

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

THESE

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

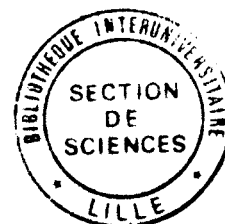
(Nouveau régime)

en

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Djamel Eddine BENOUARETH



**CLONAGE ET EXPRESSION DE L'ADNc D'UNE
METALLOPROTEINE
(MP II) DE L'ANNELIDE MARINE
(NEREIS DIVERSICOLOR)**

soutenue le 9 juillet 1990 devant la commission d'examen

Président : M. M. PORCHET, Professeur à l'Université de Lille I

Rapporteurs : M. S. BALL, Professeur à l'Université de Lille I

M. M. WEGNEZ, Professeur à l'Université de Paris XI

Examineurs : M. J. J. CURGY, Professeur à l'Université de Lille I

Mme N. DHAINAUT-COURTOIS, Professeur à l'Université de Lille I



A mon pays

A mes parents

A mes deux frères et leur famille

A toute ma famille

A tous mes amis

REMERCIEMENTS

Je vous remercie Monsieur le Professeur Maurice PORCHET, Directeur du Laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés (Unité Associée au CNRS n°148) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres Artois, de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Qu'il me soit permis de vous manifester ma reconnaissance pour avoir accepté de présider ce jury.

Je tiens également à vous remercier Monsieur le Professeur Jean-Jacques CURGY, qui avez su me faire partager votre talent pédagogique et votre expérience tout au long de ce travail.

Madame le Professeur Nicole DHAINAUT-COURTOIS, je tiens à vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté à l'évolution de ce travail et de l'honneur que vous me faites en acceptant de siéger dans ce jury.

Messieurs les Professeurs Steven BALL et Maurice WEGNEZ, vous me faites l'honneur de pouvoir vous compter parmi les membres de ce jury. Je vous prie d'accepter l'expression de ma reconnaissance pour avoir bien voulu rédiger les rapports de thèse.

Je te dois beaucoup Muriel VENNIN; trouves ici toute mon affection et ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Madame Eliane PORCHET-HENNERE, Directeur de recherche au CNRS, pour avoir mis à ma disposition les anticorps monoclonaux et pour m'avoir prodigué vos conseils.

Je tiens à te remercier aussi Yvette HIMPENS, tu as assuré avec gentillesse la dactylographie de ce mémoire.

Je vous remercie également Madame Adeline AUGER et Monsieur Daniel LAZARECKI pour la qualité de votre travail concernant l'iconographie de ce mémoire.

Enfin qu'il me soit permis de remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont aidé à un moment ou à un autre pour réaliser ce travail.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I - LES METALLOTHIONEINES.....	1
I - 1 - Rôle des métallothionéines.....	2
I - 2 - Méthodes de purification.....	3
I - 3 - Caractéristiques des métallothionéines.....	4
I - 3 - 1 - Masse moléculaire.....	4
I - 3 - 2 - Composition en acides aminés.....	4
I - 3 - 3 - Absorption en ultraviolet.....	4
I - 3 - 4 - Résistance à la chaleur.....	4
I - 3 - 5 - Induction de la synthèse des métallothionéines.....	4
I - 3 - 6 - Critères de détermination des métallothionéines.....	5
I - 4 - Données moléculaires.....	5
I - 4 - 1 - Chez les Vertébrés.....	5
I - 4 - 2 - Chez les Invertébrés.....	7
I - 4 - 3 - Chez les microorganismes.....	8
II - AUTRES PROTEINES FIXANT DES METAUX LOURDS, PROTEINES DITES NON METALLOTHIONEINES.....	8
II - 1 - Caractéristiques générales.....	8
II - 2 - Données moléculaires.....	9
III - SITUATION ET INTERET DU PROJET DE RECHERCHE.....	9
MATERIEL ET METHODES.....	12
I - MATERIEL BIOLOGIQUE.....	12
II- PREPARATION DES CŒLOMOCYTES.....	12
III - EXTRACTION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES (ARN) DES CŒLOMOCYTES.....	12
III - 1 - Précautions opératoires.....	12
III - 2 - Technique d'extraction.....	13
IV - PURIFICATION DES ARNm.....	13
IV - 1 - Appareillage.....	13
IV - 2 - Traitement de l'appareillage et préparation du gel d'oligo-(dT) cellulose.....	14

IV - 3 - Préparation des ARN totaux.....	1 4
IV - 4 - Recyclage de l'échantillon.....	1 4
IV - 5 - Elution des ARNm.....	1 4
V - TRADUCTION DES ARNm.....	1 5
V - 1 - Traduction in vitro.....	1 5
V - 2 - Traduction in vivo.....	1 5
V - 2 - 1 - Extraction des protéines synthétisées in vivo.....	1 6
VI - ANALYSES DES PRODUITS TRADUITS.....	1 6
VI - 1 Technique du "Western-blot".....	1 6
VI - 1 - 1 -Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (PAGES).....	1 6
VI - 1 - 2 - Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	1 8
VI - 2 - Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	1 9
VII - ELABORATION D'UNE BANQUE D'EXPRESSION A PARTIR DES ARNm DE CŒLOMOCYTES.....	1 9
VII - 1 - Purification des ARNm poly (A)+.....	2 0
VII - 2 - Synthèse d'ADNc double brin.....	2 0
VII - 2 - 1 - Synthèse du 1er brin d'ADNc.....	2 0
VII - 2 - 2 - Synthèse du 2ème brin d'ADNc.....	2 1
VII - 2 - 3 - Purification de l'ADNc double brin.....	2 1
VII - 3 - Insertion de l'ADNc double brin dans le vecteur.....	2 2
VII - 3 - 1 - Méthylation des sites EcoR1 de l'ADNc.....	2 2
VII - 3 - 2 - Addition des attaches Eco R1 (Eco R1 "Linkers") à l'ADNc.....	2 3
VII - 3 - 3 - Hydrolyse des "Linkers" par Eco R1.....	2 3
VII-3-4-Purification des molécules d'ADNc par chromatographie.....	2 3
VII - 3 - 5 - Ligation de l'ADNc aux "bras"du vecteur λ gt11.....	2 4
VII - 3 - 6 - Empaquetage de l'ADN phagique recombiné.....	2 4
VII - 4 - Infection des bactéries et titrage de la banque d'ADNc.....	2 5
VII - 4 - 1 - Obtention des bactéries sensibles à l'infection.....	2 5

VII - 4 - 2 - Détermination du titre de la banque.....	2 5
VII - 4 - 3 - Amplification de la banque.....	2 5
VII - 5 - Sélection des clones recombinés ou criblage de la banque d'ADNc.....	2 6
VII - 5 - 1 - Epuisement des anticorps.....	2 6
VII - 5 - 2 - Criblage de la banque.....	2 6
VIII - SYNTHESE DE LA PROTEINE DE FUSION.....	2 7
VIII - 1 - Caractérisation de la protéine de fusion.....	2 8
VIII - 1 - 1 - Technique du "Dot-immunobinding".....	2 8
VIII - 1 - 2 - Technique du "Western-blot".....	2 8
VIII - 1 - 3 - Test biologique.....	3 0
RESULTATS.....	3 1
I - ANALYSE DES ARNm POLY (A)+.....	3 1
II - TRADUCTION IN VITRO DES ARNm.....	3 1
II - 1 - Evaluation quantitative des produits traduits.....	3 1
II - 2 - Evaluation qualitative des produits traduits.....	3 1
III - TRADUCTION IN VIVO DES ARNm.....	3 2
IV - CLONAGE DE L'ADNc SPECIFIANT LA MPII.....	3 3
IV - 1 - Quantité d'ADNc synthétisé.....	3 3
IV - 2 - Titre de la banque.....	3 3
IV - 3 - Criblage et sélection des clones recombinés.....	3 4
IV - 4 - Caractérisation de la protéine de fusion.....	3 4
IV - 4 - 1 - Technique dite de "Dot-immunobinding".....	3 4
IV - 4 - 2 - Technique dite du "Western-blot".....	3 5
VI - 4 - 3 - Test biologique.....	3 5
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	3 6
BIBLIOGRAPHIE	

RESUME

Chez l'Annélide Polychète *Nereis diversicolor*, une métalloprotéine (MPII) ayant la propriété de fixer des métaux lourds tel que le cadmium a été précédemment caractérisée et purifiée dans notre laboratoire. Nous avons abordé l'étude de cette protéine en adoptant une nouvelle stratégie.

Nous avons extrait et purifié les ARNm de coelomocytes (cellules libres dans le coelome des animaux). Ces ARNm ont été traduits *in vitro* (lysate de réticulocytes de lapin) ou *in vivo* (injection des ARNm dans les ovocytes de *Xenopus laevis*). Les techniques du "Western-blot" et celles du test ELISA, mettant en œuvre des anticorps monoclonaux anti MPII, indiquent que les coelomocytes sont un site de synthèse des ARNm de la MPII.

Les traductions obtenues à partir de ces ARNm et la disponibilité d'anticorps poly-ou monoclonaux nous ont incité à élaborer une banque d'expression par un clonage de cDNA dans le vecteur λ gt11. La sélection des clones de phages recombinés a été pratiquée par la révélation d'une immunoréaction des anticorps poly-ou monoclonaux confrontés aux protéines exprimées au niveau des plages de lyse.

Les modalités de l'expression en abondance des protéines de fusion par des bactéries hôtes de phages recombinés et les conditions de détection de ces protéines par des anticorps anti-MPII nous ont conduit à invoquer une dégradation systématique de ces dernières par les bactéries. Les protéines de fusion, dans leur intégrité, seraient considérées comme toxiques par les cellules hôtes des phages recombinés.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Il est maintenant bien établi que lors d'une intoxication par un métal lourd tel que le cadmium, les Invertébrés comme les Vertébrés, y compris l'Homme, utilisent plusieurs mécanismes de défense, dans le but de diminuer l'absorption du métal, ou de favoriser son excrétion par voie urinaire ou fécale. L'organisme peut aussi, en plus de l'élimination, développer d'autres moyens de défense, comme la synthèse de protéines nommées métalloprotéines ayant la propriété de fixer les métaux lourds, ou comme l'accumulation de métal sous forme de concrétions minérales appelées sphérocristaux. Ces structures sont formées d'éléments concentriques qui jouent un rôle important dans le piégeage du métal ; ce dernier peut ainsi s'accumuler dans les cellules intoxiquées en perdant de sa toxicité. De tels sphérocristaux ont été décrits chez les Crustacés par Chassard-Bouchaud (1982), chez les Insectes par Martoja *et al.* (1983), Martoja et Martoja (1984) et chez les Annélides par Boilly et Richard (1978), Dennaï (1984), Nejmeddine (1985), Dennaï *et al.* (1986). Chez les Protozoaires, Simkiss (1976, 1981) et Mason et Nott (1982) ont montré, lors d'une exposition des cellules à des métaux lourds, que la plupart de ces derniers sont incorporés rapidement dans des sphérocristaux. Chez *Pecten maximus*, la même bioaccumulation a été déterminée en microscopie électronique à l'aide d'une microsonde à rayons X par Ballan-Dufrançais *et al.* (1982).

Synthèse de métalloprotéines et formations de sphérocristaux sont des moyens usuels de défense, mais l'animal peut aussi réagir par d'autres facultés qui lui sont spécifiques. C'est ainsi que les Crustacés ont un exosquelette qui fixe les métaux (Poirier et Cossa, 1981) et le poisson *Serranus cabrilla* parvient à diminuer l'absorption de mercure par la sécrétion abondante de mucus lors d'une intoxication par HgCl_2 (Radoux et Bouquegneau, 1979).

I - LES METALLOTHIONEINES

Une métallothionéine a été isolée pour la première fois par Margoshes et Vallée en 1957 à partir du cortex rénal du cheval. Cette protéine cytoplasmique, de faible masse moléculaire, riche en cadmium et en zinc, possède un taux très élevé de cystéine (30 % des acides aminés) et ne contient pas d'acides aminés aromatiques (Kägi et Vallée, 1960). Après cette découverte, ce type de molécule a été recherché dans de nombreuses espèces du règne animal, en particulier chez l'Homme et chez d'autres Mammifères, mais aussi chez des végétaux et chez des microorganismes eucaryotiques ou procaryotiques. Selon leur structure, ces protéines sont subdivisées en 3 classes : classe I pour les protéines proches des métallothionéines de Mammifères, caractérisées par une conservation phylogénétique de plus de 55 % des acides aminés y compris une vingtaine de cystéines, et qui présentent un

polymorphisme génétique; classe II pour les protéines présentant une réserve différente en cystéine de la classe I; et la classe III pour les phytométallothionéines, qui sont des polypeptides atypiques très différents des métallothionéines usuelles (Fowler *et al.*, 1987).

Chez l'Homme, la métallothionéine est synthétisée principalement par le foie et secondairement par la rate (Amacher, 1975), les reins (Magos, 1974), l'intestin (Squibb *et al.*, 1976), les lymphocytes T et B (Yamada *et al.*, 1989), enfin le pancréas et les testicules (Nordberg, 1971). Cette protéine apparaît souvent sous 2 isoformes, MT I et MT II (Kägi *et al.*, 1984).

Chez d'autres Mammifères, des protéines semblables ont été caractérisées, essentiellement au niveau du foie et des reins {lapin (Piscator, 1964; Nordberg *et al.*, 1974), porc (Bremner et Young, 1976), souris (Huang *et al.*, 1977; Karin, 1985; Hamer, 1986), rat (Andersen et Weser, 1978), veau (Briggs et Armitage, 1982)}. Chez d'autres Vertébrés, le foie et les reins sont également le lieu de synthèse des métallothionéines {Oiseaux (Weser *et al.*, 1973; Mc Cormick, 1984), Poissons (Bouqueneau *et al.*, 1975; Bouqueneau et Noël-Lambot, 1978; Mc Carter et Roch, 1983; Thomas *et al.*, 1983; Delval, 1984)}.

Au cours de ces dernières années, la recherche des métallothionéines a été entreprise chez des Invertébrés. La contamination de ces derniers par des métaux lourds constitue un danger par le fait que ces animaux se situent généralement au début des chaînes alimentaires. Le danger est augmenté par le pouvoir de concentration des polluants par ces organismes inférieurs. Ainsi des protéines de faible masse moléculaire, ayant la capacité de fixer les métaux lourds, ont été identifiées chez de nombreuses espèces d'Invertébrés, principalement marines. La masse moléculaire, l'association à des métaux lourds et l'induction par ces derniers de protéines particulières suggèrent que ces macromolécules sont des métallothionéines. Le tableau 1 résume la connaissance des métallothionéines identifiées chez les Invertébrés.

I - 1 - Rôle des métallothionéines

En absence d'intoxication, les métallothionéines constituent une réserve de métaux essentiels, comme le zinc et le cuivre, pour la synthèse des enzymes associées à un métal (Richards et Cousins, 1976; O'Brady *et al.*, 1979) et assurent ainsi une homéostasie dans le métabolisme de ces deux métaux et la constance de leur teneur dans les cellules (Cherian et Goyer, 1978).

Lors d'une intoxication de l'organisme par un métal lourd tel que le cadmium, les métallothionéines sont abondamment synthétisées et fixent le polluant; ce dernier est ainsi rendu biologiquement inerte et inoffensif. Ce mécanisme de détoxification a induit plusieurs auteurs à penser que ces protéines jouent un rôle dans la défense de l'animal (Piscator,

TABLEAU 1

ESPECES ANIMALES	METAUX EVENTUELLEMENT UTILISES COMME TRACEURS	AUTEURS
Polychètes :		
<i>Eudystylia vancouveri</i>	Cu	Young et Roesijadi (1983)
<i>Lumbrineris fragilis</i>	Cd	Eriksen <i>et al.</i> (1988)
Oligochètes :		
<i>Eisenia foetida</i>		Suzuki <i>et al.</i> (1980)
		Yamarura <i>et al.</i> (1981)
<i>Lumbricus terrestris</i>	Cd	Ireland (1983)
<i>Dendrodrilus rubidus</i>		Morgan <i>et al.</i> (1989)
<i>Lumbricus rubellus</i>		
Mollusques :		
<i>Helix aspersa</i>		Cooke <i>et al.</i> (1979)
<i>Patella caerulea</i>	Cd	Noël-Lambot (1979)
<i>Littorina littoria</i>	Cd	Noël-Lambot (1979)
<i>Patella vulgata</i>	Cd	Noël-Lambot (1980)
<i>Murex trunculus</i>	Cd	Bouquegneau <i>et al.</i> (1983)
		Dallinger <i>et al.</i> (1989)
<i>Helix pomatia</i>	Cd	Dallinger et Wieser (1984)
<i>Clemmys mutica</i>	Cd,Cu	Yamamura et Suzuki (1984)
<i>Mytilus edulis</i>	Cd	Frazier <i>et al.</i> (1985)
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Cd, Zn, Cu	Hidalgo <i>et al.</i> (1985)
Crustacés :		
<i>Cancer magister</i>		Olafson <i>et al.</i> (1979)
<i>Scylla serrata</i>	Cd	Olafson <i>et al.</i> (1979)
<i>Cancer pagurus</i>	Cd, Cu	Overnell (1984)
<i>Carcinus maenas</i>		Wong et Rainbow (1986)
Insectes :		
<i>Chironomus yoshimatsui</i>	Cd	Yamamura <i>et al.</i> (1983)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Cd	Maroni et Watson (1985)
<i>Blatella germanica</i>	Hg	Bouquegneau <i>et al.</i> (1985)

Procaryotes :

Synechococcus sp.

Olafson *et al.* (1979)

Levures :

Saccharomyces cerevisiae

Cd, Cu

Premakumar *et al.* (1975)

Inouhe *et al.* (1989)

1964; Nordberg, 1971; Nordberg *et al.*, 1971). Nordberg (1971), Yau et Mennear (1977), Probst *et al.* (1977) ont démontré qu'une première contamination, qui fait apparaître les métallothionéines dans les tissus, permet la fixation sur ces protéines des métaux administrés par la suite. Ce prétraitement, correspondant à l'administration de faibles doses de cadmium, provoque une réduction de la toxicité de ce métal lors d'une exposition ultérieure de l'organisme à de grandes quantités de l'élément toxique (Yoshikawa, 1970; Bouquegneau *et al.*, 1975). Ce mécanisme mis en place chez les animaux exposés à des intoxications leur permet une meilleure résistance, et par conséquent une certaine adaptation au milieu. L'existence des métallothionéines permet donc d'expliquer que des quantités importantes de cadmium puissent être progressivement accumulées sans dommage dans l'organisme. Tanaka et Sueda (1973), Valberg *et al.*, (1977) ont même suggéré que les métallothionéines joueraient le rôle de barrière à l'absorption du cadmium au niveau de la muqueuse intestinale. Par ailleurs, Cherian et Nordberg (1983) ont proposé que l'adaptation cellulaire à la toxicité des métaux est un facteur important dans l'évaluation des effets sur la santé des humains lors d'une exposition aux métaux lourds.

I - 2 - Méthodes de purification

Les méthodes de purification des métallothionéines sont fondées sur des techniques d'extraction tissulaire par homogénéisation des organes susceptibles d'accumuler les métaux lourds, et par conséquent de synthétiser des métallothionéines. Cette extraction comprend une homogénéisation dans une solution saline isotonique (Olafson *et al.*, 1979) ou dans la même solution additionnée de saccharose 0,5 M (Noël-Lambot, 1980) suivie d'une centrifugation à grande vitesse. D'autres auteurs ont purifié la molécule en la précipitant, soit par l'éthanol à 95% à - 20°C (Bühler et Kägi, 1974), soit par l'acétone à 45 et 80 % (Noël-Lambot, 1980).

Après son extraction des tissus, la fraction soluble est chromatographiée en gel filtration (généralement Séphadex G 75) (DiSilvestro et Cousins, 1984a), suivie d'une séparation sur résine échangeuse d'ions (généralement DEAE cellulose) ou par HPLC en phase inverse (Roesijadi *et al.*, 1989). La pureté du produit isolé peut alors être testée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970) ou selon celle de Swank et Munkres (1971).

I - 3 - Caractéristiques des métallothionéines

I - 3 - 1 - Masse moléculaire

Les déterminations de la masse moléculaire des métallothionéines faites par chromatographie, électrophorèse ou composition en acides aminés, conduisent à des résultats assez homogènes, quel que soit l'espèce ou l'organe à partir duquel la métallothionéine est extraite. Les valeurs des masses moléculaires sont comprises entre 6 et 12 kDa.

I - 3 - 2 - Composition en acides aminés

La composition en acides aminés est caractérisée par une forte teneur en cystéine (de l'ordre de 30%), la rareté des acides aminés aromatiques, de l'histidine et de l'arginine, et l'abondance de lysine, sérine, glycine et alanine. La distribution des résidus cystéiniques selon la séquence cys - x - cys, ainsi que l'étroite association de la cystéine avec la sérine et la lysine, semblent être une constante des métallothionéines (Noël-Lambot, 1980).

I - 3 - 3 - Absorption en ultraviolet

La composition en acides aminés d'une métallothionéine lui confère une absorption originale des ultraviolets. L'absence d'acides aminés aromatiques induit une non absorbance à 280 nm, en revanche la présence de cystéine, qui provoque la liaison cadmium-soufre, fait apparaître un pic d'absorbance à 250 nm (Kägi et Vallée, 1961; Nordberg *et al.*, 1974).

I - 3 - 4 - Résistance à la chaleur

Chérian et Goyer (1978) ont montré que la métallothionéine reste stable à 80°C pendant 10 minutes; propriété sur laquelle Olafson *et al.* (1979) se sont appuyés pour effectuer le premier fractionnement à partir d'un homogénat de tissus.

I - 3 - 5 - Induction de la synthèse des métallothionéines

Une des caractéristiques des métallothionéines est l'augmentation de la teneur de ces molécules dans les tissus en réponse à une intoxication par les métaux lourds. Le cadmium possède l'action la plus puissante sur l'induction de la synthèse de ces protéines; il est suivi par le mercure inorganique, le zinc et le cuivre (Webb, 1972; Chen *et al.*, 1975; Bremner et Young, 1976; Overnell et Coombs, 1979; Durnham et Palmiter, 1981; Thomas *et al.*, 1983). Cette protéine est également fortement inductible par des stimulateurs très variés, tels que le dexaméthasone (Karin et Hershman, 1979), les radiations ultraviolets (Lieberman *et al.*, 1983), l'interleukine-1 (DiSilvestro et Cousins, 1984b), l'interféron (Friedman et Manley, 1984), des endotoxines bactériennes (Durnham *et al.*, 1984), des promoteurs de tumeurs (Angel *et al.*, 1986). Par ailleurs, Schmidt et Hamer (1986) ont

constaté que les cellules transformées par l'oncogène cHa-ras activé synthétisent plus de métallothionéines. En général, l'induction de ces dernières s'accompagne d'une augmentation des ARNm correspondants, c'est le cas des Mammifères (Squibb et Cousins, 1977), des Poissons (Bonham et Gedamu, 1984). Le temps d'apparition des métallothionéines est beaucoup plus court dans le rein que dans d'autres organes (30 minutes environ) et le maximum de synthèse se situe entre 3 et 5 heures (Probst *et al.*, 1977; Shaikh et Smith, 1977). C'est ainsi que Chen *et al.* (1975) et Shaikh et Smith (1977) ont montré l'existence d'un délai de 2 à 5 heures entre l'injection du métal et l'apparition de la protéine dans le foie de Mammifères; pour cet organe, le maximum de synthèse se situe à une dizaine d'heures.

I - 3 - 6 - Critères de détermination des métallothionéines

Ces critères ont été résumés par Vallée (1979):

- Teneur en cystéine : 30% de la composition globale des acides aminés
- Teneur élevée en métal (cadmium, zinc, cuivre)
- Liaison du tiers des ions métalliques aux groupements S - H
- Généralement 7 atomes grammes de Me^{2+} pour 20 ou 21 groupements S-H
- Absence des acides aminés aromatiques, de l'histidine et des ponts disulfures
- Une seule méthionine présente dans la métallothionéine de Mammifères
- Absence d'absorption à 280 nm
- Absorbance à 250nm de la cadmium-thionéine
- Masse moléculaire située entre 6 et 7 kDa

I - 4 - Données moléculaires

Afin d'appréhender la structure et l'expression des gènes spécifiant une métallothionéine, l'approche moléculaire fondée sur l'isolement des ARNm, leur traduction, la caractérisation des produits traduits par des anticorps anti-métallothionéine, l'élaboration des banques d'ADNc, la reconnaissance des gènes par des sondes nucléotidiques, enfin le séquençage sont nécessaires.

I - 4 - 1 - Chez les Vertébrés

Chez l'Homme, l'étude de l'expression de la métallothionéine est souvent compliquée par la présence de plusieurs isoformes de la molécule, isoformes qui sont sous le contrôle d'une famille de 14 gènes (Karin et Richards, 1982; Varshney *et al.*, 1986). Ainsi, Foster *et al.* (1988) ont montré que la séquence IG spécifiant la métallothionéine-I humaine se caractérise par sa région 5' flanquante comprenant une "TATAA box", quatre séquences riches en GC et au moins quatre éléments responsables de la sensibilité aux métaux, et par sa

région 3' non traduite qui présente un signal non typiquement consensuel de polyadénylation AATTAA et une séquence YGTGTTY de maturation de l'ARNm. Sadhu et Gedamu (1988) ont aussi analysé l'expression de trois gènes de métallothionéine (MTI-F, MTI-G et MTII-A) dans une lignée cellulaire hépatique (Hep G2), ceci en réponse à l'induction par trois métaux (Cd, Cu et Zn). Ces auteurs parviennent ainsi à comprendre la régulation de ces gènes : chacun d'entre eux possède un mode de régulation propre vis-à-vis de ces métaux; l'abondance des ARNm transcrits est fonction de la quantité de métaux servant à l'induction.

Chez les Mammifères, de nombreux auteurs ont prouvé qu'un métal lourd tel que le cadmium stimule la transcription des gènes de métallothionéine. Cette induction se traduit par un taux élevé d'ARNm correspondant. L'analyse de la séquence des gènes de métallothionéine du rein de cheval (Kojima *et al.*, 1976), du foie humain (Kissling et Kägi, 1977) et du foie de souris (Huang *et al.*, 1977) a montré que ces protéines sont composées de 61 acides aminés dont 20 sont des cystéines. La remarquable similarité des séquences retrouvée entre ces protéines suggère une conservation de la fonction au cours de l'évolution et la présence d'allèles multiples pour ces métallothionéines (Bühler et Kägi, 1974; Kojima *et al.*, 1976). Ces métallothionéines se présentent souvent sous deux ou plus de deux isoformes, manifestant de très faibles hétérogénéités. Chez d'autres Vertébrés, par exemple chez la truite (*Salmo gairdneri*) Bonham et Gedamu (1984) rapportent que les ARNm de la métallothionéine extraits du foie d'un animal exposé au cadmium sont activement traduits. Par ailleurs, dans cette espèce la métallothionéine se présente sous deux isoformes, mais peu d'informations existent sur la structure des gènes des métallothionéines identifiées chez les Poissons. Cependant, Bonham *et al.* (1987) ont cloné deux ADNc correspondant aux deux isoformes de la métallothionéine de la truite (MT-A et MT-B). L'un spécifie une protéine de 61 acides aminés et l'autre une molécule de 60 acides aminés. Les séquences de ces deux gènes manifestent une grande similarité avec celles des métallothionéines de Mammifères. Chez la truite, l'analyse selon la technique de Southern suggère que la famille des gènes de la métallothionéine est limitée à deux membres. Zafarullah *et al.* (1988) ont établi la structure du gène MT-B de la truite, qui présente des similitudes avec la structure des gènes de métallothionéine de Mammifères : 1) structure tripartite du gène, 2) conservation des résidus cystéine, 3) Signal TATAA et deux copies d'éléments de sensibilité aux métaux. Néanmoins, ces auteurs ont constaté des différences dans le promoteur qui est riche en AT au lieu de l'être en GC, et l'absence de la séquence GGGCGG qui est le site de fixation du facteur SP1 (facteur de transcription). Ces chercheurs ont aussi caractérisé la séquence responsable de l'induction par le cadmium et le zinc, séquence située à au moins 100 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription; enfin ils ont constaté que le promoteur du gène MT-B est fonctionnel dans une lignée cellulaire hépatique humaine, ce qui laisse penser que le facteur de régulation des métallothionéines est conservé

phylogénétiquement chez des espèces relativement éloignées comme l'Homme et la truite. Chez la poule, Wei et Andrews (1988) ont cloné le gène de la métallothionéine, et ils ont montré que la séquence composée de 63 acides aminés présente une grande similarité (70%) avec celle des métallothionéines de Mammifères. L'étude de l'organisation du génome de la poule a aussi indiqué que le gène de la métallothionéine constitue une séquence qui ne fait pas partie d'une large famille de gènes comme cela a été décrit chez les Mammifères. La métallothionéine de poule n'existe que sous une seule isoforme.

Afin d'élucider la structure et le fonctionnement des gènes de métallothionéine, plusieurs auteurs ont préféré suivre la stratégie du clonage et de l'expression des gènes dans des cellules hôtes variées. Mbikay *et al.* (1983) ont cloné et fait exprimer le gène de la métallothionéine de souris chez *E. coli* ; Murooka et Nagaoka (1987) ont emprunté la même démarche pour l'homologue de ce gène chez un singe. Après clonage du gène de la métallothionéine I de souris, Hou *et al.* (1988) ont remarqué que le produit de ce gène, produit synthétisé sous la forme d'une protéine de fusion chez *E. coli*, augmente la tolérance de la bactérie vis-à-vis des métaux lourds. Plus significatif encore sont les travaux de Thiele *et al.* (1986) qui montrent que le clonage du gène de la métallothionéine du singe restaure la résistance au cuivre chez un mutant de levure (*CUP⁻*) présentant une délétion au niveau de son propre gène. Il est à noter qu'à cause de leur petite taille et de leur richesse en résidus sulhydrylés, ces protéines sont susceptibles d'être toxiques et instables dans les bactéries hôtes; l'hypothèse d'une interférence avec les réactions d'oxydo-réduction du cytoplasme a été proposée. Cette hypothèse a été retenue par Jacobs *et al.* (1989) qui en insérant le gène de la métallothionéine humaine II dans le vecteur d'expression pUA7 (plasmide contenant l'opéron arabinose de *S. typhimurium*, une partie de la région 5' codante et toute la région 3' non codante de la lipoprotéine d'*E. coli*) et en employant une forte induction par l'arabinose ont obtenu une protéine de fusion de 8300 Da, parfaitement stable et spécifiquement localisée au niveau de la paroi d'*E. coli*; l'éventuelle toxicité de la protéine de fusion est ainsi minimisée dans la bactérie hôte. En insérant le même gène dans un vecteur contenant seulement l'opéron arabinose, Romeyer *et al.* (1988) ont obtenu une protéine de fusion de 24 kDa, stable pendant environ 50 minutes, et qui apparaît sous forme d'inclusions dans le cytoplasme d'*E. coli*.

I - 4 - 2 - Chez les Invertébrés

Seule la *Drosophile* a servi de matériel pour l'étude des gènes spécifiant les métallothionéines. Chez cet animal, il existe deux gènes responsables de deux isoformes (MTo et MTn). Le séquençage de l'ADN a montré que les deux gènes dérivent probablement d'une séquence ancestrale commune. Les deux gènes sont interrompus par un seul intron; celui du gène MTo est plus court que son homologue du gène MTn (Erraïss *et al.*, 1989). Cependant,

les deux introns sont en même position lorsque les gènes sont alignés selon le programme EPURE utilisé pour la comparaison des protéines (Mokdad *et al.*, 1987).

I - 4 - 3 - Chez les microorganismes

Chez une levure, Karin *et al.* (1984) ont présenté la structure primaire du gène (*CUP1*) d'une métallothionéine. Simultanément, Butt *et al.* (1984) ont déterminé la séquence de l'ADN de ce gène et ils ont montré une nette divergence de cette protéine de 6573 Da avec les métallothionéines de Vertébrés.

L'analyse de la séquence régulatrice du gène *CUP1* par fusion avec le gène de la galactokinase d'*E. coli* (Butt *et al.*, 1984) ou avec le gène de la β - galactosidase de la même bactérie (Szczypka et Thiele, 1989) a montré que cette séquence joue un rôle direct dans la régulation de la transcription du gène après induction par le cuivre. Par cette technique de fusion, Berka *et al.* (1988) parviennent à faire exprimer le gène de la métallothionéine de la levure chez *E. coli* sous forme de peptide isolé ou de protéines de fusion, bien que ces produits soient instables et en faibles quantités. Ces mêmes auteurs ont montré qu'en synthétisant la métallothionéine de levure *E. coli* fixe du cuivre, du cadmium et du zinc.

II - AUTRES PROTEINES FIXANT DES METAUX LOURDS, PROTEINES DITES NON METALLOTHIONEINES

Récemment, il a été montré qu'en plus des métallothionéines décrites chez des Vertébrés et chez des Invertébrés, d'autres protéines, ne possédant pas les caractéristiques des métallothionéines, ont néanmoins la propriété de fixer des métaux lourds tel que le cadmium.

II - 1 - Caractéristiques générales

- Faible teneur en cystéine
- Présence non négligeable d'acides aminés aromatiques
- Très faible absorbance à 250 nm
- Légère absorbance à 280 nm
- Faible teneur en métal

Il faut noter que la synthèse de ces molécules n'est pas induite chez toutes les espèces après un traitement par les métaux lourds. C'est le cas d'*Hydra attenuata* et d'autres espèces de coelentérés marins. En effet, la comparaison en gel de polyacrylamide des bandes formées par la metalloprotéine extraite des animaux traités ou non traités au cadmium ne met en évidence aucune induction (Andersen *et al.*, 1988). Par la mise en œuvre d'une autre technique, l'immunocytochimie, Dhainaut-Courtois *et al.* (1987) localisent une metalloprotéine dans les coelomocytes du ver marin *Nereis diversicolor* non intoxiqué. En

revanche, Slice *et al.* (1990) ont constaté une augmentation, par un facteur d'environ 55, du taux d'ARNm de métallothionéine chez le Nématode *Caenorhabditis elegans* traité. Enfin, chez les Vertébrés, Thomas *et al.* (1983) ont constaté que lorsque le cadmium est présent dans l'environnement de la truite *Salmo gairdneri*, le métal n'est pas séquestré par une métallothionéine, mais par deux protéines non-métallothionéines de faible masse moléculaire. Le tableau 2 résume quelques exemples de caractérisation de métalloprotéines.

II - 2 - Données moléculaires

Peu de travaux sont réalisés sur la structure et sur l'expression des gènes spécifiant les métalloprotéines. Chez le Nématode *Caenorhabditis elegans*, après avoir caractérisé et purifié une protéine d'environ 6500 Da, Slice *et al.* (1990) ont cloné l'ADNc correspondant à cette molécule. Le séquençage de l'ADNc de cette protéine indique que 17 des 18 résidus cystéine sont inclus dans l'un des motifs suivants Cys - X - Cys ou X - Cys - Cys - X, caractéristiques des métallothionéines de Mammifères. Cependant, entre ces motifs une divergence importante se manifeste entre la séquence du gène de "métallothionéine-like" de *C. elegans* et celle des gènes homologues des Mammifères. Slice *et al.* (1990) concluent à un phénomène d'évolution convergente. Ce séquençage a aussi révélé qu'il existe au moins deux types d'ARNm codant la "métallothionéine-like". Ces ARNm spécifient les mêmes 63 acides aminés et possèdent une extrémité 3' semblable. Par ailleurs, les 2 ADNc divergent au niveau des 10 pb en amont du site d'initiation de la transcription. L'ensemble de ces données moléculaires soulève la question de l'existence d'un épissage alternatif des ARNm, de l'utilisation de promoteurs différents et/ou de l'existence de deux gènes de "métallothionéine-like" spécifiant des molécules identiques (Slice *et al.*, 1990).

III - SITUATION ET INTERET DU PROJET DE RECHERCHE

Les Polychètes représentent un groupe d'Invertébrés abondant dans les sédiments marins. Beaucoup d'espèces de ce groupe possèdent une bonne tolérance vis-à-vis des différents contaminants de leur environnement, tels que les métaux lourds. C'est pourquoi les Polychètes sont considérés comme de possibles indicateurs de la disponibilité des métaux lourds et par conséquent de la pollution des estuaires (Blackstock *et al.*, 1986).

Il est bien connu que des Invertébrés marins exposés expérimentalement à des métaux lourds accumulent du métal fixé à certaines de leur protéines. Ainsi, l'Annélide Polychète *Nereis diversicolor*, espèce euryhaline bien adaptée à une vie dans la vase des estuaires généralement fortement polluée par les métaux lourds, a constitué un modèle biologique pour l'étude des mécanismes de défense. Des chercheurs de notre laboratoire, Dennaï (1984), Nejmeddine (1985), Dennaï *et al.* (1986) ont montré qu'à 13°C *N. diversicolor* résiste bien aux effets du cadmium et du mercure (Cd : 22ppm, Hg :

TABLEAU 2

ESPECES ANIMALES	METAUX EVENTUELLEMENT UTILISES COMME TRACEURS	AUTEURS
Polychètes :		
<i>Nereis diversicolor</i>	Cd, Hg	Nejmeddine (1987)
<i>Harmothoë</i> sp.		Eriksen <i>et al.</i> (1988)
<i>Anobothrus gracilis</i>		Eriksen <i>et al.</i> (1988)
<i>Melina cristata</i>		Eriksen <i>et al.</i> (1988)
Oligochètes :		
<i>Caenorhabditis elegans</i>		Slice <i>et al.</i> (1990)
Coelentéré :		
<i>Hydra attenuata</i>		Andersen <i>et al.</i> (1988)
Mollusques :		
<i>Crassostrea virginica</i>	Cd	Ridlington et Fowler (1979)
<i>Buccinum tenuissimum</i>	Cd	Dohi <i>et al.</i> (1983)
<i>Pecten maximus</i>	Cd	Stone et Overnell (1985)
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Cd	Evtushenko <i>et al.</i> (1986)
Crustacés :		
<i>Palaemon elegans</i>	Cd, Cu, Zn	Whites et Rainbow (1986)
Insectes :		
<i>Ptetronearcys californica</i>	Cd	Clubb <i>et al.</i> (1975)
<i>Locusta migratoria</i>	Cd, Hg	Martoja <i>et al.</i> (1983)

0,075ppm) ajoutés à l'eau des aquariums. Plusieurs mécanismes de défense ont été envisagés : faible absorption du métal, piégeage par des sphérocristaux, ou encore complexation avec une protéine nommée métalloprotéine II (MP II) (II du fait de son apparition avec le cadmium dans un second pic, après chromatographie en gel filtration sur Séphadex G75 (Dennaï *et al.*, 1986). Après passage des fractions composant ce second pic sur une colonne de DEAE-cellulose, le profil de chromatographie ne comprend qu'un seul pic de protéine superposé à celui du cadmium. La masse moléculaire de cette métalloprotéine calculée à partir de l'électrophorèse et de l'analyse des acides aminés, est voisine de 10 kDa. Cependant l'analyse en gel de superose 12 indique une masse moléculaire d'environ 20 kDa, ce qui suggère que la protéine native est un dimère de deux sous unités identiques (Nejmeddine *et al.*, 1988). L'analyse de la composition en acides aminés, ainsi que le spectre d'absorption en ultraviolets ont donné les résultats suivants : très faible teneur en cystéine (0,1%), présence d'acides aminés aromatiques ($\approx 10\%$), environ 13% d'acide aspartique et d'acide glutamique, environ 10% de glycine, alanine et lysine, absence d'absorbance à 250 nm, légère absorbance à 280 nm (Dennaï *et al.*, 1986; Nejmeddine *et al.*, 1988). Ces caractéristiques indiquent que cette protéine diffère radicalement des métallothionéines.

La protéine étant purifiée et caractérisée, il était intéressant d'en rechercher la localisation cellulaire exacte. Ainsi Dhainaut-Courtois *et al.* (1987), par immunocytochimie mettant en œuvre un anticorps polyclonal dirigé contre la MP II sur coupes à la paraffine, ont montré la présence de sites antigéniques au niveau des coelomocytes (cellules libres dans la cavité coelomique des animaux). Avec une technique homologue en microscopie électronique, ces auteurs ont précisé que la MP II est essentiellement localisée au niveau d'une catégorie de coelomocytes, les granulocytes de type I dont la structure fine et les propriétés ont été décrites antérieurement par Baskin (1974) et Dhainaut (1984). Parallèlement aux travaux précédents, la présence de la MP II au niveau des coelomocytes et plus spécialement des granulocytes a été vérifiée par électrophorèse après immunoprécipitation. L'ensemble des résultats précédents démontre que la MP II est synthétisée par les granulocytes de type I; ce qui a été confirmé par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la MP II (Porchet-Henneré *et al.*, 1987). La MP II est exportée vers le liquide coelomique comme en témoigne la mise en évidence par électrophorèse des produits de dégranulation (Nejmeddine, 1987; M'Beri, 1988). Les produits ainsi libérés sont toujours immunoréactifs avec les anticorps monoclonaux (Porchet-Henneré *et al.*, 1987).

A la suite de l'ensemble des résultats fondamentaux obtenus sur la MP II par des chercheurs de notre laboratoire, il nous a semblé intéressant de poursuivre des recherches sur cette molécule, mais en adoptant une démarche complémentaire et solidaire de celles

suivies par les autres chercheurs. Il s'agissait pour nous d'aborder une nouvelle étude de la MP11, molécule qui apparaît comme essentielle (défense contre une pollution par les métaux lourds et contre une infection bactérienne) pour l'animal servant de modèle biologique de notre laboratoire, en mettant en œuvre des techniques de biologie moléculaire.

Notre stratégie peut se résumer ainsi :

- 1) Isolement, purification et sélection des ARNm des coelomocytes.
- 2) Traduction des ARNm dans des systèmes cellulaires ou acellulaires et caractérisation des produits traduits en utilisant des anticorps monoclonaux.
- 3) Elaboration d'une cDNAthèque d'expression.
- 4) Criblage de cette banque par les anticorps poly-ou monoclonaux.
- 5) Synthèse et caractérisation des protéines de fusion par les anticorps précédemment utilisés.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

Nous avons effectué nos travaux sur le ver marin *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète), récolté dans la vase de l'estuaire de l'Aa, Petit ou Grand Fort-Philippe (Département du Nord, France). Après la récolte, les vers sont conservés à 4°C dans de l'eau de mer renouvelée quotidiennement. Nos expériences sont pratiquées sur des femelles dont l'âge n'est pas déterminé.

II- PREPARATION DES CŒLOMOCYTES

Le liquide cœlomique contenant les cellules cœlomiques (ovocytes et cœlomocytes) est collecté par ponction dans la cavité cœlomique à l'aide d'une pipette Pasteur effilée. Les ponctions sont rassemblées dans 5 ml de tampon PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,05M, pH 7,4, NaCl 0,56 M). Après une première centrifugation de 5 mn à 3000xg, les cellules rassemblées (ovocytes et cœlomocytes) sont resuspendues et lavées dans le même tampon, puis recentrifugées.

La séparation des cœlomocytes et des ovocytes est effectuée selon la technique décrite par Bulet *et al.* (1983). Le protocole consiste à déposer délicatement le culot cellulaire repris dans le tampon PBS sur un coussin de 5ml d'une solution de Ficoll à 2,5% dans le tampon PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M, pH 7,4, NaCl 0,35M) dans un tube conique placé sur de la glace. Après 10mn, temps au cours duquel les ovocytes sédimentent et les cœlomocytes demeurent dans le surnageant, ces derniers sont récupérés, puis lavés dans le tampon PBS afin d'éliminer toute trace de Ficoll.

III - EXTRACTION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES (ARN) DES CŒLOMOCYTES

III - 1 - Précautions opératoires

Les ARN sont des molécules fragiles et facilement dégradées par les ribonucléases. Ainsi, leur manipulation en laboratoire nécessite certaines précautions :

- Verrerie stérilisée à 200°C
- Utilisation d'un masque et de gants à usage unique
- Les objets en plastique à usage unique doivent être traités au diéthyl-pyrocarbonate (DEPC) à 0,1% dans l'éthanol pur, puis stérilisés à 100°C.
- Toutes les solutions sont également traitées au DEPC à 0,1%, puis utilisées après un "vieillissement" de la solution pendant au moins une nuit.

III - 2 - Technique d'extraction

Après lavage, les cœlomocytes sont repris dans 5 ml de tampon GT (isothiocyanate de guanidium 4M, citrate trisodique 0,005 M, sarcosyl 0,017M, β -mercaptoéthanol 0,1M) et broyés manuellement dans un tube (type Dounce). Deux grammes de chlorure de césium sont ajoutés à l'homogénat, puis dissous par forte agitation. Les molécules d'ADN sont brisées mécaniquement au cours d'un passage par l'aiguille d'une seringue. La suspension est ensuite déposée délicatement 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) placée dans un tube pour le rotor de type SW 40 Beckman. Les tubes complétés par du tampon GT et équilibrés sont centrifugés à 148500 xg pendant une nuit à 18°C. Après cette centrifugation, les molécules d'ARN totaux forment un sédiment et une bande d'ADN bien visible flotte à environ 1 cm au dessus du culot d'ARN. A l'aide d'une pipette Pasteur on élimine une partie du surnageant avant de clamber les tubes en dessous de la bande d'ADN; puis les tubes sont sectionnés. Le culot d'ARN est asséché, puis repris dans 1ml de tampon TE (Tris/HCl 0,01 M, pH 7,4, EDTA 0,001M, SDS 1%). 2ml du mélange chloroforme/butanol (4 vol/1 vol) sont ajoutés, et l'ensemble est agité vigoureusement, puis centrifugé à 1600 xg pendant 5 mn. 2 phases sont alors obtenues, la phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques est soigneusement prélevée en utilisant une pipette Pasteur, et la phase organique inférieure est additionnée de 1 ml de tampon TE; l'ensemble est agité et centrifugé à 1600 xg pendant 5 mn. La nouvelle phase supérieure est ajoutée à la première, et l'ensemble des ARN est précipité par addition d'un dixième du volume de la phase aqueuse en acétate de sodium 3 M et 2,2 volumes en éthanol pur à - 20°C. L'ensemble est soigneusement mélangé, puis stocké à - 80°C pour au moins 2 h, ou à -20°C pendant une nuit.

IV - PURIFICATION DES ARNm

Les ARNm sont purifiés par chromatographie d'affinité lors d'un passage des échantillons d'ARN totaux sur une colonne d'oligo -(dT) cellulose selon la technique de Aviv et Leder (1972) et Maniatis *et al.* (1982).

IV - 1 - Appareillage

L'appareillage comprend :

- une colonne dont le fond est bouché par des fibres de verre préalablement autoclavées; c'est sur ce bouchon qu'est déposé le gel;
- la partie inférieure de la colonne est reliée à l'unité optique par un tube souple passant par une pompe péristaltique;
- l'unité optique est couplée à un enregistreur de type ISCO;
- un tube capillaire sert à l'évacuation du liquide.

IV - 2 - Traitement de l'appareillage et préparation du gel d'oligo-(dT) cellulose

La colonne est rincée par deux passages d'eau bidistillée additionnée extemporanément de DEPC à 0,1 %, suivis par plusieurs lavages d'eau bidistillée traitée la veille par le DEPC. Ce traitement se poursuit par 5 ou 6 passages de tampon de fixation (Tris/HCl 0,02M, pH 7,6, LiCl 0,5M, EDTA 0,001M, SDS 0,1%).

2 g environ de gel d'oligo-(dT) cellulose (Boehringer-Mannheim GmbH), quantité nécessaire pour obtenir environ 1 cm de gel dans la colonne au-dessus de la fibre de verre, sont mis en suspension dans le tampon de fixation, puis centrifugés à faible vitesse (1000 xg pendant 5 mn). Le gel est repris par le mélange NaOH 0,1M/EDTA 0,005M et centrifugé à faible vitesse. Le surnageant, dont le pH est très basique, est éliminé, et le gel est repris par le tampon de fixation jusqu'à ce que le pH du surnageant soit compris entre 7 et 7,5. Le gel est alors déposé dans la colonne et décante lentement.

IV - 3 - Préparation des ARN totaux

La solution d'ARN totaux est centrifugée à 14600 xg pendant 10 mn à 4°C. On obtient un culot d'ARN qui est asséché sous air comprimé et dissous dans 0,5 ml d'eau bidistillée. La solution d'ARN est portée à 65°C pendant 3 mn afin de dénaturer les molécules d'acides nucléiques doubles brins. 1 ml de tampon de fixation deux fois concentré (Tris/HCl 0,04 M, pH 7,6, LiCl 1M, EDTA 0,002M, SDS 0,2%) est alors ajouté et l'ensemble est déposé délicatement sur le gel.

IV - 4 - Recyclage de l'échantillon

La partie supérieure de la colonne est bouchée par une membrane de "Parafilm". Le tube capillaire d'évacuation est placé à l'intérieur de la colonne en perforant la membrane précédente. La pompe péristaltique est mise en action et la circulation du liquide en circuit fermé dure au moins 2 h. Le bon recyclage de l'échantillon est déterminé par l'indication d'un plateau d'absorbance stable ($\lambda = 254$ nm).

IV - 5 - Elution des ARNm

Le capillaire d'évacuation est placé dans un tube et du tampon de fixation est déposé sur la colonne jusqu'à ce que l'enregistreur indique une chute de l'absorbance. Cette chute témoigne de l'élution des ARN poly (A)⁻; elle est suivie par une ligne de base stable. Le tampon d'élution (Tris/HCl 0,01M, pH 7,6, EDTA 0,001M, SDS 0,05%) est alors déposé dans la colonne. L'élution des ARNm poly (A)⁺ se traduit par un pic d'absorbance au niveau de l'enregistreur. Ces molécules sont recueillies dans un nouveau tube. Les ARNm poly (A)⁺

ainsi recueillis sont alors précipités en présence d'un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M et 2,2 volumes d'éthanol pur à -20°C. L'ensemble est soigneusement mélangé, puis stocké à - 20°C pour au moins une nuit.

V - TRADUCTION DES ARNm

V - 1 - Traduction *in vitro*

Le système acellulaire utilisé pour cette traduction est le lysat de réticulocytes de lapin. Les techniques opératoires suivies sont celles préconisées par le fournisseur Amersham. Le volume total de 50 µl, contenant 37,5 µl de lysat de réticulocytes de lapin (référence N. 90, Amersham-France), 7,5 µl de méthionine ^{35}S (activité spécifique 1250 Ci/mM, SJ 1515 Amersham) et 5 µg d'ARNm poly (A)⁺, est incubé à 30°C pendant une heure. Un témoin négatif, dit "témoin eau", contenant les mêmes composants, mais dépourvu des ARNm poly (A)⁺ remplacés, par de l'eau bidistillée, est préparé en parallèle. Les réactions de traduction sont stoppées par un refroidissement brusque des tubes dans la glace.

Afin de mesurer le taux de méthionine ^{35}S incorporé dans les protéines nouvellement synthétisées, 2 µl de chaque échantillon sont additionnés à 0,5ml de NaOH 1M contenant 5% de H₂O₂ à 30%. L'ensemble est agité puis incubé à 37°C pendant 10 mn dans le but d'hydrolyser les complexes ARN-acides aminés. Les échantillons sont ensuite additionnés à 2 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 100% froid contenant 2% de caséine, et demeurent à température ambiante pendant 30 mn. Après cette étape de précipitation des protéines, l'ensemble de chaque échantillon est déposé sur un disque de fibre de verre Whatman. Les filtres sont alors lavés successivement par du TCA à 8%, de l'eau bidistillée et le mélange éthanol/éther (V/V). Les disques sèchent une nuit, puis sont placés dans des fioles à scintillation liquide contenant 5 ml de Lipofluore (J.T. Backer). La radioactivité est déterminée à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (LKB WALLAC 1215 RACK BETA).

Afin d'obtenir une évaluation moyenne de la radioactivité, trois mesures concernant trois prélèvements différents du même échantillon sont effectuées. Le reste de chaque échantillon est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide 5-25% en milieu dénaturant.

V - 2 - Traduction *in vivo*

Le système cellulaire utilisé pour une traduction *in vivo* est l'ovocyte de *Xenopus laevis* injecté des ARNm.

Les ovocytes sont prélevés sur des *X.laevis* matures après incision de l'abdomen. Les cellules sont placées dans le milieu de Barth modifié (NaCl 0,088M, KCl 0,001M,

Ca(NO₃)₂ 0,033 M, CaCl₂ 0,041M, MgSO₄ 0,082M, NaHCO₃ 0,0024M, Hepes 0,01M). Les cellules folliculaires sont séparées des ovocytes par incubation dans le milieu de Barth additionné de 2 mg/ml de collagénase (type IA, Sigma Chemical Co) pendant 3 h à température ambiante. 50 nl d'une solution d'ARNm poly (A)⁺ sont injectés au niveau du pôle végétatif (pôle jaune) des ovocytes à l'aide d'un microdistributeur muni d'une aiguille d'environ 20µm de diamètre. Les ovocytes témoin reçoivent 50 nl d'eau bidistillée. L'ensemble des ovocytes est incubé à 18°C dans le milieu de Barth contenant de la pénicilline à 100 U/ml, streptomycine à 100 µg/ml, théophylline à 0,0005 M et du pyruvate de sodium à 0,0025 M pendant 3 jours. Un renouvellement quotidien du milieu d'incubation est pratiqué.

V - 2 - 1 - Extraction des protéines synthétisées *in vivo*

Les protéines sont extraites, des ovocytes injectés d'ARNm poly (A)⁺ et des ovocytes témoin injectés par l'eau bidistillée, par homogénéisation de 5 ovocytes dans 200 µl du tampon (Tris/HCl 0,075M, pH 6,8, β-mercaptoéthanol 1%, SDS 1%, Phényl-Méthyl-Sulfonyl-Fluoride (PMSF) 0,001M). Après une centrifugation de 5 mn à 10 000xg à température ambiante, le surnageant contenant les protéines est dilué dans le tampon (Tris/HCl 0,05 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M) et analysé en électrophorèse.

La technique décrite par Bradford (1976), fondée sur le dosage colorimétrique, est utilisée pour la quantification des protéines .

VI - ANALYSES DES PRODUITS TRADUITS

VI - 1 Technique du "Western-blot"

VI - 1 - 1 -Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (PAGES)

L'électrophorèse en PAGES est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970) dans une cuve verticale (type Bio-Rad). Le gel possède 0,75 mm d'épaisseur.

a) Le gel de séparation : Il est constitué par un gradient de polyacrylamide 5-25%

- Solution d'acrylamide à 5 %		
Tris/HCl 0,75 M, pH 8,8		50 ml
Acrylamide		5 g
Bis-acrylamide		0,132 g
SDS		0,1 g
H ₂ O	q.s.p.	100 ml

- Solution d'acrylamide à 25%

Tris/HCl 0,75 M, pH 8,8	50 ml
Acrylamide	25 g
Bis-acrylamide	0,66 g
Saccharose	18 g
SDS	0,1 g
H ₂ O	q.s.p.100 ml

Pour 9 ml de gel, sont ajoutés 9 µl de persulfate d'ammonium à 10 % préparé extemporanément et 4 µl de N, N, N', N' tétraméthylènediamine (TEMED) comme catalyseurs.

b) Le gel de concentration : il est constitué par un gel de polyacrylamide à 5 %

Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8	25 ml
Acrylamide	5 g
Bis-acrylamide	0,132 g
SDS	0,1 g
H ₂ O	q.s.p.100 ml

Pour 4 ml de gel de concentration, sont ajoutés 50 µl de persulfate d'ammonium à 10 % préparé extemporanément et 5 µl de TEMED comme catalyseurs.

Ces différentes solutions peuvent être conservées à 4°C pendant plusieurs semaines.

Les protéines sont traitées à 100°C pendant 3 mn dans un tampon (Tris/HCl 0,065 M, pH 6,8, SDS 2 %, saccharose 10 %, β-mercaptoéthanol 5 %, bleu de bromophénol 0,1 %) avant leur dépôt dans les puits formés par le peigne dans le gel de concentration.

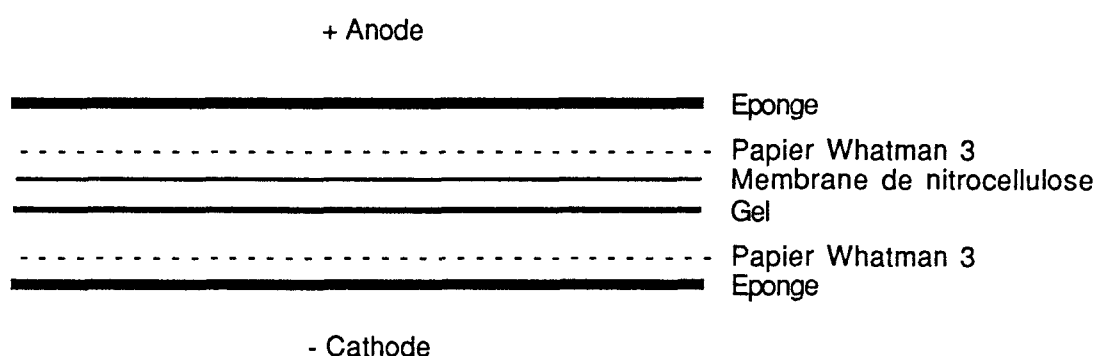
Un mélange de protéines témoin (marqueurs de masse moléculaire) fourni par Pharmacia, de masse moléculaire 94 kDa (phosphorylase B), 67 kDa (albumine), 43 kDa (ovalbumine), 30 kDa (anhydrase carbonique), 20 kDa (inhibiteur de la trypsine) et 14,4 kDa (α- lactalbumine) est traité et déposé dans les mêmes conditions.

L'électrophorèse est réalisée à 4-5 mA pendant 16 h à température ambiante, en utilisant le tampon d'électrophorèse (Tris/HCl 0,025 M, pH 8,3, glycine 0,19 M, SDS 0,1 %).

VI - 1 - 2 - Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

L'électrophorèse des protéines est effectuée selon la méthode de Towbin *et al.* (1979).

Après séparation des protéines par électrophorèse, le gel est équilibré pendant 30 mn dans le tampon de transfert (Tris 0,025 M, glycine 0,19 M, méthanol 10 %, pH 8,3). Les membranes de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, porosité 0,45 μ m) sont découpées à une dimension légèrement supérieure à celle du gel et équilibrées pendant 15 mn dans le même tampon. L'empilement suivant est ainsi réalisé :



Les éponges et le papier Whatman 3 sont préalablement imbibés dans le tampon de transfert. Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose s'effectue dans une cuve dite de transfert (Bio-Rad) à 45 V pendant 4 à 5 h à température ambiante en présence du tampon de transfert.

a) Révélation par l'"amido-black" (Bio-Rad) : une languette de nitrocellulose est découpée à partir de chaque échantillon, puis elle est colorée dans l'"amido-black" 0,1 %, méthanol 45 %, acide acétique 10 %. La décoloration s'effectue dans le mélange méthanol 30 %, acide acétique 2 %.

b) Immunorévélation : on pratique une saturation des sites libres de la nitrocellulose par du lait en poudre écrémé à 5 % dans du tampon TBS (Tris/HCl 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M) additionné de Tween 20 à 0,05 %, pendant 2 h sous agitation. La nitrocellulose est ensuite incubée en présence de l'anticorps dilué au 100 ème dans le tampon de saturation pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après un lavage de 10 mn, puis quatre lavages de 5 mn dans le tampon TBS - Tween 20, la nitrocellulose est mise en présence de l'anticorps secondaire (anticorps de mouton anti-IgG de souris) marqué à la peroxydase (Institut Pasteur) dilué au 100 ème dans du TBS pendant 1 h 30 mn. Des lavages selon le mode précédent sont alors effectués avant la révélation dans le mélange : 50 ml TBS,

3 ml de 4 chloro-1-naphtol à 0,3 % dans le méthanol et 10 µl H₂O₂ à 30 %. La révélation est interrompue après 10 mn par un lavage dans l'eau bidistillée; puis la nitrocellulose sèche à l'abri de la lumière.

VI - 2 - Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Un test est réalisé sur des plaques ELISA (plaques flexibles en chlorure de polyvinyl Falcon) à 96 puits. 100 µl de chacun des produits traduits *in vivo* sont déposés dans les puits. Après une nuit de fixation à 4°C, environ 60 % de produits non fixés sont récupérés, et les puits sont saturés avec 200 µl de PBS (NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M) contenant 2% de sérum albumine bovine (SAB), pendant 30 mn à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés par le PBS additionné de SAB à 0,1 % et de Tween 20 à 0,05 %. La plaque est alors enveloppée dans une membrane de "Parafilm" et séchée à l'abri de la poussière à 4°C. Parallèlement, un témoin positif (MP II purifiée) et un témoin négatif (PBS) sont préparés dans les mêmes conditions. Le jour de la réalisation du test, 100 µl d'anticorps dirigés contre la MP II, ici un anticorps monoclonal anti-MP II, sont déposés dans chaque puits préparé selon la technique décrite précédemment. Après une incubation de 3 h à température ambiante, ou de 2 h à 37°C, ou encore d'une nuit à 4°C, les puits sont lavés au moins trois fois avec 200 µl de PBS contenant 0,1% de SAB et 0,05 % de Tween 20. 100 µl d'anticorps secondaire (anticorps de mouton anti-IgG de souris) marqué à la peroxydase (Institut Pasteur) dilué au 10 000ème dans du PBS sont alors ajoutés. Après 2 h d'incubation à 37 °C et plusieurs lavages soigneux, la réaction de révélation est réalisée par introduction dans chaque puits de 100 µl de solution de substrat {9 mg d'OPD (ortho-phényl-diamine) dissous dans 25 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 5,5, additionné de 16 µl de H₂O₂ à 30 %}. La réaction de révélation dure 30 mn à 37°C, avant qu'elle soit arrêtée par addition de 100 µl d'HCl 1 M par puits. La densité optique à 490 nm de chaque puits est évaluée à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA (MR 700, Dynatech). A cette longueur d'onde, la valeur maximale de la densité optique est de 2, au delà de cette valeur le lecteur affiche "OVER".

VII - ELABORATION D'UNE BANQUE D'EXPRESSION A PARTIR DES ARNm DE CŒLOMOCYTES

Des précautions opératoires sont indispensables pour cette élaboration :

- Une vaisselle stérilisée à 200 °C
- Des solutions autoclavées
- Du matériel à usage unique en plastique siliconé et autoclavé

Les cinq grandes étapes de l'élaboration d'une banque d'ADNc sont :

- La purification des ARNm poly (A)⁺

- La synthèse d'ADNc double brin
- L'insertion d'ADNc dans un vecteur
- Le clonage du vecteur recombiné
- La sélection des clones recombinés

VII - 1 - Purification des ARNm poly (A)⁺

Les ARNm poly (A)⁺, extraits à partir des coelomocytes de *N. diversicolor*, sont purifiés sur colonne d'oligo-(dT) cellulose selon le mode décrit en IV.

Après précipitation, les ARNm poly (A)⁺ sont centrifugés à 10 000 xg pendant 20 mn à 4°C. Le culot est alors lavé par l'éthanol à 70 %, puis centrifugé à 10 000 xg pendant 5 mn à 4°C. Le culot est ensuite séché par un flux d'air comprimé, puis il est repris dans un minimum d'eau bidistillée traitée au DEPC. Un aliquot de 3 µl de cette solution, dilué dans 0,5 ml d'eau bidistillée, est utilisé pour une analyse spectrophotométrique des ARNm poly (A)⁺.

VII - 2 - Synthèse d'ADNc double brin

Pour cette synthèse, le protocole expérimental suivi est celui préconisé par le fournisseur Amersham (code RPN 1256), selon les techniques décrites par Okayama et Berg (1982), et Gubler et Hoffman (1983).

VII - 2 - 1 - Synthèse du 1er brin d'ADNc. 5 µg d'ARNm poly (A)⁺ ont servi de matrice à la transcriptase reverse du virus de la myéloblastose aviaire pour synthétiser le 1er brin d'ADNc en présence d'un court fragment d'oligo-dT servant d'amorce qui, en s'appariant à la séquence poly (A)⁺, permet l'initiation de la synthèse de l'ADNc en 3'.

Pour cette opération le mélange suivant est réalisé :

- Tampon 5 X de synthèse du 1er brin	10 µl
- Sodium pyrophosphate (NaPP)	2,5 µl
- Inhibiteur de la ribonucléase (placenta humain)	2,5 µl
- Désoxynucléotides trisphosphatés (dNTP)	5 µl
- Oligo-dT	2,5 µl
- (α-P ³²) dCTP (activité spécifique > 3000 Ci/mM)	10 µl
- ARNm poly (A) ⁺	3 µl (5 µg)
Mélange et centrifugation brève	
- H ₂ O q.s.p.50 µl	9,5 µl
- Enzyme (transcriptase reverse)	5 µl (100 unités)
Incubation à 42 °C pendant 45 mn	

VII - 2 - 2 - Synthèse du 2ème brin d'ADNc.

Lorsque la transcriptase reverse a terminé la synthèse du premier brin, la ribonucléase H d'*E. coli* est ajoutée afin de couper en plusieurs segments le brin d'ARNm de l'hybride ARNm-ADNc. Un ou plusieurs de ces morceaux servent d'amorces à l'ADN polymérase I d'*E. coli* pour la synthèse du 2ème brin d'ADNc. Après synthèse des 2 brins, l'ADN polymérase du phage T4, grâce à son activité exonucléasique 3'-5', hydrolyse les petits segments dépassant de l'extrémité 3' du 1er brin d'ADNc.

Les réactions se déroulent dans le mélange contenant l'hybride ARNm-ADNc (50 µl), auquel sont ajoutés :

- Tampon de synthèse du 2ème brin	93,5 µl
- (α -P ³²) dCTP (activité spécifique > 3000 Ci/mM)	10 µl
- Ribonucléase H d' <i>E. coli</i>	5 µl (4 unités)
- ADN polymérase I d' <i>E. coli</i>	33 µl (115 unités)
- H ₂ O q.s.p. 250µl	58,5 µl

L'échantillon est agité délicatement, puis incubé à 12°C pendant 1 h, puis à 22°C pendant 1 h. La réaction enzymatique de la ribonucléase H est interrompue par incubation de l'échantillon à 70°C pendant 10 mn. L'échantillon est alors brièvement centrifugé, puis placé dans la glace avant d'ajouter l'ADN polymérase du phage T4 à raison de 2 unités/µg d'ARNm poly (A)⁺ (2,5 µl). L'échantillon est alors incubé à 37°C pendant 10 mn. La réaction enzymatique de l'ADN polymérase de T4 est interrompue par addition de 10µl d'EDTA à 0,25 M, pH 8 et 10 µl de SDS à 10 % pour 100µl de volume réactionnel final.

VII - 2 - 3 - Purification de l'ADNc double brin

a) Extraction au phénol/chloroforme : un mélange phénol/chloroforme (V/V) (le chloroforme est préalablement mélangé avec l'alcool isoamylique 24 V/1V) est ajouté en volume égal au milieu réactionnel contenant l'ADNc double brin. L'ensemble est soigneusement agité, puis centrifugé 1 à 2 mn pour obtenir 2 phases : une supérieure à récupérer, et une phase phénolique inférieure reprise par 50 µl d'eau. Après agitation et centrifugation comme précédemment, la nouvelle phase supérieure est ajoutée à la première, et l'ensemble est traité par 2 volumes d'éther saturé d'eau. Une première phase étherée supérieure est alors éliminée à la suite d'une brève centrifugation, et la phase inférieure est à nouveau traitée par l'éther, qui sera éliminé après centrifugation. Cette élimination sera totale après évaporation sous flux d'air comprimé.

b) Précipitation à l'éthanol : la précipitation de l'ADNc double brin est réalisée par l'addition d'un volume d'acétate d'ammonium 4 M et de 2 volumes d'éthanol pur à -20°C. L'ensemble est placé à -70°C pendant 1 h, puis centrifugé à 10 000 xg pendant 30 mn à

4°C. Le culot obtenu est alors lavé avec l'éthanol à 70 %, suivi d'une centrifugation de 5 mn à 10 000 xg. Après élimination du surnageant, le culot est séché sous air comprimé, puis repris dans 50 µl de tampon TE (Tris/HCl 0,01 M, pH 8, EDTA 0,001 M). L'ensemble est précipité par un volume d'acétate d'ammonium 4 M et 2 volumes d'éthanol pur à -20°C.

VII - 3 - Insertion de l'ADNc double brin dans le vecteur

Dans le but de conserver l'intégrité de la molécule d'ADNc, et aussi d'exciser facilement l'insert du vecteur, la stratégie d'addition des attaches dites "Linkers" contenant des sites de restriction définis pour une enzyme de restriction est utilisée.

VII - 3 - 1 - Méthylation des sites *EcoR1* de l'ADNc

L'enzyme de restriction *Eco R1* est utilisée pour l'insertion de l'ADNc dans le vecteur phagique λ gt 11. Cependant, une protection des éventuels sites de restriction de l'enzyme *Eco R1* au niveau des molécules d'ADNc est nécessaire. Cette protection est réalisée par la méthylation de la cytosine dans le palindrome spécifique GAATTC*.

L'ADNc, précédemment extrait et précipité, est centrifugé à 10 000 xg pendant 30 mn à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec l'éthanol à 70 % puis centrifugé 5 mn à 10 000 xg. Le culot obtenu est séché sous air comprimé puis redissous dans 13 µl d'H₂O.

La quantité de méthylase à ajouter est proportionnelle à la concentration d'ADNc synthétisé, cette dernière est donc déterminée par analyse de la densité optique (la masse totale obtenue: 2 µg).

Pour la réaction de méthylation, le mélange suivant est réalisé :

- ADNc (2 µg)	13 µl
- Tampon M	4 µl
- Solution SAM (S-adénosyl-méthionine)	2 µl

L'ensemble est agité délicatement, puis centrifugé quelques secondes avant d'ajouter l'enzyme *Eco R1* méthylase (20 unités/µl) selon la proportion (20 unités d'enzyme/µg d'ADNc), soit 50 unités correspondant à 2,5 µl d'enzyme. La réaction enzymatique est réalisée à 37°C pendant 1 h, puis stoppée à 70°C pendant 10 mn. L'échantillon est ensuite précipité par un volume d'acétate d'ammonium 4 M et 2 volumes d'éthanol pendant 1 h à -70°C. Le culot, obtenu après centrifugation de 30 mn à 10 000 xg à 4°C, est lavé par l'éthanol à 70%. Une deuxième centrifugation de 5 mn à 10 000 xg permet d'éliminer l'éthanol. Le culot est alors séché sous air comprimé, puis repris dans le tampon TE.

VII - 3 - 2 - Addition des attaches *Eco R1* (*Eco R1* "Linkers")

à l'ADNc

Les "Linkers *Eco R1*" sont des polymères synthétiques contenant des sites de restriction spécifiques pour l'enzyme *Eco R1*. Le mélange suivant est réalisé :

- | | |
|---|--|
| - ADNc méthylé | 21 μ l |
| - Tampon de ligation L. | 3 μ l |
| - "Linkers <i>Eco R1</i> " (0,5 μ g/ μ l) | 4 μ l (1 μ g/1 μ g d'ADNc) |

Mélange, puis centrifugation brève.

La fixation de ces "Linkers" est réalisée par addition de 2 μ l (5 unités) d'enzyme ADN ligase du phage T 4. Après une agitation douce, l'échantillon est incubé à 15°C pendant 16 à 20 h. L'inactivation de la ligase se fait par incubation à 70°C pendant 10 mn, suivie d'une centrifugation de quelques secondes.

VII - 3 - 3 - Hydrolyse des "Linkers" par *Eco R1*

Le vecteur fourni par la société Amersham est déjà digéré par l'enzyme *Eco R1*; cette hydrolyse a permis de faire apparaître des extrémités cohésives, qui sont nécessaires pour l'insertion de l'ADNc dans le vecteur. Aux 30 μ l d'ADNc pourvu de "linkers", sont ajoutés :

- | | |
|---------------------------------------|--|
| - Tampon E. | 10 μ l |
| - H ₂ O q.s.p. 100 μ l | 56,7 μ l |
| Agitation et centrifugation brève | |
| - <i>Eco R1</i> (60 unités/ μ l) | 3,3 μ l (100 unités/ μ g d'ADNc) |

d'ADNc)

La réaction de digestion se déroule à 37°C pendant 5 h. Elle est arrêtée par une incubation de 10 mn à 70°C.

VII-3-4-Purification des molécules d'ADNc par chromatographie

Le but de la purification des molécules d'ADNc est d'éliminer les "Linkers *Eco R1*" en excès. Une colonne contenant un gel fourni par la société Amersham est équilibrée par deux passages de 3 ml de tampon STE (Tris/HCl 0,01 M, pH 8, EDTA 0,001 M, NaCl 0,3 M) pendant environ 30 mn. L'échantillon (100 μ l) est déposé sur le gel, et après sa pénétration 100 μ l de tampon STE sont ajoutés.

La première solution éluée est récupérée dans un tube. L'addition de 200 μ l de tampon STE permet d'éluer la deuxième solution récupérée dans un deuxième tube. Cette technique d'élution est répétée jusqu'au 20 ème tube. Après mesure de la radioactivité

présente dans chaque tube, les solutions radioactives sont rassemblées, puis précipitées par 1 volume d'acétate d'ammonium 4 M et 2 volumes d'éthanol pur à -20°C.

VII - 3 - 5 - Ligation de l'ADNc aux "bras" du vecteur λ gt11

Le vecteur phagique λ gt 11 fourni par la société Amersham est déjà digéré par l'enzyme *Eco R1* au niveau du site localisé dans la partie 3' terminale du gène de la β -galactosidase (*lac Z*), formant ainsi de part et d'autre du site des éléments appelés "bras du vecteur".

Le culot d'ADNc obtenu après centrifugation est asséché, puis redissous dans du tampon TE. Un aliquot de 1 μ l a permis d'évaluer une nouvelle fois la concentration de l'ADNc.

- ADNc	1 μ l (100 ng)
- "Bras λ gt11"	2 μ l (1 μ g)
- Tampon de ligation	1 μ l
- H ₂ O q.s.p. 10 μ l	5 μ l
Agitation douce, puis centrifugation brève	
- Ligase du phage T4	1 μ l (2,5 unités)

Après une incubation de 16 à 20 h à 15°C, l'ensemble est centrifugé pour quelques secondes, puis additionné d'un μ l d'acétate d'ammonium 4 M et de 27 μ l d'éthanol pur. Après agitation, l'échantillon est placé dans un bac contenant un mélange éthanol/glace pendant 15 mn. Le culot obtenu après centrifugation de 15 mn à 10 000 xg est séché sous air comprimé puis redissous dans 5 μ l de tampon TE.

VII - 3 - 6 - Empaquetage de l'ADN phagique recombiné

Le but de l'empaquetage est de permettre l'encapsidation du phage, qui rend ce dernier virulent et donc capable d'infecter des bactéries. Le système d'empaquetage utilisé est le système Gigapack Gold fourni par la société Stratagène. Les 5 μ l de l'ADN phagique recombiné sont ajoutés au premier milieu d'empaquetage du "kit", préalablement placé dans la glace. 15 μ l du deuxième milieu d'empaquetage du "kit" sont ajoutés, et l'ensemble est brièvement centrifugé puis incubé à 22°C pendant 2 h. Un témoin positif (ADN natif du virus λ sauvage) est empaqueté dans les mêmes conditions afin de tester l'efficacité de ce système d'empaquetage.

Après cette incubation, 0,5 ml de tampon SM (NaCl 0,1 M, MgSO₄ 0,008 M, Tris/HCl 0,05 M, pH 7,5, gélatine 2%) et 10 μ l de chloroforme sont ajoutés à l'échantillon qui peut être stocké à 4°C pour plusieurs semaines. Ces phages recombinés élaborés *in vitro* se conservent bien dans ces conditions.

VII - 4 - Infection des bactéries et titrage de la banque d'ADNc

VII - 4 - 1 - Obtention des bactéries sensibles à l'infection

La souche bactérienne Y 1090 d'*E. coli* est utilisée pour cette infection. Les bactéries en phase exponentielle de croissance sont obtenues par multiplication dans le milieu liquide LB (Luria Bertoni),

- Bacto - tryptone	10 g
- Bacto "yeast extract"	5 g
- NaCl	10 g
- H ₂ O milli-Q q.s.p.	1000 ml pH 7,5

contenant 35 µg/ml d'ampicilline, à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,7. Ces bactéries en phase exponentielle de croissance sont centrifugées à 3 000 xg pendant 15 mn. Le culot bactérien est redissous dans une solution de MgSO₄ à 0,01 M de façon à obtenir une D.O de 2. Les bactéries sont alors placées à 37°C pendant 1 h. Ces bactéries peuvent être conservées à 4°C pendant 2 jours.

VII - 4 - 2 - Détermination du titre de la banque

La détermination du titre de la banque est l'évaluation du pourcentage de phages recombinés (phages qui ont intégrés un ADNc au site *Eco R1* de lac Z). A partir de la banque, des dilutions par entraînement sont réalisées. A 100 µl de chaque dilution, 100 µl de bactéries rendues sensibles à l'infection sont ajoutées. Le temps de fixation et d'attaque par les phages des bactéries dure 20 mn à température ambiante. 3 ml de gélose "molle" (milieu LB contenant 0,8 % d'agarose et 0,01 M de MgSO₄) maintenue à 60°C sont ajoutés à chaque tube. L'ensemble est rapidement mélangé, puis coulé sur un fond d'agar à 1,2 % contenant 75 µg/ml d'ampicilline, préalablement coulé et solidifié dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont placées à 37°C pendant une nuit.

Il est important de noter que la gélose "molle" utilisée pour le titrage de la banque contient pour 20 ml de gélose :

- 160 µl d'IPTG 0,1 M (Isopropyl-thiogalactopyranoside) de chez IBI
- 200 µl de X-gal 0,049 M (5 bromo-4 chloro-3 indolyl galactoside) de chez Boehringer. X-gal est un substrat de la β-galactosidase qui est dissous dans du di méthylformamide.

VII - 4 - 3 - Amplification de la banque

Une série de 30 tubes contenant chacun 100 µl d'une dilution qui permet d'avoir une confluence des plages de lyse sur les boîtes de Pétri est préparée. A chaque tube sont

ajoutés 100 µl de bactéries rendues sensibles à l'infection ; après un temps de contact phages-bactéries de 20 mn, 3 ml de gélose "molle" (sans IPTG, ni X-gal) sont ajoutés à chaque tube, puis rapidement coulés sur un fond d'agar solide dans une boîte de Pétri. Les 30 boîtes sont incubées à 37°C pendant une nuit. 5 ml de tampon SM sont répandus à la surface de chaque boîte présentant une confluence des plages de lyse. Les boîtes sont placées sur un agitateur pendant 3 h à 4°C. Avec un étaleur, les surnageants du tampon SM contenant les phages sont rassemblés et additionnés de 0,5 ml de chloroforme. L'ensemble est agité 15 mn à 37°C, puis centrifugé à 4000 xg pendant 10 mn pour éliminer les débris de bactéries et d'agarose. Le surnageant récupéré est additionné de 200 µl de chloroforme pour empêcher un éventuel développement bactérien, puis il est stocké à 4°C pour plusieurs semaines. Une nouvelle évaluation de la teneur de la banque amplifiée en phages recombinés peut alors se faire.

VII - 5 - Sélection des clones recombinés ou criblage de la banque d'ADNc

Le criblage dit "screening" de la banque pour sélectionner les clones recombinants intéressants se fait par des anticorps spécifiques du produit du gène de la MP11.

VII - 5 - 1 - Epuisement des anticorps

Le but de l'opération est d'éliminer les éventuels anticorps dirigés contre les protéines totales d'*E. coli*. Une culture d'*E. coli* (souche Y 1090) est relancée dans 800 ml de milieu LB liquide contenant 35 µg/ml d'ampicilline, pour une nuit à 37°C sous agitation. Le bouillon de culture très riche en bactéries est centrifugé à 3000 xg pendant 15 mn. Le culot bactérien est repris dans 30 ml de tampon PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M). Le mélange est congelé à -70°C, décongelé puis soniqué. Cette opération est répétée 3 fois dans le but de faire éclater les bactéries. A 50 µl d'anticorps, sont ajoutés 500 µl de bactéries éclatées et 500 µl de tampon PBS. Le mélange est agité 1 h à 4°C, puis centrifugé à 10 000 xg pendant 15 mn. Le surnageant contenant les anticorps présente une dilution au 20ème de ces derniers.

VII - 5 - 2 - Criblage de la banque

On réalise une grande série de tubes contenant 100 µl d'une dilution de phages dans le tampon SM, dilution qui permet d'obtenir de nombreuses plages de lyse bien isolées. Dans ces expériences, la dilution convenable est de 2×10^3 phages/ml. A chaque tube sont ajoutés 100 µl de bactéries rendues sensibles à l'infection. Après 20 mn de contact phages-bactéries, 3 ml de gélose "molle" sont ajoutés, et l'ensemble est agité puis rapidement coulé sur une boîte d'agar préalablement préparée. Les boîtes de Pétri sont

incubées à 42°C pendant 2 à 3 h, temps au cours duquel les plages de lyse commencent à apparaître. A ce moment les filtres de nitrocellulose (Cera labo, diamètre 85 mm) préalablement imprégnés d'une solution d'IPTG à 0,01 M et séchés sont déposés à la surface de la gélose "molle". Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 4 à 5 h. Après cette incubation, sur chaque filtre des repères sont réalisés afin de pouvoir repérer la plage de lyse correspondante à chaque clone lors de la révélation. Les filtres sont alors retirés et plongés dans une cuvette contenant un tampon de lavage (Tris/HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 8, Tween 20 0,05%) pendant 30 mn sous agitation. Une saturation des protéines non spécifiques sur les filtres est réalisée par incubation de 30 mn dans le tampon de saturation (Tris/HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 8, lait en poudre écrémé à 5%), avant d'incuber chaque filtre avec 5 ml d'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt (MPII) dilué au 20ème à 4°C sous agitation pendant une nuit. Après cette incubation, les filtres subissent 3 lavages de 10 mn, puis chaque filtre incube avec 5 ml d'anticorps secondaire (anticorps de mouton anti-IgG) marqué à la peroxydase dilué au 2 000 ème dans le tampon de saturation pour 1 h à température ambiante. 3 lavages de 10 mn sont alors réalisés avant l'étape de révélation, qui consiste à faire incuber chaque filtre avec 5 ml de la solution de révélation : 60 mg de 4 - chloro - 1- naphtol dissous dans 20 ml de méthanol froid, ajoutés à 100 ml de PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,01M, pH 7,2, NaCl 0,15 M) et 60 μl de H_2O_2 à 30 %.

La révélation dure environ 15 mn, elle se manifeste par l'apparition d'une coloration violette sur les traces de plages de lyse. Cette coloration permet de déduire que la protéine de fusion exprimée par les bactéries infectées par un phage recombiné et transférée sur le filtre est reconnue par l'anticorps. Grâce aux repères réalisés précédemment, il est possible de reconnaître sur les boîtes de Pétri, les plages de lyse intéressantes. A l'aide d'un petit bâtonnet stérile, une pique au sein de la plage de lyse est pratiquée, puis le batonnet est introduit dans un tube contenant 1ml de tampon SM. Une goutte de chloroforme est ajoutée dans chaque tube. Les tubes sont stockés à 4°C pour plusieurs semaines.

VIII - SYNTHÈSE DE LA PROTÉINE DE FUSION

La technique utilisée pour faire synthétiser une protéine de fusion par des bactéries infectées par les phages recombinés est pour l'essentiel celle décrite par Villarreal Ramos (1989). Cette technique a l'avantage de faire intervenir la souche bactérienne d'*E. coli* (Y 1090), souche que nous avons utilisée pour le clonage d'ADNc, souche lytique qui nous a donc permis d'éviter les aléas de l'induction de la lysogénie.

A 0,5 ml d'une culture bactérienne âgée d'une nuit, on ajoute 0,5 ml du mélange CaCl_2 0,001 M, MgSO_4 0,001 M, et 0,5 ml de phages recombinés préalablement amplifiés, soit 10^9 phages/ml. L'ensemble incube à 37°C pendant 15 mn sous agitation. Après cette période d'"attaque" des bactéries par les phages, 8,5 ml de milieu LB frais sont additionnés

VIII - 1 - Caractérisation de la protéine de fusion

VIII - 1 - 1 - Technique du "Dot-immunobinding"

La technique du "Dot-immunobinding" utilisée est celle décrite par Hawkes *et al.* (1982). Cette technique est similaire à celle du "Western-blot", mais au lieu de transférer les protéines du gel sur la membrane de nitrocellulose, les protéines sont déposées directement sur cette dernière.

La membrane de nitrocellulose quadrillée (carré de 3mm de côté) est lavée 5 mn dans l'eau bidistillée, puis séchée à température ambiante. 1 µl d'échantillon est déposé au centre du carré et rapidement séché à 37°C pour éviter la diffusion de la goutte déposée. Le témoin dit "colonie bleue" est préparé en parallèle.

Le blocage des sites non spécifiques, l'incubation en présence des anticorps et la révélation de la réaction immunologique sont identiques aux étapes correspondantes du "Western-blot", exception faite pour le tampon TBS qui est ici plus concentré (Tris/HCl 0,05 M, pH 7,4, NaCl 0,2 M).

VIII - 1 - 2 - Technique du "Western-blot"

a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS à 10 %

L'électrophorèse est pratiquée selon le protocole de Laemmli (1970), dans un gel de 0,75 mm d'épaisseur. La migration est réalisée dans une cuve verticale (type Bio Rad).

- Le gel de séparation : gel homogène de polyacrylamide à 10 %
 - Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8 5,7 ml

- | | |
|--------------------------------|---------|
| - Acrylamide à 30 % | 4,9 ml |
| - Bis-acrylamide à 0,8 % | 1 ml |
| - SDS à 10 % | 38 µl |
| - H ₂ O | 3 ml |
| - Persulfate d'ammonium à 10 % | 50 µl |
| - TEMED | 12,7 µl |
| - Le gel de concentration | |
| - Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8 | 1,25 ml |
| - Acrylamide à 30 % | 1,7 ml |
| - Bis-acrylamide à 0,8 % | 0,7 ml |
| - SDS à 10 % | 50 µl |
| - H ₂ O | 6,35 ml |
| - Persulfate d'ammonium à 10 % | 50 µl |
| - TEMED | 10 µl |

Les échantillons expérimentaux et le témoin dit "colonie bleue" sont portés à 100 °C pendant 5 mn avant leur dépôt dans les puits du gel de concentration. Un mélange de protéines (fourni par Bio-Rad) servant de marqueurs de masse moléculaire composé de la myosine (200 kDa), la β -galactosidase (116,250 kDa), la phosphorylase B (97,4 kDa), le sérum albumine bovine (66,2 kDa) et l'ovabulmine (42,699 kDa) est traité et déposé dans les mêmes conditions que les échantillons. La migration des protéines est réalisée à 10 mA pendant 5 à 6 heures à température ambiante, dans le tampon suivant : Tris/HCl 0,025 M, pH 8,3, glycine 0,19 M, SDS 0,1 %.

Après la migration, une partie du gel est colorée par le mélange ci-après :

- | | |
|---|--------|
| - Bleu de Coomassie | 0,1 % |
| - Isopropanol | 25 % |
| - Acide acétique | 10 % |
| - H ₂ O q.s.p. 1000 ml | 650 ml |
| - Incubation de 2 heures, puis décoloration dans l'acide acétique à 10 %. | |

Après décoloration et mise en évidence des bandes, le gel est séché entre une feuille de papier Whatman 3 et une feuille de plastique transparent.

b - Electrotransfert des protéines

L'électrotransfert des protéines de l'autre partie du gel sur une membrane de nitrocellulose est effectué selon la technique de Towbin *et al.* (1979). Les étapes de transfert, de la révélation à l' "amido-black" et de l'immunorévélation sont identiques à celles qui ont été décrites pour l'analyse des produits traduits à partir des ARNm isolés des coelomocytes.

VIII - 1 - 3 - Test biologique

Le test biologique est réalisé selon le principe de l'"antibiogramme". Il est effectué dans des boîtes de Pétri contenant du milieu LB additionné d'agar à 12‰. Après étalement des bactéries (*Micrococcus luteus*) en phase exponentielle de croissance, des disques d'environ 6 mm de diamètre imbibés par 20 µl de la solution à tester sont déposés sur le tapis bactérien, et l'ensemble est placé à 37°C pendant 18 h. Après ce temps d'incubation, l'éventuelle inhibition de la croissance bactérienne se manifeste par un anneau clair, plus ou moins large, dépourvu de colonies de bactéries qui n'ont pu croître au niveau de cette plage.

RESULTATS

RESULTATS

I - ANALYSE DES ARNm POLY (A)⁺

Toutes nos expériences sont fondées sur une bonne qualité des ARNm, c'est pourquoi ces derniers, après extraction à partir des cœlomocytes de *Nereis diversicolor* sont purifiés et sélectionnés par chromatographie d'affinité sur gel d'oligo-(dT)cellulose. L'enregistrement à 254 nm se caractérise, lors de l'élution des ARNm poly (A)⁺, par un pic bien profilé (fig.1).

La courbe d'absorbance établie à partir d'un aliquot de ces ARNm purifiés, en fonction de la variation de la longueur d'onde entre 230 et 280 nm, montre un maximum d'absorbance à 260 nm. Les rapports caractéristiques $260/240 = 1,6$ et $260/280 = 1,7$ indiquent une purification suffisante des molécules d'ARNm. La concentration d'ARNm poly (A)⁺, évaluée par spectrophotométrie, est de 15 µg/ml, ce qui est suffisant pour les expériences de traduction en milieu cellulaire ou acellulaire, ou pour l'élaboration d'une cDNA thèque.

II - TRADUCTION *IN VITRO* DES ARNm

II - 1 - Evaluation quantitative des produits traduits

L'évaluation quantitative des protéines synthétisées en lysat de réticulocytes de lapin est obtenue par la mesure du taux de méthionine ³⁵S incorporée dans les protéines nouvellement élaborées, ces mesures sont réalisées à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (détection de rayonnements β). Les décomptes de la radioactivité témoignent d'une importante incorporation de la méthionine ³⁵S dans les produits traduits à partir des ARNm poly (A)⁺. Ainsi, les mesures de radioactivité obtenues pour 1 µl de produit de traduction sont :

- Témoin eau (milieu de traduction dépourvu d'ARNm) 1162 ± 32 cpm
- Expérience (milieu contenant des ARNm) $8928,5 \pm 324,5$ cpm

Ces résultats indiquent une véritable traduction *in vitro* de protéines à partir des ARNm de cœlomocytes; ces molécules ont donc un grand pouvoir informatif, ce qui atteste de leur bon état de conservation.

II - 2 - Evaluation qualitative des produits traduits

L'analyse des produits traduits, séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide (5-25%) - SDS, montre la synthèse de protéines dont la masse moléculaire est comprise entre 10 et 94 kDa. Dans le but de détecter parmi les produits traduits la

Figure 1 : Profil chromatographique de la fraction d'ARNm poly (A)⁺ éluée d'une colone d'oligo-
(dT) cellulose. Les flèches indiquent la fraction récupérée.

Abs.
(254 nm)

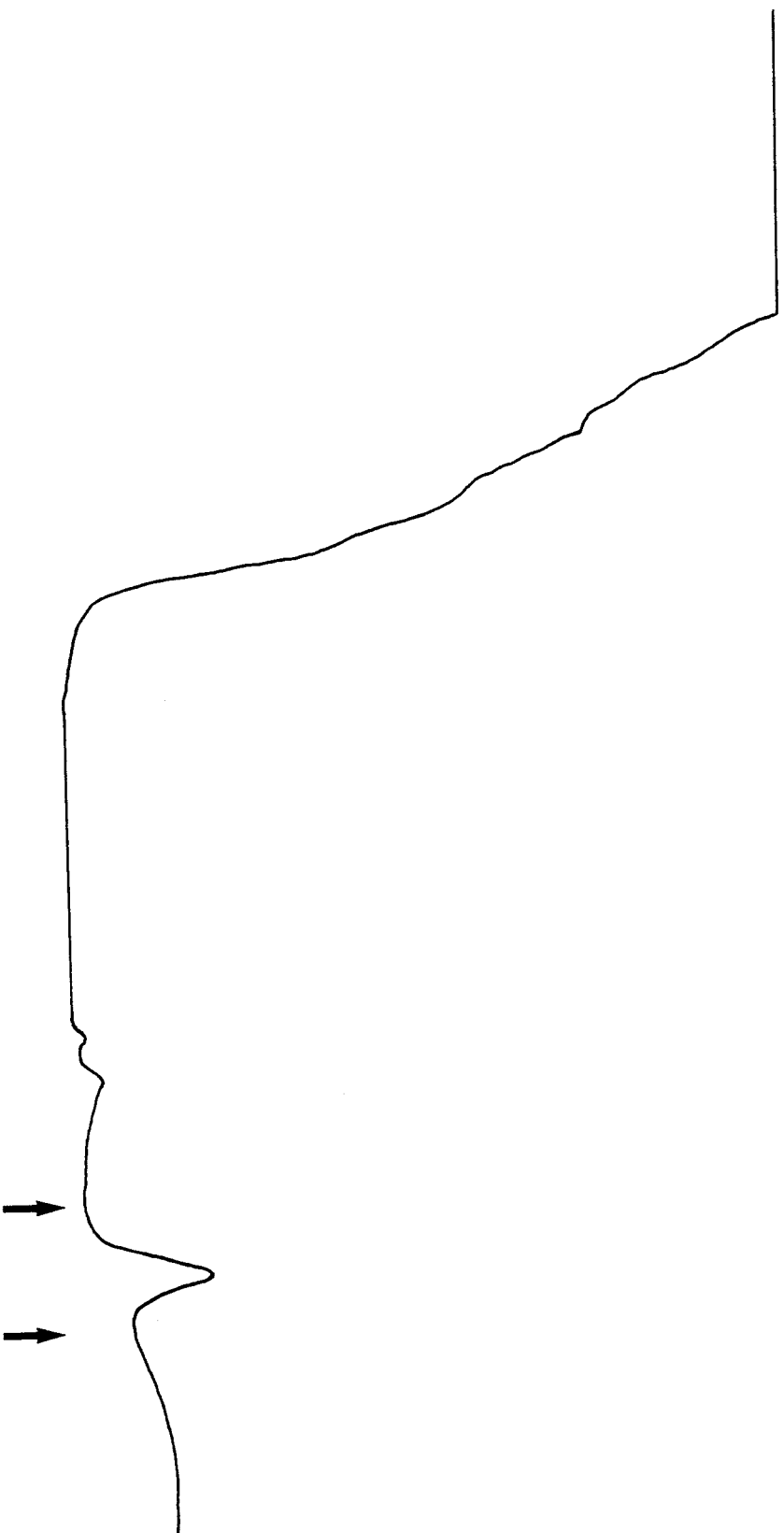


Figure 1.

présence éventuelle de la MP11, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose qui est confrontée à l'un des 2 lots d'anticorps monoclonaux (anti-MP11 4 et anti-MP11 11). Les pistes B et C (fig.2) montrent une reconnaissance immunologique d'un produit de masse moléculaire de 11-13 kDa. On note la co-migration de ce produit avec la MP11 purifiée (fig. 2 piste D) et avec un produit de l'homogénat de granulocytes, cellules où est synthétisée la MP11 (fig.2, piste E). De ce résultat il est permis de déduire que le produit traduit à partir des ARNm de cœlomocytes et reconnu par les 2 lots d'anticorps monoclonaux est effectivement la MP11.

Par ailleurs, les 2 lots d'anticorps monoclonaux révèlent deux polypeptides de masse moléculaire 26,5 et 28 kDa (fig.2, pistes B et C). Dans l'état actuel de nos connaissances il semble difficile d'attribuer à ces deux polypeptides un rôle de précurseur de la MP11. Les anticorps utilisés ne reconnaissent aucun polypeptide du témoin (fig. 2, piste A).

III - TRADUCTION *IN VIVO* DES ARNm

L'analyse des produits traduits dans les ovocytes de *Xenopus laevis* injectés par les ARNm poly (A)⁺ et dans les ovocytes témoin (ovocytes injectés d'eau bidistillée), ainsi que la recherche des polypeptides relargués par les ovocytes dans le milieu d'incubation des ovocytes est réalisée par le test ELISA. L'intensité de la réaction immunologique entre l'anticorps monoclonal anti MP11 11 (surnageant de culture) et les protéines extraites des ovocytes d'une part et les protéines sécrétées par ces ovocytes d'autre part, est évaluée par un lecteur de plaque ELISA. La comparaison des valeurs des densités optiques obtenues entre les ovocytes témoin et les ovocytes expérimentaux indique une forte réaction immunologique provoquée par les protéines de ces derniers (fig.3, D et E). Cette réaction est également provoquée, mais d'une manière moins intense, par les protéines présentes dans le milieu d'incubation des ovocytes injectés (fig.3, A et B). Le résultat C est le témoin positif correspondant à une réaction engendrée par la MP11 purifiée.

La quantification des protéines est réalisée selon Bradford (1976). La MP11 purifiée a servi pour la réalisation de la gamme étalon. Le tableau 1 rapporte les valeurs de la concentration protéique présente dans 100 µl déposés dans chaque puits de la plaque ELISA et les valeurs de la densité optique à 490 nm. Si on rapporte cette densité optique à 1 mg de protéine (DO/mg), il apparaît que la réaction immunitaire est deux fois plus importante dans les ovocytes injectés que dans les ovocytes témoin. Ceci confirme une synthèse de MP11 dans les ovocytes injectés. En revanche, il semble difficile d'obtenir des informations précises concernant la présence de la MP11 dans les milieux d'incubation des ovocytes expérimentaux, car une fuite artéfactuelle éventuelle des protéines par les ovocytes peut

Figure 2 : "Werstern-blot" des produits traduits *in vitro*, après séparation par électrophorèse en gradient de polyacrylamide 5-25% en présence de SDS. A : témoin eau. B : immunodétection par l'anticorps monoclonal anti-MPII 11 de la MPII synthétisée *in vivo*. C : immunodétection par l'anticorps monoclonal anti MPII 4 de la MPII synthétisée *in vitro*. D : réaction immunitaire entre la MPII purifiée et l'anticorps monoclonal anti-MPII 11. E : réaction immunitaire entre un produit de l'homogénat de granulocytes et l'anticorps monoclonal anti-MPII 11. Les masses moléculaires des protéines témoin sont indiquées sur le côté gauche de la figure.

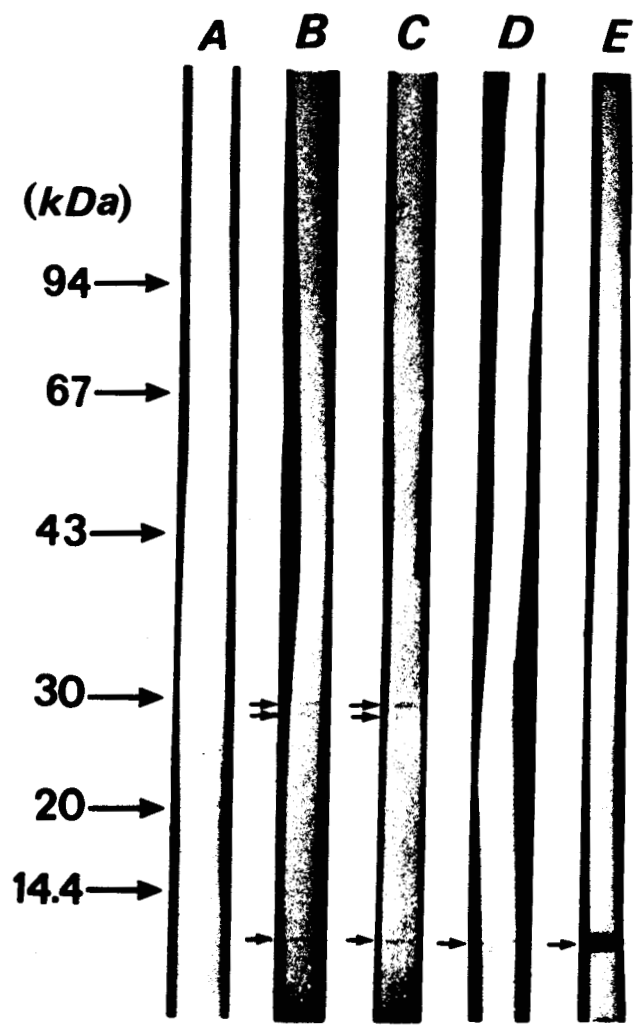


Figure 2.

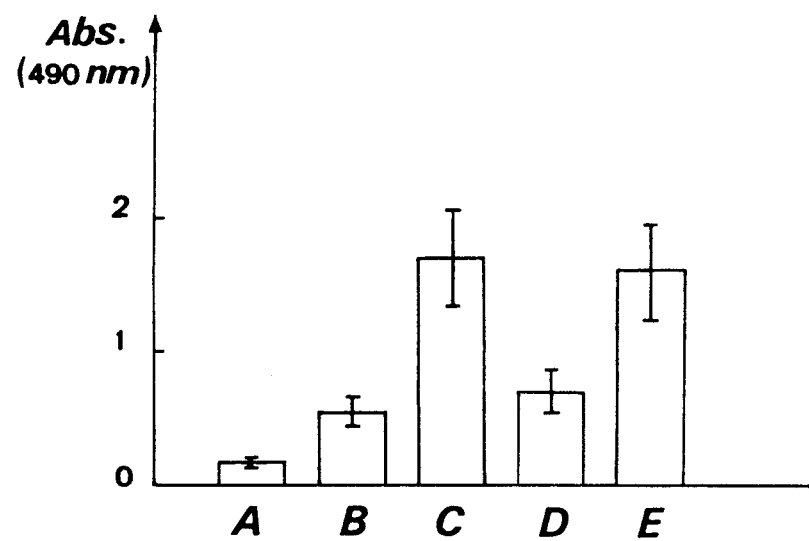


Figure 3.

Figure 3 : Histogramme de la moyenne (4 tests effectués) des absorbances à 490 nm des tests ELISA. A : protéines sécrétées par les ovocytes témoin. B : protéines sécrétées par les ovocytes injectés par les ARNm poly (A)⁺. C:MPH purifiée. D : protéines extraites des ovocytes témoin. E : protéines extraites des ovocytes injectés par les ARNm poly (A)⁺.

induire des erreurs dans l'évaluation quantitative des protéines effectivement exportées par un mécanisme physiologique normal.

	mg de protéines dans 100 µl	Test ELISA DO à 490 nm	DO (490 nm) mg de protéines dans 100 µl
MP II	0,0183	1, 7	92, 89
Ovocytes injectés par les ARNm poly (A) ⁺	0,1504	1, 6	10, 63
Ovocytes témoin	0,1258	0, 7	5, 56

Tableau 1 : Evaluation quantitative des résultats obtenus par les tests ELISA

IV - CLONAGE DE L'ADNc SPECIFIANT LA MP II

IV - 1 - Quantité d'ADNc synthétisé

La détermination de la quantité d'ADNc double brin synthétisé est effectuée à deux reprises au cours de la construction de la banque d'expression. La première détermination est réalisée avant l'étape de méthylation des sites *EcoRI* de l'ADNc double brin. Un aliquot d'ADNc, analysé à 260 nm en spectrophotométrie, indique une quantité d'ADNc double brin de 2 µg environ.

La deuxième détermination est effectuée après la purification de l'ADNc par chromatographie et avant l'insertion de ce dernier dans le vecteur phagique λgt 11. L'absorbance à 260 nm indique qu'il ne reste que 0,13 µg. Cette diminution d'ADNc est certainement due à des pertes de matériel survenues au cours des différents traitements de l'échantillon entre l'étape de la méthylation et celle de l'insertion de l'ADNc.

IV - 2 - Titre de la banque

Le système d'empaquetage utilisé est le système "Gigapack Gold" (voir Matériel et Méthodes). Le titre de la banque correspond à l'efficacité du système à produire des phages dont l'ADN a été recombiné *in vitro*. C'est pourquoi un ADN du phage λ sauvage a servi de témoin pour ce système d'empaquetage.

Le titre obtenu est de 10^6 phages/ml dont 67% sont recombinés (67% de plages de lyse blanches, après l'induction par l'IPTG et l'emploi de X-gal comme substrat). Ce résultat est satisfaisant par comparaison avec le titre de la banque témoin estimé à 10^9 phages/ml.

Une amplification de la banque originelle a porté le titre à 10^8 phages/ml et la proportion des phages recombinés à 72%. Ce dernier pourcentage n'est probablement pas significativement différent de celui des phages recombinés dans la banque originelle.

IV - 3 - Criblage et sélection des clones recombinés

La sélection dans la banque d'ADNc des clones recombinés synthétisant la MP II est faite à l'aide des anticorps poly - ou monoclonaux spécifiques de cette protéine. Avant leur utilisation pour ce repérage, les anticorps ont été épuisés contre un lysat d'*E. coli*, afin d'éviter d'éventuelles réactions immunitaires avec les protéines bactériennes libérées au niveau des plages de lyse. Le premier criblage effectué à l'aide de l'anticorps polyclonal a concerné environ 30 000 clones de la banque originelle et a permis de repérer 29 clones positifs. A partir de ces derniers et après 2 criblages successifs avec le même anticorps, 12 clones positifs ont été conservés (fig. 4). Un premier criblage avec les anticorps monoclonaux anti-MPII (mélange anti MPII 4 et anti-MPII 11) a permis de sélectionner 4 clones nommés B, C, D et E. A partir de ces derniers, nous avons confirmé par deux fois que les clones manifestent une immunoréaction positive en utilisant le mélange d'anticorps monoclonaux. 8 des 12 clones positifs précédemment sélectionnés par l'anticorps polyclonal ont subi deux purifications supplémentaires à l'aide de l'anticorps polyclonal, puis 3 criblages à l'aide des anticorps monoclonaux. A la fin de des différentes étapes, nous n'avons poursuivi notre étude que sur 2 clones nommés F et G (fig.5).

IV - 4 - Caractérisation de la protéine de fusion

IV - 4 - 1 - Technique dite de "Dot-immunobinding"

Cette technique a l'avantage de ne nécessiter que de faibles quantités d'antigènes et de ne pas engendrer de "bruit de fond". Des dépôts de culot de bactéries transformées par des phages recombinés (clones B, C, D, E, F et G) ou non recombinés (bactéries témoin nommées "colonies bleues", clone H) ont été pratiqués sur des feuilles de nitrocellulose quadrillées. L'utilisation des anticorps polyclonaux, comme celle des anticorps monoclonaux (mélange anti-MPII 4 et anti-MPII 11) donne des immunoréactions positives, cependant avec des intensités variables selon les clones (fig. 6, A). Il faut noter une immunoréaction systématiquement peu intense après utilisation des anticorps monoclonaux (fig. 6, B).

Figure 4 : Clones recombinés sélectionnés par l'anticorps polyclonal anti-MPII 3ème criblage.

Figure 5 : Clones recombinés sélectionnés par le mélange des anticorps monoclonaux anti-MPII 4 et anti-MPII 3ème criblage.

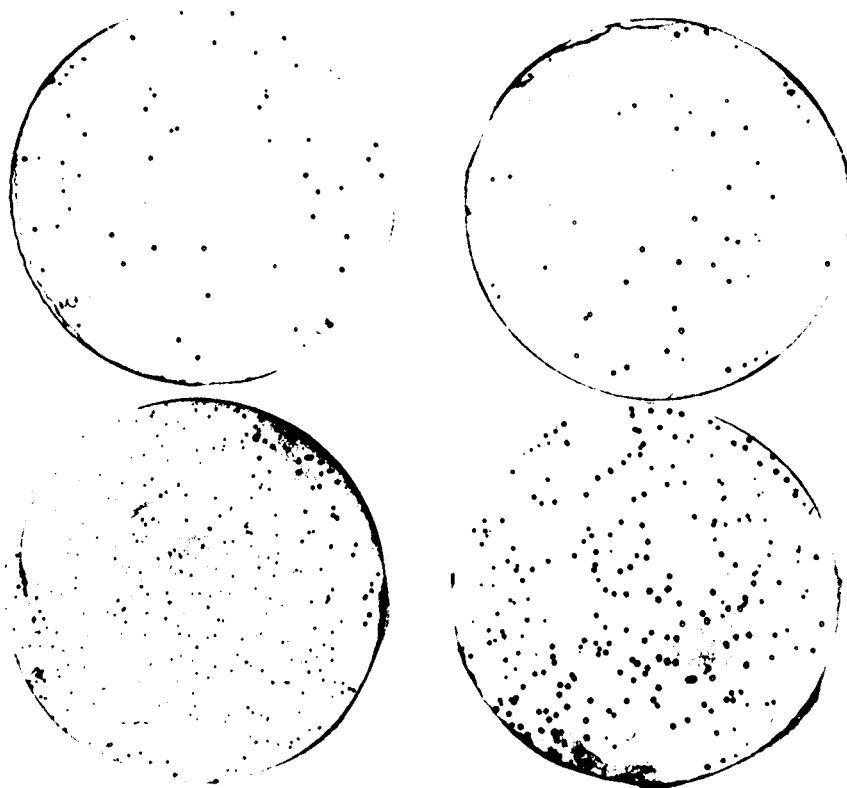


Figure 4.

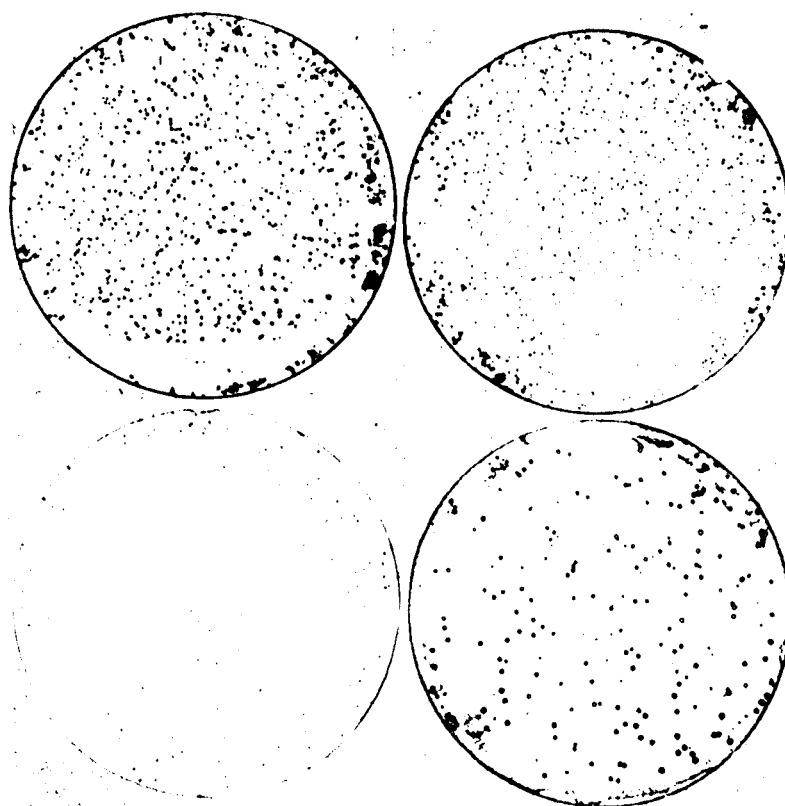


Figure 5.

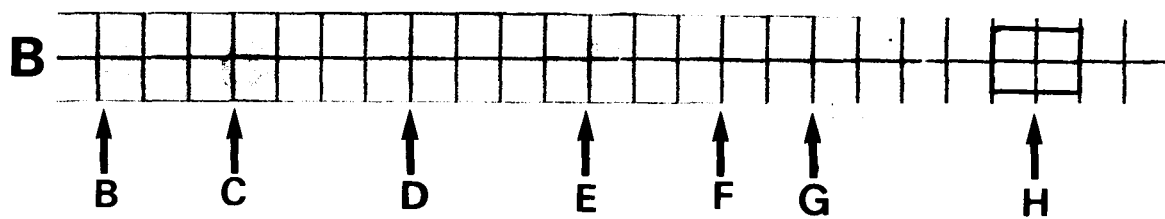
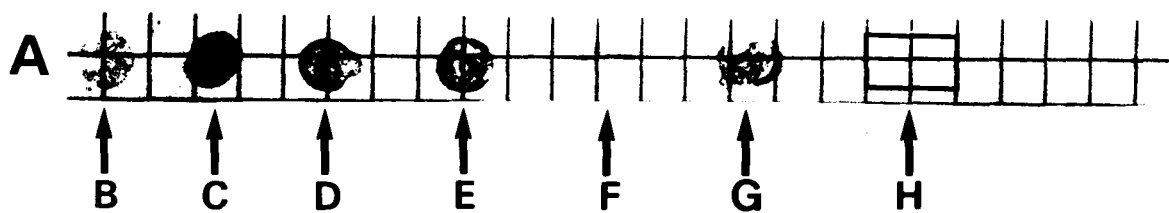


Figure 6.

Figure 6 : Immunorévélation des protéines de fusion par la technique dites du "Dot-immunobinding". A : après incubation avec l'anticorps polyclonal anti-MPII. B : après incubation avec le mélange des anticorps monoclonaux anti-MPII 4 et anti-MPII 11. B à G : protéines extraites des bactéries infectées par des phages recombinés. H : protéines extraites des bactéries infectées par des phages non recombinés, témoin "colonie bleue".

IV - 4 - 2 - Technique dite du "Western-blot"

La recherche de la protéine de fusion synthétisée par la bactérie hôte de λ gt11 lac Z (*E. coli*, Y1090) a été entreprise dans le culot bactérien, par analyse des bandes obtenues après électrophorèse et coloration du gel au bleu de Coomassie. Notre attention s'est concentrée au niveau des protéines migrant dans la zone correspondant à la migration des éventuelles protéines de masse moléculaire comprise entre 116 et 130 kDa (somme des masses moléculaires de la β -galactosidase et de la MP11). Effectivement, 2 bandes de protéines de 128 et 129 kDa sont bien visibles au niveau de deux pistes concernant des bactéries infectées par deux phages recombinés (fig. 7, pistes B et F). Mais la présence constante de ces mêmes bandes, bien que systématiquement moins visibles, au niveau du témoin dit "colonie bleue" (fig.7, piste H) nous induit à proposer que ces protéines de 128 et 129 kDa ne sont pas les protéines de fusion recherchées. La présence de ces bandes a été confirmée après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et révélation à l' "amido-black" (fig. 8). Ainsi, il nous a donc semblé nécessaire de rechercher la protéine de fusion par immunodétection en mettant en œuvre les anticorps anti-MP11 après transfert. L'anticorps polyclonal a révélé pour les 6 clones de phages sélectionnés une bande située à 24 kDa, et pour 5 d'entre eux une bande à 34 kDa (fig. 9, pistes B, C, D, E, F et G). Aucune des protéines de 24 ou 34 kDa n'est immunoréactive à l'anticorps au niveau du témoin (fig. 9, piste H). Les bandes présentes au niveau du témoin et au niveau des 6 clones de phages recombinés ne sont pas prises en compte. De l'ensemble de ces résultats, il semble permis de déduire que la protéine de fusion a certainement été synthétisée, mais doit être considérée par la bactérie comme néfaste. Cette dernière l'a probablement dégradée en au moins 2 polypeptides de 24 et 34 kDa. Une recherche parallèle a été menée sur les protéines solubles lyophilisées; mais aucune immunoréaction n'a été mise en évidence.

VI - 4 - 3 - Test biologique

Les disques déposés sur le tapis bactérien sont imbibés, soit par un extrait de culot de bactéries infectées par des phages recombinés d'un clone sélectionné, soit par un extrait de culot de bactéries infectées par des phages non recombinés (expérience témoin). L'apparition d'une zone d'inhibition (anneau clair dépourvu de colonies) de la croissance bactérienne autour des disques imbibés par les échantillons expérimentaux, et l'absence de cette zone d'inhibition autour du disque imbibé par le témoin (fig.10) démontrent que la protéine de fusion, même segmentée en quelques fragments, manifeste un rôle inhibiteur de la croissance bactérienne.

Figure 7 : Recherche de la synthèse des protéines de fusion après séparation des polypeptides par électrophorèse en gel homogène de polyacrylamide (10%)-SDS, et coloration au bleu de Coomassie. A : protéines témoin. B à G : protéines extraites des bactéries infectées par des phages recombinés. H : protéines extraites des bactéries infectées par des phages non recombinés, témoin "colonie bleue".

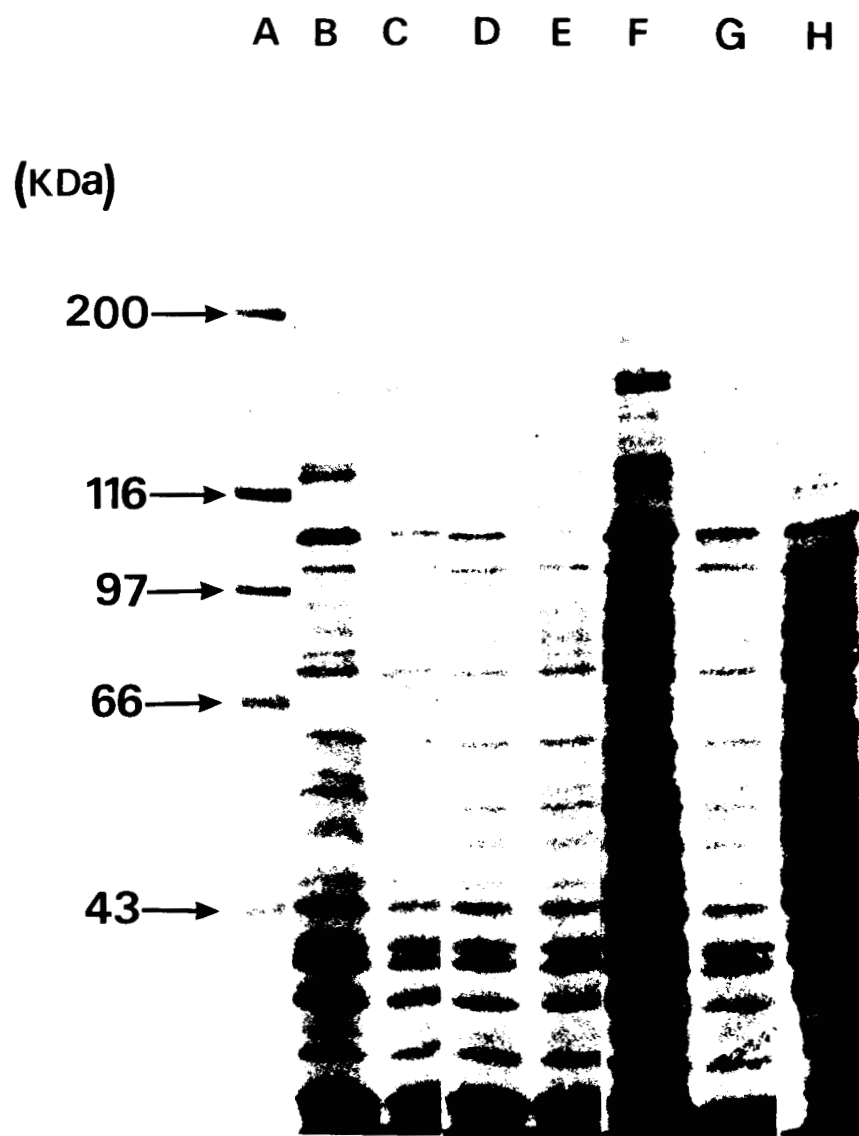


Figure 7.

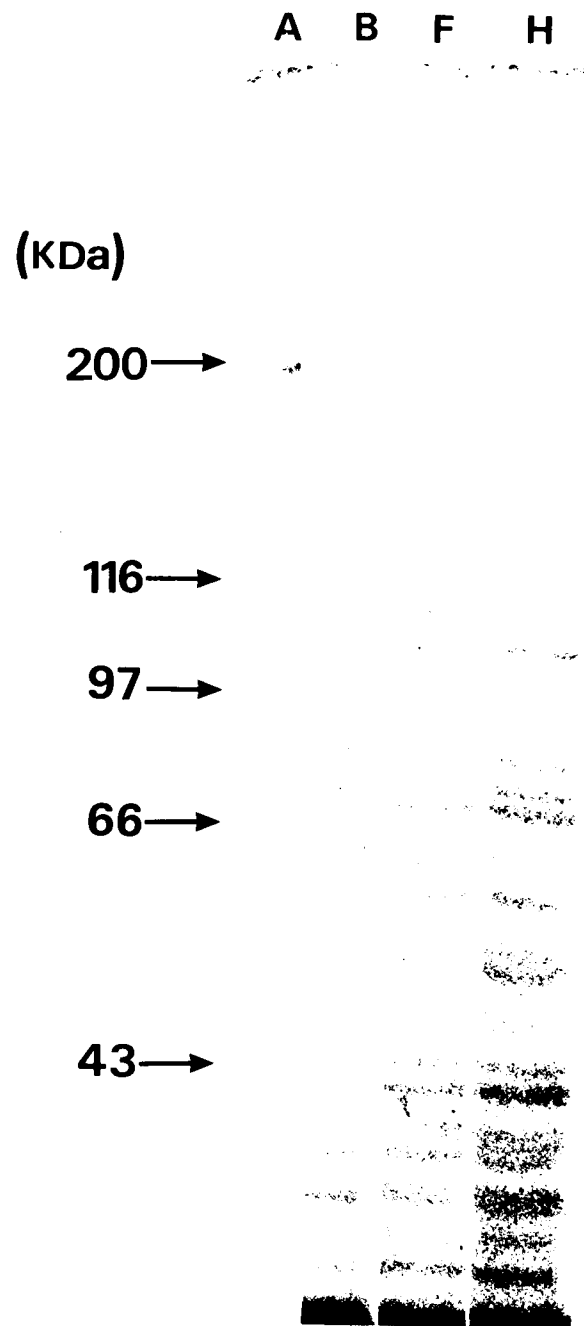


Figure 8.

Figure 8 : Recherche des protéines de fusion par révélation à l'"amido-black" après séparation des polypeptides par électrophorèse et transfert sur nitrocellulose. A : protéines témoin. B et F : protéines extraites des bactéries infectées par des phages recombinés. H : protéines extraites des bactéries infectées par des phages non recombinés, témoin "colonie bleue".

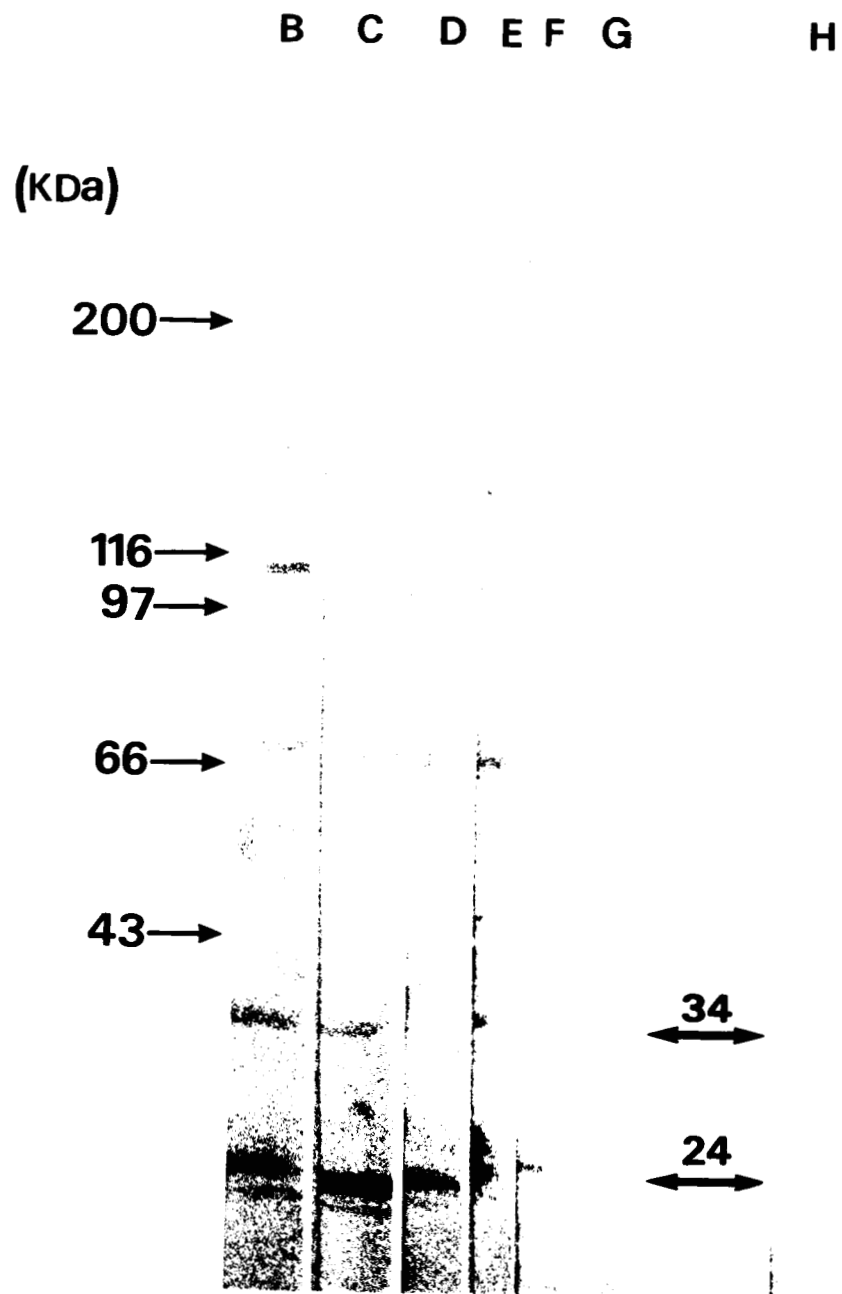


Figure 9.

Figure 9 : Electrotransfert des polypeptides et immunodétection des protéines de fusion par l'anticorps anti-MPII. B à G : protéines extraites des bactéries infectées par des phages recombinés. H : protéines extraites des bactéries infectées par des phages non recombinés, témoin "colonie bleue". Les flèches indiquent la position des polypeptides immunoréactifs.

Nous proposons que ces derniers soient des produits de dégradation des protéines de fusion probablement reconnues comme nocives par la bactérie hôte.

Les masses moléculaires des protéines témoin sont indiquées sur le côté gauche de la figure.

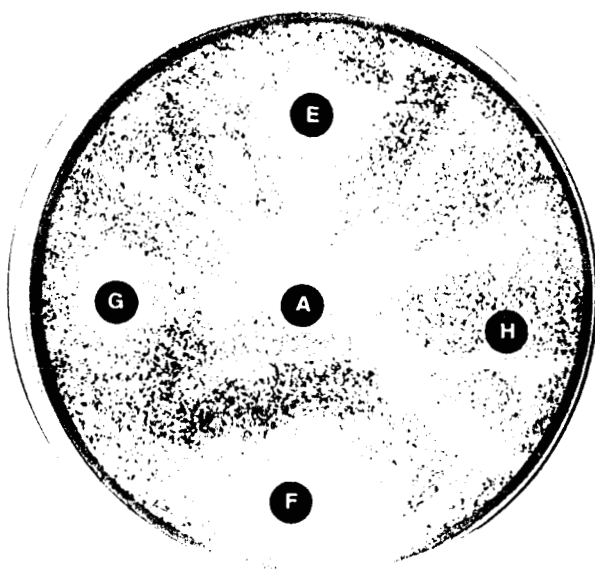
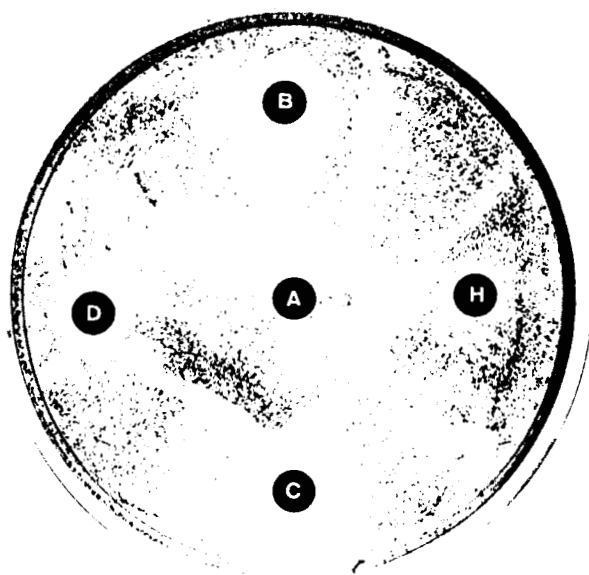


Figure 10.

Figure 10 : Test Biologique : Effet des protéines de fusion sur la croissance de *Micrococcus luteus*.
B, C, D, E, F et G : extraits de culot de bactéries infectées par des phages recombinés. H
: extrait de culot de bactéries infectées par des phages non recombinés (clone témoin).
A:disque (témoin) imbibé par de l'eau bidistillée.

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'Annélide Polychète *Nereis diversicolor*, espèce euryhaline, constitue un bon modèle biologique pour l'étude des mécanismes de défense contre certains polluants, par le fait qu'elle supporte un taux élevé de pollution de la vase des estuaires. A la suite des travaux de mise en évidence, de caractérisation et de purification d'une métalloprotéine chez cette espèce, travaux effectués par des chercheurs de notre laboratoire, il nous a semblé opportun de contribuer à l'étude de cette molécule par une approche moléculaire. Après la présentation de nos résultats, nous nous proposons, maintenant, de discuter ces derniers et de conclure.

L'extraction des ARNm par l'action de l'isothiocyanate de guanidium permet d'éviter les aléas des extractions phénoliques, et par conséquent autorise l'obtention d'ARNm caractérisés par leur grand pouvoir informatif lors des traductions en milieu acellulaire (Actis *et al.*, 1983). La technique usuelle du passage des ARN sur colonne d'oligo-(dT) cellulose nous a permis de sélectionner les ARNm poly (A)⁺ dont la qualité s'est révélée suffisante pour mener à bien la suite de nos expériences.

La quantification des produits nouvellement traduits dans un système acellulaire (lysate de réticulocytes de lapin) est effectuée par la mesure du taux de méthionine ³⁵S incorporée dans des macro-molécules acido-précipitables. Ces résultats indiquent que les ARNm poly (A)⁺ extraits de coelomocytes ont conservé un grand pouvoir informatif.

La disponibilité d'anticorps monoclonaux anti-MPII élaborés par plusieurs clones d'hybridomes (Porchet-Henneré *et al.*, 1987), nous a incité à détecter l'éventuelle synthèse de la MPII parmi les produits traduits *in vitro*. L'immunorévélation, au niveau des polypeptides séparés par électrophorèse et transférés sur membrane de nitrocellulose, indique la présence, parmi les ARNm poly (A)⁺ de messagers spécifiques de la MPII. Les antigènes MPII synthétisés *in vitro*, les molécules de MPII isolées et purifiées à partir des coelomocytes et un produit d'un homogénat de granulocytes co-migrent dans un gel de polyacrylamide. Ces résultats attestent que les ARNm spécifiques de la MPII sont abondamment transcrits au sein des noyaux de coelomocytes (Benouareth *et al.*, 1989).

Notre démonstration concernant les coelomocytes, lieu de synthèse des ARNm spécifiques de la MPII, a été confortée par les résultats du test ELISA. Cette technique a montré sans ambiguïté la présence d'épitopes caractéristiques de la MPII dans les ovocytes de *X. laevis* injectés par les ARNm poly (A)⁺. Ces épitopes ont été également détectés dans le milieu d'incubation des ovocytes injectés par les ARNm poly (A)⁺. La quantité de ces épitopes, bien que faible, suggère que les ovocytes sont capables d'exporter la MPII, propriété qui rappelle celle manifestée par les cellules à l'origine des ARNm spécifiques de la MPII. Cependant, une fuite artéfactuelle éventuelle des protéines par les ovocytes peut nous

induire en erreur. Il faut donc rester très prudent quant à la conclusion d'une véritable exportation de la MP II par les ovocytes ayant reçu une injection d'ARNm isolés des cœlomocytes.

L'ensemble de nos résultats sont en accord avec ceux de Dhainaut-Courtois *et al.* (1987) qui ont localisé, à l'aide d'anticorps polyclonaux, la MP II au sein des granulocytes de type I, type qui se différencie de deux autres types, et dont la structure et les propriétés ont été décrites antérieurement par Baskin (1974) et Dhainaut (1984). Ces résultats sont aussi à rapprocher de ceux de Nejmeddine (1987) et M'Béri (1988) qui rapportent, à la suite d'étude électrophorétique, que la MP II est exportée des granulocytes vers le liquide cœlomique sous forme de produits dits "de dégranulation". Ces derniers se sont révélés positifs après confrontation avec les anticorps monoclonaux anti-MP II (Porchet-Henneré *et al.*, 1987).

Il existe peu d'exemples de localisation du site de synthèse de protéines complexant le cadmium chez des Invertébrés. On peut citer le cas de l'Huître *Crassostrea gigas*, chez qui Martoja et Martin (1985) ont pu, par réduction du ferricyanure ferrique, détecter dans les amœbocytes à zinc et à cuivre une protéine sulfhydrylée complexant le cadmium.

La totalité de nos résultats a été obtenue en absence de toute induction ou stimulation de la synthèse de la MP II, en imaginant que ces initiations soient possibles. Ceci implique donc que cette métalloprotéine soit synthétisée sur un mode constitutif dans les granulocytes. Nejmeddine (1987) avait montré que la MP II n'est ni synthétisée, ni libérée spécifiquement en réponse à l'action du cadmium. D'ailleurs, Dhainaut-Courtois *et al.* (1987) ont aussi localisé par immunocytochimie la MP II dans les cœlomocytes de *N. diversicolor* non intoxiquée. Ces données fondamentales suggèrent que cette molécule pourrait intervenir également dans des processus de défense de l'organisme contre d'autres stimuli pouvant intervenir dans la synthèse de la MP II, qui se manifesterait donc comme une molécule de défense contre des agressions variées (différents métaux lourds, infections bactériennes, par exemple). Cependant, il nous semble important de rappeler que les vers sont collectés dans un estuaire généralement fortement pollué par les métaux lourds tel que le cadmium, et que la notion d' "animal témoin" non confronté à une intoxication est difficile à établir, voire impossible.

Les résultats de traduction *in vitro* et *in vivo*, qui ont permis la caractérisation de la MP II traduite à partir des ARNm poly (A)⁺ de cœlomocytes, a montré que ces ARNm sont bien conservés et doivent permettre l'élaboration d'une banque d'expression.

Au cours de notre travail, des sondes oligonucléotidiques spécifiques de la MP II n'ont pas été disponibles, mais en revanche des anticorps poly-ou monoclonaux anti MP II ont été élaborés par des chercheurs de notre laboratoire. Cette situation favorable nous a incité à

élaborer une banque d'expression en clonant l'ADNc synthétisé dans le vecteur λ gt11. Les quantités d'ADNc double brin déterminées au cours de l'élaboration de la banque, soit avant l'étape de méthylation des sites *EcoRI* de l'ADNc, soit après la purification de l'ADNc par chromatographie, étaient suffisantes pour nous permettre de poursuivre la construction de cette banque. Les différents anticorps anti-MPII ont permis le criblage de cette dernière et la sélection des clones recombinés, susceptibles de synthétiser la protéine de fusion comprenant des épitopes spécifiques de la MPII. Le titre de banque et le pourcentage des phages recombinés furent satisfaisants. L'utilisation, dans un premier temps des anticorps polyclonaux anti-MPII lors du criblage de la banque, a pour but de faire une première sélection. La disponibilité d'anticorps monoclonaux anti-MPII, nous a permis de poursuivre le criblage et de confirmer le caractère "positif" des plages de lyse, par la présence des antigènes spécifiques de la MPII. C'est ainsi qu'après trois criblages successifs à l'aide des anticorps monoclonaux anti-MPII, 6 clones positifs ont été sélectionnés. Ces derniers, repiqués et amplifiés, ont servi à produire une protéine de fusion par des bactéries hôtes.

La technique d'obtention d'une protéine de fusion, décrite par Villarreal Ramos (1989) présente l'avantage de conserver la souche bactérienne, *E. coli* (Y1090), utilisée lors du titrage et du criblage de la banque, et évite l'emploi d'une souche bactérienne lysogène, de manipulation un peu plus délicate. La recherche de l'éventuelle présence de protéines de fusion a été entreprise d'abord dans les culots, obtenus après centrifugation des lysats bactériens, car dans la majorité des cas, les protéines de fusion sont immobilisées sous une forme insolubles au sein d'inclusions (Harris, 1983; Marston, 1986).

Une première technique, mise en œuvre pour la détection de la protéine de fusion, fut le test nommé "Dot-immunobinding". L'utilisation d'anticorps poly- ou monoclonaux a permis de détecter une protéine de fusion comprenant tout ou partie de la MPII synthétisée par tous les clones sélectionnés. Il faut cependant noter que la réponse après l'utilisation des anticorps monoclonaux fut plus faible que celle obtenue avec l'anticorps polyclonal.

En "Western-blot", notre attention s'est focalisée au niveau d'une zone de migration des protéines de masse moléculaire comprise entre 116 et 130 kDa, somme des masses moléculaires de la β -galactosidase et tout ou partie de la MPII. En fait, aucune différence patente n'est apparue au niveau des protéines extraites des bactéries, infectées par des phages recombinés ou par des phages non recombinés, protéines migrant dans cette zone digne d'intérêt. La seule constante, que nous avons détectée, est une faible représentation de ce groupe de protéines compris entre 125 et 130 kDa chez les témoins dits "colonie bleue". Après immunotransfert, nous avons noté l'absence systématique de reconnaissance de protéines supérieures à 116 kDa par les anticorps. Cela nous a conduit à évoquer la possibilité d'une dégradation de la protéine de fusion. Or, la reconnaissance par

les sondes immunologiques, d'une part de bandes situées à 24 kDa pour les 6 clones de phages recombinés, et d'autre part, pour 5 d'entre eux d'une bande à 34 kDa, conforte notre interprétation de la dégradation de protéines de fusion de masse moléculaire comprise entre 116 et 130 kDa. Nous ne pouvons expliquer l'absence apparente de la bande à 34 kDa pour l'un des clones (clone D).

Une recherche identique à la précédente a été menée sur les surnageants de lysat bactérien. Après lyophilisation, aucune protéine de fusion n'a été mise en évidence. Cela suggère que les protéines de fusion synthétisées dans les bactéries infectées par des phages recombinés, sont immobilisées ou séquestrées dans des inclusions ou sous une forme insoluble.

La dégradation de la protéine de fusion que nous avons constatée rappelle ce qui a été décrit par d'autres auteurs. En effet, il a été constaté que la production de certains produits eucaryotiques et l'accumulation de ces derniers sont souvent limitées chez *E. coli*. Ces défauts sont dus à l'instabilité de ces produits dans les bactéries hôtes (Itakura *et al.*, 1977; Tanigushi *et al.*, 1980; Davis *et al.*, 1983), produits reconnus comme étrangers, anormaux ou même toxiques, et par conséquent dégradés (Goldschmidt, 1970; Lin et Zabin, 1972; Jacobs *et al.*, 1989). Ceci est particulièrement fréquent pour de petits polypeptides (Wetzel et Goeddel, 1983), ce qui est une caractéristique de la MP11. Cette propriété de certaines protéines de fusion a amené d'autres auteurs à évaluer la demi-vie de ces macromolécules. Par exemple, Talmadge et Gilbert (1982) l'ont évaluée à 2 mn pour la proinsuline humaine synthétisée chez *E. coli*, Berka *et al.* (1988) à 15 mn pour la métallothionéine de levure. Par ailleurs, Romeyer *et al.* (1988) ont estimé à 50 mn la demi-vie de la métallothionéine humaine. Il apparaît donc que nos résultats et notre interprétation concernant les protéines de fusion immunoréactives aux anticorps anti-MP11 sont en accord avec un ensemble de travaux relatant une instabilité de certaines protéines de fusion.

Il a été démontré par Dhainaut *et al.* (1989) que l'activité antibactérienne du liquide coelomique de *N. diversicolor* est due à des protéines de masse moléculaire d'environ 10kDa. De façon plus convaincante, ces auteurs ont montré, en "Western-blot", que la protéine antibactérienne et la MP11 ont le même comportement électrophorétique, et sont reconnues par les mêmes anticorps poly- et monoclonaux anti-MP11, ce qui laisse suggérer qu'il s'agit de la même molécule.

Afin de nous assurer de la sélection des clones d'intérêt, nous avons été conduit à vérifier l'action biologique des protéines de fusion. L'inhibition de la croissance de bactéries par les protéines de fusion de tous les clones sélectionnés de la banque d'ADNc conforte notre criblage mené en utilisant les différents anticorps poly- et monoclonaux, et démontre le pouvoir biologique antibactérien des protéines de fusion.

Des essais de stimulation de synthèse de protéines de fusion après l'addition de cadmium $\{Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O\}$ dans le milieu d'incubation ont été réalisés dans l'espoir d'initier une synthèse accrue de ce type de macromolécules. Ces essais se sont révélés infructueux, que l'immunodétection soit menée en utilisant des anticorps poly-ou monoclonaux en "Dot-immunobinding" ou en "Western-blot".

Dans ce travail, nous avons donc contribué, par une approche moléculaire, à la connaissance de la métalloprotéine (MPII) de l'Annélide Polychète *Nereis diversicolor*. Dans un premier temps, nous avons montré, par des traductions *in vitro* et *in vivo*, que les coelomocytes sont un site de synthèse des ARNm spécifiques de la MPII (Benouareth *et al.*, 1989). Puis l'isolement et la purification des ARNm, la disponibilité d'anticorps poly-ou monoclonaux anti MPII, nous ont conduit à élaborer une cDNAthèque d'expression. Le titre de la banque et le pourcentage de clones recombinés ont permis de poursuivre par le criblage et la sélection des clones recombinés d'intérêt. Les anticorps monoclonaux anti MPII, sondes de choix, très spécifiques, ont été utilisés dans le but de confirmer le caractère positif des clones présélectionnés à l'aide des anticorps polyclonaux anti-MPII. L'expression des protéines de fusion par des bactéries hôtes de bactériophages recombinés et les difficultés de détection de ces protéines nous ont conduit à évoquer une dégradation de ces macromolécules. Ce phénomène ne semble pas exceptionnel et a déjà été relaté par plusieurs auteurs.

Nous avons conscience de n'avoir franchi que les premières étapes d'une stratégie devant conduire à la connaissance du ou des gènes spécifiant la MPII, mais ces étapes n'en restent pas moins fondamentales dans l'étude de cette protéine jouant certainement un ou des rôles majeurs dans les conditions défavorables dues à la présence de métaux lourds dans les eaux saumâtres des pays industrialisés.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ACTIS L. A., FLURY A. and PATRITO L. C. (1983) - Translation in a cell-free system of mRNA from term placenta extrated by guanidine hydrochloride. *Molec. Biol. Rep.*, **9**, 203-208.
- AMACHER D. E. (1975) - In Haguenoer J. M. et Furon D; (1981). Toxicologie et hygiène industrielles. *Tome 1. Les dérivés minéraux*. Ed. *Technique et Documentation, Paris*.
- ANDERSEN R. A. and WESER U. (1978) - Partial purification, characterization and translation *in vitro* of rat liver metallothionein messenger ribonucleic acid. *Biochem. J.*, **175**, 841-852.
- ANDERSEN R. A., WIGER R., DAAE H. L. and ERICKSEN K. D. H. (1988) - Is the metal binding protein metallothionein present in the Cœlenterate *Hydra attenuata* ? *Comp. Biochem. Physiol.*, **91C**, 553-557.
- ANGEL P., PÖTING A., MOLLIK U., ROHNSDORF H. J., SCHORPP M. and HERRLICH P. (1986) - Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1760-1766.
- AVIV H. and LEDER P. (1972) - Purification of biological active globin messenger RNA by chromatography of oligothymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1408-1417.
- BALLAN-DUFRANCAIS C., JEANTET A. Y. et HALPERN S. (1982) - Localisation intracellulaire par microanalyse X de métaux et de métalloïdes dans la glande digestive d'un Mollusque bivalve (*Pecten maximus*). Implication des processus de digestion. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **294**, 673-678.
- BASKIN D. G. (1974) - The cœlomocytes of Nereid Polychaetes. *Contemp. Topics Immunobiol.*, **4**, 55-64.

- BENOUARETH D. E., DHAINAUT-COURTOIS N., PORCHET-HENNERE E. and CURGY J. J. (1989) - Translation in a cell-free system, and in *Xenopus laevis* oocytes, of mRNA which specify a cadmium-binding protein in *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta). *Biol. Cell*, **67**, 167-171.
- BERKA T., SHATZMAN A., ZIMMERMAN J., STRICKLER J. and ROSENBERG M. (1988) - Efficient expression of the yeast metallothionein gene in *Escherichia coli*. *J. of Bact.*, **170**, 21-26.
- BLACKSTOCK J., JOHANNESSEN P. J. and PEARSON T. H. (1986) - Use of a sensitive indicator species in the assessment of biological effects of sewage disposal in fjords near Bergen, Norway. *Mar. Biol.*, **93**, 315-322.
- BOILLY B. et RICHARD A. (1978) - Accumulation du fer chez une Annélide Polychète *Magelona papillicornis* O.F. Müller. *C.R.Acad. Sci. Paris*. **286**, 1005-1008.
- BONHAM K. and GEDAMU L. (1984) - Induction of metallothionein and metallothionein mRNA in rainbow-trout liver following cadmium treatment. *Bioscience Reports*, **4**, 633-642
- BONHAM K., ZAFARULLAH M. and GEDAMU L. (1987) - The rainbow trout metallothioneins : molecular cloning and characterization of two distinct cDNA sequences. *DNA*, **6**, 519-528.
- BOUQUEGNEAU J.-M., BALLAN-DUFRANCAIS C. and JEANTET A. Y. (1985) - Storage of Hg in the ileum of *Blatella germanica* : biochemical characterization of metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **80C**, 95-98.
- BOUQUEGNEAU J.-M., CERDAY Ch. and DISTECHE A. (1975) - Fish mercury binding thionein related to adaptation mechanisms. *FEBS Let.*, **55**, 173-177.
- BOUQUEGNEAU J.-M., MARTOJA M. et TRUCHET M. (1983) - Localisation biochimique du cadmium chez *Murex trunculus* L. (Prosobranchie Néogastéropode) en milieu naturel non pollué et après intoxication expérimentale. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **296**, 1121-1124.

- BOUQUEGNEAU J.-M. et NOEL-LAMBOT F. (1978) - Les métallothionéines, structure, fonctions et incidence dans les milieux marins par les métaux lourds. *Act. Biochim. Mar. Colloque GABIM*, 219-232.
- BRADFORD M. M. (1976) - A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BREMNER I. and YOUNG B. W. (1976) - Isolation of (copper-zinc)-thioneins from pig liver. *Biochem J.*, **155**, 631-635.
- BRIGGS R. W. and ARMITAGE I. M. (1982) - Evidence for site selective binding in calf liver metallothionein. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1259-1262.
- BÜHLER R. H. O. and KÄGI J. H. R. (1974) - Human hepatic metallothionein. *FEBS Let.*, **39**, 229-234.
- BULET P., HOFLACK B., VERBERT A. and PORCHET M. (1983) - Simple procedure to isolate coelomocyte-free oocytes from coelomic fluid of *Perinereis cultrifera* Grube (Annelida Polychaeta). *Experientia*, **39**, 436-437.
- BUTT T. R., STERNBERG E. J., GORMAN J. A., CLARK P., HAMER D., ROSENBERG M. and CROOKE S. T. (1984) - Copper metallothionein of yeast : structure of the gene and regulation of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3332-3336.
- CHASSARD-BOUCHAUD C. (1982) - Localisation ultrastructurale du cadmium dans la glande digestive du Crabe *Carcinus maenas* (Crustacé décapode). Microanalyse par spectrographie des rayons X. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, **294**, 153-157.
- CHEN R. W., WHANGER P. D. and WESWIG P. H. (1975) - Biological function of metallothioneins from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 920-926.
- CHERIAN M. G. and GOYER R. A. (1978) - Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.*, **23**, 1-10.

- CHERIAN M. G. and NORDBERG M. (1983) - Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology*, **28**, 1 - 5.
- CLUBB R. W., LORDS J. L. and GAUFIN A. R. (1975) - Isolation and characterization of a glycoprotein from the stonefly *Pteronarcys californica*, with binds cadmium. *J. Insect. Physiol.*, **21**, 53-60.
- COOKE M., JACKSON A., NICKLESS G. and ROBERTS D. J. (1979) - Distribution and speciation of cadmium in the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Bull. Envir. Contam. Toxic.*, **23**, 445-451.
- DALLINGER R. and WIESER (1984) - Molecular fraction of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **79C**, 125-129.
- DALLINGER R., CARPENE E., DALLA VIA G. J. and CORTESI P. (1989) - Effects of cadmium on *Murex trunculus* from the adreatic sea. I. Accumulation of metal and binding to a metallothionein-like protein. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 554-561.
- DAVIS A. R., BOS T., UEDA M., NAYAK D. P., DOWBENKO D. and COMPANS R. W. (1983) - Immune response to human influenza virus hemagglutinin expressed in *Escherichia coli*. *Gene*, **21**, 273-284.
- DELVAL C. (1984) - Réactions du flet vis-à-vis des pollutions par les métaux (Cu, Zn, Cd, et Pb) sur le littoral de la Mer du Nord : détoxification, métallothionéines. *Thèse de 3ème cycle, Université de Lille I*, 172 p.
- DENNAI N. (1984) - Effets histophysio-pathologiques et biochimiques de l'intoxication d'un ver marin (*Nereis diversicolor*) par deux métaux lourds (le cadmium et le mercure). *Thèse de 3ème cycle, Université de Lille I*, 45 p.
- DENNAI N., DHAINAUT-COURTOIS N., BOUQUEGNEAU J.-M. et NEJMEDDINE A. (1986). Effets du cadmium et du mercure sur un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). Mécanismes de détoxication. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **302**, 489-494.

- DHAINAUT A. (1984) - Aspect cytophysiologique des coelomocytes de Néréidiens (Annélides Polychètes). *Arch. Anat. micr. Morph. Exp.*, **73**, 135-150.
- DHAINAUT A., RAVEILLON B., M'BERI M., PORCHET-HENNERE E. and DEMUYNCK S. (1989) - Purification of an antibacterial protein in the coelomic fluid of *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta). Similitude with a cadmium-binding protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94C**, 555-560.
- DHAINAUT-COURTOIS N., NEJMEDDINE A., BAERT J.-L. et DHAINAUT A. (1987) - Localisation immunocytochimique en microscopie électronique d'une protéine complexant le cadmium chez un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **305**, 237-241.
- DISILVESTRO R. A. and COUSINS R. J. (1984a) - Mediation of endotoxin-induced changes in zinc metabolism in rats. *Am. J. Physiol.*, **247**, E436-E441.
- DISILVESTRO R. A. and COUSINS R. J. (1984b) - Glucocorticoid independent mediation of interleukin-1 induced changes in serum zinc and liver metallothionein levels. *Life Sci.*, **35**, 2113-2118.
- DOHI Y., OHBA K. and YONEYAMA Y. (1983) - Purification and molecular properties of two cadmium-binding glycoproteins from the hepatopancreas of a whelk, *Buccinum tenuissimum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **745**, 50-60.
- DURNHAM D. M. and PALMITER R. D. (1981) - Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-1 gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5712-5716.
- DURNHAM D. M., HOFFMAN J. S., QUAIFE C. J., BENDITT E. P., CHEN Y. H., BRINSTER R. L. and PALMITER R. D. (1984) - Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1053-1056.
- ERIKSEN K. D. H., DAAE H. L. and ANDERSEN R. A. (1988) - Evidence of presence of heavy metal-binding proteins in Polychaeta species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91C**, 377-384.

- ERRAISS N., SILAR P., CADIC-JACQUIER A., MOKDAD-GARGOURI R. and WEGNEZ M. (1989) - The metallothionein system of *Drosophila melanogaster*. *Metal ion Homeostasis : Mol. Biol. Chemi.* 91-99.
- EVTUSHENKO Z. S., BELCHEVA N. N. and LUKYANOVA O. N. (1986) - Cadmium accumulation in organs of the Scallop *Mizuhopecten yessoensis*. II Subcellular distribution of metals and metal-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **83C**, 377-383.
- FOSTER R., JAHROUDI N., VARSHNEY U. and GEDAMU L. (1988) - Structure and expression of the human metallothionein. IG gene. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11528-11535.
- FOWLER B. A., HILDEBRAND C. E., KOJIMA Y. and WEBB M. (1987) - Nomenclature of metallothionein. *IN : Metallothionein II. Kägi J. H. R. and Kojima Y., eds. Birkhauser Verlag, Basel*, pp. 19-22.
- FRAZIER J. M., GEORGE S. S., OVERNELL J., COOMBS T. L. and KÄGI J. (1985) - Characterization of two molecular weight classes of cadmium binding proteins from the Mussel, *Mytilus edulis* (L). *Comp. Biochem. Physiol.*, **80C**, 257-262.
- FRIEDMAN R. L. and MANLEY S. P. (1984) - Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell*, **38**, 745-755.
- GOLDSCHMIDT R. (1970) - *In vivo* degradation of nonsense fragments in *E. coli*. *Nature*, **228**, 1151-1154.
- GUBLER U. and HOFFMAN B. J. (1983) - A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, **25**, 263-269.
- HAMER D. H. (1986) - Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 913-951.

- HARRIS T. J. R. (1983) - In : Genetic engineering (Williamson, R., ed.), *Academic Press, London*, **4**, 127-185.
- HAWKES R., NIDAY E. and GORDON J. (1982) - A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.*, **119**, 142-147.
- HIDALGO J., TORT L. and FLOS R. (1985) - Cd - Zn-, Cu-binding protein in the Elasmobranch *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81C**, 159-165.
- HOU Y.-M., KIM R. and KIM S.-H. (1988) - Expression of the mouse metallothionein-I gene in *Escherichia coli* : increased tolerance to heavy metals. *Biochim. Biophys. Acta.*, **951**, 230-234.
- HUANG I.-Y., YOSHIDA A., TSUNOO H. and NAKAJIMA H. (1977) - Mouse-liver metallothioneins. Complete amino-acid sequence of metallothionein-1. *J. Biol. Chem.*, **252**, 8217-8221.
- INOUE M., HIYAMA M., TOHOYAMA H., JOHO M. and MURAYAMA T. (1989) - Cadmium-binding protein in a cadmium-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **993**, 51-55.
- IRELAND M. P. (1983) - Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworms. In earthworm Ecology. From Darwin to vermiculture (Edited by Satchell J.E.), pp.247-265. Chapman & Hall, London.
- ITAKURA K., HIROSE T., CREA R. and RIGGS A. D. (1977) - Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, **198**, 1056-1063.
- JACOBS F. A., ROMEYER F. M., BEAUCHEMIN M. and BROUSSEAU R. (1989) - Human metallothionein-II is synthesized as a stable membrane-localized fusion protein in *Escherichia coli*. *Gene*, **83**, 95-103.

- KÄGI J. H. R. and VALLEE B. L. (1960) - Metallothionein : a Cd- and Zn - containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460-3465.
- KÄGI J. H. R. and VALLEE B. L. (1961) - Metallothionein : a Cd- and Zn- containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2435-2442.
- KÄGI J. H. R., VASAK M. , LERCH K., GILG D. E. O., HUNZIKER P., BERNHARD W. R. and GOOD M. (1984) - Structure of mammalian metallothionein. *Environ. Health Perspect.*, **54**, 93-103.
- KARIN M. (1985) - Metallothioneins : Proteins in search of a function. *Cell*, **41**, 9-10.
- KARIN M. and HERSCHMAN H. R. (1979) - Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in *Hela* cultures. *Science*, **204**, 176-177.
- KARIN M., NAJARIAN R., HASLINGER A., VALENZUELA P., WELCH J. and FOGEL S. (1984) - Primary structure and transcription of an amplified genetic locus : the Cup1 locus of yeast. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 337-341.
- KARIN M. and RICHARDS R. I. (1982) - Human metallothionein genes : Molecular cloning and sequence analysis of the mRNA.*Nucleic Acids Res.*, **10**, 3165-3173.
- KISSLING M. M. and KÄGI J. H. R. (1977) - Primary structure of human hepatic metallothionein. *FEBS Let.*, **82**, 247-250.
- KOJIMA Y., BERGER C., VALLEE B. L. and KÄGI J. H. R. (1976) - Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3413-3417.
- LAEMMLI U. K. (1970) - Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LIERBERMAN M. W., BEACH L. R. and PALMITER R. D. (1983) - Ultraviolet radiation-induced metallothionein-1 gene activation is associated with extensive demethylation. *Cell*, **35**, 207-214.

- LIN Z. and ZABIN I. (1972) - β -galactosidase. Rates of synthesis and degradation of incomplete chains. *J. Biol. Chem.*, **247**, 2205-2211.
- M'BERI M. (1988) - Dégranulation des coelomocytes au cours des réactions immunitaires d'un invertébré marin : *Nereis diversicolor* (Annélide, Polychète). Caractérisation des coelomocytes d'après leurs récepteurs membranaires, identification et rôle biologique des produits extrudés. *Thèse de Doctorat d'Université, Université de Lille I*, 105 p.
- MAGOS (1974) - In Haguenoer J. M. et Furon D. (1981). Toxicologie et hygiène industrielles. *Tome I Les dérivés minéraux*. Ed. *Technique et Documentation, Paris*.
- MANIATIS T., FRITSH E. F. and SAMBROOK J. (1982) - Molecular cloning : a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory, *Cold Spring Harbor, New York*, 545 p.
- MARGOSHES M. and VALLEE B. L. (1957) - A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813-4814.
- MARONI G. and WATSON D. (1985) - Uptake and binding of cadmium, copper and zinc by *Drosophila melanogaster* Larvae. *Insect. Biochem.*, **15**, 55-63.
- MARSTON F. A. O. (1986) - The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **240**, 1-12.
- MARTOJA M. et MARTOJA R. (1984) - La bioaccumulation de métaux. Processus physiologique normal et conséquence de la pollution. *Le courrier du C.N.R.S.*, **54**, 32-37.
- MARTOJA R., BOUQUEGNEAU J.-M. and VERTHE C. (1983) - Toxicological effects and storage of cadmium and mercury in an Insect *Locusta migratoria* (Orthoptera). *J. Invert. Pathol.*, **42**, 17-32.

- MARTOJA R. et MARTIN J.L. (1985) - Recherche des mécanismes de détoxication du cadmium par l'Huître *Crassostrea gigas* (Mollusque, Bivalve). I. Mise en évidence d'une protéine sulfhydrilée de complexation du métal dans les amœbocytes à zinc et cuivre. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **300**, 549-554.
- MASON A. Z. and NOTT J. A. (1982) - The rôle of intracellular biomineralised granules in the regulation and detoxication of metals in gastropods with special reference to the marine prosobranch *Littorina littorea*. *Aquatic toxicol.*, **1**, 239-256.
- MBIKAY M., BRZEZINSKI R. and THIRION J.-P. (1983) - Differential expression of cloned mouse metallothionein sequences in *Escherichia coli*. *DNA*, **2**, 23-30.
- McCARTER J. A. and ROCH M. (1983) - Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenil coho salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, **74C**, 133-137.
- McCORMICK C. C. (1984) - Induction and accumulation of metallothionein in liver and pancreas of chicks given oral zinc : a tissue comparison. *J. Nutr.*, **114**, 191-203.
- MOKDAD R., DEBEC A. et WEGNEZ M. (1987) - Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2658-2662.
- MORGAN J. E., NOREY C. G., MORGAN A. J. and KAY J. (1989) - A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92C**, 15-21.
- MUROOKA Y. and NAGAOKA T. (1987) - Expression of cloned monkey metallothionein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 204-207.
- NEJMEDDINE A. (1985) - Contribution à l'étude cytologique et biochimique des mécanismes de défense chez une Annélide (*Nereis diversicolor*) soumise à une intoxication chronique par le cadmium. *D.E.A. Université de Lille I*, 33 p.

- NEJMEDDINE A. (1987) - Effets biologiques du cadmium sur un invertébré marin (*Nereis diversicolor*). Isolement et caractérisation d'une métalloprotéine intervenant dans les processus de détoxification. *Thèse de Doctorat d'Université, Université de Lille I*, 111 p.
- NEJMEDINNE A., DHAINAUT-COURTOIS N., BAERT J.-L., SAUTIERE P., FOURNET B. and BOULENGUER P. (1988) - Purification and characterization of a cadmium-binding protein from *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.*, **89C**, 321-326.
- NOEL - LAMBOT F. (1979) - Cadmium accumulation correlated with increase in metallothioneins concentration in the limpet *Patella caerulea*. 1st Conf. Eur. Soc. *Comp. Physiol. Biochem.*, Animals and Environmental Fitness, 27-31, August 1979, Liège Belgique, Pergamon Press.
- NOEL-LAMBOT F. (1980) - La bioaccumulation du cadmium en milieu marin. *Thèse Doct. Univ. Liège*, 258 p.
- NORDBERG G. F. (1971) - Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testicles of mice. *Environ Physiol*, **1**, 171-187.
- NORDBERG G. F., PISCATOR M. and LIND B. (1971) - Distribution of Cd among protein fractions of mouse liver. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, **29**, 456-470.
- NORDBERG M., TROJANOWSKA B. and NORDBERG G. F. (1974) - Studies on metal-binding proteins of low molecular weight from renal tissue of rabbits exposed to Cd or Hg. *Environ. Physiol. Biochem.*, **4**, 149-158.
- O'BRADY F., PANEMAGALORE M. and DAY F. A. (1979) - *In vivo* and *ex vivo* induction of rat liver metal metallothionein. *IN : Metallothionein. Kägi et Nordberg Eds.*, **34**, 261-271.
- OKAYAMA H. and BERG P. (1982) - High efficiency cloning of full length cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 161-170.

- OLAFSON R. W., SIM R. G. and BOTO K. G. (1979) - Isolation and chemical characterization of the heavy metal binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, **62B**, 407-416.
- OVERNELL J. (1984) - The partition of copper and cadmium between different charge-forms of metallothionein in the digestive tubule of the crab, *Cancer pagurus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **77C**, 237-243.
- OVERNELL J. and COOMBS T. L. (1979) - Purification properties of plaice metallothionein, a cadmium-binding protein from the liver of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem. J.*, **183**, 277-283.
- PISCATOR M. (1964) - Cd in kidneys of normal beings and the isolation of metallothionein from liver of rabbits exposed to Cd. *Nord. Hyg. Tidskr.*, **45**, 76-82.
- POIRIER L. et COSSA D. (1981) - Distribution tissulaire de cadmium chez *Meganyctiphanes norvegica* (Euphausiacée) : état naturel et accumulation expérimentale de formes solubles. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **38**, 1449-1453.
- PORCHET-HENNERE E., NEJMEDDINE A., BAERT J.-L. and DHAINAUT-COURTOIS N. (1987) - Selective immunostaining of type 1 granulocytes of the Polychaete annelid *Nereis diversicolor* by a monoclonal antibody against a cadmium-binding-protein (MPH). *Biol. Cell.*, **60**, 259-261.
- PREMAKUMAR R., WINGE D. R., WILEY R. D. and RAJAGOPALAN K. V. (1975) - Copper-chelatin : isolation from various eucaryotic sources. *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 278-288.
- PROBST G. S., BOUSQUET W. G. and MIYA T. S. (1977) - Kinetics of cadmium-induced hepatic and renal metallothionein synthesis in the mouse. *Toxicol. appl. Phamacol.*, **39**, 51-60.
- RADOUX D. and BOUQUEGNEAU J.-M. (1979) - Uptake of mercuric chloride from sea water by *Serranus cabrilla*. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, **22**, 771-778.

- RICHARDS M. P. and COUSINS R. J. (1976) - Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. *J. Nutr.*, **106**, 1591-1599.
- RIDLINGTON J. W. and FOWLER B. A. (1979) - Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Chem. Biol. Interact.*, **25**, 127-138.
- ROESIJADI G., KIELLAND S. and KLERKS P. (1989) - Purification and properties of novel Molluscan metallothionein *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **273**, 403-413.
- ROMEYER F. M., JACOBS F. A., MASSON L., HANNA Z. and BROUSSEAU R. (1988) - Bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli* expressing an inducible synthetic human metallothionein gene. *J. Biotech.*, **8**, 207-220.
- SADHU C. and GEDAMU L. (1988) - Regulation of human metallothionein (MT) genes. *J. Biol. Chem.*, **263**, 2679-2684.
- SCHMIDT C. J. and HAMER D. H. (1986) - Cell-specificity and an effect of ras on human metallothionein gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3346-3350.
- SHAIKH Z. A. and SMITH J. C. (1977) - The mechanisms of hepatic and renal metallothionein biosynthesis in cadmium-exposed rats. *Chim. Biol. Inter.*, **19**, 161-171.
- SIMKISS K. (1976) - Intracellular and extracellular routes in biomineralisation. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **30**, 423-444.
- SIMKISS K. (1981) - Calcium and pyrophosphate and cellular pollution. *Trds Biochem. Sc.*, **3**-5.
- SLICE L. W., FREEDMAN J. H. and RUBIN C. S. (1990) - Purification, characterization and cDNA cloning of a novel metallothionein-like, cadmium-binding protein from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 256-263.
- SQUIBB K. S. and COUSINS R. J. (1977) - Synthesis of metallothionein in a polysomal cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 806-812.

- SQUIBB K. S., COUSINS R. J., SILBON B. L. and LEVIN S. (1976) - Liver and intestinal metallothionein : function in acute cadmium toxicity. *Exp. Mol. Pathol.*, **25**, 163-171.
- STONE H. C., WILSON S. B. and OVERNELL J. (1986) - Cadmium binding components of scallop (*Pecten maximus*) digestive gland. Partial purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, **85C**, 259-268.
- SWANK R. T. and MUNKRES K. D. (1971) - Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Analyt. Biochem.*, **39**, 462-477.
- SZCZYPKA M. and THIELE D. J. (1989) - A cysteine-rich nuclear protein activates yeast metallothionein gene transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 421-429.
- TALMADGE K. and GILBERT W. (1982) - Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1830-1833.
- TANAKA K. and SUEDA K. (1973) - Cadmium binding components in the supernatant fraction of liver, kidney and intestinal mucosa homogenates of cadmium-administrated rats. *Jap. J. Hyg.*, **28**, 492-496.
- TANIGUCHI T., GUARENTE L., ROBERTS T. M., KIMELMAN D., DOUHAN III J. and PTASHNE M. (1980) - Expression of the human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5230-5233.
- THIELE D. J., WALLING M. J. and HAWER D. H. (1986) - Mammalian metallothionein is functional in yeast. *Science*, **231**, 854-856.
- THOMAS D. G., de L. G. SOLBE J. F., KAY J. and CRYER A. (1983) - Environmental cadmium is not sequestered by metallothionein in rainbow trout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 584-592.

- TOWBIN H., STAEGELIN T. and GORDON J. (1979) - Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- VALBERG L. S., HAIST J., CHERIAN M. G., DELAQUERRIERE-RICHARDSON L. and GOYER R. (1977) - Cadmium-induced enteropathy : comparative toxicity of cadmium chloride and cadmium-thionein. *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, **2**, 963-975.
- VALLEE B. L. (1979) - Metallothionein : historical. Review and perspectives. *In* : Metallothionein, Kägi J. H. R. et Nordberg M. eds, p.19-40.
- VARSHNEY U., JAHROUDI N., FOSTER R. and GEDAMU L. (1986) - Structure, organization and regulation of human metallothionein IF gene : differential and cell type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 26-37.
- VILLARREAL-RAMOS B. (1989)- A method for the screening of fusion protein expression by 1gt11 recombinant clones without the preparation of lysogens. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6421.
- WEBB M. (1972) - Binding of Cd ions by rat liver and kidney. *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2751-2771.
- WEI D. and ANDREWS G. K. (1988) - Molecular cloning of chicken metallothionein. Deduction of the complete amino acid sequence and analysis of expression using cloned cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 537-553.
- WESER U., DONAY F. and RUPP H. (1973) - Cadmium-induced synthesis of hepatic metallothionein in chicken and rats. *FEBS Let.*, **32**, 171-173.
- WHITE S. L. and RAINBOW P. S. (1986) - A preliminary study of Cu-, Cd and Zn-binding components in the hepatopancreas of *Palaemon elegans* (Crustacea : Decapoda) *Comp. Biochem. Physiol.*, **83C**, 111-116.
- WONG V. W. T. and RAINBOW P. S. (1986) - Two metallothioneins in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **83A**, 149-156.

- YAMADA H., MINOSHIMA S., KOIZUMI S., KIMURA M. and SHIMIZU N. (1989) - Cadmium-induced synthesis of metallothioneins in human T and B cell purified by a fluorescence activated cell sorter. *Chem. Biol. Interactions*, **70**, 117-126.
- YAMAMURA M. and SUZUKI K. T. (1984) - Isolation and characterization of metallothionein from the tortoise *Clemmys mutica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **79C**, 63-69.
- YAMAMURA M., MORI T. and SUZUKI K. T. (1981) - Metallothionein induced in the earthworm. *Experientia*, **37**, 1187-1189.
- YAMAMURA M., SUZUKI K. T., HATAKEYAMA S. and KUBOLA K. (1983) - Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva *Chironomus yoshimatsui* (Diptera Chironomidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, **75C**, 21-24.
- YAU E. T. and MENNEAR J. H. (1977) - Pancreatic metallothionein : protection against cadmium-induced inhibition of insulin secretory activity. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **39**, 515-520.
- YOSHIKAWA H. (1970) - Preventive effect of pretreatment with low dose of metals in the acute toxicity of metals in mice. *Ind. Health*, **8**, 184-191.
- YOUNG J. S. and ROESIADI G. (1983) - Reparatory adaptation of copper-induced injury and occurrence of a copper-binding protein in the Polychaete, *Eudistylia vancouveri*. *Mar. Poll. Bull.*, **14**, 30-32.
- ZAFARULLAH M., BONHAM K. and GEDAMU L. (1988) - Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-response region. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4469-4476.

