma d'un patron de fragmentation protéique et détermination de la structure d'une protéine à partir du spectre MS et MS/MS.....	41
Figure 17 : Représentation schématique du mode MRM et SRM	42

Liste des abréviations

CLP-1 : Cathepsin L protease

CPE : Carboxypeptidase - E

ESI : Ionisation par électro-vaporisation (Electrospray ionization)

ESI-MS : Ionisation par électro-vaporisation couplée à la spectrométrie de masse (Electrospray ionization coupled mass spectrometer)

FLP : FMRFamide-like neuropeptides

GFP : Green Fluorescent Protein

K : Potassium (Kalium en latin)

KO : Knock Out

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance (High performance liquid chromatography)

ICR : Résonance ionique cyclotronique

IT : Trappe ionique (Ion Trap)

LIT : Trappe ionique linéaire (Linear Ion Trap)

M : Molaire

MALDI : Ionisation par désorption laser assistée par une matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)

m/z : Ratio masse sur charge (Mass to charge ratio)

min : minute

MRM : Mode de surveillance des réactions multiples (Multiple Reaction Monitoring)

MS : Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

NaCl : Chlorure de sodium

NLP : Neuropeptide-like protein

NPR-1 : NeuroPeptide Receptor family

NRM : Résonance Magnétique Nucléaire (Nuclear Magnetic Resonance)

OCR-2 : Osm-9 and Capsaicin receptor-Related

ODR-3 : Odorant response abnormal protein 3

OSM-9 : Olfactory channel

PAM-1 : Puromycin-sensitive AMinopeptidase

PC1 : Proprotéine convertase 1

PC2 : Proprotéine convertase 2

pH : Potentiel d'hydrogène

ppm : Partie par million

QIT : Trappe ionique quadripolaire

Q-orbitrap : Spectromètre de masse orbitrap couplé au quadripole (Quadrupole coupled orbitrap mass spectrometer)

QqQ : Spectromètre de masse triple quadripolaire

Q-TOF : Spectromètre de masse TOF couple au quadripole (Quadrupole coupled TOF mass spectrometer)

SRM : Moniteur unique de surveillance (Single Reaction Monitoring)

TOF : Analyseur à temps de vol (Time of flight)

TRP : Récepteur transitoire Potentiel (Transient Receptor Potential)

TRPA : Récepteur transitoire Ankyrine (Transient Receptor Potential Ankyrin)

TRPC : Récepteur transitoire Canonique (Transient Receptor Potential Canonic)

TRPM : Récepteur transitoire Mélastatine (Transient Receptor Potential Melastatin)

TRPML : Récepteur transitoire Mucopolipine (Transient Receptor Potential Mucopolipine)

TRPN : Récepteur transitoire Non-mécanosensible (Transient Receptor Potential Non-mécanosensible)

TRPP : Récepteur transitoire Polycystine (Transient Receptor Potential Polycystin)

TRPV : Récepteur transitoire Potentiel vanilloïde (Transient Receptor Potential Vanilloid)

WT : Souche sauvage (Wild Type)

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier le Dr. Francis Beaudry pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire et son soutien pendant toutes les étapes de mon projet de maîtrise.

Aux membres de mon comité-conseil, Dr. Christopher A. Price et Dr. Kalidou Ndiaye pour leur assistance et leur soutien tout au long de mon projet de maîtrise.

Tous mes collègues et stagiaires du laboratoire qui ont été d'un immense soutien pour la réussite de ce projet.

Pour terminer, j'aimerais remercier mes proches ici au Canada et ma famille qui ont été d'un grand soutien malgré la distance afin que ce projet soit concrétisé

INTRODUCTION

La nociception est une fonction défensive, une sorte d'alarme qui permet l'intégration de stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme [15]. L'intégration du stimulus au niveau du système nerveux se fait via l'activation de nocicepteurs cutanés, musculaires et articulaires [1, 4]. Le transport de l'information sensorielle par les neurones se fait à partir de la périphérie ou lieu du ressenti de la sensation nociceptive jusqu'à l'effecteur [1, 4, 5]. Dans nos études, nous nous étions fixés comme objectif de vérifier l'hypothèse selon laquelle, les mutants *C. elegans* (*egl-3*, *egl-21*, *flp-18* et *flp-21*) auraient une diminution significative dans la production de neuropeptides matures bioactifs et présenteraient par conséquent une diminution significative de la sensibilité aux stimuli nociceptifs.

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) est un petit ver de forme allongée et recouvert par une cuticule protectrice, visible au stéréomicroscope. À 22°C, son cycle de développement est de 3 jours et sa durée de vie environ 3 semaines [1, 2, 18]. C'est un nématode non parasite et non segmenté, qui se nourrit de microorganismes, principalement des bactéries du genre *Escherichia coli* (*E. coli*). La presque totalité des *C. elegans* sont hermaphrodites (99,5 %) et s'autofécondent à l'intérieur du même organisme assurant ainsi la pérennité de l'espèce. Les mâles XO (0.05%) copulent avec des hermaphrodites et produisent alors de nouvelles lignées avec une proportion d'hermaphrodites qui peut-être plus élevée.

C. elegans possède un système nerveux rudimentaire, constitué de 302 neurones dont le nombre et la position sont identiques d'un individu à l'autre. Ses neurones ont une morphologie généralement simple, avec un ou deux prolongements neuritiques [2]. Le système nerveux de *C. elegans* contient environ 7,000 synapses chimiques, dont 2,000 jonctions neuromusculaires et 600 jonctions communicantes (*gap junctions*). À titre de comparaison, une seule cellule pyramidale du cortex des mammifères contient plus de 10,000 synapses; ceci met en évidence la simplicité du système nerveux de *C. elegans* [1, 2, 18, 25].

Le génome de *C. elegans*, entièrement séquencé, a été publié en 1998 [18]. Il comporte 100 millions de paires de bases (pb), avec 19,000 gènes codant pour des protéines. Par comparaison, la séquence du génome humain, publiée pour la première fois en 2001, contient trois milliards de pb, pour 20,000 à 25,000 gènes codant pour des protéines [18].

Le neurone ASH est considéré comme le principal nocicepteur impliqué dans les réponses d'évitement des stimuli nocifs, ce neurone exprime les nocicepteurs OCR-2 et OSM-

9, orthologues des TRPV des mammifères [62]. Des études ont montré l'existence des gènes orthologues entre les espèces supérieures y compris l'humain et *C. elegans* [171]. *C. elegans* est un modèle intéressant pour l'étude de la nociception, car il présente un comportement nocifensif (réponse à la nociception) bien défini et reproductible impliquant soit une attraction ou un changement de direction (répulsion) par rapport aux stimuli nociceptifs [2, 9].

Notre étude est dérivée des hypothèses et objectifs suivants : les mutants de *C. elegans* (*egl-3* et *egl-21* ; *flp-18* et *flp-21*) devraient présenter une diminution significative de la sensibilité aux stimuli thermiques et chimiques ; de plus, les modulations du comportement d'évitement thermique observées devraient être proportionnelles à l'expression des neuropeptides pronociceptifs (FLPs). Ensuite comme objectifs, nous devrions procéder à une analyse quantitative du comportement d'évitement de chaque type de stimulus pour *C. elegans* WT (N2) vs mutants (*egl-3* et *egl-21* ; *flp-18* et *flp-21*) ; caractériser et quantifier l'expression des FLPs par spectrométrie de masse et enfin analyser le lien entre les changements phénotypiques et l'abondance de neuropeptides matures (FLP-18 et FLP-21). Dans nos études, nous nous attendions à ce que les mutants de *C. elegans* *egl-3* et *egl-21* présentent une diminution significative des concentrations de neuropeptides matures.

REVUE DE LA LITTERATURE

Chapitre 1 : Introduction à la nociception

La nociception est essentielle à la survie et fournit un mécanisme de perception sensorielle des stimuli nocifs, qui alerte l'organisme des dangers environnementaux potentiels. Associé à une sensation de douleur et à des réponses comportementales complexes, ce mécanisme protège l'organisme des dommages naissants [15]. De plus, la douleur aiguë et chronique peut se manifester par une nociception altérée dans les états douloureux neuropathiques [171]. Éclaircir les bases neurales de la nociception est donc important pour identifier et mettre en œuvre de nouvelles stratégies de traitement de la douleur neuropathique, ainsi que pour découvrir les bases mécanismes grâce auxquelles le système nerveux intègre des informations pour produire des comportements spécifiques en réponse à une gamme de stimuli nocifs [2, 6, 7]. Les organismes invertébrés, tels que *Drosophila melanogaster* et *C. elegans*, se sont révélés être d'excellents modèles génétiquement manipulables pour explorer ces questions. Le processus de perception de la douleur commence à la périphérie par l'activation des nocicepteurs [1, 4, 5]. Malgré les progrès considérables réalisés dans la recherche sur la douleur ces dernières années, de nombreuses questions demeurent concernant les circuits et le comportement nociceptifs, à la fois dans les états nociceptifs aigus et douloureux chroniques [6, 11]. Les techniques permettant l'activation sélective de sous-populations neuronales in vivo peuvent permettre de mieux comprendre ces voies complexes [1, 15].

1.1 Évaluation de la nociception chez *C. elegans*

La nociception est une fonction défensive, une sorte d'alarme qui permet l'intégration de stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme [6, 7]. La réaction des récepteurs sensitifs provoquée par des stimuli envoie des signaux à l'organisme. Certains auteurs associent la nociception à un comportement qui se serait développé au cours de l'évolution des espèces pour sauvegarder l'intégrité physique des organismes [60]. Chaque organisme dépend d'un ensemble de comportements régulés et protecteurs pour assurer sa survie. Lors d'une exposition à un stimulus mécanique, chimique ou thermique nocif, les individus stimulés exécutent un programme de retrait-réflexe protecteur pour prévenir des dommages [19].

1.1.1 Chimiotaxie (Chemotaxis)

Les signaux chimiosensoriels tel un pH acide (< 5) peuvent induire chez *C. elegans* le phénomène de chimiotaxie. Il s'ensuit un évitement du stimulus associé à une modification de la mobilité de l'individu. Ces comportements sont régulés principalement par les organes chimiosensoriels amphides, qui contiennent onze paires de neurones chimiosensoriels. Chaque neurone sensoriel amphidique exprime un ensemble spécifique de gènes récepteurs potentiels [61]. Il détecte aussi un ensemble caractéristique de phéromones, de stimuli chimiques attractifs ou répulsifs [16, 61]. Environ 500-1 000 récepteurs différents couplés aux protéines G (RCPG) sont exprimés dans les neurones chimiosensoriels, et ceux-ci peuvent être complétés par d'autres voies sensorielles [61]. *C. elegans* possède un système chimiosensoriel extrêmement développé. Ceci lui permet de détecter une grande variété de signaux volatils et hydrosolubles associés à la nutrition et au danger [61]. Une grande partie du système nerveux de *C. elegans* et plus de 5 % de ses gènes sont consacrés à la reconnaissance de produits chimiques environnementaux.

Chez *C. elegans*, sa capacité à éviter un stimulus nocif est critique pour sa survie [62]. Pour comprendre les mécanismes spécifiques de stimulation chimique chez *C. elegans*, les chercheurs ont fait un zonage de gélose avec des zones à pH basique et des zones à pH neutre. Les études ont montré que *C. elegans* souche sauvage (N2) évitait les zones au pH supérieur à 10,5. Cependant, les mutants de *C. elegans* donc on a inhiber le neurone sensoriel associé à la perception du pH basique ne présentaient pas le comportement d'évitement des zones au pH supérieur à 10,5 [62]. L'ablation au laser spécifique des neurones ASH a rendu ces individus insensibles à un pH basique [62].

De plus, le sauvetage génétique de mutants *osm-9* en exprimant spécifiquement OSM-9 dans l'ASH a montré que les canaux TRPV jouent un rôle essentiel dans la détection de la variation du pH. L'imagerie Ca^{2+} *in vivo* a également révélé que les neurones ASH étaient activés par une stimulation à pH. OSM-9 / OCR-2 orthologues des TRPV de mammifères fonctionnent comme des canaux pour l'afflux de Ca^{2+} dans ASH. Ces résultats démontrent que chez *C. elegans*, la variation de pH est détectée par les nocicepteurs ASH suite à l'ouverture des canaux de OSM-9 / OCR-2 [62].

1.1.2 Thermotaxie (Thermotaxis)

Les signaux thermosensoriels peuvent induire chez *C. elegans* le phénomène de thermotaxie. Chez *C. elegans*, la température influence chaque processus biologique et biochimique. La perception d'un stimulus nocif par un organisme entraîne la mise en place des mécanismes de défense, tels que l'évitement [19]. Cette capacité à éviter les sensations de chaleur et de froid est essentielle à la survie et dépend de la nociception thermique [11]. Ainsi, la capacité de sentir la température et de répondre adéquatement est essentielle pour la survie de tous les organismes [11].

Le sous-ensemble TRPV orthologue de OSM-9 / OCR-2 est activé par la chaleur et responsable de la détection de l'augmentation de la température [11]. Pour comprendre la base génétique et neurale de la nociception thermique, des tests qui quantifient l'évitement de la chaleur ont été réalisés chez *C. elegans* [11]. Afin d'étudier les mécanismes spécifiques de stimulation thermique chez *C. elegans*, les chercheurs ont fait un zonage de gélose. La gélose comportait quatre zones, dont deux sous l'effet d'une pointe chauffante (33°C) et deux autres zones contrôles (sans pointe chauffante). Ces études montrent que *C. elegans* souche sauvage (N2) évite les zones avec la pointe chauffante (33°C). Cependant, les mutants de *C. elegans* présentant des anomalies neuronales sur le plan de la structure et du développement de cette fonction échouaient à éviter la zone stimulée (33°C) [11, 19]. Une analyse plus poussée a révélé que la perte du récepteur NPR-1 ou de son ligand (FLP-21), augmente le seuil de sensibilité à la chaleur chez les mutants de *C. elegans*. Ces mutants dépourvus de récepteurs NPR-1 et des deux canaux TRPVs présentaient des défauts plus sévères d'évitement thermique que les mutants ne présentant qu'une mutation de *npr-1* ou de *osm-9* et *ocr-2*. Ces résultats ont démontré que les canaux TRPV et la voie de signalisation des neuropeptides FLP-21 / NPR-1 déterminent le seuil d'évitement de la chaleur chez *C. elegans* [11]. Ainsi, l'étude de ce comportement nociceptif chez *C. elegans* peut être utilisée pour comprendre les bases génétiques et moléculaires de la nociception thermique [19].

1.1.3 Mécanosensation

Les signaux mécaniques peuvent induire chez *C. elegans* le phénomène de mécanosensation. *C. elegans* a la capacité de détecter et de répondre à divers stimuli mécaniques en utilisant ses circuits neuronaux [63]. Le contact par le toucher est un des stimuli nocifs de

mécanosensation chez *C. elegans*. La capacité de ce dernier à éviter ce stimulus dangereux est critique pour sa survie [21, 63]. Pour comprendre les mécanismes spécifiques de stimulation mécanique, les chercheurs ont réalisé plusieurs variances de contact doux de la tête et de la queue de *C. elegans*. Un poil de sourcil collé à l'extrémité d'un cure-dent a été généralement utilisé pour réaliser ces expériences [63]. Les études montrent que *C. elegans* souche sauvage (N2) réagit en évitant le stimulus mécanique, alors que les mutants présentent une diminution de la sensibilité au toucher [63]. En effet, pour comprendre ces expériences, il faut s'appuyer sur les tests quantitatifs de la sensibilité au toucher. Ces tests ne sont pas un phénomène du tout ou rien, car même les individus insensibles au toucher réagissent parfois au premier contact. Ces expériences s'appuient plutôt sur une mesure plus quantitative de la réponse tactile, qui consiste à compter les réponses à plusieurs contacts et touchers avec des stimuli bien définis [63]. En pratique, il faut éviter un stimulus trop dur et ne pas toucher les animaux trop près du bout de la tête ou de la queue [21, 63]. Il faut prendre soin de toucher les individus de manière à ne pas stimuler d'autres neurones mécanosensoriels [21]. À tous les contacts, un individu de type sauvage (N2) s'orientera généralement en sens inverse en réponse à la stimulation. L'individu mutant insensible au toucher pourrait répondre de façon minimale au premier contact et ne plus répondre aux contacts suivants. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une mesure quantitative assez précise de la sensibilité au toucher, cette technique quantitative avec le poil de sourcil est un test rapide qui a été utilisé pour dépister les mutants insensibles au toucher [63].

Des outils existent pour permettre d'étudier la mécanosensation en observant comment l'individu est affecté par le toucher. Ceci peut être fait en mesurant les réponses cellulaires aux stimuli mécaniques, notamment par l'imagerie Ca^{2+} *in vivo* et l'enregistrement patch-clamp, en recherchant les molécules nécessaires à la fonction MRN, et en manipulant la fonction cellulaire en utilisant l'expression cellulaire spécifique de protéines modifiées et hétérologues [21]. Les neurones mécanorécepteurs (MRN) permettent de détecter les collisions avec les particules du sol et avec les autres individus ainsi que les forces générées par le mouvement de l'organisme. Les MRN peuvent également aider les individus à détecter les sources de nourriture bactérienne. Les hermaphrodites et les mâles ont 22 MRN putatifs ; les mâles ont 46 MRN supplémentaires, la plupart, sinon la totalité, étant nécessaires pour l'accouplement [21]. Les défis futurs devraient être, entre autres choses, le développement et l'identification de la fonction de chaque MRN

ainsi qu'une meilleure compréhension de la façon dont la mécanosensation affecte le comportement.

1.2 Méthode expérimentale

Le principe du test est basé sur l'évaluation de la réponse de *C. elegans* à un stimulus (thermique ou chimique) consiste à observer et à quantifier le mouvement d'évitement ou de non évitement en réponse à un stimulus spécifique. Les méthodes proposées dans ce manuscrit pour l'évaluation de la thermotaxe ou de la chimiotaxie ont été adaptées des stratégies à deux et quatre quadrants décrites précédemment par Margie et al., 2013 [16] ; Wittenburg and Baumeister, 1999 [19]. Nous avons décidé d'utiliser la même stratégie d'observation pour tous les tests effectués pour une meilleure comparaison. Les schémas expérimentaux sont illustrés à l'article ci-joint que nous avons publié. Les résultats du test de chimiotactisme sont disponibles sous forme de figures supplémentaires. Les expériences ont été effectuées sur des boîtes de Pétri de 92 x 16 mm divisées en quatre quadrants. Un cercle central délimitait une zone où les animaux n'étaient pas comptés. Cela empêche les vers immobiles de déformer les données de comportement. Les quadrants créent une configuration alternée de zones de stimuli thermiques (ou chimiques) et de zones de contrôle afin d'éviter tout biais pouvant apparaître du fait de l'emplacement initial des nématodes. Les boîtes de Pétri ont été divisées en quadrants deux zones de stimulus (A et D) et deux zones de contrôle (B et C) [B. Nkambeu et al., 2018]. L'azoture de sodium a été utilisé dans tous les quadrants pour paralyser les nématodes. Les nématodes ont été déposés au centre d'une boîte de Pétri marquée et au bout de 30 minutes, ils ont été comptés par quadrant. Les nématodes qui n'ont pas traversé le cercle intérieur n'ont pas été comptés. La formule dérivée de l'indice thermotaxique (TI) et le pourcentage d'évitement des animaux ont été utilisés pour phénotyper chaque génotype testé de *C. elegans*.

1.3 Présentation de *C. elegans*

Sydney Brenner, biologiste Sud-Africain, a introduit *C. elegans* dans les laboratoires de génétique à la fin des années 1960. L'objectif était de répondre au besoin de trouver un organisme ou modèle génétique pour comprendre le fonctionnement d'un organisme pluricellulaire en neurobiologie [29]. Le nématode *C. elegans* est un petit ver rond non segmenté qui combine à la fois simplicité et complexité structurale. Ce nématode fait environ 1 mm de

longueur à l'âge adulte et un tiers de ses cellules sont des cellules nerveuses [2]. Il a été utilisé comme modèle pour explorer de nombreux domaines d'études, entre autres la biologie et la nociception [2, 6, 29]. Les travaux sur *C. elegans* ont apporté dans la recherche médicale une meilleure compréhension sur les origines d'une série de maladies. Dans les études datant de février 2018, *C. elegans* a été utilisé comme modèle pour mieux comprendre la maladie de Parkinson [171]. Auparavant, en 2003, *C. elegans* était utilisé comme modèle pour les maladies dégénératives héréditaires humaines, entre autres la dystrophie musculaire ou myopathie de Duchenne et la maladie neurodégénérative appelée chorée de Huntington [24]. Tout cela fait de *C. elegans* un modèle animal très intéressant.

1.4 Neuroanatomie et Neurophysiologie de *C. elegans*

La neuroanatomie se définit comme l'étude de la structure du système nerveux. En neuroanatomie, les études sont effectuées en utilisant d'autres organismes comme modèle. Les souris, les poissons-zèbres, la drosophile et *C. elegans* sont certains des modèles communs utilisés pour étudier la neuroanatomie et la neurophysiologie [31, 32].

Les neurones de *C. elegans* ont une morphologie généralement simple, avec un ou deux prolongements neuritiques [17]. J. White et collaborateurs (1984) [17], ont reconstitué l'ensemble de la connectivité du réseau neuronal de *C. elegans* à partir de coupes examinées en microscopie électronique. Ce réseau neuronal est très similaire entre les individus, bien qu'il puisse exister de petites variations interindividuelles du nombre de connexions synaptiques formées. *C. elegans* présente dans son système nerveux environ 7 000 synapses chimiques, dont 2 000 jonctions neuromusculaires et 600 jonctions communicantes (*gap junctions*) [17]. Dans le même ordre d'idée, une seule cellule pyramidale du cortex d'un mammifère forme plus de 10 000 synapses [17]. Le séquençage du génome de *C. elegans* en 1998 a confirmé le haut degré de conservation qui existe à l'échelle moléculaire entre le système nerveux du nématode et celui des vertébrés [26, 27]. D'autres études révèlent une certaine similarité au niveau génétique entre les humains et *C. elegans*. Environ 40 pour cent des gènes humains ont des homologues dans le génome de *C. elegans* [9, 31]. Ce dernier est un organisme extrêmement rudimentaire avec une structure interne facilement visualisable en temps réel. Son système nerveux est assez simple, les neurones suivent une sorte de diagramme de connexions à l'intérieur du nématode et se

rejoignent au niveau d'une zone concentrée en neurones qui pourrait s'apparenter à un cerveau primitif (figure 1). *C. elegans* présente des comportements élémentaires comme la nutrition et les réponses à différents stimuli, qui peuvent être étudiés [9, 31].

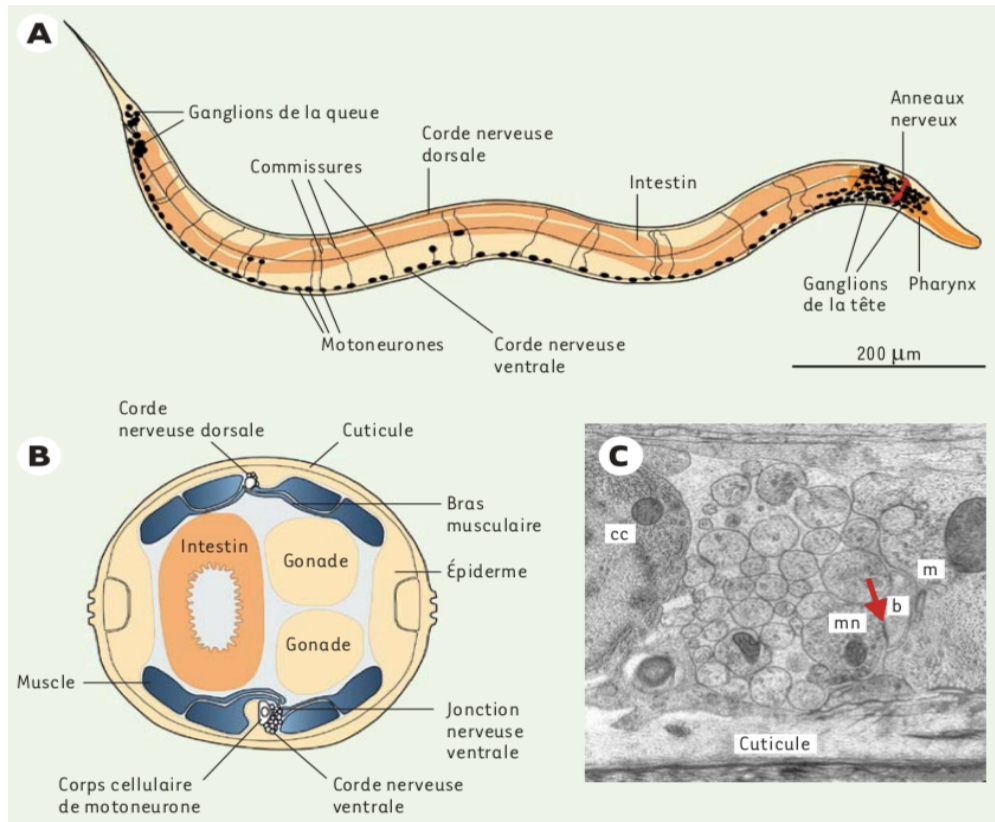


Figure 1 : Le système nerveux de *C. elegans* adulte (Extrait de C. Gally and J. L. Bessereau, 2003) [2].

A. Les 302 neurones du nématode se répartissent pour la plupart entre les ganglions de la tête et de la queue et le long de la corde nerveuse ventrale. Tous les corps cellulaires (cc) des motoneurones ne sont pas représentés sur ce schéma. Un faisceau de neurites majoritairement issus des neurones contenus dans les ganglions de la tête constitue « l'anneau nerveux » qui entoure le pharynx. Les motoneurones sont situés dans la région ventrale de l'animal. Ils possèdent des extensions neuritiques ventrales qui circulent selon un axe antéro-postérieur dans la corde ventrale. Certains motoneurones envoient des projections dorsales via des commissures circonférentielles. Les cellules musculaires qui permettent le déplacement du ver sont réparties en quatre quadrants ventraux et dorsaux.

B. Coupe transversale schématique d'un hermaphrodite adulte. Les cellules musculaires envoient des extensions cytoplasmiques, les « bras musculaires », à destination des axones moteurs contenus dans les cordes ventrale ou dorsale.

C. Une coupe transversale de la corde ventrale observée en microscopie électronique permet de visualiser une jonction neuromusculaire (flèche) entre un motoneurone (mn) et un bras musculaire (b). cc : corps cellulaire d'un motoneurone; m: cellule musculaire (photographie réalisée par P. Rostaing, Inserm U.497).

Chez la plupart des animaux, l'approche standard pour étudier l'activité neuronale (neurophysiologie) est un enregistrement électrique des neurones. Ces techniques sont difficiles à appliquer chez *C. elegans* pour plusieurs raisons. Comme les autres nématodes, *C. elegans* a

un squelette hydrostatique dont la structure est un compartiment fermé, plus ou moins souple et rempli par un liquide interstitiel incompressible. Sa forme et la structure de son corps protégé par une cuticule protéique tenace entoure la cavité liquide interne imparfaitement délimitée et fortement pressurisée [30]. De ce fait, la présence de cuticule peut constituer une barrière à un électrode d'enregistrement. L'étude de l'activité neuronale chez *C. elegans* est précédée par une dissection qui doit être réalisée avec grand soin afin d'éviter la perturbation du squelette hydrostatique. D'autre part, les neurones de *C. elegans* sont petits, avec des corps cellulaires entre 2 à 3 microns de diamètre [30]. Ainsi, même lorsqu'un neurone de *C. elegans* est exposé par dissection, la réalisation d'enregistrements intracellulaires par analyse électrophysiologique nécessite beaucoup de compétences et de dextérité (figure 2) [2].

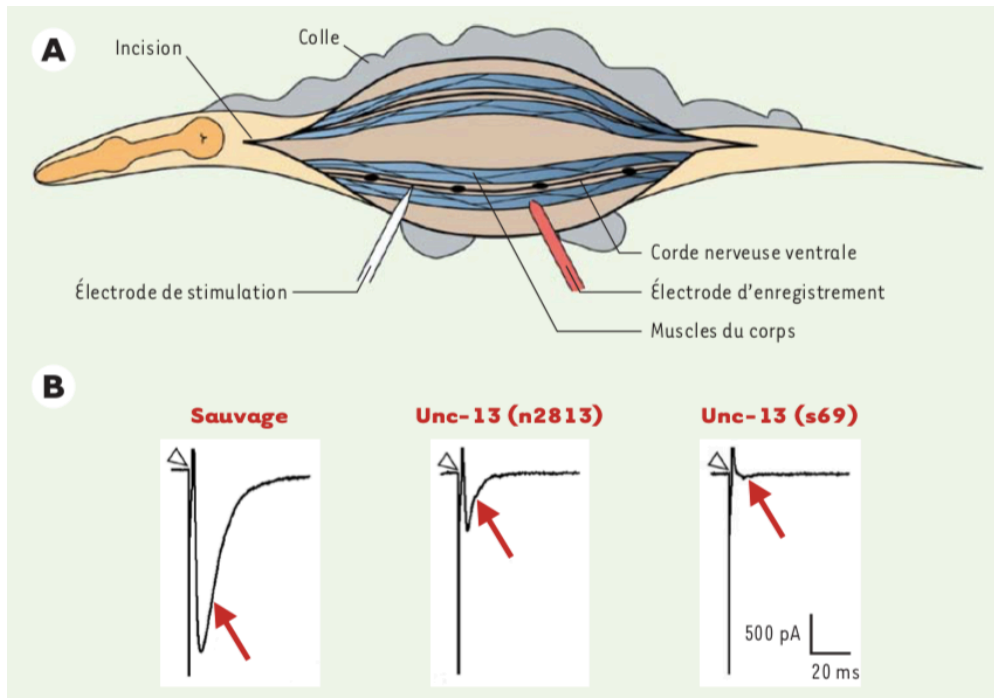


Figure 2 : Analyse électrophysiologique d'un *C. elegans* mutant de transmission synaptique. (Extrait de C. Gally and J. L. Bessereau, 2003) [2].

A. Le ver est fixé sur un support avec une colle chirurgicale. Une incision latérale de la cuticule permet d'exposer les cellules musculaires et la corde nerveuse ventrale après aspiration du contenu de la cavité pseudocoelomique. La stimulation des motoneurones par une électrode placée au voisinage de la corde ventrale provoque la libération de neurotransmetteur.

B. La stimulation des récepteurs de l'acétylcholine et du GABA présents aux jonctions neuromusculaires produit un courant synaptique enregistrable au niveau de la cellule musculaire (flèche rouge) ; la pointe du triangle indique l'artéfact de stimulation. La protéine UNC-13 joue un rôle clé dans l'exocytose des vésicules synaptiques. Chez des mutants de *unc-13*, partiel (*n2813*) ou nul (*s69*), le courant post-synaptique est respectivement diminué ou aboli.

Chez *C. elegans*, l'utilisation de méthodes physiologiques pour surveiller l'activité neuronale *in vivo* ou déterminer l'effet de canaux ioniques spécifiques sur la fonction neuronale est tout à fait récent [30]. Avec le développement de nouveaux biomarqueurs neurales ainsi que de nouvelles techniques pour disséquer et manipuler les nématodes, les méthodes physiologiques sont susceptibles de jouer un rôle de plus en plus important dans les études de la fonction et du comportement du système nerveux de *C. elegans* [30].

Les caractéristiques de la description du système nerveux chez *C. elegans* font de celui-ci un organisme particulièrement adapté pour étudier la neurobiologie. La position des 302 neurones de son système nerveux est constante d'un individu à l'autre (Figure 1) [11, 2].

1.5 Les mécanismes de neurotransmission chez *C. elegans*

Dans les études réalisées par J. E. Richmond et E. M. Jorgensen (1999) [34], l'analyse par électrophysiologie de la neurotransmission chez *C. elegans* a été rendue possible grâce au développement d'une nouvelle approche [2, 32]. Celle-ci a permis l'enregistrement de la transmission synaptique au niveau des jonctions neuromusculaires (Figure 2). Certains mutants étudiés par électrophysiologie ont permis d'identifier les anomalies liées à la neurotransmission et ainsi de caractériser la nature du déficit [34]. Dans une autre étude, en combinant les mutations et en exprimant des protéines modifiées à partir de transgènes, les auteurs J. E. Richmond, R. M. Weimer et E. M. Jorgensen (2001) [35] ont pu analyser les interactions entre les constituants de la machinerie de libération synaptique et tester *in vivo* les modèles construits à partir de données biochimiques [35]. Cette combinaison entre la génétique et la physiologie ont permis de caractériser les récepteurs et les canaux. Par exemple, l'enregistrement des cellules musculaires chez *C. elegans* a révélé l'existence de deux types distincts de récepteurs de l'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires [36].

1.5.1 Les nocicepteurs chez *C. elegans*

De nombreux nocicepteurs de *C. elegans* ont des mécanismes d'activation et de régulation similaires à ceux des mammifères [33, 39]. La famille des récepteurs transitoires (TRP en anglais *Transient Receptor Potential*) sont conservés de *C. elegans* à l'espèce humaine. Environ 28 membres du TRP ont été identifiés chez les mammifères [33]. Sur la base de leur

homologie de séquence et de leur similarité fonctionnelle, ces canaux sont subdivisés en sept sous-familles. L'accumulation de données expérimentales montre que les canaux TRP des mammifères sont largement impliqués dans la régulation de la physiologie sensorielle. Ces canaux sont importants pour la détection d'une grande variété de signaux mécaniques et chimiques à la fois intracellulaires et extracellulaires [33].

Grâce au dépistage génétique et à la recherche dans les bases de données, 17 canaux TRP ont été identifiés chez *C. elegans* ; ils couvrent les sept sous-familles du TRP. La relation phylogénique entre chaque canal TRP de *C. elegans* et certaines de leurs fonctions générales a pu être décrite par Xiao et Shawn en 2011 [33]. La méthode utilisée est l'algorithme de ClustalW. La distance évolutive entre chaque canal TRP est indiquée par la longueur de la branche en unités de mutation acceptée par le point (PAM) (figure 3). Chaque sous-unité TRP du nématode semblerait contenir six segments transmembranaires (S1-S6). Il est intéressant de noter que de nombreux canaux TRPs de *C. elegans* jouent un rôle important dans la transduction sensorielle, notamment la chimiosensation, la mécanosensation, l'osmosensation et la proprioception [33].

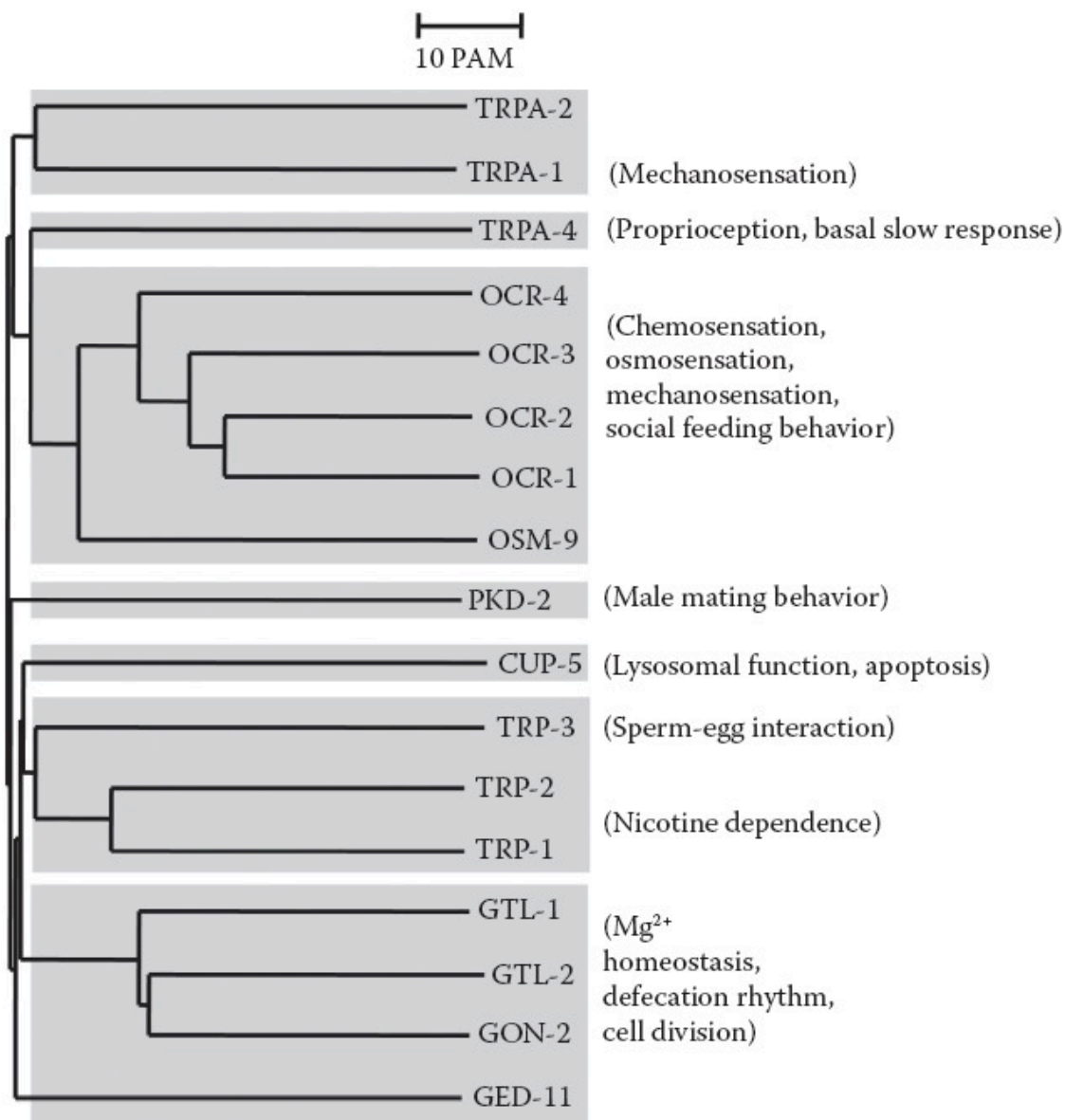


Figure 3 : Diagramme de Dendrogramme des canaux TRP de 17 *C. elegans* (Extrait de R. Xiao and X. Z. Shawn, 2011) [33].

Diagramme de Dendrogramme des canaux TRP de 17 *C. elegans* utilisant l'algorithme de ClustalW. La distance évolutive entre chaque canal TRP est indiquée par la longueur de la branche dont l'unité est le Point d'Acceptation de Mutation (PAM). Certaines fonctions générales de canaux TRP spécifiques sont indiquées sur la figure.

1.5.1.1 Récepteurs TRPV chez *C. elegans*

Un certain nombre de composés naturels isolés de plantes sont des agonistes de plusieurs canaux TRPV de mammifères, notamment la capsaïcine (TRPV1), le cannabinoïde (TRPV2), le camphre (TRPV3 et TRPV1), le carvacrol, le thymol et l'eugénol (TRPV3), et le bisandrographolide (TRPV4) [33]. Toutefois, la plupart de ces agonistes n'ont pas été testés sur

les canaux TRPV de *C. elegans*. Des études génétiques et biologiques montrent que des canaux TRPV distincts de *C. elegans* peuvent former des canaux hétéromériques dans différents types de cellules. Par exemple, dans les neurones AWA et ASH, OSM-9 et OCR-2 sont colocalisés (figure 5-A, en annexe) et dépendent les uns des autres pour leur localisation [33, 41]. Fonctionnellement, OSM-9 et OCR-2 sont tous deux requis pour la thermosensation, la chimiosensation, la mécanosensation et l'osmosensation dans ces neurones [33].

Les récepteurs TRPV1 sont des récepteurs ionotropiques activés par des molécules de la famille des vanilloïdes comme la capsaïcine, molécule activatrice des TRPV1 naturellement présente dans le piment [179]. Ces récepteurs interviennent dans les mécanismes nociceptifs et s'activent en réponse à un stimulus thermique. Son mode d'action est biphasique, elle engendre d'abord une brûlure ou irritation due à la stimulation du TRPV1 et puis les fibres sensorielles exprimant ce récepteur se désensibilisent [178, 179]. En effet les TRPV1 apparaissent et disparaissent naturellement à la surface membranaire selon un cycle de renouvellement nécessaire à leur fonctionnement [179]. Des pathologies comme le diabète sucré entraîne une désensibilisation à la douleur thermique et tactile, probablement dû à une modification de l'expression des TRPV1 [177, 178].

Le rôle des canaux TRPV dans la signalisation de la sérotonine a été identifié à partir d'un criblage génétique non biaisé pour les mutants de synthèse de la sérotonine [38]. Le gène *tph-1* code pour la tryptophane hydroxylase qui est l'enzyme clé pour la synthèse de la sérotonine. L'expression de GFP cible le gène *tph-1* (*tph-1 :: gfp*), qui peut être identifié sans ambiguïté et quantifié dans des neurones sérotoninergiques spécifiques des nématodes vivants. Les gènes *ocr-2* et *osm-9* sont les deux premiers à être identifiés du TRPV et qui régulent l'expression de *tph-1* dans les neurones chimiosensoriels ADF [37]. Pour les simples mutants avec un seul gène muté *osm-9* ou *ocr-2*, on observe une diminution considérable de l'expression de *tph-1 :: gfp* dans les neurones ADF [37]. Mais l'expression de *tph-1 :: gfp* dans les neurones NSM et HSN n'est pas affectée chez ces simples mutants. Puisqu'il y a une similarité d'expression entre les doubles mutants et les simples mutants, on peut conclure qu'il n'y a pas de différence détectable dans l'intensité d'expression de *tph-1 :: gfp* [37].

En exprimant des séquences codantes *ocr-2* ou *osm-9* du type sauvage sous des promoteurs spécifiques à certaines cellules, il a été démontré que l'expression de OCR-2 et

OSM-9 dans ADF est nécessaire et suffisante pour restaurer l'expression de *tph-1* chez les mutants respectifs. En plus du neurone ADF, OSM-9 et OCR-2 sont co-exprimés dans cinq paires de neurones chimiosensoriels non sérotoninergiques: AWA, ADL, ASH dans la tête, et PHA et PHB dans la queue [39].

Pour ce qui est des récepteurs sensoriels, le mécanisme qui dicte l'expression de OCR-2/OSM-9 semble être la signalisation de la protéine-G. Il existe des preuves génétiques convaincantes suggérant que l'OCR-2/OSM-9 détecte directement la force osmotique environnementale et les stimuli tactiles au niveau de la tête à travers les neurones ASH (figure 4 et figure 5-A, en annexe) [41]. Cependant, la fonction de OCR-2/OSM-9 dans la sensation osmotique et mécanique dépend également de la protéine-G ODR-3 [42]. Ceci suggère que la fonction OCR-2/OSM-9 dans la sensation osmotique et mécanique est spécifiée par une activation du déclenchement mécanique et de la signalisation de la protéine-G. Un des TRPV, le TRPV4 des mammifères, peut remplacer OSM-9 pour diriger la sensation osmotique et mécanique chez *C. elegans* [41]. Le TRPV4 fonctionne par déclenchement mécanique ainsi que par activation chimique dans des systèmes d'expression hétérologues [40, 43, 44]. Ceci suggère que la fonction et le mécanisme de transfert de l'influx nerveux sont conservés entre le nématode et les mammifères.

1.5.2 Structure neuronale chez *C. elegans*

La structure neuronale et la connectivité du système nerveux de *C. elegans* proviennent de reconstructions de micrographies électroniques réalisées sur les séries de coupes transversales et longitudinales [17] (figure 6, annexe). L'hermaphrodite a un total de 302 neurones, disposés dans une structure invariante. Les études ont permis de regrouper les neurones en 118 classes en fonction de la similarité des morphologies et des connectivités (figure 7-B, en annexe). Les neurones ont des morphologies simples avec peu ou pas de prolongements. Les neurones sont généralement très connectés localement, établissant des connexions synaptiques avoisinantes [17] (figure 6, en annexe).

John White *et al.* (1986) [45] ont publié une carte détaillée du système nerveux de *C. elegans*. Cette carte ne représente pas seulement les 302 neurones, mais également les 7 000 connexions qui relient ces neurones entre eux [45]. Pour établir cette carte, ils ont utilisé au moins 20 000 images prises au microscope confocal. Cette carte a permis de jeter un éclairage

sur les fonctionnalités de chacun des 302 neurones de *C. elegans*, et des connexions synaptiques qu'ils entretiennent [45, 46].

Ainsi la plupart de ces connexions se font au moyen d'une synapse. Cette dernière est une structure qui permet à un neurone de se connecter à un autre neurone pour lui envoyer un signal via des neurotransmetteurs. De part et d'autre d'une synapse, il y a respectivement un neurone émetteur (pré-synaptique) et un neurone récepteur (post-synaptique) (figure 8, en annexe) [5, 45, 46]. Chez *C. elegans*, on a observé que certains neurones possédaient de nombreuses connexions pré-synaptiques suggérant que ces neurones peuvent envoyer des messages à de nombreux autres neurones. Ils correspondent généralement aux neurones liés aux fonctions sensorielles. Inversement, d'autres neurones possèdent de nombreuses connexions post-synaptiques. Ces neurones peuvent donc recevoir des messages d'un grand nombre de neurones. Il s'agit dans la majorité des cas de neurones qui commandent les fonctions motrices [45].

L'analyse des connexions permet donc de classer les neurones en 3 grandes catégories : sensoriel, moteur ou intermédiaire. Par contre, cette classification n'indique rien sur le rôle exact de chacun des neurones. Pour le savoir, il faut faire des expériences bien plus fines. Une des façons de procéder consiste à détruire, avec un laser, un neurone bien particulier et observer en quoi cela modifie le comportement du ver. Grâce à cette méthode, on a pu repérer quels étaient les neurones associés à la perception de la température, des odeurs ou de la nourriture, ou encore ceux qui jouent un rôle dans l'hibernation ou l'accouplement. Des chercheurs ont même identifié certains neurones qui jouent un rôle dans le comportement social de *C. elegans* [45]. Il y a encore beaucoup de travaux à faire, mais nous pouvons nous imaginer qu'un jour, les chercheurs pourraient modéliser le système nerveux de *C. elegans*, et comprendre parfaitement la chaîne des signaux impliqués dans tous ses comportements.

1.5.3 Mécanismes moléculaires de neurotransmission

Le courant électrique qui se déplace sans perte d'intensité le long de l'axone des fibres nerveuses est appelé influx nerveux. La myéline est un isolant lipidique qui contraint l'influx nerveux à se propager par bonds. Ce type de propagation limite les contacts avec la membrane de l'axone et donc les pertes de vitesse et d'intensité du signal [5]. Arrivé à l'extrémité de l'axone, au niveau du bouton synaptique, le message nerveux ne peut pas franchir la synapse.

Cette espace entre les neurones pré-synaptique et post-synaptique est appelée fente synaptique ou espace inter-synaptique [5]. Le signal électrique est donc transmis au neurone post-synaptique par l'intermédiaire d'un messager chimique, le neurotransmetteur (Figure 7B, en annexe) [5, 46]. À l'arrivée du message nerveux électrique dans le bouton synaptique, une entrée massive d'ions calcium fait migrer les vésicules synaptiques, qui fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent les molécules de neurotransmetteur dans la synapse (phénomène d'exocytose). La membrane du neurone post-synaptique possède de nombreux récepteurs spécifiques du neurotransmetteur ; la liaison récepteur-neurotransmetteur déclenche une cascade de réactions qui aboutit à la formation d'un message nerveux électrique au niveau de la membrane du neurone post-synaptique [5].

Les molécules de neurotransmetteurs de type protéiques (neuropeptides) qui n'ont pas été captées par les récepteurs post-synaptiques pourraient déclencher la production d'un second message nerveux. Pour cette raison, elles sont recaptées par le neurone pré-synaptique et emballées à nouveau dans des vésicules. Dans le cas contraire, elles sont dégradées dans l'espace inter-synaptique par des enzymes spécifiques libérées en même temps qu'elles [5]. Des substances toxiques peuvent perturber la transmission du signal nerveux au niveau des synapses entre cellules nerveuses et musculaires. Leur étude a permis de mieux comprendre le fonctionnement général des synapses [5].

1.5.4 Neuropeptides chez *C. elegans*

Les neuropeptides sont de courtes séquences d'acides aminés qui agissent directement ou indirectement pour moduler l'activité synaptique [3]. Les neuropeptides constituent une famille vaste et fonctionnelle de molécules de signalisation neurochimiques. Ils sont largement impliqués dans la régulation de divers processus physiologiques [20].

Cependant, la plupart des neuropeptides appartiennent à deux grandes familles : les peptides de type insuline [46] et les peptides apparentés à la FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) ou les FaRP, que l'on appelle aussi FLPs (FMRFamide-like neuropeptides) chez *C. elegans* [48, 49]. Les peptides non-insuline, non-FLP restants sont classés comme neuropeptide-like proteins ou NLPs. Les NLPs sont un groupe divers de neuropeptides qui ont peu de similarité entre eux [10]. À quelques exceptions près, les fonctions des différents neuropeptides restent largement inconnues chez *C. elegans*. Chez ce dernier, le rôle des neuropeptides dans la

modulation du comportement est un sujet d'intérêt pour la recherche [3, 4, 5, 11, 14]. Dans une famille de neuropeptides, plusieurs neuropeptides peuvent se lier et activer le même récepteur en raison du chevauchement fonctionnel possible [3, 4, 6]. Néanmoins, des expériences récentes ont montré que plusieurs des gènes de neuropeptides ont des fonctions uniques [2, 3, 24, 24].

Avant le séquençage du génome de *C. elegans*, une des techniques d'identification et de localisation des neuropeptides consistait à utiliser différents anticorps développés pour détecter des neuropeptides chez les mammifères. Les études préliminaires ont rapporté une immunoréactivité à plusieurs composantes, entre autres, la cholécystokinine, la substance P, l'hormone mélanocyte-stimulante, la met-enképhaline et la bêta-endorphine. Le séquençage subséquent du génome de *C. elegans* [27] a indiqué qu'à l'exception des peptides apparentés à la substance P et à la FMRFamide, aucune de ces familles de peptides mammifères n'a été identifiée chez *C. elegans* [10]. En raison de la similitude avec les neuropeptides FLP, les anticorps anti-cholécystokinine sont susceptibles d'avoir réagi de manière croisée avec les FLP [3]. Les anticorps ne sont généralement pas spécifiques ou assez sélectifs ce qui est une limitation très importante.

Après le séquençage du génome de *C. elegans*, l'étendue des gènes de neuropeptides chez *C. elegans* a pu être déterminée [3]. À ce jour, 113 gènes de pro-neuropeptides codant pour plus de 250 neuropeptides distincts ont été identifiés [172]. Parmi ceux-ci, 40 gènes codent pour des peptides analogues à l'insuline, 31 gènes codent pour des peptides apparentés à la FMRFamide et 42 gènes codent pour des neuropeptides non liés à l'insuline et non associés à la FMRFamide [3, 49, 172]. Comme dans d'autres systèmes, les neuropeptides de *C. elegans* sont dérivés de molécules précurseurs qui doivent subir une modification post-traductionnelle pour donner les peptides actifs. Ces molécules précurseurs peuvent contenir un seul peptide, plusieurs copies d'un seul peptide, de multiples peptides distincts ou toute combinaison de ceux-ci [3].

Les gènes des neuropeptides sont largement exprimés dans tout le système nerveux, y compris dans les neurones sensitifs et moteurs et les interneurons. De plus, certains des gènes sont également exprimés dans des tissus non-neuronaux, tels que la gonade somatique, l'intestin et l'hypoderme vulvaire [2, 3]. Pour comprendre les effets des neuropeptides sur le comportement de *C. elegans*, les individus présentant des mutations caractéristiques et précises ont été étudiés. Sur la base de leur profil d'expression, les peptides sont susceptibles de participer

à une multitude de comportements. Ces comportements sont entre autres la ponte, la locomotion, la formation de Dauer, la sensibilité à la pression osmotique, aux stimuli thermiques, mécaniques et chimiques [3, 11, 19, 62]. Pour déterminer la fonction des différents neuropeptides, la stratégie la plus commune a été d'inactiver ou de surexprimer des gènes de neuropeptides spécifiques. Dans une approche complémentaire, les récepteurs auxquels se lient les neuropeptides sont également identifiés et leurs activités sont examinées [3, 5, 11, 14]. Ces données suggèrent que les neuropeptides ont un rôle modulateur dans la presque totalité des comportements de *C. elegans*.

1.5.4.1 Neuropeptides FLPs

Les FMRFamide-Like-Peptides (FLP) sont la plus grande famille de neuropeptides chez les animaux, en particulier les invertébrés [14]. Il y a eu un intérêt à examiner les effets physiologiques des FLP chez les nématodes. Chez *C. elegans*, les effets des FLP ont été examinés dans une préparation pharyngée. Les muscles des bulbes terminaux pharyngiens exposés ont été empalés avec des microélectrodes pour enregistrer les changements d'activité et la fréquence du potentiel d'action [174]. Étonnamment, de nombreux FLP testés modulaient la fréquence des potentiels d'action [3]. Ces études ont montré plusieurs anomalies de fonctionnement chez les mutants knock-out FLP [3, 14, 174].

Des mutants présentant des délétions pour différents gènes *flp* ont été isolés [173]. cette inactivation a provoqué plusieurs défauts. Ces défauts incluent une diminution du nombre d'œufs pondus, une réduction de la réserve de graisse chez le mutant ainsi que l'hyperactivité ou l'absence de réaction à certains types de stimuli [173]. Les gènes *flp* ont des motifs d'expression chevauchants; la fonction de ces gènes peut également se chevaucher et, par conséquent, être difficile à démêler. Par conséquent, les mutants sont examinés sur une grande variété de tests comportementaux comme la nage et le battage [10]. Certaines études consistaient à placer les individus dans un tampon physiologique et à compter le nombre de battages par minute. Cette technique selon les auteurs est plus sensible pour détecter les défauts de locomotion que d'examiner le mouvement de l'animal sur une surface solide [3, 173, 174]. Dans l'ensemble, le nombre de FLP qui peut provoquer des effets physiologiques est frappant et met en évidence les façons complexes dont les différents FLP peuvent moduler l'activité synaptique et musculaire [174]. Le récepteur auquel les peptides se lient doit être identifié, comme cela a

été fait pour FLP-18 et FLP-21. Les fonctions de FLP-18 et FLP-21 seront discutées en conjonction avec la fonction de leur récepteur, NPR-1.

1.5.4.1.1 Le neuropeptide FLP-21

FMRFamide-Like-Peptides-21 (FLP-21) est un neuropeptide qui a la capacité de se fixer à un récepteur spécifique. La capacité des individus à éviter les éléments nocifs tels que le froid et la chaleur est essentielle à leur survie [11]. Le sous-ensemble TRPV des canaux de potentiel de récepteur transitoire (TRP) est activé par la chaleur et responsable de la détection de la chaleur chez les vertébrés et les drosophiles. Pour mieux comprendre la base génétique et neuronale de la nociception thermique, différents tests qui quantifient l'évitement de la chaleur chez *C. elegans* ont été mis sur pied. Ces tests sont utilisés pour étudier la génétique et le comportement de *C. elegans* [11].

Une analyse plus poussée a révélé que la perte du récepteur NPR-1 (famille de Récepteur de NeuroPeptides) ou de son ligand, FLP-21, augmente le seuil d'évitement de la chaleur chez *C. elegans* [11]. De ce fait, le ligand FLP-21 ou son récepteur NPR-1 sont impliqués dans l'établissement du seuil d'évitement thermique. Pour tester cette idée, les auteurs ont analysé le comportement d'évitement thermique des mutants *flp-21* (*ok889*), une souche chez laquelle la région codante de la pré-proprotéine *flp-21* était supprimée. La température était de 33°C au cours de l'expérimentation. À cette température, on a noté un évitement chez la souche sauvage (N2) de *C. elegans*, mais peu d'évitement chez les mutants *flp-21* (*ok889*), *npr-1* (*ad609*) et ainsi que le double mutant *flp-21/npr-1* [11]. Ces données montrent que la voie FLP-21 / NPR-1 est nécessaire pour assurer un comportement d'évitement suite à un stimulus thermique.

1.5.4.1.2 Les neuropeptides FLP-18

FMRFamide-Like-Peptides-18 (FLP-18), tout comme FLP-21, est un neuropeptide qui a la capacité de se fixer à un récepteur spécifique [11]. Les ligands de NPR-1 ont été identifiés comme des neuropeptides codés par les gènes *flp-18* et *flp-21* chez *C. elegans* [14]. Le gène *flp-18* code pour huit FLPs, y compris DFDGAMPGVLRN-NH₂ et EMPGVLRN-NH₂. Ces peptides présentent des activités considérablement différentes sur NPR-1, le plus long montrant une plus faible puissance [14]. Dans certaines études, les auteurs ont utilisé la Résonance magnétique nucléaire (RMN) et les mécanismes biologiques pour étudier les caractéristiques

structurelles qui peuvent expliquer les différences d'activité des FLP-18. Les résultats ont démontré qu'il existait des interactions électrostatiques à longue distance entre les aspartates N-terminaux et la pénultième arginine C-terminale ainsi que des interactions de liaison H N-terminales qui forment des boucles transitoires dans DFDGAMPGVLRN-NH₂ [14]. L'hypothèse est que ces boucles, avec la charge peptidique, diminuent l'activité de ce peptide sur NPR-1 par rapport à celle de EMPGVLRN-NH₂. Ces résultats donnent un aperçu de la grande diversité des acides aminés dans les FLP. Les mutations de perte de fonction *npr-1*, par absence de neuropeptide FLP-18 ou inactivation du récepteur NPR-1 présentent une diminution de la sensibilité des mutants à un seuil élevé de température (33°C) [14].

1.5.4.1.3 Le récepteur NPR-1

Les neuropeptides FLP-18 et FLP-21 ont la capacité de se lier au récepteur NPR-1 [11, 14]. Le gène *npr-1* affecte plusieurs comportements par différentes voies. Le polymorphisme NPR-1 215V / 215F a été initialement identifié dans une étude portant sur un comportement alimentaire social [11]. Les individus forment des grappes lorsqu'ils se nourrissent des bactéries sur la gélose. Les individus porteurs de l'allèle *npr-1* 215F, ainsi que les mutants de perte de fonction dans *npr-1* et *flp-21* sont des consommateurs dits sociaux, ce qui indique qu'une voie inactive FLP-21 / NPR-1 favorise l'alimentation sociale [11]. Cette étude montre que le rôle de NPR-1 dans la régulation du seuil d'évitement de la chaleur présente des similitudes avec son rôle dans le comportement alimentaire social, notamment l'implication du ligand FLP-21 et des interneurons RMG [11].

Le polymorphisme NPR-1 215V / 215F influence également la paralysie induite par l'éthanol. Dans les mutants de perte de fonction *npr-1*, la tolérance aiguë à l'éthanol se développe plus rapidement [11]. Les gènes *npr-1* et *flp-21* sont également nécessaires pour la perception sensorielle hypoxique. FMRamide-Like-Peptides-21 (FLP-21) est un neuropeptide qui a la capacité de se lier à un récepteur spécifique NPR-1 [11]. Contrairement à l'évitement de la chaleur, cette réponse à la perception sensorielle hypoxique est restaurée chez les mutants *npr-1* en exprimant *npr-1* dans les neurones AQR, PQR et URX. Ainsi, la signalisation NPR-1 module l'alimentation sociale, la tolérance à l'éthanol, la perception sensorielle et l'évitement de la chaleur par le biais de voies moléculaires et neurales chevauchantes, mais non identiques.

Le gène *npr-1* contrôle l'évitement thermique sans qu'il y ait redondance avec *osm-9* et *ocr-2*. L'effet de la perte de la fonction *npr-1* sur le comportement alimentaire social est supprimé par des mutations de perte de fonction dans *osm-9* [11]. En revanche, l'effet de *npr-1* sur l'évitement de la chaleur n'est pas supprimé par *osm-9*. Le phénotype d'évitement de la chaleur de *npr-1* (ad609); les mutants doubles *osm-9* (ky10) ne peuvent pas être distingués de ceux des mutants simples *npr-1* (ad609). Comme les mutants *osm-9* n'ont qu'un léger défaut d'évitement de la chaleur, les études n'ont pas permis de déterminer si cette mutation a un effet cumulatif avec la mutation *npr-1*. Pour en savoir plus sur les interactions possibles entre les signaux NPR-1 et TRPV-dépendants, les auteurs ont comparé le phénotype des doubles mutants *osm-9 / ocr-2* avec *osm-9 / ocr-2 / npr-1* (ad609) triple mutant [11]. Les résultats ont révélé que le seuil d'évitement de la chaleur du triple mutant était plus grand que celui des mutants simples *npr-1* (ad609) ou double *osm-9 / ocr-2* mutants [11]. Ainsi, les seuils de diminution de la sensibilité thermique à des températures plus élevées des trois mutants par rapport à la souche sauvage N2 montrent que les gènes *npr-1* et TRPV agissent de manière synergique, très probablement dans des voies génétiques parallèles [14].

1.5.4.2 Les neuropeptides NLPs

Les neuropeptides jouent des rôles critiques dans la signalisation synaptique dans tous les systèmes nerveux. Les technologies de pointe ont permis la caractérisation de peptides endogènes dérivés des précurseurs de protéines, entre autres les neuropeptides de type NLP (Neuropeptide-Like Protein) [56].

Les *Neuropeptide-Like Protein* (NLP) constituent une famille de neuropeptides. Trente-deux gènes codant pour des protéines de type neuropeptide NLP de *C. elegans* ont été identifiés [10]. Les gènes *nlp* définissent au moins 11 familles de neuropeptides putatifs avec des motifs uniques [10]. Des étiquettes de séquences exprimées similaires ont été identifiées chez d'autres espèces d'invertébrés pour l'ensemble des 11 familles. Six de ces familles sont définies par des motifs bioactifs putatifs (FAFA, GGYNH₂, MRNH₂, LQFNH₂, LDNH₂ et GGARAF) [10]. Les cinq familles restantes sont apparentées à l'allatostatine, à la myomoduline, à la buccaline / drosulfakinine, à l'orcokinine et aux neuropeptides APGWNH₂ (familles MGL / FNH₂, FRPNH₂, MSFNH₂, GFGE et YGGWNH₂, respectivement) [10]. La plus grande partie de l'expression du gène *nlp* de *C. elegans* se trouve dans les neurones. Les gènes *nlp* de *C. elegans*

et des gènes similaires codant pour des neuropeptides putatifs chez d'autres espèces sont susceptibles de jouer divers rôles dans la fonction du système nerveux [10].

1.5.5 Biosynthèse des neuropeptides chez *C. elegans*

L'absence de certaines enzymes de biosynthèse des neuropeptides n'est pas critique pour la viabilité de *C. elegans*. Ce dernier est donc bien adapté à l'étude de la biochimie et de la fonction des neuropeptides, en inactivant le récepteur ou le gène associé à la production du neuropeptide. Ainsi, *C. elegans* a permis l'étude de la biosynthèse des neuropeptides chez des mutants dépourvus de certaines enzymes de traitement des neuropeptides [20]. La spectrométrie de masse est utilisée pour étudier les effets de l'activité de la proprotéine convertase et de la carboxypeptidase sur le traitement protéolytique des précurseurs des neuropeptides et sur le peptidome chez *C. elegans* [20].

1.5.5.1 Maturation et clivage enzymatique (cas de FLP-18 et FLP-21)

Le gène *flp-18* code pour huit FLPs, mais puisque certains neuropeptides de FLP-18 sont des protéines isoformes, cela ramène le nombre effectif à 6 séquences distinctes de neuropeptides. On déduit que le gène de *flp-18* code pour 6 neuropeptides FLP [13, 14] alors que le gène de *flp-21* code pour un seul neuropeptide FLP [11, 20]. Le processus de maturation nécessite l'action des peptidases et consiste au passage du proneuropeptide inactif au neuropeptide mature bioactif. La maturation du proneuropeptide FLP-18 nécessite l'activité successive de la proprotéine convertase EGL-3 et de la carboxypeptidase-E EGL-21. L'amidation est le processus final pour chacun des neuropeptides FLP matures bioactifs [13, 14]. La maturation du proneuropeptide FLP-21 nécessite l'action d'une seule peptidase, la carboxypeptidase-E (EGL-3). L'amidation s'ensuit pour le seul neuropeptide mature FLP-21 [11, 20].

1.5.5.2 Régulation (processus de dégradation des neuropeptides)

Les voies de traitement et de régulation des neuropeptides, bien que diverses, suivent plus ou moins le même cheminement. Les neuropeptides sont synthétisés sous la forme de grandes proprotéines ou proneuropeptides qui nécessitent une modification post-traductionnelle [20]. Le peptide signal est clivé lors de l'entrée dans la voie sécrétoire par une peptidase signal. Par la suite, une proprotéine convertase (principalement EGL-3, mais aussi KPC-1, BLI-4 et

AEX-5 chez *C. elegans*) clive la partie restante de la protéine précurseur à des motifs spécifiques contenant des acides aminés basiques (KR, RR, RK, KK ou RX_nR avec n = 2, 4, 6 ou 8). Ces résidus sont ensuite éliminés par une carboxypeptidase (principalement EGL-21, mais aussi CPD-1 et CPD-2 chez *C. elegans*) pour donner le peptide clivé [20]. Finalement, le résidu de neuropeptide obtenu est amidé. L'amidation se fait en position C-terminale et comprend deux étapes [20]. La première étape est l'hydroxylation du carbone α par un PHM et la seconde étape est une réaction de clivage effectuée par un PAL. Cela va générer une molécule de neuropeptide α-amidé mature et bioactif. Chez les vertébrés, ces deux activités enzymatiques sont contenues dans une enzyme bifonctionnelle, PAM (figure 9) [20].

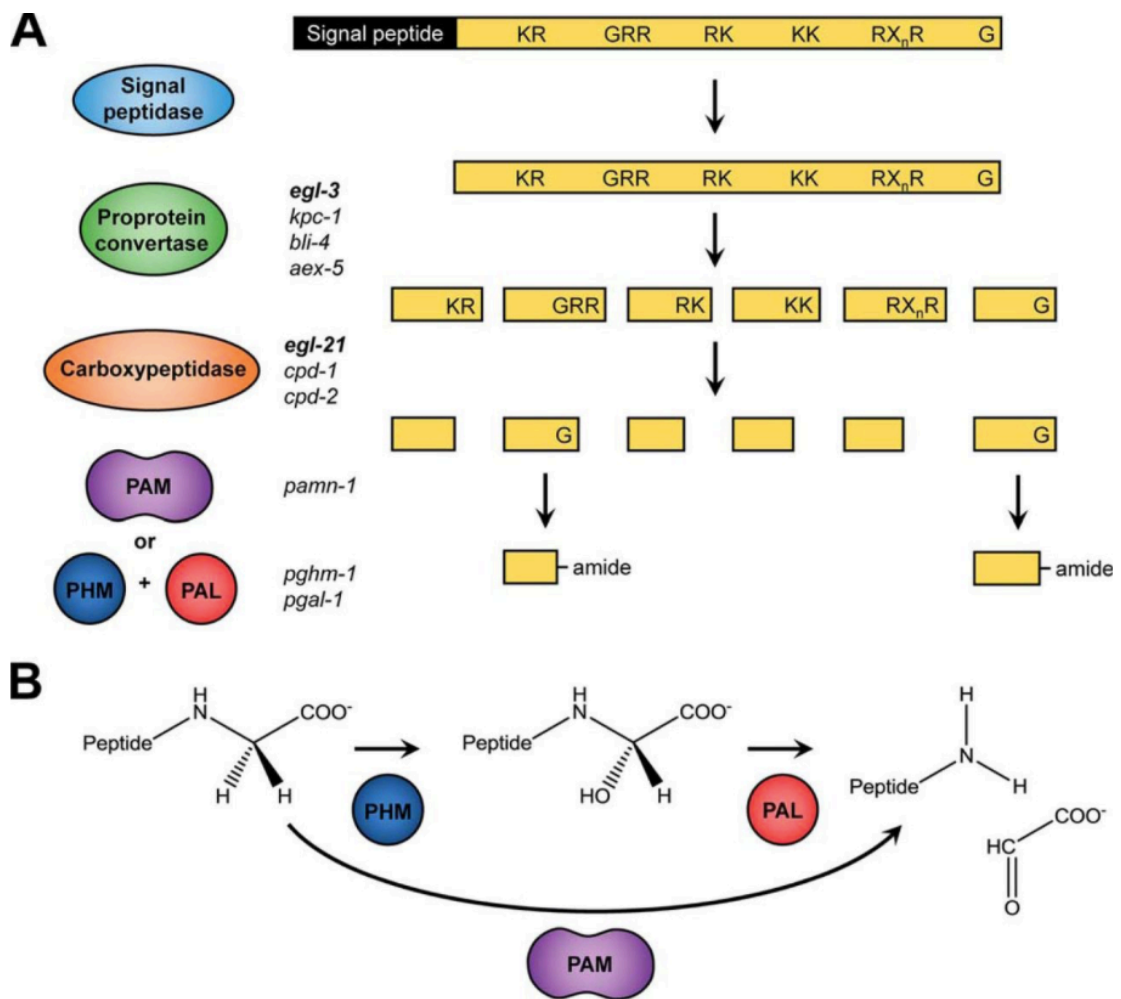


Figure 9 : Processus de maturation des neuropeptides (Inspiré de S. Van Bael et al., 2018) [20]

Les neuropeptides sont synthétisés sous la forme de grandes préprotéines qui nécessitent une modification post-traductionnelle.

A) Le peptide signal est clivé lors de l'entrée dans la voie sécrétoire par une peptidase signal. Par la suite, une proprotéine convertase (principalement EGL-3, mais aussi KPC-1, BLI-4 et AEX-5 chez *C. elegans*) clive la partie restante de la protéine précurseur à des motifs spécifiques contenant des acides aminés basiques (KR, RR, RK, KK ou RXnR avec n = 2, 4, 6 ou 8). Ces résidus sont ensuite éliminés par une carboxypeptidase (EGL-21, CPD-1 et CPD-2 dans *C. elegans*) pour donner le peptide clivé. Finalement, le résidu de glycine carboxy-terminal, s'il est présent, est transformé en un amide.

B) L'amidation carboxy-terminale comprend **deux étapes** : l'**hydroxylation** du carbone α de la glycine par un PHM, suivie d'une **réaction de clivage** effectuée par un PAL. Cela va générer une molécule de glyoxylate et le peptide α -amidé.

NB : Chez les vertébrés, ces deux activités enzymatiques sont contenues dans une enzyme bifonctionnelle, PAM.

1.5.6 Proprotéines convertases (EGL-3) chez *C. elegans*

La famille des proprotéines convertases, entre autres PC1/3, PC2 et la carboxypeptidase-E (CPE), sont des exopeptidases importantes pour la synthèse des neuropeptides [4]. Les études de spécificité de clivage indiquent la propriété distincte pour les enzymes PC à cliver du côté COOH-terminal des sites de traitement des résidus d'acides aminés basiques appariés des proneuropeptides et des prohormones [4]. En effet, la CPE est l'étape cruciale pour obtenir la formation de neuropeptides bioactifs matures [4].

1.5.6.1 Caractéristiques structurales et enzymatiques des convertases

Des études ont montré que le gène *egl-3* de *C. elegans* code pour une protéine identique à 57% à la proprotéine convertase de type 2 (PC2) chez la souris; cette convertase régule les réponses mécanosensorielles [57]. La sensibilité au toucher corporel régulée par les cellules tactiles est grandement diminuée chez les mutants *egl-3 / PC2*. Ces résultats suggèrent que les peptides traités par EGL-3 / PC2 régulent normalement la réactivité de *C. elegans* aux stimuli mécaniques [4, 57].

Chez les mammifères, la famille des proprotéines convertases qui ressemblent aux gènes *kex2* de la levure et à la *subtilisine* de la bactérie a été identifiée par clonage moléculaire sur la base des similitudes prédites de la *kex2* de la levure avec les enzymes de transformation des prohormones mammaliennes [4]. Le clonage homologue a conduit à l'élucidation de la famille des proprotéines convertases qui sont constituées de PC1/3, PC2, furine, PACE4, PC3, PC5/6 et PC7, qui agissent en position COOH-terminal des acides aminés basiques [4].

Dans nos travaux, nous allons nous focaliser davantage aux rôles des proprotéines convertases neuroendocriniennes spécifiques, constituées principalement de PC1/3 et de PC2 pour la production de neuropeptides. Nous utilisons la spectrométrie de masse pour les études peptidomiques et l'identification des neuropeptides.

1.5.6.2 Localisation cellulaire chez *C. elegans*

EGL-3 est la proprotéine convertase qui transforme le proneuropeptide FLP-18 en neuropeptide intermédiaire, la localisation et l'expression de EGL-3 ont été réalisés par J. Kass et al. (2001) [57]. L'anticorps anti-EGL-3 PC2 a été utilisé pour des animaux transgéniques exprimant le KP # 454. Une construction EGL-3 :: GFP de sauvetage complète a été réalisé (figure 10 : A-C). EGL-3 exprimé de manière endogène a été visualisé en colorant des animaux non transgéniques de type sauvage (figure 10 : D) ou des mutants *egl-3* (nu349) (figure 10 : E) [57]. L'expression de EGL-3 / PC2 dans les neurones de commande a été examinée en colorant des animaux transgéniques contenant à la fois KP # 454 et *nuIs24*, un transgène *GLR-1* :: GFP, avec des anticorps anti-EGL-3 PC2 et anti-*GLR-1* GluR (figure 10 : B).

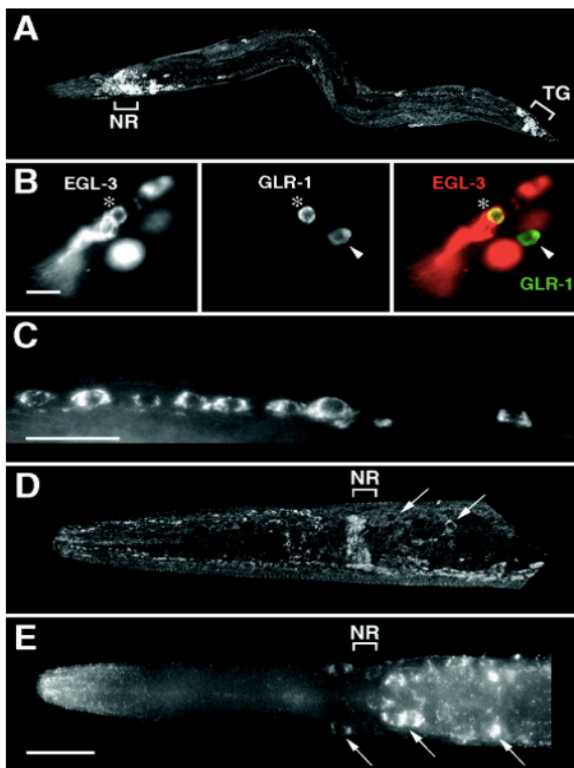


Figure 10 : Localisation et expression de EGL-3 (Tiré de J. Kass et al. 2001) [57]

A) Expression de EGL-3 :: GFP a été mise en évidence dans les corps cellulaires de nombreux neurones de la tête et des ganglions de la queue (TG). De plus, les axones de l'anneau nerveux (NR) ont coloré de façon intense avec l'anticorps anti-EGL-3PC2.

B) Expression de EGL-3 :: GFP dans les neurones de commande de PVC a été documentée par double coloration avec des anticorps anti-EGL-3 PC2 (à gauche) et anti-GLR-1 GluR (milieu). L'image fusionnée est montrée sur la droite. Ce panneau montre un animal en mosaïque dans lequel un neurone de PVC (indiqué par un astérisque) exprimait GLR-1 (vert) et EGL-3 (rouge), tandis que le second neurone de PVC (indiqué par la pointe de flèche) exprimait GLR-1 mais pas EGL-3.

C) Les types de cellules non neurales (par exemple l'hypoderme et les cellules musculaires) ne sont pas colorés avec l'anticorps anti-egl-3 PC2.

D), E), EGL-3 exprimé de manière endogène a été coloré avec des anticorps anti-EGL-3 PC2.

D) Chez les souches sauvages une coloration brillante a été observée dans les axones de l'anneau nerveux (NR) et du cordon ventral (données non montrées). Les corps cellulaires (indiqués par des flèches) sont très faiblement colorés.

E) Chez les mutants *egl-3 (nu349)*, les axones de l'anneau nerveux (NR) et du cordon ventral (données non montrées) étaient faiblement colorés, alors qu'une coloration brillante des corps cellulaires neuronaux était observée (flèches).
Barres d'échelle, 10 µm.

1.5.6.3 Gène, biosynthèse et activation des Proprotéines convertases chez *C. elegans*

Les peptides traités par les protéases EGL-3 régulent la fonction de commande des synapses des neurones ASH [57]. Les mutants KO *egl-3* présentent une diminution de la réactivité aux stimuli tactiles. En revanche, des défauts prononcés de ponte et de mécanosensation ont été observés chez les mutants *egl-3*. On déduit que leurs neuropeptides ou leurs neurohormones respectifs jouent un rôle critique dans ces comportements. Ces résultats permettent de conclure que les niveaux d'activité de EGL-3 déterminent la sensibilité des *C. elegans* à des stimuli tactiles [57]. Les neuropeptides et les neurohormones agissent souvent comme neuromodulateurs, régulant l'impact des émetteurs classiques. Les résultats de différentes études classent *C. elegans* comme un modèle génétique utile pour étudier les mécanismes moléculaires par lesquels les neuropeptides modulent les réponses sensorielles [4, 57, 58].

1.5.6.4 Substrats des protéines convertases et catalyse de clivage spécifique

Au cours de la maturation chez *C. elegans*, la proprotéine convertase (PC) clive le proneuropeptide en position COOH-terminal du couple d'acide aminé basique [3, 4]. Le traitement par la PC produit des intermédiaires neuropeptidiques inactifs avec des résidus basiques COOH-terminaux (R ou K) [4]. Les résidus basiques des neuropeptides intermédiaires sont éliminés par la carboxypeptidase-E (CPE) [23-28, 55]. Les convertases de type subtilisine PC combinées à la carboxypeptidase-E représentent une voie de protéase importante pour la

conversion des proneuropeptides dans les neurotransmetteurs peptidiques actifs et les hormones [4].

1.5.7 Carboxypeptidase E (CPE) (*egl-21*) chez *C. elegans*

La carboxypeptidase-E est l'étape finale avant l'obtention du neuropeptide mature bioactif [4]. La CPE EGL-21 est exprimée dans 60% des cellules du système nerveux de *C. elegans*, y compris les interneurons, les motoneurons et les neurones sensoriels [58].

1.5.7.1 Caractéristiques de EGL-3 et EGL-21

Dans une étude de EGL-3, les mutants ont une diminution de la sensibilité aux stimuli mécanosensoriels [57], alors que les mutants *egl-3* et *egl-21* ont montré une diminution de la libération de l'acétylcholine [58]. De cette étude, une estimation neuropeptidique EGL-3 / PC2 et EGL-21 / CPE pourrait inclure environ 200 neuropeptides uniques, codés par *flp*, *nlp* et deux gènes *ins* (*ins-1* et *ins-18*) [58]. Ils ont été identifiés par la présence de sites de clivage uniques et dibasiques dans les gènes *flp* et *nlp*. Le traitement par EGL-3 / PC2 et EGL-21 / CPE est nécessaire pour produire des neuropeptides biologiquement actifs et des hormones qui modulent plusieurs circuits neuronaux différents. On a observé différents défauts de comportement chez les mutants dépourvus de ces enzymes [4, 58].

1.5.7.2 Localisation cellulaire chez *C. elegans*

La localisation et l'expression de EGL-21 et EGL-3 ont été réalisés par C. Tija and J. M. Kaplan (2003) [58]. L'expression d'EGL-21 et d'EGL-3 a été étudié chez des animaux de type sauvage et des mutants *unc-104* KIF1A. L'anticorps anti-GFP a été utilisé pour colorer des animaux transgéniques exprimant une construction génomique de sauvegarde *gfp :: egl-21* complète (A-C).

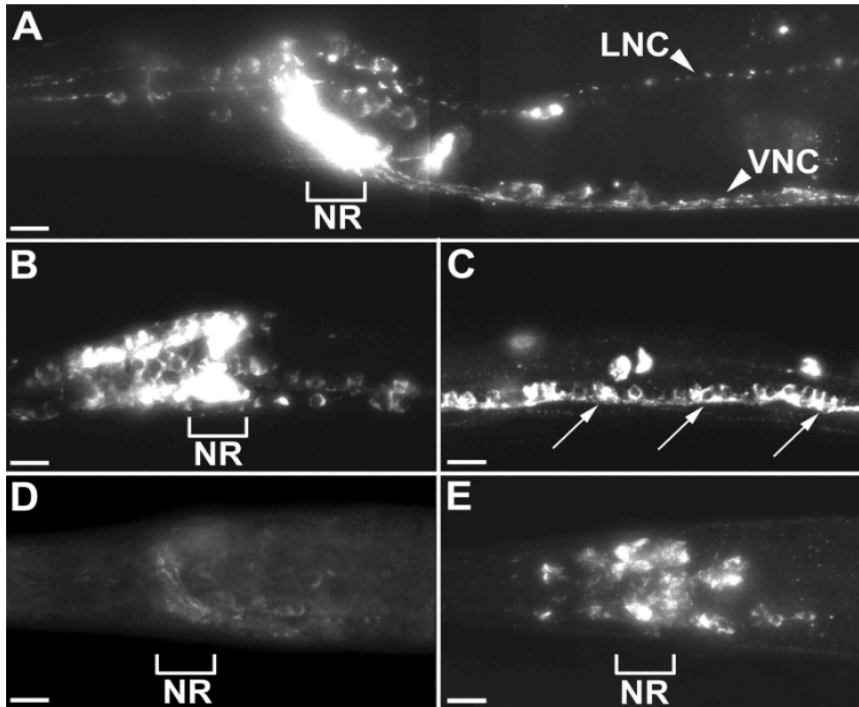


Figure 11 : Expression de EGL-21 (CPE) et EGL-3 chez *C. elegans* de type sauvage et des mutants *unc-104*KIF1A (Tiré de C. Tija et al., 2003) [58].

A) La fusion intégrale de sauvetage *gfp :: egl-21* montre une expression neurale large, incluant les corps cellulaires des neurones des ganglions de la tête et de la queue et les axones des cordons ventraux (VNC) et latéraux (LNC) (pointes de flèches) . En outre, de nombreux axones dans l'anneau nerveux (NR) sont fluorescents.

B - C) Chez un mutant KIF1A *unc-104* (e1265), *egl-21* CPE est localisée dans les corps cellulaires. La réduction du trafic d'ECP d'EGL-21 induit par le KIF1A-104 vers des processus axonaux révèle un schéma d'expression plus large incluant ~ 100 neurones de tête (B) et les motoneurons de la moelle ventrale (C, flèches).

D) La coloration anti-EGL-3 PC2 de type sauvage est principalement observée dans les axones de l'anneau nerveux (NR), tandis que les corps cellulaires sont faiblement colorés.

E) Chez un mutant KIF1A *unc-104* (e1265), la coloration anti-EGL-3 PC2 est localisé aux corps cellulaires.

Barres d'échelle, 10 μ m.

1.5.7.3 Gène, biosynthèse et activation des CPE chez *C. elegans*

La carboxypeptidase E (CPE) a été nommée enképhaline convertase à l'origine. En effet, elle était présente dans les vésicules chromaffines contenant de l'enképhaline de la médullosurrénale chez l'espèce bovine [59]. Le CPE a également été désigné sous le nom de carboxypeptidase H. La CPE était considérée comme étant la seule carboxypeptidase impliquée dans le traitement des peptides neuroendocriniens. Cependant, les souris dépourvues d'activité CPE se sont avérées capables de produire de faibles niveaux de nombreux peptides neuroendocriniens [59, 4]. Cela a appuyé l'idée que la CPE était impliquée dans la biosynthèse

de la plupart des peptides neuroendocriniens [59]. La CPE a été retrouvée chez tous les animaux vertébrés, ce qui est compatible avec son large rôle dans la biosynthèse des peptides neuroendocriniens. Un orthologue de la CPE a été identifié chez *C. elegans* (EGL-3) [4, 59]. Cependant, le traitement par EGL-3 et EGL-21 est nécessaire pour produire des neuropeptides biologiquement actifs et des hormones qui modulent plusieurs circuits neuronaux associés à la sensibilisation aux stimuli [58]

1.5.7.4 Substrats des CPE et catalyse de clivage spécifique

Les résidus basiques C-terminaux sont éliminés des peptides dans la vésicule sécrétoire par la carboxypeptidase-E. Un mutant KO de CPE (S202P) chez les souris a présenté des déficits comportementaux, avec des effets physiologiques étendus incluant non seulement l'obésité, mais aussi une densité minérale osseuse réduite et une diminution de la réactivité bronchique [59]. Les protéases de type subtilisine Prohormone Convertase 1/3 (PC1/3) et Prohormone Convertase 2 (PC2) sont souvent responsables de la production de neuropeptides intermédiaires dans lesquels Lys ou Arg est le résidu C-terminal [20, 3, 59]. L'élimination des résidus Lys et Arg C-terminaux du neuropeptide intermédiaire est catalysée par la carboxypeptidase-E [3, 20].

Les neuropeptides résultant du clivage par la CPE peuvent, dans certains cas, subir le processus d'amidation tel qu'illustré par dans la figure 9 [20, 59].

Chapitre 2 : Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier une substance ou des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Cette technique permet aussi de caractériser la structure chimique des molécules d'intérêt en procédant à leur fragmentation. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions), en fonction du rapport masse/charge (m/z) [65]. Les techniques qui prédominent aujourd'hui en spectrométrie de masse sont : HPLC-MS, HPLC-MS/MS, MALDI-TOF et autres dérivés. Le spectromètre de masse se compose de différents éléments : un système d'introduction des échantillons, la source d'ionisation, l'analyseur, le détecteur et d'un système de traitement des données (enregistreur) [65].

2.1 Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide à haute performance

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (HPLC-MS) a été conceptualisée en 1973 et continue à se développer dans la quête de l'amélioration de la résolution, de la précision de masse et de la sensibilité [65]. Le couplage HPLC-MS est une technique d'actualité qui offre quatre avantages importants : une très grande précision pour la quantification, la capacité de caractériser les molécules ainsi qu'une sensibilité et une spécificité de loin supérieures aux autres techniques analytiques [66, 67, 68, 69, 70, 71].

2.1.1 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC est une méthode de séparation des constituants d'un mélange ou d'un échantillon afin de pouvoir les identifier et les quantifier. En effet, l'HPLC permet de séparer les peptides en fonction de leurs diverses propriétés physicochimiques issues des acides aminés qui les composent (charge, pH, degré d'hydrophobicité, taille...) [72, 73, 74]. Au cours du processus, l'échantillon à analyser est entraîné par la phase mobile dans une colonne remplie avec une phase stationnaire ayant une grande affinité ou non avec les substances qui traversent cette colonne [75]. Le choix de la phase stationnaire dépend des propriétés physicochimiques des molécules à analyser et se base principalement sur la structure et la polarité de celles-ci [76, 77, 78]. Ainsi, les molécules n'ayant aucune affinité avec la phase stationnaire de la colonne n'y adhèrent pas. Par contre, les molécules ayant une grande affinité avec la phase stationnaire de

la colonne adhèrent à la surface de celle-ci [79, 80]. Le choix du débit d'écoulement de la phase mobile joue un rôle très important dans la capacité de celle-ci à séparer les molécules. Les colonnes HPLC ont été conçues pour réaliser une séparation chromatographique avec un flux laminaire tel que décrit par Van Deemter en 1956 [176]. La fine granulométrie de la phase stationnaire assure une meilleure séparation des composants [81].

Placé à la sortie de la colonne, un détecteur, couplé à un enregistreur, permet d'obtenir un tracé nommé chromatogramme, où le signal est normalement fonction de la concentration de l'analyte. Durant le processus de chromatographie, le temps de rétention, qui correspond au temps d'élution et de détection d'un composé, caractérise qualitativement une substance. Toutefois, l'identification des peptides par la chromatographie liquide uniquement n'est pas suffisante. En peptidomique, le couplage HPLC-MS est un outil sensible qui permet d'identifier, de caractériser et de quantifier les peptides dans des mélanges complexes en se basant sur la masse de l'ion précurseur et de ses fragments (CID, HCD).

2.1.2 Spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse est constitué principalement des parties suivantes (Figure 12) : un système d'introduction de substance, d'une source d'ionisation, d'un analyseur, d'un détecteur et d'un système de traitement des données.

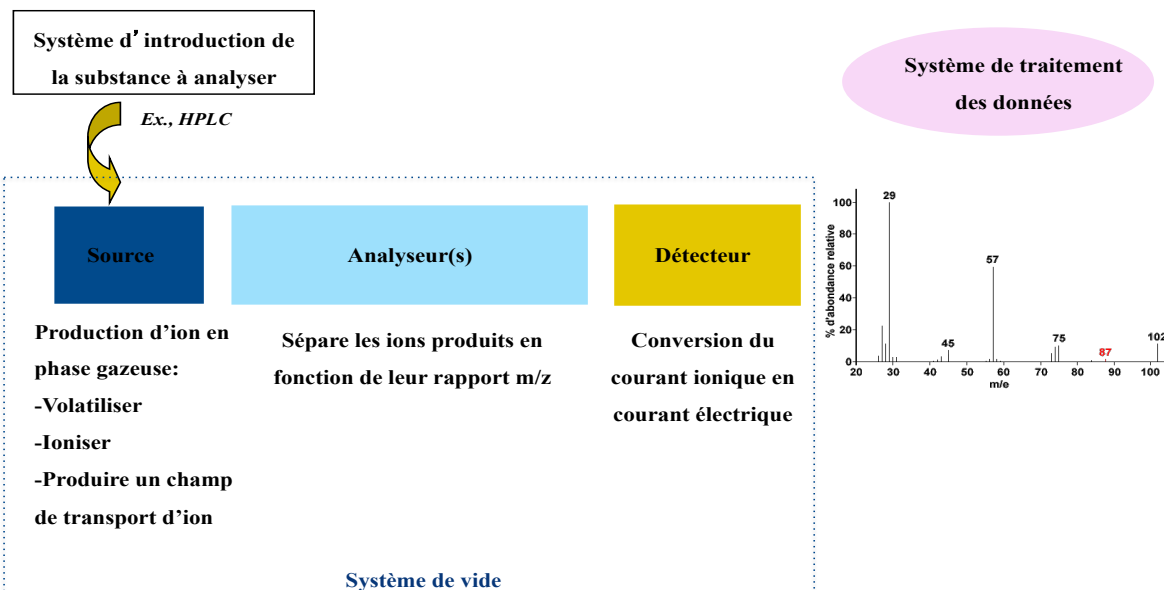


Figure 12 : Composantes d'un spectre de masse (Inspiré par R. Y. John, 1998) [93].

Un spectromètre de masse est composé principalement d'un système d'introduction de l'échantillon, d'une source d'ionisation, d'un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse et de leur charge et d'un détecteur qui détecte les ions sortant de l'analyseur.

2.1.2.1 Sources d'ionisation

Toutes les techniques de spectrométrie de masse font appel non pas aux espèces moléculaires en tant que telles, mais aux molécules ionisées. Tous les procédés reposent sur les déplacements d'ions moléculaires chargés et formés à partir d'une molécule. Afin que l'analyse soit réalisable, il faut au préalable avoir une étape d'ionisation de l'échantillon [82].

La source d'ionisation assure trois fonctions : nébuliser, ioniser et produire un champ de transport des ions. **(i) La nébulisation** permet une séparation des molécules introduites dans le spectromètre par passage de l'état liquide à un état gazeux [83]. **(ii) L'ionisation** permet de transformer les molécules en ions grâce à des champs électriques et la présence de molécules (ex. H_3O^+) ou d'électrons (e^-) favorisant le transfert de charge **(iii)** et avec pour conséquence la **production d'un champ de transport des ions** [84]. Ainsi, les molécules libérées par HPLC sont chargées dans la source par l'ionisation. Les molécules acides sont capables de céder un proton H^+ , ce qui entraîne la formation d'un ion négatif ($[\text{M}-\text{H}]^-$). Cet ion sera analysé en mode négatif. En parallèle, les molécules basiques sont aptes à capter un H^+ , ce qui entraîne la formation d'ion positif ($[\text{M}+\text{H}]^+$) analysé en mode positif [85] (Figure 13). En pratique, la quasi-totalité des analyses peptidomiques et protéomiques sont réalisées en mode positif.

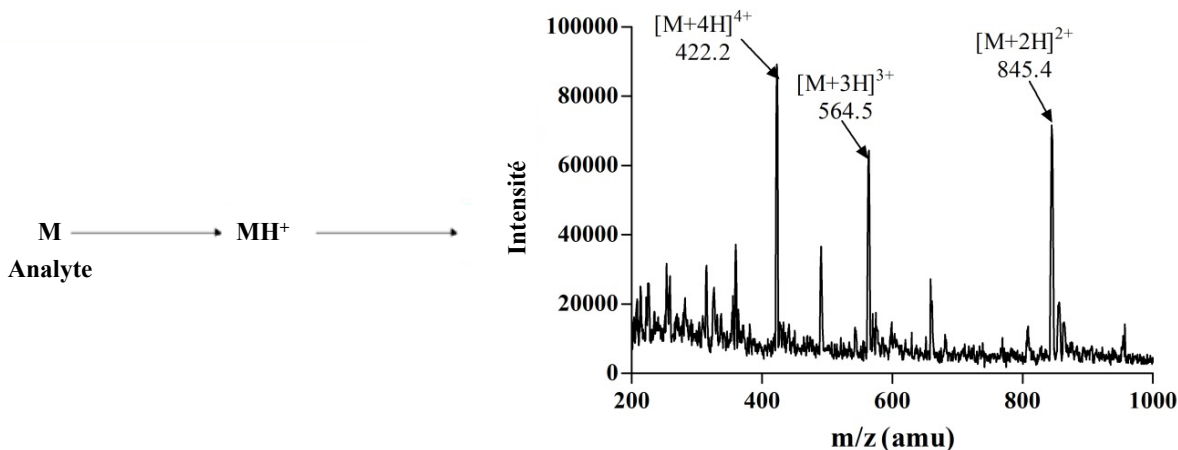


Figure 13 : Mécanisme d’ionisation en spectrométrie de masse (Dunham et al. 2012) [85]. Spectre MS de la β tachykinine58-71 obtenu avec une source d’ionisation ESI, sur un analyseur Trappe ionique. Chaque ion détecté correspond à un état de charge précis du peptide.

Les critères de choix du type de source d’ionisation sont : la volatilité, la stabilité thermique du composé à analyser, la labilité chimique, les fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation, la taille des molécules, les quantités de produit disponibles et le type d’introduction souhaitée (directe ou en HPLC) [86, 87].

Les sources d’ionisation les plus utilisées en spectrométrie de masse sont : la désorption, l’ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) [88, 89] et l’ionisation électro-spray ou Electro-Spray Ionisation (ESI) [90, 91]. Elles ont la capacité d’entraîner la formation d’ions stables avec peu ou pas de fragmentation [92] (Tableau 2).

Tableau 1 : Critères de choix du type de source d’ionisation selon le type de l’échantillon à analyser

Type d’ionisation	Symbole	Type de molécules
Ionisation à impact électronique	IE	
Ionisation Chimique	IC	
Ionisation par bombardement d’ions ou d’atomes rapides	LSIMS ou FAB	Petites molécules volatiles et thermostables
Ionisation par électronébullisation	ESI	Biomolécules (1 300 kDa) et complexes protéique non-covalents

2.1.2.2 Les analyseurs

L'analyseur permet de séparer les ions produits en fonction du rapport masse/charge (appelé m/z) qui peut s'exprimer en Thomson (Th) [93, 101]. Il existe différents types d'analyseurs (Tableau 2). Les caractéristiques principales d'un analyseur sont la résolution R , la gamme m/z qu'il peut analyser, la rapidité de balayage, la sensibilité et la vitesse avec laquelle les ions le traversent [101]. La vitesse de balayage d'un analyseur varie énormément en fonction des différents types d'analyseurs [175].

La résolution R d'un analyseur définit la capacité de distinguer une masse M par rapport à une masse $M + \Delta M$. Il est admis que deux pics sont résolus quand l'intensité de la vallée entre ces pics est égale à 10% de l'intensité du pic le plus faible. La résolution pour un pic isolé se calcule en prenant la largeur du pic ΔM à 50% de son maximum. On parle alors de résolution FWHM (Full Width at Half Maximum) [102].

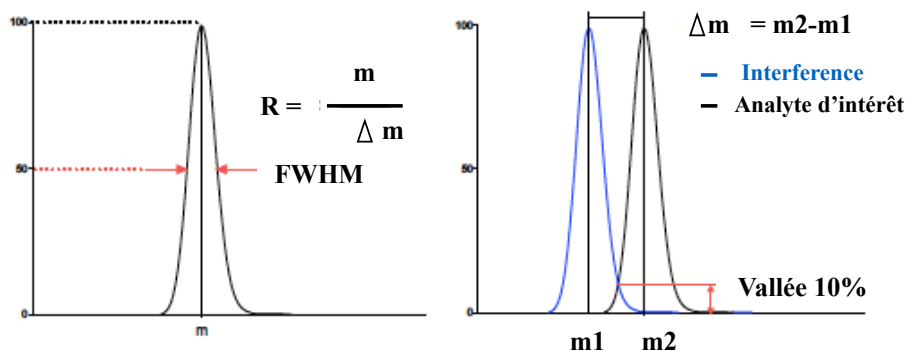


Figure 14 : Résolution d'un spectromètre de masse

Les analyseurs les plus utilisés en peptidomique sont les analyseurs de type quadripolaire (Q), les trappes ioniques ou pièges à ions (IT), les trappes ioniques linéaires (LIT) [103] (Tableau 2) ainsi que des analyseurs hybrides couplant deux ou plusieurs analyseurs tels que les triples quadripôles (QqQ), le quadripôle couplé au temps de vol (QqTOF) [104] et également l'hybride QqOrbitrap [105]. Les analyseurs hybrides permettent d'obtenir des informations complémentaires. Particulièrement les instruments de haute résolution, les analyseurs hybrides ont une sensibilité et une capacité de séparation encore plus importante que l'analyseur seul. Chacun de ces instruments possède ses propres caractéristiques dont il faut tenir compte afin de

choisir le meilleur analyseur pour l'étude souhaitée. En peptidomique, l'analyseur permet à la fois de réaliser la détection et l'identification en mode MS, ainsi que la caractérisation et quantification en mode MS/MS [106].

Tableau 2 : Différents types de spectre de masse ainsi que leurs principes

Types	Symboles	Principes
Secteur électrostatique	E	Dispersion d'un faisceau ionique continu dans un champ électrique constant ; séparation selon l'énergie cinétique des ions
Secteur magnétique	B	Dispersion d'un faisceau ionique continu ; séparation selon le momentum des ions dans un champ magnétique
Temps de vol	TOF	Dispersion temporelle d'un faisceau ionique pulsé ; séparation selon le temps de vol
Quadripôle linéaire	Q	Faisceau ionique continu dans un champ quadripolaire linéaire de radio fréquence ; séparation selon la stabilité de trajectoire
Trappe ionique quadripolaire linéaire	LIT	Faisceau ionique continu et ion piégés ; accumulation et séparation dans un champ linéaire de radio fréquence quadripolaire
Trappe ionique quadripolaire	QIT	Ions piégés ; séparation selon la trajectoire stable d'ions dans un champ quadripolaire tridimensionnelle de radio –fréquence
Résonance ionique cyclotronique	ICR	Ions piégés ; séparation selon la fréquence cyclotronique dans un champ magnétique

Les spectres de masse les plus utilisés en peptidomique sont dans les zones en gris

2.2 Mode d'analyse MS

Les ions issus de l'interface et piégés dans l'analyseur sont sélectionnés selon un rapport m/z donc un ion présent dans un mélange complexe d'ion pourrait être purifié. Différents modes de balayage peuvent être utilisés, selon l'information recherchée. Le mode « full scan MS » balaye tous les rapports m/z . Ainsi, les ions sont séparés dans l'espace en fonction du temps. Il en résulte la détection d'un grand nombre d'ions issus de la source et ayant des rapports m/z différents appartenant à l'intervalle ciblé [126]

Suite à l'obtention d'un spectre de masse, un processus d'interprétation doit être établi, telle que l'isolement des ions précurseurs (parents) des bruits de fond. Il faut programmer l'acquisition des fragments uniquement à partir d'une certaine masse dans la configuration de l'appareil [127]. Une fois les pics moléculaires des ions précurseurs identifiés, la réalisation

d'une fragmentation en mode MS-MS devient possible afin de déterminer la structure de l'analyte [128].

2.3 Mode d'analyse MS/MS (MS²)

La spectrométrie de masse en tandem permet d'étudier la structure des molécules et d'identifier de manière très spécifique certains ions [129]. Son principe se base sur l'isolement d'une part de l'ion précurseur (ion parent) que l'on désire fragmenter, d'autre part de sa fragmentation [130]. Ainsi, l'ion sélectionné par un premier analyseur se décompose spontanément (ion métastable). Ce dernier entre en collision dans une cellule remplie d'un gaz inerte, le plus souvent de l'argon, de l'azote ou de l'hélium [131]. Ensuite, les fragments résultants sont étudiés par un second analyseur. Les différents ions produits (ion fils) ne seront plus déstabilisés et la fréquence appliquée ne correspondra plus au rapport m/z des différents ions produits [132]. Les différents ions produits seront alors éjectés de l'analyseur vers le détecteur. Ce mode de balayage est relativement sélectif car, par exemple, deux ions précurseurs de même rapport m/z ne se fragmentent pas selon le même patron, entraînant donc la formation d'ions fragments différents et possédant des rapports m/z propres à leurs structures (Figure 15). Dans une dernière étape, ce processus d'isolement-fragmentation peut potentiellement se reproduire un grand nombre de fois selon les modes MS², MS³...MSⁿ. Le mode MSⁿ permet d'obtenir des informations structurales d'un composé très complexe [133, 134]. Ces fragmentations répétées doivent considérer la limite de sensibilité de l'instrument utilisé. La méthode MS/MS peut être réalisée en combinant plusieurs analyseurs de même type comme le triple quadripôle ou de types différents : ce sont des analyseurs dits hybrides, comme le Q-TOF [135, 136], qui consiste en une association d'un quadripôle et d'un analyseur à temps de vol.

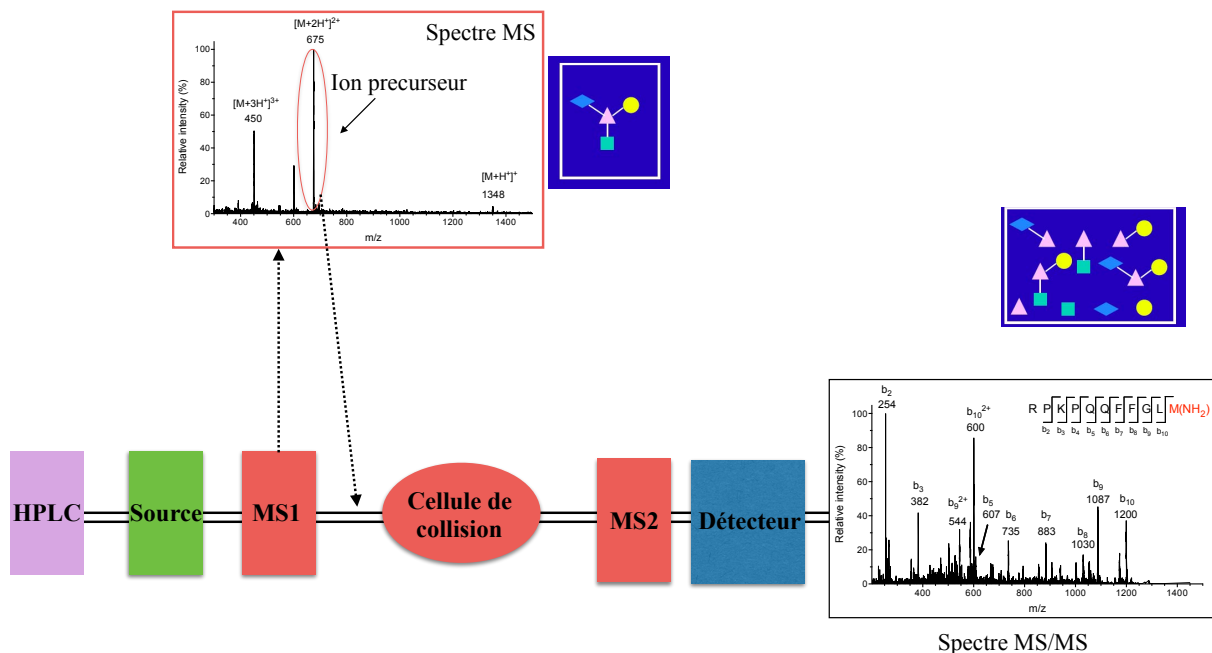


Figure 15 : Schéma de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (Tiré de R. Y. John, 1998, Roepstorff and Fohlman, 1984, Biemann, 1990b et du cours 2013 L2 de Régine Lebrun : https://sciences.univ-amu.fr/files/coursl2_20fevrier2013_r_lebrun.pdf) [93, 139, 140].

Spectre MS : Identification de la molécule ionisée

Spectre MS/MS : Caractérisation moléculaire en remontant la séquence peptidique

2.4 Détermination de la structure primaire d'un peptide à l'aide des spectres MS et MS/MS

La détermination de la structure primaire d'un peptide peut se faire par des spectres MS/MS [137]. L'échantillon biologique contenant le peptide ciblé est analysé par HPLC-MS. Les peptides sont analysés en spectrométrie de masse en mode full scan. Le pic abondant est sélectionné pour la fragmentation. Par la suite, les différentes transitions de fragments sont identifiées. L'ensemble des fragments observés est comparé avec les fragments générés *in silico* [122, 137].

Les ions résultant de la fragmentation d'un peptide sont illustrés par un patron de fragmentation. La rupture d'une liaison de la chaîne peptidique peut avoir lieu au niveau de trois types de liaisons : C α -C, C-N ou N-C α pour donner six types de fragments désignés par a_n, b_n et c_n du côté N-terminal et des fragments x_n, y_n et z_n du côté C-terminal (Figure 16) [139, 140].

Les ions observés dépendent de nombreux facteurs, notamment de la séquence du peptide, de sa charge initiale, de l'énergie de la collision induisant la fragmentation et de la

nature et de la localisation d'acides aminés basiques. La présence d'acides aminés basiques au niveau du peptide oriente la nature des ions fragments obtenus en b et y [138].

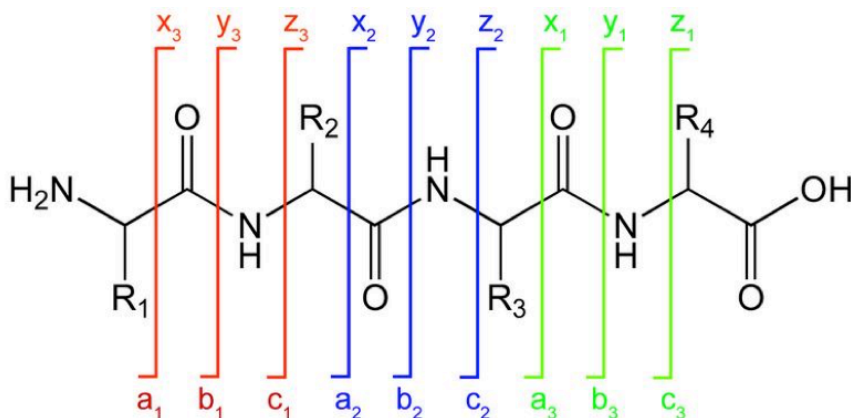


Figure 16 : Schéma d'un patron de fragmentation protéique et détermination de la structure d'une protéine à partir du spectre MS et MS/MS (Tiré de Roepstorff and Fohlman, 1984; Biemann, 1990b) [139, 140]

Les fragments a, b et c contiennent l'extrémité N-terminale, tandis que les fragments x, y et z possèdent l'extrémité C-terminale du peptide. Le numéro indiqué (n) correspond au nombre d'acides aminés contenu dans le fragment.

2.5 Mode Multiple Reaction Monitoring (MRM), Single Reaction Monitoring (SRM)

Les différents modes MRM et SRM quantifient les ions avec une très grande sensibilité [141]. Les paramètres du premier analyseur sont choisis en considérant le rapport m/z à étudier. L'ion est fragmenté dans la cellule de collision et le second analyseur est focalisé sur l'un des fragments produits [142, 143]. Ainsi, l'analyse inclut deux étapes : **(1)** la sélection de différents ions de rapports m/z prédéfinis pour le mode MRM ou un seul ion de rapport m/z prédéfini pour le mode SRM. **(2)** Ces ions sont sélectionnés et analysés simultanément. Enfin, un fragment spécifique de l'ion précurseur, de valeur m/z prédéfinie, est sélectionné. C'est l'intensité du signal généré par ce fragment qui est utilisée pour la quantification de la molécule analysée. Cette méthode permet de minimiser le bruit de fond en augmentant la sélectivité de l'analyse (Figure 17).

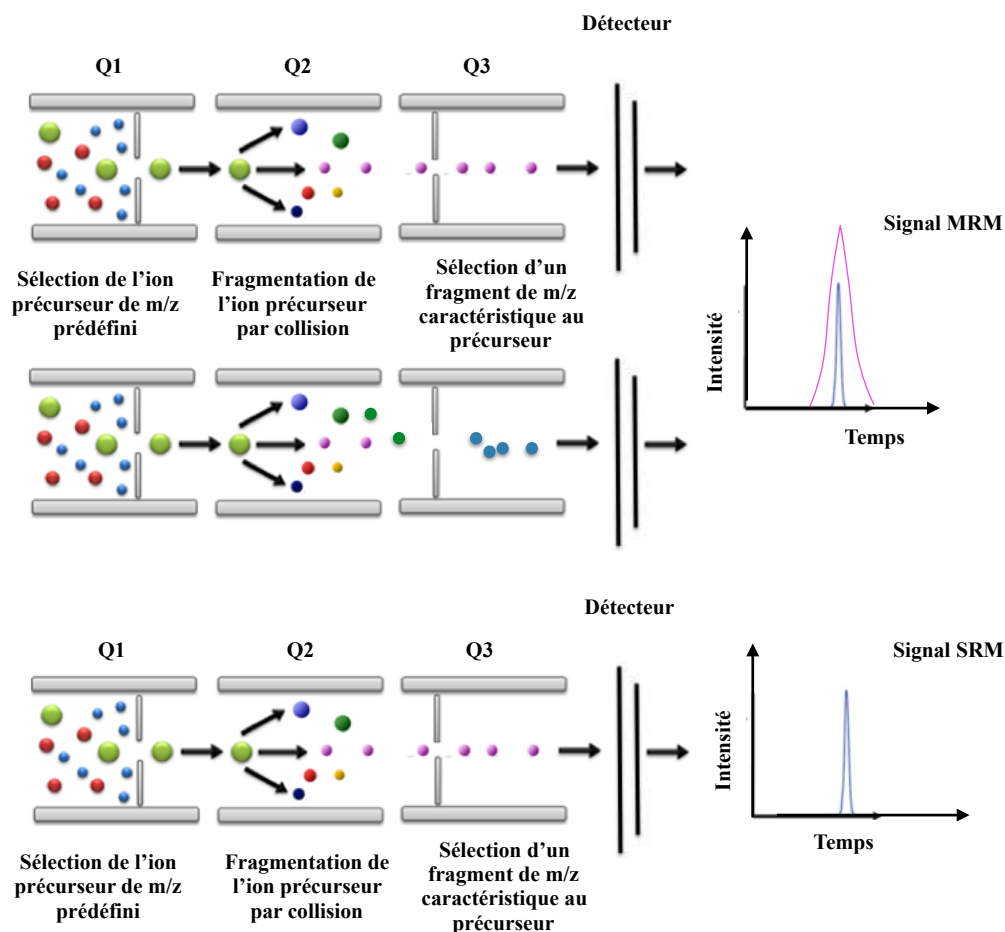


Figure 17 : Représentation schématique du mode MRM et SRM (Inspiré de V. Lange et al., 2008; Vidova et Spacil, 2017) [142, 143].

2.6 Stratégies de quantification

Plusieurs stratégies de quantification ont été développées afin de détecter des changements par rapport à l'abondance de peptides dans différents échantillons à comparer [144]. La quantification des peptides par spectrométrie de masse peut être relative ou absolue [92, 145]. La quantification relative fournit des comparaisons relatives de l'abondance des peptides entre un ensemble d'échantillons, par exemple, entre un groupe sain et un ou plusieurs groupes pathologiques. Il s'agit, en effet, de comparer les aires des pics des analytes d'intérêt [122]. A l'inverse, la quantification absolue vise à déterminer les concentrations des peptides dans des échantillons biologiques, permettant ainsi la comparaison de données exactes [146].

Les analyses spectrométriques peuvent être divisées en deux catégories. La première catégorie est basée sur un marquage isotopique stable [147] tandis que la deuxième catégorie est réalisée sans marquage isotopique et est dite « label free » [148]. Ainsi, au niveau des spectres, une distinction entre les échantillons marqués de ceux non marqués est possible. Les valeurs quantitatives sont calculées par rapport au ratio de l'intensité des pics, dont l'une comporte seulement l'isotope natif tandis que l'autre porte un certain nombre d'isotopes lourds stables. Ayant les mêmes propriétés chimiques, les isotopes peuvent être introduits simultanément mais sont clairement distingués par leur différence de masse. À partir des ratios des peptides lourds et légers, l'abondance relative entre les échantillons est mesurée [149].

Toutefois, les approches basées sur un marquage isotopique ne sont pas toujours pratiques, raison pour laquelle les méthodes sans marquage (label free) sont à considérer. Ces techniques sont de plus en plus utilisées en peptidomique, car elles ne nécessitent aucune préparation chimique, donc aucune modification de l'échantillon. Elles permettent de conserver l'intégrité des échantillons peptidiques à analyser [150]. Elles permettent aussi d'analyser un grand nombre de peptides simultanément. C'est une méthode où les échantillons à comparer sont introduits individuellement dans un spectromètre de masse. Ensuite, les intensités et les fréquences des pics sont comparées dans des analyses séparées, afin de calculer l'abondance relative [144]. Dans un premier temps, il est nécessaire d'aligner les transitions de masses sélectionnées afin de s'assurer qu'elles correspondent à la structure du peptide ciblé [104]. Une optimisation des transitions utilisées pour créer une méthode analytique sensible serait envisagée. Ces opérations sont suivies par un traitement statistique des données relatives aux transitions. La quantification est basée sur la comparaison de profils MS et la comparaison des intensités du signal observé entre les deux échantillons [151]. Ceci permet de corrélérer les changements de concentrations peptidiques entre différents phénotypes et/ou génotypes (wild-type vs knock-out) et de comparer un nombre illimité d'échantillons, même si chaque échantillon doit être analysé individuellement [152, 11]. L'inconvénient de cette méthode est que chaque variation dans la préparation d'échantillon peut mener à plusieurs erreurs expérimentales qui ne peuvent pas être corrigées par un étalon interne. Ce biais expérimental peut donc avoir un impact important sur le résultat final.

HYPOTHÈSE(S) ET OBJECTIFS

La maturation des neuropeptides important dans la transduction du signal nociceptif requiert l'action successive de la proprotéine convertase (EGL-3) et de la carboxypeptidase-E (EGL-21). Plus spécifiquement, la thermosensation est intimement lié à la voie FLP-18/FLP-21 / NPR-1. La maturation du proneuropeptide FLP-18 nécessite l'action successive de EGL-3 et de EGL-21 alors que la maturation du proneuropeptide FLP-21 nécessite seulement l'action de la proprotéine convertase (EGL-3).

Nos hypothèses de départ étaient les suivantes :

- 1) Les souches mutantes de *C. elegans* (*egl-3* et *egl-21* ; *flp-18* et *flp-21*) devaient présenter une diminution significative de la sensibilité aux stimuli thermiques et chimiques.
- 2) Les modulations du comportement d'évitement observées devaient être proportionnelles à l'expression des neuropeptides pronociceptifs (FLPs).

Les objectifs de l'étude ont été fixés comme suit :

- 1) Faire une analyse quantitative du comportement d'évitement de chaque type de stimulus pour les différentes souches de *C. elegans*, soit la souche sauvage ou Wild Type (N2) et les souches mutantes (*egl-3* et *egl-21* ; *flp-18* et *flp-21*). Comparer le comportement du N2 à chaque mutant.
- 2) Caractériser et quantifier l'expression des FLPs par spectrométrie de masse ;
- 3) Analyser la corrélation entre les changements phénotypiques des mutants et la diminution significative des neuropeptides FLP-18 et FLP-21.

CHAPITRE 3 : ARTICLE DE RECHERCHE

Chapitre 3 : Article de recherche

Article sous-presse et disponible en ligne: Neuropeptides. 2018. doi: 10.1016/j.npep.2018.11.002.

EGL-3 and EGL-21 are required to trigger nocifensive response of *Caenorhabditis elegans* to noxious heat

Bruno Nkambeu, Jennifer Ben Salem, Sophie Leonelli, Fatemeh Amin Marashi, and Francis Beaudry*

Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

*Corresponding author:

Francis Beaudry, Ph.D.
Associate Professor
Département de Biomédecine Vétérinaire
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal
3200 Sicotte
Saint-Hyacinthe, QC
Canada J2S 2M2

Email: francis.beaudry@umontreal.ca

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, Proprotein convertases, Proteolysis, Neuropeptides, Nociception, Mass spectrometry

Abstract

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) is a widely used model organism to examine nocifensive response to noxious stimuli, including heat avoidance. Recently, comprehensive analysis of the genome sequence revealed several pro-neuropeptide genes, encoding a series of bioactive neuropeptides. *C. elegans* neuropeptides are involved in the modulation of essentially all behaviors including locomotion, mechanosensation, thermosensation and chemosensation. The maturation of pro-neuropeptide to neuropeptide is performed by ortholog pro-protein convertases and carboxypeptidase E (e.g. EGL-3 and EGL-21). We hypothesized that *C. elegans* *egl-3* or *egl-21* mutants will have a significant decrease in mature neuropeptides and they will display an impaired heat avoidance behavior. Our data has shown that thermal avoidance behavior of *egl-3* and *egl-21* mutants was significantly hampered compared to WT(N2) *C. elegans*. Moreover, *flp-18*, *flp-21* and *npr-1* mutant *C. elegans* displayed a similar phenotype. EGL-3 pro-protein convertase and EGL-21 carboxypeptidase E are essential enzymes for the maturation of pro-neuropeptides to active neuropeptides in *C. elegans*. Quantitative mass spectrometry analyses with *egl-3* and *egl-21* mutant *C. elegans* homogenates demonstrated that proteolysis of ProFLP-18 and ProFLP-21 are severely impeded, leading to a lack of mature bioactive neuropeptides. Not only FLP-21 but also FLP-18 related mature neuropeptides, both are ligands of NPR-1 and are needed to trigger nocifensive response of *C. elegans* to noxious heat.

1.0 Introduction

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) is a remarkable animal model system for functional genomics pertinent to mammalian and human biology and diseases [Komuniecki *et al.* 2012; Avila *et al.* 2012]. *C. elegans* genome sequencing was finalized in 1998 and it is now comprehensively annotated and publicly available [The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998 ; the *C. elegans* genome sequencing project, 1999]. This is an important benefit for proteomic investigations particularly in the context of comprehensive biochemical and signaling network studies [Tullet, 2014; Boucher *et al.* 2013]. Interestingly, adult *C. elegans* consists of 959 cells including 302 neurons, which make this model attractive to study neuronal communication at the physiological and molecular levels [Wittenburg and Baumeister, 1999]. *C. elegans* is particularly useful for the study of nociception as it exhibits a well-defined and reproducible nocifensive behavior, involving a reversal and change in direction away from the noxious stimulus [Wittenburg and Baumeister, 1999; Carr and Zachariou, 2014]. Following the genome sequencing of *C. elegans*, it was determined that specific genes encode transient receptor potential (TRP) ion channel proteins with significant sequence similarities to mammalian TRP channels including the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) [Kahn-Kirby and Bargmann, 2006]. Specifically, five TRP subfamilies including TRPV analogs (e.g. OSM-9 and OCR-1-4) were characterized [Xiao and Xu, 2011]. Furthermore, it has been recently established that *C. elegans* TRP channels are associated with behavioral and physiological processes, including sensory transduction of thermal and chemical information [Glauer *et al.* 2011; Venkatachalam *et al.* 2014]. Many *C. elegans* TRP channels share similar activation and regulatory mechanisms with their mammal counterparts. Interestingly, it was revealed that the thermal avoidance response of *C. elegans* is amplified

when animals are exposed to capsaicin a well-known agonist of the TRPV1 [Wittenburg and Baumeister, 1999; Tobin *et al.* 2002]. Furthermore, the TRPV1 can be activated by other physical and chemical stimuli including noxious heat, low pH, divalent cations and animal toxins [Yang and Zheng, 2017]. The activation of the TRPV1 triggers the release of several neuropeptides, including substance P and calcitonin gene-related peptide central to synaptic and nociceptive transmission in mammals [Jara-Oseguera *et al.*, 2008 ; Gazzieri *et al.*, 2007].

Neuronal molecular communication in *C. elegans* was recently investigated and exploratory immunochemical analyses exposed the presence of numerous neuropeptides in *C. elegans* [Mills *et al.* 2012]. Additionally, a comprehensive analysis of the genome sequence revealed several pro-neuropeptide genes, encoding a series of bioactive neuropeptides and specific neuropeptide receptors playing a central role in synaptic transmission [Li, 2005; Hu *et al.* 2012; Choi *et al.* 2013]. Neuropeptides are involved in the modulation of essentially all behaviors including locomotion, mechanosensation, thermosensation and chemosensation [Komuniecki *et al.*, 2012]. Neuropeptides act as neuromodulators and as fast neurotransmitters. The broad existence of these neuropeptides in nematodes suggests a fundamental role of neuropeptidergic signaling in *C. elegans* but the molecular pathways and networks are poorly understood. Moreover, *C. elegans* uses classical neurotransmitter systems like acetylcholine (ACh), glutamate, γ -aminobutyric acid (GABA), serotonin, dopamine and octopamine found in mammals [Barclay *et al.* 2012]. Several neuropeptide receptors were identified and were shown to play an important role in signal transduction. It has been recently demonstrated that neuropeptide receptor 1 (NPR-1) play a central role in locomotion and thermal avoidance. NPR-1 and its ligands FLP-18 and FLP-21 play an important role in the regulation of locomotion [Choi *et al.* 2013]. Additionally, data suggested that TRPV channels (i.e. OSM-9 and OCR-2) and the FLP-21/ NPR-1

neuropeptide signaling pathway are essential for the nocifensive response associated to heat avoidance in *C. elegans* [Glauser *et al.* 2011]. Therefore, the key proteases (e.g. ELG-3 and EGL-21) involved in the processing of pro-neuropeptides into neuropeptides can potentially regulate nociceptive behavior in *C. elegans*.

In mammals, several neuropeptides are synthesized by the action of pro-protein convertases (PCs) and endopeptidases during the axonal transport (Hook *et al.* 2008; Saidi *et al.*, 2016; Ruiz and Beaudry, 2016; Saidi and Beaudry, 2017; Ben Salem, *et al.*, 2018). Recently, it was revealed that *C.elegans egl-3* gene encodes a protein (i.e. EGL-3) with 57% sequence homology compared to mammalian pro-protein convertase type 2 (PC2) [Kass *et al.* 2001]. EGL-3 is a serine endoprotease which cleaves pro-proteins at paired basic amino acids as shown in Figure 1 and is an ortholog of the human PC2. EGL-3 is an essential enzyme involved in the maturation of pro-neuropeptides to active neuropeptides in *C .elegans* [Hook, 2008 ; Li and Kim, 2008]. Analogously to human, *C. elegans egl-21* gene encodes a protein (i.e. EGL-21) that is an ortholog of the human carboxypeptidase E and this enzyme is broadly expressed in several neurons. EGL-21 is essential for removing basic residues from the C-terminal following EGL-3 pro-neuropeptide processing [Jacob and Kaplan, 2003]. Thus, we believe that *egl-3* and *egl-21* mutant animals will lack mature neuropeptides and consequently synaptic chemical communication will be impaired. Changes in nocifensive behavior are orchestrated by specific altered activity during synaptic communication in *C. elegans*.

The objectives of the study were to characterize nocifensive responses of wild type (N2 strain), *egl-3* and *elg-21* mutants as well as specific neuropeptide mutant nematodes (*flp-21* and *flp-18*) and neuropeptide receptor *npr-1* following exposition to noxious heat (i.e. 33-35°C). Chemotaxis results are shown in supplementary figures. Relative quantification of FLP-21 and

FLP-18 related neuropeptides were performed using high performance liquid chromatography coupled to a hybrid Orbitrap high-resolution mass spectrometer.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA) or MilliporeSigma (St-Louis, MO, USA). For mass spectrometry analysis, formic acid, water (HPLC-MS Optima grade), acetonitrile (HPLC-MS Optima grade), trifluoroacetic acid (TFA), were purchased from Fisher Scientific.

2.2 *C. elegans* strains

The N2 (Bristol) isolate of *C. elegans* was used as a reference strain. Mutant strains used in this work included: *egl-21* (KP2018); *egl-21* (MT1206); *egl-3* (MT1541); *egl-3* (VC461); *flp-18* (AX1410); *flp-21* (RB982); *npr-1* (CX4148). N2 (Bristol) and other strains were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota (Minneapolis, MN, USA). Strains were maintained and manipulated under standard conditions as described [Brenner, 1974; Margie et al., 2013]. Worms were grown and kept on Nematode Growth Medium (NGM) agar at 22°C in a Thermo Scientific Heratherm refrigerated incubator. Analyses were performed at temperature ranging from 22 to 25 °C unless otherwise noted.

2.3 Thermal avoidance and chemotaxis assays

The principle behind evaluating the *C. elegans* response to a stimulus (i.e thermal or chemical) is to observe and quantify the movement evoked in response to a specific stimulus. The methods proposed in this manuscript for the evaluation of thermal avoidance or chemotaxis were adapted from the two and four quadrants strategies previously described [Margie et al., 2013; Porta-de-la-Riva et al. 2012]. We decided to use the same observation strategy for all the test performed

to enable better comparison. The experimental schematics are illustrated in Figure 2. Chemotaxis assay results are available as supplemental figures. Experiments were performed on 92 x 16 mm petri dishes divided into four quadrants. A middle circle delimited (i.e. 1 cm diameter) an area where animals were not counted. This prevents immobile worms from distorting the behavior data. The quadrants create an alternating configuration of thermal (or chemical) stimuli areas and control areas to prevent any bias that may appear resulting from the initial location of the nematodes. Petri dishes were divided into quadrants; two stimulus areas (A and D) and two control areas (B and C). Sodium azide (i.e. 0.5M) was used in all quadrants to paralyze the nematodes. Nociceptive heat was generated using an electronically heated metal tip (0.8-mm diameter) producing a constant radial temperature gradient (e.g. 32-35°C on the NGM agar at 2 mm from the tip measured with an infrared thermometer). Nematodes were isolated, prepared and washed according to protocol outline by Margie et al. (2013). From this point, they were off food pending and throughout all experimentations. The nematodes (i.e. 50 to 200 young adult worms) were deposited at the center of a marked petri dish and after 30 minutes, they were counted per quadrant. Nematodes that did not cross the inner circle were not counted. The derived Thermal avoidance Index (TI) formula is shown in Figure 2. Both TI and the animal avoidance percentage were used to phenotype each tested *C. elegans* genotype. The selection of quadrant temperature was based on previous experiments [Wittenburg and Baumeister, 1999].

2.4 Analysis of neuropeptides

2.4.1 *C. elegans* homogenization and peptides extraction

The N2 (Bristol) isolate of *C. elegans* was used as a reference strain. Mutant strains used for the neuropeptide analyses work included: *egl-21* (KP2018); *egl-21* (MT1206); *egl-3* (MT1541);

egl-3 (VC461). Strains were cultured in liquid media standard as described [Brenner, 1974; Margie et al., 2013]. The liquid media was centrifuged at 1,000 g for 10 min and nematodes were collected and aliquoted to re-enforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 500 μ m glass beads. A solution of 0.1% TFA in water was added at a ratio of 1:5 (w:v) and a Disruptor Genie was used at 2,800 rpm for 15 minutes. Nematodes were homogenized in a TFA solution to inhibit the enzymatic degradation of neuropeptides. The homogenates were centrifuged at 12,000 g for 10 min. The protein concentration for each homogenate was determined using a Bradford assay and all samples were normalized to avoid any bias. One hundred microliters of sample were taken and mixed with 100 μ L of methanol containing 0.1% TFA to precipitate large and medium size proteins. Samples were centrifuge at 12,000 g for 10 min. The supernatant was dried using an Eppendorf vacuum concentrator, resuspended in 50 μ L of 5% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid and transferred into low volume HPLC vials.

2.4.2 Chromatographic conditions

The HPLC system was a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system (San Jose, CA, USA). The chromatography was performed using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C18 100 \times 1 mm, with a particle size of 5 μ m. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 2 min, the ratio was maintained at 5:95. From 2 to 22 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 50:50 and maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 min for a total run time of 40 min. The flow rate was fixed at 75 μ L/min and 2 μ L of sample were injected.

2.4.3 Mass Spectrometry conditions

A Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. Auxiliary gas was heated to 200°C. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. The scan range was set to m/z 400-2000. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM using automatic gain control target of 3.0×10^6 and maximum ion injection time of 200 msec. Product ion spectra (MS^2) were acquired at a resolving power of 17,500 (FWHM), using automatic gain control target of 2.0×10^5 and maximum ion injection time of 50 msec. The normalized collision energy was set to 28 (HCD) and the isolation window was set to 2 Da. Targeted peptide quantifications were performed at MS^1 level using specific precursor masses based on the monoisotopic masses. Peptide quantification was performed by extracting specific precursor ions using a 5 ppm mass window and a label free approach. The data were normalized based on the peak areas observed of the mean WT (N2) strain for relative quantification. Analyses were performed in triplicate. Instrument calibration was performed prior to all analyses and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. Peptide sequences were verified base on typical b and y fragments observed at the MS^2 level.

2.5 Statistical analysis

All behavior data were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test (e.g. WT(N2) was the control group used). Significance was set a priori to $p <$

0.05. The statistical analyses were performed using PRISM (version 7.0d). Neuropeptide data were analyzed with a two-tailed Student-t test with significance set a priori to $p < 0.01$.

3. Results and discussion

3.1 *C. elegans* thermal avoidance behavior

Thermal avoidance assays are widely used as a model to study how sensory information is integrated to alter nematode behavior. Noxious temperatures ($> 30^{\circ}\text{C}$) provoke a temperature avoidance response in *C. elegans* that can be quantified using a standard thermal avoidance assay. Comprehensive studies have suggested that AFD neurons are the main thermosensors in *C. elegans* [Mori and Ohshima 1995; Koutarou et al., 2004]. Also, FLP neurons located in the head and PHC neurons in the tail act as thermonociceptive neurons and both express heat- and capsaicin-sensitive TRPV channels, OCR-2 and OSM-9 [Liu et al., 2012 ; Glauser et al., 2011]. Interestingly, a recent study has shown that heat avoidance is not related to AFD sensory neurons but does rely on functional NPR-1 receptors located in the RMG interneuron [Glauser et al., 2011]. Moreover, NPR-1 controls heat avoidance coactively with OSM-9 and OCR-2. NPR-1 function as a receptor for *flp-18*- and *flp-21*-encoded neuropeptides. It was extensively demonstrated that FLP-21/NPR-1 are key players for nocifensive response triggered by noxious heat. The ASH neuron is considered an important nociceptor involved in avoidance responses from noxious stimuli, but its role in heat avoidance is not clear despite ASH neurons expressing OCR-2 and OSM-9 channels [Sassa *et al.* 2013]. However, it is well established that signaling from ASH neurons induce avoidance behavior through gap junctions with RMG interneurons and that communication is regulated by the NPR-1 receptor [Metaxakis *et al.*, 2018; Glauser *et al.*, 2011]. EGL-3 is an essential enzyme involved in the maturation of pro-neuropeptides to active neuropeptides and EGL-21 removes basic residues from the C-terminal following EGL-

3 pro-neuropeptide processing leading to active neuropeptides, including FLP-21- and FLP-18-related neuropeptides.

Thermal avoidance assays described in Figure 2 were performed to assess if *egl-3* and *egl-21* mutant *C. elegans* will display an impeded nocifensive response to noxious heat. The initial experiment involved an assessment of the mobility and bias for WT (N2) and mutants *egl-3*, *elg-21*, *flp-18*, *flp-21* and *npr-1* nematodes. Animals were placed in the center of plates divided into quadrants conserved at constant temperature (i.e. 22°C) and no stimulus was applied (negative control). As shown in Figure 3, there was no quadrant selection bias observed for all *C. elegans* genotypes tested. The nematodes were not preferably selecting any quadrant and were uniformly distributed after 30 minutes following the initial placement at the center of the marked petri dish.

The thermal behavior of *C. elegans* was studied on petri dishes in which two opposite quadrants had a surface temperature of 33°C to 35°C and the other two were at room temperature. The results depicted in Figure 4 suggest that *egl-3* and *egl-21* thermal avoidance is defective for these mutants. These results are coherent with our initial hypothesis since both of these enzymes are important for the maturation of pro-neuropeptides to neuropeptides. Additionally, *flp-18*, *flp-21* and *npr-1* mutants also displayed an impeded thermal avoidance behavior. However, it was significantly less pronounced compared to *egl-3* and *egl-21* mutants. Both *egl-3* and *egl-21* mutant animals lack a wide variety of mature neuropeptides. Thus, synaptic chemical communication is impaired, probably with RMG and other interneurons [Glauser *et al.*, 2011; Peymen *et al.* 2014]. As it was previously established, heat avoidance relies on functional NPR-1 receptors located in the RMG interneuron and both, FLP-18 and FLP-21 mature neuropeptides

are ligands of NPR-1. Changes in nocifensive behavior are coordinated by specific molecular modulation of the neurotransmitters involved in synaptic communications in *C. elegans*. Chemotaxis experiments performed (e.g. chemical repellent, acid and osmotic pressure) are presented in supplementary figures (i.e. Figure S1, Figure S2 and Figure S3). The results do not show any significant difference between WT (N2) and all tested mutants. Classical small molecule neurotransmitters modulate behavior in response to various stimuli in *C. elegans* and subsequently, neuropeptides may not be essential for *C. elegans* to respond to chemical repellents [Li and Kim, 2008; Hilliard et al., 2002].

3.2 High-resolution mass spectrometry analysis of specific neuropeptides

The analysis of *C. elegans* homogenates was performed using a hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer operating in full scan MS mode at a resolution of 140,000 (FWHM) and in full scan MS² mode at a resolution of 17,500 (FWHM). Based on specific cleavage points identified in Figure 1 and *in silico* C- and N-ladder fragmentation, we generated an *in silico* mass list for FLP-18 (UniProtKB - Q9N4V0) and FLP-21 (UniProtKB - Q18234) related pro-neuropeptides and neuropeptides to extract specific m/z (± 5 ppm) from the total ion current (TIC) chromatogram. Moreover, MS² spectra were collected using an inclusion list to trigger MS² analyses based upon accurate mass of targeted precursor ions. As illustrated in Table 1, all targeted pro-neuropeptides and neuropeptides were detected with mass accuracy ranging from -2.47 ppm to 2.53 ppm (< 3 ppm). The mass accuracy observed was within the instrument specifications. Moreover, all the acquired MS² spectra confirmed the targeted peptide sequences based on typical a,b,c and x,y,z positive ion fragments [Roepstorff and Fohlman, 1984]. An example of TIC, extracted ion chromatogram (XIC) and MS² spectra is presented in supplemental Figure 4S.

The relative peptide quantification was based on a label free approach well described in the proteomic literature [Blein-Nicolas and Zivy, 2016; Neilson *et al.* 2011]. More specifically, peak areas based on MS¹ XIC's were compared between samples and relative peptide concentrations were determined based on the ratio of the mean area of the WT (N2) group. Technical triplicate precision assessments were performed, and all groups provided %CV < 10%. As shown in Figure 5, there was no significant concentration difference for FLP-21G and FLP-21 neuropeptides between WT(N2) and *egl-21* mutants. This was expected since EGL-21 is not involved in the biosynthesis of mature FLP-21 neuropeptide as shown in Figure 1. However, significant FLP-21G pro-neuropeptide and FLP-21 concentration differences were observed for *egl-3* mutants. Importantly, this was an expected result even if mature FLP-21 neuropeptide was detected. As shown in Figure 1A, other pathways can lead to the biosynthesis of FLP-21G and FLP-21 neuropeptides. Moreover, redundant proteolytic reactions from other proteases can explain these results [Hook et al. 2008; Husson et al., 2007]. The relative quantification results for FLP-18-related neuropeptides are presented in Figure 6. Interestingly, all FLP-18 pro-neuropeptides incorporating at the C-terminal GKR sequence appear to accumulate in *egl-21* mutants. These mutants have a deficit in the expression of the EGL-21 carboxypeptidase E and, therefore, the catalytic reaction to remove C-terminal R or K residues from peptides is significantly hampered. Similarly, *egl-3* mutants display a significant deficit in both FLP-18 pro-neuropeptides including C-terminal GKR sequence, and mature FLP-18 neuropeptides. These results are coherent with prior published qualitative results [Husson *et al.* 2006]. EGL-3 is an ortholog of the mammalian prohormone convertase 2 (PC2), an important enzyme involved in the processing of neuropeptide precursors at paired basic residues (i.e. RR,

KR, RK and KK). As presented in Figure 1A, the CPL-1 and PAM-1 pathway does not appear to compensate for the deficit in expression of the EGL-3 pro-protein convertase and EGL-21 carboxypeptidase E in *egl-3* and *egl-21* *C. elegans* mutants. These results are coherent with other studies we have performed on mammalian CNS tissue fractions [Saidi et al., 2015; Orduna and Beaudry, 2016; Saidi and Beaudry, 2017; Ben Salem et al. 2018]. This is a very interesting finding for further translational studies using *C. elegans* as a model organism for nociceptive pharmacology studies. Although, the neuropeptide analyses were performed using whole-animal lysate, the results demonstrated that *egl-3* and *egl-21* mutant *C. elegans* have a noteworthy deficit in mature neuropeptides which results in impaired synaptic chemical communication, possibly with the interneuron RMG [Glaser et al., 2011; Peymen et al. 2014]. As discovered previously, NPR-1 ligands/NPR-1 neuropeptide signaling pathway is necessary to trigger nocifensive response of *C. elegans* to noxious heat [Glaser et al. 2011]. In *C. elegans*, modulation in nocifensive behavior is intimately associated to specific altered activity during synaptic communication.

4. Conclusion

The thermal avoidance behavior of *egl-3* and *egl-21* mutant *C. elegans* was significantly hampered compared to WT(N2) *C. elegans*. Moreover, *flp-18*, *flp-21* and *npr-1* mutant *C. elegans* displayed a similar phenotype. EGL-3 pro-protein convertase and EGL-21 carboxypeptidase E are essential enzymes for the maturation of pro-neuropeptides to active neuropeptides in *C. elegans*. The ability to avoid noxious heat is strongly associated with the neuropeptide receptor gene *npr-1*. FLP-18/FLP-21/NPR-1 neuropeptide signaling pathways appear to be important to determine the threshold for heat avoidance in *C. elegans* but other neuropeptides and neuropeptide receptors are most likely playing an important role.

Experiments using *egl-3* and *egl-21* mutant *C. elegans* homogenates demonstrate that proteolysis of ProFLP-21 and ProFLP-18 are severely hindered leading to a lack of mature bioactive neuropeptides. Pharmacological manipulations of pro-protein convertases could be an interesting strategy to alter sensitivity threshold in higher species.

Acknowledgements

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. RGPIN-2015-05071). The mass spectrometry analyses were performed using an infrastructure and operation funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the *Fonds de Recherche du Québec (FRQ)*, Government of Quebec (F. Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706). A PhD scholarship was awarded to J. Ben Salem with a grant obtained from *Fondation de France* (RAF18002BBA). Sophie Leonelli received a NSERC Undergraduate Student Research Awards scholarship.

References

- Avila, D., Helmcke, K., Aschner, M., 2012. The *Caenorhabditis elegans* model as reliable tool in neurotoxicology. *Hum. Exp. Toxicol.* 31(3), 236–243.
- Barclay, J.W., Morgan, A., Burgoyne, R.D., 2012. Neurotransmitter release mechanisms studied in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Calcium* 52(3-4):289-295.
- Ben Salem, J., Nkambeu, B. and Beaudry, F. 2018 Characterization of Neuropeptide K Processing in Rat Spinal Cord S9 Fractions using High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 32(6):e4204
- Biron, D., Wasserman, S., Thomas, J.H., Samuel, A.D., Sengupta, P., 2008. An olfactory neuron responds stochastically to temperature and modulates *Caenorhabditis elegans* thermotactic behavior. *PNAS* 105, 11002–11007.
- Blein-Nicolas, M., and Zivy, M., 2016. Thousand and one ways to quantify and compare protein abundances in label-free bottom-up proteomics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1864(8), 883-895.
- Boucher, B., and Jenna, S., 2013. Genetic interaction networks: better understand to better predict. *Front. Genet.* 4(290), 1-16.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Choi, S., Chatzigeorgiou, M., Taylor, K.P., Schafer, W.R., and Kaplan, J.M., 2013. Analysis of NPR-1 Reveals a Circuit Mechanism for Behavioral Quiescence in *C. elegans*. *Neuron* 78(5), 869–880.
- Carr, F.B., Zachariou, V., 2014. Nociception and pain: lessons from optogenetics. *Front. Behav. Neurosci.* 8(69), 1-6.
- Gazzieri, D., Trevisani, M., Springer, J., Harrison, S., Cottrell, G.S., Andre, E., Nicoletti, P., Massi, D., Zecchi, S., Nosi, D., Santucci, M., Gerard, N.P., Lucatelli, M., Lungarella, G., Foscher, A., Grady, E.F., Bunnnett, N.W., Geppetti, P., 2007. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 581-589.
- Glauser, D.A., Chen, W.C., Agin, R., MacInnis, B., Hellman, A.B., Garrity, P.A., Man-WahTan, and Goodman, M.B., 2011. Heat avoidance is regulated by Transient Receptor Potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics Society of America*, 188 : 91-103.
- Kahn-Kirby, A., Bargmann C.I., 2006. TRP channels in *C. elegans*. *Annual Review of Physiology* 68(1), 719-736.

- Kass, J., Jacob, T.C., Kim, P., Kaplan J.M., 2001. The EGL-3 pro-protein convertase regulates mechanosensory responses of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 21(23), 9265-9672.
- Komuniecki, R., Harris, G., Haplak, V., 2012. Monoamines activate neuropeptide signaling cascades to modulate nociception in *C. elegans*: a useful model for the modulation of chronic pain? *Invertebrate Neuroscience* 12, 53-61.
- Koutarou, D.K., Atsushi, M., Kunihiro, M., and Ikue, M., 2004. The *C. elegans* Thermosensory Neuron AFD Responds to Warming. *Current Biology* 14, 1291-1295.
- Hilliard, M.A., Bargmann, C.I, Bazzicalupo, P., 2002. *C. elegans* Responds to Chemical Repellents by Integrating Sensory Inputs from the Head and the Tail. *Current Biology* 12, 730-734.
- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., Hwang, S.R., 2008. Proteases for processing pro-neuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48, 393–423.
- Hu, Z., Pym E.C.G., Babu. K., Vashlishan-Murray A.B., and Kaplan J.M., 2011. A neuropeptide-mediated stretch response links muscle contraction to changes in neurotransmitter release. *Neuron* 71, 92-102.
- Husson S.J., Janssen, T., Baggerman, G., Bogert, B., Kahn-Kirby, A.H., Ashrafi,K., and Schoofs, L., 2007. Impaired processing of FLP and NLP peptides in carboxypeptidase E (EGL-21)-deficient *Caenorhabditis elegans* as analyzed by mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* 102, 246–260.
- Husson, S.J., Clynen, E., Baggerman, G., Janssen, T. and Schoofs, L., 2006. Defective processing of neuropeptide precursors in *Caenorhabditis elegans* lacking proprotein convertase 2 (KPC-2/EGL-3): mutant analysis by mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* 98(6):1999-2012.
- Jacob, T.C., Kaplan, J.M., 2003. The EGL-21 carboxypeptidase E facilitates acetylcholine release at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 23(6), 2122-30.
- Jara-Oseguera, A., Sideney, A.S., Tamara, R., 2008. TRPV1: On the road to pain relief. *Curr. Mol. Pharmacol.* 1(3), 255-269.
- Li, C., 2005. The ever-expanding neuropeptide gene families in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* 131, Suppl:S109–127.
- Li, C., and Kim, K., 2008. Neuropeptides. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook 1-35.

- Liu, S., Schulze, E., Baumeister, R., 2012. Temperature- and Touch-Sensitive Neurons Couple CNG and TRPV Channel Activities to Control Heat Avoidance in *Caenorhabditis elegans*. PLoS ONE 7(3), 1-13.
- Margie, O., Palmer, C., Chin-Sang, I., 2013. *C. elegans* Chemotaxis Assay. J. Vis. Exp. 74, 1-6.
- Metaxakis, A., Petratou, D., and Tavernarakis N., 2018. Multimodal sensory processing in *Caenorhabditis elegans*. Open Biol. 8, 1-9.
- Mori, I., and Ohshima, Y. (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. Nature 376, 344–348.
- Mills, H., Wragg, R., Haplak, V., Castelletto, M., Zahratka, J., Harris, G., Summers, P., Korchnak, A., Law, W., Bamber, B., Komuniecki, R., 2012. Monoamines and neuropeptides interact to inhibit aversive behaviour in *Caenorhabditis elegans*. EMBO J. 31(3), 667–678.
- Neilson, K.A., Ali, N.A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., Van Sluyter, S.C., Haynes, P.A., 2011. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. Proteomics 11, 535-553.
- Peymen, K., Watteyne, J., Frooninckx, L., Schoofs, L. and Beets, I. 2014. The FMRFamide-Like Peptide Family in Nematodes. Front Endocrinol (Lausanne) 2014; 5: 90.
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., and Cerón, J., 2012. Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. J. Vis. Exp. 64, 1-9.
- Roepstorff, P., and Fohlman, J., 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed Mass Spectrom 11(11), 601.
- Ruiz, A.O., Beaudry, F., 2016. Characterization of Endoproteolytic Processing of Dynorphins by Proprotein Convertases using Mouse Spinal Cord S9 Fractions and Mass Spectrometry. Neuropeptides 57, 85-94
- Saidi, M., Kamali, S., Ruiz, A.O., Beaudry, F., 2015. Tachykinins Processing is Significantly Impaired in PC1 and PC2 Mutant Mouse Spinal Cord S9 Fractions. Neurochemical Research 40(11), 2304-2316.
- Saidi, M., and Beaudry, F., 2017. Targeted High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry Analyses Reveal a Significant Reduction of Tachykinin and Opioid Neuropeptides Level in PC1 and PC2 Mutant Mouse Spinal Cords. Neuropeptides 65:37-44.

Sassa, T., Murayama, T., Maruyama, N.I., 2013. Strongly alkaline pH avoidance mediated by ASH sensory neurons in *C. elegans*. *Neuroscience Letters* 555, 248–252

The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282, 2012-2017.

The *C. elegans* genome sequencing project, 1999. How the worm was won. *15*(2), 51-58.

Tobin, D.M., Madsen, D.M., Kahn-Kirby, A., Peckol, E.L., Moulder, G., Barstead, R., Maricq, A.V., Bargmann, C.I., 2002. Combinatorial Expression of TRPV Channel Proteins Defines Their Sensory Functions and Subcellular Localization in *C. elegans* Neurons. *Neuron* 35, 307–318.

Tullet, J.M., 2014. DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future. *Biogerontology* 16(2), 221-234.

Venkatachalam, K., Luo, J., and Montell, C., 2014. Evolutionarily Conserved, Multitasking TRP Channels: Lessons from Worms and Flies. *Handb. Exp. Pharmacol* 223, 937-962.

Wittenburg, N., and Baumeister, R., 1999. Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: An approach to the study of nociception. *PNAS* 96(18), 10477-10482.

Xiao, R., and Xu, X.Z., 2011. *C. elegans* TRP channels. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, 323-339.

Yang, F., and Zheng, J., 2017. Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein Cell.* 8(3), 169–177.

Table 1. FLP-18 and FLP-21 related neuropeptides observed in *C. elegans*

Peptide	Sequence	Charge state z	Theoretical mass	Observed mass	Relative error (ppm)
FLP21-G	GLGPRPLRFG	+2	535.3169	535.3158	-2.05
FLP21(NH ₂)	GLGPRPLRF-NH ₂	+2	506.3142	506.3145	0.59
FLP18-1GKR	GAMPGVLRFGKR	+2	644.8690	644.8682	-1.24
FLP18-1	GAMPGVLRF-NH ₂	+2	473.7682	473.7694	2.53
FLP18-2GKR	EMPGVLRFGKR	+2	645.3610	645.3614	0.62
FLP18-2	EMPGVLRF-NH ₂	+2	474.2602	474.2611	1.90
FLP18-3GKR	SVPGVLRFGKR SVPGVLRFGKR	+2	608.3697	608.3682	-2.47
FLP18-3	SVPGVLRF-NH ₂	+2	437.2689	437.2692	0.69
FLP18-4GKR	EIPGVLRFGKR	+2	636.3828	636.3824	-0.63
FLP18-4	EIPGVLRF-NH ₂	+2	465.2820	465.2812	-1.72
FLP18-5GKR	SEVPGVLRFGKR	+2	672.8910	672.8899	-1.63
FLP18-5	SEVPGVLRF-NH ₂	+2	501.7902	501.7909	1.40
FLP18-6GKR	DVPGVLRFGKR	+2	622.3671	622.3664	-1.12
FLP18-6	DVPGVLRF-NH ₂	+2	451.2663	451.2668	1.11

List of Figures

Figure 1. Neuropeptide processing by pro-protein convertases (EGL-3) and carboxypeptidase E (EGL-21). Most pro-neuropeptides have several paired basic amino acid cleavage sites and based on the sequence, various processing intermediates can be derived leading to mature neuropeptide. A) Generalized protease pathways for pro-neuropeptide processing in *C.elegans* (adapted from Hook *et al.*, 2008). B) FLP-21 processing by pro-protein convertases EGL-3 leading to active FLP-21 neuropeptide. C) FLP-18 processing by pro-protein convertases EGL-3 and carboxypeptidase E EGL-21 leading to several active neuropeptides with common C-terminal sequence of GVLRFG.

Figure 2. Technical schematics of the four quadrants assay adapted from Margie *et al.* (2013). For thermal avoidance assay and chemotaxis, plates were divided into quadrants two test (A and D) and two controls (B and C). Sodium azide was added to all four quadrants to paralyze nematodes. *C.elegans* were added at the center of the plate (n=50 to 200) and after 30 minutes, animals were counted on each quadrant. Only animals outside the inner circle were scored. The calculation of the thermal avoidance index and chemotaxis index were performed as outlined. Quadrants temperature was continuously monitored using an infrared thermometer.

Figure 3. Comparison of the mobility and bias for WT (N2) and mutants *egl-3*, *elg-21*, *flp-18*, *flp-21* and *npr-1* animals in plates divided into quadrants conserve at constant temperature and no stimulus were applied (negative control). No quadrant selection bias was observed for all *C.elegans* genotype tested.

Figure 4. Thermal avoidance index and avoidance were evaluated for WT (N2) and mutants *egl-3*, *elg-21*, *flp-18*, *flp-21* and *npr-1* animals. Display values (mean \pm SD) were calculated from at least 3 independent experiments (n >150 nematodes) for each genotype. Heat avoidance is severely impaired in *egl-3* and *elg-21* mutant animals.

Figure 5. FLP-21G and FLP-21(NH2) neuropeptide relative concentrations. Peak areas were compared based on MS1 XIC's. The concentration of mature FLP-21 is hampered in *egl-3* mutants.

Figure 6. Relative concentration of FLP-18 related neuropeptides. Peak areas were compared based on MS1 XIC's. The concentration of mature FLP-18 is severely impaired in both, *egl-21* and *egl-3* mutants. Moreover, pro-neuropeptides including C-terminal GKR sequence accumulated in *egl-21* mutants as suspected based on proteolytic mechanism outline in Figure 1. Consequently, *egl-21* and *egl-3* have a deficit of mature FLP-18 and FLP-21 neuropeptides essential for neurotransmission.

Supplementary Figures

Figure S1. Chemotaxis index and chemical repellent 1-octanol avoidance were evaluated for WT (N2) and mutants *egl-3*, *elg-21*, *flp-18* and *flp-21* animals. Display values (mean \pm SD) were calculated from at least 3 independent experiments ($n > 150$ nematodes) for each genotype. No significant statistical differences were observed but *flp-18* and *flp-21* mutant animals were less sensitive to 1-octanol.

Figure S2. Chemotaxis index and acid avoidance were evaluated for WT (N2) and mutants *egl-3*, *elg-21*, *flp-18* and *flp-21* animals. Display values (mean \pm SD) were calculated from at least 3 independent experiments ($n > 150$ nematodes) for each genotype. No significant statistical differences were observed but *flp-18* and *flp-21* mutant animals were marginally less sensitive to pH.

Figure S3. Chemotaxis index and osmotic pressure avoidance were evaluated for WT (N2) and mutants *egl-3*, *elg-21*, *flp-18* and *flp-21* animals. Display values (mean \pm SD) were calculated from at least 3 independent experiments ($n > 150$ nematodes) for each genotype. Only mutant *egl-3* (VC461) were significantly less sensitive and *egl-3* (MT1541) were marginally less sensitive to osmotic pressure.

Figure S4. Examples of specific extracted-ion chromatograms (XIC) for FLP-21G and FLP-21(NH₂). XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. High-Resolution MS² Spectra were used to confirm peptide identity.

Figure 1

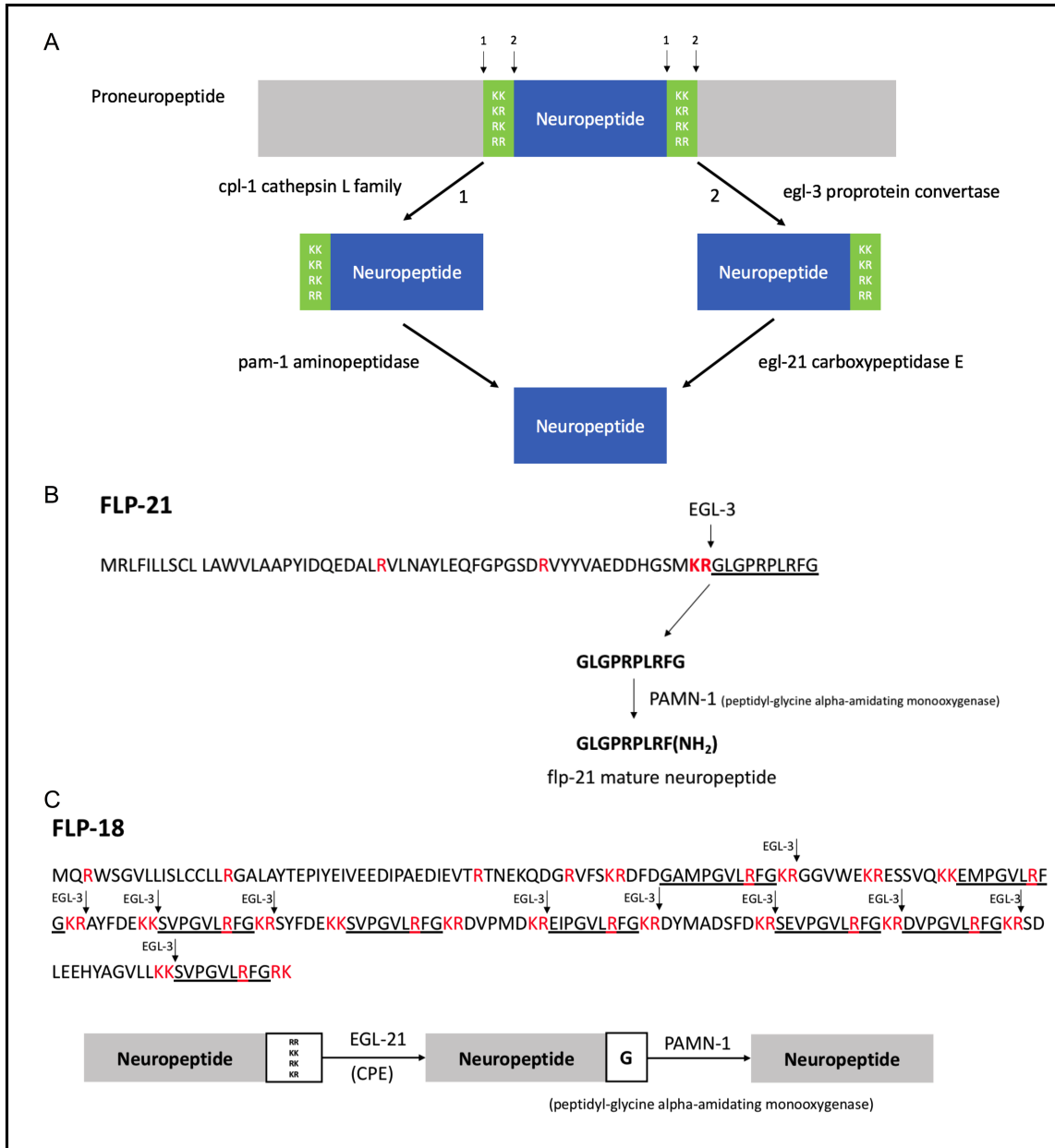


Figure 3.

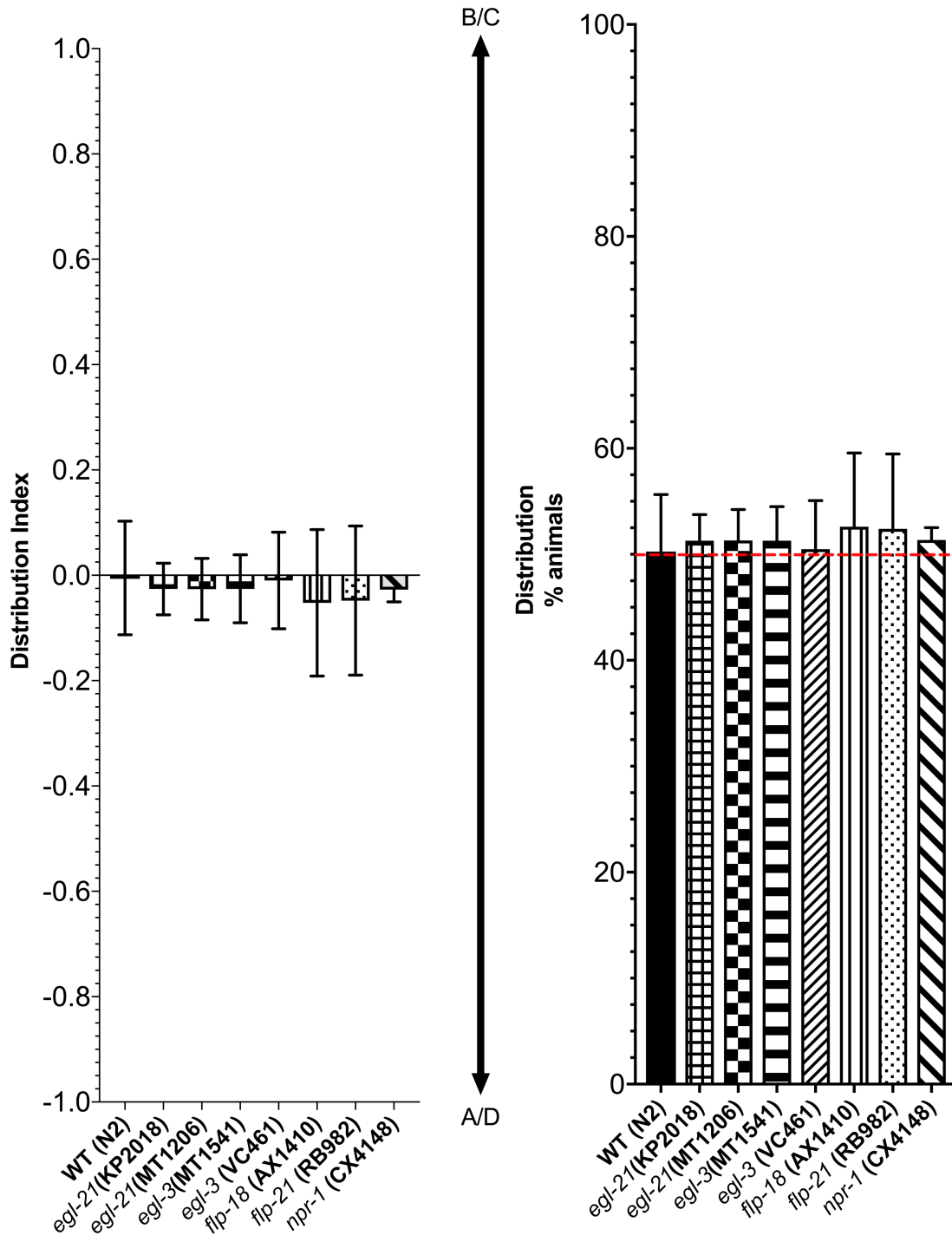


Figure 4.

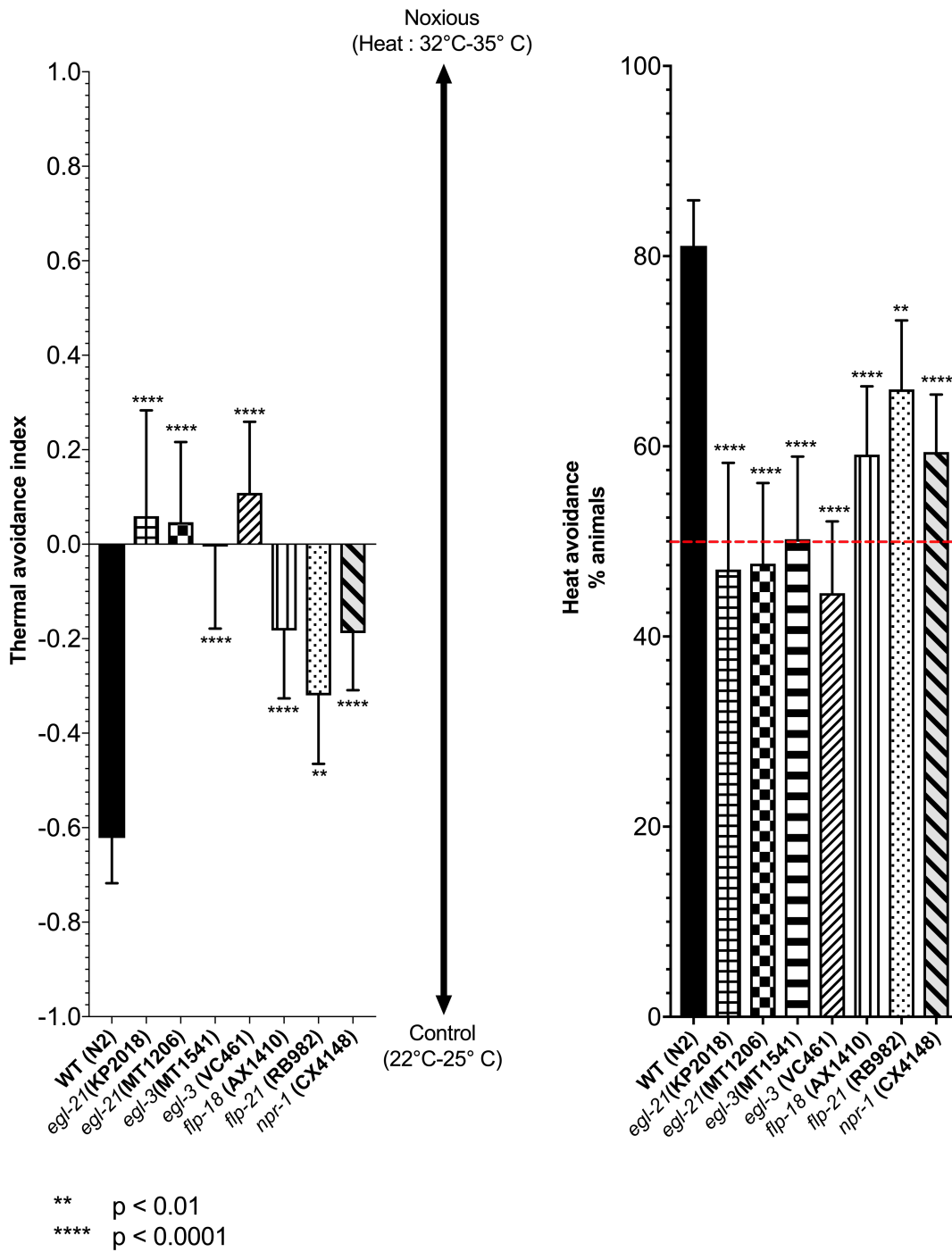


Figure 5.

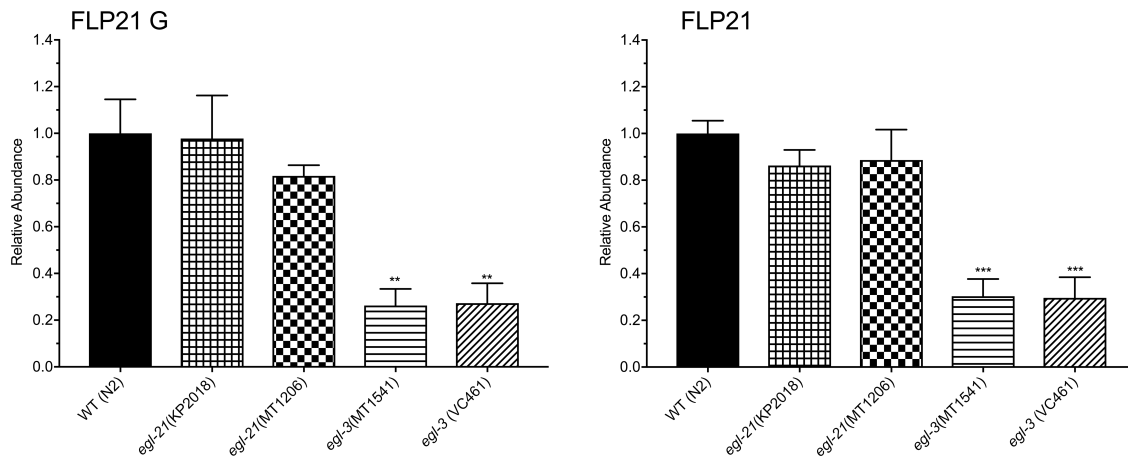
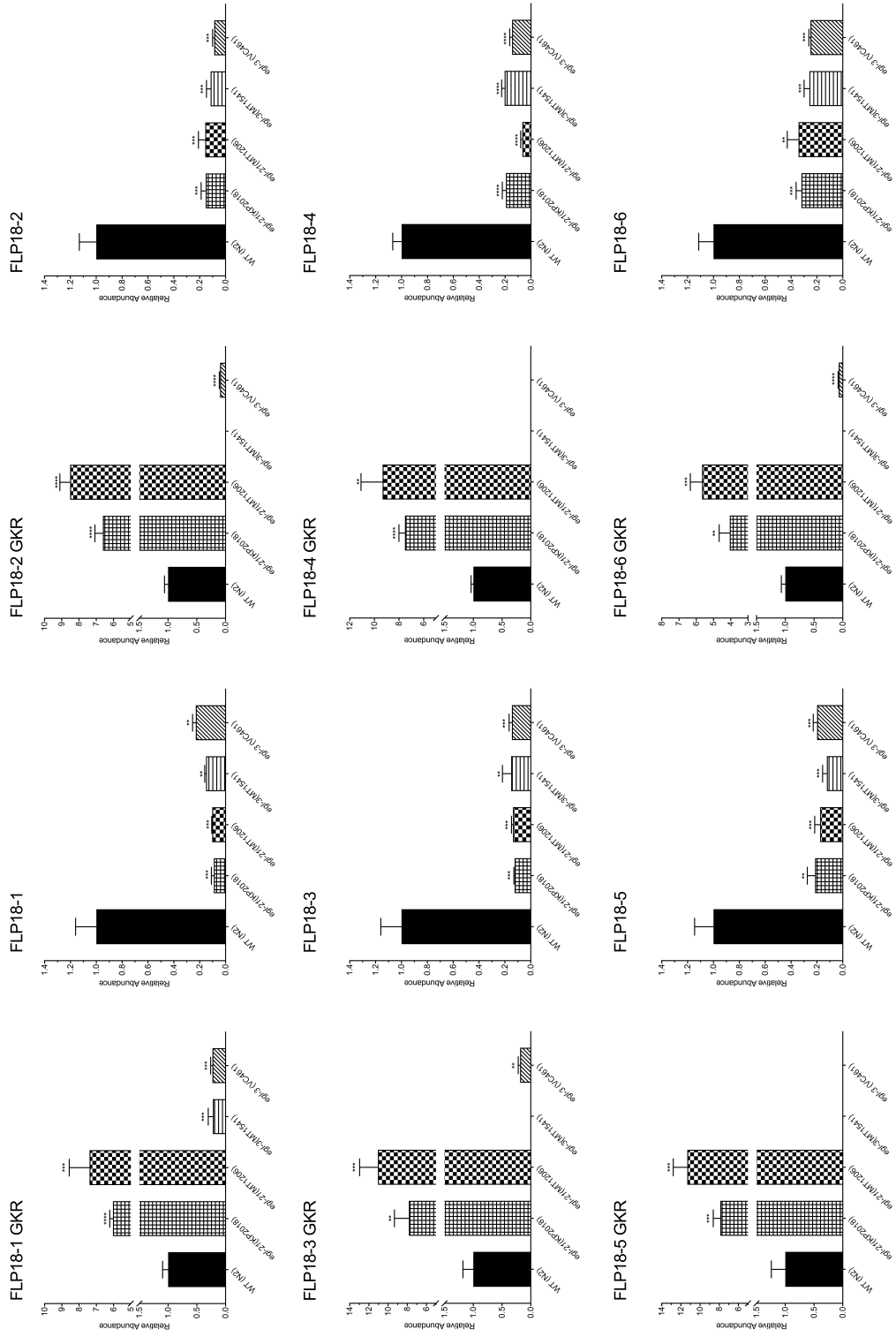
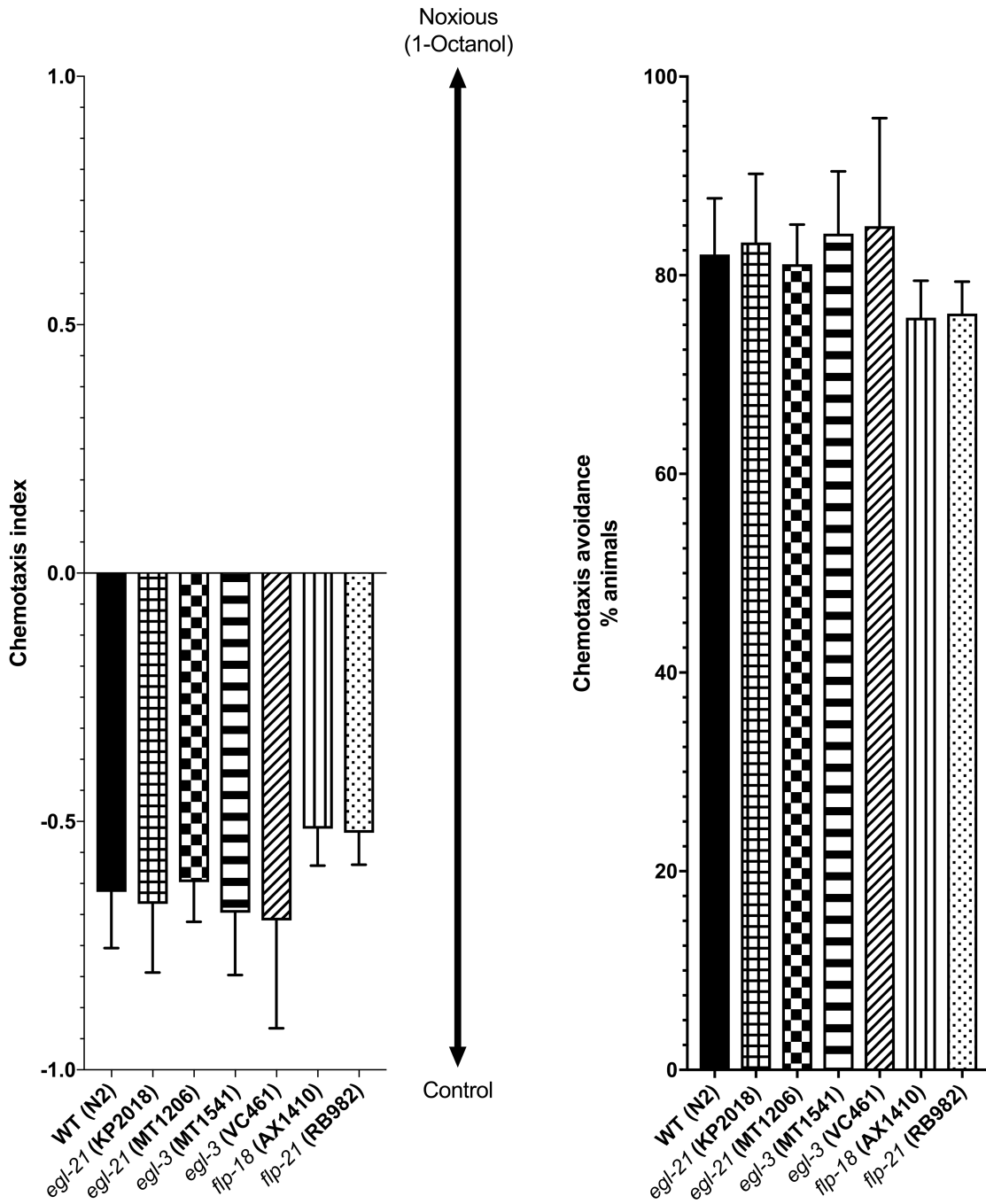


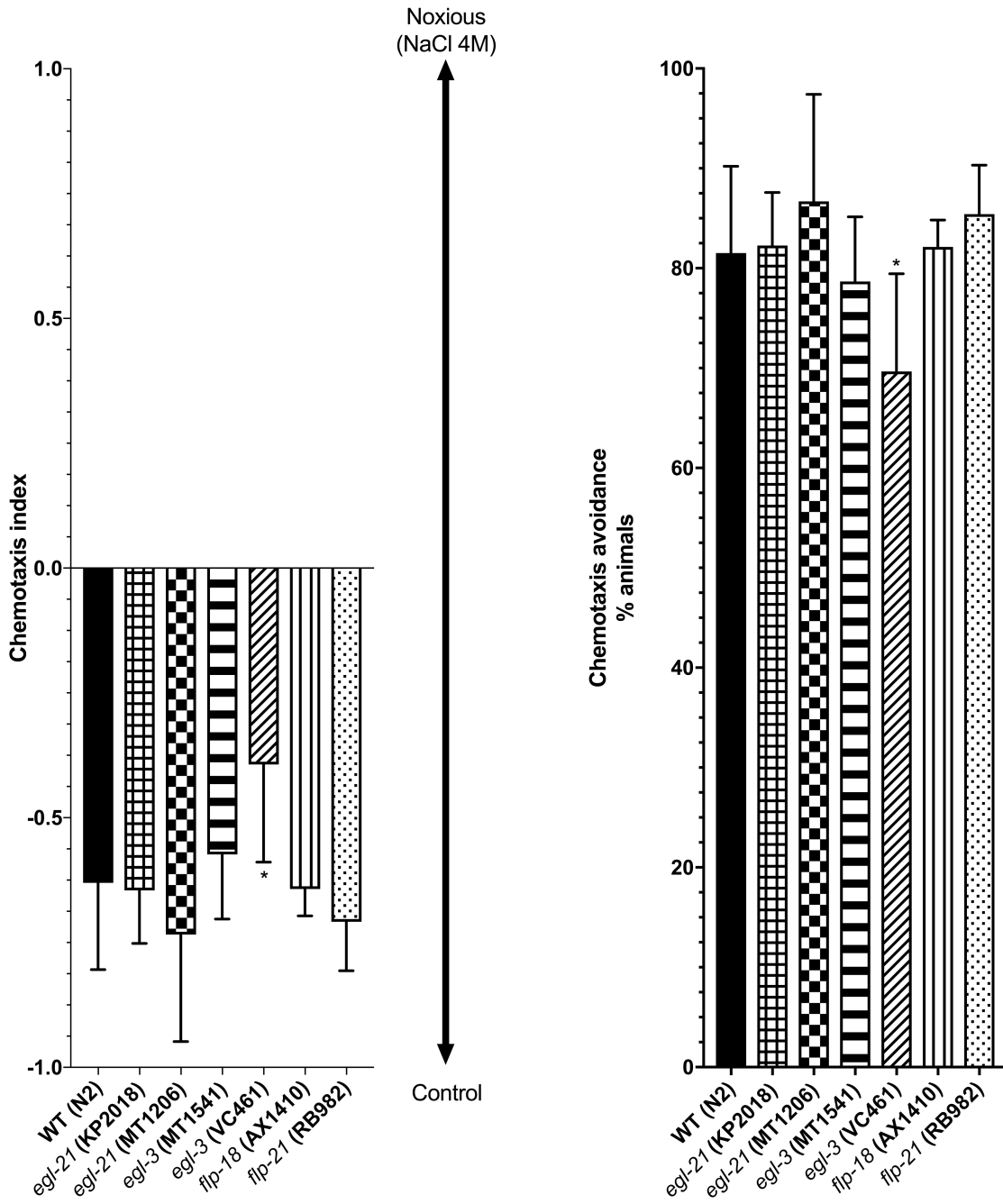
Figure 6.



Supplementary Figure 1

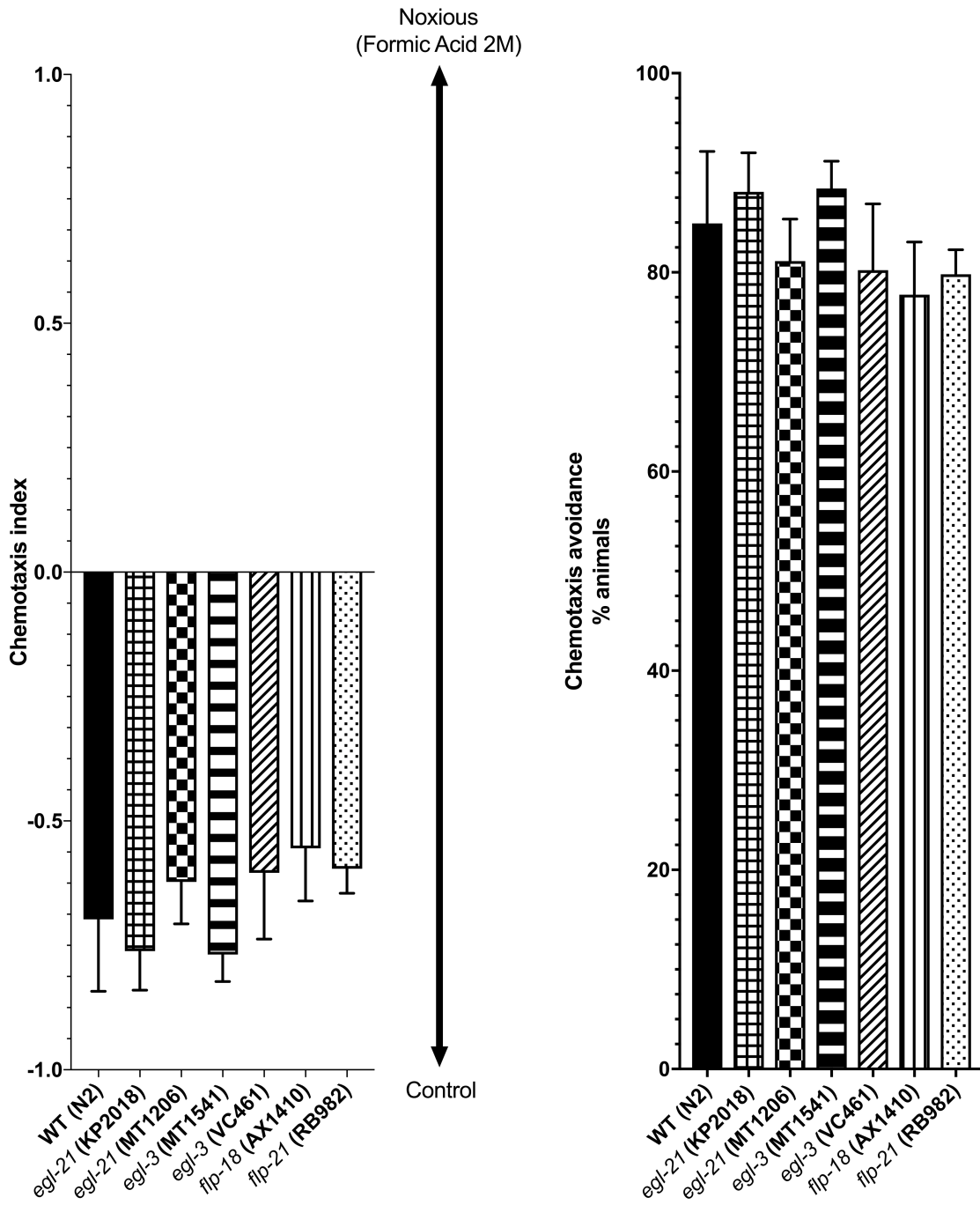


Supplementary Figure 2

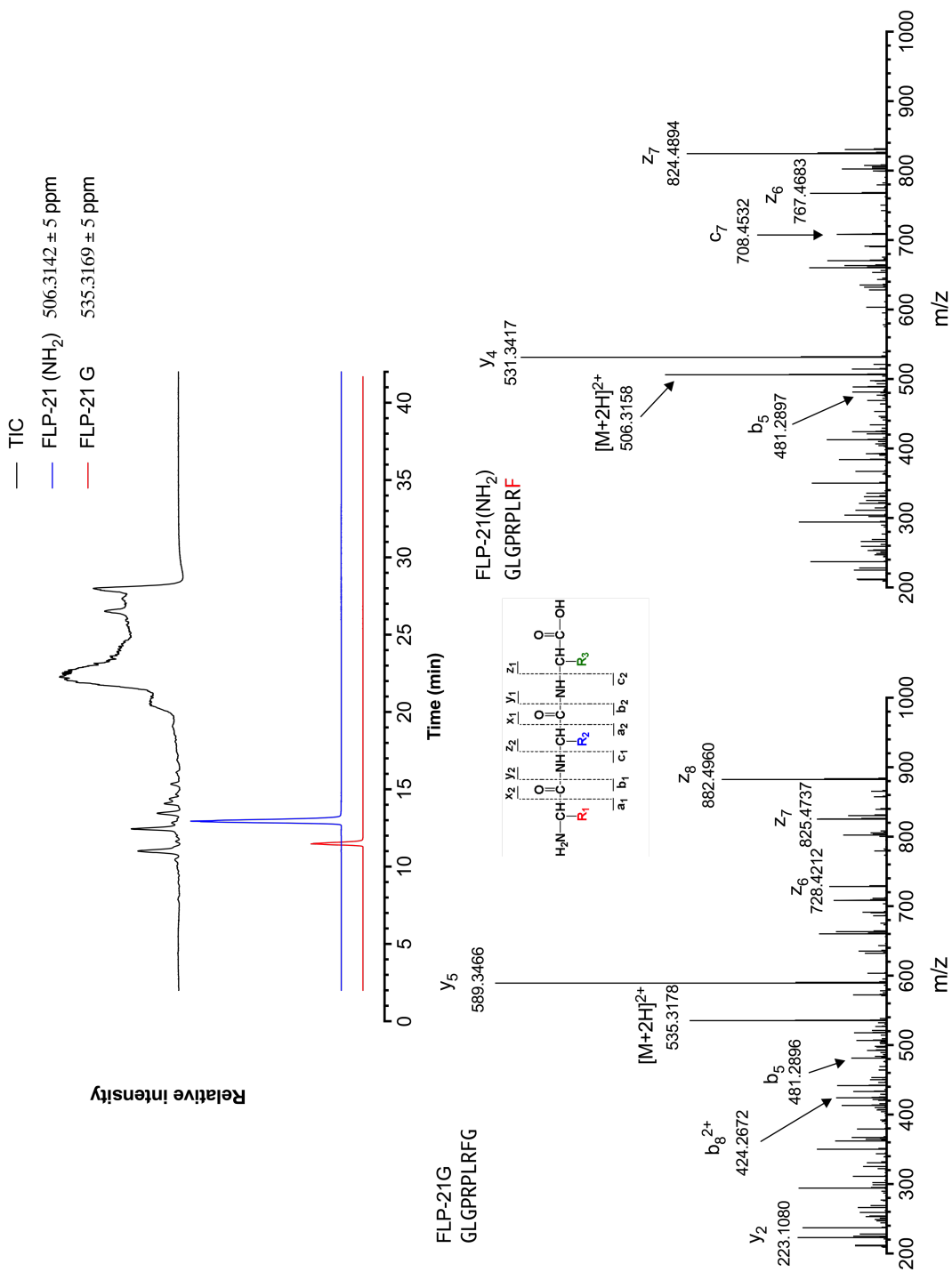


* p < 0.05

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



CHAPITRE 4 : DESCRIPTION DÉTAILLÉE DES
RÉSULTATS
&
DISCUSSION GÉNÉRALE

Chapitre 4-1 : Description détaillée des résultats

Tableau3: Résultats des études phénotypique et peptidomique

Conditions expérimentales	Souches	Résultats attendus (Hypothèses)	Résultats observés (obtenus)
Sans stimuli	WT (N2)	Distribution homogène dans toutes les zones	√ (Conforme aux hypothèses)
	Mutants	Distribution homogène dans toutes les zones	√ (Conforme aux hypothèses)
	WT vs Mutants	*ns	√ (Conforme aux hypothèses)
Stimuli Chimiques : - 1-octanol - NaCl 4M - Acide formique 2M	WT (N2)	Sensibilité	√ (Conforme aux hypothèses)
	Mutants	Diminution significative (↓*) de sensibilité	× (Non conforme aux hypothèses)
	WT vs Mutants	Différence significative (*)	× (Non conforme aux hypothèses) + √ (Conforme aux hypothèses) (Pression osmotique : <i>egl-3(VC461)</i>)
Stimulus thermique : Pointe chauffante	WT (N2)	Sensibilité	√ (Conforme aux hypothèses)
	Mutants	Diminution significative (↓*) : sensibilité	√ (Conforme aux hypothèses)
	WT vs Mutants	Différence significative (*)	√ (Conforme aux hypothèses)

Chapitre 4-2 : Discussion générale

Les méthodes utilisées dans nos travaux pour l'évaluation de la thermotaxie et de la chimiotaxie ont été adaptées à partir des stratégies à deux et à quatre quadrants décrits précédemment par d'autres auteurs [16, 19, 64]. Pour une meilleure comparaison des résultats, nous avons décidé d'utiliser la même stratégie de stimulation et d'observation pour tous les tests effectués. Nous avons choisi les pétris de stimulation divisée en quatre zones et donc les zones en diagonales sont similaires deux à deux. À partir de nos résultats, nous avons calculé l'indice de distribution et le pourcentage de distribution (article du chapitre 3 : figure 2 en annexe). L'indice de distribution nous indique vers quels types de zones s'orientent la majorité des individus (*C. elegans*), alors que le pourcentage de distribution renseigne sur la proportion d'individus qui évitent les zones stimulées, s'orientant ainsi vers les zones non stimulées.

Pour comparer la mobilité des individus à température pièce (22°C) en absence de stimulus, les premiers tests ou contrôles négatifs sont réalisés sur toutes les souches WT et mutantes (article du chapitre 3 : figure 3). Tous les résultats des contrôles négatifs sont similaires, l'indice de distribution présente des valeurs autour de zéro et le pourcentage de distribution des valeurs autour de 50%. Peu importe la souche, on a une distribution homogène des individus dans toutes les zones. Nous avons déduit qu'en absence de stimulus, aucun biais de sélection du quadrant n'a été observé pour tous les génotypes de *C. elegans* testés.

Pour les tests de stimulation thermique, l'indice de thermotaxie et le pourcentage d'évitement ont été évalués pour les individus WT (N2) et les mutants *egl-3*, *egl-21*, *flp-18* et *flp-21*. Les pétris de stimulation présentent des zones en diagonales deux à deux et similaires, ce qui permet d'obtenir deux zones avec stimuli (A et D) et deux zones sans stimuli ou contrôles (B, C) (article du chapitre 3 : figure 2). Le principe derrière l'évaluation de la réponse de *C. elegans* au stimulus thermique était d'observer et de quantifier en fonction de la souche, vers quels types de zones s'orientent la majorité des individus. Les calculs ont été réalisés à partir d'au moins trois expériences indépendantes ($n > 150$ nématodes) pour chaque génotype. Nos résultats révèlent que l'évitement de la chaleur (32° - 35°C) a été gravement altéré chez tous les individus mutants présentant ainsi une différence significative avec le WT qui a continué à être sensible à cette température (article du chapitre 3 : figure 4).

Pour le test de chémotaxie, les souches sauvages, tout comme que la presque totalité des mutants, évitaient les stimuli. Une seule exception, le mutant *egl-3* (VC461), dont le résultat démontrait une altération de la perception du stimulus chimique NaCl 4M et une différence significative assez faible avec le WT. Ainsi, pour ce mutant en particulier, il se pourrait que la communication chimique associée à la perception de la pression osmotique (NaCl 4M) soit légèrement altérée. Par contre, pour la souche sauvage et la presque totalité des mutants, soit la communication chimique n'a pas été altérée, soit la perception chemotaxique est associée à d'autres mécanismes synaptiques impliquant des neurotransmetteurs non peptidiques.

Les tests de stimulation ont été réalisés sur la souche sauvage ou WT (N2) et les mutants (*egl-3*, *egl-21*, *flp-18* et *flp-21*), alors que la détection des neuropeptides par spectrométrie de masse en utilisant la méthode label free a été réalisée pour WT, *egl-3* et *egl-21* seulement. La méthode label free en spectrométrie de masse vise à déterminer la quantité relative de protéines

dans deux ou plusieurs échantillons biologiques [170]. Avant de faire une ébauche des résultats, nous allons nous attarder sur l'effet de chacun des éléments affectés par les mutations.

L'action des protéases PC2 et/ou CPE est nécessaire pour produire des neuropeptides biologiquement actifs qui modulent plusieurs circuits neuronaux différents (article du chapitre 3 : figure 1A). Plusieurs défauts de comportement ont été observés chez les mutants dépourvus de ces enzymes [4, 58]. Dans les études de Hook et al. 2008, les mutants KO *egl-3* ont présenté une diminution de la réactivité aux stimuli tactiles. En revanche, des défauts prononcés de ponte et de mécanosensation ont été observés chez ces mutants. La carboxypeptidase-E agit à l'étape finale avant l'obtention du neuropeptide mature bioactif [4]. La maturation du proneuropeptide FLP-18 nécessite l'action successive de la PC2 (EGL-3) et de la CPE (EGL-21), alors que la maturation du proneuropeptide FLP-21 nécessite l'action d'une seule peptidase, la carboxypeptidase-E (EGL-3). L'amidation est le processus final pour obtenir des neuropeptides matures, 6 neuropeptides FLP matures bioactifs pour FLP-18 et un seul pour FLP-21 [11, 13, 14, 20]. Dans le processus de maturation des neuropeptides y compris les FLP-18 et FLP-21, les études ont pu identifier au moins deux voies. La voie 1 sous l'action des protéases PC2/CPE et la voie 2 sous l'action des protéases CPL-1/PAM-1 [11, 13,14] (article du chapitre 3 : figures 1A, 5 et 6 en annexe). Ces résultats laissent penser que les protéases CPL-1 et PAM-1 impliquées dans la seconde voie de dégradation des pro-neuropeptides en neuropeptides ne compensent pas l'absence de EGL-3 et EGL-21.

Les résultats de détection des neuropeptides FLP-18 et FLP-21 suivent les mêmes tendances que les phénotypes observés. Chez les mutants *egl-3*, il a été noté une faible abondance relative des neuropeptides matures FLP-18 et FLP-21 qui nécessitent l'action de la protéase EGL-3. Par contre, chez le mutant *egl-21*, une importante abondance relative de FLP-21 mature qui ne nécessite pas l'action de la protéase EGL-21, mais uniquement celle de EGL-3 a été notée. De plus, chez les mutants *egl-21*, des neuropeptides intermédiaires ont été observés mais pas de neuropeptides matures FLP-18. L'accumulation de neuropeptides intermédiaires serait une conséquence de l'absence de la seconde protéase EGL-21 dans ces mutants. EGL-21 agit normalement sur les neuropeptides intermédiaires en clivant les résidus basiques en C-terminal pour donner les neuropeptides qui, dans certains cas, subissent une amidation pour être biologiquement actifs.

D'après les hypothèses suggérées, pour tous les types de stimuli, la souche sauvage (N2) devait être sensible et tous les mutants devaient présenter une diminution de la sensibilité. Pour la souche sauvage, les résultats attendus ont été identiques aux résultats obtenus, quel que soit le type de stimuli. Pour les souches mutantes, les résultats attendus ont été identiques aux résultats obtenus uniquement pour le stimulus thermique. Pour les stimuli chimiques, Les résultats observés étaient tous différents des résultats attendus sauf le mutant *egl-3* (VC461). Le résultat observé pour ce dernier a été similaire à l'hypothèse avec une différence significative et ce, uniquement avec la pression osmotique (NaCl 2M) (tableau 4).

Le test de thermotaxie standard a permis de quantifier la réaction aux températures nocives (>30 °C). L'exposition à des températures comprises entre 32°C et 35°C a provoqué une réaction d'évitement chez *C. elegans* souche sauvage. Des tests thermotaxiques ont été réalisés pour évaluer si les mutants de *C. elegans egl-3* et *egl-21* présenteraient une réponse nocifensive diminuée à la chaleur nocive. Les mutants *flp-18* et *flp-21* permettaient de confirmer les résultats obtenus chez les deux précédents mutants, qui ne produisaient pas de neuropeptides FLP-18 et FLP-21. Les résultats suggèrent que les mutants *egl-3* et *egl-21* sont des mutants déficients en neuropeptides responsables de la thermosensation. Ceci est cohérent avec notre hypothèse, puisque les enzymes EGL-3 et EGL-21 sont importantes pour la maturation des pro-neuropeptides en neuropeptides. De plus, les mutants *flp-18* et *flp-21* présentaient également un comportement d'évitement thermique entravé. Cependant, il était significativement moins prononcé par rapport aux mutants *egl-3* et *egl-21*. Les deux mutants *egl-3* et *egl-21* manqueraient d'une grande variété de neuropeptides matures, incluant FLP-18 et FLP-21. Ainsi, la communication chimique synaptique a été altérée. On peut déduire que les modifications du comportement nocifensif sont coordonnées par une modulation moléculaire spécifique des neurotransmetteurs impliqués dans les communications synaptiques chez *C. elegans*. Il a été largement démontré que les FLP-21 / NPR-1 sont des acteurs clés de la réponse nocifensive déclenchée par la chaleur nocive. Le neurone ASH est considéré comme le principal nocicepteur impliqué dans les réponses d'évitement des stimuli nocifs, mais son rôle dans l'évitement de la chaleur n'est pas clair, même si les neurones ASH expriment les nocicepteurs OCR-2 et OSM-9, orthologues des TRPV des mammifères [62].

Les tests de thermotaxie et de chimiotaxie ont été largement utilisés pour étudier et comprendre comment l'information sensorielle (influx nerveux) est intégrée pour modifier le

comportement des *C. elegans* [4, 6, 11, 13, 19, 62]. Les premières expériences durant nos travaux consistaient à travailler dans un milieu sans stimuli et à évaluer la mobilité des nématodes WT (N2) et mutants (*egl-3*, *elg-21*, *flp-18*, *flp-21*), évitant de ce fait tout biais associé à la mobilité des individus. De notre projet, il en ressort plusieurs pistes possibles de compréhension.

La réponse d'évitement est fonction du type de stimuli et diffère significativement d'une souche à l'autre. Cette réponse implique différents neurones et est influencée par des mutations dans des gènes distincts [6, 19, 62]. La base de ce mécanisme est moléculaire et associée à la transmission du message nerveux à travers les neurones (neurotransmission) [19]. Au cours du processus de neurotransmission, les protéases proprotéine convertase (PC) et la carboxypeptidase-E (CPE) clivent les protéines précurseurs pour donner des neuropeptides matures. Le clivage endo-protéolytique est une étape clé pour la libération de neuropeptides bioactifs. Les protéases possèdent un rôle physiologique important pour la biosynthèse des neuropeptides [3,4]. Elles clivent sélectivement les protéines au niveau des sites dibasiques ou monobasiques [3, 4]. Pendant la maturation des neuropeptides chez *C. elegans*, PC et/ou CPE sont indispensables pour la formation de neuropeptides matures bioactifs [4]. Les neuropeptides matures auraient un rôle crucial chez *C. elegans*, affectant ainsi la structure et la fonction des neurones sensoriels, particulièrement les neurones impliqués dans la transduction des stimuli thermiques. Ainsi, le comportement nociceptif chez *C. elegans* peut être utilisé pour comprendre les bases phénotypiques de la nociception, alors que les études protéomiques permettent de faire une mesure ciblée des neuropeptides associés à ces phénotypes.

Comme perspective immédiate, il serait intéressant de raffiner la compréhension du mécanisme d'activation des nocicepteurs OCR-2 / OSM-9 orthologues des TRPV des mammifères. Ensuite, il serait pertinent d'examiner si l'activation pharmacologique de ces nocicepteurs produit chez *C. elegans* un effet similaire à celui chez les mammifères. Sur le long terme, et partant du principe qu'en recherche la chimie combinatoire génère des milliers de nouvelles entités chimiques, *C. elegans* pourrait permettre de tester des bibliothèques imposantes de molécules. Ceci pourrait faire de *C. elegans* un système *in vivo* pour des essais pharmacologiques et, par ricochet, un modèle alternatif pour l'investigation de pathologies ou de mécanismes de réponses nociceptives.

Nous avons pu présenter *C. elegans* comme un modèle intéressant pour l'analyse des

neuropeptides intervenant dans la perception de la chaleur. Dans les études ultérieures, nous allons procéder à l'étude de l'abondance absolue par l'identification et la caractérisation par spectrométrie de masse des neuropeptides ciblés. La réponse de *C. elegans* à la chaleur nocive est médiée par des neurones sensoriels en utilisant uniquement la voie des neuropeptides. Selon nos résultats dans la présente étude, la réponse nociceptive de *C. elegans* à la chaleur est proche de celle des organismes supérieurs. Il serait intéressant de savoir si les outils génétiques intervenant chez *C. elegans* pourraient être exploités pour l'identification de nouveaux gènes et des voies impliquées dans le comportement des animaux supérieurs. Par contre, dans une autre étude en cours dans notre laboratoire, nous étudions les mutants auxquels ils manquent certains gènes impliqués dans la transmission nerveuse glutamatergique qui est la seconde voie de dégradation des proneuropeptides que nous avons pas pu aborder ici.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Chapitre 5 : Conclusion

La souche sauvage (N2) n'a subi aucune modification et reste par essence la souche de référence. Les souches mutantes étudiées se caractérisent soit par une absence d'enzymes importantes dans la synthèse des pro-neuropeptides et des neuropeptides matures (mutants *egl-3* et *egl-21*), soit par une absence de neuropeptides matures bioactifs (mutants *flp-18* et *flp-21*).

Au cours de la thermosensation, les souches sauvages sont restées sensibles aux stimuli alors qu'on a noté une régression de la sensibilité chez les mutants. Les analyses statistiques des résultats en lien avec les expériences sur la thermosensation ont révélé une différence significative entre la souche sauvage et toutes les souches mutantes.

Pour ce qui est de la chimiosensation, la souche sauvage et la presque totalité des mutants étaient sensibles à ces stimuli chimiques. Les analyses statistiques n'ont pas mis en évidence de différence significative entre la souche sauvage et la presque totalité des mutants. La seule différence significative était entre la souche sauvage et le mutant *egl-3* (VC461) pour la stimulation à la pression osmotique induite par le NaCl 2M.

Malgré la distance évolutive qui sépare *C. elegans* et les mammifères, nous constatons qu'aux échelles moléculaire et cellulaire, la physiologie du neurone est très conservée entre ces organismes. Les outils génétiques disponibles chez *C. elegans* permettent d'extraire les éléments critiques des réseaux d'interactions mis en jeu dans des processus cellulaires ou comportementaux. La très grande simplicité de son système nerveux permet donc d'utiliser *C. elegans* comme un « tube à essai vivant » pour identifier de nouveaux gènes, analyser les voies moléculaires de signalisation et explorer la biologie cellulaire du neurone *in vivo*.

Sur le court terme, notre étude pourrait permettre de raffiner la compréhension du mécanisme des nocicepteurs OCR-2 / OSM-9 orthologues des TRPV des mammifères et voir si l'activation pharmacologique de ces nocicepteurs va produire chez *C. elegans* un effet similaire à celui des mammifères. Sur le moyen et long terme, la chimie combinatoire permet de générer des milliers de nouvelles entités chimiques. *C. elegans* est un « système *in vivo* » qu'on pourrait présenter comme modèle alternatif et qui pourrait être utile en essai pharmacologique pour tester en aval une certaine librairie de molécules générées par la chimie combinatoire.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- 1) WORMATLAS. Introduction to *C. elegans* ANATOMY. [En ligne]. [Cité le 22 février 2017]. Disponible : <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>
- 2) C. Gally et J.-L. Bessereau (2003). *C. elegans* : des neurones et des gènes. *médecine sciences*, vol. 19, n°6-7, p. 725-734.
- 3) Chris Li and Kyuhung Kim. Neuropeptides (2008). *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. [En ligne]. [Cité le 08 février 2017]. Disponible : http://www.wormbook.org/chapters/www_neuropeptides/neuropeptides.pdf
- 4) V. Hook et al (2008). Proteases for Processing Proneuropeptides into Peptide Neurotransmitters and Hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008 ; **48**: 393–423. [En ligne]. [Cité le 08 février 2017]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18184105>
- 5) Assistance scolaire personnalisée. La chimie de la perception. [En ligne]. [Cité le 04 mars 2017]. Disponible : https://www.assistancescolaire.com/eleve/1ES/ens_sciences/reviser-le-cours/la-chimie-de-la-perception-1_sci_03
- 6) H. Mills, A. Ortega, W. Law, V. Hapiak, P. Summers, T. Clark, and R. Komuniecki (2016). Opiates Modulate Noxious Chemical Nociception through a Complex Monoaminergic/Peptidergic Cascade. *The Journal of Neuroscience*, **36(20)** : 5498-5508.
- 7) M. Ezcurra, D. S. Walker, I. Beets, P. Swoboda, and W. R. Schafer (2016). Neuropeptidergic Signaling And Active Feeding State Inhibit Nociception in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*, **36(11)** : 3157-3169.
- 8) H. Wang, J. Liu, S. Gharib, C. M. Chai, E. M. Schwarz, N. Pokala & P. W. Sternberg (2016). cGAL, a temperature-robust GAL4-UAS system for *Caenorhabditis elegans*. *Nature America, Inc., part of Springer Nature*. 1-4 DOI:10.1038/NMETH.4109
- 9) C. Couillault et C. L. Kurz (2010). Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire. *STAL Volume 36 / 4^{ème} Trimestre 2010*. [En ligne]. [Cité le 08 février 2017]. Disponible : <http://www.afstal.com/medias/File/sta-39252-w-4-articles-c-elegans-6012011.pdf>
- 10) A. N. Nathoo, R. A. Moeller, B. A. Westlund, and A. C. Hart (2001). Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditis elegans* and other species. *PNAS*, **96(24)** : 14000 - 14005. [En ligne]. [Cité le 24 mars 2017]. Disponible : www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.241231298

- 11) D. A. Glauser, et al. (2011). Heat avoidance is regulated by Transient Receptor Potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics Society of America*, 188 : 91-103. [En ligne]. [Cité le 24 mars 2017]. Disponible : <http://www.genetics.org/content/188/1/91>
- 12) T. Stiernagle (2006). Maintenance of *C. elegans*. *The C. elegans Research Community*. [En ligne]. [Cité le 16 avril 2018]. Disponible : http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html
- 13) S. J. Husson and al. (2007). Impaired processing of FLP and NLP peptides in carboxypeptidase E (EGL-21)-deficient *Caenorhabditis elegans* as analyzed by mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*, 2007, 102, 246–260. [En ligne]. [Cité le 16 mars 2018]. Disponible : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1471-4159.2007.04474.x> (doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04474.x)
- 14) A. T. Dossey and al. (2006). NMR Analysis of *C. elegans* FLP-18 Neuropeptides: Implications for NPR-1 Activation. *Biochemistry*; 45(24): 7586–7597. [En ligne]. [Cité le 16 mars 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2517133/pdf/nihms61165.pdf>
- 15) D. A. Glauser and al. (2011). Heat Avoidance Is Regulated by Transient Receptor Potential (TRP) Channels and a Neuropeptide Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 188: 91–103. [En ligne]. [Cité le 16 mars 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3120139/pdf/91.pdf> (DOI: 10.1534/genetics.111.127100)
- 16) O. Margie, C. Palmer, I. Chin-Sang (2013). Heat *C. elegans* Chemotaxis Assay. *J. Vis. Exp.* (74). [En ligne]. [Cité le 16 mars 2018]. Disponible : <http://www.jove.com/video/50069>
- 17) J.C. White, E. Southgate, J. N. Thomson, S. Brenner (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; **314** : 1 - 340.
- 18) F. Ibarando (2015). Le vieillissement et le petit ver rond *Caenorhabditis elegans*. *Evo-Bio*. [En ligne]. [Cité le 25 avril 2018]. Disponible : <http://evobio.blog.lemonde.fr/2015/08/19/le-vieillissement-et-le-petit-ver-rond-caenorhabditis-elegans/>
- 19) N. Wittenburg AND R. Baumeister (1999). Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: An approach to the study of nociception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp. 10477–10482.

- 20) S. Van Bael and al (2018). Mass spectrometric evidence for neuropeptide-amidating enzymes in *C. elegans*. [En ligne]. [Cité le 27 avril 2018]. Disponible : <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.RA117.000731>
- 21) M. B. Goodman (2006). Mechanosensation. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, [En ligne]. [Cité le 27 mai 2018]. Disponible : http://www.wormbook.org/chapters/www_mechanosensation/mechanosensation.pdf
- 22) Jennifer M. A. Tullet (2014). DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future. *Biogerontology* 16:221–234. [En ligne]. [Cité le 27 mai 2018]. Disponible : <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10522-014-9527-y.pdf>
- 23) B. Boucher and al. (2016). Structural and Functional Characterization of a *Caenorhabditis elegans* Genetic Interaction Network within Pathways. *PLOS Computational Biology*. [En ligne]. [Cité le 27 mai 2018]. Disponible : <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article/file?id=10.1371/journal.pcbi.1004738&type=printable>
- 24) Laurent Ségalat et Christian Néri (2003). « *C. elegans* comme modèle pour les maladies dégénératives héréditaires humaines ». *Médecine Sciences*, vol. 19, n° 12, p. 1218-1225. [En ligne]. [Cité le 27 mai 2018]. Disponible : <https://www.erudit.org/fr/revues/ms/2003-v19-n12-ms598/007397ar/>
- 25) P. Laurent et al. (2015). Decoding a neural circuit controlling global animal state in *C. elegans*. [En ligne]. [Cité le 27 mai 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25760081>
- 26) C. I. Bargmann (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* ; **282** : 2028 – 2033.
- 27) *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans* : A platform for investigating biology. *The Science*; **282** : 2012 – 2018. [En ligne]. [Cité le 08 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851916>
- 28) S. Brenner, H. R. Horvitz and J. E. Sulston (2002). Genetic regulation of organ development and programmed cell death. [En ligne]. [Cité le 27 mai 2018]. Disponible : https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/press.html

- 29) S. Brenner (1974). The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77** : 71-94. [En ligne]. [Cité le 11 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1213120/pdf/71.pdf>
- 30) W. R. Schafer (2006). Neurophysiological methods in *C. elegans*: an introduction. [En ligne]. [Cité le 11 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19791/>
- 31) A. R. Corsi (2006). A Biochemist's Guide to *C. elegans*. *Anal. Biochem*; **359(1)** : 1-17. [En ligne]. [Cité le 11 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1855192/>
- 32) C. Shaffer (2017). Systèmes Modèles de Neuroanatomie. *M. Sc.*; [En ligne]. [Cité le 11 Juin 2018]. Disponible : [https://www.news-medical.net/health/Neuroanatomy-Model-Systems-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Neuroanatomy-Model-Systems-(French).aspx)
- 33) R. Xiao and X. Z. Shawn Xu (2011). TRP Channels – **Chapter 21: Studying TRP Channels in *Caenorhabditis elegans***. *Taylor and Francis Group, LLC.* ; [En ligne]. [Cité le 12 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92808/>
- 34) J. E. Richmond, E. M. Jorgensen (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* ; **2** : 791-797
- 35) J. E. Richmond, R. M. Weimer, E. M. Jorgensen (2001). An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* ; **412** :338-341
- 36) M. Christesen, A. Estevez, X. Yin et al. (2002). A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells. *Neuron* ; **33** : 503-514
- 37) Ji Ying Sze (2007). TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades - **Chapter 18 : The TRPV Channel in *C. elegans* Serotonergic Neurons**. *CRC Press/Taylor & Francis*; [En ligne]. [Cité le 17 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5261/>
- 38) S. Zhang, I. Sokolchik, G. Blanco, Ji Ying Sze (2004). *Caenorhabditis elegans* TRPV ion channel regulates 5HT biosynthesis in chemosensory neurons. *The Company of Biologists*; [En ligne]. [Cité le 17 Juin 2018]. Disponible : <http://dev.biologists.org/content/develop/131/7/1629.full.pdf>
- 39) D. M. Tobien et al. (2002). Combinatorial Expression of TRPV Channel Proteins Defines Their Sensory Functions and Subcellular Localization in *C. elegans* Neurons. *Neuron*; **35** : 307–

318. [En ligne]. [Cité le 17 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160748>
- 40) W. Liedtke et al. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. HHMI Author Manuscripts; 103(3) : 525-535. [En ligne]. [Cité le 17 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2211528/>
- 41) W. Liedtke et al. (2003). Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci USA ; **100** : 14531–14536. [En ligne]. [Cité le 17 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC304114/>
- 42) K. Roayaie et al. (1998). The G Protein ODR-3 Mediates Olfactory and Nociceptive Function and Controls Cilium Morphogenesis in *C. elegans* Olfactory Neurons. *Neuron*; 20 : 55–67. [En ligne]. [Cité le 17 Juin 2018]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627300804341?via%3Dihub>
- 43) H. Watanabe et al. (2002). Activation of TRPV4 Channels (hVRL-2/mTRP12) by Phorbol Derivatives. [En ligne]. [Cité le 17 Juin 2018]. Disponible : <http://www.jbc.org/content/277/16/13569.long>
- 44) J. Vriens et al. (2004). Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci USA*; **101(1)** : 396–401. [En ligne]. [Cité le 17 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC314196/>
- 45) J. G. White et al (1986). The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London – Series B: Biological Sciences*; **314** : 1-340.
- 46) E. Serrano-Saiz et al. (2017). A Neurotransmitter Atlas of the *Caenorhabditis elegans* Male Nervous System Reveals Sexually Dimorphic Neurotransmitter Usage. *The Genetics Society of America*; **206**: 3 1251-1269. [En ligne]. [Cité le 18 Juin 2018]. Disponible : <https://doi.org/10.1534/genetics.117.202127>
- 47) W. Li et al. (2003). *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes Dev*; **17**: 844-858.

- 48) C. Li (2005). The ever-expanding neuropeptide gene families in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology 131 Suppl.* S109–S127.
- 49) C. Li, K. Kim, L. S. Nelson (1999). FMRamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Res*; **848 (1-2)**: 26–34. [En ligne]. [Cité le 30 Juillet 2018] : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612695>
- 50) R. Maldonado (2010). The endogenous system and drug addiction. Author Manuscript; **68(1)**: 3-11. [En ligne]. [Cité le 18 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3444724/>
- 51) C. B. Pert, S. H. Snyder (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*; **179**: 1011–1014. Abstract Article
- 52) E. J. Simon, J. M. Hiller, I. Edelman (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA*. **70**: 1947–1949. Abstract Article
- 53) L. Terenius (1973). Characteristics of the “receptor” for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol*; **33**: 377–384. Abstract Article
- 54) C. J. Evans et al. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*; **258**: 1952–1955. Abstract Article
- 55) B. L. Kieffer et al. (1992). The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*; **89**: 12048–12052. Abstract Article
- 56) S. J. Husson et al. (2008). Comparison of *Caenorhabditis elegans* NLP peptides with arthropod neuropeptides. *Trends in Parasitology*; **25(4)**: 171-181. [En ligne]. [Cité le 18 Juin 2018]. Disponible : [https://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922\(09\)00044-0.pdf](https://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922(09)00044-0.pdf)
- 57) J. Kass et al. (2001). The EGL-3 Proprotein Convertase Regulates Mechanosensory Responses of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience* ; **21(23)**: 9265-9272. [En ligne]. [Cité le 22 Juin 2018]. Disponible : <http://www.jneurosci.org/content/21/23/9265.long>
- 58) C. Tija and J. M. Kaplan (2003). The EGL-21 Carboxypeptidase E Facilitates Acetylcholine Release at *Caenorhabditis elegans* Neuromuscular Junctions. *Journal of Neuroscience* ; **23(6)**: 2122-2130. [En ligne]. [Cité le 22 Juin 2018]. Disponible : <http://www.jneurosci.org/content/23/6/2122.long>

- 59) D. F. Lloyd (2013). Carboxypeptidase E « Third Edition ». [En ligne]. [Cité le 22 Juin 2018]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/carboxypeptidase-e>
- 60) G. Chapouthier (2010). Chapitre 2 – La douleur sous l’angle de l’évolution des espèces. CAIRN.INFO ; 43-50. [En ligne]. [Cité le 25 Juin 2018]. Disponible : https://www.cairn.info/article.php?ID_ARTICLE=QUAE_GUICH_2010_01_0006
- 61) C. I. Bargmann (2006). Chemosensation in *C. elegans*. [En ligne]. [Cité le 25 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19746/>
- 62) T. Sassa, T. Murayama, I. N. Maruyama (2013). Strongly alkaline pH avoidance mediated by ASH sensory neurons in *C. elegans*. *Neuroscience Letters* ; **555** : 248–252. [En ligne]. [Cité le 25 Juin 2018]. Disponible : https://ac.els-cdn.com/S0304394013005338/1-s2.0-S0304394013005338-main.pdf?_tid=4a795836-ff5c-49df-8fb0-75aa4737dc39&acdnat=1529959990_4d591d7a12740116e35c4fb7e494cb89
- 63) M. Chalfie et al. (2005). Assaying mecanosensation. [En ligne]. [Cité le 25 Juin 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK235860/>
- 64) A. Braithwaite and F. J. Smith (1985). Chromatographic Methods – 4ème éd. *Kluwer Academic Publishers*.
- 65) M. A. Baldwin and F. W. McLafferty (1973). Liquid chromatography mass spectrometry interface–I: The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer. *Organic Mass Spectrometry*; **7(9)** : 1111-1112.
- 66) A. Poletini (2006) Applications of LC-MS/MS in toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*; **31(1)** : 55-61
- 67) A. M. Evans, C. D. DeHaven, T. Barrett, M. Mitchell and E. Milgram (2009). Integrated non-targeted ultrahigh performance liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal. Chem.*; **81(16)** : 6656–6667.
- 68) S. Banerjee, S. Mazumdar (2012). Electrospray Ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*; Article ID 282574, 40 pages.
- 69) F. Pailleux and F. Beaudry (2012) Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*; **26(8)** : 881-891.

- 70) G. Mao, F. Qu, C. M. St. Croix, Y. Y. Tyurina, J. Planas-Iglesias, J. Jiang and A. Cheikhi, (2016). Mitochondrial redox opto-lipidomics reveals mono-oxygenated cardiolipins as pro-apoptotic death signals. *ACS Chemical Biology*; **11(2)** : 530-540.
- 71) B. H. Bao, A. Kang, Y. Zhao, Q. Shen, J. S. Li, L. D. Di, & J. X. Li (2017). A selective HPLC–MS/MS method for quantification of SND-117 in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*.
- 72) G. P. S. Jadaun, S. Dixit, V. Saklani, S. Mendiratta, R. Jain, and S. Singh (2017) HPLC for peptides and proteins: principles, methods and applications. *Pharmaceutical Methods* 8(1).
- 73) S. Kromidas (2017). The HPLC-Expert II: Optimizing the Benefits of HPLC/UHPLC. (Ed.). *John Wiley and Sons*.
- 74) D. Teixeira, C. Prudêncio and M. Vieira (2017). Development of a new HPLC-based method for 3-nitrotyrosine quantification in different biological matrices. *Journal of Chromatography B*, **1046**: 48-57.
- 75) P. Hemström and K. Irgum (2006). Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, **29(12)**: 1784-1821.
- 76) J. T. McCue (2009). Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods in enzymology*, **463**: 405-414.
- 77) S. Fekete, J. L. Veuthey, A. Beck and D. Guillarme (2016). Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **130**: 3-18.
- 78) E. Tyteca, J. L. Veuthey, G. Desmet, D. Guillarme and S. Fekete (2016). Computer assisted liquid chromatographic method development for the separation of therapeutic proteins. *Analyst*, **141(19)**: 5488-5501.
- 79) N. P. Manes, J. M. Mann and A. Nita-Lazar (2015). Selected reaction monitoring mass spectrometry for absolute protein quantification. *Journal of Visualized Experiments*, **102 (e52959)**: 1-15.
- 80) L. Moruz and L. Käll (2016). Peptide retention time prediction. *Mass Spectrometry Reviews*, **9999**: 1-9.
- 81) L. R. Snyder, J. Kirkland, L. Glach (1997). Practical HPLC Method Development. *Wiley, New York*, 439-478.

- 82) Z. J. Zhu, A. W. Schultz, J. Wang, C. H. Johnson, S. M. Yannone, G. J. Patti and G. Siuzdak (2013). Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nature protocols*, **8(3)**: 451-460.
- 83) R. Botter and G. Bouchoux (1995). Spectrométrie de masse. *Technique de l'ingénieur*, 2615 - 2641.
- 84) E. De Hoffmann and V. Stroobant (2007). Mass spectrometry: Principles and applications. *Chichester: John Wiley and Sons Ltd*.
- 85) W. H. Dunham, M. Mullin and A. C. Gingras (2012). Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies. *Proteomics*, **12(10)**: 1576-1590.
- 86) S. E. Ong, L. Foster, M. Mann (2003). Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, **29(2)**: 124-130.
- 87) V. Gautier, E. Mouton-Barbosa, D. Bouyssié, N. Delcourt, M. Beau, J. P. Girard, C. Cayrol, O. Burret-Schiltz, B. Monsarrat and A. G. Peredo (2012a). Label-free quantification and shotgun analysis of complex proteomes by one-dimensional SDS-PAGE/nanoLC-MS evaluation for the large scale analysis of inflammatory human endothelial cells. *Molecular and Cellular Proteomics*, **11(8)**: 527-539.
- 88) M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp (1989). Laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**: 760-762.
- 89) F. Rusconi, J. M. Schmitter, J. Rossier and M. le Maire (1998). Chromatographic separation and sample preparation in one step for MALDI mass spectrometric analysis of subpicomole amounts of heterogeneous protein samples. *Analytical Chemistry*, **70(14)**: 3046-3052.
- 90) J. B. Fenn M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry. **9(1)**: 37-70.
- 91) B. Baudin (2015). Spectrométrie de masse et protéomique clinique. *In Annales de Biologie Clinique*, **73(1)**: 39-48.
- 92) W. J. Griffiths and Y. Wang (2009). Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chemical Society Reviews.*, **38(7)**: 1882-1896.
- 93) R. Y. John (1998). Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*, **33**: 1-19.

- 94) R. D. Smith, J. A. Loo, C. J. Barinaga, C. D. Edmonds and H. R. Udseth (1989). Capillary zone electrophoresis and isotachopheresis—mass spectrometry of polypeptides and proteins based upon an electrospray ionization interface. *Journal of Chromatography A*, 480: 211-232.
- 95) R. Gottardo, F. Bortolotti, G. De Paoli, J. P. Pascali, I. Mikšík and F. Tagliaro (2007). Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1159(1), 185-189.
- 96) M. Yamashita and J. B. Fenn (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, **88(20)**: 4451-4459.
- 97) R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga and H. R. Udseth (1990). New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, **62(9)**: 882-899.
- 98) M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice (1968). Molecular beams of macro ions. *J. Chem. Phys.*, **49**: 2240-2247.
- 99) J. V. Iribarne and B. A. Thomson (1976). On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.*, **64**: 2287.
- 100) S. Soares, C. Franco, E. Pires, M. Ventosa, R. Plhinhas, K. Koci, A. M. de Almeida A. V. Coelho (2012). Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. *Journal of Proteomics*, **75**: 4190-4206.
- 101) M. C. Menet (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*, **437** : 41-53.
- 102) E. V. D. Van Loef, P. Dorenbos, C. W. E. Van Eijk, K. Krämer, H. U. and Güdel (2001). High-energy-resolution scintillator: Ce³⁺ activated LaBr₃. *Applied Physics Letters*, **79(10)**: 1573-1575.
- 103) B. Vatansever, S. L. Lahrchi, A. Thiocone, N. Salluce, M. Mathieu, E. Grouzmann, B. Rochat (2010). Comparison between a linear ion trap and a triple quadrupole MS in the sensitive detection of large peptides at femtomole amounts on column. *Journal of Separation Science*. **33**: 2478-2488.
- 104) F. Rusconi (2011). Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes. Lavoisier.
- 105) M. W. Senko, P. M. Remes, J. D. Canterbury, R. Mathur, Q. Song, S. M. Eliuk and H. Bui (2013). Novel parallelized quadrupole/linear ion trap / Orbitrap tribrid mass spectrometer

- improving proteome coverage and peptide identification rates. *Analytical Chemistry*, **85(24)**: 11710-11714.
- 106) R. Ouedraogo (2013). La spectrométrie de masse : application à l'étude des cellules immunitaires (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).
- 107) D. E. Austin, M. Wang, S. E. Tolley, J. D. Maas, A. R. Hawkins, A. Rockwood, H. Dennis Tolley D. Edgar E. D. Lee and M. L. Lee (2007). Halo ion trap mass spectrometer. *Analytical chemistry*, **79(7)**: 2927-2932.
- 108) J. W. Hager and J. C. Le Blanc (2003). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1020(1)**: 3-9.
- 109) H. J. Hübschmann (2015). Handbook of GC-MS: fundamentals and applications. *John Wiley and Sons*.
- 110) B. Pang, Y. Zhu, L. Lu, F. Gu and H. Chen (2016). The applications and features of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of traditional chinese medicine. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. **Vol 2016**, 7 pages.
- 111) R. Simon (2012). La quantification ciblée de protéines et peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : développements analytiques et applications (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
- 112) J. Allegrand (2012). Des génomes aux organismes. (Doctoral dissertation, Université d'Evry Val d'Essonne).
- 113) W. Paul and H. Steinwedel (1953). Einneues Mass enspektrometerohne Magnet feld. *RZeitschriftfür Naturforschung A.*, **8(7)**: 448-450.
- 114) R. E. March and J. F. Todd (2005). Quadrupole ion trap mass spectrometry. *John Wiley and Sons (Volume 165)*.
- 115) W. Lippert (2016). Further development and application of a mobile multiple-reflection time-of-flight mass spectrometer for analytical high-resolution tandem mass spectrometry. (Dissertation Maitrise, Physikalisches Institut Justus-Liebig-Universität at Gießen).
- 116) S. Gallien, E. Duriez, C. Crone, M. Kellmann, T. Moehring and B. Domon (2012). Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Molecular and Cellular Proteomics*, **11(12)**: 1709-1723.

- 117) R. A. Yost, C. G. Enke, D. C. McGilvery, D. Smith and J. D. Morrison (1979). High efficiency collision-induced dissociation in an RF-only quadrupole. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **30(2)**: 127-136.
- 118) G. Hopfgartner, E. Varesio, V. Tschäppät, C. Grivet, E. Bourgone and L. A. Leuthold (2004). Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry*, **39(8)**: 845-855.
- 119) J. Becker (2013). Étude et développement d'un spectromètre de masse et énergie : modélisation et optimisation de l'optique, réalisation du prototype. (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, France).
- 120) I. Andriamanana (2009). Analyse métabolomique : mise au point et validation d'une méthode d'analyse du métabolome plasmatique humain par UPLC-LTQ/Orbitrappe. (Doctoral dissertation, University Paris-Est Créteil, Créteil, France).
- 121) E. Denisov, E. Damoc, O. Lange and A. Makarov (2012). Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. *International Journal of Mass Spectrometry*, **325**: 80-85.
- 122) M. Saidi (2017). Etudes de la regulation de la tachykinine et son impact sur l'expression des peptides opioïdes à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance et la spectrométrie de masse. (Thèse de Doctorat, Université de Montréal – Faculté de Médecine Vétérinaire).
- 123) B. Ganem Y. T. Li and J. D. Henion (1991). Detection of non-covalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, **113**: 6294-9296.
- 124) N. R. Daly (1960). Scintillation type mass spectrometer ion detector. *Review of Scientific Instruments*, **31(3)**: 264-267.
- 125) McFadden, W. H. (1973) Techniques of GC/MS. Wiley-Interscience. New-York.
- 126) M. Plumel (2015). Optimisations des stratégies analytiques quantitatives en protéomique : application à l'étude des réponses adaptatives du métabolisme chez divers organismes (Doctoral dissertation, Strasbourg).
- 127) V. Buridon (2013). Application de la spectrométrie de masse COINTOF à l'étude de la dissociation de petits agrégats d'eau protonés par collision sur un atome d'argon. Développement d'une cible de nano-gouttes de gaz rare (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).

- 128) F. Beaudry, C. Ferland-Legault and P. Vachon (2009). Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, **23(9)**: 940-950.
- 129) M. Carson and S. Kerrigan (2017). Quantification of suvorexant in urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **1040**: 289-294.
- 130) J. C. Schwartz, A. P. Wade, C. G. Enke, G. R. Cooks (1990). Systematic delineation of scan modes in multidimensional mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **62**: 1809-1818.
- 131) J. J. Coon, B. Ueberheide, J. E. P. Syka, D. D. Dryhurst, J. Ausio, J. Shabanowitz, D. F. Hunt (2005). Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 9463–9468.
- 132) P. Chaimbault (2000). Analyse d'acides aminés non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- 133) J. Cao, C. Yin, Y. Qin, Z. Cheng and D. Chen (2014). Approach to the study of flavone di-C-glycosides by high performance liquid chromatography-tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in *Viola yedoensis*. *Journal of Mass Spectrometry*, **49(10)**: 1010-1024.
- 134) M. Sneha, M. T. Dulay and R. N. Zare (2016). Introducing mass spectrometry to first-year undergraduates: Analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper-spray mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry. Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**: 12807–12811.
- 135) J. S. Kang (2012). Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples. *Tandem Mass Spectrometry—Applications and Principles*, 441-492.
- 136) P. X. Wang, Y. H. Li, Y. J. Li, L. M. L. GengTing, G. Ding, Z. Z. Wang, W. Xiao (2014). Determination of protopine in rat brain tissues by RRLC-ESI/Q-TOF-MS Method. *Chinese Herbal Medicines*, **6(2)**: 125-130.
- 137) D. Bertaccini (2014). Advances in analytical methodologies for the characterization and quantification in proteomic analysis (Doctoral dissertation, Strasbourg).

- 138) G. Tsaprailis, A. Somogyi, E. N. Nikolaev, V. H. Wysocki (2000). Refining the model for selective cleavage at acidic residues in arginine-containing protonated peptides. *Int. J. Mass Spectrom.*, **95(196)**: 467-479.
- 139) P. Roepstorff and J. Fohlman (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.*, **11(11)**: 601.
- 140) K. Biemann (1990b). Appendix 5. nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods. Enzymol.* 193: 886–887.
- 141) C. Hunter and B. and Simons (2008). The Scheduled MRM™ Algorithm Enables Intelligent Use of Retention Time During Multiple Reaction Monitoring. *Technical Note. Biomarkers and OMIC*.
- 142) V. Lange, P. Picotti, B. Domon and R. Aebersold (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology*, **4(1)**: 222.
- 143) V. Vidova and Z. Spacil (2017). A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta*. In press.
- 144) L. N. Mueller, M. Y. Brusniak, D. R. Mani, R. Aebersold (2008). An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J. Proteome Res.*, **7**: 51-61.
- 145) C. Vogel and E. M. Marcotte (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, **13(4)**: 227-232.
- 146) J. C. Smith, J. P. Lambert, F. Elisma, D. Figeys (2007). Proteomics in 2005/2006: developments, applications and challenges. *Annual. Chem.*, **79**: 4325-4343.
- 147) H. Bohnenberger, P. Ströbel, S. Mohr, J. Corso, T. Berg, H. Urlaub, C. Lenz, H. Serve and T. Oellerich (2015). Spectrométrie de masse quantitative de profilage Protéomes Cancer-cellulaires dérivées de liquide et de tumeurs solides. *Journal of Visualized Experiments*. (**96**), e52435, DOI: doi:10.3791/52435.
- 148) H. Im, H. Shao, Y. I. Park, V. M. Peterson, C. M. Castro, R. Weissleder and H. Lee (2014). Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nature Biotechnology*, **32(5)**: 490-495.
- 149) D. Ayoub (2012). Vers une étude approfondie des protéomes : caractérisation des extrémités N-terminales des protéines (Doctoral dissertation, Strasbourg).

- 150) J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Lubner, I. Paron, N. Nagaraj and M. Mann (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular and Cellular Proteomics*, **13(9)**: 2513-2526.
- 151) T. Le Bihan, T. Goh, I. I. Stewart, A. M. Salter, Y. V. Bukhman, M. Dharsee, R. Ewing, J. R. Wisniewski (2006). Differential analysis of membrane proteins in mouse fore- and hindbrain using a label-free approach. *Journal of Proteome Research*, **5**: 2701-2710.
- 152) G. Fantuzzi and C. A. Dinarello (1996). The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *Journal of Leukocyte Biology*, **59(4)**: 489-493.
- 153) E. Ciccimaro, I. A. Blair (2010). Stable-isotope dilution LC-MS for quantitative biomarker analysis. *Bioanalysis*, **2**: 311-341.
- 154) X. Xu, H. Mei, S. Wang, Q. Zhou, G. Wang, L. Broske, A. Pena and W. A. Korfmacher (2005). A study of common discovery dosing formulation components and their potential for causing time-dependent matrix effects in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assays. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**: 2643-2650.
- 155) E. Stokvis, H. Rosing and J. H. Beijnen (2005). Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19(3)**: 401-407.
- 156) H. J. Finley-Jones, J. L. Molloy, J. A. and Holcombe (2008). Choosing internal standards based on a multivariate analysis approach with ICP (TOF) MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **23(9)**: 1214-1222.
- 157) L. E. Sojo, G. Lum and P. Chee (2003). Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS. *Analyst*, **128(1)**: 51-54.
- 158) L. Wu, M. R. Mashego, J. C. Van Dam, A. M. Proell, J. L. Vinke, C. Ras, W. A. Van Winden, W. M. Van Gulikand, J. J. Heijnen (2005). Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards. *Analytical Biochemistry*, **336(2)**: 164-171.
- 159) J. Schulte, M. C. Bohm and R. Ramirez (1998). The isotope effect in electronic expectation values: an all-quantum study of C₆H₆ and C₆D₆. *Molecular Physics*, **93(5)**: 801-807.

- 160) J. P. Godin and H. Schierbeek (2017). Mass spectrometry techniques for in vivo stable isotope approaches. *Mass Spectrometry and Stable Isotopes in Nutritional and Pediatric Research*.
- 161) T. G. Hall, D. McKearn, I. Smukste, K. R. Bresciano, R. E. Savage and Y. Wang (2012). Identifying and overcoming matrix effects in drug discovery and development. Intech Open Access Publisher.
- 162) B. C. Liang, X. L. Shi, C. W. Li, Z. Y. Shi, W. T. He, J. L. Yao, X. Y. Li (2016). Identification of human serum protein targets of Qianggu Decoction in primary type I osteoporosis based on tandem mass tag labeling and liquid chromatography-tandem mass spectrometry technology. *Chinese journal of Integrative Medicine*, 1-8.
- 163) H. Lee, J. Lee, K. Choi and B. Kim (2017). Development of isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the accurate determination of trans-and cis-vitamin K 1 isomers in infant formula. *Food Chemistry*, **221**: 729-736.
- 164) K. Zhang, M. R. Schaab, G. Southwood, E. R. Tor, L. S. Aston, W. Song and K. Tran (2017). A collaborative study: determination of mycotoxins in corn, peanut butter, and wheat flour using stable isotope dilution assay (SIDA) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65(33)**:7138-7152.
- 165) V. Gautier (2012b). Développement de méthodes quantitatives sans marquage pour l'étude protéomique des cellules endothéliales (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- 166) J. M. Pratt, D. M. Simpson, M. K. Doherty, J. Rivers, S. J. Gaskell and R. J. Beynon, (2006). Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat. Protoc.*, **1(2)**: 1029-1043.
- 167) V. Gautier, E. Mouton-Barbosa, D. Bouyssié, N. Delcourt, M. Beau, J. P. Girard, C. Cayrol, O. Burlet-Schiltz, B. Monsarrat and A. G. Peredo (2012a). Label-free quantification and shotgun analysis of complex proteomes by one-dimensional SDS-PAGE/nanoLC-MS evaluation for the large-scale analysis of inflammatory human endothelial cells. *Molecular and Cellular Proteomics*, **11(8)**: 527-539.
- 168) J. Breibeck, A. Serafin, A. Reichert, S. Maier, B. Küster and A. Skerra (2014). PAS-cal: A Generic Recombinant Peptide Calibration Standard for Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, **25(8)**: 1489-1497.

- 169) Laboratory of Dr. Paul Bower - Purdue University (2018). JoVE Science Education Database. *Analytical Chemistry*. Method of Standard Addition. JoVE, Cambridge. [En ligne]. [Cité le 08 Juillet 2018]. Disponible : <https://www.jove.com/science-education/10201/method-of-standard-addition>
- 170) R. Simon (2012). La quantification ciblée de protéines et peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : Développements analytiques et applications. Thèse de Doctorat de l'Université de Lyon, délivrée par l'université Claude Bernard Lyon1 – École Doctorale de Chimie.
- 171) J. F. Cooper, R. Van and M. Jeremy (2018). Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *Journal of Parkinson's Disease*, **8(1)**: 17-32. [En ligne]. [Cité le 28 juillet 2018]. Disponible : <https://content.iospress.com/articles/journal-of-parkinsons-disease/jpd171258>
- 172) L. Holden-Dye and R. J. Walker (2012). The roles of neuropeptides in *Caenorhabditis elegans* including their importance in the regulation of feeding and metabolism. *Protein and Peptide Letters*, **20(6)** : 636- 646. [En ligne]. [Cité le 30 juillet 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22630124>
- 173) L. E. Waggoner, L. A. Hardaker, S. Golik and W. R. Schafer (2000). Effect of neuropeptide gene on behavioral states in *Caenorhabditis elegans* egg-laying. *Genetics* **154**: 1181 – 1192.
- 174) C. M. Rogers, C. J. Franks, R. J. Walker, J. F. Burke and L. Holden-Dye (2001). Regulation of the pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, octopamine, and FMRFamide-like neuropeptides. *J. Neurobiol.*, **15**: 235 – 244.
- 175) Harakat, D. (2011). Études mécanistiques par ESI-MS de réactions palladocatalysées (Doctoral dissertation, Université de Reims).
- 176) J. J. Van Deemter, F. J. Zuiderweg and A. Klinkenberg (1956). Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci.* **5**: 271–289
- 177) T. Rosenbaum and S. A. Simon (2007). Chapter 5: TRPV1 Receptors and Signal Transduction. *CRC Press/Taylor & Francis*. [En ligne]. [Cité le 29 août 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5260/>
- 178) M. K. Chung, A. D. Guler and M. J. Caterina (2008). TRPV1 shows ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat. Neurosci.*, **11(5)** : 555 - 564. [En ligne]. [Cité le 29 août 2018]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391945>
- 179) T. Makoto and T. Tomoko (2005). Structure and function of TRPV1. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, **451(1)** : 143 – 150.

ANNEXES

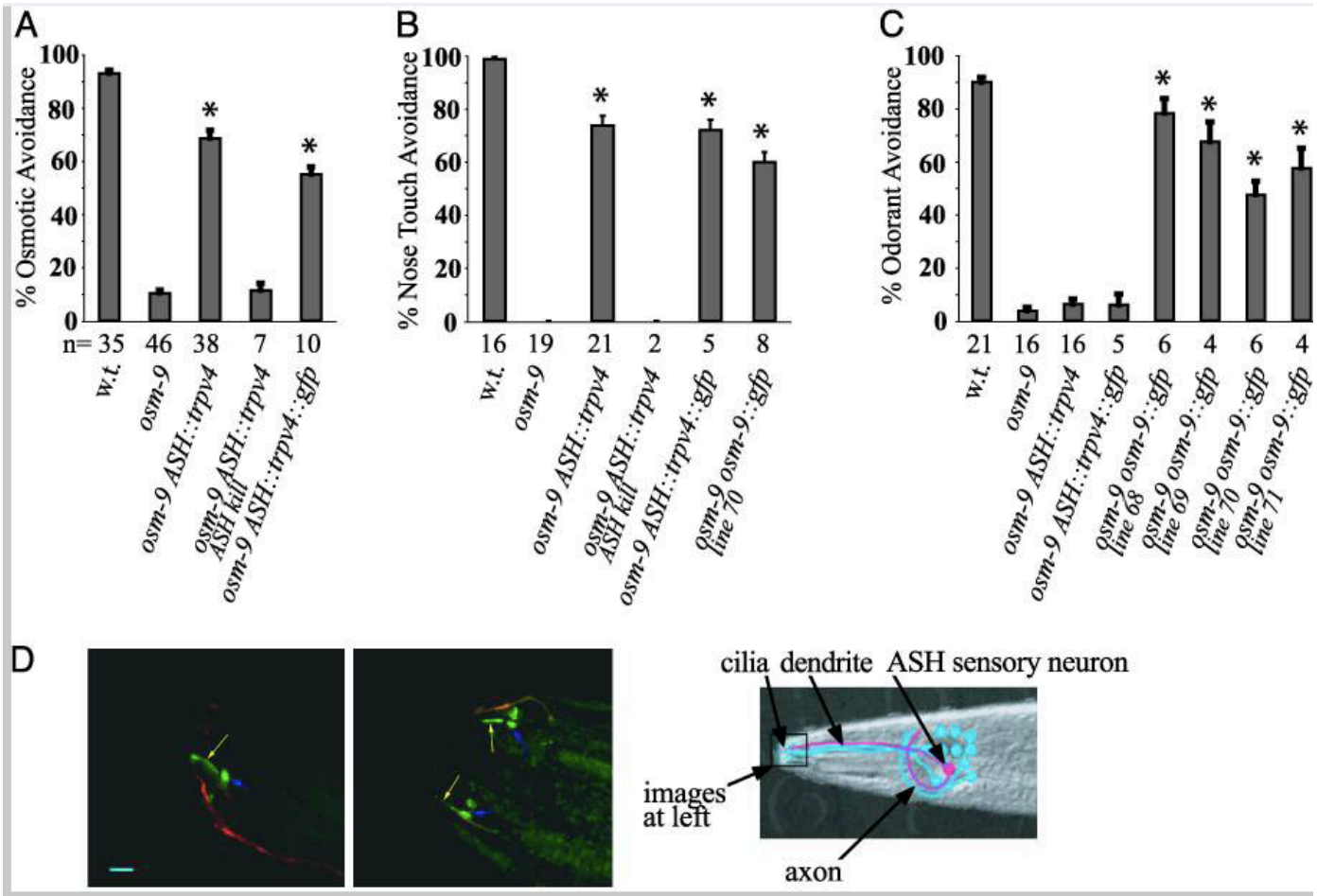


Figure 4 : L'expression de TRPV4 : Évitement osmotique et du toucher du nez chez les mutants *osm-9* de *C. elegans*

L'expression de TRPV4 dirige l'évitement osmotique et du toucher du nez chez les mutants *osm-9*. (A) évitement osmotique de 1 M fructose ou de glycérol. (B) évitement du toucher du nez. (C) Évitement de l'odorant 2-octanone. Des animaux de type sauvage (w.t.) et *osm-9* (ky10) avec ou sans transgène *ASH::trpv4*, un transgène *ASH::trpv4::gfp*, ou un transgène *osm-9::gfp5* ont été testés. "ASH kill" désigne l'ablation laser bilatérale du neurone ASH. Dans tous les panels, les astérisques indiquent des différences significatives entre le groupe indiqué et le groupe *osm-9* ($P < 0,01$, ANOVA unidirectionnel avec analyse post-test de Dunnett). Les barres d'erreur indiquent SEM. n = nombre d'animaux testés, 10 essais chacun. (D) expression de TRPV4::GFP dans les neurones nociceptifs ASH. (Gauche) Vue latérale. (Centre) Vue dorsale. TRPV4::GFP dans ASH apparaît en vert, et une protéine de fusion ODR-1::dsRED exprimée dans la dendrite et faiblement dans le cil du neurone sensoriel AWC adjacent apparaît en rouge. Flèche jaune, cils ASH; flèche bleue, base de dendrite. (Barre d'échelle = 5 μm). (Droite) Diagramme schématique du neurone sensoriel ASH *C. elegans* (rouge), 1 des 12 neurones sensoriels amphides (bleus) qui étendent les dendrites au nez, où ils se terminent par des cils sensoriels. Deux amphides contiennent chacun un neurone nociceptif polymorphe ASH; seul l'amphide gauche est montré. La zone représentée sur les micrographies fluorescentes est mise en surbrillance.

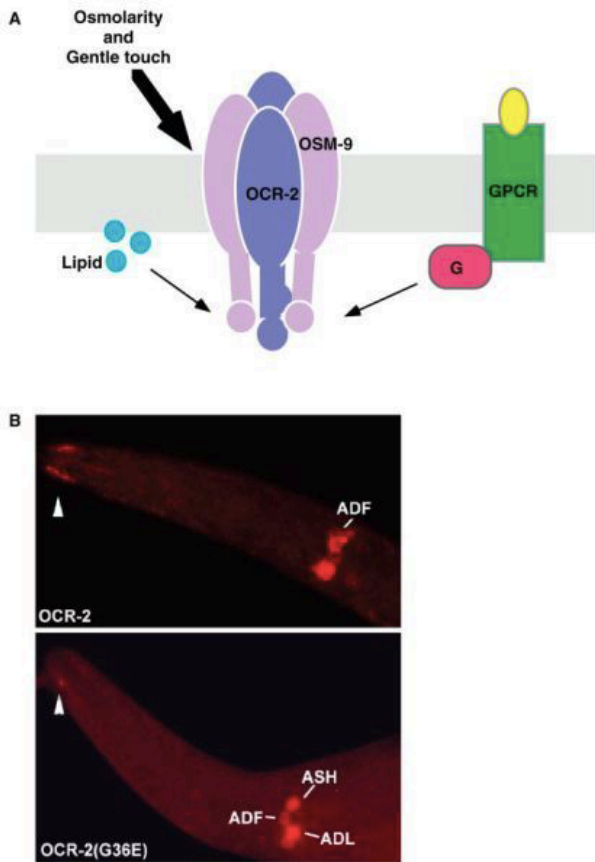


Figure 5 : Polymodalité et spécificité de OCR-2 / OSM-9 *in vivo* (Inspiré de Liedtke et al., 2003) [41].

Polymodalité et spécificité de OCR-2 / OSM-9 *in vivo*. (A) OCR-2 / OSM-9 dans différentes fonctions sensorielles sont réglementés par des mécanismes distincts. OCR-2 et OSM-9 forment probablement un canal hétéromérique et sont situés dans les cils sensoriels et la membrane plasmique de quatre classes de neurones chimiosensoriels dans les organes sensoriels amphidés. La région de la membrane est représentée en gris. Les domaines transmembranaires de OCR-2 et OSM-9 sont présentés comme des colonnes ovales, la barre rectangulaire représente les motifs d'ankyrine, et la structure de la bille représente la région N-terminale précédant les motifs d'ankyrine. La fonction OCR-2 / OSM-9 dans la sensation de diacétyle dépend du récepteur couplé à la protéine G ODR-10, de la protéine G ODR-3 et des signaux des acides gras polyinsaturés, mais n'est pas affectée par l'OCR-2 (G36E) mutation dans la balle. OCR-2 / OSM-9 sensation à l'osmolarité externe et au toucher doux au nez nécessite la protéine C ODR-3, les signaux des acides gras polyinsaturés, et les déterminants situés dans la région de la balle de l'OCR-2. La régulation à la hausse de l'expression de *tph-1* dans les neurones de l'ADF est régie par les déterminants situés dans la balle de l'OCR-2. Abréviations: G, protéine G hétérotrimérique; GPCR, récepteur couplé aux protéines G. (B) Photomicrographies des neurones chimiosensoriels sérotoninergiques ADF exprimant OCR-2. A la fois les protéines OCR-2 de type sauvage et OCR-2 (G36E) mutantes sont marquées sur l'épitope FLAG, et les vers transgéniques sont colorés avec un anticorps anti-FLAG. Notez que OCR-2 et OCR-2 (G36E) de type sauvage sont exprimés dans les cils (pointes de flèches) et les corps cellulaires.

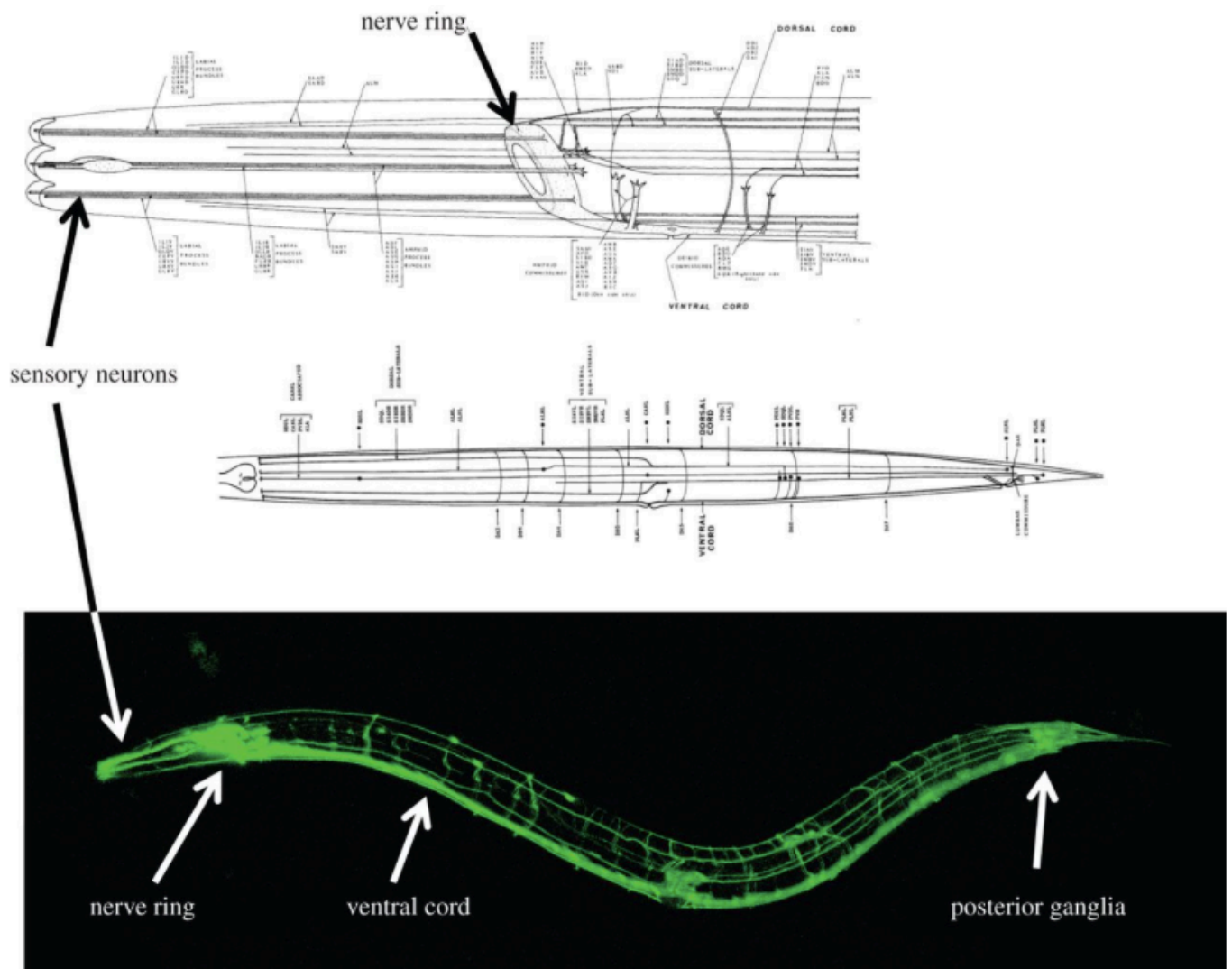


Figure 6 : Le système nerveux de *C. elegans*

Le système nerveux de *C. elegans*. En haut: les diagrammes de 'L'esprit d'un ver'. En bas: un ver exprimant la protéine fluorescente GFP dans tout son système nerveux. Le système nerveux hermaphrodite contient précisément 302 neurones, le mâle, 383 (46% de ses noyaux somatiques). L'anneau nerveux entourant le pharynx contient des circuits complexes régissant la plupart des aspects du comportement. C'est la chose la plus proche que le ver a à un «cerveau». La moelle nerveuse ventrale contient des motoneurones qui régissent la locomotion ondulatoire. De nombreux neurones sensoriels ont des terminaisons disposées autour de la bouche. Les neurones mâles supplémentaires sont principalement situés dans la queue où ils forment les circuits d'accouplement. (Photo de Hang Ung, laboratoire de Jean-Louis Bessereau, France, avec permission.)

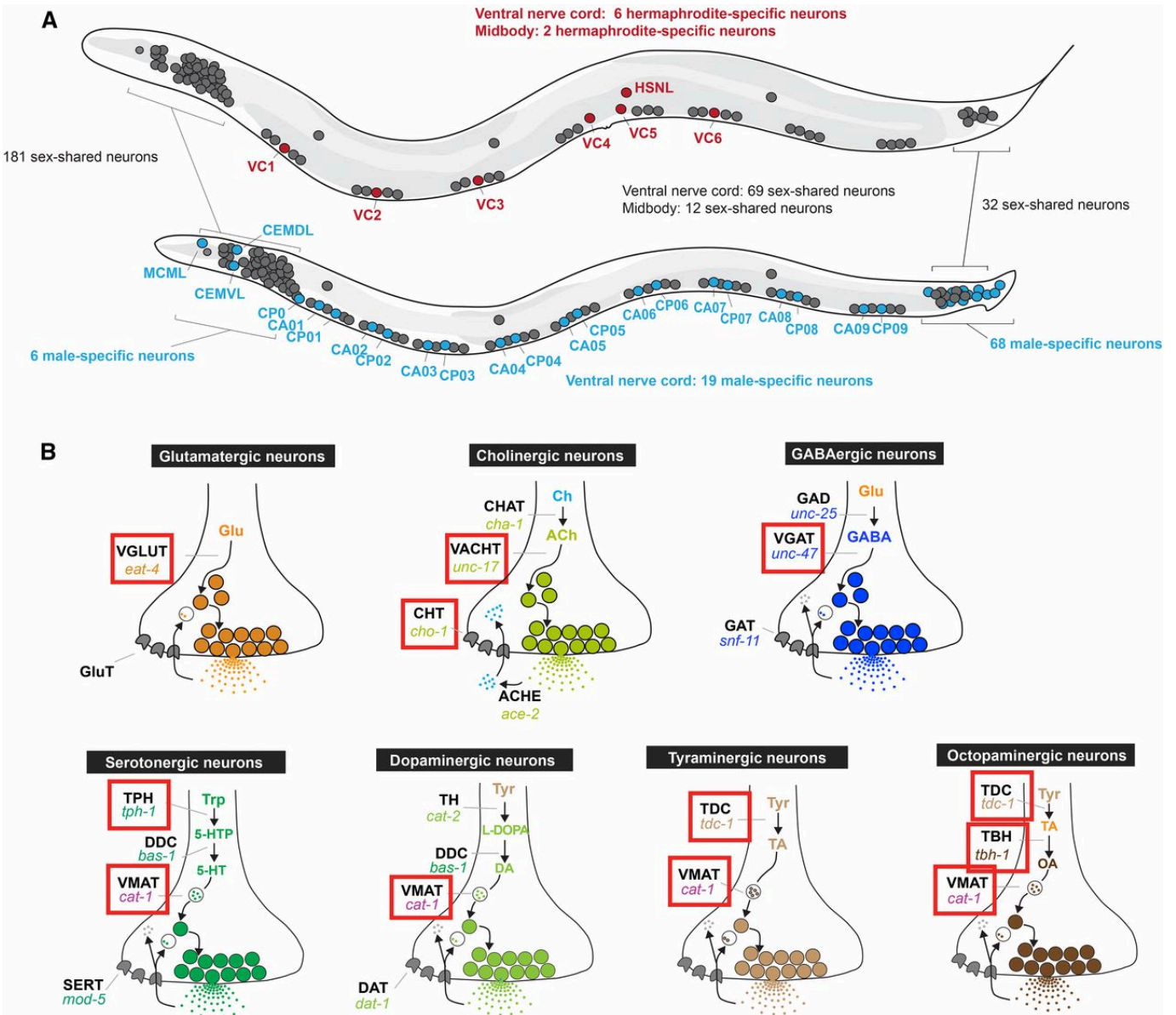


Figure 7 : Vue d'ensemble du système nerveux de *C. elegans* et du système neurotransmetteur

Vue d'ensemble du système nerveux de *C. elegans* et du système neurotransmetteur. (A) Vue d'ensemble du système nerveux masculin et hermaphrodite adulte. Les cercles gris indiquent des neurones partagés entre les deux sexes; les cercles rouges indiquent des neurones hermaphrodites spécifiques; les cercles bleus indiquent les neurones spécifiques aux mâles. (B) les gènes de la voie des neurotransmetteurs. Le modèle d'expression des reporters fluorescents à base de fosmides a été analysé dans le système nerveux masculin pour les gènes encadrés en rouge. VGLUT, transporteur de glutamate vésiculaire; VACHT, transporteur ACh vésiculaire; CHT, transporteur de choline; VGAT, transporteur vésiculaire de GABA; TPH, tryptophane hydroxylase; VMAT, transporteur de monoamine vésiculaire; TDC, tyrosine décarboxylase; TBH, tyramine hydroxylase.

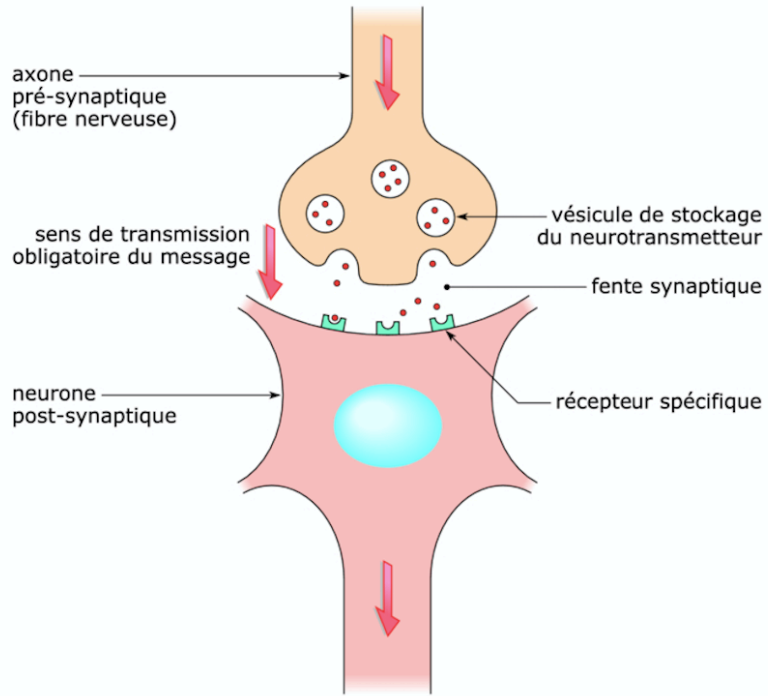


Figure 8 : Transmission de l'influx Nerveux [5]

Article publié et disponible en ligne : *Neurochemical Research*. 2018;
43(11):2121-2131. doi: 10.1007/s11064-018-2636-2

Deciphering the Role of EGL-3 for Neuropeptides Processing in *Caenorhabditis elegans* using High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry

Jennifer Ben Salem^{1,2}, Bruno Nkambeu¹, Dina N Arvanitis² and Francis Beaudry^{1*}

1- Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

2- Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR1048, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne 31062 Toulouse Cedex 9, France

*Corresponding author:

Francis Beaudry, Ph.D.
Associate Professor in Analytical Pharmacology
Département de Biomédecine Vétérinaire
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal
3200 Sicotte
Saint-Hyacinthe, QC
Canada J2S 2M2

Email: francis.beaudry@umontreal.ca

Keywords: Neuropeptides, Proprotein convertases, Proteolysis, *Caenorhabditis elegans*, Nociception, Mass spectrometry

Abstract

Neuropeptides are derived from large and inactive proteins which require endoproteolytic processing for the biosynthesis of the bioactive peptides. The maturation of pro-neuropeptide to neuropeptide is believed to be performed by ortholog pro-protein convertase EGL-3 in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Furthermore, ortholog of Cathepsin L, CPL-1 are found in *C. elegans* and can potentially cleave paired basic amino acids at the N-terminal suggesting the presence of both pathways. The objective of this study was to decipher the role of EGL-3 in the proteolysis of FLP or NLP neuropeptides using synthetic surrogate peptides based on a universal enzymatic cleavage pattern published by Schechter and Berger and used widely in enzymology. The results shown evidence that proteolysis controls FLP-21 and NLP-8 related neuropeptide levels in *C. elegans*. Surrogate peptides were degraded rapidly when exposed to *C. elegans* S9 fractions leading to the formation of specific peptide fragments related to EGL-3 and CPL-1 pathway. The results suggest that CPL-1 pathway does not compensate for the loss of the EGL-3 pathway. Proteolysis of Pro-neuropeptides associated to FLP-21 and NLP-8 in *elg-3* mutants are severely hampered leading to a lack of mature bioactive neuropeptides.

1. Introduction

Neuropeptides and many endogenous peptides are derived from large and inactive proteins which require endoproteolytic processing for the biosynthesis of the bioactive peptides. Protein convertases (PCs) are a family of enzymes catalyzing protein cleavage at paired basic residues including RR, KR, RK and KK [1,2]. Seven PCs were identified in mammalian tissues including PC1, PC2, PC4, PC5, PACE4, PC7 and furin; and, are officially recognized as proprotein convertase subtilisin/kexin type 1, 2, 4, 5, 6, 7 and furin respectively [3]. PCs and other secreted proproteins are packed in secretory vesicles as they leave the endoplasmic reticulum (ER). During the vesicle transport, active PCs can process proproteins within the vesicles [4]. Since PCs have overlapping functions, substrate specificity is determined by tissue and cellular distribution [5]. The rich expression of PC1 and PC2 in neuroendocrine cells confers a key role of these enzymes in the processing of several pro-neuropeptides and prohormones [6]. Bioactive neuropeptides usually result from the removal of N- or C-terminal residues, being commonly flanked by dibasic residues within the pro-neuropeptide sequence. PCs cleave at the C-terminal side and Cathepsin L at the N-terminal [6,7]. The removal of basic residues from the intermediates differs between C- and N-terminal processing. Carboxypeptidase, specifically carboxypeptidase E (CPE), removes basic residues from the C-terminal [8,9]. On the other hand, aminopeptidase is required for the removal of basic residues from the N-terminus depicted in Figure 1A and [6,10]. Even if the contribution of both pathways is controversial, it is suggested that the biosynthesis of most neuropeptides occurs by endoproteolytic cleavage on the C-terminal side [11,12]. As we have previously demonstrated, PC1 and PC2 are required for the processing of tachykinin precursor 1 (TAC1) leading to the formation of substance P [13] and neurokinin A [14]. We further showed that PC1 and PC2 are required for the biosynthesis and

regulation of dynorphin A, one of the major proteolytic fragments of prodynorphin (PDYN) and leu-enkephalin resulting in two major opioid neuropeptides [16].

Given the complexity of neuropeptide processing in mammals, *C. elegans* has proven to be an advantageous model for deciphering the intricacies of several molecular pathways [17,18, 32,33]. For example, *C.elegans* neuronal communication at the molecular level was recently explored and exploratory immunochemical analyses exposed the presence of numerous neuropeptides in *C.elegans* [16]. Additionally, a comprehensive analysis of the genome revealed several pro-neuropeptide genes, encoding a series of bioactive neuropeptides [17,18] and specific neuropeptide receptors [19] playing a fundamental role in synaptic transmission. It is deduced that neuropeptides are involved in the modulation of essentially all behaviors including locomotion, mechanosensation, thermosensation and chemosensation [20]. The presence of a variety of neuropeptides implies an essential role of neuropeptidergic signaling in *C. elegans* but the molecular pathways and networks are poorly described in the literature. Interestingly, *C. elegans egl-3* gene encodes a protein (i.e. EGL-3) with 57% sequence homology compared to mammalian PC2 [21,22]. ELG-3 is a serine endoprotease which cleaves proproteins at paired basic amino acids as shown in Figure 1A. EGL-3 appears to be an important enzyme involve in the maturation of pro-neuropeptides leading to the biosynthesis of active neuropeptides in *C.elegans* [22,23]. Moreover, *C. elegans egl-21* gene encodes a protein (i.e. EGL-21) that is an ortholog of the human CPE. EGL-21 is largely expressed in several *C. elegans* neuronal types [24]. EGL-21 has a similar function to CPE, it removes basic residues from the C-terminal. Additionally, ortholog of Cathepsin L (i.e. CPL-1) cleaving paired basic amino acids at the N-terminal are found in *C. elegans* suggesting the presence of both pathways. *C. elegans* aminopeptidase PAM-1 can remove basic residues from the N-terminal.

The contribution of both pathways is still under investigation. The attractiveness of *C. elegans* as an interesting model to investigate, particularly for nociception, lies in the fact that it consists of 959 cells including 302 neurons[25]. To identify the molecular elements, the processing of nociceptive neuropeptides we used *egl-3* mutant animals. We hypothesized that *egl-3* mutant animals will lack mature neuropeptides since the biosynthesis of the majority of neuropeptides appears to occur by endoproteolytic cleavage on the C-terminal side in higher species. The objective of this study was to decipher the role of EGL-3 (i.e. PC2 ortholog) in the proteolysis of FLP or NLP neuropeptides. We will be used synthetic surrogate peptides were used to demonstrate specific cleavage sites shown in Figure 1B and 1C along with S9 fractions produce from *C. elegans* homogenates. The strategy employed is based on a universal enzymatic cleavage pattern published by Schechter and Berger [26,27] and used widely in enzymology. **2.**

Materials and Methods

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA) or MilliporeSigma (St-Louis, MO, USA). For mass spectrometry analysis, formic acid, water (HPLC-MS Optima grade), acetonitrile (HPLC-MS Optima grade), trifluoroacetic acid (TFA), were used and purchased from Fisher Scientific.

2.2 *C. elegans* strains

The N2 (Bristol) isolate of *C. elegans* was used as a reference strain. Mutant strains used in this work included: *egl-3* (MT1541); *egl-3* (VC461). N2 (Bristol) and other strains were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota (Minneapolis, MN, USA). Strains were maintained and manipulated under standard conditions as described [Brenner, 1974; Margie et al., 2013]. Analyses were performed at temperature ranging from 22

to 25 °C unless otherwise noted.

2.3 *C. elegans* homogenization and S9 fraction

Strains were cultured in liquid media standard as described [28,29]. The liquid media was centrifuge at 1,000 g for 10 min and nematodes were collected and aliquot to a re-enforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 500 µm glass beads. A solution of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 was added at a ratio of 1:5 (w:v) and a Disruptor Genie was used at 2,800 rpm for 15 minutes. The homogenates were centrifuge at 9,000 g for 20 min. The total amount of protein in each supernatant was determined using the standard Coomassie protein assay (e.g. Bradford). This procedure was necessary in order to assure the same amount of protein was used for each experiment. Supernatant aliquots, designated as S9 fractions, were kept at -80 °C until usage. Each aliquot was submitted to only one cycle of freeze and thaw in order to assure maximum enzymatic activities.

2.4 Biodegradation study

Incubations were performed minimally in triplicate for each S9 fraction tested. The incubations were performed in a microcentrifuge tube containing 2 µM (i.e. 2000 pmol/mL) of FLP-21₄₃₋₆₆ or NLP-8₉₂₋₁₃₇, 0.25 mg/mL of S9 fraction proteins diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. S9 enzyme suspensions (total volume of 1 mL) were pre-incubated with 1mM CaCl₂ in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 5 min prior fortification with targeted surrogate neuropeptides. Immediately after fortification of the full-length peptide into the S9 fraction suspension, the sampling point for t=0 was taken, and the reaction was quenched after 5 minutes. One hundred microliters of sample were then mixed with 100 µL of an aqueous solution containing 1% TFA to stop the reaction. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 150 µL of the supernatant was transferred into an injection vial.

2.5 *C. elegans* homogenization and peptides extraction

The N2 (Bristol) isolate of *C. elegans* was used as a reference strain. Mutant strains used for the *in vivo* neuropeptide analyses work included: *egl-3* (MT1541); *egl-3* (VC461). Strains were cultured in liquid media standard as described [28,29]. The liquid media was centrifuge at 1,000 g for 10 min and nematodes were collected and aliquoted to a re-enforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 500 μ m glass beads. A solution of 0.1% TFA in water was added at a ratio of 1:5 (w:v; nematodes:0.1% TFA solution) and a Disruptor Genie was used at 2,800 rpm for 15 minutes. Nematodes were homogenized in a TFA solution to inhibit the enzymatic degradation of neuropeptides. The homogenates were centrifuge at 12,000 g for 10 min. The protein concentration for each homogenate was determined using a Bradford assay and all samples were normalized to avoid any bias. Two hundred microliters of sample were taken and mixed with 200 μ L of methanol containing 0.1% TFA to precipitate large and medium size proteins. The supernatant was dried using a Eppendorf vacuum concentrator and resuspend in 50 μ L of 5% ACN in water containing 0.1% formic acid and transferred into low volume HPLC vials.

2.6 Chromatographic conditions

The HPLC system was a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system (San Jose, CA, USA). Chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C18 100 \times 1 mm, with a particle size of 5 μ m. The column temperature was maintained to 30°C. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 2 minute, the ratio was maintained at 5:95. From 2 to 22 minute, a linear gradient was applied up to a ratio of 50:50 and maintained for 3 minutes. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 17 minutes for a total run time of

42 minutes. The first two minutes was diverted to waste and reverted to MS instrument for acquisition from 2 to 40 minutes. The flow rate was fixed at 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 2 μL of sample were injected.

2.7 Mass Spectrometry conditions

A Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. Auxiliary gases was heated to 200°C. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. The scan range was set to m/z 400-2000. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM using automatic gain control target of 3.0×10^6 and maximum ion injection time of 200 msec. Product ion spectra (MS^2) were acquired at a resolving power of 17,500 (FWHM), using automatic gain control target of 2.0×10^5 and maximum ion injection time of 50 msec. The normalized collision energy was set to 28 (HCD) and the isolation window was set to 2 Da. Targeted peptide quantification was performed at MS^1 level using specific precursor masses based on the monoisotopic masses. Peptide quantification was performed by extracting specific precursor ions using a 5 ppm mass window and a label free approach. The data were normalized based on the peak areas observed of the meant WT (N2) strain for relative quantification. Analyses were performed in triplicates. Instrument calibration was performed prior all analysis and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. Peptide sequence were verify based on typical a, b, c and x, y, z fragments observed at the MS^2 level [30].

2.8 Statistical analysis

Neuropeptides data were analyzed with a two-tailed Student-t test with significance set a priori to $p < 0.05$. WT (N2) was compared to *egl-3* (MT1541) and WT (N2) was compared to *egl-3* (VC461). The statistical analyses were performed using PRISM (version 7.0d).

3. Results and discussion

3.1 Neuropeptide fragment characterization by high-resolution mass spectrometry analysis

FLP-21₄₃₋₆₆ and NLP-8₉₂₋₁₃₇ were used as surrogate peptides to foster a better understanding of the degradation of the pro-neuropeptides containing sequence of mature neuropeptides in *C. elegans*. This strategy is based on a scheme well established in enzymology [13,26,27]. The comprehensive analysis of complex biological samples is a significant challenge in peptidomic research. Therefore, the MS resolution and mass accuracy is an important factor to improve the accuracy of peptides identification and assignment. The analyses of S9 fraction generated from *C. elegans* homogenates were performed using a hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer operating in MS at a resolution of 140,000 (FWHM) and in MS/MS at a resolution of 17,500 (FWHM). Based on specific cleavage point identified in Figure 1, we generated an *in silico* mass list and extract specific m/z (± 5 ppm) from the total ion current (TIC) chromatogram. Full-length peptides, FLP-21₄₃₋₆₆ and NLP-8₉₂₋₁₃₇ were incubated for 5 minutes in S9 fractions and following the reaction stoppage, supernatants were analyzed. The HRAM MS analysis reveals specifically the presence of several expected FLP-21₄₃₋₆₆ and NLP-8₉₂₋₁₃₇ fragments with mass accuracy within 2 ppm as shown in Table 1 and 2.

The total ion current (TIC) chromatogram following experiments with FLP-21₄₃₋₆₆ and specific extracted ion chromatogram (XIC) shown in Figure 2 reveal that many expected peptide

fragments were observed. Moreover, as illustrated in Table 1, mass accuracy observed was between -0.58 to 1.7 ppm for all detected peptide fragments. Interestingly, data clearly demonstrate that the FLP-21 mature neuropeptide (i.e. FLP-21₅₇₋₆₅) was generated from full-length FLP-21₄₃₋₆₆ in S9 fraction generated from *C. elegans* homogenates. The amidated form of FLP-21₅₇₋₆₅ was also observed but the ion intensity was low. Copper is the only metal that supports peptide amidation by Peptidylglycine α -amidating monooxygenase (PAM) in mammals [31]. The reaction media was not supplemented with copper which may explain low level of the amidated form of FLP-21₅₇₋₆₅ resulting from the degradation of the synthetic surrogate peptide FLP-21₄₃₋₆₆. Comparisons of the relative abundances for each peptide fragment detected after 5-minute incubation are shown in Figure 3. The most abundant peptide based on ion abundance was FLP-21₄₃₋₅₄ followed by FLP-21₅₇₋₆₆, FLP-21₅₅₋₆₆, FLP-21₅₆₋₆₆ and lastly FLP-21₅₇₋₆₅ (e.g. mature FLP-21 neuropeptide). Interestingly, these findings demonstrate that the FLP-21₄₃₋₆₆ surrogate peptide is cleaved at the C-terminal (i.e. EGL-3) and N-terminal (i.e. CPL-1) of the basic amino acid doublet (KR) generating FLP-21₅₅₋₆₆ and FLP-21₅₆₋₆₆ respectively. These results confirm that *in vitro*, both proteolytic pathway contribute to the degradation of FLP-21₄₃₋₆₆.

Figure 4 shows specific extracted ion chromatogram (XIC) following the incubation of NLP-8₉₂₋₁₃₇ in S9 fraction produced from *C. elegans* homogenates. Again, many expected peptide fragments were observed, including fragments from cleavage at C-terminal (i.e. EGL-3) and N-terminal (i.e. CPL-1) of basic amino acid doublets. A list of the most abundant peptide fragments is presented in Table 2. The observed mass accuracy observed was between -0.67 – 1.4 ppm for all detected peptide fragments. Figure 5 the comparison of the relative abundances for each peptide fragment detected after 5-minute incubation. Interestingly, the two most

abundant peptide based on ion abundance were NLP-8₉₂₋₉₉ and NLP₁₀₀₋₁₁₂. As shown in Figure 5B, these results may suggest that C-terminal by EGL-3 is favored. Other peptide fragment detected were in similar abundance. In mammals, it is well established that the subtilisin-like protease pathway implicates the proprotein convertases PC1 and PC2 cleaving at the C-terminal side of basic amino acid doublets resulted in peptide fragments with basic residue extensions located at the C-terminal that are removed by carboxypeptidase E [6,7]. Interestingly, EGL-3 proprotein convertase and EGL-21 carboxypeptidase orthologs appears to participate in a similar pathway for the biosynthesis of active neuropeptides. Moreover, the cysteine proteases cathepsin L (i.e. CPL-1) also functions as a processing enzyme for the production of neuropeptides. Cathepsin L cleave at the N-terminal of dibasic residue sites. In addition to cathepsin L, an aminopeptidase (i.e. pam-1) is required to remove N-terminal basic residues to generate bioactive neuropeptides. The results presented in this manuscript outline that both of these pathways play a role in the maturation of pro-neuropeptides to bioactive neuropeptides in *C. elegans* but the favored pathway is most likely structure dependent.

3.2 Relative quantification of mature neuropeptides in *egl-3* mutant strains

Endogenous neuropeptides were extracted from *C.elegans* and analyzed by MS. Specific XIC for FLP-21, NLP-8₁₀₀₋₁₁₂ and NLP-8₁₁₇₋₁₂₉ are presented in Figure 6a, 6b and 6c, respectively. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. All 3 mature neuropeptides were detected in WT (N2), *egl-3* (MT1541) and *egl-3* (VC461) animals. When comparing XIC's for WT (N2) and *egl-3* mutants, we detect a significant decrease in the quantity of mature neuropeptides in *egl-3* mutants. The peptide identity was confirmed using high-resolution MS² spectra and well establish fragmentation scheme [30]. as shown in Figure 6d, 6e and 6f, typical a, b, c and x, y, z positive ion fragments were observed. The observed

Higher-energy collisional dissociation (HCD) spectra were all compatible with the neuropeptide sequences.

The relative peptide quantification was based on a label free approach well described in the proteomic literature [34,35]. Peak areas based on MS¹ XIC's were compared between samples and relative peptide concentrations were determined based on the ratio of the mean area of the WT (N2) group. Technical triplicate precision assessment was performed, and all groups provided %CV < 10%. A significant difference in targeted neuropeptide concentration between WT(N2) and *elg-3* mutants was observed and presented in Figure 7. FLP-21₅₇₋₆₅, NLP-8₁₀₀₋₁₁₂ and NLP-8₁₁₇₋₁₂₉ peptide concentrations were significantly impaired in *elg-3* mutants. These results are coherent with the results generated with the synthetic surrogate FLP-21 and NLP-8 related peptides. We still can detect mature neuropeptides suggesting they are synthesized by the cysteine proteases cathepsin L (i.e. CPL-1) pathway. However, the results shows this pathway does not compensate for the loss of EGL-3. Furthermore, the in vivo results may suggest the CPL-1 pathway is less important compared with the EGL-3 proprotein convertase pathway. The results with *elg-3* mutants also indicate these nematodes will have hampered synaptic chemical communication, particularly with specific interneurons (i.e. RMG) leading to a deficit in nocifensive response [19]. In *C. elegans*, modulation in nocifensive behavior is intimately associated to specific altered activity during synaptic communication. The pharmacological manipulation of EGL-3 could be investigated as a strategy to modulate nociceptive behavior for a better understanding of the underlying molecular mechanisms governing nociceptive responses, and, can be used as a model to develop new pain therapeutic strategies.

4. Conclusion

We provide evidence that proteolysis controls FLP-21 and NLP-8 related neuropeptide levels in *C. elegans*. Surrogate peptides were degraded rapidly when exposed to *C. elegans* S9 fractions leading to the formation of specific peptide fragments related to EGL-3 and CPL-1 pathway. EGL-3 pro-protein convertase is an essential enzyme for the maturation of pro-neuropeptides to active neuropeptides in *C. elegans*. CPL-1 pathway does not compensate for the loss of the EGL-3 pathway. Proteolysis of Pro neuropeptides associated to FLP-21 and NLP-8 in *elg-3* mutants are severely hindered leading to a lack of mature bioactive neuropeptides. Pharmacological manipulations of pro-protein convertases could be an interesting strategy to alter sensitivity threshold in higher species.

5. Acknowledgements

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. RGPIN-2015-05071). The mass spectrometry analyses were performed using an infrastructure funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the *Fonds de Recherche du Québec (FRQ)*, Government of Quebec (F.Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706). A PhD scholarship was awarded to J. Ben Salam with a grant obtained from *Fondation de France* (DN Arvanitis grant no. RAF18002BBA)

References

- 1- Hook, V., Brennand, K. J., Kim, Y., Toneff, T., Funkelstein, L., Lee, K. C., ... & Gage, F. H. (2014). Human iPSC neurons display activity-dependent neurotransmitter secretion: Aberrant catecholamine levels in schizophrenia neurons. *Stem cell reports*, 3(4), 531-538.
- 2- Rouillé, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., ... & Steiner, D. F. (1995). Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Frontiers in neuroendocrinology*, 16(4), 322-361.
- 3- Seidah, N. G., Day, R., Marcinkiewicz, M., & Chretien, M. (1998). Precursor Convertases: An Evolutionary Ancient, Cell-Specific, Combinatorial Mechanism Yielding Diverse Bioactive Peptides and Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 839(1), 9-24.
- 4- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York. Garland Science.
- 5- Steiner, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S. and Chan, S.J. (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J. Biol. Chem.*, 267, 23435–23438.
- 6- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., & Hwang, S. R. (2008). Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, 393.
- 7- Hook, V. Y. (2006). Protease pathways in peptide neurotransmission and neurodegenerative diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 26(4-6), 447-467.
- 8- Seidah, N., & Prat, A. (2002). Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem*, 38, 79-94.
- 9- Scamuffa, N., Calvo, F., Chrétien, M., Seidah, N. G., & Khatib, A. M. (2006). Proprotein convertases: lessons from knockouts. *The FASEB Journal*, 20(12), 1954-1963.
- 10- Hwang, S. R., O'Neill, A., Bark, S., Foulon, T., & Hook, V. (2007). Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin-and NPY-containing chromaffin granules. *Journal of neurochemistry*, 100(5), 1340-1350.
- 11- Zhang, X., Pan, H., Peng, B., Steiner, D. F., Pintar, J. E., & Fricker, L. D. (2010). Neuropeptidomic analysis establishes a major role for prohormone convertase-2 in neuropeptide biosynthesis. *Journal of neurochemistry*, 112(5), 1168-1179
- 12- Minokadeh, A., Funkelstein, L., Toneff, T., Hwang, S. R., Beinfeld, M., Reinheckel, T., & Hook, V. (2010). Cathepsin L participates in dynorphin production in brain cortex, illustrated

by protease gene knockout and expression. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 43(1), 98-107.

13- Saidi, M., Kamali, S., Ruiz, A. O., & Beaudry, F. (2015). Tachykinins Processing is Significantly Impaired in PC1 and PC2 Mutant Mouse Spinal Cord S9 Fractions. *Neurochemical research*, 40(11), 2304-2316.

14- Salem, JB, Nkambeu, B & Beaudry, F. (2018). Characterization of neuropeptide K processing in rat spinal cord S9 fractions using high-resolution quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 32(6):e4204.

15- Orduna Ruiz, A & Beaudry, F (2016), Characterization of Endoproteolytic Processing of Dynorphins by Proprotein Convertases using Mouse Spinal Cord S9 Fractions and Mass Spectrometry, *Neuropeptides*, 57:85-94

16- Mills, H., Wragg, R., Haplak, V., Castelletto, M., Zahratka, J., Harris, G., Summers, P., Korchnak, A., Law, W., Bamber, B., Komuniecki, R., 2012. Monoamines and neuropeptides interact to inhibit aversive behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 31(3), 667–678.

17- Li, C., (2005). The ever-expanding neuropeptide gene families in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* 131, Suppl:S109–127.

18- Hu, Z., Pym E.C.G., Babu. K., Vashlishan-Murray A.B., and Kaplan J.M., (2011). A neuropeptide-mediated stretch response links muscle contraction to changes in neurotransmitter release. *Neuron* 71, 92–102.

19- Glauser, D.A., Chen, W.C., Agin, R., MacInnis, B., Hellman, A.B., Garrity, P.A., Man-WahTan, and Goodman, M.B., (2011). Heat avoidance is regulated by Transient Receptor Potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics Society of America*, 188 : 91-103.

20- Komuniecki, R., Harris, G., Haplak, V., (2012). Monoamines activate neuropeptide signaling cascades to modulate nociception in *C. elegans*: a useful model for the modulation of chronic pain? *InvertebrateNeuroscience* 12, 53-61.

21- Kass, J., Jacob, T.C., Kim, P., Kaplan J.M., 2001. The EGL-3 pro-protein convertase regulates mechanosensory responses of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 21(23), 9265-9672.

22- Choi, S., Chatzigeorgiou, M., Taylor, K.P., Schafer, W.R., and Kaplan, J.M., (2013). Analysis of NPR-1 Reveals a Circuit Mechanism for Behavioral Quiescence in *C. elegans*. *Neuron* 78(5), 869–880.

23- Husson, SJ, Clynen, E, Baggerman, G, Janssen, T & Schoofs, L.(2006) Defective processing of neuropeptide precursors in *Caenorhabditis elegans* lacking proprotein convertase

- 2 (KPC-2/EGL-3): mutant analysis by mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*. 98(6):1999-2012.
- 24- Husson, SJ, Janssen, T, Baggerman, G, Bogert, B, Kahn-Kirby, AH, Ashrafi, K & Schoofs L. (2007). Impaired processing of FLP and NLP peptides in carboxypeptidase E (EGL-21)-deficient *Caenorhabditis elegans* as analyzed by mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*. 102(1):246-260.
- 25- Wittenburg, N., and Baumeister, R., (1999). Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: An approach to the study of nociception. *PNAS* 96(18), 10477-10482.
- 26- Schechter, I & Berger, A (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 27(2):157-162.
- 27- Schechter, I & Berger, A (1968). On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 32(5):898-902
- 28- Brenner, S., (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- 29- Margie, O., Palmer, C., Chin-Sang, I., (2013). *C. elegans* Chemotaxis Assay. *J. Vis. Exp.* 74, 1-6.
- 30- Roepstorff, P., & Fohlman, J., (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 11(11), 601.
- 31- Bousquet-Moore, D, Mains, RE & Eipper, BA (2010). PAM and Copper – a Gene/Nutrient Interaction Critical to Nervous System Function. *J Neurosci Res*. 88(12): 2535–2545.
- 32- Metaxakis A, Petratou D & Tavernarakis N. (2018). Multimodal sensory processing in *Caenorhabditis elegans*. *Open Biol*. 8(6)
- 33- Ma L, Zhao Y, Chen Y, Cheng B, Peng A & Huang K. (2018). *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases. *Eur J Pharmacol*. 819:169-180
- 34- Blein-Nicolas, M., and Zivy, M., 2016. Thousand and one ways to quantify and compare protein abundances in label-free bottom-up proteomics. *Biochim. Biophys. Acta*. 1864(8), 883-895.
- 35- Neilson, K.A., Ali, N.A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., Van Sluyter, S.C., Haynes, P.A., 2011. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11, 535-553.

Table 1. Principal peptide fragments observed following the incubation of FLP-21₄₃₋₆₆ surrogate peptide in *C. elegans* S9 fractions.

Peptide	Sequence	Charge state z	Theoretical mass	Observed mass	Relative error (ppm)
FLP-21 ₄₃₋₆₆	VYYVAEDDHGSMKRGLGP RPLRFG	+5	544.8803	544.8812	1.65
FLP-21 ₄₃₋₅₄	VYYVAEDDHGSM	+2	693.2875	693.2871	-0.58
FLP-21 ₅₇₋₆₆	GLGPRPLRFG	+2	535.3169	535.3168	-0.19
FLP-21 ₅₇₋₆₅	GLGPRPLRF	+2	506.8062	506.8064	0.40
	GLGPRPLRF(NH ₂)	+2	506.3142	506.3145	0.59
FLP-21 ₅₅₋₆₆	KRGLGPRPLRFG	+2	677.4149	677.4148	-0.15
FLP-21 ₅₆₋₆₆	RGLGPRPLRFG	+2	613.3675	613.3673	-0.33

Table 2. Principal peptide fragments observed following the incubation of NLP-8₉₂₋₁₃₇ surrogate peptide in *C. elegans* S9 fractions.

Peptide	Sequence	Charge state z	Theoretical mass	Observed mass	Relative error (ppm)
NLP-8 ₉₂₋₁₃₇	FMSVPTKKAFDRMDNSDF	+9	591.9641	591.9649	1.35
	FGAKRKRSFDRMGGTEFG	+8	665.8337	665.8338	0.15
	LMKRSAPESR	+7	760.8089	760.8086	-0.39
NLP-8 ₉₂₋₁₁₂	FMSVPTKKAFDRMDNSDF	+4	603.5344	603.5342	-0.33
	FGA				
NLP-8 ₉₂₋₉₉	FMSVPTKK	+2	469.2624	469.2624	0.0
NLP-8 ₉₂₋₉₇	FMSVPT	+1	681.3276	681.3273	-0.44
NLP-8 ₉₈₋₁₁₂	KKAFDRMDNSDFFGA	+3	583.6069	583.6067	-0.34
NLP-8 ₁₀₀₋₁₁₄	AFDRMDNSDFFGAKR	+3	592.9423	592.9420	-0.51
NLP-8 ₁₀₀₋₁₁₂	AFDRMDNSDFFGA	+2	746.8117	746.8112	-0.67
NLP-8 ₁₁₅₋₁₂₉	KRSFDRMGGTEFGLM	+3	577.9484	577.9482	-0.35
NLP-8 ₁₁₇₋₁₃₁	SFDRMGGTEFGLMKR	+3	577.9484	577.9481	-0.52
NLP-8 ₁₁₇₋₁₂₉	SFDRMGGTEFGLM	+2	724.3209	724.3206	-0.41

List of Figure

Figure 1. Neuropeptide processing by proprotein convertases (EGL-3) and carboxypeptidase E (EGL-21). Most proneuropeptides have several paired basic amino acid cleavage sites and based on the sequence, various processing intermediates can be derived leading to mature neuropeptide. A) Generalize protease pathways for proneuropeptide processing in *C. elegans* (adapted from Hook *et al.*, 2008). B) FLP-21 processing by proprotein convertases EGL-3 leading to active FLP-21 neuropeptide. C) NLP-8 processing by proprotein convertases EGL-3 and carboxypeptidase E EGL-21 leading to several actives neuropeptides. Identification of surrogate peptides used for further *in vitro* exploration was based on subsite nomenclature adopted from a scheme developed by Schechter and Berger [1967, 1968] and used to describe of enzyme specificities.

Figure 2. Specific extracted-ion chromatograms (XIC) for the most abundant fragment peptides following the incubation of FLP-21₄₃₋₆₆ in *C.elegans* S9 fractions. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of time 0 (red) and time 5 min (black) revealed the apparition of specific peptide fragments.

Figure 3. Relative abundance of FLP-21 related neuropeptides. A) Overlay MS¹ XIC's suggest protease activity from *egl-3* and *cpl-1* leading to the formation of FLP-21₅₅₋₆₆ and FLP-21₅₇₋₆₆. B) Both pathways were involved in the degradation of FLP-21₄₃₋₆₆

Figure 4. Specific extracted-ion chromatograms (XIC) for the most abundant fragment peptides following the incubation of NLP-8₉₂₋₁₃₇ in *C.elegans* S9 fractions. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of time 0 (red) and time 5 min (black) revealed the apparition of specific peptide fragments.

Figure 5. Relative abundance of NLP-8 related neuropeptides. A) Overlay MS¹ XIC's suggest protease activity from *egl-3* and *cpl-1* leading to the formation of NLP-8₉₈₋₁₁₂, NLP-8₁₁₅₋₁₂₉ and NLP-8₁₀₀₋₁₁₂, NLP-8₁₁₇₋₁₂₉. B) These resultats support that both pathways were involved in the degradation of NLP-8₉₂₋₁₃₇

Figure 6. Specific extracted-ion chromatograms (XIC) for FLP-21, NLP-8₁₀₀₋₁₁₂ and NLP-8₁₁₇₋₁₂₉ obtained following the analysis of extracted peptide from *C. elegans* homogenates. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of WT (N2) (black) and *egl-3* (red and blue) revealed a significant decrease in mature neuropeptides. High-Resolution MS² Spectra were used to confirm peptide identity.

Figure 7. Relative concentration of FLP-21, NLP-8₁₀₀₋₁₁₂ and NLP₁₁₇₋₁₂₉. Peak areas were compared based on MS¹ XIC's. The concentration of mature neuropeptides is severally impeded in both *egl-3* mutants.

Figure 1.

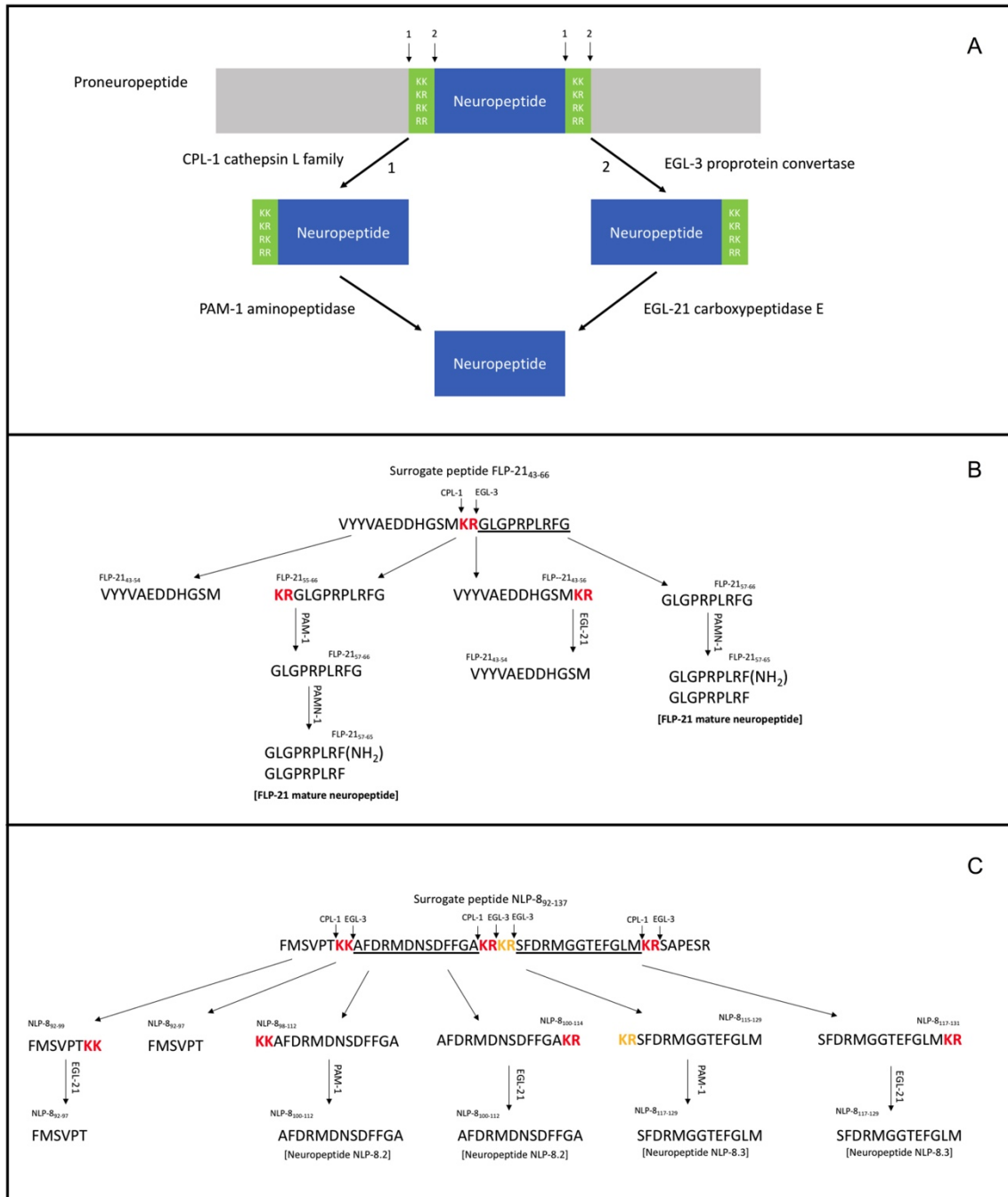


Figure 2.

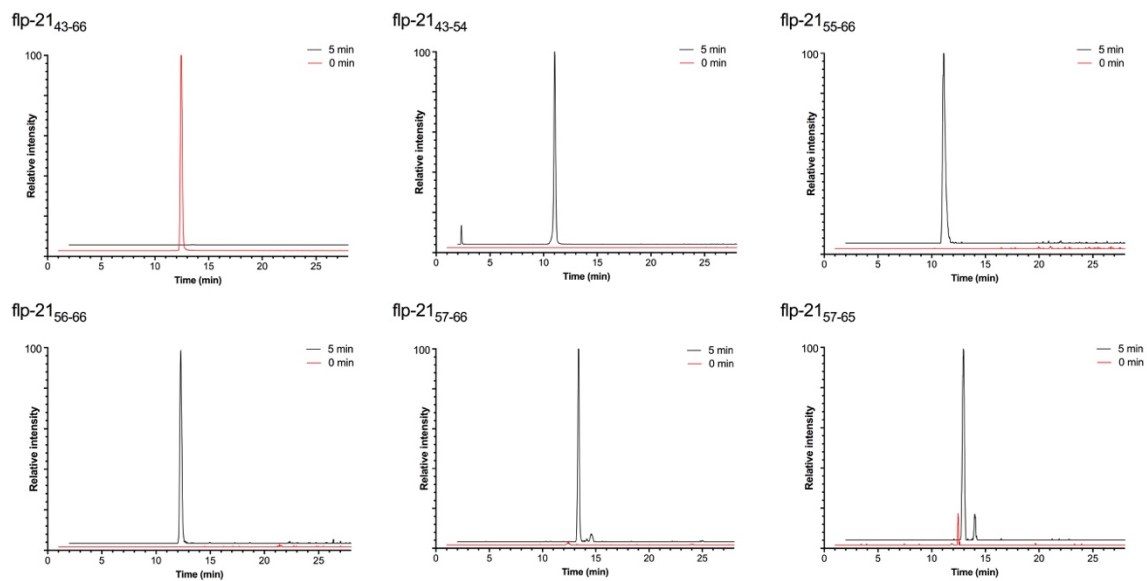


Figure 4.

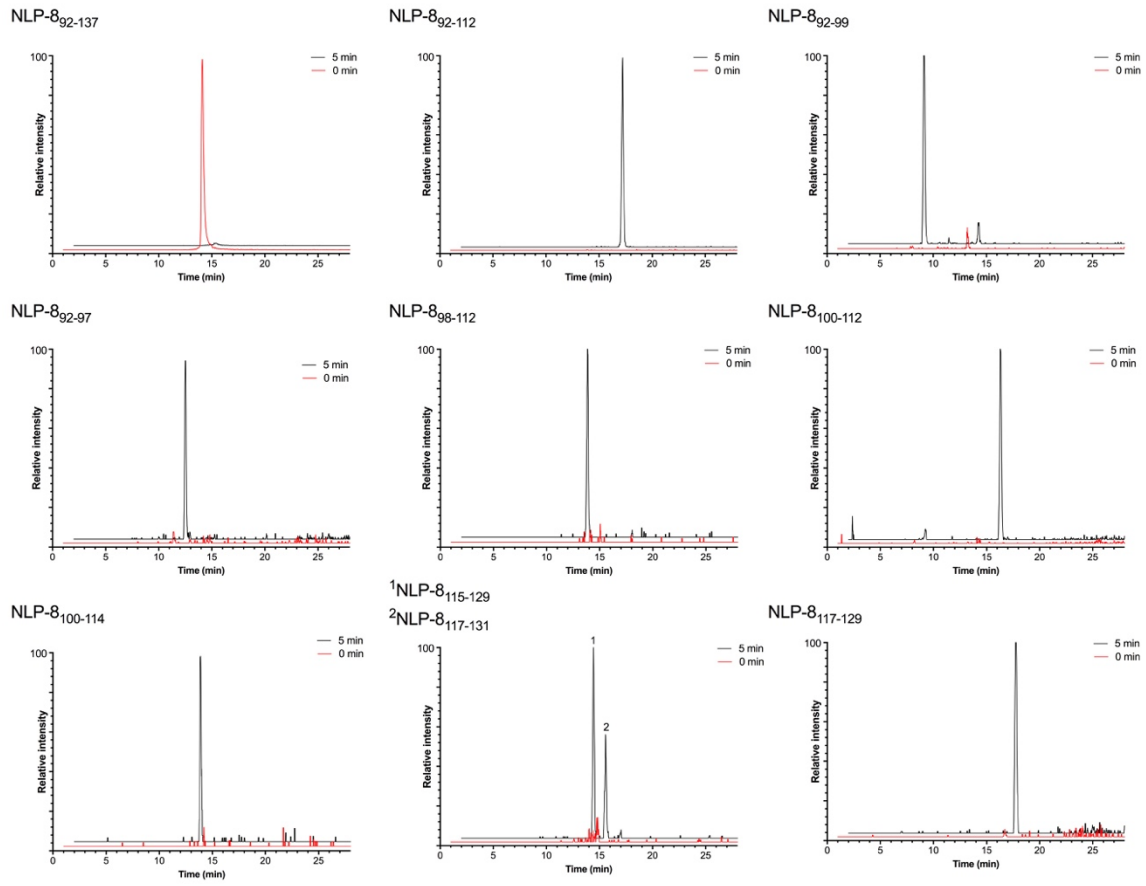
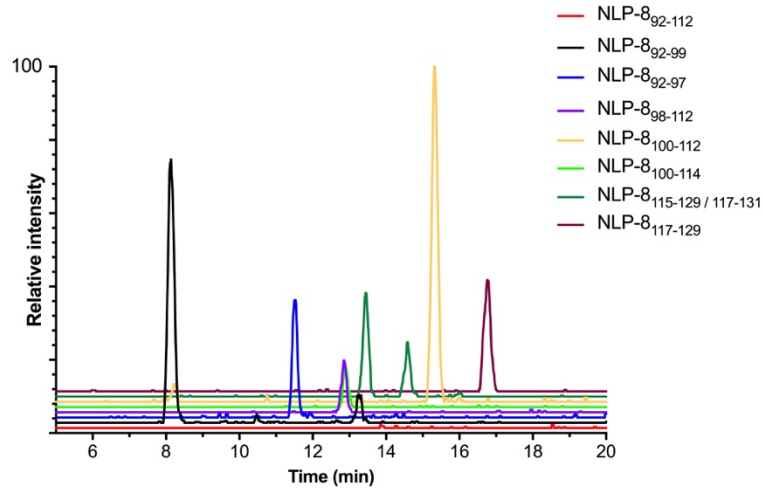


Figure 5.

A



B

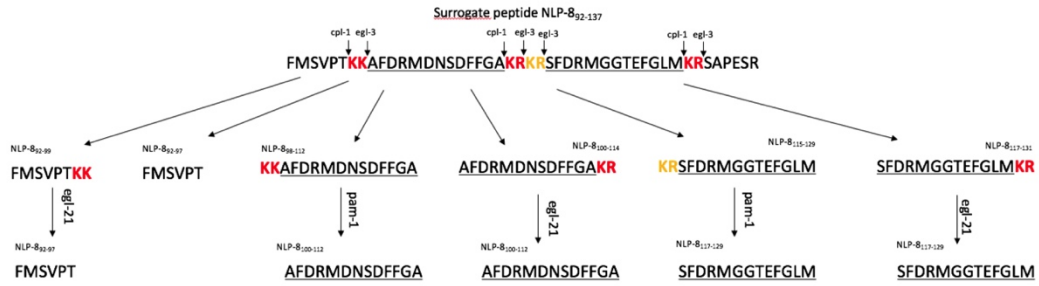


Figure 6.

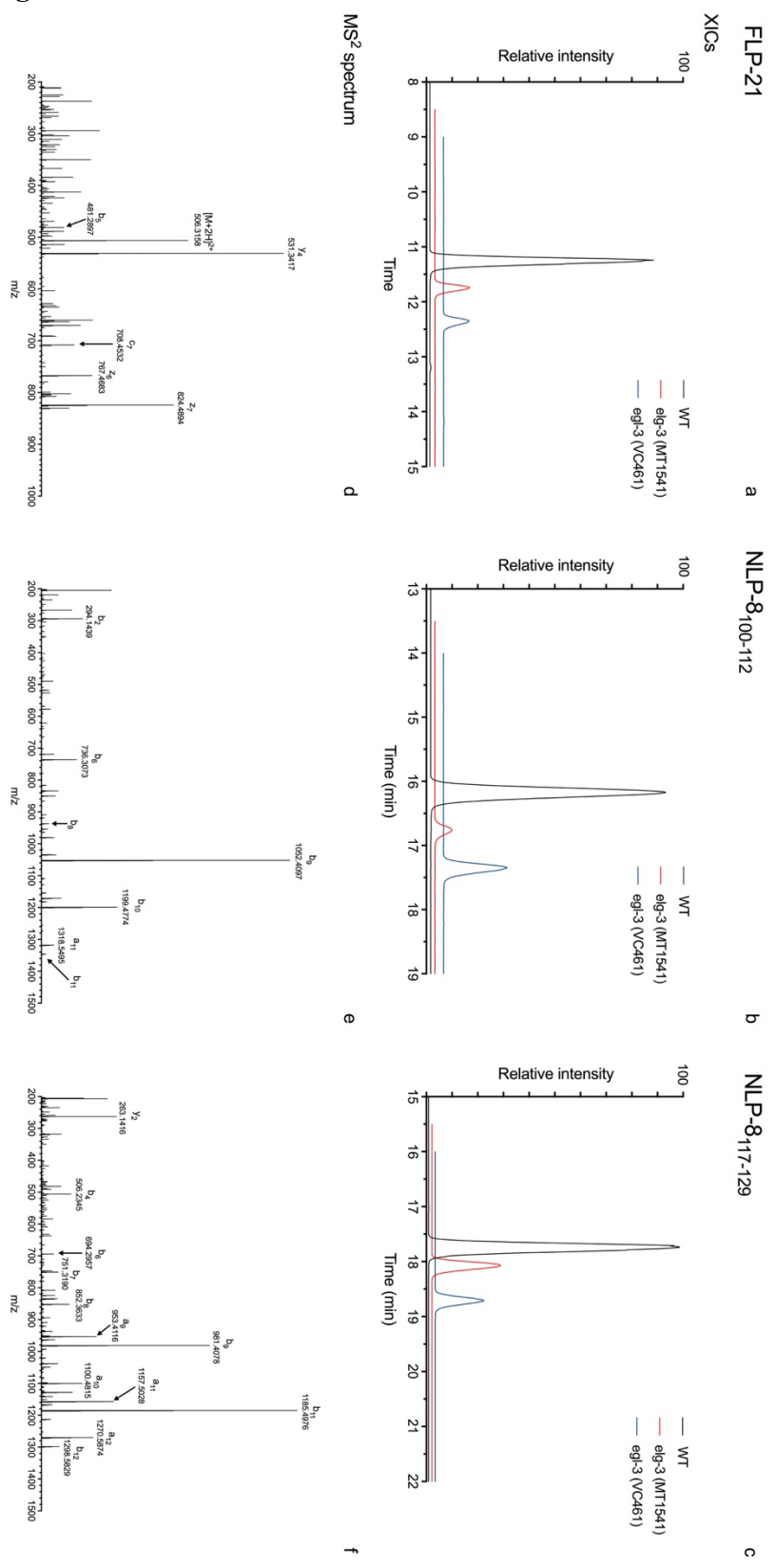
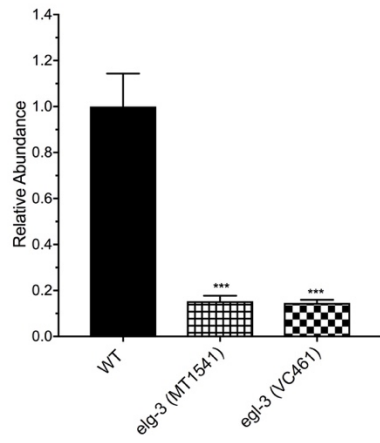
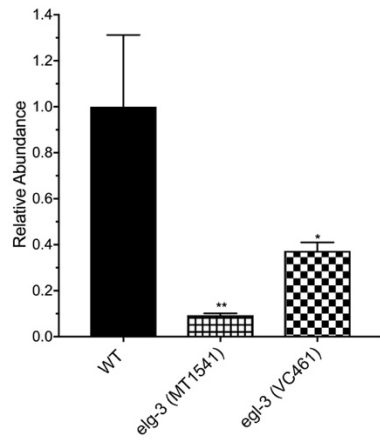


Figure 7.

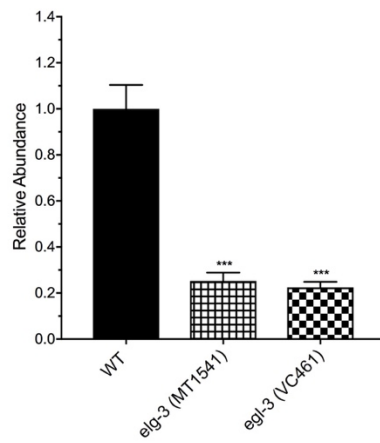
FLP-21



NLP-8₁₀₀₋₁₁₂



NLP-8₁₁₇₋₁₂₉



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$