

50376
1989
133

50376
1989
133

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

par

SANAE KADRI - GUISSI



**EXPRESSION DE GENES SPECIFIANT DES PRECURSEURS
DE NEUROPEPTIDES, CHEZ UN VER MARIN,
NEREIS DIVERSICOLOR**

soutenu le 7 juillet 1989 devant la Commission d'Examen

Président :	M. PORCHET
Rapporteurs :	M. BALL
	M. VAN MINNEN
Examineurs :	M. CURGY
	M. PIERCE

A LA MEMOIRE DE MA SOEUR SOUAD

A MES PARENTS

A MON EPOUX HAMID ET A MA FILLE SOFIA

A MES FRERES ET A MES SOEURS

A MA BELLE FAMILLE

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Jacques Curgy qui a dirigé mon travail sans discontinuer. En m'accordant toute sa confiance, il m'a permis, dans les moments de découragement, de surmonter les difficultés. C'est grâce à lui que j'ai appris véritablement à connaître tout l'enrichissement que l'on peut trouver dans le travail de recherche. Qu'il trouve ici, l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Maurice Porchet, directeur du laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés (U.A. 148) m'a fait le grand honneur de m'accueillir dans son laboratoire et de présider mon jury de thèse ; qu'il veuille trouver ici, l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également à Messieurs les Professeurs S. Ball, J. Van Minnen et R. Pierce qui ont bien voulu me faire l'honneur de juger mon travail.

Merci Philippe Bulet, tu m'as accordé, toujours dans la gaité, d'enrichissantes discussions. Il serait illusoire d'énumérer ici les multiples services et conseils que tu m'as dispensés avec serviabilité. Pour tout cela, accepte toute mon amitié et mes sincères remerciements.

Il m'est très agréable de te remercier, Muriel Vennin, toi qui m'a fait connaître la "vie d'un laboratoire". Tu as su m'initier à des techniques nouvelles, avec patience et complaisance. Tu as été l'amie de tous les jours. Je te dois beaucoup. J'espère que tu trouveras dans ces quelques mots, l'expression de ma plus amicale reconnaissance.

Je remercie Madame le Professeur Nicole Dhainaut-Courtois et Mademoiselle Maryse Masson qui m'ont aidé dans la réalisation et l'interprétation des travaux immunocytochimiques.

L'injection des ARNm dans les ovocytes de X. laevis a été réalisée par Monsieur Franck Fournier du laboratoire de Physiologie animale, SN4, USTL. Je lui présente mes sincères remerciements.

L'avancement de mes travaux doit beaucoup à l'aide précieuse qui m'a été apportée par le Professeur J. Rehfeld, le Professeur M.C. Beinfeld, le Professeur G. Tramu et A. Delaire-Hesdin qui ont eu l'amabilité de me fournir les anticorps. Qu'ils acceptent tous mes remerciements.

Valérie Deconinck, tu as assuré la dactylographie de ce mémoire avec bonne humeur. La qualité de ton travail est inestimable. Accepte donc, mes très vifs remerciements.

Monsieur D. Lazareki et Madame Auger ont mené à bien les reproductions photographiques. A vous deux, je suis très reconnaissante.

Enfin, que tous les autres membres du laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés (UA 148) trouvent ici mes remerciements. Chacun a eu l'occasion de m'assurer de son amitié en m'assistant à une quelconque période.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
MATERIELS ET TECHNIQUES.....	16
I - MATERIEL BIOLOGIQUE.....	16
II - DISSECTION ET ISOLEMENT DU PROSTOMIUM ET DU CERVEAU DES ANIMAUX.....	16
1 - Dissection du prostomium.....	16
2 - Dissection du cerveau.....	17
III - EXTRACTION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES (ARN) DES PROSTOMIUMS OU DES CERVEAUX.....	17
1 - Précautions opératoires.....	17
2 - Technique d'extraction.....	18
IV - PURIFICATION DES ARN.....	19
1 - Traitement des échantillons par le chlorure de lithium.....	19
2 - Passage des échantillons sur une colonne d'oligo-dT cellulose.....	19
a - Appareillage.....	20
b - Traitement de l'appareillage.....	20
c - Préparation du gel d'oligo dT cellulose...	20
d - Préparation de la colonne.....	21
e - Préparation des ARN totaux.....	21
f - Recyclage de l'échantillon et élution des ARNm poly(A)+.....	21
V - ELECTROPHORESE DES ARNm EN GEL D'AGAROSE- METHYLMERCURE.....	22
VI - TRADUCTION <u>IN VITRO</u> DES ARNm.....	23
1 - Traduction des ARNm en lysat de réticulocytes de lapin.....	23
a - Protocole opératoire.....	24

<u>b</u> - Evaluation du pouvoir de traduction d'un lysat de réticulocytes de lapin par mesure de la radioactivité incorporée dans les protéines synthétisées <u>de novo</u>	25
2 - Traduction des ARNm en extrait de germes de blé.....	26
<u>a</u> - Détermination de la concentration optimale en ion K ⁺ nécessaire à une traduction optimale des ARNm dans un extrait de germes de blé.....	27
<u>b</u> - Détermination de la concentration optimale en ARNm permettant l'obtention d'un maximum de synthèse <u>in vitro</u> de protéines.....	30
<u>c</u> - Traduction des ARNm de cerveaux dans le système acellulaire de germes de blé.....	33
VII - TRADUCTION DES ARNm DANS LES OVOCYTES DE <u>XENOPUS LAEVIS</u>	33
VIII - EXTRACTION DES PROTEINES SYNTHETISEES <u>IN OVO</u>	34
IX - ANALYSES DES PRODUITS TRADUITS.....	35
1 - Techniques électrophorétiques.....	35
<u>a</u> - Electrophorèse mono-dimensionnelle des polypeptides en milieu dénaturant SDS.....	35
<u>b</u> - Electrophorèse mono-dimensionnelle des peptides.....	38
2 - Techniques immunologiques.....	40
<u>a</u> - Immunoprécipitation.....	40
<u>b</u> - Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose : technique dite de "Western blot" ou d'immunotransfert.....	42
<u>c</u> - Test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay).....	43
X - TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHIMIQUE REALISEE SUR DES <u>PROSTOMIUMS DE NEREIS DIVERSICOLOR</u>	44
<u>a</u> - Préparation des tissus.....	45
<u>b</u> - Réactions immunohistochimiques.....	45

XI - ELABORATION D'UNE BANQUE D'EXPRESSION A PARTIR	
DES ARNm DE CERVEAUX DE <u>NEREIS DIVERSICOLOR</u>	46
1 - Préparation des ARNm poly(A)+.....	47
2 - Synthèse du 1er brin d'ADN complémentaire	
(ADNc).....	47
3 - Synthèse du 2ème brin d'ADNc.....	48
4 - Extraction de l'ADNc double brin.....	49
5 - Méthylation des sites Eco R1 d'ADNc.....	49
6 - Addition des attaches contenant des sites de	
restriction Eco R1 (attaches dites "linkers	
Eco R1") à l'ADNc méthylé.....	51
7 - Hydrolyse des "linkers" au niveau des sites	
Eco R1.....	51
8 - Purification des molécules d'ADNc sur colonne	
de chromatographie.....	52
9 - Ligation de l'ADNc au "bras du vecteur"	
gt 11.....	52
10 - Empaquetage <u>in vitro</u> de l'ADN phagique	
recombiné <u>in vitro</u>	54
<u>a</u> - Empaquetage dans le système "Amersham"....	54
<u>b</u> - Empaquetage dans le système "Gigapack"....	54
11 - Titrage de la banque d'ADNc.....	55
<u>a</u> - Obtention de bactéries compétentes.....	55
<u>b</u> - Préparation de la gélose dite "molle"	
pour le titrage de la banque.....	55
<u>c</u> - Détermination du titre de la banque.....	56
12 - Amplification de la banque d'expression.....	56
13 - Détection des protéines de fusion d'intérêt	
ou "screening" de la banque d'ADNc.....	57
<u>a</u> - Epuisement des anticorps utilisés pour le	
"screening" de la banque.....	57
<u>b</u> - Préparation des filtres de nitrocellulose	
imprégnés d'IPTG, utilisés pour le trans-	
fert des protéines de fusion.....	59
<u>c</u> - Criblage ou "screening" de la banque.....	59

RESULTATS.....	62
I - LES ARNm EXTRAITS DU CERVEAU DE <u>NEREIS DIVERSI-</u> <u>COLOR</u> : CARACTERISTIQUES ET CAPACITE INFORMA- TIVE.....	62
A - Analyse des ARNm.....	62
B - Comparaison des produits traduits en lysat de réticulocytes de lapin à partir des ANRm extraits de cerveaux de <u>Nereis diversicolor</u> ...	62
C - Etude quantitative des polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin.....	64
1 - Evaluation quantitative globale du pou- voir informatif des ARNm déterminée par le décompte de la radioactivité contenue dans les protéines nouvellement synthé- tisées.....	67
2 - Détermination qualitative et/ou quantita- tive du pouvoir informatif des ARNm par l'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS, des poly- peptides traduits <u>in vitro</u>	68
a - Autoradiogramme des électrophorèses...	68
b - Enregistrement densitométriques des autoradiogrammes.....	69
II - CARACTERISATION DE CERTAINS PRODUITS TRADUITS A PARTIR DES ARNm EXTRAITS DE PROSTOMIUMS DE <u>NEREIS DIVERSICOLOR</u>	72
<u>II - A</u> Polypeptides apparentés à la procholecys- tokinine (proCCK) et à la prodynorphine (prodyn) de Mammifères.....	72
A - Caractérisation de produits traduits <u>in vitro</u>	72
1 - Traduction en lysat de réticulocytes de lapin.....	72
a - Décompte de la radioactivité.....	72

b - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS des peptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin.....	73
c - Enregistrements densitométriques des autoradiogrammes.....	73
d - Immunoprécipitation des produits traduits en lysat de réticulocytes de lapin.....	73
- Mise en évidence d'un polypeptide apparenté à la proCCK humaine.....	76
- Mise en évidence d'un polypeptide apparenté à la prodyn de Mammifères.....	76
2 - Traduction en extrait de germes de blé ("wheat germ extract").....	78
a - Décompte de la radioactivité.....	78
b - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS des produits traduits en extrait de germes de blé.....	80
c - Enregistrements densitométriques des autoradiogrammes.....	80
d - Immunoprécipitation des produits traduits en extrait de germes de blé.....	83
- Mise en évidence d'un polypeptide apparenté à la proCCK humaine.....	83
- Mise en évidence d'un polypeptide apparenté à la prodyn de Mammifères.....	85
B - Traduction dans les ovocytes de <u>Xenopus laevis</u>	85
1 - Analyse des produits totaux traduits <u>in ovo</u>	87

a - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée.....	87
b - Enregistrements densitométriques des autoradiogrammes.....	87
<u>2</u> - Caractérisation de certains produits traduits <u>in ovo</u>	89
a - Polypeptides apparentés à la pro-CCK humaine.....	89
- Immunoprécipitation des produits traduits <u>in ovo</u>	89
- Immunotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, technique dite de "Western blot".....	91
b - Polypeptides apparentés à la pro-dyn de Mammifères.....	93
- Immunoprécipitation des produits traduits <u>in ovo</u>	93
- Immunotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, technique dite de "Western blot".....	95
- Immunotransfert à partir d'un gel de polyacrylamide-urée.....	98
- Immunotransfert à partir d'un gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS.....	100
- Test ELISA.....	102
<u>II - B</u> Polypeptides reconnus par les anticorps élaborés contre une fraction biochimiquement extraite du cerveau de <u>Nereis virens</u> , fraction contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse.....	102
1 - Test ELISA.....	104
2 - Technique de l'immunotransfert dite de "Western blot".....	104

III - ETUDE MORPHOFONCTIONNELLE.....	107
IV - RESULTATS CONCERNANT LA BANQUE D'EXPRESSION ELABOREE DANS LE VECTEUR GT 11.....	112
a - Mesures de la quantité d'ADNc synthétisée.....	112
b - Titre de la banque.....	112
- Empaquetage dans le système "Gigapack".....	113
- Empaquetage dans le système "Amersham".....	113
c - Caractérisation de protéines de fusion.....	114
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	115
BIBLIOGRAPHIE.....	127

INTRODUCTION

Les Néréidiens (Annélides, Polychètes) constituent un modèle biologique relativement simple qui conduit à une meilleure compréhension des mécanismes de l'endocrinologie générale. Ainsi, depuis de nombreuses années, le cerveau de certains Annélides Polychètes a suscité de nombreux travaux. L'obtention constante de résultats importants a été autorisée par les progrès des techniques en biologie animale, biologie cellulaire et aujourd'hui biologie moléculaire.

Les travaux de Durchon (1948, 1949, 1952) sont l'oeuvre d'un pionnier, et à leur suite ceux de son école font autorité dans le thème de l'endocrinologie des Néréidiens. Très tôt, l'expérimentation a mis en évidence l'existence d'une hormone de nature neurosécrétrice. Depuis ces premiers travaux, aucune donnée expérimentale n'a pu démontrer l'existence d'une seconde activité endocrine. En conséquence, Golding (1965, 1967) propose la conception devenue classique du "principe endocrine cérébral unique". Bien que cette hormone semble unique, elle se caractérise par des effets multiples. D'une part, chez les espèces présentant naturellement une épitoquie, cette hormone inhibe dans les deux sexes les transformations morphologiques et anatomiques. Elle empêche ainsi les animaux d'évoluer en ce qu'il est convenu d'appeler l'état "hétéronéréis" (Durchon, 1984). Les profondes transformations somatiques liées à cet état sont les préludes de la reproduction. Elles sont corrélées à la maturation des gamètes dont le développement est contrôlé par la même neurohormone. Cette dernière exerce une inhibition sur la maturation génitale mâle et sur la maturation génitale femelle (Durchon, 1965). D'autre part, cette hormone stimule certains métabolismes cellulaires, notamment ceux qui sont liés à la morphogenèse régénératrice (Boilly et Boilly-Marer, 1972, Boilly 1974). D'après les travaux d'Hauenschild (1956) et de Boilly-Marer (1962), cette hormone n'est pas spécifique de l'espèce.

L'activité endocrine du cerveau n'est pas constante au cours de la vie de l'animal. Le dosage biologique de l'hormone cérébrale, à partir de cultures organotypiques, a permis de confirmer l'existence d'une décroissance de l'activité endocrine du cerveau sur la période allant de la sexualisation à la reproduction des animaux de toutes les espèces considérées (Porchet 1970 ; Durchon et Porchet, 1971). La réduction progressive de l'activité endocrine cérébrale est la conséquence de l'action de différents facteurs au niveau du cerveau. Des conditions externes interviennent manifestement sur le contrôle de l'activité neurosécrétoire des ganglions cérébroïdes et semblent induire le déclenchement et le synchronisme des phases de la reproduction et de l'essaimage. Par exemple, il a été démontré que la photopériode a une influence sur le fonctionnement hormonal du cerveau (Hauenschild, 1959 ; Golding, 1967 ; Clark, 1969). La température semble également jouer un rôle dans cette régulation (Durchon et Porchet, 1971). Le conditionnement interne semble être lié à une lente décroissance de la production hormonale. Ainsi, il a été montré que les ovocytes produisent une "substance chimique capable d'inactiver la production endocrine du cerveau" (Porchet et Durchon, 1968 ; Porchet et Cardon, 1976). Plus la cellule germinale évolue vers la maturité, plus son pouvoir inhibiteur de l'activité hormonale du cerveau croît. Il s'établit donc en permanence, un équilibre entre l'activité cérébrale et l'activité génitale et toute modification de l'une de ces activités entraîne nécessairement une évolution de l'autre, jusqu'à la mise en place d'un nouvel équilibre (Porchet, 1974). Une substance ayant une action rétroactive appelée "feed-back" permettrait d'expliquer le synchronisme entre production endocrine et ovogenèse (Porchet et Cardon, 1976). L'action de la 20-hydroxy-ecdysone semble mimer celle de la substance "feed-

-back" sur les cerveaux de Néréidiens (Porchet et al., 1984) et ce résultat est à rapprocher de celui de Gaillet (1985) qui a identifié un composé très proche de ce stéroïde dans le liquide coelomique des animaux.

Chez les Polychètes, les méthodes expérimentales employées par les auteurs précédents pour étudier les neurosécrétions n'ont pas permis la détection du site exact de la synthèse des facteurs neuroendocrines (Dhainaut et al., 1979 a et b). En revanche, l'utilisation en microscopie photonique et en microscopie électronique des méthodes morphofonctionnelles et l'emploi d'anticorps dirigés contre des peptides de Vertébrés comme marqueurs ont permis de dresser une cartographie du système nerveux central et de la glande infracérébrale de Nereis diversicolor.

L'école de Durchon a pu ainsi démontrer, dans le système nerveux central des Néréidiens, l'existence de neurotransmetteurs maintenant classiques (acétylcholine, monoamines biogènes, GABA) ainsi que celle de nombreux neuropeptides (leucine-, méthionine-enképhalines, α -, β -endorphines, Δ -néo-endorphine, dynorphine 1-17, somatostatine, GRF (growth hormone releasing factor), CRF (corticotropin releasing factor), vasopressine, ocytocine, β -MSH (β melanocyte stimulating hormone), cholecystokinine/gastrine, substance P, VIP (vasoactive intestinal peptide), insuline, angiotensine et FMRF-amide) (Dhainaut-Courtois et al., 1985 a, 1986 ; Dhainaut-Courtois et Golding, 1988 ; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988). Différents peptides semblent parfois coexister dans un seul neurone, par exemple les molécules apparentées suivantes : CCK/gastrine et GRF, CCK/gastrine et CRF, CCK/gastrine et 5HT (5 hydroxy-tryptamine) (Dhainaut-Courtois et al., 1985 a et b).

Jusqu'à présent, le rôle exact des substances détectées apparentées à leur homologues de Vertébrés n'a pas été éta-

bli. Mais il a été proposé que chez les Néréidiens, ces peptides interviennent comme neurotransmetteurs et/ou neuromodulateurs dans la régulation des sécrétions de l'aire neurohémale ; ces fonctions évoquent celles attribuées aux opioïdes des Mammifères (Kuhn et Saltiel, 1986). Cette proposition est confortée par les résultats de Golding et May (1982) qui révèlent une exocytose de granules de sécrétion dans le neuropile des Polychètes. Par ailleurs, il n'est pas exclu que certains peptides opioïdes jouent un rôle dans la physiologie de la reproduction, puisque des immunoréactions mettant en oeuvre des anticorps anti-leucine-enképhaline ou anti-dynorphine 1-17, ont été observées respectivement dans les ovocytes et les spermatogonies de Nereis diversicolor (Dhainaut-Courtois et al., com. personnelle). L'implication des peptides opioïdes dans la spermatogénèse et l'ovogénèse a aussi été rapportée chez l'escargot (Marchand et Dubois, 1985), chez l'oursin (Cariello et al., 1986) et chez le rat (Engelhardt et al., 1986).

Par ailleurs, les travaux de Boilly-Marer (1983) suggèrent que des molécules apparentées à l'insuline et à la vasopressine jouent respectivement un rôle dans la morphogénèse et les mécanismes d'osmorégulation chez les Néréidiens. Bien qu'une cartographie détaillée du cerveau de Nereis diversicolor ait pu être réalisée en localisant des cellules immunoréactives, aucune donnée précise concernant la structure et le rôle biologique des molécules mises en évidence n'est encore acquise. Actuellement, la seule démonstration expérimentale évidente de l'activité biologique d'une molécule synthétisée par le cerveau des animaux est l'implication d'un produit de neurosécrétion dans le contrôle du développement des Néréidiens. Cette neurosécrétion peut être assimilée à une hormone inhibitrice de la spermatogénèse ou SIF (spermatogenesis inhibitor factor) dont la structure

reste à élucider. Des essais d'isolement du SIF des Néréidiens ont été entrepris par Durchon et al. (1963), poursuivis par Cardon (1970) à partir de cerveaux mis en culture organotypique. La neurohormone n'a pu être totalement purifiée (Cardon et al., 1981). Cependant, les analyses réalisées sur des fractions hautement purifiées ont permis de proposer qu'il s'agit d'un neuropeptide de faible masse moléculaire, vraisemblablement riche en glycine et en proline (Porchet et al., 1985), et dont le point isoélectrique se situe entre 6,3 et 6,4 (Bulet et Porchet, 1986). Récemment, l'analyse du SIF en résonance magnétique nucléaire confirme la nature peptidique et les autres données énoncées précédemment (Bulet, com.personnelle). Dans notre laboratoire, parallèlement aux travaux de purification du SIF, la production d'une sonde immunologique a été réalisée dans le but de détecter le SIF selon un procédé plus rapide et plus sensible que le test biologique (Delaire-Hesdin, com.personnelle). Cette sonde a également été utilisée pour localiser, dans le système nerveux de Néréis, les cellules impliquées dans la synthèse ou le stockage des produits contenus dans la fraction SIF. Dans le cerveau, 8 noyaux ganglionnaires possèdent 3 à 8 péricaryons immunoréactifs, et dans la chaîne nerveuse ventrale 5 à 7 cellules du groupe cellulaire antérieur sont reconnues par la sonde. La coloration séquentielle, réalisée selon la méthode de Clark (1955) permet d'avancer que l'anticorps (nommé NV24) est effectivement dirigé contre une neurosécrétion (Delaire-Hesdin, com.personnelle). Des travaux en cours ont pour but de déterminer la nature exacte de l'antigène reconnu par l'anticorps NV24, ou en d'autres termes, de savoir si cet antigène est le SIF ou une forme dérivée (Bulet et Delaire-Hesdin, com.personnelle).

On constate que les études entreprises pour caractériser

la structure et les fonctions de neuropeptides utilisent de façon usuelle des approches biochimiques performantes qui nécessitent la purification et l'analyse des peptides. Une stratégie mettant en oeuvre des techniques de biologie moléculaire, plus récentes, mais également complémentaires des approches précédentes, peut aujourd'hui être adoptée pour acquérir des informations sur les propriétés et ultérieurement le rôle des neuropeptides. Il s'agit, en définitive, d'aboutir à la connaissance du génome spécifiant les neurosécrétions, après clonage des gènes concernés. Ainsi, l'identification, puis la séquence nucléotidique des gènes de neuropeptides permet la détermination de la séquence primaire des protéines du système nerveux, sans avoir recours à l'isolement biochimique et à la purification de ces molécules. De plus, l'analyse de la séquence nucléotidique de l'ADN informatif doit permettre de découvrir la structure de peptides semblables sinon identiques à leurs homologues connus chez les Vertébrés ; cette analyse peut aussi révéler l'existence de produits encore inconnus.

Il est établi que les neuropeptides dérivent, par des processus de maturation, d'une grande molécule précurseur (Herbert et al., 1981). En conséquence, l'approche moléculaire fondée sur l'isolement des ARNm, leur traduction en système cellulaire (ovocytes de Xenopus laevis) ou en systèmes acellulaires, la caractérisation des produits traduits par des anticorps, l'élaboration de banques d'expression, l'utilisation de sondes nucléotidiques, l'isolement de gènes ou de fragments de gènes, l'organisation de ces derniers, paraît nécessaire pour affirmer que des peptides sont spécifiés par le même gène ou des gènes voisins.

A notre connaissance, aucune approche moléculaire s'intéressant à l'expression des gènes et aux modulations de cette expression au niveau du cerveau n'a été entreprise

chez les Néréidiens. Cependant, des travaux réalisés chez d'autres Invertébrés montrent que ces derniers constituent un modèle relativement simple, donc de choix, pour étudier les mécanismes moléculaires de ces neurosécrétions. Les Mollusques gastéropodes constituent des modèles animaux déjà bien étudiés et militent en faveur de ce choix. En effet, la compréhension de mécanismes moléculaires de l'action de neuropeptides a été largement facilitée par l'étude de ces modèles. Les Mollusques possèdent un système nerveux relativement simple qui n'est constitué que de 10 à 20 000 neurones polyploïdes facilement identifiables. Ces neurones sont des cellules géantes dont le péricaryon peut atteindre 1 mm de diamètre (Geraerts et Joosse, 1984 ; Roubos, 1984 ; Mayeri et Rothman, 1985 ; Geraerts et al., 1987). Ces neurones possèdent donc des qualités qui autorisent des études ultrastructurales, neurophysiologiques, endocrinologiques et enfin moléculaires. Deux espèces de Mollusques, l'Aplysie (Aplysia californica) d'une part et la Lymnée (Lymnaea stagnalis) d'autre part ont fait l'objet d'une étude moléculaire approfondie. Ces animaux, au moment de la ponte, manifestent un comportement stéréotypé particulier qui s'exprime ainsi : accélération des contractions musculaires, immobilisation, interruption de la prise de nourriture et enfin intenses contractions musculaires au niveau du cœur et du tractus génital (Cobbs et Pinsker, 1982 ; Rothman et al., 1985 ; Geraerts et al., 1988 a). Ces manifestations physiologiques s'étalent sur quelques heures et permettent d'étudier le rôle du système nerveux central dans le contrôle du comportement de ces animaux au cours de la ponte.

Une stimulation électrique de certains neurones appelés "bag cells" (BC) chez l'Aplysie et "cellules caudodorsales" (CDC) chez la Lymnée provoque la sécrétion d'une hormone de ponte nommée respectivement "egg laying hormone" ou ELH et

"caudodorsal cell hormone" ou CDCH (Kits, 1980 ; Ter Maat et al., 1983). Ces hormones agissent sur l'ovaire et provoquent la ponte (Geraerts et al., 1983, 1984). Chez la Lymnée, au moment de cette neurosécrétion, d'autres peptides sont également sécrétés par les cellules CDC. Des sécrétions multiples ont également été décrites chez l'Aplysie où les cellules BC libèrent la ELH, mais aussi d'autres peptides. La séquence primaire de la ELH et celle de la CDCH ont été déterminées (Chiu et al., 1979 ; Ebberink et al., 1985). Ces deux hormones de caractère basique, constituées de 36 acides aminés assurent la même fonction biologique ; elles ont une action directe sur l'ovaire en initiant et en régulant le mécanisme de la ponte, mais ne contrôlent pas le comportement stéréotypé associé à ce mécanisme (Joosse et Geraerts, 1983 ; Mayeri et Rothman, 1985).

Par des techniques de biologie moléculaire, on a pu démontrer que la ELH, ainsi que les autres peptides produits simultanément α BCP, β BCP, γ BCP, δ BCP...etc, (BCP pour "bag cell peptide") sont issus d'une préprohormone commune (Scheller et al., 1983 ; Jackson et al., 1986). Ceci est également le cas de la CDCH et des autres peptides, CDCA, calfuxine, α CDCP, β CDCP, β_1 CDCP, β_2 CDCP, β_3 CDCP, etc... qui sont libérés par maturation d'une préprohormone synthétisée par les cellules CDC (Geraerts et al., 1985 ; Vreugdenhil et al., 1985).

Des clones synthétisant ces deux préprohormones ont été isolés à partir d'une banque d'ADNc, puis caractérisés. La structure primaire de ces préprohormones a été ensuite déduite de la séquence nucléotidique informative (Scheller et al., 1982, 1983 ; Nambu et Scheller, 1986 ; Vreugdenhil et al., 1988a). Les ARNm spécifiques de ces préprohormones sont abondants (Ebberink et al., 1985). Le métabolisme des neurones concernés est dirigé principalement vers la synthèse de ces précurseurs qui représentent plus de 50 % des protéines

totales synthétisées par les cellules BC ou les cellules CDC (Kaldany et al., 1985). Ces molécules précurseurs représentent la forme initiale inactive sous laquelle les différents peptides intervenant dans les processus physiologiques de ponte sont synthétisés. Après une maturation post-traductionnelle, ces molécules donnent naissance à plusieurs peptides actifs (12 chez la Lymnée et au moins 6 chez l'Aplysie). Chacun de ces peptides contrôle un aspect spécifique des mécanismes impliqués dans la ponte (Kaldany et al., 1985 ; Vreugdenhil et al., 1988a). Le rôle de chacun des peptides n'est connu que pour quelques molécules. Par exemple, le peptide CDCA (12 acides aminés) sécrété par les cellules CDC et le peptide Δ BCP (7 acides aminés) possèdent la même fonction biologique. Ce sont des neurotransmetteurs qui agissent sur des neurones voisins en stimulant la synthèse d'ARNm et par voie de conséquence celle des précurseurs correspondants (Rothman et al., 1985 ; Ter-Maat et al., 1988). La calfuxine, autre peptide inclus dans la préprohormone CDCH, a une fonction connue. Ce peptide de 14 acides aminés contrôle les mouvements calciques au niveau de la glande atriale (Dictus et al., 1987). La fonction des autres peptides demeure encore inconnue (Geraerts et al., 1988 b) mais il semble que les actions combinées de ces peptides sécrétés soient responsables de l'initiation et de la coordination de la ponte. La comparaison des séquences en acides aminés de chacun de ces précurseurs et des peptides qui en résultent est intéressante du point de vue de la phylogénie de ces Mollusques. L'homologie globale entre les deux préprohormones est faible (28,2 %). Néanmoins, l'organisation structurale de ces molécules est semblable. Les préprohormones possèdent un "peptide signal" de 20 acides aminés près duquel tous les sites potentiels de clivage sont conservés (Vreugdenhil et al., 1988b). Une comparaison détaillée des

séquences des peptides issus de ces précurseurs indique une remarquable homologie entre la CDCH et la ELH (51 %) (Chiu et al., 1979 ; Ebberink et al., 1985) ; entre α CDCP et son homologue α BCP (69 %) et entre une région contenant trois peptides (CDCP β 1-3) et son homologue qui n'en contient que deux (β BCP, δ BCP) (75 %). Des homologies ont également été signalées au niveau de certaines régions correspondant à des peptides encore non identifiés. Ces homologies de séquence, mises en évidence au niveau de plusieurs régions des deux précurseurs, suggèrent que les neuropeptides concernés contrôlent des processus biologiques similaires, impliqués dans la physiologie de la ponte chez les deux espèces de Mollusques (Vreugdenhil et al., 1988b). Chez l'Aplysie, le précurseur de la ELH est spécifié par des gènes regroupés en une famille de 5 qui s'exprime d'une part dans les cellules BC et d'autre part dans les cellules de la glande atriale. Ces gènes de petite taille (1500 p.b) montrent une homologie de séquence de 90 %, mais leur expression est modulée selon le type de cellules (Scheller et al., 1982, 1983 ; Mahon et al., 1985). Cette famille de gènes a été également décrite chez d'autres espèces d'Aplysie (Nambu et Scheller, 1986). Chez une espèce plus primitive, Aplysia parvula, qui ne possède pas de glande atriale, une famille réduite à deux gènes a été mise en évidence (Geraerts et al., 1988 b).

Chez la Lymnée, les gènes spécifiant le précurseur de la CDCH appartiennent à une famille qui comprend les gènes CDCH I et CDCH II. Le gène CDCH I spécifie une préprohormone de 262 acides aminés qui est le précurseur de 10 peptides parmi lesquels se trouve la CDCH. Le gène CDCH II spécifiant une préprohormone de 259 acides aminés présente plus de 90 % d'homologie avec le précédent. La différence la plus évidente entre ces deux gènes consiste en une délétion de 17 p.b

proche de la région carboxy-terminale de la CDCH incluant le site de processing de cette dernière. Ceci donne naissance à un peptide nommé "CDCH like" dont la séquence carboxy-terminale est différente. De plus, des substitutions de plusieurs acides aminés sont révélées dans d'autres domaines peptidiques. En conséquence, les deux gènes du précurseur de la CDCH spécifient des séquences d'acides aminés qui se recouvrent partiellement. Les neuropeptides, issus par maturation de ces séquences, contrôleraient diverses manifestations physiologiques de la ponte (Vreugdenhil et al., 1988 a). Il est donc fort probable que chez les gastéropodes, les deux familles de gènes de ces précurseurs ont été engendrées par duplication d'un gène ancestral spécifiant les peptides qui régulent la physiologie de la ponte (Scheller et al., 1983). A partir des données acquises à propos des gènes de la ELH chez différentes espèces d'Aplysie, Nambu et Scheller (1986) proposent que la duplication du gène ancestral de la ELH a eu lieu avant que ne se produise la divergence au sein du groupe zoologique concerné. Chez Aplysia californica une duplication plus importante de ce gène ancestral peut expliquer l'apparition d'un génome complexe responsable de la synthèse de la ELH (Geraerts et al., 1988 b). De même, au cours de l'évolution phylogénétique des Lymnées, deux gènes, voire plus, spécifiant le précurseur de la CDCH ont été engendrés (Geraerts et al., 1988 b).

Un autre précurseur peptidique a fait l'objet d'une étude moléculaire approfondie chez les Mollusques ; il s'agit du précurseur du FMRF-amide. Ce peptide joue un rôle important dans la stimulation des contractions musculaires, en particulier celles du cœur (Painter, 1982 ; Cottrell et al., 1983 ; Muneoka et Matsuura, 1985) et il intervient également comme modulateur des courants ioniques au niveau des neurones (Cottrell et al.; 1984 ; Boyd et Walker, 1985).

Lors de la ponte, ce peptide est synthétisé en grande quantité et stimule les contractions cardiaques.

Le gène spécifiant le FMRF-amide chez l'Aplysie a été isolé puis caractérisé (Taussig et al., 1985). Il s'agit d'un grand précurseur de 597 acides aminés comprenant une séquence "signal" hydrophobe au niveau de l'extrémité amino-terminale. La partie carboxy-terminale de ce précurseur contient 28 copies du pentapeptide Phe-Met-Arg-Phe-Gly. Chacun de ces peptides est flanqué par des résidus basiques qui constituent les sites de reconnaissance nécessaires au clivage protéolytique (Loh et Gainer, 1983). Le résidu glycine, se trouvant à l'extrémité carboxy-terminale des produits de clivage, sert de substrat pour l'amidation carboxy-terminale produisant ainsi le tétrapeptide amidé qui est le FMRF-amide (Taussig et al., 1988). Au niveau de la molécule précurseur, une séquence de 7 à 8 acides aminés sépare chacun des tétrapeptides du FMRF-amide. Ces séquences de 7 à 8 acides aminés ne sont pas totalement conservées et leur fonction n'est pas encore connue. Par ailleurs, une seule copie d'un tétrapeptide nommé FLRF-amide est également présente dans le précurseur. La présence d'un seul peptide contenant de la leucine, et l'existence de multiples copies de peptides contenant de la méthionine évoquent la structure du précurseur des enképhalines chez l'Homme. Ce dernier précurseur contient une seule copie de leucine enképhaline et 7 copies de méthionine enképhaline (Comb et al., 1982). Cette homologie limitée ne semble pas suffisante pour invoquer l'existence d'une relation ancestrale entre les gènes des précurseurs de ces molécules.

Chez les Insectes, le cerveau sécrète une hormone prothoracicotrope (PTTH) qui stimule les glandes prothoraciques et induit la libération de l'ecdysone. Ce stéroïde est nécessaire à la croissance et à la métamorphose de l'animal

(Ishizaki et Suzuki, 1984). Chez le Bombyx (Bombyx mori), en plus de la PTH (22 kDa), un autre peptide nommé bombycine (5 kDa) exprime aussi une activité prothoracicotrope (Ishizaki et al., 1983, 1987 ; Mizoguchi et al., 1987). Il existe plusieurs formes moléculaires de la bombycine désignées par un chiffre I, II, III, etc... La structure primaire de la bombycine II (Nagasawa et al., 1986, 1988) et celle de la bombycine IV (Nagasawa et al., 1988) ont été complètement déterminées. En revanche, pour les bombycines I, III et V (Nagasawa et al., 1984 ; Jhoti et al., 1987), la détermination de leur structure primaire n'est que partielle. Les diverses formes moléculaires de la bombycine ne diffèrent l'une de l'autre que par des substitutions mineures d'acides aminés. Par ailleurs, les molécules de la bombycine et celles de la famille de l'insuline de Mammifères partagent une importante homologie de leur séquence en acides aminés (Nagasawa et al., 1988). Récemment, le gène spécifiant la bombycine a été isolé et caractérisé à partir d'une banque génomique (Iwami et al., 1989). La découverte de la séquence nucléotidique spécifiant la bombycine confirme l'homologie déjà décrite entre la séquence d'acides aminés de cette molécule et celle de l'insuline. L'organisation du gène de la préprobombycine est identique à celle du gène de la préproinsuline de Mammifères. Ces résultats suggèrent que la bombycine et les peptides de la famille de l'insuline dérivent d'une séquence nucléotidique ancestrale commune (Iwami et al., 1989).

Les résultats fondamentaux acquis chez les Invertébrés grâce aux techniques de biologie moléculaire, nous ont encouragé à adopter une stratégie semblable, sur notre modèle animal, les Néréidiens.

Parmi les nombreux peptides apparentés à ceux de Mammifères et détectés au niveau du cerveau de Nereis diversifera

color, les opioïdes ainsi que la cholécystokinine (CCK) sont abondamment représentés (Engelhardt et al., 1982 ; Dhainaut-Courtois et Golding, 1988). Il faut également signaler que la cholécystokinine et les opioïdes, encore relativement mal connus chez les Invertébrés, ont suscité de nombreux travaux chez les Mammifères. Les séquences des acides aminés déduites des ARNm spécifiant d'une part la préprocholécystokinine (Deschenes et al., 1984 ; Gubler et al., 1984 ; Friedman et al., 1985 ; Takahashi et al., 1985 ; Rehfeld et al., 1988) et d'autre part la préprodynorphine (Kakidani et al., 1982 ; Christensson-Nylander et al., 1985 ; Lewis et Erickson, 1986) ont été déterminées chez plusieurs Mammifères. C'est ainsi que la plupart des peptides actifs qui dérivent de ces précurseurs sont maintenant bien caractérisés et même séquencés. Compte-tenu des données précédentes et de l'ensemble des connaissances acquises, en particulier par les chercheurs de notre laboratoire sur les Néréidiens, nous avons décidé de focaliser nos recherches sur deux molécules présumées : le précurseur de la cholécystokinine et celui de la dynorphine et de 1 α -néo-endorphine, en mettant en oeuvre des techniques de biologie moléculaire. Nous nous sommes intéressé à l'expression des gènes concernés dans le cerveau de Nereis diversicolor. La caractérisation de ces précurseurs est donc le but essentiel de notre travail. En conséquence, nous avons isolé les ARNm du cerveau d'un Néréidien. Nous avons éprouvé les capacités de traduction de ces ARNm dans divers systèmes, système cellulaire (ovocytes de Xenopus laevis) ou système acellulaires (lysats de réticulocytes de lapin ou extrait de germes de blé). Les polypeptides d'intérêt, traduits dans ces différentes conditions, ont été mis en évidence en utilisant de nombreux anticorps : anticorps dirigés contre certaines séquences connues de précurseurs de Mammifères ou contre des peptides maturés, anti-

corps synthétisés contre des molécules spécifiques de Néréidiens. Les techniques immunologiques utilisées pour la reconnaissance de ces produits traduits comprennent le test ELISA, l'immunoprécipitation, la technique d'immunotransfert, l'immunohistochimie. La découverte de précurseurs, par les moyens pré-cités, nous a naturellement induit à élaborer une banque d'expression à partir de l'ADNc synthétisé sur le modèle des ARNm poly(A)+ extraits du cerveau des vers. Des clones d'intérêt ont été détectés par immunoréaction entre leur protéine de fusion et les anticorps utilisés.

MATERIELS ET TECHNIQUES

I Matériel biologique

Les animaux sur lesquels nous avons effectué nos expériences sont des vers marins, Nereis diversicolor O.F. Muller (Annélide, Polychète), récoltés dans la vase de l'estuaire de l'Aa, Petit ou Grand-Fort-Philippe (Département du Nord, France). Avant leur utilisation, les vers sont conservés au laboratoire dans de l'eau de mer naturelle à 4°C. Le sexe et l'âge des animaux sont déterminés, à l'aide d'un microscope photonique, selon la nature et l'état de maturation des gamètes. Ces cellules évoluent librement dans la cavité coelomique des animaux (Durchon, 1952). Chez les animaux très jeunes, les cellules sexuelles ne sont pas identifiables. Ultérieurement, les jeunes mâles se reconnaissent par leurs produits génitaux qui se présentent sous forme d'amas mûrifomes de spermatogonies. Les femelles sont sélectionnées en fonction du diamètre de leurs ovocytes. Nos expériences ont été pratiquées en utilisant des animaux très jeunes dont le sexe n'est pas identifiable et des femelles dont les ovocytes ont un diamètre inférieur ou supérieur à 80 µm.

II Dissection et isolement du prostomium et du cerveau des animaux

1) Dissection du prostomium

L'ablation du prostomium est réalisée à partir de la région antérieure de l'animal préalablement sectionnée. Cette région est placée sous une loupe binoculaire. À l'aide de ciseaux de Pascheff et de pinces fines, on pratique trois incisions successives permettant de dégager le prostomium ;

les deux premières sont parallèles à l'axe de l'animal et permettent de séparer les palpes situés de part et d'autre du prostomium ; la troisième, faite perpendiculairement à l'axe de l'animal, permet de dégager le prostomium du reste de la tête.

2) Dissection du cerveau

Le prostomium disséqué est placé, face ventrale vers l'expérimentateur, sur une soie à bluter qui filtre l'eau de mer en excès sans dessécher les tissus. Le cerveau est visible par transparence. Il est alors libéré à l'aide des instruments de dissection.

III Extraction des acides ribonucléiques (ARN) des prostomiums ou des cerveaux

1) Précautions opératoires

Les ARN, en particulier les messagers, sont des molécules fragiles, facilement hydrolysées par des traces de ribonucléases. En conséquence, certaines précautions sont à respecter :

- utilisation de gants à usage unique et d'un masque,
- vaisselle stérilisée à 200°C,
- les objets en plastique doivent être traités au diéthyl-pyrocarbonate (DEPC), puis stérilisés à 100°C,
- les solutions sont également traitées au DEPC à 0,1 %, puis utilisées après un "vieillissement" d'au moins une nuit.

2) Technique d'extraction

Les prostomiums sont lavés dans le tampon PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,05 M, pH 7,4 contenant du NaCl à 0,56 M). Après lavage, ils sont immergés dans 5 ml de tampon GT (Isothiocyanate de guanidinium 4 M, citrate trisodique 0,005 M, β mercapto-éthanol 0,1 M, sarcosyl 0,017 M) puis broyés à l'aide d'un homogénéiseur de cellules (type Dounce). 2 g de chlorure de césium sont ajoutés à l'homogénat, puis dissous par forte agitation. Les molécules d'ADN sont brisées mécaniquement par passage au travers de l'aiguille d'une seringue. Les 5 ml de la suspension sont alors délicatement déposés sur un coussin de 3,2 ml d'une solution de chlorure de césium (CsCl 5,7 M, EDTA 0,1 M, pH 7,5) préalablement placé dans un tube pour rotor Beckman SW40. Les tubes sont complétés à l'aide du tampon GT, sans provoquer de turbulences ; les tubes équilibrés sont centrifugés à 148500 x g pendant une nuit à 18°C. Après cette durée, les molécules d'ARN totaux sédimentent ; une bande visible, correspondant essentiellement à des molécules d'ADN, flotte à environ 1 cm du culot d'ARN. Une partie du surnageant est éliminée à l'aide d'une pipette Pasteur ; les tubes sont clampés et à l'aide d'une paire de ciseaux, ils sont sectionnés à 1 cm de leur extrémité inférieure. Le culot est asséché, puis repris dans 1 ml de tampon TE 1 % SDS (Tris 10 mM, EDTA 1mM, SDS 34,6 mM, pH 7,4). 2 ml de chloroforme-butanol (4 vol/1 vol) sont ajoutés et l'ensemble est agité vigoureusement. Une centrifugation à 1600 x g dans une centrifugeuse Jouan (type GR 2000 SX) pendant 5 mn permet de séparer deux phases : la phase supérieure aqueuse, contenant les acides nucléiques est soigneusement prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur ; la phase inférieure est additionnée d'un ml de tampon TE 1 % SDS. L'ensemble est à nouveau agité vigoureusement, puis centrifugé à 1600 x g pendant 5 mn. La phase supérieure est

ajoutée à la première, précédemment isolée. On ajoute un dixième du volume d'acétate de sodium (NaCH_3COO 3 M) et 2,2 volumes d'éthanol à -20°C . L'ensemble est soigneusement mélangé, puis stocké à -80°C au moins deux heures ou à -20°C pendant une nuit. Cette opération permet la précipitation des acides nucléiques.

IV Purification des ARN

1) Traitement des échantillons par le chlorure de lithium

Les échantillons sont centrifugés à $14600 \times g$ (centrifugeuse Beckman de type J2 21 M/E) pendant 10 mn à 4°C . Les culots sont asséchés sous air comprimé. Ils sont repris dans 2 ml de chlorure de lithium 2 M et centrifugés ($14600 \times g$, 10 mn, 4°C). Cette opération est répétée deux fois afin d'éliminer les molécules d'acides nucléiques bicaténaires. Puis deux lavages à l'alcool à 100 % permettent une élimination des traces de LiCl . Le culot ne contenant plus, théoriquement, que des ARNm est asséché sous air comprimé, puis redissous dans l'eau bidistillée traitée par le DEPC. Les ARNm peuvent ensuite être stockés à -20°C dans l'éthanol à 70 %.

2) Passage des échantillons sur une colonne d'oligo-dT cellulose

La préparation de la colonne et la purification des ARNm dérivent des protocoles décrits par Maniatis et al., (1982) et Aviv et Leder (1972).

a) Appareillage

L'appareillage comprend : a) une pipette Pasteur dont le fond est obturé par un bouchon de fibre de verre préalablement autoclavée à 120°C pendant 20 mn, le gel se situe au dessus de la fibre de verre ; b) la partie inférieure de la pipette Pasteur est reliée à l'unité optique par l'intermédiaire d'un tube souple passant par une pompe péristaltique ; c) l'unité optique est couplée à un enregistreur de type Isco ; d) un tube capillaire sert à l'évacuation des liquides.

b) Traitement de l'appareillage

La colonne est rincée par un ou deux passages d'eau bidistillée additionnée extemporanément de DEPC (1/1000), puis par plusieurs passages d'eau bidistillée traitée par le DEPC la veille de l'utilisation. La préparation de la colonne se poursuit par plusieurs passages de tampon de fixation, appelé tampon D (Tris /HCl 20 mM, pH 7,6, LiCl 0,5 M, SDS 0,1 %, EDTA 1 mM).

c) Préparation du gel d'oligo dT cellulose

Le gel d'oligo dT cellulose (Boehringer, Mannheim) doit être conservé à -20°C. Une quantité suffisante de gel (environ 1 cm dans la colonne au dessus de la fibre de verre) doit être préparée. Le gel est mis en suspension dans le tampon D, puis centrifugé à faible vitesse (1000 x g, 5 mn). Le gel est repris par de la soude à 0,1 M. Cette opération fait normalement virer le gel du blanc au jaune. Le surnageant, dont le pH est à environ 10, est éliminé à la suite d'une centrifugation à faible vitesse. Le gel est

alors repris par le tampon D ; cette opération est répétée jusqu'à ce que le pH du surnageant soit compris entre 7 et 7,5.

d) Préparation de la colonne

Le gel traité, comme cela vient d'être exposé, est déposé dans la colonne (pipette Pasteur) contenant environ 1 cm de tampon D. Après décantation du gel, il est nécessaire de s'assurer de l'absence de formation d'agrégats. Si le gel semble non homogène, il doit être repris plusieurs fois à l'aide d'une pipette Pasteur. L'excédent du tampon D est ensuite éliminé jusqu'à ce que le niveau du gel affleure.

e) Préparation des ARN totaux

Les ARN totaux sont centrifugés à 14600 x g pendant 10 mn à 4°C. Le culot est asséché sous air comprimé ; il est dissous dans 500 µl d'eau bidistillée et porté à 80°C pendant 5 mn dans le but de dénaturer les molécules d'ADN.

Aux 500 µl de l'échantillon sont additionnés 500 µl de tampon de fixation D deux fois concentré (Tris/HCl 40 mM, pH 7,6, LiCl 1 M, SDS 0,2 %, EDTA 2 mM). L'ensemble de l'échantillon est ensuite déposé délicatement sur le gel précédemment préparé, en évitant la formation de bulles d'air.

f) Recyclage de l'échantillon et élution des ARNm poly (A)+

L'extrémité supérieure de la colonne est bouchée à l'aide de parafilm. Le tube capillaire d'évacuation des effluents est placé à l'intérieur de la colonne (pipette Pasteur), en perforant le parafilm. La pompe péristaltique est mise en

fonctionnement. Ce système permet le recyclage de l'échantillon qui dure environ 2 h. La fin de cette étape est déterminée quand l'enregistreur n'indique plus de variations de densité optique à 254 nm : on observe alors un plateau stable d'absorbance. Le capillaire d'évacuation des effluents est alors placé dans un tube de type corex bouché à l'aide de parafilm. Le tampon D est ajouté dans la colonne jusqu'à ce qu'on observe sur l'enregistreur une chute de la densité optique qui traduit l'élution des ARN poly(A)- (essentiellement les ARNr et les ARNt); la chute est suivie d'une ligne de base stable. Les ARNm poly(A)+ recueillis dans un autre tube sont élués finalement à l'aide du tampon d'élution dit E (Tris/HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS 0,05 %).

L'élution des ARNm poly(A)+ se traduit par un pic d'absorbance au niveau de l'enregistreur. Les ARNm poly(A)+ sont ensuite précipités par 0,2 volume d'acétate de sodium 3 M et 3 volumes d'éthanol pur à - 20°C. L'ensemble est soigneusement mélangé puis conservé à - 20°C pendant au moins une nuit.

V Electrophorèse des ARNm en gel d'agarose-méthylmercure

Tampon borate d'électrophorèse 10 x. Le tampon d'électrophorèse comprend : acide borique 500 mM, tétraborate disodique 50 mM, sulfate de sodium 100 mM, EDTA 10 mM, ajusté à pH 8,2 à l'aide de NaOH.

Tampon de dépôt des échantillons 5 x. Il comprend : glycérol 50 %, bleu de bromophénol 0,25 %.

Préparation d'un "minigel" d'agarose.

Afin d'obtenir un "minigel" à 1 % d'agarose, 0,25 g d'agarose sont dissous dans 22 ml d'eau stérile. 2,5 ml de tampon borate 10 x et 0,5 ml d'hydroxyde de méthylmercure 1 M (20 mM final) sont ajoutés au mélange précédent. Le gel est immédiatement coulé sur une plaque de verre de 12,8 cm sur 8 cm ; son épaisseur est de 0,3 cm. Le gel est utilisable dans l'heure qui suit sa préparation. Les échantillons d'ARN à analyser (de 0,5 à 5 µg par puits) sont dénaturés dans l'eau distillée pendant 5 mn à 65°C ; le glycérol et le bleu de bromophenol sont amenés respectivement aux concentrations finales suivantes 10 % et 0,5 %. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 40 V/cm pendant 45 mn. La renaturation et la coloration par le bromure d'éthidium sont obtenues en incubant le gel pendant 20 mn dans une solution 0,5 M d'acétate d'ammonium contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium. Des témoins de poids moléculaires représentés par les ARN ribosomiques 16 S et 23 S d'E. coli MRE 600 (Boehringer Mannheim) co-migrent avec les échantillons.

VI Traduction in vitro des ARNm

Deux systèmes acellulaires de traduction ont été utilisés.

1) Traduction des ARNm en lysat de réticulocytes de lapin

Les échantillons d'ARNm sont additionnés au lysat de réticulocytes de lapin (référence M90Y, Amersham - France). Les conditions opératoires, qui ont été respectées, sont celles préconisées par la société Amersham. Les incubations ont duré 1 h à 30°C. Le lysat utilisé procure un système

acellulaire eucaryotique complet qui permet la traduction d'un grand nombre d'ARNm exogènes. De nombreux travaux indiquent la haute performance de ce système capable de traduire des protéines de haut poids moléculaire (Clemens, 1984).

a) Protocole opératoire

- Constitution d'un mélange d'incubation de base

.....

appelé "prémix"

.....

- * lysat de réticulocytes de lapin : 140 µl
- * méthionine S35 (SJ1515 - Amersham - France) à activité spécifique supérieure à 1000 Ci/mM : 17,5 µl
- * eau bidistillée : 8,75 µl
- * mélange à l'aide d'un agitateur de type "vortex"

- Préparation des deux témoins

.....

* un "témoin ARN", nommé "témoin positif", mettant en oeuvre les ARNm du virus de la mosaïque de tabac (TMV pour Tobacco Mosaic Virus), commercialisés par Amersham ; ce témoin est utilisé dans le but de s'assurer de la bonne activité biologique (pouvoir de traduction) du lysat de réticulocytes.

* un "témoin eau", dit "témoin négatif", contenant une fraction "eau bidistillée dépourvue d'ARNm".

	Témoïn ARN	Témoïn eau	Echantillon
Eau	-	2,5 µl	-
ARN testé	-	-	2,5 µl (2-3µg)
Lysat	40 µl	-	-
ARN TMV	3 µl	-	-
Méthionine S35	7 µl	-	-
Prémix	-	47,5 µl	47,5 µl

Tableau 1 : Tableau récapitulatif du protocole opératoire

Le volume réactionnel total est toujours de 50 µl. Chaque échantillon est correctement mélangé à l'aide d'un agitateur de type "vortex", puis mis à incuber 1 h à 30°C dans un bain-marie agité.

b) Evaluation du pouvoir de traduction d'un lysat de réticulocytes de lapin par mesure de la radioactivité incorporée dans les protéines synthétisées de novo

Les échantillons sont agités après l'incubation au cours de laquelle la traduction est réalisée. A 1 ml de tampon Tris 20 mM / HCl pH 7,4, NaCl 150 mM additionné de méthionine non radioactive (4 mg/ml), on additionne 1 µl d'échantillon. L'addition de deux gouttes d'acide trichloro-

acétique (TCA) à 100 % entraîne la précipitation des protéines. L'opération se poursuit pendant 2 h à 4°C. L'ensemble est filtré sur une pastille en fibre de verre. Une séquence de quatre lavages intervient alors : TCA à 10 %, TCA à 5 %, eau bidistillée, éthanol/éther (V/V). Les filtres sont séchés une nuit. La radioactivité contenue dans les filtres est déterminée à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (LKB WALLAC 1215 RACK BETA). Les filtres sont placés dans des fioles à scintillation contenant du lipofluore (J.T. Baker) utilisé comme liquide scintillant. Trois mesures concernant trois prélèvements différents du même échantillon sont effectuées dans le but d'obtenir une valeur moyenne de la radioactivité contenue dans les différentes prises d'aliquot.

Le reste de chaque échantillon est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide 5-25 % en milieu dénaturant.

2) Traduction des ARNm en extrait de germes de blé ("Wheat germ extract")

La différence entre ce deuxième système de traduction in vitro et le précédent réside dans le fait que l'extrait de germes de blé est généralement employé pour la traduction de molécules de masse moléculaire plus faible que celles que l'on peut obtenir dans le système de réticulocytes de lapin. Cependant, l'extrait de germes de blé peut apparaître, parfois, plus efficace que le premier système décrit (Borelli et Wu, 1985). L'utilisation de ce deuxième système de traduction nécessite la détermination préalable des concentrations optimales en ions K⁺ et en ARNm nécessaires à l'obtention d'un maximum de pouvoir de traduction au cours des expériences.

a) Détermination de la concentration optimale en ions K+ nécessaire à une traduction optimale des ARNm dans un extrait de germes de blé

Une concentration en ions K+ insuffisante peut induire d'une part une faible incorporation de l'acide aminé radioactif choisi, ici la méthionine S35, et d'autre part une terminaison prématurée de la traduction. La concentration optimale en ions K+ est déterminée par une série "test" de traduction des ARNm de cerveaux de Nereis diversicolor. Chaque lot d'incubation de cette série possède une quantité identique d'un mélange réactionnel de base, nommé "prémix", mais des concentrations variées en acétate de K+. Pour cette détermination, on réalise une gamme de dilution d'acétate de K+ dans une série de six tubes.

- Constitution du "prémix"

Les conditions opératoires, retenues ici, sont celles préconisées par la société Amersham.

* acides aminés non radioactifs à la concentration de 1 mM, (mélange commercialisé)	: 14	µl
* extrait de germes de blé	: 105	µl
* ARNm (4 µg)	: 4	µl
* méthionine S35 (SJ235), 1 mCi/ml	: 8, 2	µl

activité spécifique supérieure à
1000 Ci/mM (supérieure à 37 TBQ/mM)

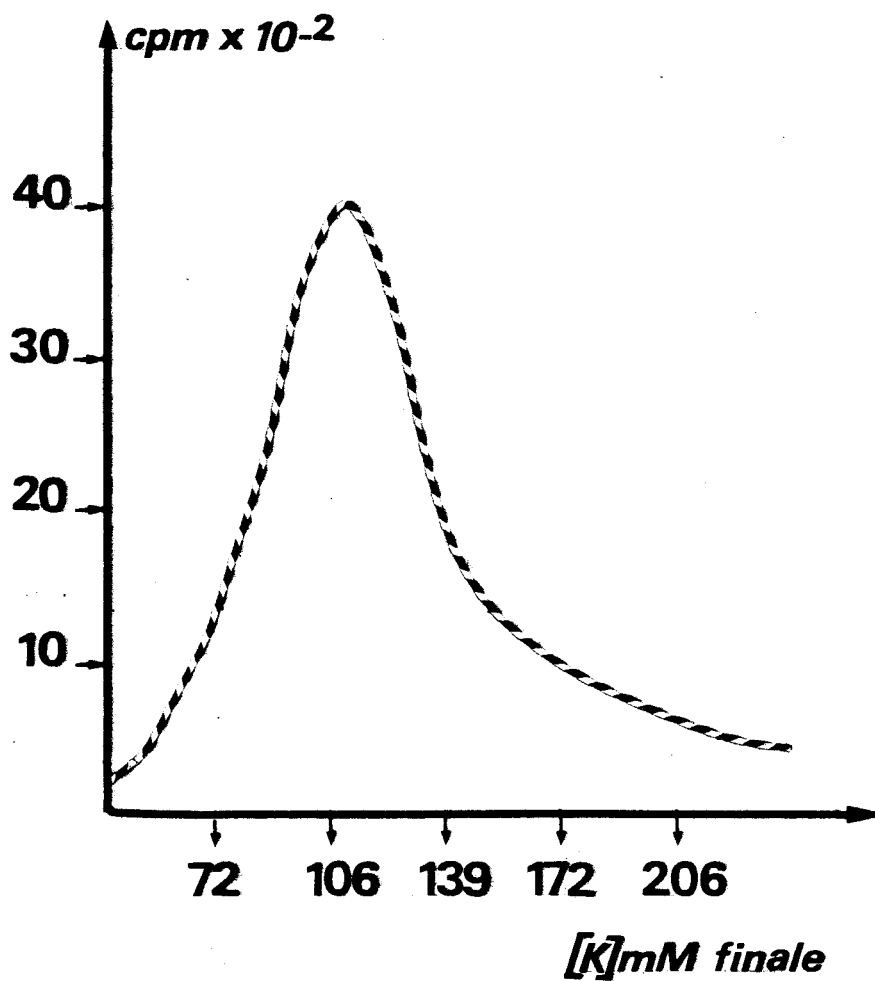
- Gamme de dilution

oooooooooooooooooooo

Tubes	1	2	3	4	5	6
Acétate de K ⁺ à 1M(μl)	0	1μl	2μl	3μl	4μl	5μl
Eau	7μl	6μl	5μl	4μl	3μl	2μl
"Prémix"	23μl	23μl	23μl	23μl	23μl	23μl
Volume total	30μl	30μl	30μl	30μl	30μl	30μl
Concentration ajoutée en acétate de K ⁺ (mM)	0	33	67	100	133	167
Concentration totale en acétate de K ⁺ (mM)	39	72	106	139	172	206

Tableau 2 : Gamme de détermination de la concentration optimale en ions K⁺ nécessaire à une traduction optimale des ARNm dans l'extrait de germes de blé

La concentration initiale en K⁺ dans l'extrait de germes de blé est de 78 mM. Lors de l'élaboration du "prémix", l'extrait a été dilué au 1/2 (V/V), soit une concentration en K⁺ endogène de 39mM. Les six tubes sont agités puis incubés pendant 1 h à 25°C dans un bain-marie agité.



* FIG.1

Figure 1. Courbe d'incorporation de la méthionine S35 en fonction de la concentration en ions K⁺. La concentration en ions K⁺ nécessaire à une traduction optimale des ARNm dans un extrait de germes de blé est ainsi déterminée à 106 mM.

- Technique de détermination de la radioactivité

.....

contenue dans les échantillons

.....

Il s'agit, comme lors de l'utilisation du lysat de réticulocytes de lapin, d'une évaluation grossière de la capacité de traduction des ARNm. Nous avons suivi le même protocole que celui utilisé pour le précédent système de traduction in vitro. On peut ainsi tracer la courbe d'incorporation de la méthionine S35 en fonction de la concentration en K⁺. La concentration optimale en K⁺ est ainsi déterminée à 106 mM (figure 1).

b) Détermination de la concentration optimale en ARNm permettant l'obtention d'un maximum de synthèse in vitro de protéines

- Préparation du "prémix"

.....

On réalise le mélange suivant :

* acides aminés non radioactifs, à la concentration de 1 mM, fournis par la société Amersham : 14 µl

* acétate de K⁺ (KCH₃COO) à 1 M : 2 µl (quantité déterminée précédemment : 106 mM finale)

* méthionine S35 (SJ235) à 1 mCi/ml : 12,5 µl, fournie par la société Amersham, activité spécifique supérieure à 1000 Ci/mM

* extrait de germes de blé : 105 µl

* compléter à 189 µl avec l'eau bidistillée traitée par le DEPC.

Les tubes sont agités puis incubés à 25°C pendant 1 h dans un bain-marie agité.

- Gamme de dilution

Tubes	1	2	3	4	5	6
Eau	0	3	3	3	3	3
ARN (µl) (4 µg/µl)	3	3	3	3	3*	0
Dilution par entrainement	1	1/2	1/4	1/8	1/16	-
Prémix (µl)	27	27	27	27	27	27
Volume total (µl)	30	30	30	30	30	30

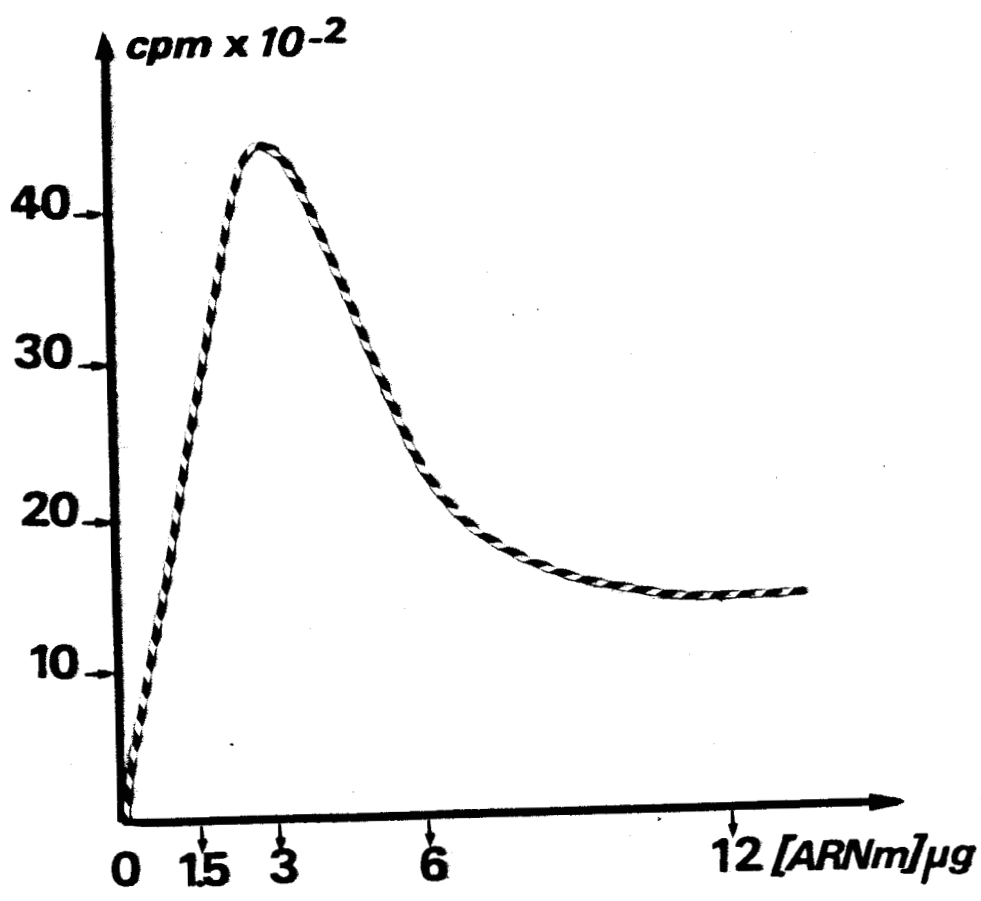
Tableau 3 : Gamme de détermination de la concentration optimale d'ARNm permettant d'obtenir un maximum de synthèse in vitro de protéines.

* 3 µl sur 6 sont seulement conservés du mélange ARNm + eau.

- Technique de détermination de la radioactivité

contenue dans les échantillons

Nous avons suivi la même technique que celle utilisée pour la détermination de la concentration optimale en K+. Nous avons alors tracé la courbe d'incorporation de méthionine-S35 en fonction de la concentration en ARNm correspondant à une incorporation optimale (figure 2).



***FIG. 2**

Figure 2. Courbe d'incorporation de la méthionine S35 en fonction de la concentration en ARNm. L'activité optimale de traduction dans l'extrait de germes de blé a ainsi été obtenue avec une concentration en ARNm de 3 μg .

c) Traduction des ARNm de cerveaux dans le système acellulaire de germes de blé

La traduction des ARNm dans ce système est réalisée après les déterminations préalables des concentrations optimales en ions K⁺ et en ARNm.

- Préparation du "prémix"

«.....»

On prépare par échantillon :

- acétate de potassium (KCH₃COO à 1 M) : 2 µl
- acides aminés non radioactifs (sauf méthionine) à 1 mM fournis par la société Amersham : 2 µl
- méthionine S35 (SJ235 - Amersham), 0,5 à 1 mCi/ml, activité spécifique supérieure à 1000 Ci/mM : 2 µl
- extrait de germes de blé (50 % du volume final) : 15 µl
- ARNm (1 µg/1 µl) : 3 µl
- compléter avec l'eau bidistillée traitée par DEPC : 30 µl

L'échantillon est agité, puis mis à incuber à 25°C pendant 1 h. Le décompte de la radioactivité est réalisé selon le même mode que celui utilisé précédemment.

VII Traduction des ARNm dans les ovocytes de *Xenopus laevis*

Les ovocytes, prélevés sur des *Xenopus laevis*, sont séparés des cellules folliculaires par la collagénase dispase (Boehringer, Mannheim) (1 mg/ml). Immédiatement après l'in-

jection de 50 nl d'une solution d'ARNm (5 µg d'ARNm/µl d'eau bidistillée traitée par le DEPC) par ovocyte, les cellules sont transférées dans un milieu de Barth modifié (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM, CaCl₂ 0,41 mM, MgSO₄ 0,82 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, théophylline 0,5 mM, pyruvate de Na 2,5 mM, pénicilline-10 mg/l, streptomycine 10 mg/l) puis incubées à 19°C pendant 2 à 5 jours. Le milieu d'incubation des ovocytes est renouvelé chaque jour. La méthionine S35 (SJ1515 - Amersham - activité spécifique supérieure à 1000 Ci/mM) est utilisée, comme marqueur radioactif des protéines nouvellement synthétisées. Chaque ovocyte injecté est incubé dans un puits d'une plaque de microtitration contenant 200 µl de milieu d'incubation de Barth modifié additionné de 2 µl de précurseur radioactif.

Les ovocytes témoin reçoivent une injection d'eau bidistillée ne contenant pas d'ARNm et incubent dans les mêmes conditions que les ovocytes ayant reçu une injection d'eau bidistillée contenant des ARNm.

VIII Extraction des protéines synthétisées in ovo

Les protéines sont extraites des ovocytes injectés d'ARNm ou des ovocytes témoin par homogénéisation de 5 cellules dans 200 µl de tampon (Tris 75 mM/HCl pH 6,8, SDS 1 %, β-mercaptoéthanol 1 %, phényl-méthyl-sulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM). Après une centrifugation de 5 mn à 10 000 x g et à température ambiante dans une minifuge (Sigma 201. M), le surnageant, contenant les protéines marquées, est dilué 10 fois puis analysé en électrophorèse.

Cette technique est également utilisée pour extraire les protéines du cerveau de Nereis diversicolor. Les protéines libérées par les ovocytes dans leur milieu d'incubation sont

précipitées par 0,2 volume d'acide trichloroacétique (TCA) (50 % m/v) en présence d'une protéine jouant le rôle d'un entraîneur qui est la sérum albumine bovine (SAB) (2 µg). Les précipités sont récupérés par centrifugation à 10 000 x g pendant 5 mn. Le culot est lavé par de l'acétone froid (4°C), puis il est mis en suspension dans un tampon (Tris 50 mM, HCl, pH 7,4, NaCl 150 mM) pour une analyse électrophorétique.

IX Analyses des produits traduits

1) Techniques électrophorétiques

a) Electrophorèse mono-dimensionnelle des polypeptides en milieu dénaturant SDS

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Des gels de 0,75 mm d'épaisseur sont utilisés.

- Le gel de séparation

Le gel de séparation est constitué par un gradient d'acrylamide 5 - 25 %.

d) Solutions à 5 % et à 25 % d'acrylamide

Solutions	Gel à 5 %	Gel à 25 %
Tampon Tris/HCl 0,75 M, pH 8,8:	25 ml	25 ml
Acrylamide	2,5 g	12,5 g
Bis-acrylamide	0,066 g	0,330 g
Saccharose	-	9 g
Eau (q.s.p. 50 ml)		

Tableau 4 : Solutions d'acrylamide nécessaires à la confection des gels de séparation des protéines.

β) SDS : 0,1 %

γ) Catalyseurs : pour 9 ml de gel, on ajoute 9 µl de persulfate d'ammonium à 10 % préparé extemporanément et 4 µl de N, N, N', N' tétraméthylènedianine (TEMED).

- Le gel de concentration

Le gel de concentration est constitué d'acrylamide à 5 %.

α) Solutions du gel de concentration

Solutions	Gel à 5 %
Tampon Tris/HCl 0,5 M pH 6,8	12,5 ml
Acrylamide	2,5 g
Bis-acrylamide	0,066 g
Eau (q.s.p. 50 ml)	

Tableau 5 : Solutions d'acrylamide du gel de concentration nécessaire à l'analyse électrophorétique des protéines.

β) SDS : 0,1 %

δ) Catalyseurs : pour 4 ml de gel, on ajoute 50 µl de persulfate d'ammonium à 10 % préparé extemporanément et 5 µl de TEMED.

Avant dépôt, les échantillons préparés dans un tampon, Tris/HCl 65 mM, pH 6,8, SDS 2 %, saccharose 10 %, βmercapto-éthanol 5 %, bleu de bromophénol 0,1 %, sont chauffés 3 mn dans un bain-marie bouillant.

Un mélange de protéines témoin de masse moléculaire 94 kDa (phosphorylase B), 67 kDa (albumine), 43 kDa (ovalbumine), 30 kDa (anhydrase carbonique), 20 kDa (inhibiteur de la trypsine) et 14,4 kDa (α - lactalbumine) sert, après migration électrophorétique, de marqueurs de masse moléculaire. Après 16 à 20 h de migration (4-5 mA) à

température ambiante dans le tampon (Tris 0,025 M, glycine 190 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3), le gel est coloré pendant 2 h sous agitation par le bleu de Coomassie à 0,1 % dans le mélange isopropanol 25 % - acide acétique 10 % - eau 65 %. Il est partiellement décoloré par l'acide acétique à 10 %. La détection des éventuels polypeptides radioactifs est effectuée par autoradiographie. Le gel est donc séché sur papier Whatman 3 et mis en contact avec un film photographique préalablement exposé à un éclair de lumière orange diffuse (filtre Kodak Wratten 21). L'exposition dure 48 à 72 h à -70°C. Les enregistrements densitométriques des autoradiogrammes sont effectués à 595 nm sur un densitomètre "Junior plus" équipé d'un intégrateur.

b) Electrophorèse mono-dimensionnelle des peptides

L'électrophorèse des peptides est effectuée selon la méthode de Burr et Burr (1983). Des gels de 0,75 mm d'épaisseur et de 12 cm de longueur sont utilisés.

- Le gel de séparation

.....

- Acrylamide : 12,5 %
- Bis-acrylamide à 1 % (m/v) : 0,11 %
- Urée : 8 M
- Tris 2 M/H₃PO₄, pH 8 : 0,34 M
- SDS à 20 % (m/v) : 0,1 %
- TEMED : 0,05 %
- Persulfate d'ammonium à 10 %
(m/v) : 0,05 %
- Compléter à 25 ml avec de l'eau bidistillée.

- Le gel de concentration

- Acrylamide à 30 % (m/v) : 5 %
- Bis-acrylamide à 1 % (m/v) : 0,07 %
- Urée : 8 M
- Tris 1 M/H₃P₀4, pH 6,8 : 0,125 M
- SDS à 20 % (m/v) : 0,1 %
- TEMED : 0,05 %
- Persulfate d'ammonium à 10 %
 (m/v) : 0,05 %
- Compléter à 10 ml avec l'eau bidistillée.

Avant dépôt, les échantillons sont traités 3 à 5 mn au bain-marie bouillant dans le tampon d'échantillon (urée 8 M, Tris 0,02 M/H₃P₀4, pH 6,8, bleu de bromophénol 0,01 %, SDS 1 %, β mercapto-éthanol 0,02 %). Un mélange de protéines témoin (Pharmacia AB) de masse moléculaire 17,2 kDa (myoglobine), 14,6 kDa (myoglobine I + II), 8,24 kDa (myoglobine I), 6,38 (myoglobine II), et 2,56 kDa (myoglobine III), et le mélange témoin précédent, utilisé en électrophorèse en gel de polyacrylamide 5 - 25 %, permettent d'avoir une très large échelle de masses moléculaires de référence.

Après 16 h de migration à 100 V, à température ambiante, dans un tampon (H₃P₀4 0,1 M, pH 6,8 obtenu à l'aide de Tris en poudre, SDS 0,1 %), le gel est coloré pendant 2 h sous agitation par le bleu de Coomassie à 0,25 % et la crocéin Scarlet à 0,1 % dans le mélange acide acétique 10 % - méthanol 10 % - eau 80 %. Puis le gel est partiellement décoloré dans des bains d'acide acétique 10 % - méthanol 10 % - eau 80 %. La détection des éventuels peptides radioactifs se fait par autoradiographie selon la technique précédemment décrite pour les électrophorèses en gel de polyacrylamide 5 - 25 % en milieu dénaturant.

2) Techniques immunologiques

a) Immunoprécipitation

Les produits traduits sont mis en présence d'anticorps dans le but d'obtenir d'éventuels immunoprécipités. Les anticorps choisis ont été :

- Anticorps polyclonaux dirigés contre certaines séquences de la préprocholécytokinine humaine :

1) Ab 1561 : dirigé contre l'extension amino terminale (acides aminés 86 - 90)

2) Ab 1700/3 : dirigé contre le site d'amidation (acides aminés 104 - 106) et les séquences adjacentes.

3) Ab 8007 : dirigé contre la séquence bioactive de carboxyamidation.

Ces anticorps ont été gracieusement fournis par le Professeur J.F. Rehfeld (University Department of Clinical Chemistry, Rigshospitalet, DK - 2100 Copenhagen, Denmark)

- Anticorps polyclonaux dirigés contre certaines séquences de la préprocholécytokinine de rat :

1) Ab 1940 : dirigé contre l'extrémité amino-terminale de la CCK 58

2) Ab 1578 : dirigé contre l'extension carboxy-terminale

3) Ab 67273 : dirigé contre la séquence amino-terminale de la CCK 39/33

Ces anticorps ont été gracieusement fournis par le Professeur M.C. Beinfeld (Department of Pharmacology, St Louis University Medical Center, St Louis, MO 63104, U.S.A.)

- Anticorps polyclonaux dirigés contre la dynorphine 1-17 et l' α -néo-endorphine de Mammifères. Ces anticorps ont été aimablement fournis sous forme de sérum par le Dr G. Tramu (Unité 156, I.N.S.E.R.M., Lille, France). Ces antisérums sont produits chez le lapin par injection d'antigène synthétique (Serva, Heidelberg) couplé à la sérum albumine humaine à l'aide du glutaraldéhyde.

- Anticorps monoclonaux dirigés contre une fraction active contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse chez Nereis virens. Ces anticorps ont été aimablement fournis par Mme Delaire-Hesdin, de notre laboratoire.

La technique d'immunoprécipitation utilisée est la suivante :

A 1 ml de tampon (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) on additionne 4 mg de protéine A sépharose (Pharmacia). La protéine A sépharose gonfle pendant 5 à 10 mn. Elle est centrifugée à 1600 x g dans une centrifugeuse de type Jouan pendant 1 mn. L'opération est répétée. On ajoute au culot 100 μ l d'anticorps (100 μ g) et 1 ml de l'échantillon dilué à tester (10 μ l d'échantillon + 990 μ l de tampon Tris, NaCl, méthionine non radioactive). L'ensemble est agité et mis à incuber 2 h à température ambiante, puis une nuit à 4°C. Dans le but d'une analyse électrophorétique, l'immunoprécipité éventuellement formé est récupéré par centrifugation et repris dans 1 ml de tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M. La suspension est centrifugée à 1600 x g. L'opération est répétée deux fois. Après lavage, l'immunoprécipité est repris dans 50 μ l du tampon d'échantillon de Laemmli (1970) ou de Burr et Burr (1983) et chauffé à 100°C pendant 3 à 5 mn.

b) Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose : technique dite de "western blot" ou d'immunotransfert

La technique de transfert des protéines sur la nitrocellulose est effectuée selon la méthode de Towbin et al.(1979). Après la séparation des produits traduits, par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS 5 - 25 % ou par électrophorèse de peptides en gel contenant de l'urée, les gels sont équilibrés pendant 30 mn dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 190 mM, méthanol 10 %, pH 8,3). Les feuilles de nitrocellulose (porosité 0,4 µm) sont découpées selon des dimensions légèrement supérieures à celles du gel et sont équilibrées dans le même tampon pendant 15 mn. La nitrocellulose doit être toujours manipulée avec des gants ou des pinces. Après avoir imbibé les éponges et le papier Whatman 3 de ce même tampon, l'empilement suivant est réalisé.

+ Anode

La formation de	-----	Eponge
	-----	Papier Whatman 3
bulles doit être	-----	Nitrocellulose
	-----	Gel
absolument évitée	-----	Papier Whatman 3
	-----	Eponge

- Cathode

Le transfert des protéines du gel à la nitrocellulose est réalisé à 45 V pendant 4 à 5 h à température ambiante. Les protéines transférées sont détectées par coloration dans le noir-amidon 0,1 %, méthanol 45 %, acide acétique 10 %. La

saturation des sites libres de la nitrocellulose se fait sous agitation pendant 2 h dans le tampon TBS (Tris 10 mM/HCl, pH 7,4, NaCl 150 mM) additionné de Tween 20 à 0,05 % et de lait Gloria écrémé en poudre à 5 %. La nitrocellulose est ensuite incubée avec les anticorps à tester ; ces derniers étant dilués dans 5 ml de tampon de saturation. Cette incubation se fait sous agitation pendant 2 h à température ambiante, puis une nuit à 4°C. La nitrocellulose est ensuite lavée pendant 10 mn, puis 4 fois 5 mn avec le tampon TBS - Tween 20. A la suite de ces lavages, la nitrocellulose incubée avec l'anticorps secondaire, marqué à la peroxydase, diluée dans 5 ml de tampon TBS - Tween 20, pendant 1 h 30 mn. Des lavages sont ensuite réalisés selon le mode précédent. La révélation des complexes immuns se produit pendant 10 mn dans le mélange 50 ml de TBS, 3 ml de 4 chloro-1-naphtol à 0,3 % dans le méthanol et 10 µl de H₂O₂. La nitrocellulose est finalement lavée à l'eau bidistillée, puis mise à sécher à l'abri de la lumière. Cette dernière risque de faire disparaître rapidement les éventuelles colorations obtenues au niveau des complexes immuns.

c) Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay)

α) Préparation des plaques de microtitration

Le test ELISA est réalisé sur plaque flexible de chlorure de polyvinyl (Falcon) à 96 puits. La surface des puits est recouverte par l'antigène dit "total". Cette fixation a lieu en ajoutant par puits 200 µl de l'échantillon contenant les produits traduits in ovo. Après une nuit de contact à 4°C (ou 3 h à température ambiante) la solution antigénique, qui contient encore environ 60 % d'antigènes, est récupérée. Les puits sont saturés par 200 µl de PBS

(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M) contenant 2 % de sérum albumine bovine (SAB) pendant 30 mn, puis lavés à l'aide de PBS à 0,1 % de SAB, 0,05 % Tween 20. La plaque est alors séchée à l'abri de la poussière, enveloppée d'un parafilm et conservée à 4°C. Parallèlement, on prépare un témoin négatif représenté par 100 µl de PBS.

β) Réalisation du test

100 µl d'anticorps à tester sont déposés dans les puits préparés selon la technique précédente. L'incubation dure 3 h à température ambiante (ou 2 h à 37°C ou une nuit à 4°C) après avoir recouvert la plaque. Cette dernière est alors lavée au moins 3 fois par 200 µl de PBS contenant 0,1 % de SAB, 0,05 % Tween 20. 100 µl de conjugué (sérum de mouton anti IgG de souris marqué à la peroxydase de chez Biosys) dilué dans le PBS au 1/10 000ème sont alors ajoutés. Après 2 h d'incubation à 37°C et plusieurs lavages soigneux en utilisant 200 µl de PBS à 0,1 % de SAB, 0,05 % Tween 20, on procède à la révélation de la réaction. Dans chacun des puits, on introduit 100 µl de substrat (9 mg d'OPD (Ortho-Phenyl-Diamine) dissous dans 25 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 5,5 additionné de 16 µl d'H₂O₂ à 30 vol). Après un contact de 30 mn à 37°C, la réaction est arrêtée par l'addition de 100 µl d'HCl 1 M par puits. L'intensité de la coloration est évaluée avec précision à l'aide d'un lecteur de plaque (modèle MR 700 de Dynatech).

X Technique immunohistochimique réalisée sur des prostomiums de Nereis diversicolor

Après dissection, les prostomiums sont préparés dans le but d'une réaction immunohistochimique en microscopie photonique.

a) Préparation des tissus

Les tissus sont fixés par immersion pendant 24 h dans le liquide de Bouin-Hollande sans acide acétique (pour 100 ml d'eau, on ajoute 2,5 g d'acétate de cuivre, 4 g d'acide picrique et 10 ml de formol neutralisé avec NaOH (4 g/l)) sublimé par l'addition d'une solution saturée de chlorure mercurique (concentration finale 10 %). La déshydratation est effectuée par passages successifs dans divers bains d'alcool (alcool 70, 30 mn ; alcool 96, 30 mn ; alcool 100, 1 h ; alcool 100, 2 h ; alcool butylique, 1 h ; alcool butylique, 1 nuit) ; on procède alors à l'imprégnation par la paraffine, puis à l'inclusion selon une orientation sagittale ou transversale dans des blocs de paraffine formés à l'aide des barres de Leuckart. Des coupes sériées et alternées de 7 μm sont confectionnées au microtome et disposées sur lame.

b) Réactions immunohistochimiques

Les cellules neurosécrétrices du cerveau de Nereis élaborent des substances apparentées à la cholécystokinine des Vertébrés (Engelhardt et al., 1982). La technique immunohistochimique de type indirect, utilisant des anticorps de Vertébrés dirigés contre des produits de neurosécrétion, permet de localiser les cellules qui synthétisent ces produits (Tramu et Dubois, 1977). Nous avons recherché une éventuelle immunoréaction sur coupes sériées en utilisant les anticorps dirigés contre le précurseur de la cholécystokinine de Mammifères.

La méthode utilisée est celle décrite par Engelhardt et al. (1982) et par Dhainaut-Courtois et al. (1985b). Après déparaffinage, les coupes sont immergées dans du tampon Coons pH 7,2 (Véronal sodique 2 g, NaCl 8,5 g, HCl 1 N 8 ml,

Natriumazide (NaN_3) 0,25 g), puis incubées 1 nuit à température ambiante en chambre humide avec l'antisérum spécifique de l'antigène recherché, dilué au 1/200^{ème} dans du tampon Coons. Après deux bains dans le tampon Coons, d'une durée totale de 10 mn, on procède à une seconde incubation avec un antisérum de mouton anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase de raifort dilué au 1/40^{ème} dans le tampon Coons. Cette incubation est réalisée pendant 1 h 30 mn en chambre humide à température ambiante. Après un rinçage dans le tampon Coons, l'activité de la peroxydase fixée est révélée par utilisation d'un mélange substrat-chromogène spécifique (H_2O_2 0,15 %, 4-chloro-1-naphtol (80 mg dissous dans 4 ml d'alcool absolu et dilué dans 200 ml de tampon Tris 0,1 M, pH 7,6)). Les lames sont rincées à l'eau distillée et montées avec de la glycérine.

Après avoir photographié les tissus dont certaines cellules sont immunoréactives, on procède à la décoloration des coupes pour réaliser une coloration histochimique. Dans ce but, la lamelle est décollée dans l'eau, puis la lame portant les coupes est plongée dans l'acétone afin d'éliminer le précipité bleu de chloronaphtol oxydé. Les coupes sont alors colorées selon la méthode modifiée de Clark (1955) : le chromotrope 2R du colorant de fond est remplacé par de l'hématoxyline de Groat.

XI Elaboration d'une banque d'expression à partir des ARNm de cerveaux de Nereis diversicolor

Précautions opératoires

Il est indispensable d'utiliser une vaisselle stérilisée à 200°C. Toutes les solutions et les matériels à usage unique en plastique siliconné sont autoclavés.

1) Préparation des ARNm poly(A)+

Les ARNm poly(A)+, extraits à partir de cerveaux de Ne-
reis diversicolor, sont centrifugés à 10 000 x g pendant 20
mn à 4°C. Le culot est alors lavé, sans remise en
suspension, par l'éthanol à 70 %. Cette opération est suivie
d'une centrifugation à 10 000 x g pendant 5 mn à 4°C. Le cu-
lot est asséché sous air comprimé, puis redissous dans un
minimum d'eau traitée par le DEPC (50 µl) ; 1 µl de cette
solution, dilué dans 500 µl d'eau, est utilisé pour une ana-
lyse spectrophotométrique des ARNm poly(A)+.

2) Synthèse du 1er brin d'ADN complémentaire (ADNc)

Le protocole expérimental, choisi pour l'élaboration de
cette banque d'expression, est celui préconisé par la socié-
té Amersham. 5 µg d'ARNm poly(A)+ sont utilisés pour synthé-
tiser le premier brin d'ADNc à l'aide de la transcriptase
réverse du virus de la myéloblastose aviaire.

Le mélange suivant est réalisé :

- Tampon 5 x de synthèse du 1er brin	10	µl
- Solution de sodium pyrophosphate	2,5	µl
- Inhibiteur de la ribonucléase (placenta humain)	2,5	µl
- Déoxynucléoside triphosphate	5	µl
- Oligo dT	2,5	µl
- (α .P32) dCTP (activité spécifique supérieure à 3000 Ci/mM - Amersham)	10	µl
- ARNm poly (A)+	2,5	µl (5 µg)
- Eau	10	µl
- Enzyme (transcriptase réverse)	5	µl (100unités)

	total	50 µl

La transcriptase réverse est ajoutée au dernier moment, après avoir agité puis centrifugé brièvement le mélange. La transcriptase réverse est ajoutée à ce dernier en quantité proportionnelle à celle d'ARNm utilisée (20 unités d'enzyme/ μg d'ARNm poly(A)+). La réaction est réalisée à 42°C pendant un minimum de 40 mn ; temps après lequel le mélange contenant le 1er brin d'ADNc est placé dans la glace.

3) Synthèse du 2ème brin d'ADNc

Au mélange contenant l'hybride ADNc/ARNm (50 μl), on ajoute :

- Tampon de synthèse du 2ème brin d'ADNc	93,5 μl
- (α .P32) dCTP (activité spécifique supérieure à 3000 Ci/mM - Amersham)	10 μl
- Ribonucléase H d' <u>E.coli</u>	5 μl
- ADN polynérase I d' <u>E.coli</u>	29 μl (115 unités)
- Eau	60,3 μl

L'échantillon est agité délicatement, incubé à 12°C pendant 60 mn, puis à 22°C pendant 60 mn. La réaction est ensuite interrompue par incubation de l'échantillon à 70°C pendant 10 mn. L'échantillon est brièvement centrifugé puis placé dans la glace. L'ADN polymérase du phage T4 est ensuite additionnée à l'échantillon à raison de 2 unités/ μg d'ARNm poly (A)+. L'enzyme, qui est à la concentration de 4,5 u/ μl , est ajoutée en quantité proportionnelle à celle d'ARNm poly(A)+, soit 10 unités (2,2 μl). L'échantillon est incubé à 37° pendant 10 mn. La réaction est interrompue par l'addition de 10 μl d'EDTA 0,25 M pH 8 et de 10 μl de SDS à 10 % par 100 μl du volume réactionnel final.

4) Extraction de l'ADNc double brin

Au milieu réactionnel final précédent contenant l'ADNc double brin, on ajoute un volume égal du mélange phénol/chloroforme (V/V) (le chloroforme utilisé est mélangé avec de l'alcool isoamylique en proportion 24 V/V). L'échantillon est agité jusqu'à la formation d'une émulsion, puis centrifugé 1 à 2 mn dans une microfuge. Cette centrifugation sépare deux phases. La phase supérieure est récupérée et la phase phénolique inférieure est reprise par 50 µl d'eau. L'ensemble est à nouveau agité puis centrifugé 2 mn dans la microfuge.

La nouvelle phase supérieure est ajoutée à la première et l'ensemble est traité par 2 volumes d'éther saturé d'eau. La phase supérieure étherée est éliminée à la suite d'une brève centrifugation et la phase inférieure est à nouveau traitée par l'éther. Ce dernier est éliminé par centrifugation. L'élimination de l'éther est achevée par évaporation sous flux d'air comprimé.

La précipitation d'ADNc bicaténaire est réalisée par l'addition d'un volume d'acétate d'ammonium 4 M et de 4 volumes d'éthanol à -20°C. L'échantillon est ensuite placé 1 h à -70°C, puis il est centrifugé à 10 000 x g pendant 30 mn à 4°C. Le culot est alors lavé à l'éthanol 70 %. A la suite d'une centrifugation à 10 000 x g qui dure 5 mn, le surnageant est éliminé ; le culot est asséché sous air comprimé, puis redissous dans 50 µl de tampon TE (Tris 10 mM, HCl pH 8, EDTA 1 mM). L'échantillon est précipité par 1 volume d'acétate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 4 M) et 2 volumes d'éthanol à -20°C.

5) Méthylation des sites Eco R1 d'ADNc

L'ADNc précédemment extrait est centrifugé 30 mn à

10 000 x g à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec l'éthanol à 70 % puis centrifugé 5 mn à 10 000 x g. Le culot est ensuite asséché sous air comprimé. L'enzyme de restriction Eco R1 est utilisée au cours des étapes nécessaires à l'insertion de l'ADNc double brin dans le vecteur λ gt 11. Il est donc nécessaire de protéger les molécules d'ADNc d'une hydrolyse au niveau des éventuels sites de restriction spécifiques de l'enzyme utilisée. Cette protection est réalisée par méthylation de la cytosine dans le palindrome spécifique GAATTC*. Avant d'accomplir cette protection, il est indispensable d'évaluer la concentration d'ADNc double brin synthétisé, car la concentration en méthylase est proportionnelle à la concentration d'ADNc. Après avoir déterminé la concentration d'ADNc (masse totale 4,8 μ g), on réalise le mélange suivant :

- ADNc (4,8 μ g)	9 μ l
- Tampon M	4 μ l
- Solution SAM (S - adénosyl- méthionine)	2 μ l

L'échantillon est agité délicatement, puis centrifugé quelques secondes. L'enzyme Eco R1 méthylase (20 u/ μ l) est ajoutée proportionnellement à la concentration d'ADNc (20 unités d'enzyme par μ g d'ADNc), soit 100 unités correspondant à 5 μ l d'enzyme. La réaction enzymatique est réalisée à 37°C pendant 60 mn, puis interrompue à 70°C pendant 10 mn. Cette deuxième étape inactive la méthylase. L'échantillon est précipité par 1 volume de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 4 M et 2 volumes d'éthanol. Après 1 h à -70°C, il est centrifugé à 10 000 x g pendant 30 mn à 4°C. Le culot est ensuite lavé par l'éthanol 70 %. Une centrifugation de 5 mn permet d'éliminer l'éthanol, et le culot est alors asséché sous air comprimé, puis redissous dans le tampon TE.

6) Addition des attaches contenant des sites de restriction Eco R1 (attaches dites "linkers Eco R1") à l'ADNc méthylé

La quantité des "linkers Eco R1" (0,5 µg/µl) doit être proportionnelle à la concentration d'ARNm poly(A)+ (1 µg/ 1 µg).

Le mélange suivant est réalisé :

- ADNc méthylé	: 5 µl
- Tampon de ligation L	: 3 µl
- "Linkers Eco R1"	: 10 µl

L'échantillon est mélangé, puis brièvement centrifugé. 5 unités (2 µl) d'ADN ligase du phage T4 sont ajoutés au volume réactionnel final. Après une agitation douce, la réaction est réalisée à 15°C pendant 16 à 20 h. L'inactivation de la ligase se fait par incubation du mélange réactionnel à 70°C pendant 10 mn. Une centrifugation de quelques secondes suit cette étape.

Deux témoins sont réalisés, en parallèle, pour éprouver l'efficacité de ce système : 1) témoin négatif : 5 µl (0,5 µg) d'ADN du phage λ gt 11 sans insert, 2) témoin positif : 2 µl (100 ng) de "bras" de gt 11 dont une extrémité possède une séquence cohésive après digestion par l'enzyme Eco R1

7) Hydrolyse des "linkers" au niveau des sites Eco R1

Au mélange (30 µl) contenant les molécules d'ADNc double brin pourvues de "linkers Eco R1" à leurs extrémités, on ajoute successivement :

- Tampon E	: 10 µl
- Eau	: 51,7 µl

Après avoir agité, puis centrifugé pendant quelques secondes l'échantillon, l'enzyme Eco R1 (60 u/ μ l) est ajoutée à raison de 100 u/ μ g d'ARNm poly(A)+, soit dans notre cas 500 u qui correspondent à 8,3 μ l d'enzyme. La réaction de digestion se déroule à 37°C pendant 5 h. Elle est arrêtée par incubation à 70°C pendant 10 mn.

8) Purification des molécules d'ADNc sur colonne de chromatographie

La colonne de purification utilisée et le protocole expérimental mis en oeuvre sont fournis par la société Amersham. La colonne est équilibrée par deux passages de 3 ml de tampon STE (Tris/HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 300 mM). Cet équilibrage doit durer environ 30 mn. L'échantillon (100 μ l) est déposé sur le gel, et après pénétration dans ce dernier, on ajoute 100 μ l de tampon STE.

La solution éluée est récupérée dans le tube 1. L'addition de 200 μ l de tampon STE permet de collecter une nouvelle solution éluée dans le tube 2. Cette étape est répétée jusqu'au 10ème tube. La radioactivité présente dans chaque tube est alors mesurée et les solutions radioactives sont rassemblées, puis les molécules d'ADNc sont précipitées par 1 volume d'acétate d'ammonium 4 M et 2,5 volumes d'éthanol pur.

9) Ligation de l'ADNc aux "bras du vecteur" λ gt 11

On dénomme "bras du vecteur" les éléments situés de part et d'autre de l'unique site Eco R1 du vecteur, site localisé dans la partie 3' terminale du gène de la β - galactosidase. L'ADNc est centrifugé à 10 000 x g pendant 30 mn à 4°C ; le culot obtenu est lavé par l'éthanol à 70 %. Après une brève centrifugation de 5 mn, le culot est asséché, puis remis en suspension dans le tampon TE.

L'ADNc possède des extrémités cohésives depuis l'hydrolyse des "linkers" aux sites Eco R1 (voir paragraphe 7 précédent), qui vont lui permettre de s'insérer dans l'ADN du vecteur phagique λ gt 11.

Une nouvelle évaluation de la concentration d'ADNc est nécessaire pour augmenter l'efficacité de la ligation.

- ADNc	1 μ l (100 ng)
- "Bras λ gt 11"	2 μ l
- Tampon de ligation	1 μ l
- Eau	5 μ l

L'ensemble est agité doucement puis centrifugé quelques secondes. La ligase du phage T4 est ensuite additionnée à raison de 2,5 unités (1 μ l) et la réaction est effectuée à 15°C pendant 16 à 20 h.

Nous avons confectionné deux lots identiques de milieux de ligation aux "bras λ gt 11". Le dédoublement de cette étape est réalisé dans le but de permettre l'empaquetage de l'ADN phagique recombiné in vitro dans deux systèmes commercialisés : système Amersham et système Gigapack. En effet, cet empaquetage est une étape délicate, et nous avons recherché à augmenter nos chances de réussite dans l'élaboration de cette banque d'ADNc.

Après une brève centrifugation, 1 μ l d'acétate d'ammonium 4 M et 27 μ l d'éthanol absolu sont ajoutés dans chacun des échantillons (témoins + expériences). Ces derniers, après agitation, sont placés pendant 15 mn dans un bac contenant un mélange éthanol/glace. Après une centrifugation à 10 000 x g pendant 15 mn, les culots sont rapidement asséchés sous air comprimé.

L'échantillon d'ADNc utilisé pour l'empaquetage dans le système Amersham est redissous dans 5 μ l de tampon TE, et celui utilisé pour l'empaquetage dans le système Gigapack est redissous dans 4 μ l de tampon TE.

10) Empaquetage in vitro de l'ADN phagique recombiné in vitro

Deux systèmes d'empaquetage ont été utilisés : le système commercialisé par Amersham et celui nommé Gigapack par la société Génofit.

a) Empaquetage dans le système "Amersham"

10 μ l d'un extrait A (tube bleu), puis 15 μ l d'un extrait B (tube jaune) sont ajoutés aux 5 μ l du milieu contenant l'ADNc. L'ensemble est brièvement centrifugé et incubé à 20°C pendant 2 h. Le témoin positif et le témoin négatif sont empaquetés dans les mêmes conditions.

b) Empaquetage dans le système "Gigapack"

4 μ l de l'échantillon d'ADNc sont immédiatement ajoutés à un milieu contenu dans un tube signalé dans le "kit" par sa couleur rouge, préalablement placé dans la glace. 15 μ l d'un autre milieu (tube jaune du "kit") sont rapidement ajoutés au mélange précédent. L'ensemble est brièvement centrifugé puis incubé à 22°C pendant 2 h.

Un témoin positif, utilisé pour tester l'efficacité du milieu d'empaquetage dans le système Gigapack a été réalisé. Dans ce but, l'ADN natif du virus λ sauvage commercialisé est dissous dans 10 μ l d'un tampon Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM pendant une nuit : 1 μ l (environ 0,2 μ g d'ADN) de cette solution est utilisée pour l'élaboration de ce témoin.

Après l'achèvement des processus d'empaquetage, 500 μ l de tampon SM (NaCl 5,8 g, MgSO₄7H₂O 2 g, Tris 6,05 g/HCl pH 7,5, 5 ml de gélatine à 2 %) et 10 μ l de chloroforme sont ajoutés à l'échantillon final. Ce dernier peut être stocké à 4°C comme des phages élaborés in vivo.

11) Titrage de la banque d'ADNc

a) Obtention de bactéries compétentes

La souche d'E.coli (Y1090) est utilisée en phase exponentielle de croissance après réactivation de bactéries congelées. Le milieu de culture des bactéries est le liquide LB (Luria Bertani) ("Bacto-tryptone" 10 g, "Bacto yeast extract" 5 g, NaCl 10 g, compléter à un litre avec de l'eau très pure (système d'eau milli-Q, Watters Millipore), pH 7,5 avec NaOH) contenant 35 µg/ml d'ampicilline. Le milieu contenant les bactéries est placé sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique d'environ 0,7. Ces bactéries en phase exponentielle de croissance sont centrifugées à 3000 x g pendant 15 mn à température ambiante. Le culot contenant les bactéries est suspendu dans une solution de MgSO₄ à 10 mM ; la quantité de cette solution est telle que la D.O. finale est environ 2. Les bactéries sont alors placées 1 h à 37°C avant leur utilisation ; le surplus peut être conservé à 4°C pendant 1 à 2 jours.

b) Préparation de la gélose dite "molle" pour le titrage de la banque

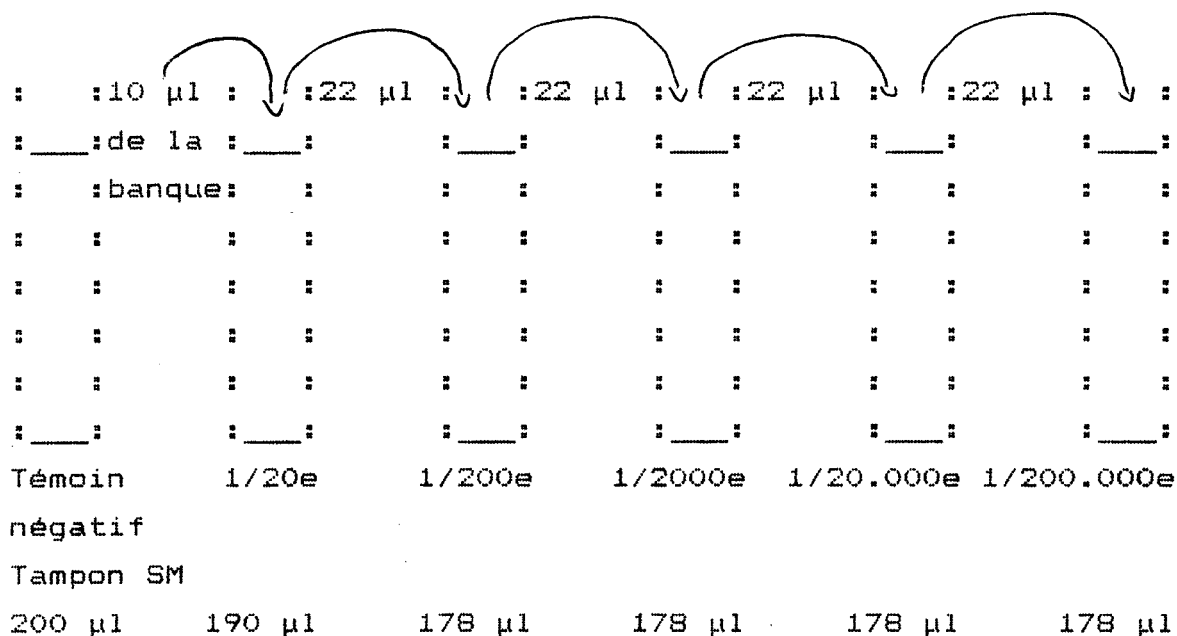
La gélose dite "molle" est répandue sur une boîte de Pétri dont le fond est recouvert d'agar solide (milieu LB contenant de l'agar à 1,5 % et de l'ampicilline à 75 µg/ml). Cette gélose consiste en un milieu LB contenant 0,8 % d'agarose et 10 mM de Mg SO₄.

Pour 20 ml de gélose "molle" on ajoute :

- 160 µl à 100 mM d'IPTG (Isopropyl-thio-galactopyranoside) de chez IBI
- 200 µl à 49 mM de X-gal X-gal(5 bromo - 4 chloro-3 indolyl galactoside) (Boehringer) est un substrat de la β-galactosidase. X-gal doit être dissous dans du diméthyl formamide.

c) Détermination du titre de la banque

La détermination du titre d'une banque est l'évaluation du pourcentage de phages recombinés in vitro. On réalise une dilution de la banque par entraînement.



A 100 µl de chaque dilution, on ajoute ensuite 100 µl de bactéries compétentes. La phase de fixation des phages sur les bactéries dure 20 mn. 3 ml de gélose "molle" maintenue à 60°C est ajoutée dans chaque tube contenant le mélange phages - bactéries en milieu SM. L'ensemble est rapidement mélangé, puis coulé sur une boîte de Pétri dont le fond est recouvert d'agar additionné d'ampicilline à 75 µg/ml (milieu LB + 1,5 % d'agar). Les boîtes de Pétri sont placées à 37°C pendant une nuit.

12) Amplification de la banque d'expression

Nous avons choisi une dilution de la concentration en phages qui nous permette d'avoir une confluence des plages

de lyse sur des boîtes de Pétri. Cette dilution a été évaluée au 20ème. Nous avons donc préparé une série de 30 tubes de la façon suivante : à 100 µl de la suspension diluée de phages sont additionnés 100 µl d'une suspension de bactéries compétentes ; le contact bactéries - phages dure 20 mn à la température ambiante. 3 ml de gélose "molle" (sans IPTG, ni X-gal) sont ajoutés respectivement à chaque tube préparé ; ce mélange est rapidement coulé sur une boîte dont le fond est recouvert d'agar solide. Les 30 boîtes de Pétri sont alors placées à 37°C jusqu'à l'obtention de la confluence des plages de lyse. 5 ml de tampon SM sont alors répandus à la surface de la gélose des boîtes qui sont placées sur un agitateur tridimensionnel pendant 3 h à 4°C. A la suite de cette opération, les surnageants de tampon SM contenant les phages sont rassemblés puis additionnés de 500 µl de chloroforme. Ce dernier permet une bonne conservation des phages. L'ensemble est agité 15 mn à 37°C, puis centrifugé à 4000 x g pendant 10 mn. Cette centrifugation élimine les gros débris d'agarose et de bactéries. Le surnageant contenant les phages est prélevé et additionné de 200 µl de chloroforme. L'ensemble peut être conservé à 4°C pendant plusieurs semaines. Il est alors nécessaire d'évaluer la nouvelle teneur en phages de la banque amplifiée ; nous avons procédé comme précédemment (voir paragraphe 11-c).

13) Détection des protéines de fusion d'intérêt ou "screening" de la banque d'ADNc

a) Epuisement des anticorps utilisés pour le "screening" de la banque

1er épuisement

Cette opération est effectuée dans le but d'éliminer les anticorps élaborés contre des protéines totales d'E.coli par l'animal immunisé. Une colonie de bactéries (souche Y1090), reprise d'une boîte de Pétri ensemencée, est relancée dans environ 800 ml de milieu LB additionné d'ampicilline (75 µg/ml). La suspension bactérienne est placée à 37°C pendant une nuit sous agitation, jusqu'à l'obtention d'un bouillon de culture très riche. Les bactéries sont alors centrifugées à 3000 x g pendant 15 mn et le culot de bactéries est repris dans 30 ml de tampon PBS. (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Le mélange est congelé à -70°C, décongelé puis soumis aux ultra-sons. Cette opération est répétée 2 fois dans le but de faire éclater les bactéries. A 50 µl de sérum, on ajoute 500 µl de lysat de bactéries et 500 µl de tampon PBS. Le mélange est agité 1 h à 4°C, puis il est centrifugé à 10 000 x g pendant 15 mn. Le surnageant contenant les anticorps est soumis à un 2ème épuisement.

2ème épuisement

Dans une boîte de Pétri, dont le fond est recouvert de milieu LB additionné d'agar (1,5 %) et d'ampicilline (75 µg/ml), on coule 5 ml d'une culture d'E.coli en phase exponentielle de croissance. Un filtre de nitrocellulose est ensuite placé sur la culture bactérienne. Les boîtes sont incubées à 37°C jusqu'à la formation d'un tapis bactérien à la surface du filtre. Ce dernier est ensuite mis en contact avec une feuille de papier Wathman 3 imbibée de SDS à 1 % pendant 30 mn. Le filtre est déposé dans une boîte de Pétri

placée dans une enceinte saturée en chloroforme pendant 15 à 30 mn. Puis, on lave les filtres 3 fois pendant 10 mn dans un tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05 %. Les filtres ainsi préparés peuvent être stockés à 4°C avant de servir au 2ème épuisement des anticorps. Ces derniers sont alors mis en présence des filtres dans une boîte de Pétri placée sur un agitateur tridimensionnel pendant 1 à 2 h. Après ce temps, les anticorps ainsi épuisés sont utilisés pour le criblage de la banque d'ADNc.

b) Préparation des filtres de nitrocellulose imprégnés d'IPTG, utilisés pour le transfert des protéines de fusion

L'IPTG est préparé à 100 mM, mais utilisé à 10 mM. Les filtres de nitrocellulose sont imbibés, un par un, dans une solution d'IPTG à 10 mM. Les filtres de 85 cm de diamètre (Cera Labo, diamètre des pores 0,45 µm) sont séchés à la température ambiante sur un papier d'aluminium. Ils se conservent à 4°C dans une boîte de Pétri close.

c) Criblage ou "screening" de la banque

Les anticorps utilisés pour cribler la banque d'ADNc sont d'une part ceux dirigés contre le précurseur de la CCK de Mammifères, et d'autre part ceux dirigés contre l'-néo-endorphine et contre la dyn 1 - 17 de Mammifères.

La banque est criblée en choisissant une dilution de phages qui permet d'obtenir des plages de lyse nombreuses mais isolées. Dans notre situation, la dilution convenable est au 100ème.

Nous avons préparé une série de 30 tubes bouchés dans lesquels sont introduits 100 µl d'une suspension de phages diluée au 100ème et 100 µl d'une culture de bactéries compétentes. L'infection des bactéries par les phages est réalisée au cours d'une période de 20 mn. Après cette étape, nous avons ajouté dans chacun des tubes, 3 ml de gélose

"molle" à 60°C. L'ensemble du contenu est agité, puis rapidement coulé sur une boîte d'agar préalablement préparée.

Les 30 boîtes de Pétri incubent pendant 2 à 3 h dans une étuve à 42°C. Quand les plages de lyse commencent à apparaître, les filtres imprégnés d'IPTG sont placés à la surface de la gélose "molle" solidifiée. Cette opération est réalisée en évitant la formation de bulles d'air qui empêche un bon contact entre la gélose et le filtre. Les boîtes incubent à 37°C pendant 4 à 5 h. Après ce temps d'incubation, les filtres sont numérotés et des perforations servant de repères sont confectionnées à l'aide d'une aiguille à la surface des boîtes de Pétri. Les filtres ainsi marqués sont alors mis dans une cuvette contenant un tampon de lavage (Tris 10 mM, pH 8, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05 %), est placée à 4°C, sous agitation, pendant 1 nuit.

La saturation des filtres en protéines non spécifiques est réalisée pendant 30 mn dans un tampon dit de "saturation" (Tris 10 mM, pH 8, NaCl 0,15 M, lait Gloria écrémé en poudre 5 %). Chaque filtre ainsi traité est placé dans une boîte de Pétri et est recouvert par 5 ml d'une solution d'anticorps spécifique d'une protéine d'intérêt diluée au 100ème dans le tampon de saturation.

Les boîtes sont placées sur un agitateur tridimensionnel pendant 2 à 3 h à température ambiante. A la suite de cette incubation, les filtres subissent 3 lavages de 10 mn dans le tampon Tris, NaCl, Tween 20. Chaque filtre incube alors dans une solution d'anticorps de lapin marqués à la peroxydase, solution diluée au 2000ème. Cette incubation, sous agitation, dure 1 h à la température du laboratoire. 3 lavages de 10 mn permettent d'éliminer les adsorptions non spécifiques de l'anticorps marqué à la peroxydase. La dernière étape consiste à mettre les filtres en contact avec le substrat (péroxyde d'hydrogène) et avec un chromogène (le 4-

chloro-1-naphtol de chez Biorad) : 60 mg de 4-chloro-1-naphtol sont dissous dans 20 ml de méthanol froid (4°C) ; on ajoute 100 ml de tampon PBS (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 10 mM pH 7,2 NaCl 0,15 M) ; 60 µl de H₂O₂ à 30 % sont additionnés au mélange précédent.

La révélation des filtres, qui est la manifestation de la réaction enzymatique de la peroxydase vis à vis de son substrat, dure 15 mn à la température ambiante. Les filtres sont alors lavés à l'eau bidistillée, puis séchés à l'abri de la lumière. Une coloration en violet foncé de certaines traces de plages de lyse permet de déduire que la protéine de fusion transférée, exprimée par des bactéries infectées par un phage recombiné, a été reconnue par l'anticorps utilisé.

Le filtre est confronté à la boîte de Pétri utilisée pour la culture. Grâce aux marques pratiquées précédemment à l'aide d'une aiguille, il est possible de repérer les plages de lyse intéressantes. Un bâtonnet stérile sert au prélèvement des phages par piqûre au sein du clone repéré. Les phages sont alors dispersés dans le milieu SM et peuvent être conservés à 4°C pendant plusieurs semaines. Pour une conservation prolongée des clones, une goutte de chloroforme est ajoutée à la suspension des phages.

RESULTATS

I Les ARNm extraits du cerveau de Nereis diversicolor : caractéristiques et capacité informative

A - Analyse des ARNm

Les expériences réalisées dans ce travail sont fondées sur la pureté et la qualité des ARNm isolés.

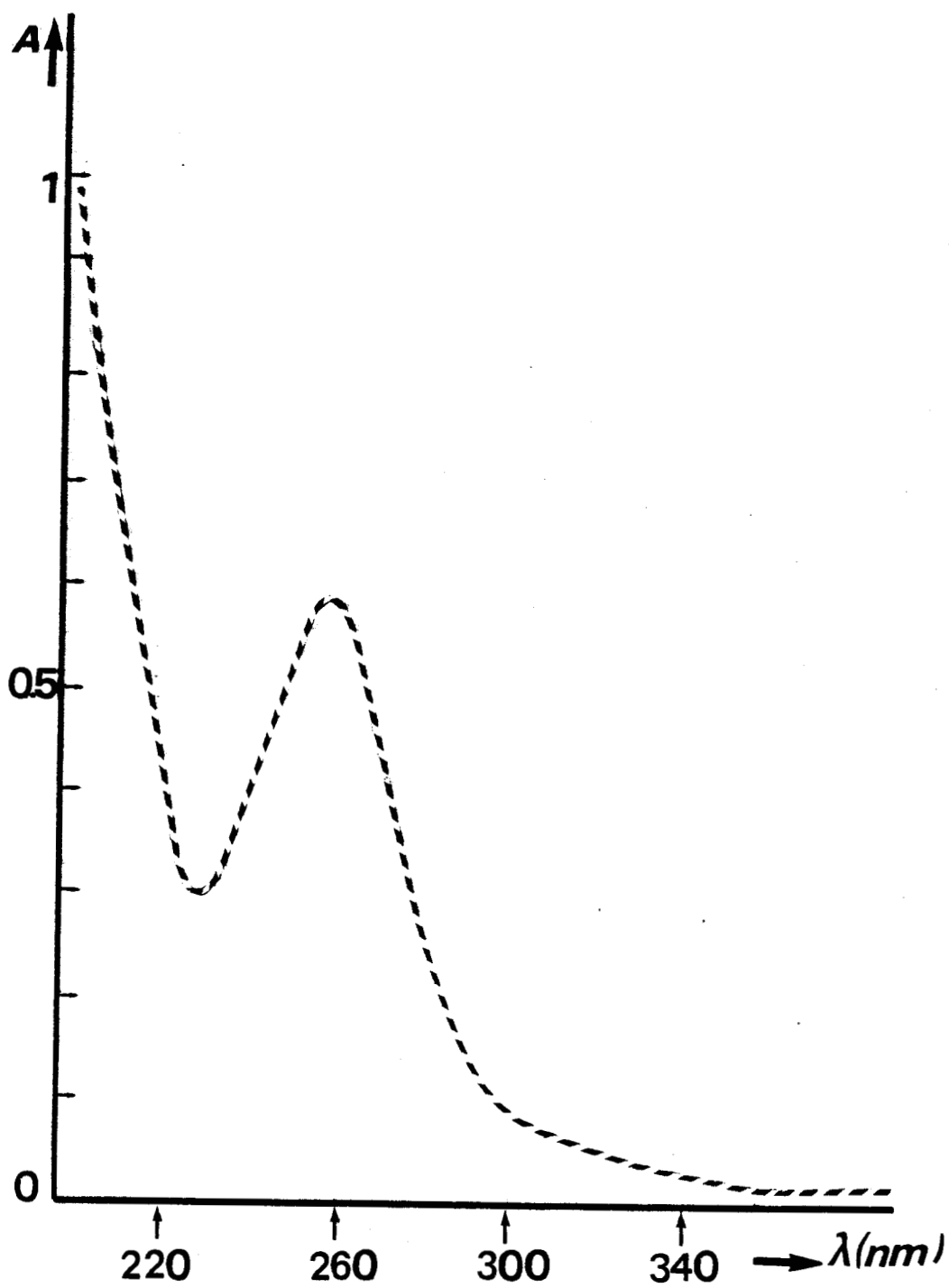
Les ARNm purifiés par un traitement au LiCl, suivi d'une chromatographie d'affinité sur colonne d'oligo-dT cellulose, sont finalement dissous dans un minimum d'eau traitée par le DEPC. Un aliquot de cette solution d'ARNm est utilisé pour une analyse spectrophotométrique (fig 3).

La courbe d'absorbance (A) des ARNm extraits de prostomiums en fonction de la longueur d'onde (λ) montre un maximum d'absorbance situé à 260 nm. Les rapports des densités optiques voisins de 2, densités optiques enregistrées à 260 et à 230 nm d'une part et à 260 et à 280 nm d'autre part, indiquent que les molécules d'ARN ont été correctement purifiées. Leur bon état de conservation est prouvé par une électrophorèse en gel d'agarose-méthylmercure.

B - Comparaison des produits traduits en lysat de réticulocytes de lapin à partir des ARNm extraits de prostomiums et à partir des ARNm extraits de cerveaux de Nereis diversicolor

Dans le but de faire une comparaison entre la totalité des produits traduits à partir d'un lot d'ARNm isolés de cerveaux et la totalité des produits traduits à partir d'un lot d'ARNm extraits de prostomiums, nous avons utilisé des femelles dont les ovocytes ont un diamètre inférieur à 80 μm . Afin de parfaire la similitude entre les animaux, nous

Figure 3. Courbe d'absorbance (A) d'une solution d'ARNm poly(A)+ extraits de prostomiums de Nereis diversicolor, en fonction de la longueur d'onde (). Le maximum d'absorbance est situé à 260 nm.



*FIG. 3

avons pratiqué nos expériences sur des animaux récoltés au cours d'une même marée. Enfin, les deux lots d'ARNm étudiés ont été isolés à partir du même nombre d'animaux (300). Les ARNm des deux lots ont été traduits simultanément dans deux fractions de lysat de réticulocytes de lapin provenant du même "kit". Les produits traduits, marqués par la méthionine-S35 ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide 5 - 25 %, SDS. Les polypeptides nouvellement synthétisés ont été détectés par autoradiographie.

La comparaison entre la totalité des produits traduits à partir des ARNm de cerveaux et la totalité des produits traduits à partir des ARNm de prostomiums ne permet de distinguer aucune différence entre les autoradiogrammes illustrant les deux types d'expériences. Dans les deux cas, les mêmes produits, de masse moléculaire comprise entre 15 et 120 kDa, ont été traduits (fig 4). Les enregistrements densitométriques, tracés à partir des autoradiogrammes, facilitent la comparaison des résultats et confirment notre déduction précédente (fig 5).

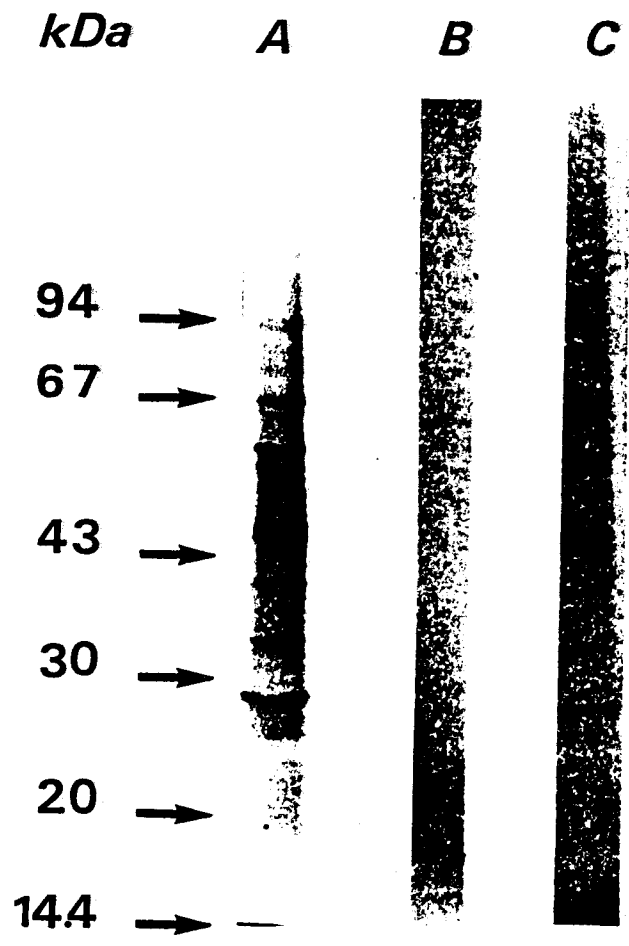
La part des ARNm provenant des cellules étrangères au cerveau paraît donc négligeable. Par ailleurs, la reproductibilité de ce résultat nous a conduit à simplifier nos dissections en les réduisant à l'isolement des prostomiums des animaux.

C - Etude quantitative des polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin

Chez les Néréidiens, Porchet (1970) et Durchon et Porchet (1971) ont montré que la production hormonale du cerveau régresse progressivement et "s'annule" à l'approche de la période de reproduction. Nous avons donc tenté de mettre en évidence des variations qualitatives et/ou quantitatives

Figure 4. Autoradiogramme obtenu à partir d'un gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS, après migration des polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin. Traduction des ARNm extraits de prostomiums (piste A) et traduction des ARNm extraits de cerveaux (piste C) de Nereis diversicolor. La piste B correspond au "témoin eau" : eau bidistillée additionnée au milieu d'incubation.

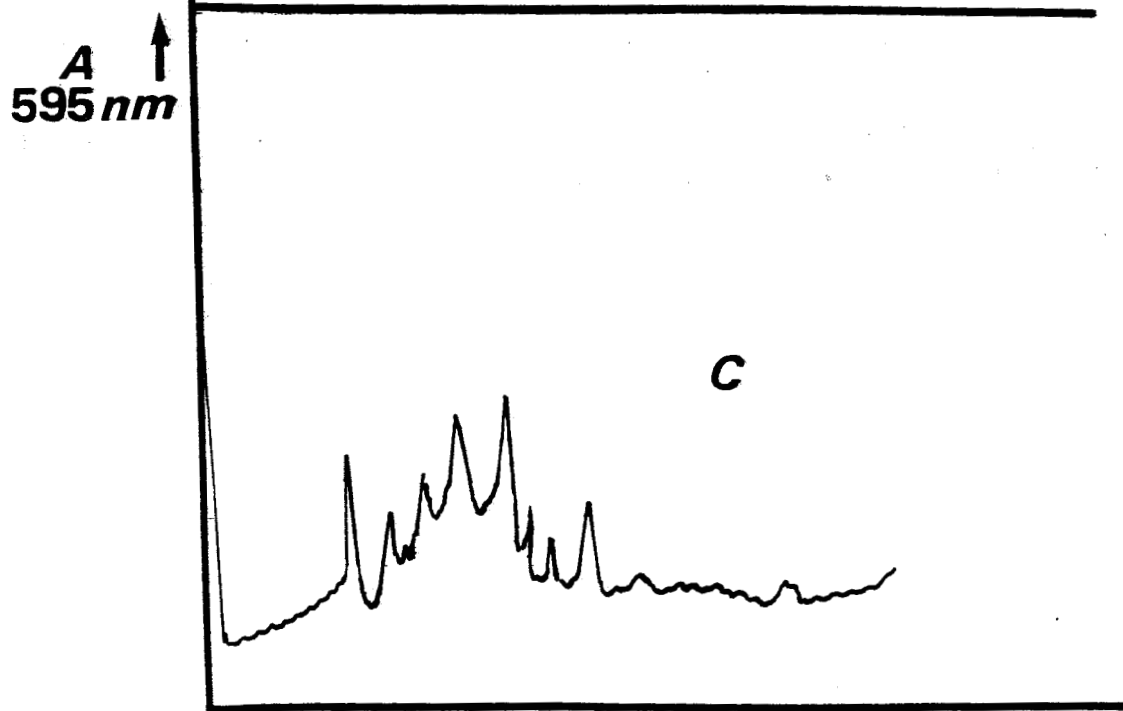
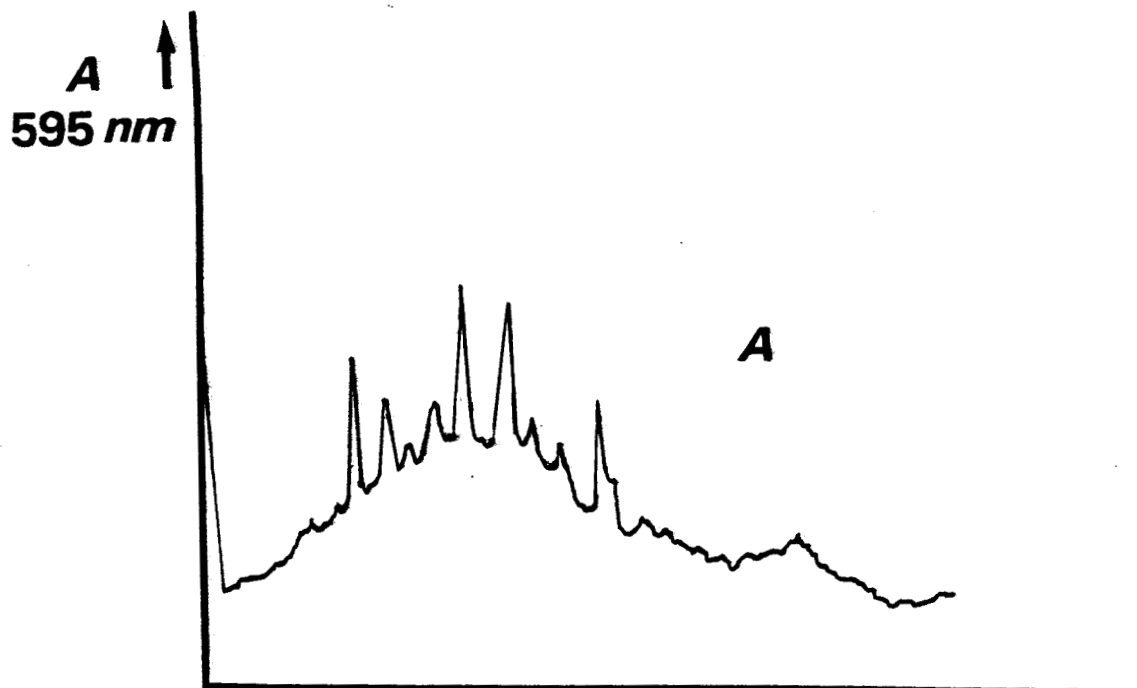
La comparaison des produits traduits à partir des ARNm de prostomiums et à partir des ARNm de cerveaux ne met en évidence aucune différence entre les autoradiogrammes illustrant les deux types d'expériences.



* FIG. 4

Figure 5. Enregistrements densitométriques de l'autoradiogramme du gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS, de la figure 4. Les graphes A et B représentent respectivement les pistes A et C de la figure 4.

On note la bonne correspondance entre les pics homologues des enregistrements A et B.



↑ 94 67 43 30 20 14.4

→ migration (kDa)

* FIG. 5

des polypeptides synthétisés in vitro, en fonction de l'âge de l'animal. Dans ce but, les ARNm ont été extraits à partir de prostomiums d'animaux appartenant à trois périodes différentes de maturation :

- très jeunes animaux dont le sexe est indéterminable.
- femelles dont les ovocytes ont un diamètre inférieur à 80 μm
- femelles dont les ovocytes ont un diamètre supérieur à 116 μm

Les expériences sont menées en parallèle et pour chacun des trois lots 300 animaux ont été sacrifiés. Les ARNm de chacun des trois lots ont été traduits simultanément en lysat de réticulocytes de lapin. Une évaluation quantitative globale du pouvoir informatif des ARNm isolés des prostomiums peut être apportée par la détermination de la radioactivité contenue dans les protéines nouvellement synthétisées. De plus, une détermination qualitative et/ou quantitative du pouvoir informatif des ARNm peut être obtenue à partir de l'analyse des protéines séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 5 - 25 %, SDS, puis autoradiographie.

1) Evaluation quantitative globale du pouvoir informatif des ARNm déterminée par le décompte de la radioactivité contenue dans les protéines nouvellement synthétisées

Une information globale sur les éventuelles synthèses in vitro de protéines peut être obtenue en évaluant l'incorporation de la méthionine- ^{35}S à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (détection de rayonnements B), qui mesure la radioactivité totale contenue dans les échantillons.

Des évaluations de radioactivité ont donné les valeurs suivantes :

Pour 1 μ l de milieu d'incubation, nous avons obtenu

- 1) Témoin négatif dit "témoin eau"
(eau additionnée au milieu d'incubation) 8000 +/- 200 cpm
- 2) Témoin positif (ARNm de TMV ajouté
au milieu d'incubation) 300 000 +/- 4000 cpm
- 3) Animaux de sexe indéterminable 142 000 +/- 2000 cpm
- 4) Femelles dont les ovocytes ont un
diamètre inférieur à 80 μ m 104 000 +/- 2000 cpm
- 5) Femelles dont les ovocytes ont un
diamètre supérieur à 116 μ m 66 000 +/- 2000 cpm

Les mesures de radioactivité décelée dans chacun des échantillons 3,4 et 5 sont très différentes de celles contenues dans le "témoin eau". Ces résultats témoignent du grand pouvoir informatif des ARNm isolés pour nos expériences. De plus, on constate que le nombre de cpm décompté s'abaisse de l'expérience 3 à l'expérience 5 ; cette diminution révèle la décroissance de la synthèse globale de protéines au cours du vieillissement de l'animal.

2) Détermination qualitative et/ou quantitative du pouvoir informatif des ARNm par l'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide 5 - 25 %, SDS, des polypeptides traduits in vitro

a) Autoradiogrammes des électrophorèses

Les différents polypeptides traduits in vitro, à partir des ARNm des prostomiums de Nereis diversicolor appartenant aux trois stades précédemment décrits, ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS. La détection

des polypeptides nouvellement synthétisés est réalisée par autoradiographie. Une comparaison du résultat des expériences (pistes A, B et C, fig 6) à celui du "témoin eau" (piste D, fig 6) indique une synthèse active des protéines à partir des ARNm isolés. Ces produits possèdent une masse moléculaire comprise entre 15 et 120 kDa (fig 6). En outre, on peut constater que l'intensité de l'image autoradiographique, produite par certains polypeptides traduits à partir des ARNm de prostomiums d'animaux dont le sexe est indéterminable, diminue au niveau de ces mêmes produits traduits à partir d'ARNm isolés d'animaux plus âgés (pistes A, B et C, fig 6). Très peu de polypeptides sont synthétisés à partir des ARNm des vers dont les ovocytes ont un diamètre supérieur à 116 μm (piste C, fig 6).

b) Enregistrements densitométriques des autoradiogrammes

L'enregistrement densitométrique des autoradiogrammes illustrant les expériences précédentes confirme et permet de mieux analyser la diminution progressive de l'abondance des produits traduits in vitro en fonction de l'âge de l'animal (graphes A, B et C, fig 7). Certains polypeptides ne sont plus représentés après la traduction des ARNm isolés de prostomiums d'animaux dont les ovocytes ont un diamètre supérieur à 116 μm (graphe C, fig 7). En fait, ces analyses de polypeptides reflètent une diminution progressive de la synthèse d'ARNm au cours de la vie de l'animal ; nous avons donc choisi d'utiliser des animaux jeunes, animaux dont le sexe n'est pas encore déterminable ou femelles dont les ovocytes ont un diamètre inférieur à 80 μm , pour la suite de notre expérimentation.

Figure 6. Autoradiogramme obtenu à partir d'un gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS, après migration des polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin. Traduction des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor :

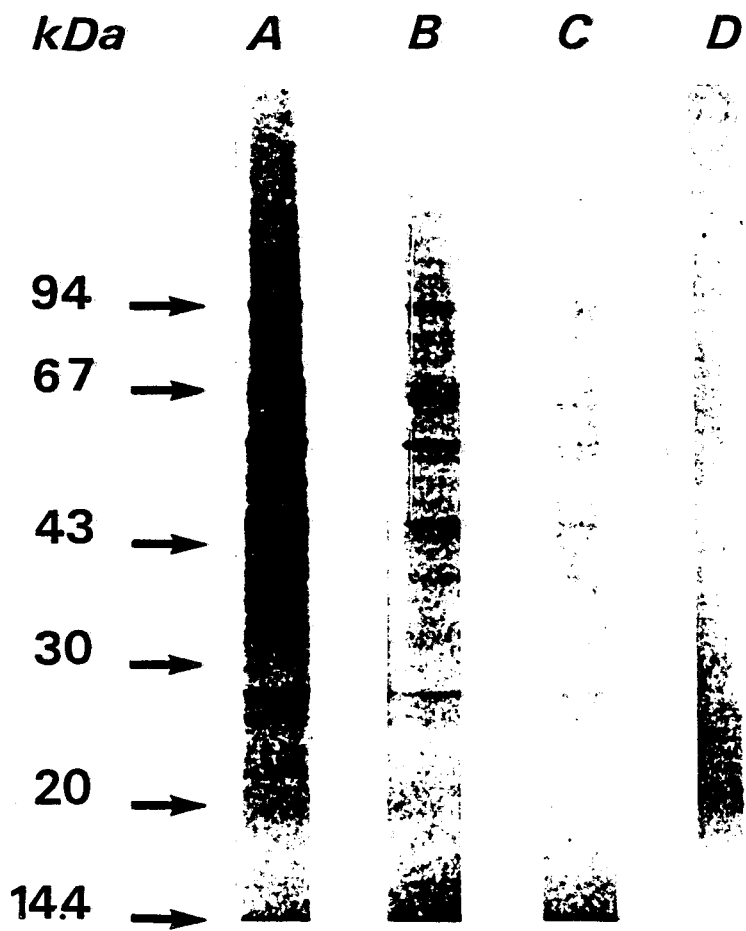
piste A : Animaux dont le sexe est indéterminable

piste B : Animaux dont les ovocytes sont inférieurs à 80 μm .

piste C : Animaux dont les ovocytes sont supérieurs à 116 μm .

piste D : Témoin "négatif" de traduction, dit "témoin eau".

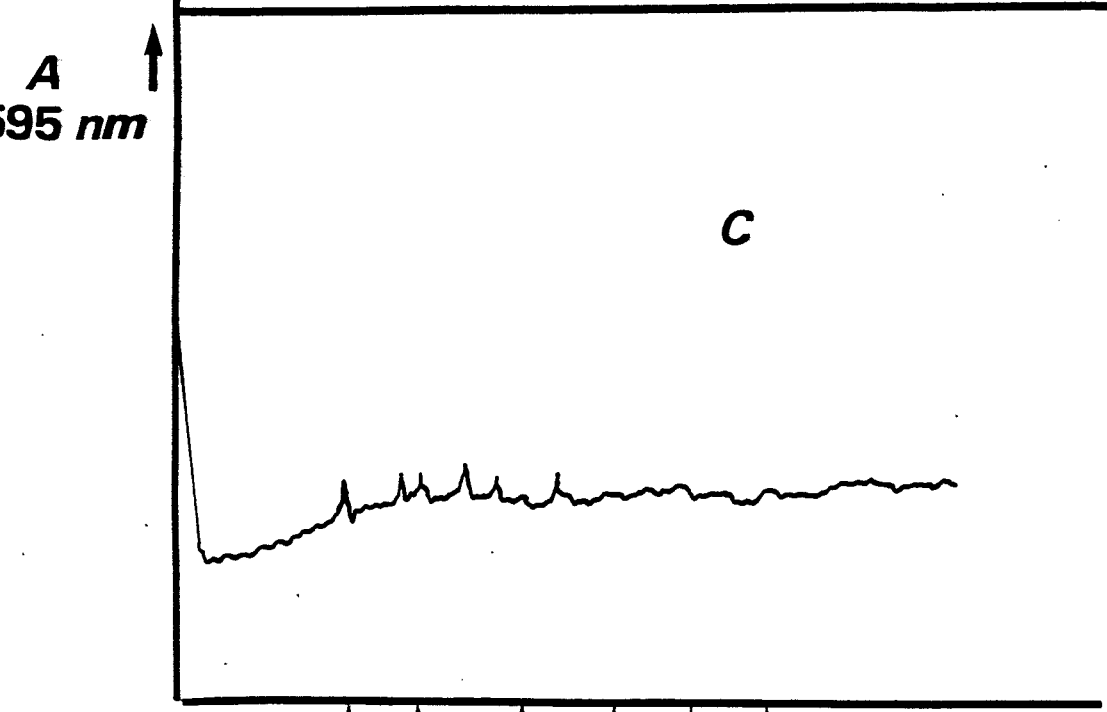
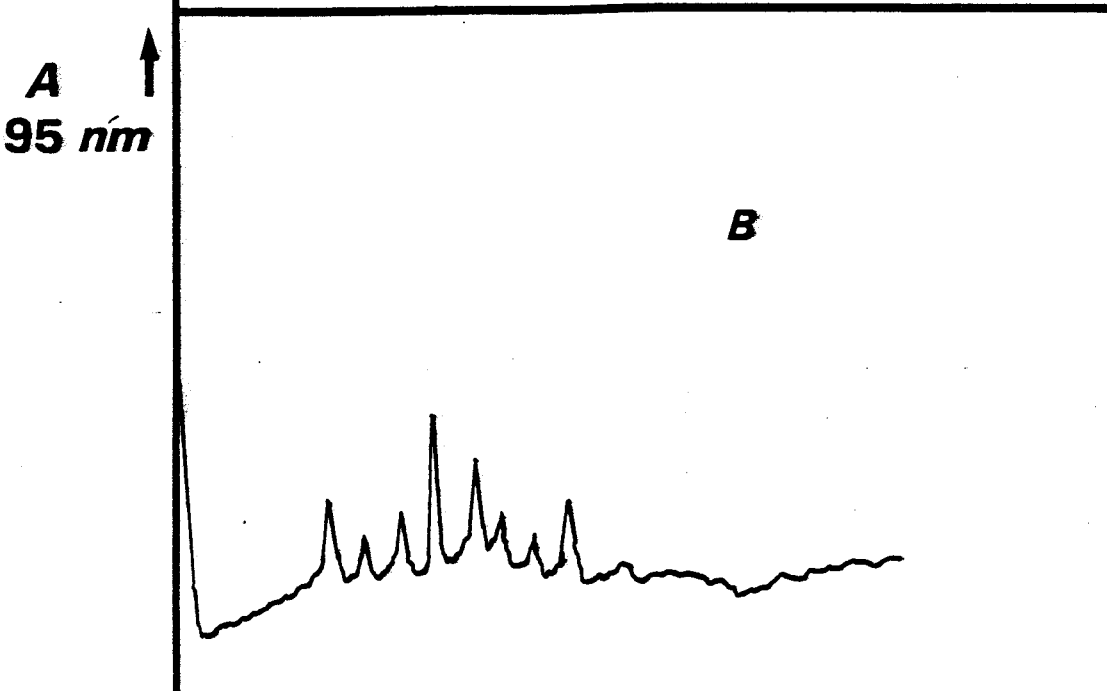
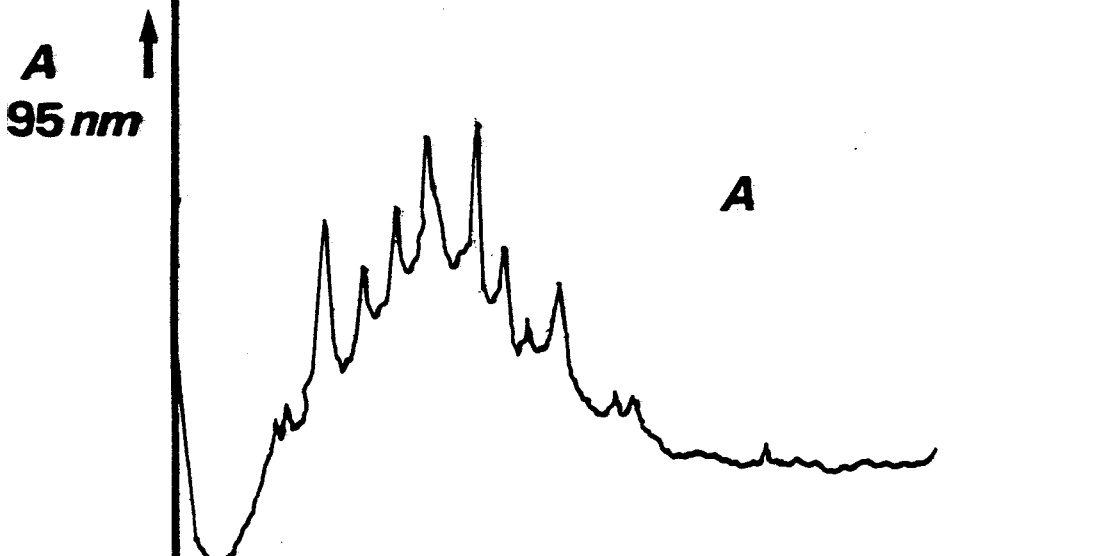
Ces résultats mettent, sans ambiguïté en évidence une réduction de la synthèse in vitro des polypeptides, à partir des ARNm d'origine cérébrale des animaux âgés. Ils reflètent probablement une diminution progressive de la transcription dans le cerveau au cours de la vie de l'animal. Ces données confortent la conclusion déjà avancée d'une réduction de l'activité cérébrale des animaux âgés.



***FIG. 6**

Figure 7. Enregistrements densitométriques de l'autoradiogramme du gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS, de la figure 6. Les lettres A, B et C correspondent respectivement aux pistes A, B et C de la figure 6.

Les enregistrements facilitent l'interprétation de l'autoradiographie.



↑ 94 67 43 30 20 144
→ migration (kDa)

* FIG 7

II Caractérisation de certains produits traduits à partir des ARNm extraits de prostomiums de Nereis diversicolor

II.A Polypeptides apparentés à la procholécystokinine (proCCK) et à la prodynorphine (prodyn) de Mammifères

A - Caractérisation de produits traduits in vitro

1) Traduction en lysat de réticulocytes de lapin

La traduction en lysat de réticulocytes de lapin additionné de méthionine-³⁵S a été réalisée en utilisant des ARNm extraits à partir de prostomiums de femelles dont les ovocytes ont un diamètre inférieur à 80 µm.

a) Décompte de la radioactivité

Les évaluations de la radioactivité, due à l'incorporation de méthionine-³⁵S dans les molécules synthétisées in vitro, ont donné les valeurs suivantes, pour 1 µl de milieu d'incubation :

- | | |
|--|----------------------|
| 1) Témoin négatif dit "témoin eau"
(eau additionnée au milieu d'incubation) | 5000 +/- 200 cpm |
| 2) Témoin positif (ARNm de TMV additionnés au milieu d'incubation) | 317 000 +/- 4000 cpm |
| 3) Echantillon à tester contenant des ARNm de <u>Nereis</u> | 100 000 +/- 3000 cpm |

La radioactivité présente dans l'échantillon est significativement différente de celle contenue dans le "témoin eau". En conséquence, ces résultats mettent en évidence une véritable traduction in vitro de protéines à partir des ARNm isolés des prostomiums.

b) Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS des polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin

Les molécules traduites in vitro, à partir des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor dont les ovocytes ont un diamètre inférieur à 80 μm , ont été séparées en gel de polyacrylamide 5 - 25 %, SDS. Ces molécules ayant incorporé de la méthionine- ^{35}S ont été détectées par autoradiographie. La comparaison entre le résultat du "témoin eau" et celui de l'échantillon à tester (pistes B et C, fig 8) met nettement en évidence des bandes radioactives correspondant aux protéines synthétisées de novo à partir des ARNm de Nereis. Ces molécules possèdent une masse moléculaire comprise entre 15 et 120 kDa.

c) Enregistrements densitométriques des autoradiogrammes

L'enregistrement densitométrique des autoradiogrammes précédents facilite les comparaisons et confirment nos déductions faites après la simple observation des autoradiogrammes (fig 9). Le graphe A de la figure 9 rend compte des résultats du "témoin eau" dans lequel l'absence de produits traduits est évidente. En revanche, le graphe B indique une abondance de protéines traduites de novo dans le milieu d'incubation pourvu en ARNm de Nereis.

d) Immunoprécipitation des produits traduits en lysat de réticulocytes de lapin

Des essais de caractérisation de molécules traduites, immunologiquement apparentées à la proCCK d'une part et à la

Figure 8. Autoradiogramme obtenu à partir d'un gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS, après migration des polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin. Traduction des ARNm de Nereis diversicolor. Immunoprécipitations par les anticorps anti-proCCK ou par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères.

piste A : Témoin "positif", ARN de TMV additionnés au milieu d'incubation

piste B : Témoin "négatif", eau bidistillée additionnée au milieu d'incubation

piste C : Total des produits traduits à partir des ARNm extraits de prostomiums de Nereis diversicolor

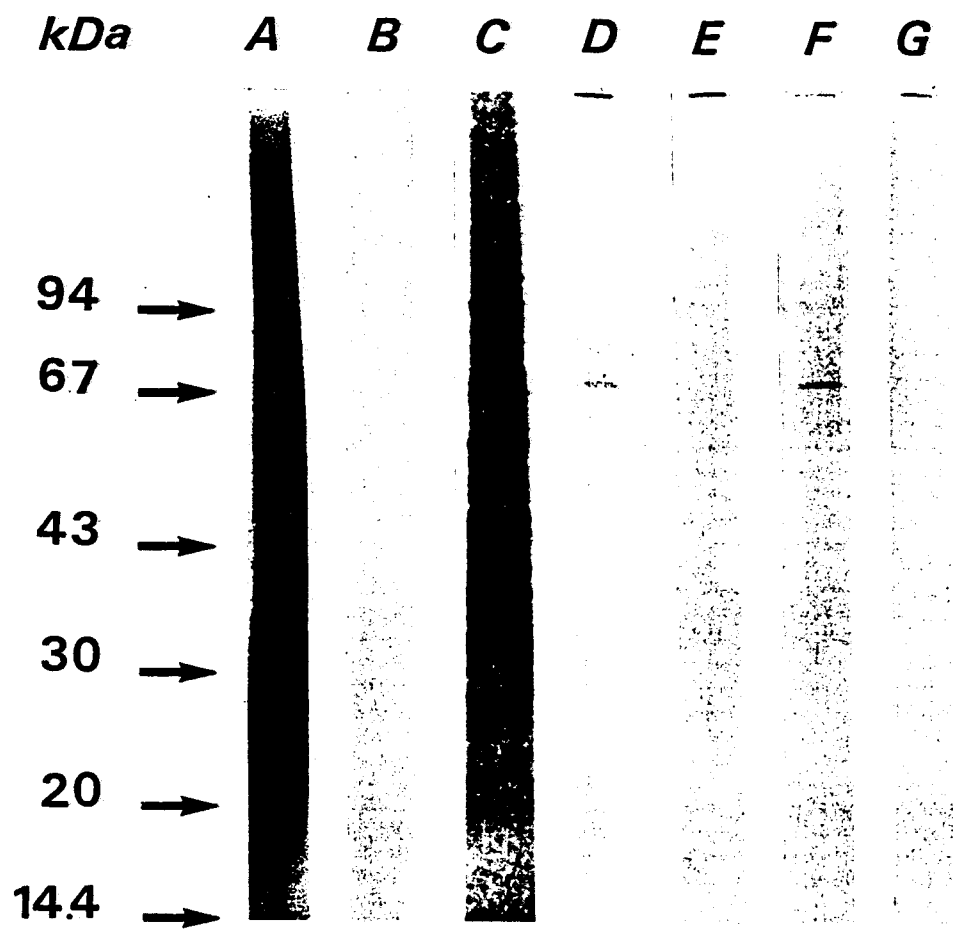
piste D : Immunoprécipitation des produits traduits in vitro obtenue par le mélange des trois anticorps dirigés contre différentes séquences de la proCCK humaine (Ab 1561 + Ab1700/3 + Ab 8007, voir "Matériels et techniques")

piste E : Polypeptides du "témoin eau" mis en présence des mêmes anticorps que ceux utilisés pour l'échantillon de la piste D

piste F : Immunoprécipitation des produits traduits in vitro obtenue par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères

piste G : Polypeptides du "témoin eau", mis en présence du même anticorps que celui utilisé pour l'échantillon F.

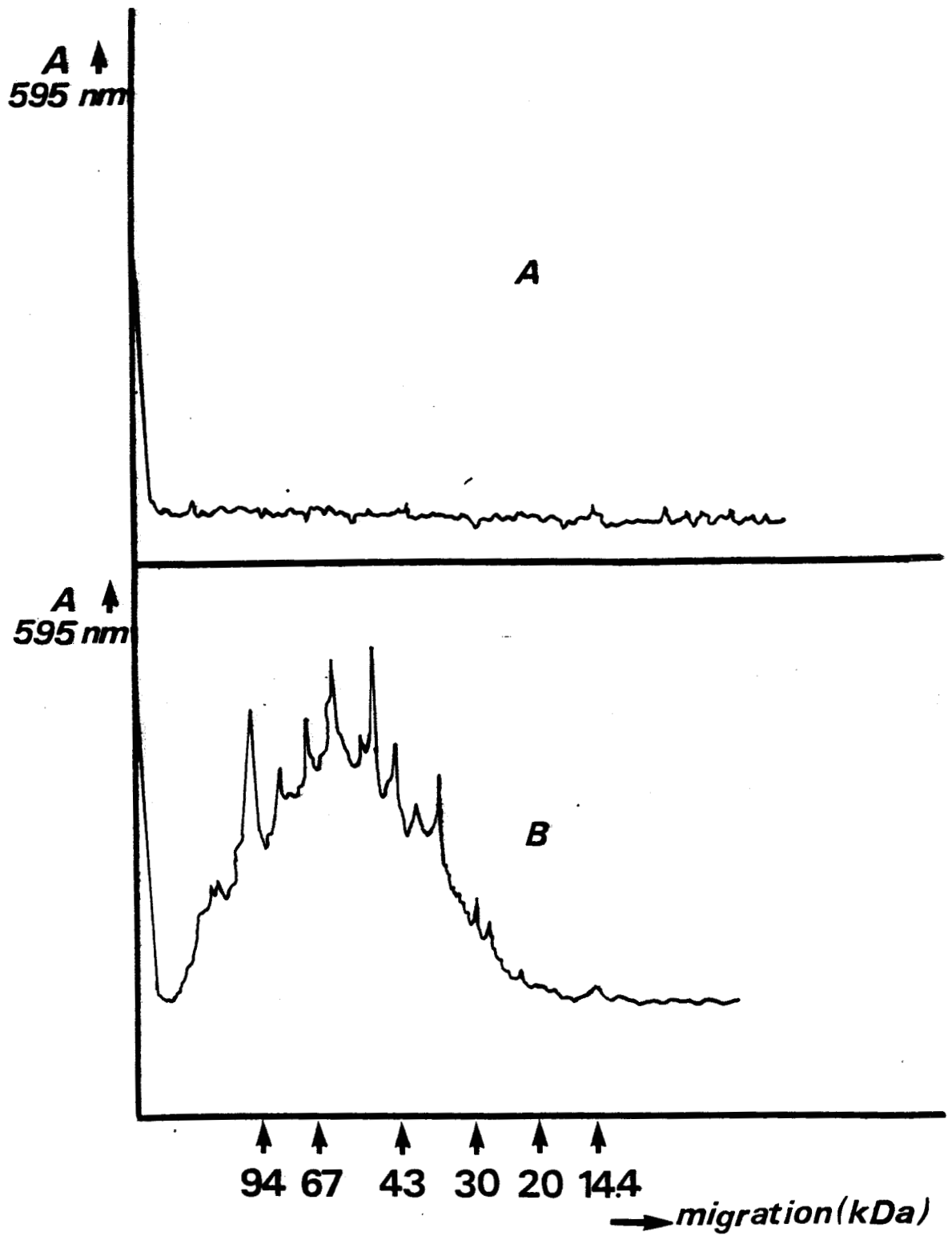
Des résultats de cette figure, il faut essentiellement retenir qu'un seul produit de masse moléculaire 70 kDa a été reconnu d'une part, par les anticorps anti-proCCK humaine, et d'autre part, par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères.



***FIG. 8**

Figure 9. Enregistrements densitométriques du gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS, correspondant aux pistes B et C de la figure 8.

Ce résultat met en évidence une synthèse active de polypeptides à partir des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor.



* FIG. 9

prodyn d'autre part, ont été réalisés par la technique dite de l'immunoprécipitation. Les éventuels immunoprécipités sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS, et la radioactivité des molécules est révélée par autoradiographie.

α-Mise en évidence d'un polypeptide apparenté à la proCCK humaine

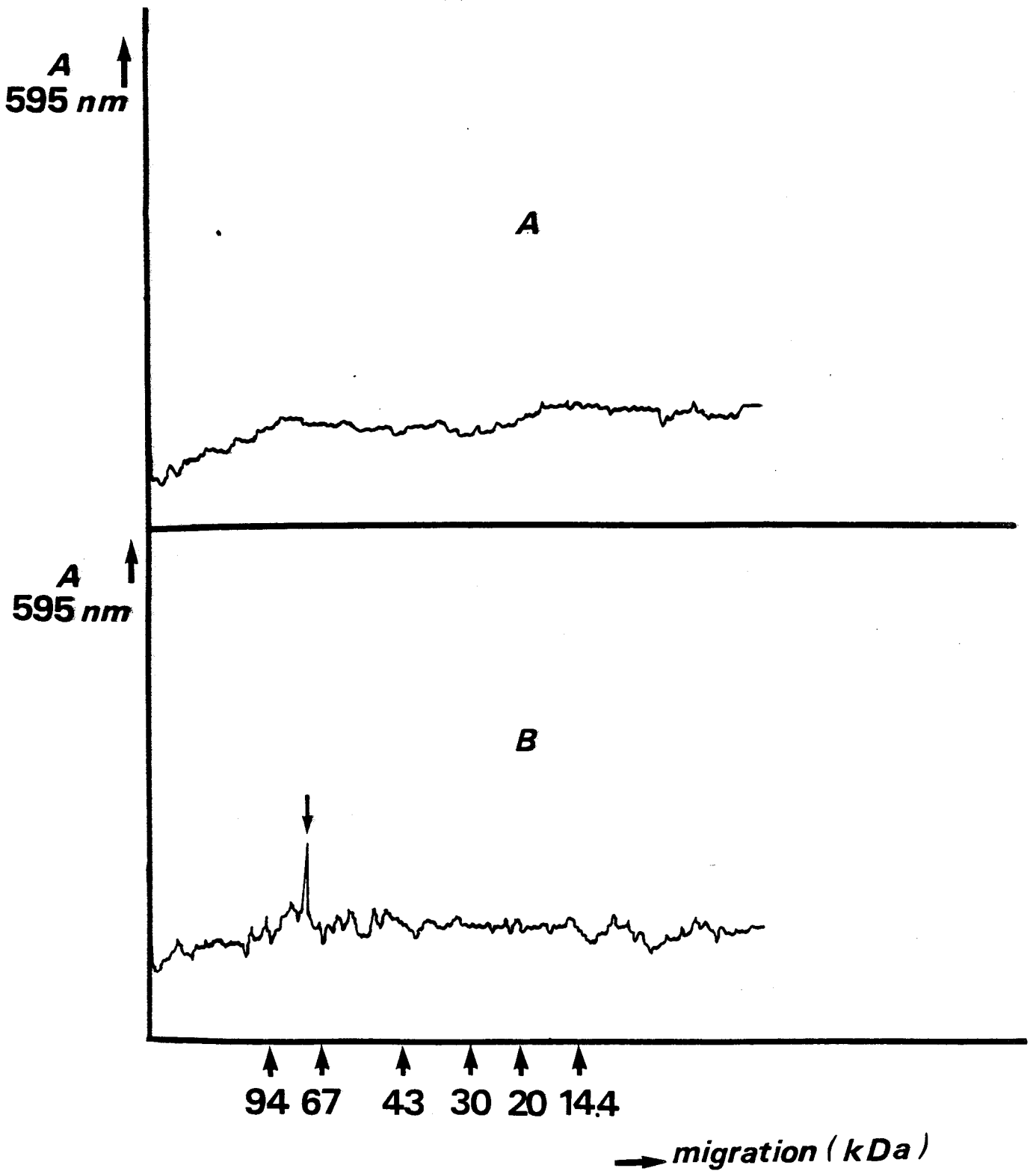
L'immunoprécipitation a été réalisée en utilisant un mélange de trois anticorps nommés Ab1561, Ab8007 et Ab1700/3. Chacun de ces anticorps est dirigé contre une séquence spécifique de la préproCCK humaine (cf. chapitre "Matériels et Techniques"). L'analyse des immunoprécipités, qui résultent de la reconnaissance de certains produits traduits par les anticorps utilisés, révèle la présence d'un **seul produit traduit**, de masse moléculaire 70 kDa (piste D, fig 8). Le "témoin eau" indique une absence de réaction immunologique avec les anticorps utilisés (piste E, fig 8).

L'enregistrement densitométrique de l'autoradiogramme précédent confirme parfaitement la présence du polypeptide de 70 kDa (graphe B, fig 10). Le graphe A de la figure 10 rend compte de l'absence d'immunoprécipité dans le "témoin eau", traité selon le même mode que celui qui a été suivi pour traiter l'échantillon à tester.

β-Mise en évidence d'un polypeptide apparenté à la prodyn de Mammifères

Une réaction d'immunoprécipitation a été recherchée dans les mêmes conditions que celles rapportées au paragraphe précédent, mais en utilisant des anticorps dirigés contre la

Figure 10. Enregistrements densitométriques de l'autoradiogramme des produits traduits en lysat de réticulocytes de lapin et immunoprécipités par les anticorps anti-proCCK humaine. Les graphes A et B correspondent respectivement aux pistes E et D de la figure 8. La flèche indique un produit de masse moléculaire 70 kDa reconnu par les anticorps utilisés.



*FIG.10

dyn 1-17 de Mammifères. L'analyse des immunoprécipités montre la présence d'un **seul produit**, de masse moléculaire identique (70 kDa) à celle du produit reconnu par les anticorps anti-proCCK humaine (piste F, fig 8). Au niveau des résultats du "témoin eau", il faut noter l'absence de toute réaction immunologique après l'utilisation des anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères (piste G, fig 8).

L'enregistrement densitométrique de l'autoradiogramme précédent confirme, sans ambiguïté, la présence de ce seul produit de 70 kDa, reconnu par les anticorps anti-dyn de Mammifères (graphe B, fig 11). En ce qui concerne les résultats du "témoin eau" (graphe A, fig 11) aucun immunoprécipité n'y est décelable.

2) Traduction en extrait de germes de blé ("wheat germ extract")

La traduction des ARNm extraits de prostomiums de Nereis diversicolor dont les ovocytes ont un diamètre inférieur à 80 µm, a été réalisée au sein d'un extrait de germes de blé additionné de méthionine-S35.

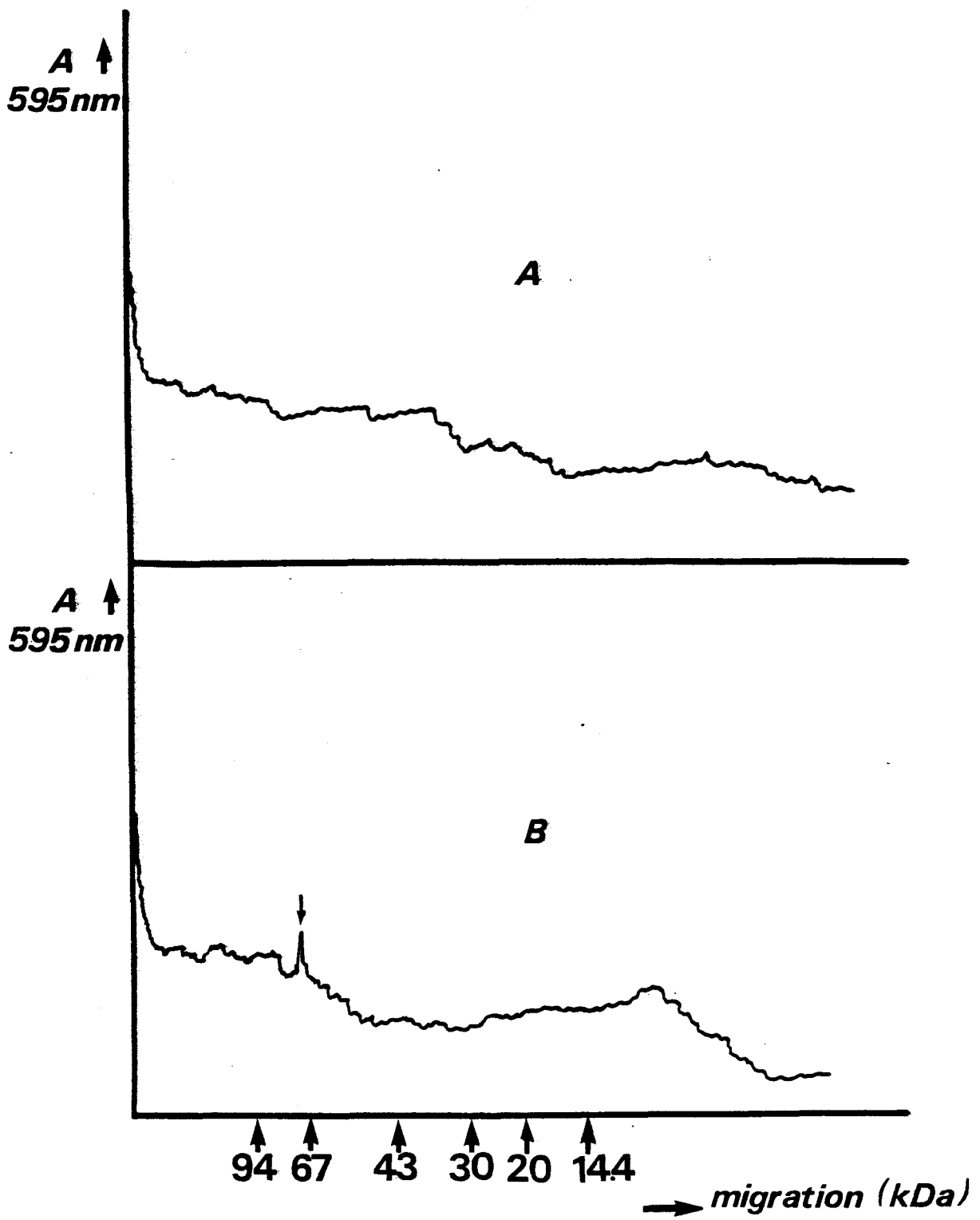
a) Décompte de la radioactivité

L'évaluation de l'incorporation de la méthionine-S35 dans les molécules synthétisées dans un extrait de germe de blé a donné les valeurs suivantes, pour 1 µl de milieu d'incubation :

1) Témoin négatif dit "témoin eau"
(eau additionnée au milieu d'incubation) 500 +/- 20 cpm

Figure 11. Enregistrements densitométriques de l'autoradiogramme des produits traduits en lysat de réticulocytes de lapin et immunoprécipités par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères. Les graphes A et B correspondent respectivement aux pistes G et F de la figure 8.

Les anticorps anti-dyn 1-17 reconnaissent un produit traduit de masse moléculaire 70 kDa (flèche).



*FIG.11

2) Témoin positif (ARNm de TMV additionné au milieu d'incubation)	11000 +/- 1000 cpm
3) Echantillon contenant les ARNm de <u>Nereis</u>	9800 +/- 700 cpm

La comparaison entre le nombre de cpm présent dans l'échantillon et celui concernant le "témoin eau" révèle une active synthèse globale de protéines.

b) Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS des produits traduits en extrait de germes de blé

Les produits traduits en extrait de germes de blé, à partir des ARNm isolés de prostomiums de Nereis diversicolor dont les ovocytes ont un diamètre inférieur à 80 μm , ont été analysés dans les mêmes conditions que celles qui ont été mises en oeuvre pour la caractérisation des molécules traduites en lysat de réticulocytes de lapin. L'autoradiogramme du gel de polyacrylamide - SDS indique la présence de plusieurs molécules, nouvellement synthétisées, qui possèdent une masse moléculaire comprise entre 12 et 140 kDa (piste C, fig 12). Au niveau de la piste illustrant les résultats du "témoin eau", aucun produit traduit n'est visible (piste B, fig 12).

c) Enregistrements densitométriques des autoradiogrammes

L'enregistrement densitométrique de l'autoradiogramme précédent permet de mieux définir les différentes molécules traduites (graphe B, fig 13). Le résultat du "témoin eau", qui n'indique la traduction d'aucun produit, est représenté par le graphe A dans la figure 13.

Figure 12. Autoradiogramme obtenu à partir d'un gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS, après migration des produits traduits en extrait de germes de blé. Immunoprécipitation résultant de l'action des anticorps anti-proCCK humaine ou des anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères :

piste A : Témoin "positif", solution d'ARN de TMV additionnée au milieu d'incubation

piste B : "Témoin eau", eau bidistillée additionnée au milieu d'incubation

piste C ; Total des produits traduits à partir des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor

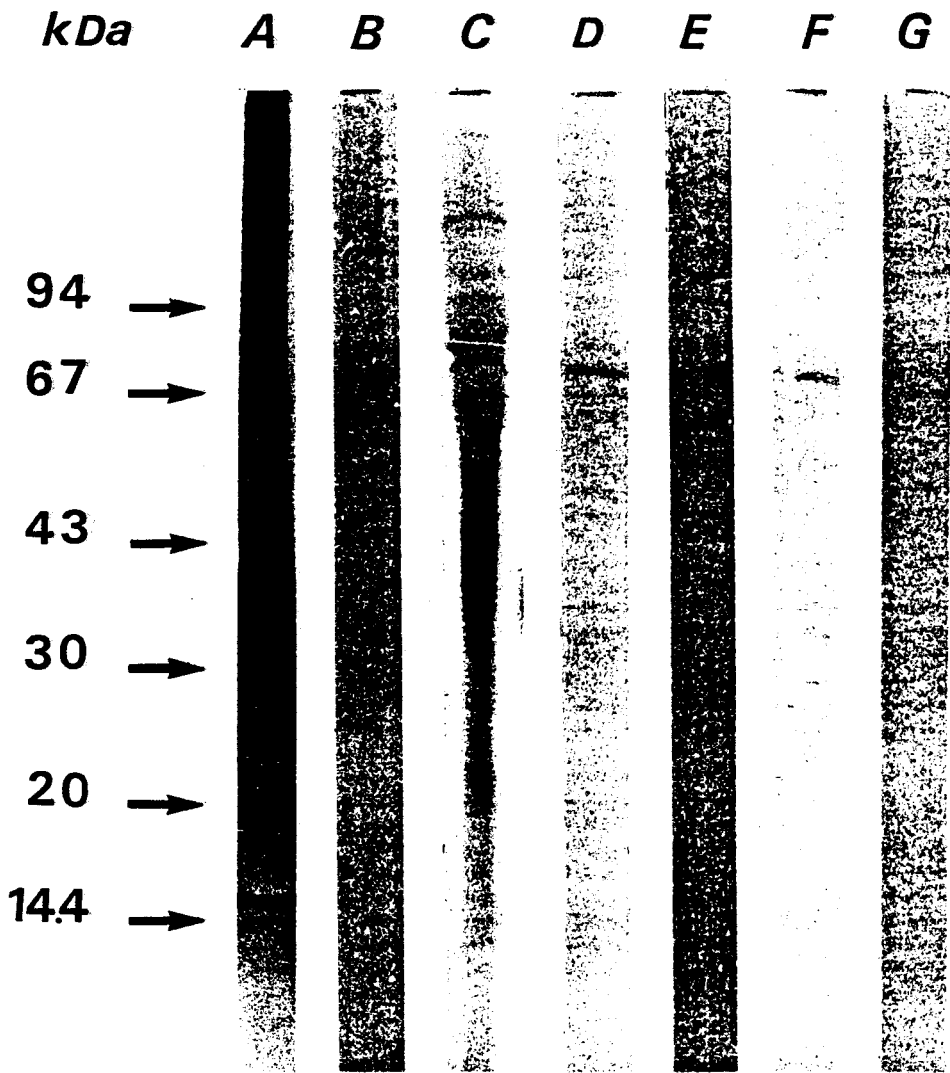
piste D : Immunoprécipitation des produits traduits, obtenue par le mélange de trois anticorps dirigés contre la proCCK humaine (Ab 1561 + Ab 1700/3 + Ab 8007 ; voir "Matériels et techniques")

piste E : Immunoprécipitation des protéines présentes dans le "témoin eau", obtenue par les anticorps anti-proCCK humaine

piste F : Immunoprécipitation des produits traduits, obtenue par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères

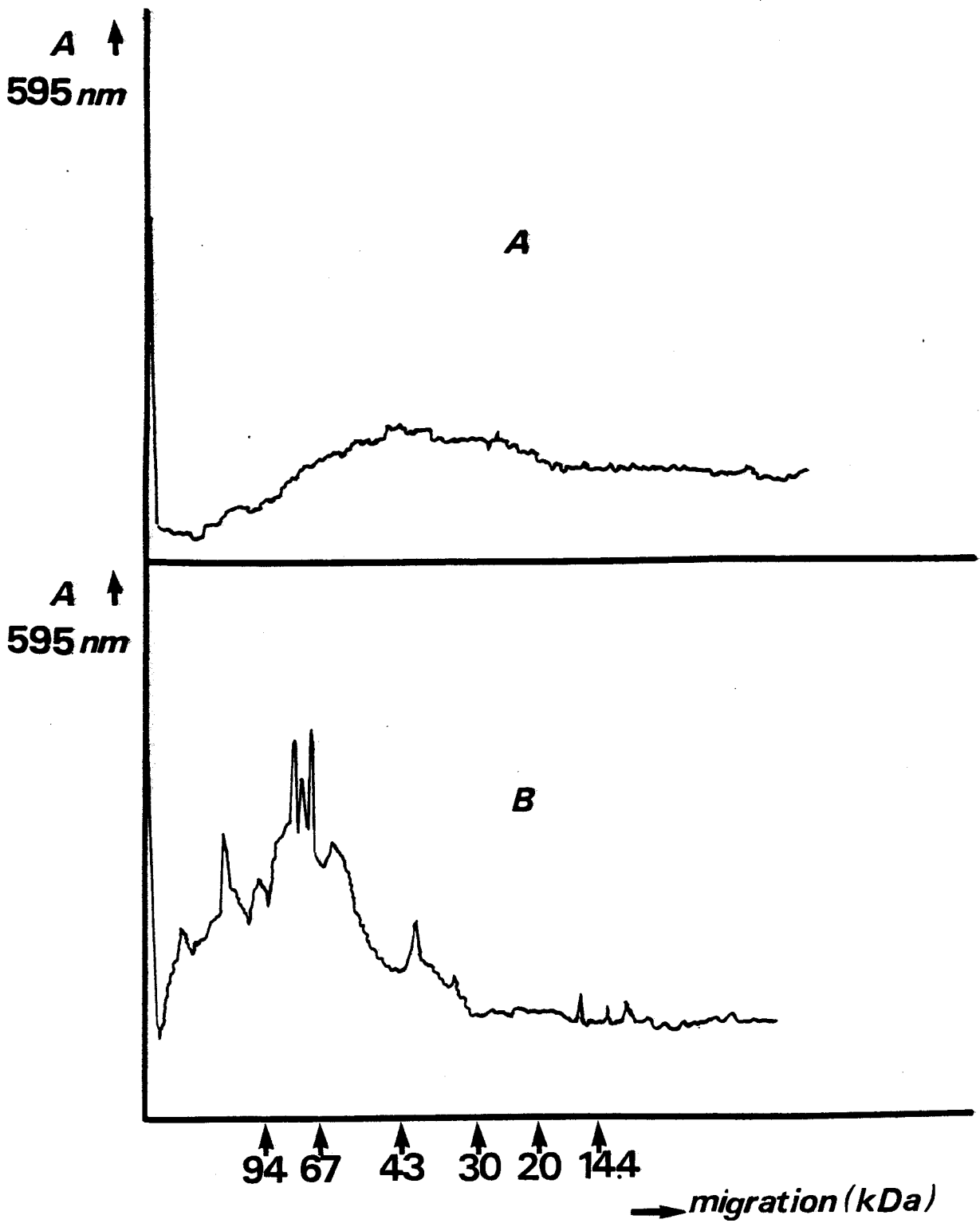
piste G : Immunoprécipitation des protéines présentes dans le "témoin eau", obtenue par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères.

Il nous semble intéressant d'attirer l'attention sur la mise en évidence d'un polypeptide de 70 kDa synthétisé dans les deux systèmes de traduction in vitro (extrait de germes de blé et lysat de réticulocytes de lapin) et reconnu par les différents anticorps testés (voir légende de la figure 8).



***FIG. 12**

Figure 13. Enregistrements densitométriques de l'auto-radiogramme des produits traduits totaux en extrait de germes de blé (graphe B). On peut noter, par rapport au "témoin eau" (graphe A), la présence de molécules nouvellement synthétisées, de masse moléculaire comprise entre 12 et 140 kDa.



*FIG.13

d) Immunoprécipitation des produits traduits en extrait de germes de blé

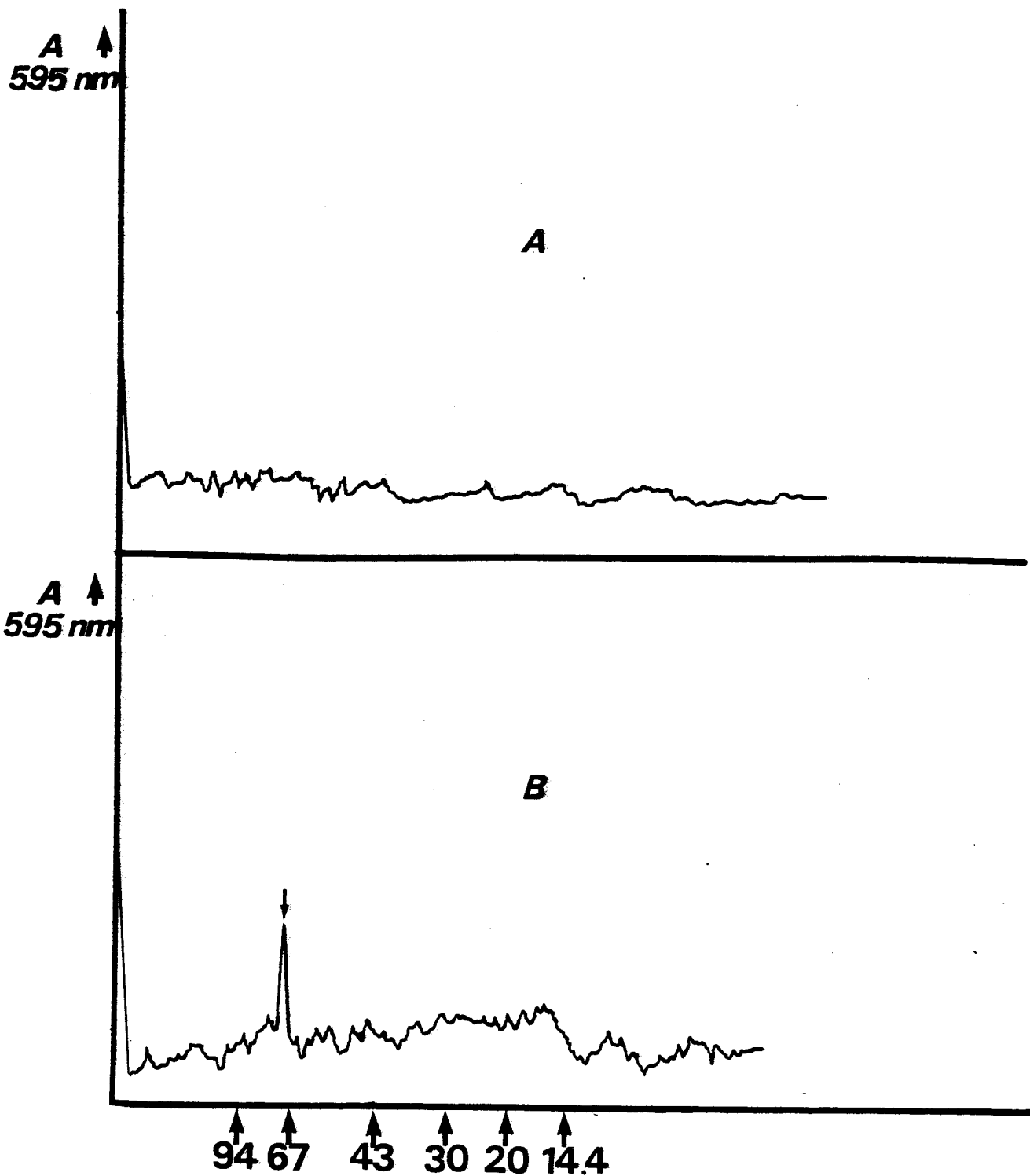
Des essais de caractérisation des produits traduits en extrait de germes de blé par les anticorps dirigés contre différentes séquences de la proCCK humaine d'une part, et par les anticorps élaborés contre la dyn 1-17 de Mammifères d'autre part, ont été réalisés dans des conditions identiques à celles adoptées pour les polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin.

α. Mise en évidence d'un polypeptide apparenté à la proCCK humaine

L'analyse des immunoprécipités, qui résultent de la réaction immunologique entre le mélange de trois anticorps dirigés contre la proCCK humaine (références Ab1561, Ab8007, Ab 1700/3 voir "Matériels et Techniques") et les produits traduits in vitro, confirme le résultat obtenu en lysat de réticulocytes de lapin. **Un seul produit** de masse moléculaire 70 kDa réagit avec les anticorps nommés ci-dessus (piste D, fig 12). Dans le "témoin eau", traité avec les mêmes anticorps que ceux utilisés pour l'échantillon, il ne se produit aucune immunoréaction (piste E, fig 12).

Le polypeptide de masse moléculaire égale à 70 kDa est encore mieux défini au niveau de l'enregistrement densitométrique de l'autoradiogramme précédent (graphe B, fig 14). Ce dernier confirme nos observations réalisées au niveau de la piste correspondant au "témoin eau" (graphe A, fig 14).

Figure 14. Enregistrements densitométriques d'un autoradiogramme des produits traduits en extrait de germes de blé et immunoprécipités par les anticorps anti-proCCK humaine. Les graphes A et B correspondent respectivement aux pistes E et D de la figure 12. La flèche indique un produit de masse moléculaire égale à 70 kDa reconnu par les anticorps utilisés.



*FIG.14

→ migration (kDa)

β - Mise en évidence d'un polypeptide apparenté à la prodyn de Mammifères

Les immunoprécipités résultant de la reconnaissance de certains produits traduits in vitro par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères sont visibles sur la piste F de la figure 12. On peut ainsi noter la présence d'un produit unique, de masse moléculaire encore égale à 70 kDa, reconnu par les anticorps anti-dyn 1-17. Ce résultat, identique à celui déjà obtenu en lysat de réticulocytes de lapin, est confirmé par l'enregistrement densitométrique de l'autoradiographie (graphe B, fig 15). Dans le "témoin eau", l'absence des immunoprécipités est totale (piste E, fig 12, graphe A, fig 15).

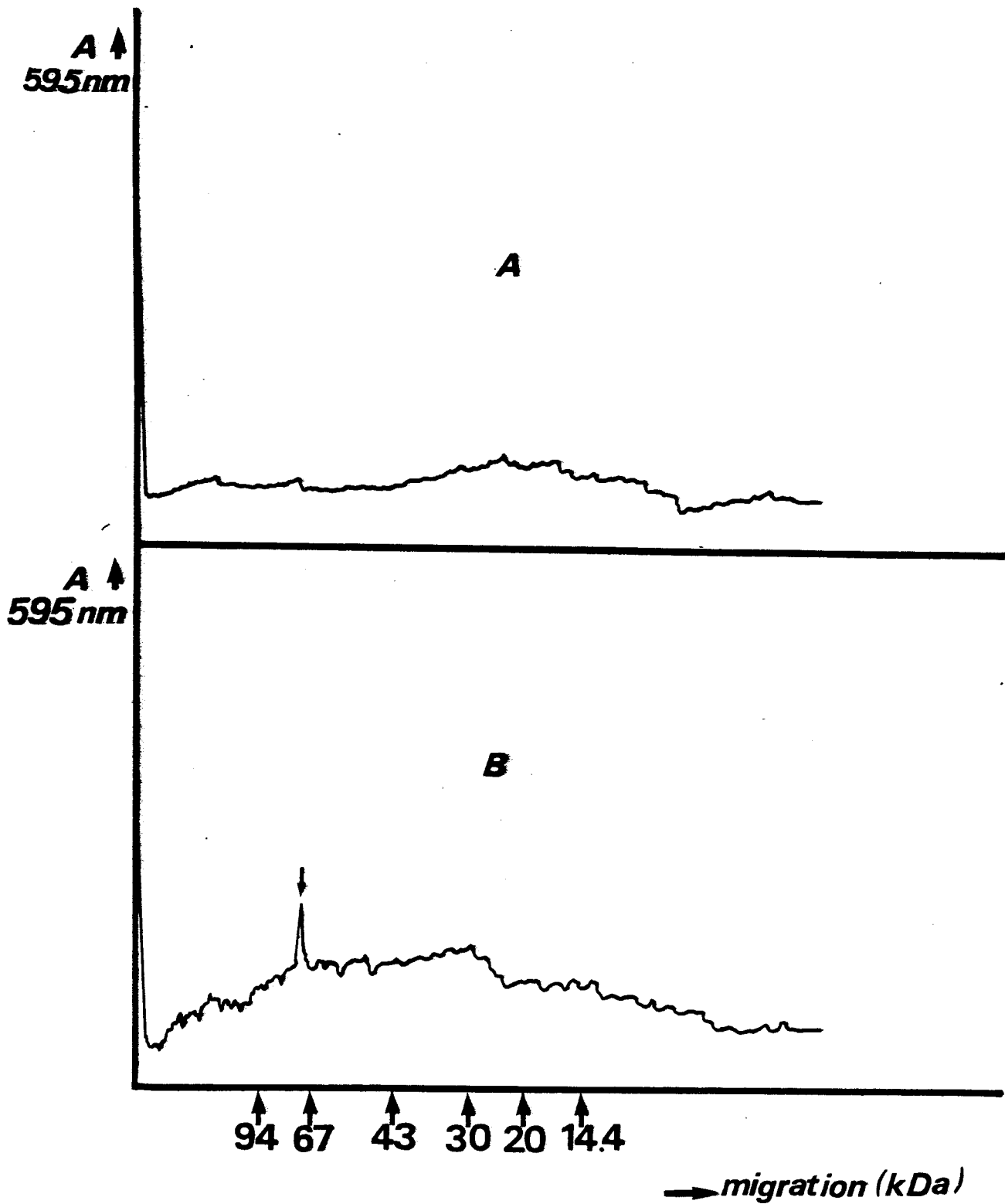
B - Traduction dans les ovocytes de *Xenopus laevis*

La traduction des ARNm dans les ovocytes de *Xenopus laevis* peut apparaître comme une stratégie prometteuse dans la recherche des facultés de maturation des produits traduits in ovo.

Dans le but de tester les capacités de l'ovocyte à traduire des précurseurs de neuropeptides, à faire subir une maturation à ces précurseurs et enfin à sécréter des produits finis actifs dans le milieu de culture, nous avons choisi d'utiliser cette cellule comme système de traduction des ARNm extraits à partir de prostomiums de *Nereis diversicolor*. Après l'injection d'une solution d'ARNm dans les ovocytes, ces derniers sont incubés dans un milieu de culture en présence de la méthionine-S35. Le milieu est renouvelé chaque jour, pendant 4 à 5 jours. Ces milieux sont finalement rassemblés, puis analysés en parallèle avec les ovocytes injectés.

Figure 15. Enregistrements densitométriques d'un autoradiogramme des produits traduits en extrait de germes de blé et immunoprécipités par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères. Les graphes A et B correspondent respectivement aux pistes G et F de la figure 12.

Un produit de masse moléculaire 70 kDa a été reconnu par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères (flèche).



* FIG.15

1) Analyse des produits totaux traduits in ovo

a) Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide - urée

La traduction dans les ovocytes de X. laevis, en présence de méthionine-³⁵S, a été induite en utilisant des ARNm extraits à partir d'animaux dont le sexe est indéterminable et de femelles dont les ovocytes ont un diamètre inférieur à 80 µm. Les molécules traduites, séquestrées à l'intérieur des ovocytes, ainsi que celles libérées dans le milieu d'incubation, ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide - urée. Les propriétés de ce gel permettent de détecter des molécules ayant une masse moléculaire aussi faible qu'1 kDa. Les éventuels produits radioactifs sont ensuite détectés par autoradiographie.

Les autoradiogrammes ainsi réalisés révèlent l'existence de plusieurs molécules nouvellement synthétisées. Ces dernières sont nombreuses, aussi bien à l'intérieur des ovocytes que dans leur milieu d'incubation (pistes A et C, fig 16). La masse moléculaire de ces produits est comprise entre 4,5 et 95 kDa. Dans les ovocytes témoin (ovocytes injectés d'eau bidistillée sans ARNm) ainsi que dans le milieu d'incubation de ces cellules, certaines molécules radioactives sont également révélées ; elles résultent de la traduction des ARNm endogènes de l'ovocyte (pistes B et D, fig 16).

b) Enregistrements densitométriques des autoradiogrammes

L'enregistrement densitométrique des autoradiogrammes correspondant aux électrophorèses précédentes permet de bien comparer les produits nouvellement traduits dans l'échantillon expérimental et dans le témoin. Il apparaît clairement

Figure 16. Autoradiogramme d'un gel de polyacrylamide-urée dans lequel ont migré les polypeptides totaux traduits in ovo à partir des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor, ou les polypeptides immunoprécipités par des anticorps dirigés contre la proCCK humaine.

piste A : Ensemble des produits traduits libérés dans le milieu d'incubation des ovocytes injectés par des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor

piste B : Ensemble des produits traduits libérés dans le milieu d'incubation des ovocytes témoin, injectés par de l'eau bidistillée dépourvue d'ARNm

piste C : Ensemble des produits traduits de novo, séquestrés à l'intérieur des ovocytes injectés par des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor :

piste D : Ensemble des produits traduits dans les ovocytes témoin injectés par de l'eau bidistillée dépourvue d'ARNm

pistes E à L : Immunoprécipitation par les trois anticorps dirigés contre les différentes séquences de la proCCK humaine (voir "Matériels et techniques") des produits traduits de novo séquestrés dans les ovocytes

piste E : Immunoprécipitation obtenue par l'anticorps Ab 1561 dirigé contre l'extension amino-terminale

piste F : Témoin de E

piste G : Immunoprécipitation obtenue par l'anticorps Ab 1700/3 élaboré contre le site d'amidation et les séquences adjacentes de la proCCK humaine

piste H : Témoin de G

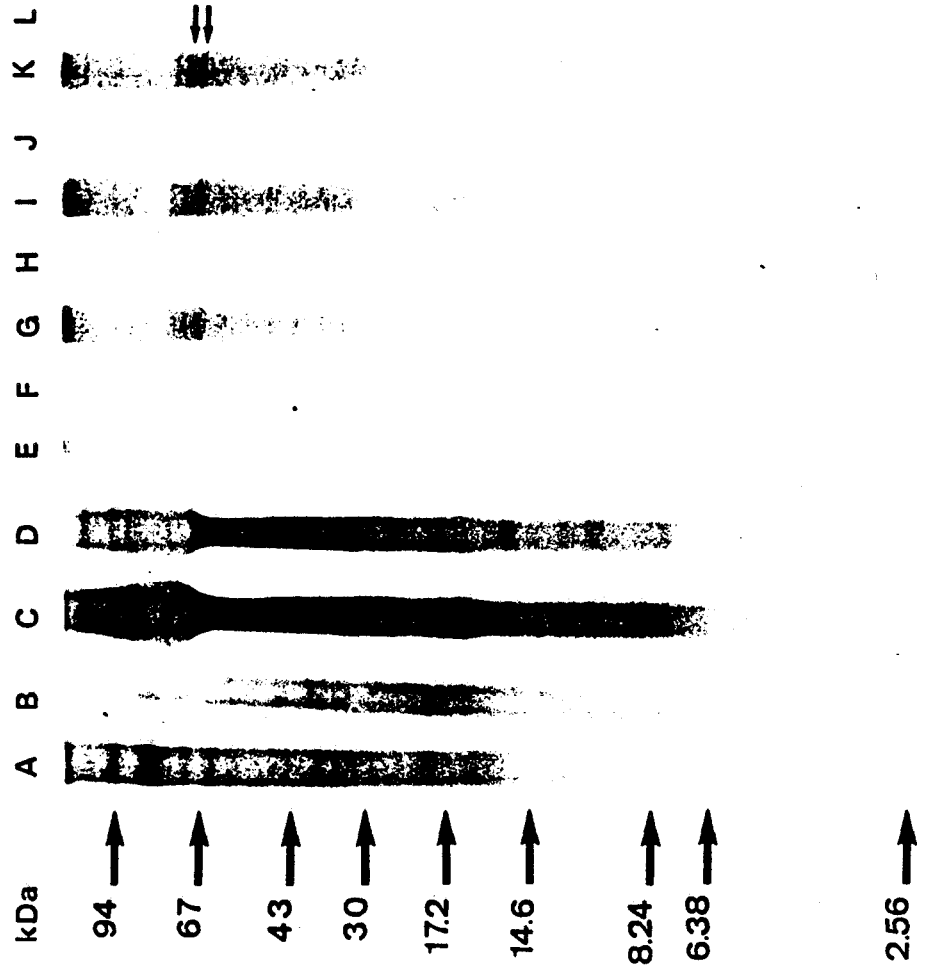
piste I : Immunoprécipitation obtenue par l'anticorps Ab 8007 dirigé contre la séquence bioactive de carboxyamidation

piste J : Témoin de I

piste K : Immunoprécipitation obtenue par le mélange des trois anticorps Ab 1561, Ab 1700/3 et Ab 8007

piste L : Témoin de K

Les flèches indiquent deux polypeptides majeurs de masse moléculaire 64 et 70 kDa qui sont reconnus par chacun des anticorps utilisés.



*** FIG. 16**

que les polypeptides néosynthétisés sont mieux représentés en qualité et en quantité dans les ovocytes ayant reçu des ARNm en injection que dans les cellules témoin. Cette constatation peut être également faite à propos des milieux d'incubation respectifs (graphes A, B, C et D, fig 17).

2) Caractérisation de certains produits traduits in ovo

Dans l'espoir de confirmer les caractérisations, réalisées à partir des produits traduits in vitro, à l'aide des anticorps dirigés contre la proCCK et des anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères, et dans le but de détecter une éventuelle maturation post-traductionnelle de ces produits, nous avons suivi la même stratégie que celle adoptée pour les produits traduits in vitro.

a) Polypeptides apparentés à la proCCK humaine

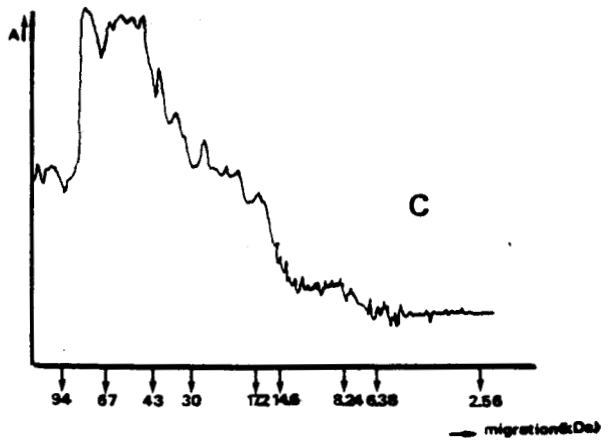
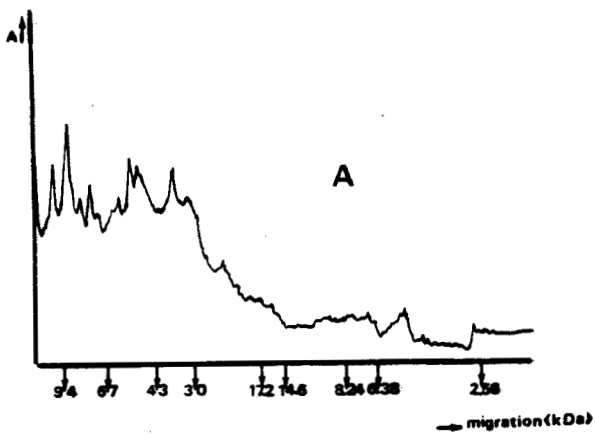
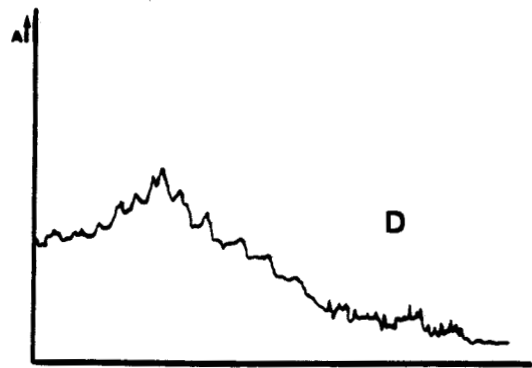
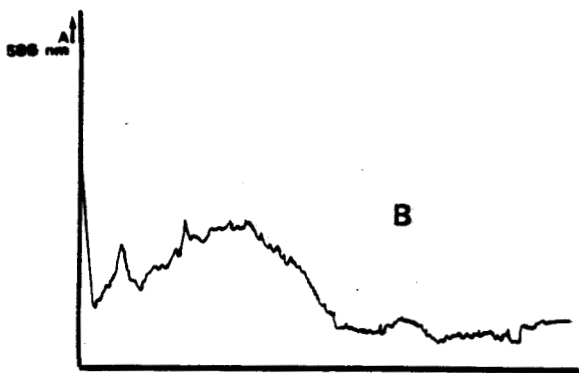
d. Immunoprécipitation des produits traduits in ovo

Les produits traduits, retenus à l'intérieur des ovocytes ainsi que ceux libérés dans le milieu d'incubation, ont été mis en présence des anticorps anti proCCK humaine. Trois anticorps nommés Ab1561, Ab1700/3 et Ab8007 ont été utilisés séparément ou après un mélange des trois. La réaction immunologique est suivie d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée, puis d'une autoradiographie.

L'analyse des immunoprécipités, obtenus à partir des produits traduits séquestrés à l'intérieur de l'ovocyte, révèle la présence de deux protéines majeures de masse moléculaire 64 et 70 kDa. Ces deux dernières présentent une affinité avec chacun des trois anticorps testés (pistes E à L,

Figure 17. et 18. Enregistrements densitométriques de l'autoradiogramme du gel de polyacrylamide-urée illustré à la figure 16.

Figure 17. Les graphes A, B, C et D correspondent respectivement aux pistes A, B, C et D de la figure 16.



*FIG. 17

fig 16). Pour deux anticorps (1700/3, piste G et 8007, piste I, fig 16) et pour le mélange des trois (piste K, fig 16), on peut distinguer une bande supplémentaire moins nette que les deux précédentes et peu séparée de celle située à 70 kDa, suggérant la présence d'un immunoprécipité de masse moléculaire légèrement supérieure à 70 kDa. Au niveau des enregistrements densitométriques, ce produit forme un simple épaulement au niveau de la face ascendante du premier pic correspondant au polypeptide de 70 kDa (graphes E à L, fig 18). Les enregistrements densitométriques des pistes (E à L) des autoradiogrammes montrent la présence d'un autre produit de 15 kDa, et celle de deux familles de protéines beaucoup moins bien définies, de masse moléculaire comprise entre 27 - 34 et 46 - 60 kDa (graphes E à L, fig 18). Des résultats identiques, mais plus évidents, sont obtenus par le mélange des trois anticorps (graphe K, fig 18).

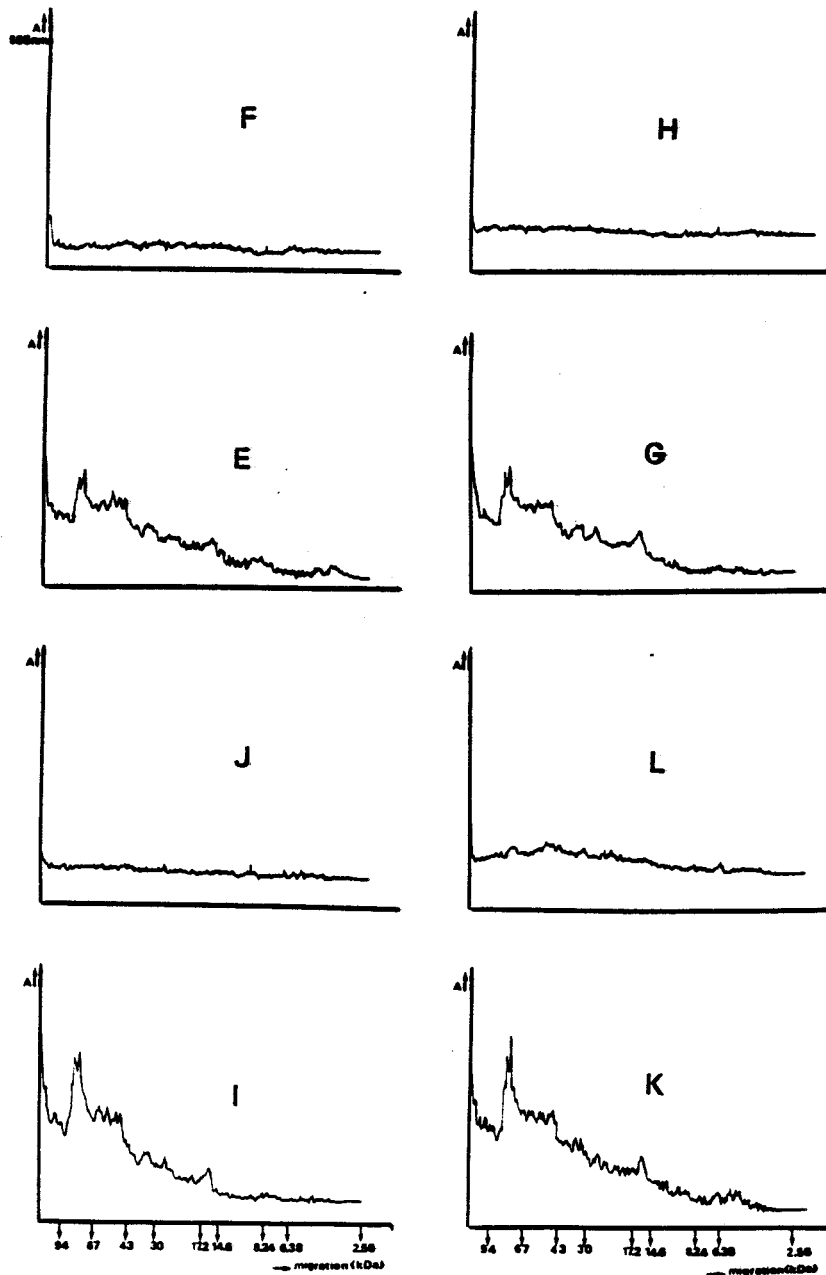
Aucun produit exporté par l'ovocyte n'est reconnu par les différents anticorps utilisés.

Immunotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, technique dite de "Western blot"

Les produits traduits in ovo à partir des ARNm de proctomiums de jeunes Nereis diversicolor, ainsi que les protéines solubles extraites du cerveau des animaux (ces dernières servent de référence) ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide - urée. Après cette étape, les molécules ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière est mise à incuber dans un milieu contenant d'une part le mélange des trois anticorps dirigés contre différentes séquences de proCCK humaine, et d'autre part le mélange de trois anticorps également dirigés contre différentes séquences de proCCK d'un autre Mammifère, le rat.

Figure 18. Les graphes E, F, G, H, I, J, K et L correspondent respectivement aux pistes E, F, G, H, I, J, K et L de la figure 16.

Les enregistrements densitométriques permettent de mieux définir nos observations réalisées directement à partir de l'autoradiogramme de la figure 16.



* FIG.18

Certains polypeptides traduits in ovo ont été reconnus par les anticorps dirigés contre les différentes séquences de proCCK humaine et contre celles de proCCK de rat. Des produits de masse moléculaire égale à 64 ou à 70 kDa manifestent le même comportement électrophorétique que des homologues de même masse moléculaire respectivement reconnus en immunoprécipitation (pistes A et C, fig 19). Par ailleurs, on peut observer un autre produit, d'une masse moléculaire égale à 27 kDa, reconnu par les deux lots d'anticorps.

Aucune protéine extraite des ovocytes témoin n'est décelable par les anticorps anti proCCK humaine ou anti proCCK de rat (pistes B et D, fig 19). Le même résultat négatif a été obtenu à partir des protéines libérées dans le milieu d'incubation des ovocytes.

Parmi les protéines extraites du cerveau de Nereis diversicolor, quatre, de masse moléculaire égale à 60, 62, 64 et 70 kDa ont été reconnues par les anticorps anti proCCK humaine, et deux, de masses moléculaires 64 et 70 kDa, ont été détectées par les anticorps anti proCCK de rat (pistes E et F, fig 19). Il est à remarquer que les deux protéines de plus grande masse moléculaire semblent identiques à leurs homologues de masse moléculaire égales à 64 et 70 kDa, reconnues parmi les produits traduits in ovo et caractérisé par la technique de l'immunoprécipitation et celle du "western blot". Par ailleurs, il faut également noter que parmi les protéines extraites du cerveau, aucun polypeptide de 27 kDa n'est reconnu par ces anticorps.

b) Polypeptides apparentés à la prodyn de Mammifères

Immunoprécipitation des produits traduits in ovo

Les éventuels complexes immuns, résultant de la réaction

Figure 19. Immunotransfert sur membrane de nitrocellulose des produits traduits in ovo à partir des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor et des protéines extraites du cerveau des animaux.

piste A : Produits traduits séquestrés dans les ovocytes injectés par des ARNm. Immunotransfert incubé avec le mélange des trois anticorps dirigés contre la proCCK humaine (Ab 1561, Ab 1700/3 et Ab 8007 ; voir "Matériels et techniques")

piste B : Témoin de A

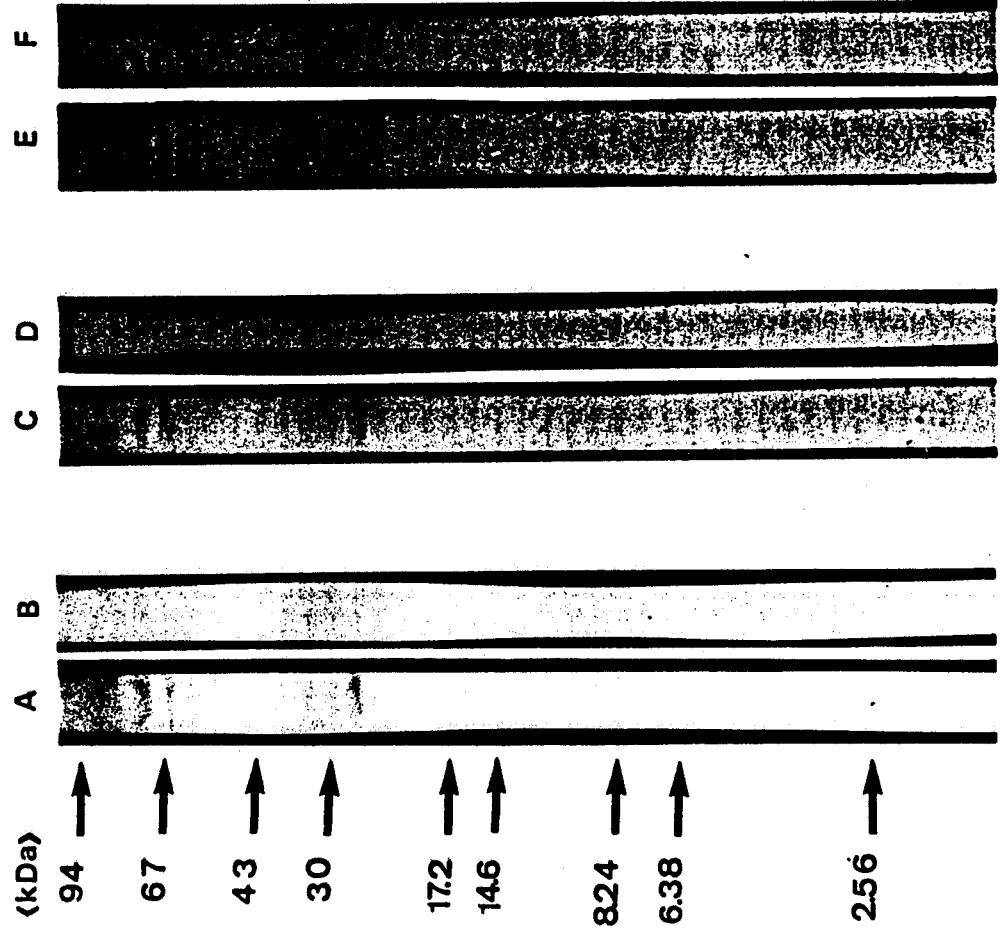
piste C : Produits traduits séquestrés dans les ovocytes injectés par des ARNm. Immunotransfert incubé avec le mélange des trois anticorps dirigés contre la proCCK de rat (Ab 1940, Ab 1578 et Ab 67273, voir "Matériels et techniques")

piste D : Témoin de C

piste E : Protéines extraites du cerveau de Nereis diversicolor. Immunotransfert incubé avec les anticorps élaborés contre la proCCK humaine

piste F : Protéines extraites du cerveau de Nereis diversicolor. Immunotransfert incubé avec les anticorps élaborés contre la proCCK de rat.

L'ensemble de ces résultats confirme les principales données obtenues à partir de la technique de l'immunoprécipitation.



*FIG.19

entre les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères et les produits traduits in ovo, ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide - urée. Ils sont détectés par autoradiographie. Cette analyse met en évidence la présence de deux produits majeurs de masse moléculaire 65 et 70 kDa (piste E, fig 20). De plus, une famille mal définie de produits, de masse moléculaire comprise entre 30 et 44 kDa semble également reconnue par les anticorps utilisés. Cet ensemble de polypeptides apparaît plus nettement après l'enregistrement densitométrique réalisé à partir de l'autoradiogramme (graphe B, fig 21).

Aucunes protéines des ovocytes témoin ne semblent réagir avec les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères (piste F, fig 20 et graphe A, fig 21).

Le test immunologique, réalisé à partir des molécules libérées par les ovocytes, ne révèle aucun complexe immun entre ces molécules et les anticorps utilisés.

Immunotransfert des protéines sur filtre de nitrocellulose, technique dite de "Western blot"

Chez les Mammifères, la dyn 1-17 et l' -néo-endorphine sont deux peptides opioïdes qui dérivent d'un précurseur commun, la prodynorphine ou la proenkephaline B. Nous avons donc recherché, en parallèle, une éventuelle reconnaissance par les anticorps dirigés contre chacun des deux peptides, des produits traduits in ovo et des protéines extraites du cerveau des animaux. Le but était de comparer les profils électrophorétiques des produits reconnus par chacun des deux types d'anticorps utilisés. Ainsi, les polypeptides traduits in ovo, comme les protéines extraites du cerveau, ont été séparées d'une part par électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée et d'autre part en gel de polyacrylamide

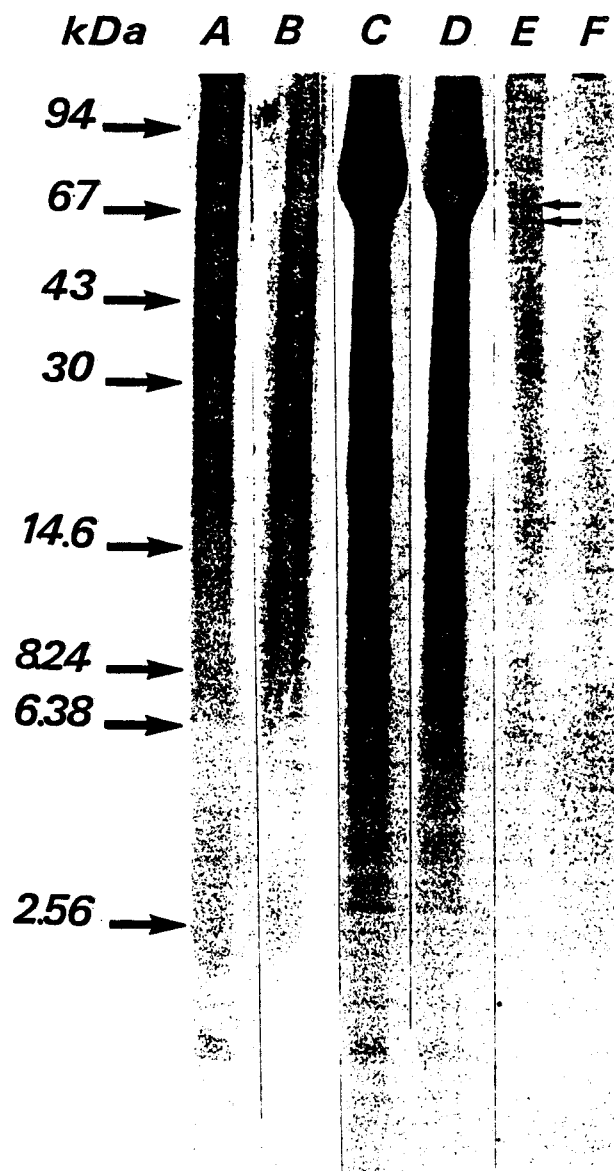
Figure 20. Autoradiogramme d'un gel de polyacrylamide-urée dans lequel ont migré des produits traduits in ovo à partir des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor ou ont migré des immunoprécipités obtenus par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères.

Les pistes A, B, C et D correspondent aux pistes A, B, C et D de la figure 16.

piste E : Immunoprécipitation par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères des produits traduits in ovo et séquestrés dans les ovocytes

piste F : Témoin de E

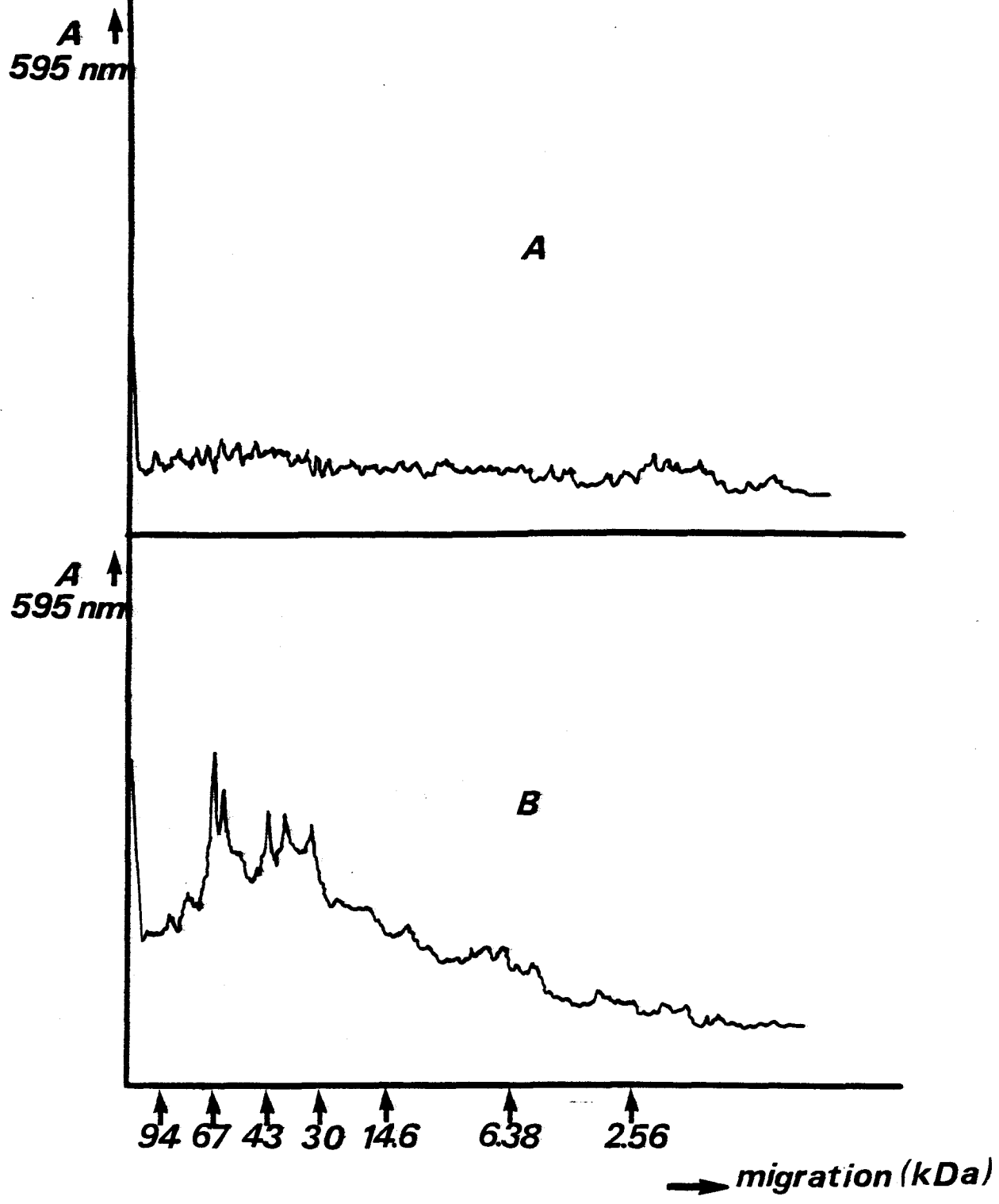
Les flèches indiquent deux produits de masse moléculaire de 65 et 70 kDa qui sont reconnus par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères.



***FIG.20**

Figure 21. Enregistrements densitométriques de l'autoradiogramme du gel de polyacrylamide-urée illustré par la figure 20. Les graphes A et B correspondent respectivement aux pistes F et E de la figure 20.

Deux polypeptides de masse moléculaire 65 et 70 kDa, ainsi qu'une famille de masse moléculaire comprise entre 30 et 44 kDa sont reconnus par les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères.



*FIG.21

5 - 25 %, SDS. Après séparation des protéines dans les deux systèmes électrophorétiques, les molécules sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont incubées dans un milieu contenant les anticorps anti α -néo-endorphine ou les anticorps anti-dyn 1-17.

β_1 - Immunotransferts à partir d'un gel de polyacrylamide - urée

Parmi les protéines extraites du cerveau de Nereis diversicolor, protéines servant de référence, 4 types de molécules (masses moléculaires 60, 62, 65 et 70 kDa) présentent une affinité avec les anticorps anti-dyn 1-17. De plus, notre attention a été attirée par la présence d'un peptide d'une masse moléculaire de 1,8 kDa, également reconnu par ces anticorps (piste A, fig 22). A partir de protéines de même origine, nous avons réalisé la même expérience en utilisant des anticorps anti- -néo-endorphine et nous avons obtenu des résultats identiques pour des polypeptides de masse moléculaire élevée (60, 62, 65 et 70 kDa). En revanche, aucun peptide de masse moléculaire égale à 1,8 kDa n'a été reconnu par les anticorps utilisés (piste D, fig 22).

L'expérience concernant les produits traduits in ovo, à partir des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor, montre que certains produits traduits sont reconnus par les anticorps anti-dyn 1-17 et par les anticorps anti- α -néo-endorphine de Mammifères. Ces produits, qui présentent une forte affinité avec les deux lots d'anticorps utilisés, sont semblables et possèdent des masses moléculaires de 60, 62, 65 et 70 kDa (pistes B et E, fig 22). Néanmoins, aucun peptide de faible masse moléculaire n'a été reconnu par les deux types d'anticorps utilisés.



Figure 22. Immunotransfert des produits traduits in ovo et stockés dans les ovocytes et des protéines extraites du cerveau de Nereis diversicolor. Ces dernières sont prises comme référence. Les protéines sont séparées sur gel de polyacrylamide-urée.

piste A : Protéines extraites du cerveau de Nereis diversicolor puis soumises à une immunodétection avec l'anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères. L'étoile indique un produit de masse moléculaire de 1,8 kDa reconnu par ces anticorps

piste B : Produits traduits in ovo. Immunotransfert incubé avec les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères

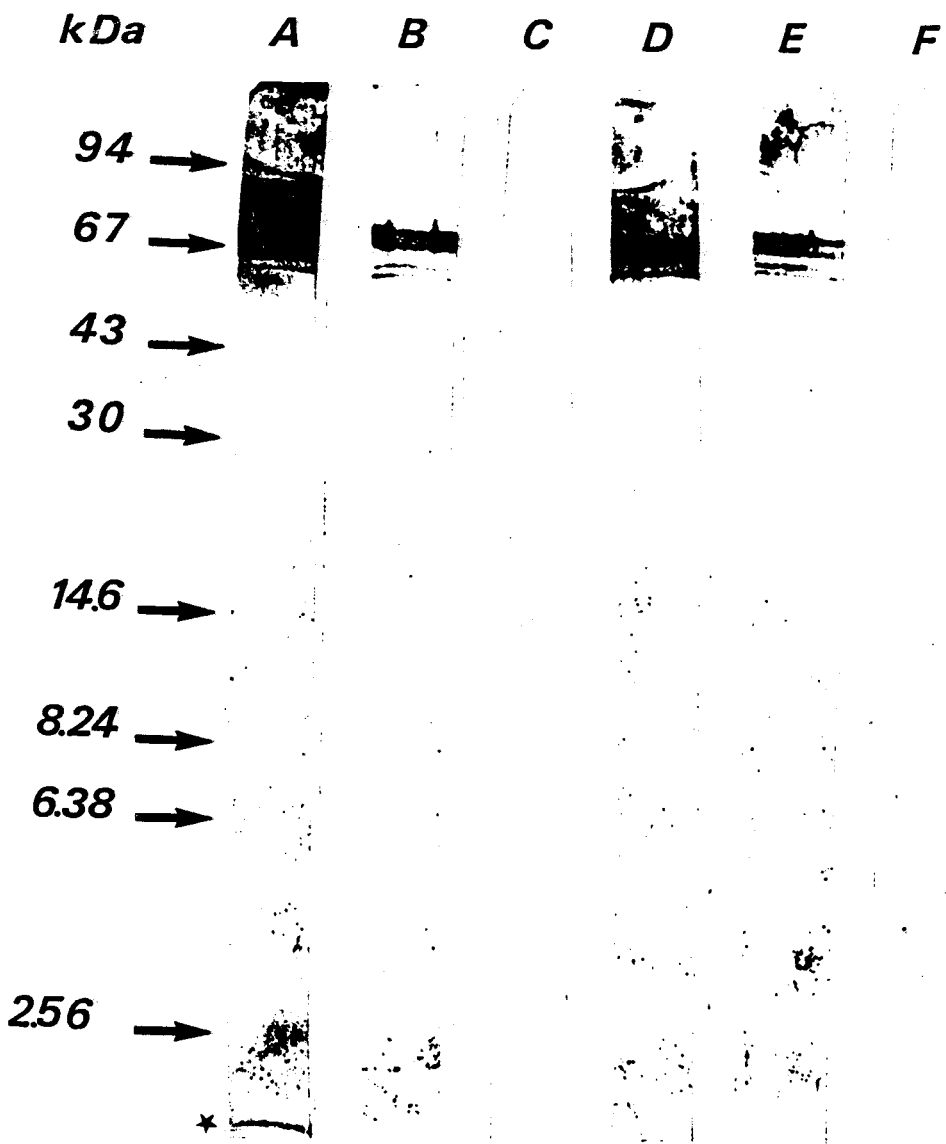
piste C : Témoin de B

piste D : Protéines extraites du cerveau et soumises à une immunodétection par les anticorps anti- -néo-endorphine

piste E : Produits traduits in ovo réagissant avec les anticorps anti- -néo-endorphine

piste F : Témoin de E

Les mêmes produits traduits in ovo et les mêmes protéines extraites du cerveau ont été reconnus par les anticorps anti-dyn 1-17 et les anticorps anti- -néo-endorphine.



*FIG. 22

Des expériences parallèles, réalisées à partir des protéines présentes dans le milieu d'incubation des ovocytes, indiquent l'absence d'immunoréaction entre ces molécules libérées par les cellules et les anticorps utilisés.

β 2 - Immunotransfert à partir d'un gel de polyacrylamide 5 - 25 %, SDS

Dans le but de confirmer les résultats exposés dans le paragraphe précédent, nous avons réalisé un transfert de protéines à partir d'un gel de polyacrylamide 5 - 25 %, SDS sur filtre de nitrocellulose. Certains polypeptides, extraits du cerveau des animaux, ont été reconnus par les anticorps anti-dynorphine 1-17 et anti- α -néo-endorphine. Ces produits ayant une masse moléculaire comprise entre 60 et 70 kDa (60, 62, 65 et 70 kDa) confirment le résultat précédent (pistes A et D, fig 23).

Un produit supplémentaire de 56 kDa est reconnu par les deux lots d'anticorps. Ce produit n'est pas détecté après l'immunoréaction réalisée en "western blot" à partir d'un gel de polyacrylamide - urée (voir paragraphe précédent).

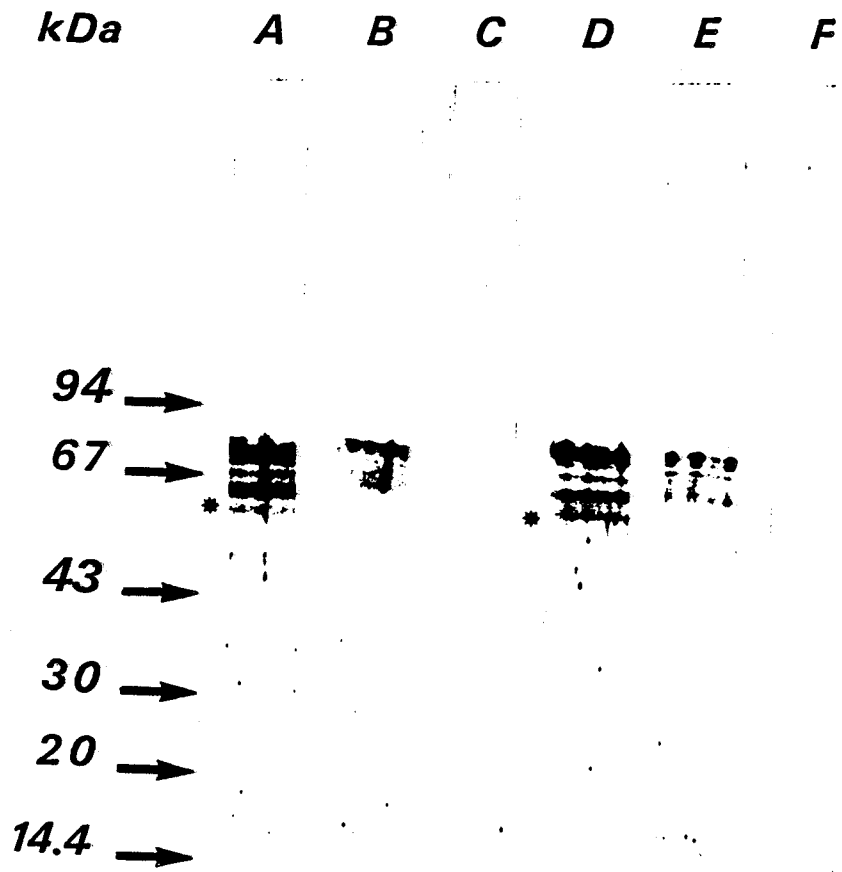
L'expérience concernant les produits traduits in ovo donne les mêmes profils électrophorétiques. Des polypeptides de masse moléculaire se situant entre 60 et 70 kDa présentent une grande affinité avec les anticorps dirigés contre les deux peptides opioïdes de Mammifères (pistes B et E, fig 23).

Les molécules, présentes dans le milieu d'incubation des ovocytes, ne provoquent pas de réaction immunologique avec les anticorps utilisés. Compte-tenu de cette constante absence de reconnaissance de protéines du milieu d'incubation par les différents anticorps utilisés, nous avons analysé ces produits par un test ELISA, qui a la réputation d'être plus sensible que les détectations précédentes. Il est évident que les protéines des ovocytes receveurs ont aussi été testés vis à vis des anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères.

Figure 23. Immunotransfert des produits traduits in ovo à partir des ARNm de prostomiums, et des protéines extraites du cerveau de Nereis diversicolor. Les protéines sont analysées en gel de polyacrylamide 5-25 %, SDS.

Les pistes A, B, C, D, E et F correspondent respectivement aux pistes A, B, C, D, E et F de la figure 22.

L'étoile indique un nouveau produit de masse moléculaire 56 kDa, reconnu parmi les protéines totales du cerveau, par chacun des deux anticorps utilisés dans les conditions électrophorétiques présentes, mais non dans celles illustrées à la figure 22.



*FIG. 23

3 - Test ELISA

Ce test a été réalisé en utilisant des produits traduits à partir des ARNm de prostomiums d'animaux jeunes. Des quantités égales (200 µl) de milieu d'incubation d'ovocytes témoin et de milieu d'incubation d'ovocytes injectés par les ARNm, et d'un extrait des ovocytes correspondants, ont été déposées dans des puits d'une plaque de microtitration. La plaque est ultérieurement incubée avec les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères. L'intensité de la réaction immunologique est évaluée à l'aide d'un lecteur. Les résultats de cette expérience confirment les données précédentes obtenues par d'autres techniques. Les protéines des ovocytes injectés par des ARNm provoquent une très forte réaction immunologique (colonne D, fig 24). En revanche, celles qui sont exportées dans le milieu d'incubation ne manifestent pas de réaction positive (colonne B, fig 24). Il semble donc qu'aucun des produits d'intérêt traduits in ovo ne soit exportés par les ovocytes injectés (fig 24).

II.B Polypeptides reconnus par les anticorps élaborés contre une fraction biochimiquement extraite du cerveau de Nereis virens, fraction contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse

Chez les Néréidiens, la seule manifestation évidente de l'action d'un produit de neurosécrétion concerne celle du facteur inhibiteur de la spermatogenèse (SIF). Récemment, dans notre laboratoire, Delaire - Hesdin a élaboré des anticorps nommés NV24 contre une fraction hautement purifiée par la performante technique de l'HPLC (Bulet et Delaire - Hesdin, com. personnelle) ; fraction qui contient le SIF. Il nous a donc paru intéressant de tester ces anticorps vis à

Figure 24. Histogramme représentant les résultats du test ELISA réalisé à partir des produits traduits in ovo. L'immunodétection a été réalisée avec les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères

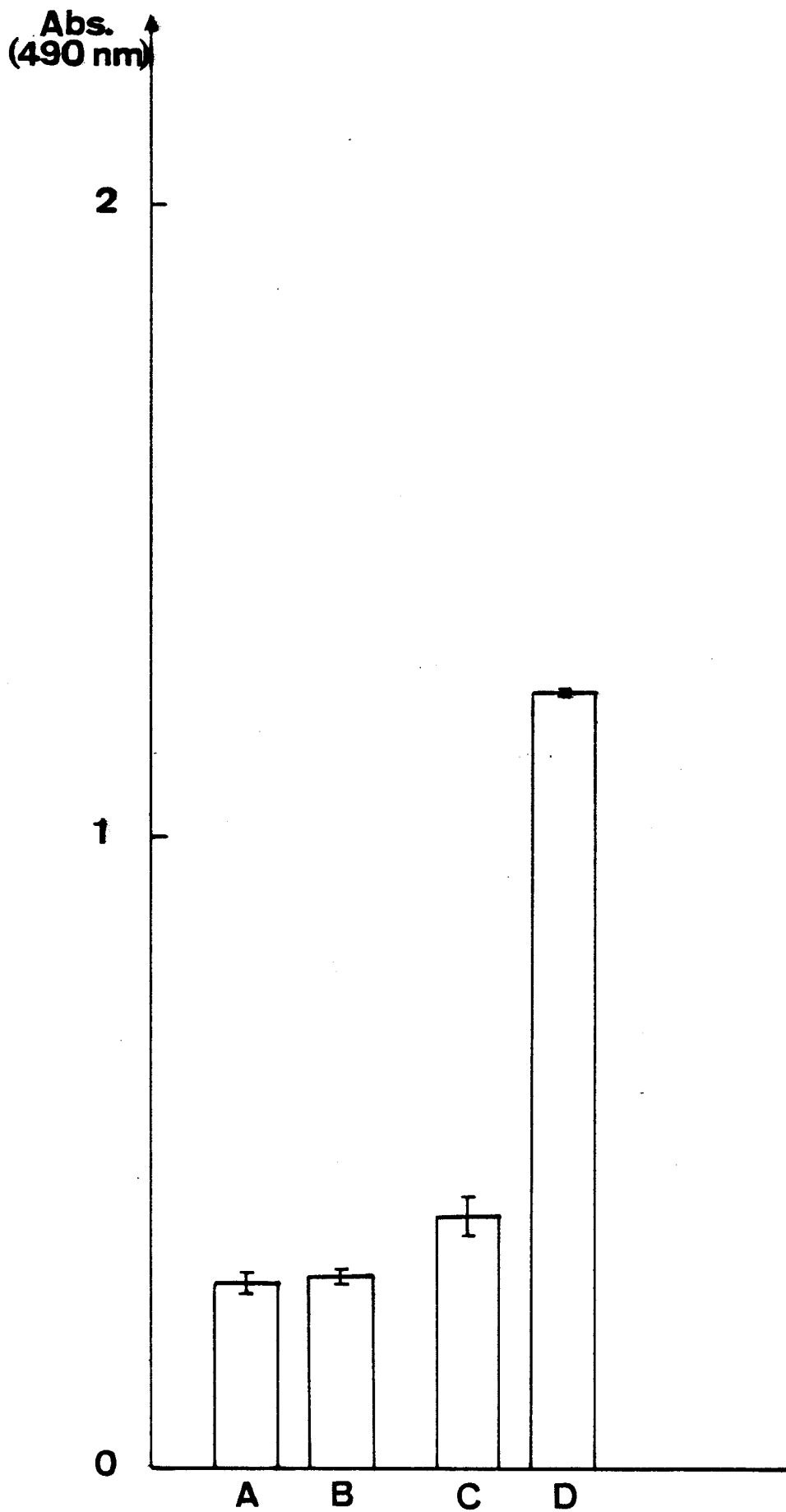
Colonne A : Protéines libérées dans le milieu d'incubation des ovocytes témoin, soit injectés d'eau bidistillée

Colonne B : Protéines libérées dans le milieu d'incubation des ovocytes injectés par des ARNm extraits de prostomiums de Nereis diversicolor

Colonne C : Protéines séquestrées dans les ovocytes témoin

Colonne D : Protéines séquestrées dans les ovocytes injectés par des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor

Une forte immunoréaction a été obtenue entre les produits traduits séquestrés dans les ovocytes injectés par des ARNm et les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères.



***FIG. 24**

vis des produits traduits à partir des ARNm de cerveaux de Nereis diversicolor. En conséquence, des produits traduits par exemple in ovo, ont été confrontés aux anticorps NV24. Les techniques utilisées sont celle du test ELISA et celle de l'immunotransfert.

1 - Test ELISA

Le test a été pratiqué en utilisant des produits traduits par les ovocytes de X. laevis après l'injection des ARNm extraits de prostomiums d'animaux dont le sexe est indéterminable. Les molécules traduites séquestrées dans l'ovocyte et celles libérées dans le milieu de culture ont été éprouvées vis à vis des anticorps NV24. Les ovocytes témoin et leur milieu d'incubation ont été testés en parallèle.

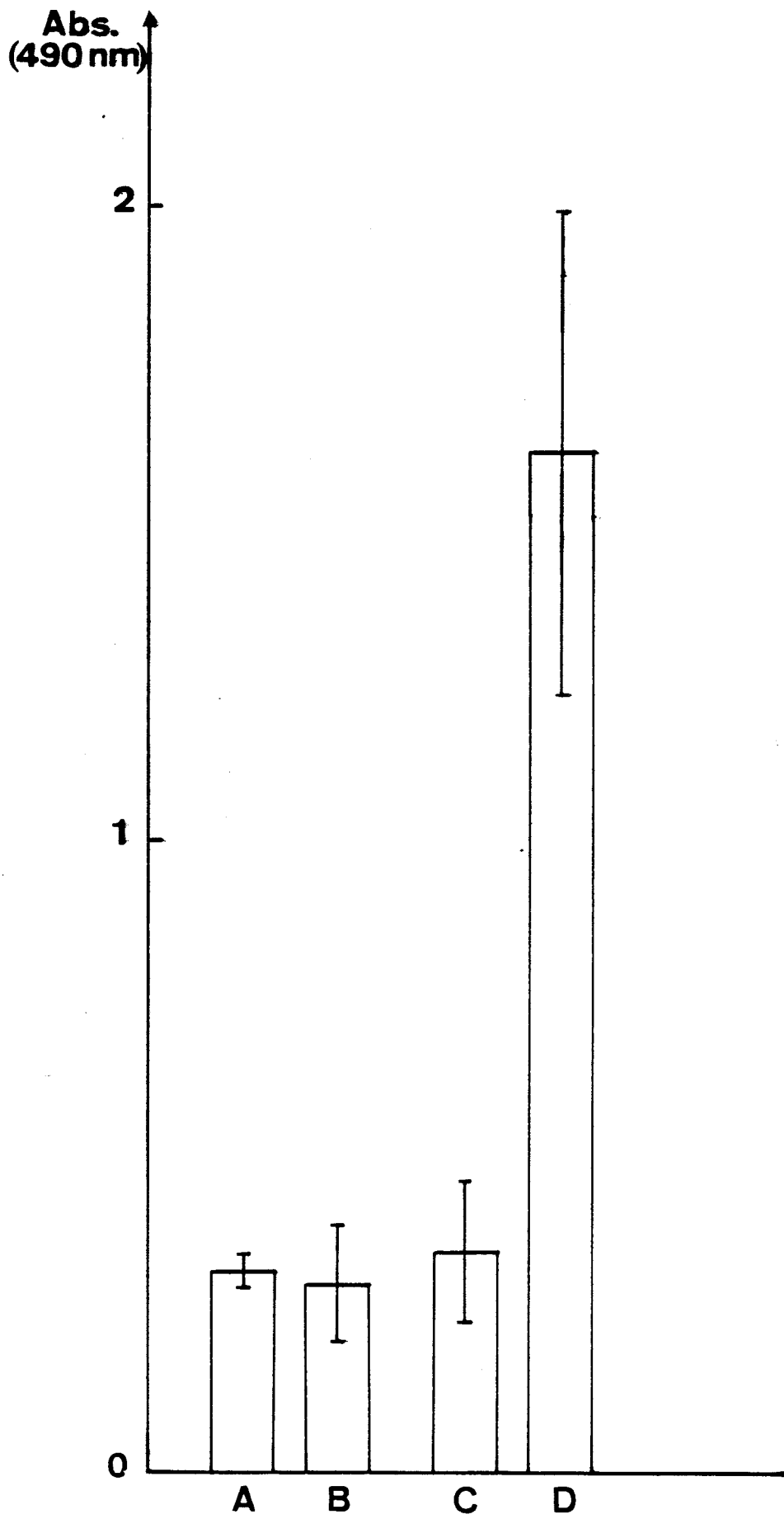
L'analyse quantitative des réactions immunologiques indique une très forte reconnaissance de produits traduits retenus dans les ovocytes injectés par l'ARNm par rapport au témoin (colonnes C et D, fig 25). La même recherche réalisée sur le milieu d'incubation des ovocytes ne montre aucune immunoréaction avec les anticorps NV24 (colonnes A et B, fig 25).

2 - Technique de l'immunotransfert dite de "Western blot"

Les anticorps NV24 ont été confrontés à des produits traduits in ovo, mais également, en guise de référence, à des protéines extraites du cerveau de Nereis diversicolor. Les molécules préalablement séparées en gel de polyarylamide - urée ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose ; cette dernière a incubé avec les anticorps NV24. Ces anticorps reconnaissent un ensemble de polypeptides extrait

Figure 25. Histogramme illustrant des résultats de tests ELISA réalisés à partir des produits traduits in ovo soumis à une immunodétection avec les anticorps (NV24), spécifiques de Néréidiens, dirigés contre la fraction contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse (SIF). Les protéines testées en A, B, C et D correspondent respectivement à celles des conditions A, B, C et D de la figure 24.

Comme pour les anticorps anti-dyn 1-17 de Mammifères, une forte réaction immunologique est obtenue entre les produits traduits à partir des ARNm de prostomiums de Nereis diversicolor, qui restent séquestrés dans les ovocytes, et les anticorps dirigés contre la fraction contenant le SIF des Néréidiens.



***FIG.25**

du cerveau des animaux. Cet ensemble comprend des molécules de masse moléculaire comprise entre 62 et 94 kDa. Un autre produit, de masse moléculaire plus faible (28 kDa) a également réagi avec les anticorps considérés (piste A, fig 26).

La même analyse relative aux produits traduits in ovo, révèle la reconnaissance, par les anticorps utilisés, d'un seul produit de masse moléculaire 28 kDa (piste B, fig 26).

Aucun polypeptide du milieu d'incubation des ovocytes n'est reconnu par ces anticorps.

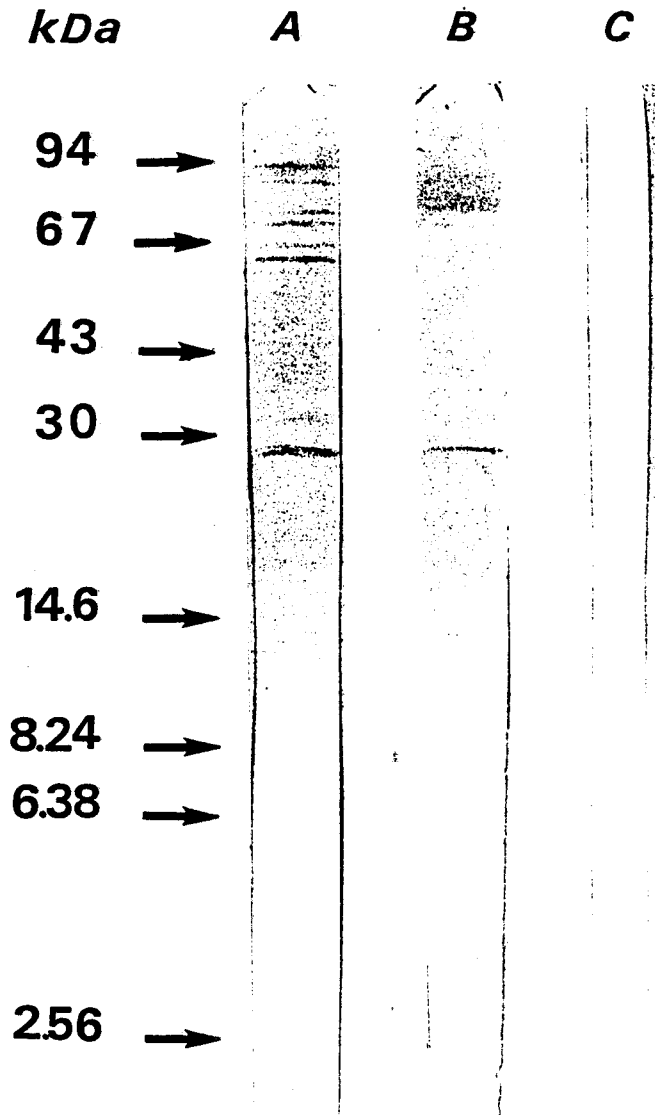
Figure 26. Immunotransfert sur membrane de nitrocellulose de produits traduits in ovo à partir des ARNm de prostomiums, et des protéines extraites du cerveau. Protéines séparées sur gel de polyacrylamide-urée. L'immunodétection a été réalisée avec les anticorps dirigés contre la fraction contenant le SIF.

piste A : Protéines extraites du cerveau et utilisés comme référence

piste B : Produits traduits in ovo séquestrés dans les ovocytes injectés par des ARNm de prostomiums

piste C : Témoin de B

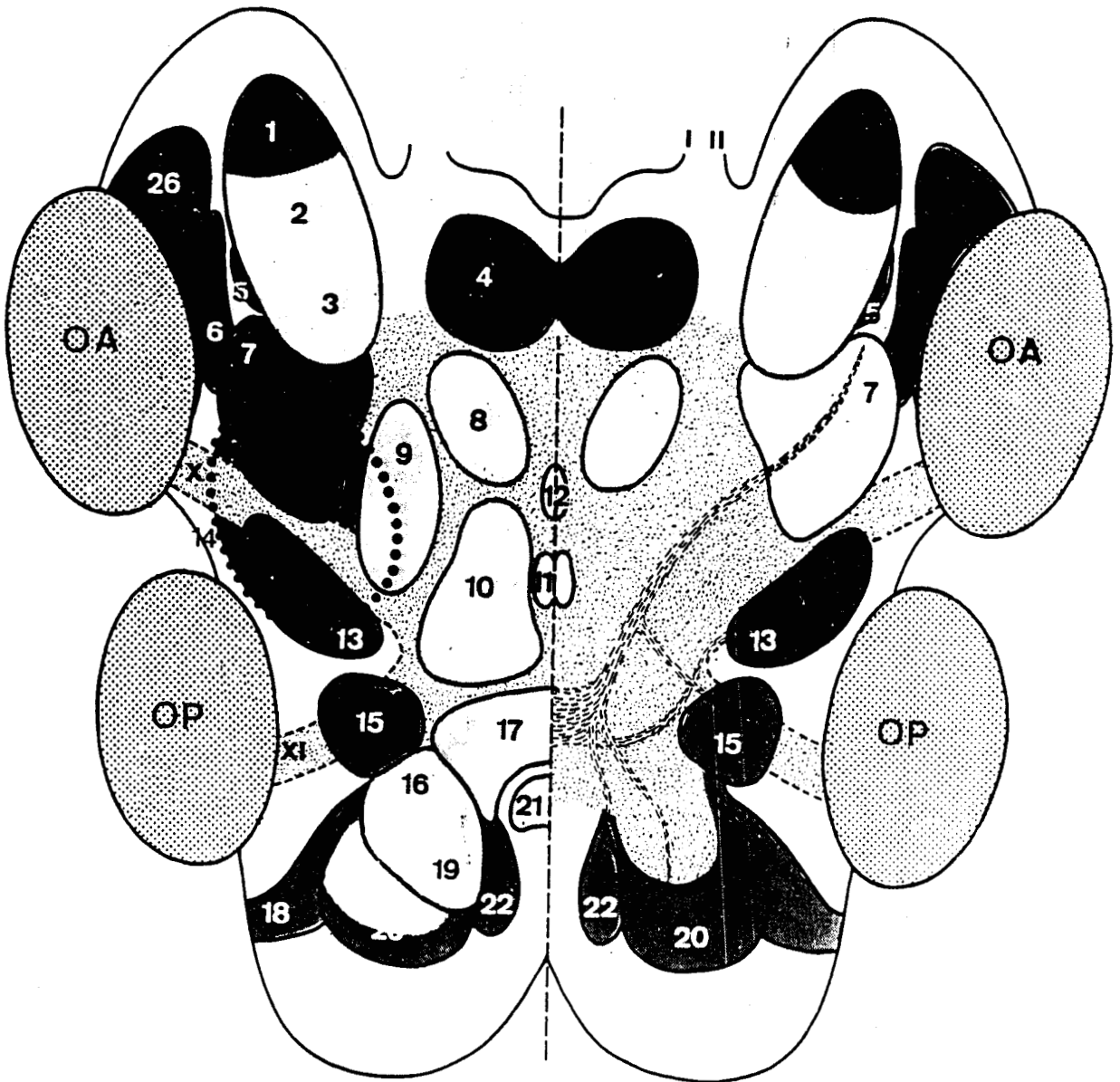
Un seul produit traduit in ovo, de masse moléculaire 28 kDa, a été reconnu par les anticorps élaborés contre la fraction active contenant le SIF.



***FIG. 26**

III Etude morphofonctionnelle

Un schéma représentant la distribution des noyaux ganglionnaires numérotés dans le cerveau de Nereis diversicolor est rapporté par le document ci-dessous élaboré par Dhainaut-Courtois (1970).



Des cellules immunoréactives aux anticorps anti-proCCK de Mammifères ont été observées au niveau du cerveau, de la chaîne nerveuse ventrale, et de l'intestin de Nereis diversicolor.

Les cellules marquées du cerveau se localisent dans différents noyaux ganglionnaires. Une forte réaction a été observée au niveau de quelques péricaryons des noyaux 4, 7, 8, 10, 20, 23 et 25, alors qu'une réaction modérée a été obtenue au niveau de certains péricaryons des noyaux 5, 13 et 14. Des trajets nerveux dans le neuropile sont également marqués. Cependant, il faut noter qu'au niveau de la région infracérébrale, fibres et cellules ne sont pas immunoréactives.

Au niveau de la chaîne nerveuse ventrale, des cellules du groupe médian et des cellules du groupe antérieur sont immunoréactives. Les anticorps utilisés marquent également des trajets dans le neuropile, trajets se dirigeant vers le nerf II. Quelques cellules intestinales réagissent aux anticorps utilisés mais sont moins nombreuses que celles détectées au niveau du cerveau ou de la chaîne nerveuse ventrale. La coloration au Clark a permis de distinguer deux populations de neurones, une population fuchsinophile et une autre colorée au vert lumière (fig 27).

La technique dite des coupes alternées indique une colocalisation dans le cytoplasme de quelques neurones, de matériel apparenté d'une part au précurseur de la CCK et d'autre part à la CCK 8 de Mammifères. Des trajets nerveux immunoréactifs ont également été observés (fig 28).

Figure 27. Réactions immunocytochimiques positives avec les anticorps anti-proCCK de Mammifères sur le cerveau (Photos A, B, C, D, E et F), sur la chaîne nerveuse ventrale (photos G et H) et sur les cellules intestinales (Photo I) de Nereis diversicolor. Les chiffres arabes indiquent les noyaux ganglionnaires.

Ep, épiderme ; NF neuropile ; V, vaisseau ; OA, oeil antérieur ; GM, groupe median ; II, nerf II ; M, musculature ; D, dissipation ; FG, fibres géantes ; L, lumière du tube digestif ; TD, tube digestif.

Les photos A, E et F représentent une coupe transversale du cerveau.

Les photos B, C et D représentent une coupe sagittale du cerveau.

Les photos G et H représentent une coupe longitudinale de la chaîne nerveuse ventrale.

La photo I représente le tube digestif, les flèches indiquent des péricaryons immunoréactifs aux anticorps anti-proCCK de Mammifères.

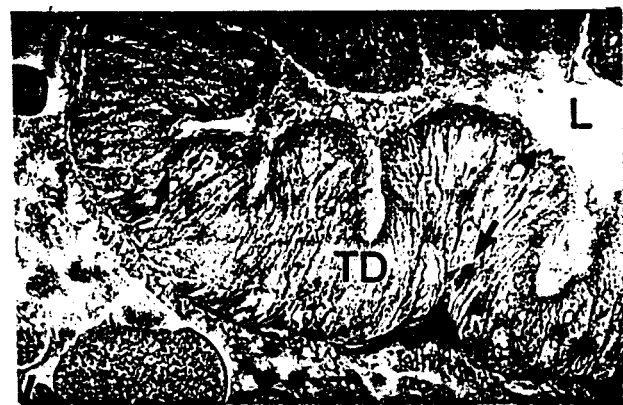
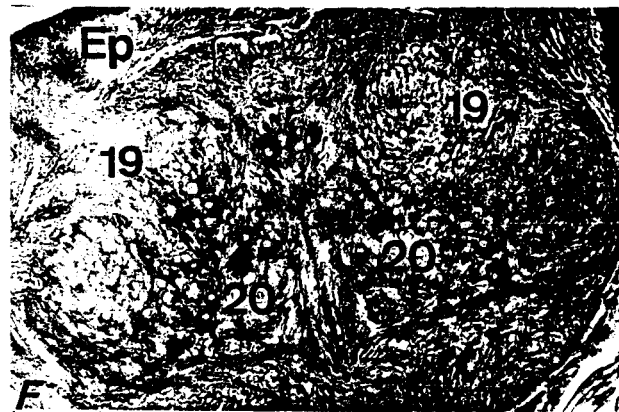
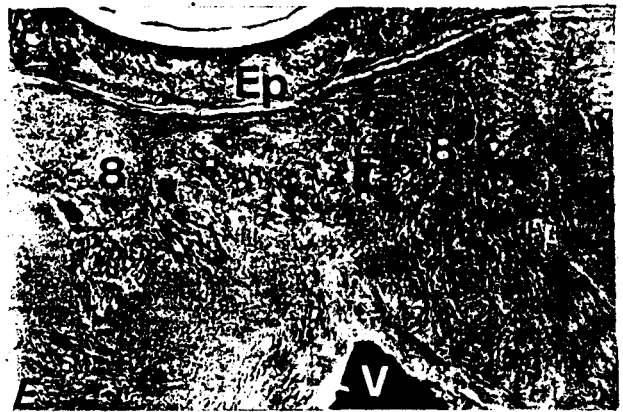
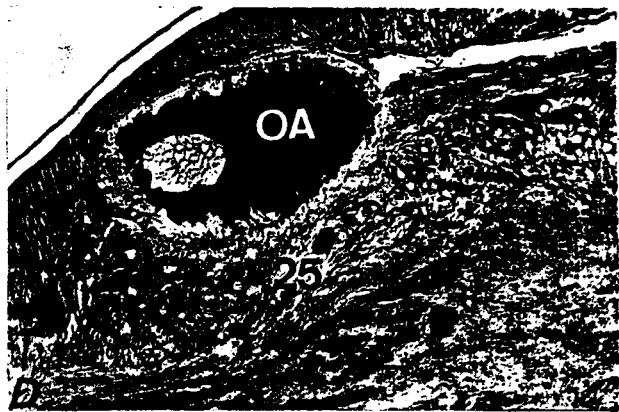
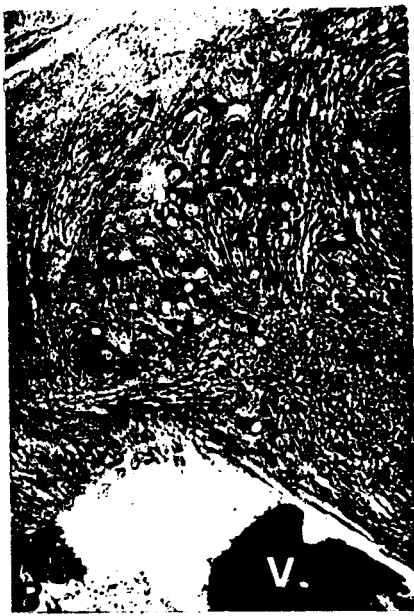


Figure 28. Colocalisation de réactions positives obtenues avec les anticorps anti-proCCK de Mammifères (photos A, C, E et G) et avec les anticorps anti-CCK 8 de Mammifères (photos B, D, F et H). Les chiffres arabes indiquent les noyaux ganglionnaires.

Ep, épiderme ; OA, oeil antérieur ; CP, corpora pedunculata ; Np, neuropile ; NO, nerf optique antérieur ; NP, neuropile ; GM, groupe median ; II, nerf II ; M, musculature ; D, dissipation ; FG, fibres géantes.

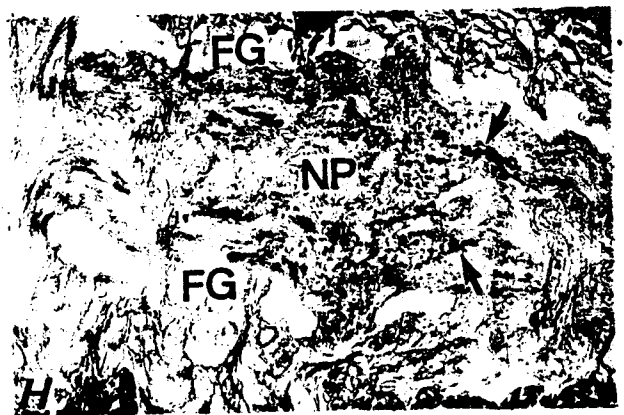
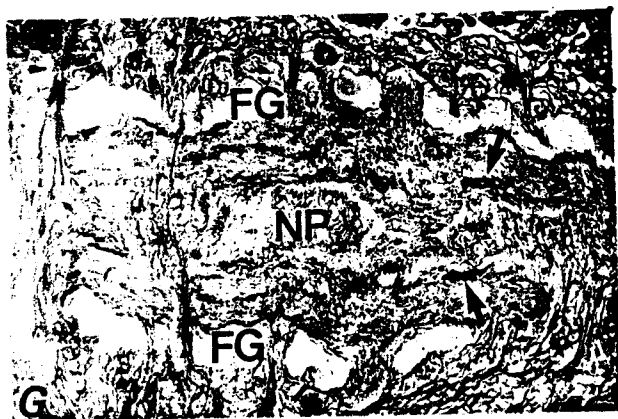
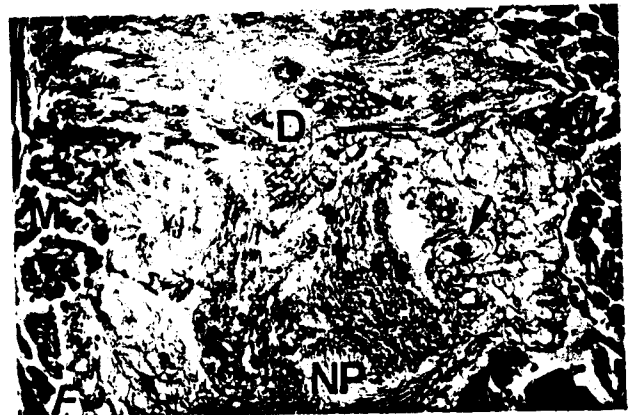
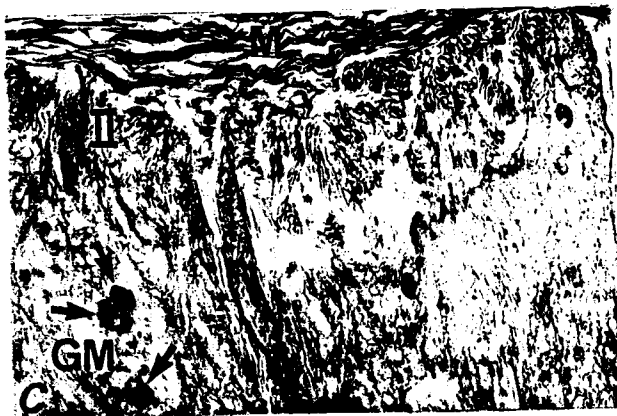
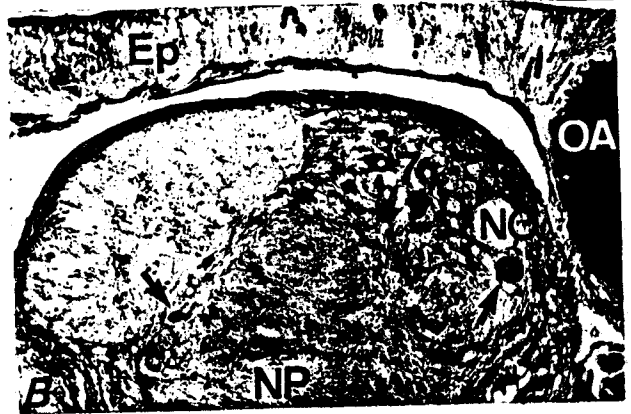
Les photos A et B représentent une coupe sagittale du cerveau.

Les photos C, D, E et F représentent une coupe longitudinale de la chaîne nerveuse ventrale.

Les flèches indiquent une immunoréaction dans le même neurone.

Les photos G et H représentent une coupe horizontale de la chaîne nerveuse ventrale.

Les flèches indiquent des trajets immunoréactifs avec les anticorps anti-proCCK et les anticorps anti-CCK8 de Mammifères.



IV Resultats concernant la banque d'expression élaborée dans le vecteur λ gt 11

a) Mesures de la quantité d'ADNc synthétisée

Au cours de l'élaboration de notre banque d'expression, il était nécessaire de déterminer à plusieurs reprises la concentration d'ADNc double brins. La première détermination précède l'étape de méthylation des sites Eco R1 de l'ADNc double brins. La concentration de ce dernier a été alors évaluée par spectrophotométrie. L'absorbance à 260 nm permet de calculer que 4,8 μ g d'ADNc ont été construits à partir de 5 μ g d'ARNm poly(A)+ extraits de prostomiums de Nereis diversicolor. Ce bon résultat indique, a posteriori, le déroulement satisfaisant des réactions enzymatiques nécessaires à la synthèse d'ADNc.

De même, après la purification de l'ADNc par chromatographie éliminant l'excès des "linkers", et avant la recombinaison in vitro de l'ADNc dans le phage gt 11, la concentration de l'ADNc a été déterminée une deuxième fois. L'absorbance à 260 nm indique que 2,8 μ g d'ADNc sont présents dans l'échantillon. La diminution de la quantité d'ADNc par rapport à la première mesure est certainement due à une perte de matériel survenue au cours des différentes manipulations nécessaires à la réalisation de la banque d'ADNc.

b) Titre de la banque

Lors de l'insertion de l'ADNc dans le phage λ gt 11, nous avons utilisé deux systèmes d'empaquetage (voir "Matériels et Techniques"). L'efficacité de l'empaquetage, qui correspond à l'évaluation du titre de la banque, a été estimée.

Des banques élaborées à partir d'ADNc de sauvage servent de témoin pour les deux systèmes.

α- Empaquetage dans le système "Gigapack"

L'empaquetage dans le système "Gigapack" a donné un meilleur résultat que celui obtenu dans le système Amersham. L'ADN du phage λ sauvage, pris pour témoin, a donné un très bon titre : 10^9 phages/ml. La proportion de phages recombinés a atteint les 100 %.

L'ADN de λ gt 11, qui a été confronté à des molécules d'ADNc bicaténaires dans le but d'obtenir un maximum de recombinaison in vitro, a permis d'atteindre le titre de 10^6 phages/ml dont 75 % sont des recombinants (75 % de plages de lyse blanches). Ce résultat est satisfaisant.

Après amplification de cette banque originelle, le titre a atteint 10^8 phages/ml ; le pourcentage de recombinants n'a pas varié.

β- Empaquetage dans le système "Amersham"

* **Témoin négatif** : A la surface du milieu nutritif contenu dans la boîte de Pétri, toutes les plages de lyse sont bleues. Ces dernières résultent de la synthèse de la β galactosidase qui a hydrolysé le substrat X-gal. L'ADN des phages concernés n'est donc pas recombiné au niveau du site Eco R1 du gène de la β -galactosidase.

* **Témoin positif** : L'ADN prédigéré à l'aide de l'enzyme Eco R1, fourni avec le "kit" d'"Amersham", a été recombiné in vitro. Ce test a permis d'obtenir un titre de 10^6 phages/ml ; la proportion des phages recombinés a atteint 100 %.

En ce qui concerne la banque élaborée à partir des ARNm de cerveaux, nous n'avons obtenu que 10^3 phages/ml dont 70 % sont recombinés. Le titre atteint par ce système étant inférieur à celui réalisé par le système "Gigapack", nous avons alors envisagé le "screening" des protéines de fusion d'intérêt à partir de cette dernière banque.

c) Caractérisation de protéines de fusion

En utilisant un mélange d'anticorps anti-dyn 1-17 et d'anticorps anti α -néo-endorphine, nous avons obtenu une dizaine de plages colorées en bleu-violet. Cette coloration indique que la protéine de fusion synthétisée par les bactéries avant leur lyse a été reconnue par les anticorps utilisés. Les phages recombinés de ces plages de lyse ont été repiqués dans le but d'une purification des divers clones.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les approches moléculaires que nous avons entreprises sur l'expression de gènes, dans notre modèle expérimental, les prostomiums de Nereis diversicolor, nous ont permis d'obtenir des résultats que nous discutons maintenant, et de dégager quelques conclusions que nous proposons ci-dessous.

La comparaison entre les produits traduits à partir des ARNm isolés de prostomiums ou de cerveaux n'indique aucune différence quantitative ou qualitative évidente entre ces produits. Nous considérons donc que les ARNm impliqués dans nos expériences ont pour la plupart, sinon pour tous, le cerveau pour origine ; la part des ARNm extraits des tissus annexes au prostomium est négligeable.

Certains de nos résultats tendent à montrer que lors du vieillissement des animaux survient une diminution de la quantité globale des polypeptides synthétisés in vitro. Cette donnée suggère donc une réduction progressive de la synthèse globale des ARNm dans le cerveau. Cette réduction peut être une des manifestations du ralentissement de l'activité endocrine cérébrale chez Nereis diversicolor. Ce résultat est à rapprocher de celui de Bulet (com. personnelle) qui observe une diminution de la sécrétion du facteur inhibiteur de la spermatogenèse en culture organotypique, en fonction de l'état de maturité sexuelle des animaux. En utilisant une technique de dosage biologique, Porchet (1974) a pu établir un cycle de l'activité endocrine cérébrale. La production hormonale décroît régulièrement au cours de la période s'étendant de la sexualisation à la reproduction des animaux.

Des ARNm poly(A)+ isolés de prostomiums de Nereis diversicolor ont été traduits in vitro en lysat de réticulocyte de lapin ; les polypeptides obtenus, analysés par électrophorèse en milieu dénaturant, ont une masse moléculaire comprise entre 15 et 120 kDa. Des ARNm poly(A)+, de même

origine que les précédents, ont aussi été traduits dans un deuxième système acellulaire, l'extrait de germes de blé. Les polypeptides obtenus, analysés selon la même technique que celle utilisée pour l'étude des produits traduits en lysat de réticulocytes de lapin, ont une masse moléculaire comprise entre 12 et 140 kDa. L'extrait de germes de blé a été envisagé comme autre système de traduction en milieu acellulaire, car ce système semble rendre possible ou même simplement faciliter la traduction de certains ARNm (Borelli et Wu, 1985). En particulier, ce milieu semble constituer un système favorable pour la traduction des peptides. A propos de notre matériel, l'extrait de germes de blé ne s'est pas révélé meilleur que le lysat de réticulocytes de lapin pour la synthèse in vitro de peptides de masse moléculaire inférieure à 10 kDa.

Par ailleurs, la traduction des ARNm poly(A)+ dans un système cellulaire, représenté par l'ovocyte de l'Amphibien Xenopus laevis, a été également testée. Notre objectif était d'éprouver la capacité de l'ovocyte à traduire des précurseurs de neuropeptides et à faire subir une maturation à ces macromolécules. Notre projet était aussi de mettre en évidence une éventuelle exportation des produits maturés vers le milieu d'incubation des cellules ayant reçu de l'ARNm. Des électrophorèses en gel de polyacrylamide - urée des produits traduits à partir des ARNm poly(A)+ de prostomiums de Nereis diversicolor révèlent la présence de molécules nouvellement synthétisées, marquées à la méthionine-³⁵S. Ces produits, qui possèdent une masse moléculaire comprise entre 4,5 et 95 kDa, sont détectables aussi bien à l'intérieur des ovocytes que dans le milieu d'incubation. La présence dans le milieu d'incubation de certains produits de faible masse moléculaire évoque une maturation post-traductionnelle de certains polypeptides traduits in ovo.

L'ensemble des résultats précédents concernant les polypeptides traduits dans divers systèmes cellulaire ou acellulaire indique une bonne conservation des ARNm isolés des prostomiums. Une extraction soigneuse des ARNm, pratiquée en évitant la technique usuelle au phénol, mais en mettant en oeuvre l'action de l'isothiocyanate de guanidium, nous a semblé une condition nécessaire pour l'isolement d'ARNm de qualité à partir d'organes éventuellement riches en ribonucléases (Actis et al., 1983 ; Frazier et al., 1983).

Bien que les extraits d'ARNm aient été traités par le LiCl qui réduit de façon efficace la contamination inévitable par des acides nucléiques bicaténaires (Saiga et Edström, 1985), des traces de molécules contaminantes peuvent persister dans les extraits. Ces molécules contaminantes sont par exemple des traces d'ARN dont la structure primaire confère une structure secondaire partiellement bicaténaire, qui peuvent exercer une inhibition sur la traduction in vitro des ARNm en lysat de réticulocytes de lapin (Borreli et Wu, 1985). Un passage des ARN, préalablement traités au LiCl, au travers d'une colonne d'affinité d'oligo-dT cellulose permet d'obtenir des ARNm dont le degré de pureté est satisfaisant pour mener à bien notre expérimentation.

L'obtention des ARNm qui se trouvent dans un bon état de conservation, et la qualité constante de nos préparations nous ont conduit, en toute logique, à envisager la caractérisation d'un ou de plusieurs polypeptides synthétisés à partir de ces ARNm isolés de cerveaux de Nereis diversicolor. Les recherches entreprises sur les systèmes neuroendocrines des Néréidiens montrent que les principes biologiques actifs sont de nature peptidique (Bulet et Porchet, 1986 ; Smiri et Andries, com. personnelle). Il a été démontré, chez d'autres organismes Invertébrés et Ver-

tébrés, qu'il s'agit de molécules à caractère neurohormonal, qui dérivent généralement d'une molécule précurseur après une maturation post-traductionnelle. En conséquence, notre attention a été naturellement attirée vers la mise en évidence et la caractérisation des précurseurs de ces substances peptidiques dont le moyen d'étude le plus évident est celui de l'expression des gènes correspondants. La caractérisation de certains produits traduits a été essentiellement réalisée en utilisant des anticorps élaborés contre des espèces moléculaires produites par des cellules de Mammifères. Les anticorps testés sont d'une part ceux dirigés contre certaines séquences de la préproCCK de Mammifères, et d'autre part ceux dirigés contre la dyn 1-17 et l' α -néo-endorphine de Mammifères. A propos de la famille de la CCK, Beinfeld (1985) a démontré qu'aucun anticorps dirigé contre la CCK 8 ou contre la CCK 33 n'est capable de détecter les molécules de CCK supérieures à la CCK 58. Ces anticorps ne reconnaissent donc pas la molécule précurseur (préproCCK). Ces données expliquent notre choix d'utiliser des anticorps dirigés contre des séquences de préproCCK de Mammifères. En revanche, les arguments précédents ne sont pas recevables pour la mise en évidence du test impliquant l'utilisation des anticorps anti-dyn 1-17 et anti' α -néo-endorphine qui peuvent reconnaître la molécules de leur précurseur (préprodyn) (Schröder et al., 1988). Nous avons aussi testé un anticorps monoclonal spécifique de molécules de Néréidiens, gracieusement fournis par Delaire-Hesdin de notre laboratoire, vis à vis de produits traduits in ovo. L'un de ces derniers, de masse moléculaire 28 kDa, et l'un des polypeptides isolés du cerveau, de même masse moléculaire ont été reconnus par l'anticorps dirigé contre la fraction active contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse chez Nereis virens (Bulet et Delaire-Hesdin, com. personnelle). Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps élaborés

rés contre la dyn 1-17 et contre l' α -néo-endorphine de Mammifères, vis à vis de produits traduits in vitro ou in ovo, indique la présence d'un ensemble de produits bien définis, de masse moléculaire comprise entre 60 et 70 kDa, réagissant avec chacun de ces deux anticorps. Un résultat identique a été obtenu en utilisant les protéines extraites du cerveau. De plus, un peptide de masse moléculaire égale à 1,8 kDa, isolé du cerveau, a été reconnu par les anticorps dirigés contre la dyn 1-17 de Mammifères. Ce produit dont la masse moléculaire est très voisine de celle de la dyn 1-17 de Mammifères peut être apparenté à son homologue chez les Vertébrés.

L'utilisation d'anticorps dirigés contre certaines séquences de la préproCCK de Mammifères, nous a permis de caractériser certains produits traduits in ovo ou in vitro à partir des ARNm extraits de cerveaux de Nereis diversicolor. Deux de ces produits de masse moléculaire 64 et 70 kDa ont également été retrouvés parmi les protéines extraites du cerveau. Ces deux protéines peuvent servir de référence et leur reconnaissance conforte les résultats des traductions obtenues à partir des ARNm isolés, au moins pour ces grands polypeptides de 64 et 70 kDa.

Ces mêmes anticorps, dirigés contre le précurseur de la CCK de Mammifères, ont été aussi testés en immunohistochimie dans le but d'une localisation précise au niveau cellulaire, de l'origine des ARNm spécifiant les produits traduits reconnus. Les résultats obtenus au cours de cette étude morphofonctionnelle réalisée sur le système nerveux de Nereis diversicolor révèlent des cellules immunoréactives qui constituent probablement le site de synthèse des ARNm correspondant à ce précurseur. Les cellules de différents noyaux ganglionnaires du cerveau et de la chaîne nerveuse témoignent d'une large distribution de cette molécule dans

l'ensemble du système nerveux de Néréidiens. Cette large distribution a été également observée avec le précurseur de la CCK au niveau du système nerveux des Mammifères (Larsson et Rehfeld, 1977). Nos résultats sont aussi à rapprocher de ceux obtenus par Engelhardt et al. (1982) et Dhainaut-Courtois et al. (1985b, 1986). En effet, ces auteurs ont mis en évidence une large distribution de molécules apparentées à la CCK 8 dans tout le système nerveux de Nereis diversicolor. La méthode dite des coupes alternées nous a conduit à reconnaître que la répartition des cellules immunoréactives à l'anticorps anti-CCK 8 recouvre partiellement celle des cellules réagissant à l'anticorps anti-proCCK de Mammifères. L'affinité tinctoriale au colorant de Clark indique la présence d'au moins deux populations de neurones sécréteurs (cellules fuchsinophiles et cellules colorées par le vert lumière), qui possèdent aussi un précurseur de la CCK apparenté à celui des Mammifères. La présence de trajets nerveux marqués par l'anticorps anti-proCCK dans le neuropile est difficile à interpréter. S'agit-il d'un transport de molécules dont la maturation à partir du précurseur est inachevée ? Par ailleurs, l'absence de cellules et de fibres immunoréactives dans la région infracérébrale montre que les molécules intermédiaires précédentes ne sont pas libérées à ce niveau dans le coelome. Cette absence de marquage a également été observée après utilisation des anticorps anti-CCK 8 (Engelhardt et al., 1982). Enfin, quelques cellules intestinales ont également été reconnues par les anticorps anti-proCCK de Mammifères. Des molécules apparentées à la proCCK seraient donc aussi présentes au niveau de l'intestin. Cette déduction est confortée par l'utilisation des anticorps anti-CCK 8 qui marquent des cellules intestinales chez Nereis diversicolor (Dhainaut-Courtois et al., 1985a) et chez les Mammifères (Rehfeld, 1978).

La présence simultanée des précurseurs de la CCK au niveau du système nerveux et au niveau de l'intestin, nous permet de postuler que les peptides qui dérivent du précurseur peuvent exercer des fonctions multiples : neurotransmetteurs et/ou neuromodulateurs au sein du système nerveux et hormone au niveau de l'intestin.

L'ensemble de ces résultats d'immunodétection, mettant en oeuvre des anticorps variés qui reconnaissent des polypeptides extraits du cerveau, des polypeptides traduits in vitro ou in ovo à partir des ARNm extraits du même organe, des produits de sécrétion in situ au niveau de certaines cellules du cerveau ; si nous ajoutons que les résultats ont été obtenus par des protocoles différents, électrophorèses en diverses conditions, immunoprécipitation, immunotransfert ; l'ensemble de ces résultats, donc, nous a naturellement incité à élaborer une banque d'expression et à prévoir l'utilisation d'une panoplie d'anticorps à notre disposition pour cribler les éventuels clones recombinés, par le biais de la reconnaissance de leur protéine de fusion. Effectivement, l'utilisation d'anticorps anti-dyn 1-17 et anti δ -néo-endorphine a déjà permis de détecter des clones de phages intéressants et d'amplifier ces colonies.

Les travaux immunohistochimiques réalisés d'une part avec les anticorps élaborés contre la dyn 1-17 et contre l' δ -néo-endorphine de Mammifères (Dhainaut-Courtois et al., 1986 ; Dhainaut-Courtois et Golding, 1988) et d'autre part avec les anticorps anti-CCK/gastrine de Mammifères (Engelhardt et al., 1982) montrent la présence dans le cerveau de Nereis diversicolor, de molécules apparentées à ces trois peptides de Mammifères. Récemment une technique chromatographique (HPLC) a permis l'isolement à partir du cerveau de Nereis diversicolor de peptides apparentés à la CCK/gastrine (Smiri et Andriès, com. personnelle).

Ces résultats intéressants, acquis par des approches cytologiques ou biochimiques, confortent la notion de l'existence de molécules précurseurs correspondant aux peptides mentionnés dans le cerveau des Néréidiens. Nous proposons donc que le polypeptide de masse moléculaire égale à 70 kDa, caractérisé par les anticorps anti-proCCK et par les anticorps anti-dyn 1-17 et anti δ -néo-endorphine de Mammifères, soit le précurseur de ces substances peptidiques. Cette hypothèse s'appuie essentiellement sur les immunodétections réalisées à partir des produits traduits *in vitro*, car le lysat de réticulocyte de lapin et l'extrait de germes de blé constituent des systèmes acellulaires de traduction dans lesquels, faute d'enzymes, aucune maturation post-traductionnelle n'est possible. Le polypeptide de masse moléculaire égale à 70 kDa représente donc vraisemblablement la forme primaire sous laquelle ce précurseur est synthétisé. Il nous semble important de rappeler que la technique de l'immunotransfert, comme celle de l'immunohistochimie attestent la présence de cette forme moléculaire au niveau de cellules cérébrales.

Kakidani et al. (1982) ont montré que chez les Mammifères, la dyn 1-17 et l' δ -néo-endorphine sont deux peptides opioïdes qui dérivent, par une maturation post-traductionnelle, d'un même précurseur nommé prodyn ou proenképhaline B. La reconnaissance du polypeptide de masse moléculaire égale à 70 kDa par chacun des anticorps dirigés contre ces deux peptides opioïdes, constitue un argument majeur, en faveur de l'hypothèse de l'existence dans le cerveau des Néréidiens, d'un précurseur de masse moléculaire élevée, à partir duquel différents peptides peuvent dériver. Nous postulons aussi que chez des Invertébrés inférieurs, les Néréidiens, comme dans les organismes supérieurs, les Mammifères, les peptides opioïdes dérivent par maturation, d'un précurseur commun.

Il est cependant difficile d'exclure totalement l'existence de deux précurseurs de même masse moléculaire (70 kDa), l'un à l'origine de la CCK et l'autre à l'origine de la dyn 1-17 et de α -néo-endorphine.

Parmi les produits traduits in ovo, des polypeptides de masse moléculaire inférieure à 70 kDa ont aussi été reconnus par les différents anticorps utilisés. Si nous gardons en mémoire que ces polypeptides ne sont jamais détectés après des traductions dans les deux systèmes acellulaires employés, il nous semble possible de proposer que ces produits ont probablement pour origine la molécule de 70 kDa. En faveur de cette hypothèse, nous considérons que les polypeptides isolés du cerveau, et dont la masse moléculaire est inférieure à 70 kDa soient le résultat d'une maturation naturelle qui se produit dans les cellules cérébrales. La maturation du précurseur de masse moléculaire égale à 70 kDa se ferait alors en plusieurs étapes. Chaque étape de cette maturation donnerait naissance à un ou à plusieurs peptides actifs et à une forme intermédiaire du précurseur. Cette maturation en plusieurs étapes, impliquant probablement des systèmes enzymatiques distincts, a été décrite pour le précurseur commun des hormones neurohypophysaires et des neurophysines chez les Mammifères (Chauvet, 1988).

Nous avons aussi mis en évidence d'autres familles de produits traduits in ovo, produits mal définis après électrophorèse des immunoprécipités. Ces produits, absents des extraits du cerveau, peuvent être considérés comme des produits résultants d'une dégradation par des enzymes ovocytaires du précurseur de masse moléculaire 70 kDa. En effet, Sorreq et Miskin (1981) rapportent que des protéases, présentes dans les ovocytes de X. laevis, peuvent reconnaître des sites protéolytiques au niveau de certains produits traduits après l'injection d'ARNm et par conséquent induisent des dégradations. Cette interprétation est confortée par l'absence de ces familles de produits, parmi les protéines isolées du cerveau.

Les protéines sécrétées dans le milieu de culture par les ovocytes ayant reçu en injection des ARNm de cerveau ne sont pas reconnues par les différents anticorps testés. Cette absence de réaction immunologique suggère que les produits reconnus par ces mêmes anticorps dans les ovocytes demeurent à l'intérieur des cellules. Il est donc vraisemblable que les ovocytes de X. laevis ne possèdent pas l'équipement enzymatique complet nécessaire à une maturation post-traductionnelle normale du polypeptide de 70 kDa des Néréidiens. En conséquence, des peptides biologiquement actifs ne sont pas libérés, **au moins en quantités immunologiquement détectables**, par l'ovocyte.

Les divers réactions immunologiques du précurseur des Néréidiens avec les différents anticorps utilisés nous incitent à postuler que ce précurseur possède certaines structures moléculaires homologues à celle de la proCCK, mais aussi à celles de peptides opioïdes de Mammifères. Cependant, le postulat doit être présenté avec réserve, car on ne peut exclure l'existence de deux précurseurs de 70 kDa.

Nous désirons attirer l'attention sur le fait que parmi les différents anticorps utilisés, l'un d'entre eux nommé 1700/3 par Rehfeld, présente un intérêt majeur. En effet, cet anticorps a été élaboré contre le site d'amidation (Trp-Met-Asp-Phe-CONH₂-Gly-Arg-Arg) (résidus 100-106 de la proCCK humaine) (Takahashi et al., 1985 ; Rehfeld, 1987). Ce site d'amidation est une cible spécifique de maturation de la proCCK (Rehfeld et Hansen, 1986). Cette information donne de l'importance à la reconnaissance du polypeptide de masse moléculaire 70 kDa. Il y aurait donc une certaine homologie entre le site d'amidation du précurseur de la CCK humaine et un site du précurseur que nous avons découvert chez les Néréidiens.

Cependant, il nous faut mentionner que la molécule du précurseur des Néréidiens, pour laquelle nous pensons avoir trouvé quelques ressemblances avec la proCCK et la prodyn de Mammifères, se caractérise par une masse moléculaire très différente de ses homologues des Vertébrés supérieurs. En effet, la proCCK humaine (Rehfeld, 1987), de même que la proCCK de rat (Beinfeld, 1985) possèdent une masse moléculaire d'environ 13 kDa, et la prodyn de 30 kDa (Lewis et Erickson, 1986). Lewis et Erickson (1986) ont montré que la prodyn appartient à une classe de précurseurs neuropeptidiques qui se caractérise par la présence de copies multiples d'un même peptide au sein de leur structure. Nous invoquons, avec prudence, une organisation semblable pour expliquer le gigantisme du précurseur de Néréidiens par rapport à ses homologues des Mammifères. Le précurseur de 70 kDa, synthétisé à partir des ARNm de Nereis diversicolor, comprendrait au niveau de son organisation moléculaire de multiples copies de séquences homologues d'une part aux peptides opioïdes, et d'autre part aux molécules de la CCK ; on ne peut exclure la présence au sein de ce "méga-précurseur" de séquences peptidiques encore insoupçonnées. Nous suggérons même une répétition plus importante de copies du même peptide que celle qui se produit au sein de la molécule de prodyn. La redondance moléculaire qui vient d'être invoquée serait responsable, au moins en partie, de la masse moléculaire élevée du précurseur des Néréidiens. Cette répétition de séquences a été déterminée dans le précurseur du FMRF-amide décrit chez un autre Invertébré, l'Aplysie. En effet, Taussig et al. (1988) ont montré que 28 copies du pentapeptide Phe-Met-Arg-Phe-Gly sont incluses dans la molécule précurseur de 71 kDa.

Le précurseur que nous avons caractérisé chez les Néréidiens peut également appartenir à une deuxième classe de précurseurs. Cette dernière regroupe des précurseurs à partir desquels dérivent de multiples peptides exprimant diffé

rentes activités biologiques. Dans cette classe, il est possible d'inclure le précurseur de la CDCH décrit chez la Lymnée. De cette préprohormone de 30 kDa, 12 peptides différents, possédant des fonctions biologiques différentes, sont libérés par des phénomènes de maturation (Vreugdenhil et al., 1988b). Dans l'état actuel de nos connaissances, nous sommes dans l'incapacité de classer dans l'une des deux catégories, le précurseur que nous avons caractérisé chez les Néréidiens. Nous ne pouvons que proposer l'existence d'un précurseur de masse moléculaire élevée (70 kDa) qui peut être commun à différents peptides actifs, incluant la CCK et la famille des opioïdes. De plus, nous pouvons avancer que dans le cerveau des Néréidiens, il existe certainement d'autres précurseurs que celui qui a été détecté par les anticorps élaborés contre la proCCK et contre la dyn 1-17 et l' κ -néo-endorphine de Mammifères. Cette proposition est soutenue par l'utilisation des anticorps spécifiques élaborés contre des molécules isolées de Néréidiens. Ainsi, le produit de masse moléculaire égale à 28 kDa, reconnu par l'anticorps monoclonal dirigé contre la fraction contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse, représente certainement un autre type de précurseur, différent de celui de 70 kDa, et à partir duquel d'autres neuropeptides actifs sont maturés.

Enfin, nous postulons que chez les Néréidiens, Invertébrés inférieurs, il existe un **petit nombre de précurseurs neuropeptidiques, mais de masse moléculaire élevée**. Ces précurseurs comprendraient plusieurs familles peptidiques médiant différentes activités biologiques. L'évolution des espèces se serait accompagnée d'une multiplication des précurseurs des neuropeptides ; chaque famille peptidique, caractérisée par une fonction biologique, dériverait d'un précurseur qui lui est propre.

BIBLIOGRAPHIE

Actis L.A., Flury A. and Patrino L.C., 1983. Translation in a cell-free system of mRNA from term placenta extracted by guanidine hydrochloride. Molec. Biol. Rep., **9**, 203-208.

Aviv H. and Leder P., 1972. Purification of biologically active globulin messenger RNA by chromatography of oligothymidilic acid cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **69**, 1408-1417.

Beinfeld M., 1985. Cholecystokinin (CCK) gene-related peptides : distribution and characterization of immunoreactive pro-CCK and an amino-terminal pro-CCK fragment in rat brain. Brain Res., **344**, 351-355.

Boilly B., 1974. Mode d'action du cerveau sur la régénération caudale de Nereis diversicolor (Annélide Polychète). Wilhem Roux' Archiv, **174**, 195-209.

Boilly B. et Boilly-Marer Y., 1972. Rôle des contacts tissulaires dans le déclenchement de la morphogenèse régénératrice chez la Nereis. Bull. Soc. Zool. fr., **97**, 296-308.

Boilly-Marer Y., 1962. Inhibitions des transformations hétéronéréidiennes par le cerveau d'espèces sans épitoquie (Néréidiens). C.R. Acad. Sci. Paris, **254**, 2830-2832.

Boilly-Marer Y., 1983. Culture de segments et induction de morphogenèses surnuméraires en présence d'insuline chez Nereis pelagica L. (Néréidien à épitoquie, Annélide Polychète). C.R. Acad. Sci. Paris, **297D**, 213-218.

Borelli T.J. and Wu J.M., 1985. In vitro translation of polyadenylated RNA isolated from control and interferon-treated human promyelocytic HL-60 leukemic cells. Biochem. Intern., **10**, 517-524.

Boyd F.J. and Walker R.J., 1985. Actions of the molluscan neuropeptide FMRF-amide on neurones in the suboesophageal ganglia of the snail Helix aspersa. Comp. Biochem. Physiol., **B1C**, 379-386.

Bulet P. and Porchet M., 1986. A new purification procedure for the neuropeptide controlling gametogenesis in Nereids (Annelida Polychaeta). In "Advances in Invertebrate reproduction". Porchet M., Andries J.C. and Dhainaut A. eds., Elsevier, Lille, 498.

Burr F.A. and Burr B., 1983. Slab gel system for the resolution of oligopeptides below molecular weight 10,000. In "Methods in enzymology". Fleischer S. and Fleischer B. eds., Acad. Press. New York, London, Paris, **96**, 239-244.

Cardon C., 1970. Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de Nereis diversicolor O.F. Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation. Bull. Soc. Zool. fr., **95**, 543-549.

Cardon C., Durchon M. et Porchet M., 1981. Purification par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) de l'hormone cérébrale de Nereis diversicolor et de Perinereis cultrifera. Reprod. Nutr. Develop., **21**, 383-390.

Cariello L., Zametti L., Spagnuolo A. and Nelson L., 1986. Effects of opioids and antagonists on the rate of sea urchin sperm progressive motility. Biol. Bull., **171**, 208-216.

Chauvet J., 1988. Les précurseurs communs des hormones neurohypophysaires et des neurophysines. Ann. Endocrinol., **49**, 377-383.

Chiu A.Y., Hunkapillar N.W., Heller E., Stuart D.K., Hood L.E. and Strumwasser F., 1979. Neuropeptide egg-laying hormone of Aplysia californica : purification and primary structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **76**, 6656-6660.

Christensson-Nylander I., Nyberg F., Ragnarsson U. and Terenius L., 1985. A general procedure for analysis of proenkephalin B derived opioid peptides. Reg. peptides, **11**, 65-76.

Clark R.B., 1955. The posterior lobes of the brain in Nephtys and the mucus glands of the prostomium. Quart. J. Microscop. Sci., **96**, 545-565.

Clark R.B., 1969. Endocrine influence in Annelids. Gen. Comp. Endocrinol., **2**, 572-581.

Clemens M.J., 1983. Translation of eucaryotic messenger RNA in Cell-free extracts. In "Transcription and translation, a practical approach". Hames B.D. and Higgins S.J., eds., IRL press, Oxford, Washington DC, 231-270.

Cobbs J.S. and Pinsker H.M., 1982. Role of bag cells in egg deposition of Aplysia brasiliana. I-Comparison of normal and elicited behaviors. J. Comp. Physiol., **147A**, 523-535.

Comb M., Seeburg P.H., Adelman J., Eiden L. and Herbert H., 1982. Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. Nature, **295**, 663-666.

Cottrell G.A., Davies N.W. and Green K.A., 1984. Multiple actions of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide and related peptides on identified Helix neurons. J. Physiol., **365**, 315-333.

Cottrell G.A., Greenberg M.J. and Price D.A., 1983. Differential effects of the molluscan neuropeptides FMRF-amide and the related Met-enkephalin derivative YGGFMRF-amide on the Helix tentacle retractor muscle. Comp. Biochem. Physiol., **75**, 373-375.

Deschenes R.J., Lorenz L.J., Haun R.S., Roos B.A., Collier K.J. and Dixon J.E., 1984. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **81**, 726-730.

Dhainaut-Courtois N., 1970. Contribution à l'étude morphologique des processus sécrétoires dans le système nerveux central et au niveau de la glande infracérébrale des Nereidae. Thèse Doct. Etat. Sci. Nat. Lille.

Dhainaut-Courtois N., Dubois M.P., Tramu G. and Masson M., 1985a. Occurrence and coexistence in Nereis diversicolor D.F. Müller (Annelida Polychaeta) of substances immunologically related to Vertebrate neuropeptides. Cell. tissue Res., **242**, 97-108.

Dhainaut-Courtois N., Engelhardt R.P. et Dhainaut A., 1979a. Etude cytophysiologique des systèmes monoaminergiques et cholinergique des Nereis (Annélides Polychètes). I-Système nerveux périphérique et jonctions neuromusculaires. Arch. Biol. Bruxelles, **90**, 225-244.

Dhainaut-Courtois N., Engelhardt R.P. et Dhainaut A., 1979b. Etude cytophysiologique des systèmes monoaminergiques et cholinergique des Nereis (Annélides Polychètes). II. Système nerveux central Arch. Biol. Bruxelles, **90**, 273-288.

Dhainaut-Courtois N. and Golding D.W., 1988. Nervous system. In "The ultrastructure of Polychaeta". Westheide W. and Hermans C.O. eds., Microfauna Marina. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart, New York, **4**, 89-110.

Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Beauvillain J.C. and Masson M., 1986. A qualitative approach of the Nereis neuropeptides by use of antibodies to several Vertebrate peptides. Neurochem. Int., **8**, 327-338.

Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Marcel R., Malecha J., Verger-Bocquet M., Andriès J.C., Masson M., Selloum L., Belmoutgri C. and Beauvillain J.C., 1985b. Cholecystokinin in the nervous systems of Invertebrates and Protochordate. Immunohistochemical localization of a cholecystokinin-8-like substance in Annelids and Insects. First Int. Conf. Neuronal cholecystokinin, Brussels, Belgium. Ann. N.Y. Acad. Sci., **448**, 167-187.

Dictus W.J.A.G., De Jong-Brink M. and Boer H.H. (1987). A neuropeptide (calfuxine) is involved in the influx of calcium into mitochondria of the albumen gland of the freshwater snail Lymnaea stagnalis. Gen. Comp. Endocrinol., **65**, 439-450.

Durchon M., 1948. Epitoquie expérimentale chez deux Polychètes : P. cultrifera et N. irrorata. C.R. Acad. Sci. Paris, **227**, 157-158.

Durchon M., 1949. Inhibition de l'épitoquie par le prostomium chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). C.R. Acad. Sci. Paris, **229**, 81-82.

Durchon M., 1952. Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoque et la stolonisation. Ann. Sc. Nat. Zool. Biol. Anim., **14**, 119-206.

Durchon M., 1965. Evolution phylogénétique et ontogénétique de l'épitoque chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). C.R. Acad. Sc. Paris, **241**, 445-447.

Durchon M., 1984. Perspectives in the physiology of epitokous metamorphosis in Polychaetes. Fortsch. Zool., **29**, 9-16.

Durchon M., Montreuil J. et Boilly-Marer Y., 1963. Résultats préliminaires sur la nature chimique de l'hormone inhibitrice du cerveau des Néréidiens. C.R. Acad. Sci. Paris, **257**, 1807-1808.

Durchon M. et Porchet M., 1971. Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle naturel. Gen. Comp. Endocrinol., **16**, 555-565.

Ebberink R.H.M., Van Loenhout H., Geraerts W.F.M. and Joosse J., 1985. Purification and amino acid sequence of the ovulation hormone of Lymnaea stagnalis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **82**, 7767-7771.

Engelhardt R.P., Dhainaut-Courtois N. and Tramu G., 1982. Immunohistochemical demonstration of a CCK-like peptide in the nervous system of a marine annelid worm, Nereis diversicolor O.F. Müller. Cell tissue Res., **227**, 401-411.

Engelhardt R.P., Saint-Pol P., Tramu G. and Leonardelli J., 1986. Immunohistochemical localization of enkephalin like peptides during testicular development in rats. Arch. Andrology, **17**, 49-56.

Frazier M.L., Mars W., Florine D.L., Montagana R.A. and Saunders G.F., 1983. Efficient extraction of RNA from mammalian tissue. Molec. Cell. Biochem., **56**, 113-122.

Friedman J., Schneider B.S. and Powel D., 1985. Differential expression of the mouse cholecystokinin gene during brain and gut development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **82**, 5593-5597.

Gaillet N., 1985. Mise en évidence et rôle physiologique des ecdystéroïdes chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). Thèse 3ème cycle, Lille.

Geraerts W.P.M., Buma P. and Hogenes Th.M., 1984. Isolation of neurosecretory granules from the neurohemal areas of peptidergic systems of Lymnaea stagnalis, with special reference to the ovulation hormone producing caudo-dorsal cells. Gen. Comp. Endocrinol., **52**, 212-217.

Geraerts W.P.M. and Joosse J., 1984. Freshwater snails (Basommatophora). In "The mollusca". Tompa A.S., Verdonk N.H. and Van den Biggelaar J.A.M., eds., Acad. Press. New York, **7**, 142-207.

Geraerts W.P.M., Tensen C.P. and Hogenes Th.M., 1983. Multiple release of peptides by electrically active neurosecretory caudo-dorsal cells of Lymnaea stagnalis. Neurosci. Lett., **41**, 151-155.

Geraerts W.P.M., Ter-Maat. A. and Vreugdenhil E., 1988a. The peptidergic neuroendocrine control of egg-laying behavior in Aplysia and Lymnaea. In "Invertebrate endocrinology". Laufer H. and Downer R.G.H. eds., Alan R. Liss. New York, **2**, 141-231.

Geraerts W.P.M., Vreugdenhil E. and Ebberink R.H.M., 1988b. Bioactive peptides in molluscs. In "Neurohormones in Invertebrates". Thorndyke M.C. and Goldsworthy G. eds., Cambridge University Press, Cambridge, 261-281.

Geraerts W.P.M., Vreugdenhil E., Ebberink R.H.M. and Hogenes Th.M., 1985. Synthesis of multiple peptides from a larger precursor in the neuroendocrine caudo-dorsal cells of Lymnaea stagnalis. Neurosci. Lett., **56**, 241-246.

Geraerts W.P.M., Vreugdenhil E. and Ter-Maat A., 1987. The peptidergic neuroendocrine control of egg-laying behavior in Aplysia and Lymnaea. In "Invertebrate endocrinology". Laufer H. and Downer R.G.H. eds., Alan R. Liss., New York, **2**, 377-468.

Golding D.W., 1965. Endocrinology and morphogenesis in N. diversicolor. Gen. Comp. Endocrinol., **3**, 703-704.

Golding D.W., 1967. Endocrinology, regeneration and maturation in Nereis. Biol. Bull., **133**, 567-577.

Golding D.W. and May B.A., 1982. Duality of secretory inclusions in neurons. Ultrastructure of the corresponding sites of release in Invertebrate nervous systems. Acta Zool. (Stockh), **63**, 229-238.

Gubler U., Chua A.O., Hoffman B.J., Collier K.J. and Eng J., 1984. Cloned cDNA to cholecystokinin mRNA predicts an identical preprocholecystokinin in pig brain and gut. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **81**, 4307-4310.

Hauenschild C., 1956. Hormonale Hemmung der Geschlechtsstreife ein metamorphose bei dem polychaeten Platynereis dumerilii. Z. Naturforsch., **11B**, 125-132.

Hauenschild C., 1959. Zyklische veränderungen an den inkretorischen drüsenzellen in prostomium des polychaeten Pl. dumerelii als grundlage der Schwärm periodizität. Z. Naturforsch., **14**, 81-87.

Herbert E., Burnberg N., Lissitsky J.C., Civelli O. and Uhler M., 1981. Pro-opiomelanocortin : a model for the regulation of expression of neuropeptides in pituitary and brain. Neurosci. Commun., **1**, 16-27.

Ishizaki H., Mizoguchi A., Fujishita M., O'oka H., Kataoka H., Isogai A., Nagasawa H., Tamura S. and Suzuki A., 1983. Species specificity of the insect prothoracicotropic hormone (PTTH) : the presence of Bombyx- and Samia- specific PTTHs in the brain of Bombyx mori. Develop. Growth and Differ., **25**, 539-600.

Ishizaki H., Mizoguchi A., Hatta M., Suzuki A., Nagasawa H., Kataoka H., Isogai A., tamura S., Fujino M. and Kitada C., 1987. Prothoracicotropic hormone (PTTH) of the silkworm Bombyx mori : 4 K-PTTH. In "Molecular entomology". Law J.H. ed., Alan. R. Liss, New York, 119-128.

Ishizaki H. and Suzuki A., 1984. Prothoracicotropic hormone of Bombyx mori. In "Biosynthesis, Metabolism and mode of action of Invertebrate Hormones (Hoffman J. and Forchet M. eds., springer-verlag, Berlin, Heidelberg. 63-77.

Iwami M., Kawakami A., Ishizaki H., Takahashi S.Y., Adachi T., Suzuki Y., Nagasawa H. and Suzuki A., 1989. Cloning of a gene encoding bombyxin, an insuline-like brain secretory peptide of the silkworm Bombyx mori with prothoracicotropic activity. Develop. Growth and Differ., **31**, 31-37.

Jackson J.F., Vreugdenhil E., Johnson K.J. and Hall F.H., 1986. Genes encoding molluscan gonadotropic hormones. Biochem. Soc. Symp., **52**, 83-90.

Jhoti H. McLeod A.N., Blundell T.L., Ishizaki H., Nagasawa H. and Suzuki A., 1987. Prothoracicotropic hormone has an insuline-like tertiary structure. FEBS Lett., **219**, 419-425.

Joosse J. and Geraerts W.P.M., 1983. Endocrinology. In "The Mollusca". Saleuddin A.S.W. and Wilbur K.M. eds., Acad. Press, New York, **4**, 317-406.

Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda M., Morimoto Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Nakanishi S. and Numa S., 1982. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neo-endorphin/dynorphin precursor. Nature, **298**, 245-249.

Kaldany P.R.J., Nambu J.R. and Scheller R.H., 1985. Neuro-peptides in identified Aplysia neurons. Ann. Rev. Neurosc., **8**, 431-455.

Kits K.S., 1980. States of excitability in the ovulation hormone producing neuroendocrine cells of Lymnaea stagnalis (Grasteropoda) and their relation to the egg-laying cycle. J. Neurobiol., **11**, 397-410.

Kuhn J.M. et Saltiel H., 1986. Rôle des peptides opioïdes endogènes dans la régulation des sécrétions hypophysaires. Ann. Endocrinol., **47**, 97-105.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685.

Larsson L.I. and Rehfeld J.F., 1977. Evidence of common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin. Nature, **269**, 335-338.

Lewis R.V. and Erickson B.W., 1986. Evolution of pro-enkephalin and pro-dynorphin. Amer. Zool., **26**, 1027-1032.

Loh Y.P. and Gainer H., 1983. Biosynthesis and processing of neuropeptides. In "Brain peptides". Krieger D.T., Brownstein M.J. and Martin J.B., eds., New York, John Wiley and Sons, 79-116.

Mahon A.C., Nambu J.R., Taussig R., Shyamala M., Roach A. and Scheller R.H., 1985. Structure and expression of the egg-laying hormone family in Aplysia. J. Neurosc., **5**, 1872-1880.

Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J., 1982. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 545.

Marchand C.R. et Dubois M.P., 1985. Mise en évidence par immunocytologie de sites antigéniques fixant des anticorps anti-MSH et anti-méthionine-enképhaline dans l'ovotestis de l'escargot adulte Petit-Gris (Helix aspersa Müller). C.R. Acad. Sci. Paris, **301**, 233-238.

Mayeri E. and Rothman B.S., 1985. Neuropeptides and the control of egg-laying behaviour in Aplysia. In "Model neural networks and behaviours", Selverston A.I. ed., New York, Plenum Press, 285-301.

Mizoguchi A., Ishizaki H., Nagasawa H., Kataoka H., Isogai A., Tamura S., Suzuki A., Fujino M. and Kitada C., 1987. A monoclonal antibody against a synthetic fragment of bombyxin (4K-prothoracicotropic hormone) from the silk moth, Bombyx mori : characterization and immunohistochemistry. Molec. Cell. Endocrinol., **51**, 227-235.

Muneoka Y. and Matsuura M., 1985. Effects of the molluscan neuropeptide FMRF-amide and the related opioid peptide YGGFMRF-amide on Mytilus muscle. Comp. Biochem. Physiol., **81**, 61-70.

Nagasawa H., Kataoka H., Isogai A., Tamura S., Suzuki A., Ishizaki H., Mizoguchi A., Fujiwara Y. and Suzuki A., 1984. Amino-terminal amino-acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone :homology with insulin. Science, **226**, 1344-1345.

Nagasawa H., Kataoka H., Isogai A., Tamura S., Suzuki A., Takahashi S.Y. and Ishizaki H., 1986. Amino-acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm Bombyxin mori. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 5840-5843.

Nagasawa H., Maruyama K., Sato B., Hietter H., Kataoka H., Isogai A., Tamura S., Ishizaki H., Senba T. and Suzuki A., 1988. Structure and synthesis of bombyxin from the silk worm, Bombyx mori. In "Peptide chemistry" Shiba T. and Sakakibara S., eds., Protein Research Foundation, Osaka, 123-126.

Nambu J.R. and Scheller R.H., 1986. Egg-laying hormone genes of Aplysia : evolution of the ELH gene family. J. Neurosc., **6**, 2026-2036.

Painter S.D., 1982. FMRF-amide inhibition of a molluscan heart is accompanied by increases in cyclic AMP. Neuropeptides, 3, 19-27.

Porchet M., 1970. Relations entre le cycle hormonal cérébral et l'évolution ovocytaire chez Perinereis cultrifera. Gen. Comp. Endocrinol., 15, 220-231.

Porchet M., 1974. Activité endocrine cérébrale chez les Nereidae. Thèse Doc. Sc. Nat., Lille.

Porchet M. et Cardon C., 1976. The inhibitory feed-back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in Nereis. Gen. Comp. Endocrinol., 30, 378-390.

Porchet M. and Dhainaut-Courtois N., 1988. Neuropeptides and monoamines in Annelids. In "Neurohormones in Invertebrates". Thorndyke M.C. and Goldsworthy. G.J., eds., Cambridge University Press, 33, 219-234.

Porchet M., Dhainaut-Courtois N., Cardon C. and Bataille M., 1985. Structure and functions of neuropeptides of Polychaete Annelids. In "Neurosecretion and the biology of neuropeptides". Kobayashi, ed., Springer-Verlag, 377-385.

Porchet M. et Durchon M., 1968. Influence de la maturité génitale sur la régénération postérieure chez Perinereis cultrifera. C.R. Acad. Sci. Paris, 167, 194-196.

Porchet M., Gaillet N., Sauber F., Charlet M. and Hoffmann J.A., 1984. Ecdysteroids in Annelids. In "Biosynthesis, metabolism and mode of action of Invertebrate hormones". Hoffmann J. and Porchet M., eds., Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 436-438.

Rehfeld J.F., 1978. Immunochemical studies on cholecystokinin. II - Distribution and molecular heterogeneity in the central nervous system and small intestine of man and hog. J. Biol. chem., **253**, 4022-4030.

Rehfeld J.F., 1987. Preprocholecystokinin processing in the normal human anterior pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **84**, 3019-3023.

Rehfeld J.F., Bardran L., Cantor P., Hilsted L. and Schwartz T.W., 1988. Cell specific processing of procholecystokinin and progastrin. Biochimie, **70**, 25-31.

Rehfeld J.F. and Hansen H.F., 1986. Characterization of preprocholecystokinin products in the porcine cerebral cortex. J. Biol. Chem., **261**, 5832-5840.

Rothman B.S., Mayeri E. and Scheller R.H., 1985. The bag cell neurons of Aplysia as a possible peptidergic multi-transmitter system. In "Gene expression in brain". Zomzely-Neurath C. and Walker W.A., eds., New York. John Wiley and Sons, Inc., 236-274.

Roubos E.W., 1984. Cytobiology of the ovulation-neurohormone producing caudo-dorsal cells of the snail Lymnaea stagnalis Int. Rev. Cytol., **89**, 295-346.

Saiga H. and Edström J.E., 1985. Long tandem arrays of complex repeat units in chironomus telomeres. EMBO J., **4**, 799-804.

Scheller R.H., Jackson J.F., McAllister L.B., Rothman B.S., Mayeri E. and Axel R., 1983. A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior. Cell, **32**, 7-22.

Scheller R.H., Jackson J.F., McAllister L.B., Schwartz J.H., Kandel E.R. and Axel R., 1982. A family of genes that codes for ELH, a neuropeptide eliciting a stereotyped pattern of behavior in Aplysia. Cell, **28**, 707-719.

Schröder H., Weihe E. and Vollrath L., 1988. Immunohistochemical evidence for the presence of peptides derived from proenkephalin, prodynorphin and proopioidmelanocortin in the guinea pig pineal gland. Histochem., **88**, 333-341.

Soreq H. and Miskin R., 1981. Secreted proteins in the medium of microinjected Xenopus oocytes are degraded by oocytes proteases. FEBS Lett., **128**, 305-310.

Takahashi Y., Kato K., Hayashizaki Y., Wakabayashi T., Ohtsuka E., Matsuki S., Ikehara M. and Matsubara K., 1985. Molecular cloning of the human cholecystokinin gene by use of a synthetic probe containing deoxyinosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **82**, 1931-1935.

Taussig R., Kaldany R.P., Rothbard J.B., Schoolnick G. and Scheller R.H., 1985. Expression of the L11 neuropeptide gene in the Aplysia central nervous system. J. Comp. Neurol., **238**, 53-64.

Taussig R., Nambu J.R. and Scheller R.H., 1988. Evolution of peptide hormones : an Aplysia CRF-like peptide. In "Neurohormones in Invertebrates". Thorndyke M.C. and Goldsworthy G.J., eds., Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, 299-309.

Ter Maat A., Geraerts W.P.M., Jansen R.F. and Bos N.P.A., 1988. Chemically mediated positive feed back generates long lasting after discharge in a molluscan neuroendocrine system. Brain Res., **438**, 77-82.

Ter Maat A., Lodder J.C. and Wilbrink M., 1983. Induction of egg-laying in the pond snail Lymnaea stagnalis by environmental stimulation of the release of ovulation hormone from the caudo-dorsal cells. Int. J. Invert. Reprod., **6**, 239-247.

Tramu G. and Dubois M.P., 1977. Comparative cellular localization of corticotropin and melanotropin in lerot adenohypophysis (Eliomys quercinus): an immunohistochemical study. Cell. tissue Res., **183**, 457-469.

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J., 1979. Electrophoretic transfert of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **76**, 4350-4354.

Vreugdenhil E., Bogerd J., Mahon A., Bouwmeester T., Klootwijk C., Van Heerikhuizen H. and Joosse J., 1988a. The genomic organization of the ovulation-hormone gene family of the snail Lymnaea stagnalis. in "The molecular basis of egg-laying behaviour in the freshwater snail Lymnaea stagnalis". Vreugdenhil E., ed., Drukkerij All In, Katwijk, 37-54.

Vreugdenhil E., Geraerts W.P.M., Jackson J.E. and Joosse J., 1985. The molecular basis of the neuroendocrine control of egg-laying behaviour in Lymnaea. Peptides, **6**, 465-470.

Vreugdenhil E., Jackson J.F., Bouwmeester T., Smit G., Van Minnen J., Heerikhuizen H.V., Klootwijk C. and Joosse J., 1988b. Isolation, characterization and evolutionary aspects of a cDNA clone encoding multiple neuropeptides involved in the stereotyped egg-laying behaviour of the freshwater snail Lymnaea stagnalis. In "The molecular basis of egg-laying behaviour in the freshwater snail Lymnaea stagnalis". Vreugdenhil E., ed., Drukkerij All In, Katwijk, 23-36.

