

50 376
1 990
87

69003

50376
1990
87

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

UFR DE BIOLOGIE

Année 1990

N° d'Ordre : 567

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'UNIVERSITE EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Youssef SMIRI



CARACTERISATION ET PURIFICATION DE MOLECULES
APPARENTEES A LA GASTRINE/CHOLECYSTOKININE
CHEZ UNE ANNELIDE POLYCHETE,
NEREIS DIVERSICOLOR

Présentée le 3 juillet 1990 devant la Commission

JURY :	Président	: Professeur M. PORCHET
	Rapporteurs	: Professeur N. DHAINAUT-COURTOIS
		: Professeur G. TRAMU
	Examineur	: Professeur J.-C. ANDRIES

A *ma mère,*
mon père,

mon frère,
mes soeurs et beaux-frères,

A *Nabil, Hatim, Kaoutar*

A *la famille MAJDI,*

A tous mes ami(es) et ceux qui me sont chers

Aux familles MOREAU, MEHDI, AHRIR, MERIMI, LEKCHIRI, HAMMIMAZ

J'exprime à Monsieur le Professeur M. Porchet ma profonde gratitude pour la bienveillance avec laquelle il m'a accueilli dans son laboratoire, et la confiance qu'il m'a témoignée. Qu'il soit également remercié pour l'honneur qu'il me fait en présidant mon Jury et qu'il trouve à travers ce travail le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur J.-C. Andriès m'a suivi de très près au cours de ces années de travail. Son esprit critique et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués m'ont beaucoup aidé. Pour son aide précieuse et la compétence avec lesquelles il m'a guidé je suis ravi de lui exprimer à travers ces lignes mes remerciements les plus sincères.

Je remercie Madame le Professeur N. Dhainaut-Courtois qui, malgré ses occupations, a bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail et d'être membre de ce Jury de thèse. Je lui en suis très reconnaissant.

J'apprécie tout particulièrement que Monsieur le Professeur G. Tramu ait accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. En me fournissant l'anticorps, il a permis la réalisation de ce travail. Qu'il veuille bien croire à l'expression de ma profonde gratitude.

J'ai eu le plus grand plaisir dès ma première année dans le laboratoire, de travailler avec P. Bulet. Il m'est agréable d'évoquer tout particulièrement les amicales et fructueuses conversations que j'ai eues avec lui. Je le remercie pour le temps qu'il a pu me consacrer, la patience et la compréhension dont il a fait preuve et lui en suis très reconnaissant.

Je remercie D. Croix pour la préparation des colonnes d'affinité et pour la courtoisie et l'amabilité qu'elle a toujours eues.

F. Bonet, tu as assuré avec efficacité et bonne humeur la dactylographie de cette thèse. Accepte mes sincères remerciements.

Je remercie N. Andriès et M. Masson pour l'aide inestimable qu'elles ont pu m'accorder.

Mes remerciements seraient incomplets s'ils ne s'adressaient pas à tous les autres membres du laboratoire d'endocrinologie des invertébrés UA 148. Chacun a eu l'occasion de me témoigner son amitié et de m'assister à une quelconque période, et surtout: B. Léü, Y. Himpens et M. Vennin.

SOMMAIRE

	Page
Introduction	1
Hormones et neuropeptides de Néréidiens	3
La CCK des Mammifères	5
Le précurseur, sa maturation	5
Les récepteurs	6
La CCK plasmatique	8
Origine	8
Concentration - formes présentes	9
Déterminisme de la sécrétion	9
Effets physiologiques	10
1- Stimulation de la contraction de la vésicule biliaire	10
2- Stimulation de la sécrétion de l'amylase pancréatique	10
3- Stimulation de la motilité intestinale	10
4- Induction de la satiété	12
5- Potentialisation de l'action de la sécrétine	12
6- Inhibition de la vidange gastrique	13
La CCK neuronale	13
La CCK, un neurotransmetteur	14
La CCK, un neuromodulateur;	
co-existence avec un neurotransmetteur	14
Fonction de la CCK neuronale	16
Dégradation de la CCK	17
Formes apparentées à la CCK	18

Matériel et méthodes	20
Matériel biologique	20
Récolte	20
Conservation	20
Méthodes	20
Réalisation de l'extrait brut	20
Purification de l'extrait	21
1- Préparation de l'échantillon pour l'injection en chromatographie liquide à haute performance	21
a) Passage sur cartouche Sep Pak C18	21
b) Passage sur colonne d'affinité	21
Préparation de la colonne d'affinité	22
Préparation du gel	22
Préparation des anticorps	22
Couplage des anticorps au gel	22
Utilisation de la colonne d'affinité	23
2- Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	23
Dosage radioimmunologique	24
1- Principe du dosage	24
2- Protocole expérimental	24
 Résultats et discussion	
Caractérisation de la molécule apparentée à la gastrine/CCK	26
Hétérogénéité	28
Purification	29
 Discussion et conclusion générales	33
 Bibliographie	36

INTRODUCTION

Les résultats immunohistochimiques obtenus cette dernière décennie ont clairement démontré que de nombreux neuropeptides d'Invertébrés étaient apparentés à des peptides du système nerveux central ou du tractus digestif des Vertébrés. En particulier, chez les Annélides Polychètes, l'utilisation d'anticorps variés, dirigés contre des peptides de Vertébrés a permis de détecter de nombreuses molécules apparentées (Dhainaut-Courtois et al. 1985a, 1986, Dhainaut-Courtois et Golding 1988, Porchet et Dhainaut-Courtois 1988). Il en est ainsi pour un ou plusieurs peptides reconnus dans le cerveau, le ganglion sous-oesophagien et les ganglions de la chaîne nerveuse par un anticorps anti-cholécystokinine (CCK) (Engelhardt et al. 1982, Dhainaut-Courtois et al. 1985b).

En immunohistochimie, une réaction positive obtenue après utilisation d'une sonde hétérologue permet de conclure à l'existence d'un peptide présentant un ou plusieurs sites antigéniques communs avec la molécule peptidique originelle. Ainsi, la portée des résultats immunohistochimiques reste limitée; la connaissance de la fonction de telles molécules nécessitant en fait celle de leurs séquences. Pour y parvenir, il est cependant possible d'utiliser des sondes hétérologues réalisées contre des peptides de Vertébrés; celles-ci permettant de suivre par voie immunologique le(s) peptide(s) concerné(s) lors des étapes successives de purification. Ainsi ont été isolées récemment des molécules apparentées à la gastrine/CCK chez l'ascidie, *Ciona intestinalis* (Johnsen et Rehfeld 1990), à la vasopressine chez le criquet, *Locusta migratoria* (Proux et al. 1987), aux enképhalines chez la moule, *Mytilus edulis* (Leung et Stefano 1984), au FMRF-amide chez l'anémone de mer, *Anthopleura elegantissima* (Grimmelikhuijzen et Graff 1986) et le néréidien *Nereis virens* (Krajniak et Price 1990).

Grâce à une telle approche méthodologique, nous nous sommes attachés à purifier une molécule de *Nereis diversicolor* apparentée à la gastrine/CCK de Mammifères. L'intérêt d'une telle étude était double: (1) son intérêt phylogénétique était évident; les seules molécules d'Invertébrés apparentées à la gastrine/CCK ont été séquencées chez les Insectes (Nachman et al. 1986a, b, Nichols et al. 1988, Veenstra 1989) et une ascidie (Johnsen et Rehfeld 1990); (2) son intérêt dans le contexte des travaux au sein du laboratoire ne l'était pas moins. Les travaux récents menés en biologie moléculaire ont démontré l'existence d'un précurseur de la CCK de grande taille (70 kDa) (Guissi-Kadri 1989). L'isolement du peptide apparenté à la gastrine/CCK des Polychètes est donc une étape indispensable à la réalisation d'une sonde homologue susceptible d'être utilisée en biologie moléculaire.

**HORMONES ET NEUROPEPTIDES
DE NEREIDIENS**

Les travaux expérimentaux de Durchon avaient permis de conclure à l'existence d'une hormone cérébrale inhibant dans les deux sexes les transformations morphologiques et anatomiques liées à l'épitoquie (réf. dans Durchon 1984). Ces transformations somatiques ont lieu alors que, corrélativement, s'effectue la maturation des gamètes. C'est donc un ensemble d'évènements (croissance somatique, différenciation, dégénérescence, gamétogenèse, voire régénération) qui se font sous la dépendance hormonale du cerveau.

Les essais de purification avaient, par le passé, permis de conclure à l'existence d'un peptide cérébral de faible poids moléculaire, riche en proline et en glycine. Dénommé néréidine, son activité biologique n'a cependant jamais été démontrée. De fait, l'isolement du facteur cérébral inhibant la seule spermatogenèse (spermatogenesis inhibiting factor : SIF) (Bulet et Porchet 1986) se poursuit actuellement. Parallèlement, une sonde immunologique dirigée contre une fraction contenant ce facteur s'est avérée réagir avec une molécule différente du SIF (Delaire-Hesdin 1989).

La production (ou la libération ?) de la néréidine est, chez la femelle, sous contrôle d'une molécule sécrétée par les ovocytes de diamètre supérieur à 180 μm (Porchet et Cardon 1972, 1976). La nature de la substance assurant ce rétro-contrôle n'est cependant pas identifiée.

Enfin, comme nous l'avons signalé précédemment, de nombreux peptides apparentés aux peptides de Vertébrés ont été détectés dans le cerveau, le ganglion sous-oesophagien et la chaîne nerveuse ventrale des Néréidiens. Le tableau I en rend compte.

L'un des peptides les plus abondants correspond à une molécule apparentée à la cholécystokinine. Des anticorps anti-CCK-8 ou -8S révèlent de nombreux péricaryons dans de nombreux noyaux ganglionnaires (noyaux 5-7, 9, 10, 13-15, 17, 23 et 24) et plus particulièrement des cellules du noyau 20 (Dhainaut-Courtois et al. 1985b) (fig. 1a, b). Après utilisation d'anticorps anti-proCCK, une immunoréaction est également décelée

Tableau I - Distribution chez les Néréidiens de substances immunologiquement apparentées à des peptides de Vertébrés.

Famille de Peptides	Distribution			Référence
	Cerveau	Ganglion sous oesophagien	Chaîne nerveuse	
<u>Opiïdes ou dérivant de précurseurs des opiïdes</u>				
Leu-enképhaline	+	+	+	1
Met-enképhaline	+		+	2
α -endorphine	+			1
β -endorphine	+		+	
α -néoendorphine	+	+		2
Dynorphine 1-17	+			2
β -MSH	+	+	+	1
<u>Hormones hypothalamiques</u>				
Somatostatine	+	+	+	2
Somatolibérine	+	+	+	1 - 2
Corticolibérine	+	+	+	1
Vasopressine	+	+	+	3
<u>Hormones gastrointestinales</u>				
CCK	+	+	+	3 - 4
Substance P	+	+	+	1
Peptides intestinal vasoactif	+	+	+	1

1- Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985a

2- Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986

3- Engelhardt *et al.*, 1982

4- Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985b

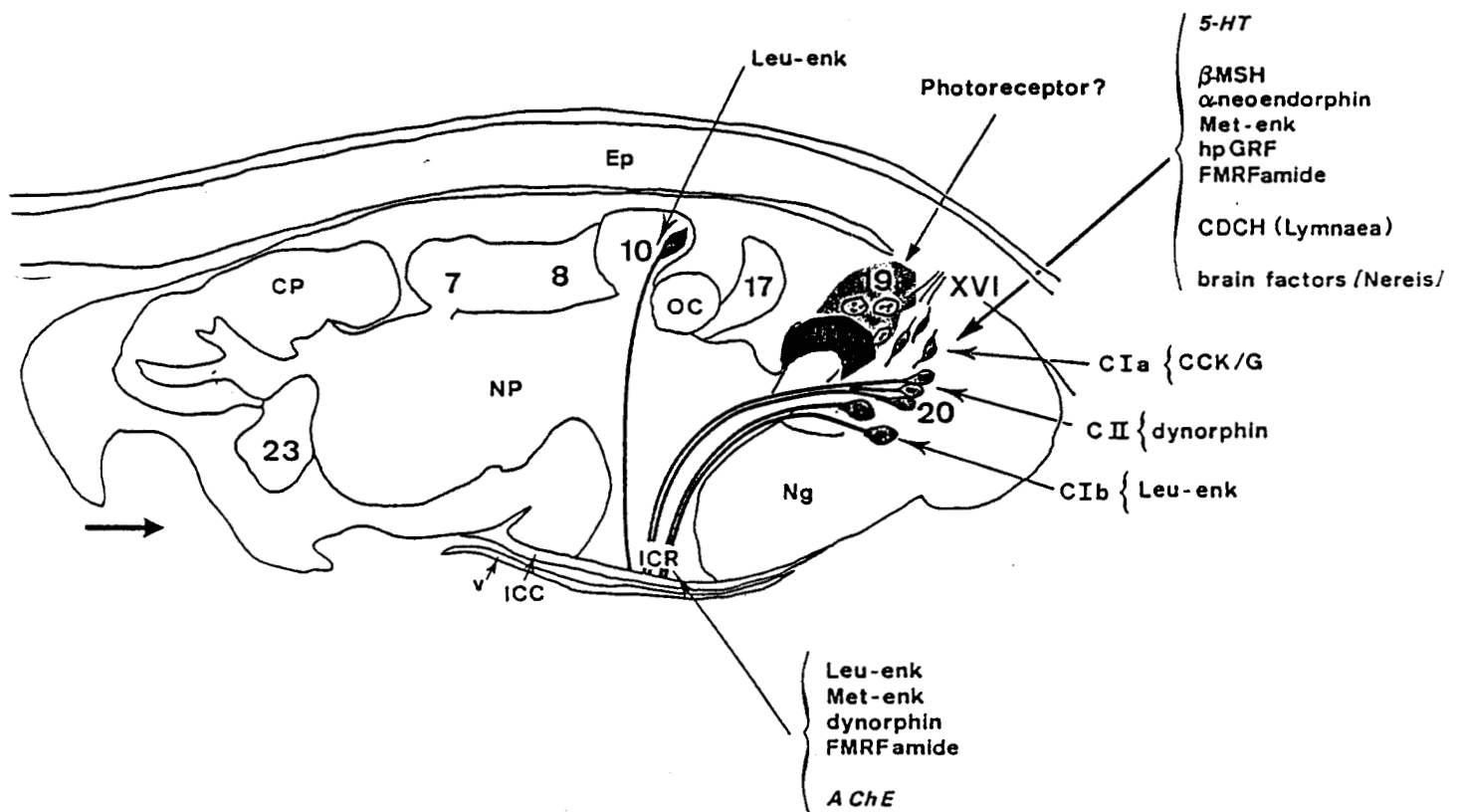


Figure 1a - Projection en vue parasagittale du cerveau de *Nereis diversicolor*

Le neuropile (NP) et quelques uns des 26 noyaux ganglionnaires sont représentés, en particulier les noyaux 16 (intégrateur), 19 (de type photorécepteur), 20 (gros centre neurosecréteur). La localisation de la région infracérébrale (ICR) et celle du nerf épidermique dorsal (XVI) sont indiquées ainsi que les principaux résultats immunocytochimiques obtenus dans la région caudale.

C Ia, C Ib, C II: types cellulaires; CP: *Corpora pedunculata*; EP: épiderme; ICC : cellules infracérébrales; OC: commissure optique; Ng: névroglie; V: vaisseau sanguin. (d'après Dhainaut-Courtois)

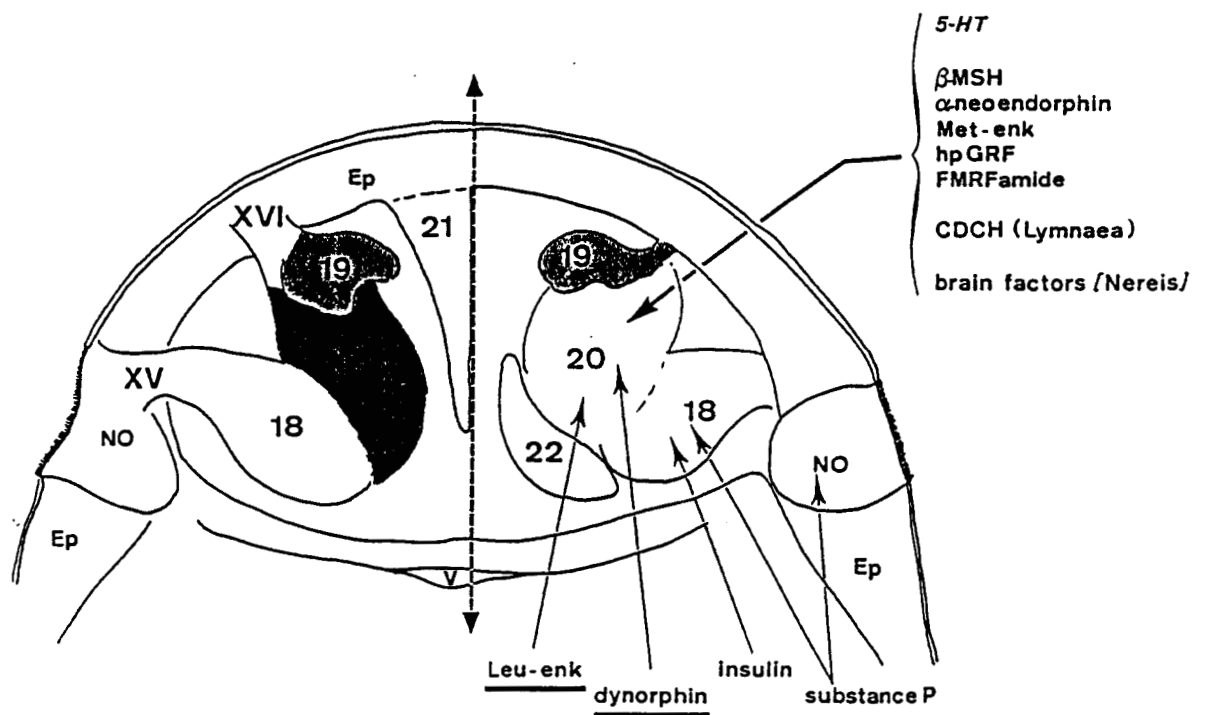


Figure 1b - Projection en vue transversale de la partie caudale du cerveau de *Nereis diversicolor*.

La moitié droite est légèrement postérieure à celle de gauche. A noter la présence dans cette région de deux organes sensoriels (l'organe nuchal, NO et le noyau 19, respectivement de type chimiorécepteur et photorécepteur) impliqués dans le contrôle des sécrétions cérébrales (Même légende que la figure 1a ; d'après Dhainaut-Courtois).

dans des péricaryons des noyaux 4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 20, 23 et 25 (Guissi-Kadri 1989). Dans certains cas au moins, il y a co-localisation de matériel présentant une immunoréactivité anti-CCK-8 et anti-proCCK (Guissi-Kadri 1989) ce qui tendrait à prouver que le polypeptide de masse moléculaire 70 kDa détecté par les anticorps anti-proCCK correspond au précurseur du ou des peptide(s) apparenté(s) à la CCK.

Des peptides apparentés à des peptides d'Insectes (neuroparsine) ou de Mollusque (hormone des cellules caudo-dorsales du cerveau de limnée) ont également été signalés (Porchet et Dhainaut-Courtois 1988, Dhainaut-Courtois communication personnelle).

Vraisemblablement, la plupart de ces substances agissent comme neurotransmetteur et/ou neuromodulateur dans la régulation des sécrétions libérées au niveau de l'organe infracérébral, lequel correspond à une aire neurohémale (Dhainaut-Courtois 1970). Leur rôle exact n'est cependant pas établi, d'autant que, si l'on excepte la molécule apparentée au FMRF-amide (Krajniak et Price 1990, Baratte, communication personnelle), leur lien de parenté avec la molécule de référence n'est pas établi.

LA CCK DES MAMMIFERES

De par son origine, la CCK est libérée soit dans la circulation sanguine, soit dans l'espace synaptique. La CCK est qualifiée de plasmaticque, lorsque synthétisée au niveau de la muqueuse intestinale, elle est déversée dans le sang; de neuronale, lorsqu'elle est libérée après stockage dans les terminaisons nerveuses.

Le précurseur, sa maturation

Les molécules actives dérivent d'un précurseur, la préproCCK comportant 114 acides aminés chez le porc (Gübler et al., 1984), 115 chez l'homme (Takahishi et al. 1985) et le rat (Deschenes et al. 1984). La maturation du précurseur conduit à la formation de plusieurs molécules de longueur variable (CCK-58, -39, -33, -22, -8), les sites de coupure étant situés au niveau de singlets ou de doublets de résidus basiques (fig. 2).

L'octapeptide C-terminal comporte la même séquence d'acides aminés chez tous les Mammifères sauf chez le cobaye (Zhou et al. 1985) et le chinchilla (Fan et al. 1987,) où une valine remplace la méthionine. Par contre, la région N-terminale et la région médiane sont sujettes à variation (Takahishi et al. 1985). La phényl alanine C-terminale de l'octapeptide est obligatoirement amidée alors qu'au niveau du précurseur elle est suivie de la séquence (Gly-Arg-Arg) et d'une extension de plusieurs acides aminés. La réaction d'amidation ne peut se faire que sur des formes intermédiaires à glycine C-terminale (CCK-gly), formes dont la présence a été démontrée dans le cerveau (Rehfeld et Hansen 1986), l'hypophyse (Rehfeld 1986), la muqueuse duodénale (Sugano et al. 1985) et le plasma sanguin (Del Valle et al. 1989).

Si l'ablation de la phényl alanine réduit considérablement la capacité biologique du peptide, et même, le transforme en antagoniste (Sparnakel et al. 1983), l'emplacement du résidu aspartyl en antépénultième position, quoique importante, n'est guère essentielle (Gaudreau et al. 1987).

En dehors des organes qui sont les principaux sites de synthèse de la CCK, les gènes de la CCK et de la gastrine sont également exprimés dans les cellules de la médullo-surrénale, du moins chez des individus atteints de phéochromocytomes (Bardram et al. 1989). Cependant les processus post-traductionnels diffèrent nettement de ceux observés dans l'intestin ou le cerveau. Les précurseurs y sont plus abondants que les molécules biologiquement actives et de nombreuses molécules ne présentent ni sulfatation de la tyrosine, ni amidation de la phényl alanine.

Dans l'hypophyse antérieure humaine les fragments proCCK (essentiellement la CCK

-58) dépourvus d'extrémité C-terminale amidée sont dix fois plus abondants que les peptides amidés (Rehfeld et al. 1987) alors que dans le cortex cérébral 95% des produits issus de la proCCK sont amidés (Rehfeld et Hansen 1986). Ainsi donc le gène, bien que transcrit, n'est exprimé que très faiblement en tant que peptide mature et actif en dehors des régions principales de production. Toutefois, dans les cellules des tumeurs corticotrophes hypophysaires, il y a production de formes amidées de petite (CCK-8) et de grande taille (CCK-58). Le processus d'amidation pourrait donc s'effectuer correctement dans des cellules indifférenciées ou peu différenciées (cf. cellules tumorales) et difficilement dans les cellules différenciées (cf. cellules adénohypophysaires normales); le contrôle de l'activité génique s'exerçant au niveau post-traductionnel (Rehfeld, 1987).

Les récepteurs

La CCK se fixe à des récepteurs du système nerveux central et du tractus digestif. Selon leur emplacement et leur affinité, deux classes de récepteurs ont été définies.

1- Les récepteurs périphériques ou récepteurs A. Démontrés par l'utilisation de divers antagonistes qui inhibent de façon spécifique mais réversible la liaison de la CCK (Jensen et al. 1980, Saito et al. 1980a, b, Chang et al. 1986), ils sont présents dans la vésicule biliaire (Steigerwalt et al. 1984), le pancréas (Jensen et al. 1980, Sankaran et al. 1980). Ils montrent une affinité maximale pour la CCK-8 sulfatée et peu d'affinité pour la CCK-8 non sulfatée et la CCK-4. Leur affinité pour la gastrine est très faible (de 500 à 1000 fois moins que pour la CCK-8S) (Steigerwalt et al. 1984, Moran et al. 1986, Rattan et Goyal 1986, Von Schrenck et al. 1988). La présence de plusieurs populations de récepteurs périphériques, les uns au niveau pancréatique, les autres au niveau de la vésicule biliaire, bien que présentée par le passé (Jensen et al. 1986) ne peut être généralisée (Von Schrenck et al. 1988).

2- Les récepteurs centraux ou récepteurs B. Ils présentent davantage d'affinité pour la CCK non sulfatée et la CCK-4 que ne le font les récepteurs A (Innis et Snyder 1980, Saito et al. 1980a, b).

Cette dualité centrale/périphérique est actuellement remise en cause dans la mesure où la présence de récepteurs se comportant comme des récepteurs de type A a été démontrée dans certaines régions du cerveau (Moran et al. 1986, Hill et al. 1987 a, b) et de la moëlle épinière (Hill et al. 1989).

A ces deux classes, s'en ajoute une troisième dont les récepteurs présentent autant d'affinité pour la gastrine que pour la CCK. Ces récepteurs, dénommés à l'origine récepteurs gastrine de par leur localisation au niveau des cellules pariétales intestinales (Soll et al. 1984), existent également au niveau des glandes gastriques (Chang et al. 1986) et des muscles lisses du tractus digestif (Bitar et Makhoul 1982). Ainsi, il semble que le modèle binaire (récepteurs A/ récepteurs B) ne prenne pas en compte toutes les données d'autant que les travaux récents démontrent au niveau d'un même organe, le pancréas, la co-existence de trois classes de récepteurs: certains ont une très forte affinité

pour la CCK, d'autres une affinité beaucoup plus faible et d'autres enfin présentent autant d'affinité pour la gastrine que pour la CCK (Fourmy et al. 1987, Yu et al. 1987, 1990). Notons toutefois que chez les Amphibiens les récepteurs centraux et périphériques présentent les mêmes caractéristiques (Vigna et al. 1984); ils représenteraient une condition ancestrale à partir de laquelle les différentes classes de récepteurs des Mammifères auraient évolué (Vigna et al. 1986).

Les récepteurs sont de nature glycoprotéinique, qu'il s'agisse de récepteurs pancréatiques (Rosenzweig et al. 1984, Svoboda et al. 1982) ou rétinien (Bone et Rosenzweig 1988). Toutefois, récepteurs pancréatiques et rétinien diffèrent par leur structure et leurs propriétés pharmacologiques.

La CCK plasmatique

Origine

La CCK plasmatique provient des sécrétions de cellules du tractus digestif. Dans le tube digestif, la CCK est synthétisée par les cellules I du duodénum et de la partie antérieure de l'intestin grêle (Buffa et al. 1976, Buchan et al. 1978), la gastrine l'étant par les cellules de type G. Il est vraisemblable qu'en dehors des cellules I, d'autres types cellulaires soient impliqués. En particulier, un second type cellulaire du duodénum humain détecté par un anticorps anti-CCK-33 (Tsumuraya et al. 1986) présente des caractéristiques proches de celles des cellules K intestinales ou A pancréatiques. Par contre, l'existence de cellules IG sécrétrices de gastrine et de CCK (Tsumuraya et al. 1986) semble devoir être remise en question, l'hybridation *in situ* ne permettant pas de détecter la présence de cellules mixtes (Yabu et al. 1989).

Concentration - formes présentes

Les concentrations sont de 1 à 2 pmol/l de plasma; elles atteignent 6 à 8 pmol/l à la suite de la prise de nourriture (Jansen et Lamers 1983a, Liddle et al. 1984, 1985, Cantor 1986).

S'il est très vraisemblable que différentes molécules de CCK sont présentes dans le plasma, leur nature et leurs proportions relatives restent controversées. Les travaux des années 80 tendaient à prouver que l'octapeptide C-terminal était la forme prédominante (Calam et al. 1982, Walsh et al. 1982). Rapidement cependant, on s'aperçut que la CCK-33 et la CCK-39 étaient présentes en quantités importantes (Liddle et al. 1985, Cantor et Rehfeld 1987, Kanamaya et al. 1987, Eberlein et al. 1987). Actuellement, après que la présence de CCK-58 ait été tout d'abord confirmée (Jansen et Lamers 1983b, 1987, Eberlein et al. 1987) on admet que la CCK-58 représente la forme majeure (Eberlein et al. 1987, Eysselein et al. 1987, Turkelson et al. 1988). Bien que l'utilisation d'anticorps différents, dirigés contre la partie N ou C-terminale, puisse expliquer certaines des différences observées, il est vraisemblable, comme le démontre un travail récent (Eberlein et al. 1988), que la diversité des régimes alimentaires puisse être une des causes de la variabilité des résultats.

Déterminisme de la sécrétion

D'importantes différences interspécifiques existent, quant à la nature des nutriments qui provoquent la libération de la CCK dans la circulation sanguine. Ainsi, chez l'homme, les triglycérides à longue chaîne sont des stimulants puissants (Hopman et al. 1984, Isaacs et al. 1987) alors qu'ils n'ont pas d'action chez le rat (Liddle et al. 1986a). Par contre, les protéines induisent la libération de CCK chez l'homme (Liddle et al. 1985, Miazza et al. 1985) et le rat (Liddle et al. 1986a).

Autre facteur maintes fois évoqué et dont le rôle reste controversé: les acides aminés. Ce seraient, pour certains (Dale et al. 1989), des stimulants aussi puissants que

les oléates alors que, pour d'autres (Go et al. 1970, Konturek et al. 1986, Liddle et al. 1986), leur action serait bien moins importante.

Effets physiologiques

Ces dernières années, de nombreux rôles ont été attribués à la CCK. Si la plupart des résultats sont parfaitement établis, d'autres, cependant, le sont moins et certains effets ne sont pour l'instant que probables voire concevables.

1- Stimulation de la contraction de la vésicule biliaire

C'est en 1928 que la cholécystokinine fut découverte en tant que substance intestinale libérée dans le sang et agissant sur la contraction de la vésicule biliaire (Ivy et Oldberg 1928), ce que rappelle l'éthymologie de son nom. Des doses infimes de CCK-8 plasmatiques exogènes (7-8 pmol/l) provoquent une réduction du volume de la vésicule biliaire de près de 80% (Cantor et al. 1986). Les formes de grande taille (CCK-58, -39, -33) apparaissent aussi efficaces que les petites molécules (Lamers et al. 1983, Solomon et al. 1984). Toutes se fixent à des récepteurs membranaires des fibres musculaires de la paroi de la vésicule biliaire (Steigerwalt et al. 1984, Von Schrenck et al. 1988).

2- Stimulation de la sécrétion de l'amylase pancréatique

Les études expérimentales anciennes (Harper et Raper 1943) avaient conclu à l'existence d'un facteur hormonal dénommé pancréozymine qui, libéré de l'intestin du porc, était susceptible d'agir sur la sécrétion d'enzymes pancréatiques. Comme le triacontatriapeptide isolé de l'intestin grêle du porc par Mutt et Jorpes (1971) provoquait la contraction de la vésicule biliaire et stimulait la sécrétion pancréatique, il fut dénommé CCK-PZ puis finalement CCK dans la mesure où il s'agissait d'une seule et même molécule.

Le mécanisme d'action de la CCK au niveau de la cellule pancréatique est en partie connu (Jensen et al. 1989). La fixation de la CCK à un récepteur membranaire provoque l'hydrolyse d'un phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate en inositol 1, 4, 5 triphosphate et en diacylglycerol. L'inositol 1, 4, 5 triphosphate mobilise le Ca^{2+} des cavités du réticulum endoplasmique. Le Ca^{2+} active la protéine kinase calmoduline- Ca^{2+} dépendante et, conjointement avec le diacylgérol, assure l'activation de la protéine kinase C. Enfin, ces kinases sont responsables de la phosphorylation de protéines cytosoliques (non identifiées). Le processus sécrétoire nécessite, par ailleurs, la déphosphorylation de certaines protéines, en particulier d'une protéine de 21 kDa (Burhnam et Williams 1986).

Chez le rat, la trypsine intraluminaire exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion enzymatique pancréatique (Green et Lyman 1972, Ihse et al. 1979, Miyasaka et Green 1984), mécanisme vraisemblablement médiaté par la CCK (Louie et al. 1986, Fölsch et al. 1987) sans que l'on puisse, pour l'instant, déterminer comment la trypsine interagit avec la CCK. L'existence d'un tel mécanisme chez l'homme reste controversée.

A noter que d'autres facteurs sont également impliqués dans le contrôle de la sécrétion pancréatique ainsi que le prouvent des études utilisant des antagonistes de la CCK (Pendleton et al. 1987, Thor et al. 1988). L'acétylcholine libérée au niveau des terminaisons vagues pourrait être l'un de ces médiateurs.

3- Stimulation de la motilité intestinale

Elle s'exerce directement sur les cellules musculaires de l'antré (Fargeas et al. 1989) ou indirectement, à la suite d'une activation cholinergique sur le jéjunum et le colon (Stewart et Burks 1977, Hellstrom 1985, Kuwahara et al. 1986), la CCK et les peptides apparentés provoquant la libération d'acétylcholine du plexus myentérique (Vizi et al. 1973). La sérotonine et la substance P participeraient également à l'action stimulatrice de la CCK au niveau du colon (Wiley et Owyang 1987, Hutchinson et Dockray 1981).

4- Induction de la satiété

A la suite de la prise de nourriture, il y a augmentation des concentrations de la CCK plasmatique (Liddle et al. 1984, 1985, Cantor 1986) et libération de CCK hypothalamique (Schick et al. 1987). Par ailleurs, l'administration systémique de CCK exogène provoque une inhibition de l'ingestion d'aliments chez de nombreux Mammifères (réf. dans Gibbs et Smith 1988); en particulier, chez l'homme, elle induit la sensation subjective de satiété (Stacher et al. 1982). Au contraire, l'injection intrapéritonéale d'un antagoniste de la CCK stimule la prise de nourriture (Reidelberger et O'Rourke 1989). Il semblerait que le mécanisme d'action de la CCK périphérique s'exerce par une modification de la tension des muscles lisses gastriques, laquelle entraîne la transmission d'une information au système nerveux central via les voies afférentes du vague (Gibbs et Smith 1986).

La CCK endogène neuronale jouerait également un rôle dans l'effet de satiété provoqué par la prise de nourriture. Suggestion que les expériences effectuées chez le mouton, perfusions intra-cérébro-ventriculaires de très faibles doses de CCK (Della-Fera et Baile 1979, 1980) ou d'antagonistes de la CCK (Della-Fera et al. 1981) rendent crédibles, sans que l'on sache pour autant relier la fonction de la CCK centrale à celle de la CCK périphérique dans le contrôle du processus de satiété (Gibbs et Smith 1988).

5- Potentialisation de l'action de la sécrétine

La sécrétion de bicarbonates pancréatiques destinée à neutraliser l'acidité gastrique est sous contrôle d'une hormone intestinale, la sécrétine. Cette action est renforcée par des doses physiologiques de CCK (You et al. 1983, Olsen et al. 1986).

6- Inhibition de la vidange gastrique

La CCK ralentit la vidange gastrique (Debas et al. 1975, Liddle et al. 1986b).

En dehors de ces faits bien établis, diverses autres fonctions ont été attribuées à la CCK:

- une stimulation de la libération des enzymes intestinales (Mutt 1980), de la sécrétion hépatique de bile,
- un effet trophique sur le pancréas exocrine (Folsch et al. 1978, Balas et al. 1985),
- une stimulation de la sécrétion de lipase (Fink et al. 1985) et de pepsinogène (Hersey et al. 1982, Kasbekar et al. 1983, Raufman et al. 1986) par les glandes fundiques gastriques,
- une stimulation de la libération d'insuline, de glucagon (Hermansen 1984, Ruskakoff et al. 1987), de polypeptide pancréatique (Schwartz 1983),
- une inhibition de la sécrétion d'acide gastrique (Brooks et al. 1970, Bengtsson et Nilsson 1989) médiée par la libération de somatostatine à partir des cellules endocrines de la muqueuse gastrique (Bengtsson et al. 1989).

La CCK neuronale

Dans le système nerveux central des Mammifères, la CCK est présente en quantités importantes, en particulier au niveau du cortex cérébral; sa concentration est au moins équivalente à celle des catécholamines. Synthétisée dans les neurones, elle est stockée dans les vésicules synaptiques (Pinget et al. 1978, Studler et al. 1984) qui, convenablement stimulées, en réalisent la libération (Goltermann et al. 1981).

Dans le système nerveux, la forme prédominante et biologiquement active est la forme sulfatée de l'octapeptide C-terminal (Rehfeld et al. 1985). Des récepteurs sont cependant susceptibles de fixer la CCK-8 non sulfatée (Innis et Snyder 1980). Quant au tétrapeptide C-terminal (CCK-4), provenant de la dégradation de la CCK-8, également présent, ses effets seraient opposés à ceux de la CCK-8 (Agnati et al. 1983). En dehors de l'octapeptide et du tétrapeptide C-terminal, des formes de plus grande taille: CCK-58 (Eysselein et al. 1984, Tatemoto et al. 1984), CCK-39 (Han et al. 1987), CCK-33 (Eng et al. 1983, Han et al. 1987) sont également présentes.

La CCK, un neurotransmetteur

Libérée au niveau des terminaisons nerveuses à la suite d'une dépolarisation membranaire Ca^{2+} -dépendante (Emson et al. 1980, Dodd et al. 1980), susceptible de se lier à des récepteurs spécifiques, capable de modifier l'activité électrique des neurones (Dodd et Kelly 1981, Brooks et Kelly 1985, Willets et al. 1985), la CCK semble posséder les qualités d'un neurotransmetteur dont la libération pourrait être modulée par la dopamine (Meyer et Krauss 1983).

De façon surprenante, les seules données concernant son mode d'action ont été obtenues chez un invertébré, *Helix aspersa* (Hammond et al. 1987). Selon ces auteurs, la modulation du courant Ca^{2+} résultant de l'action de la CCK serait médiée par la protéine kinase C.

La CCK, un neuromodulateur; co-existence avec un neurotransmetteur

Depuis la démonstration par Hökfelt et al. en 1980 de la co-existence de CCK et de dopamine dans des neurones méso-limbiques, nombre d'études ont reporté la présence conjointe de CCK et de dopamine. Ainsi, chez le rat, la quasi-totalité des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* et de la *pars lateralis* de la substance noire

renferment de la CCK (Hökfelt et al. 1985). Par contre, aucun des neurones dopaminergiques de la *pars reticula* ne présente d'immunoréactivité anti-CCK (Hökfelt et al. 1985) et bien des neurones à CCK ne présentent pas d'activité tyrosine hydroxylase. A ces différences régionales s'ajoutent des différences spécifiques importantes: ainsi, si la coexistence a été prouvée dans le système nerveux de rat et de chat, elle n'a pu être démontrée chez d'autres espèces (singe, cobaye, homme) (Hökfelt et al. 1986, Palacios et al. 1989).

De nombreuses données convergent pour attribuer un rôle de neuromodulateur à la CCK. Parmi celles-ci:

- (1) La CCK exogène a des effets dose-dépendants sur le niveau de base de la dopamine et de la noradrénaline dans diverses régions du cerveau de rat (Telegdy et al. 1980),
- (2) l'administration d'un anticorps anti-gastrine/CCK modifie la concentration de dopamine, inhibant les effets de la CCK (Fekete et al. 1981),
- (3) la CCK-8S exogène module l'utilisation de dopamine endogène (Penke et al. 1985),
- (4) la CCK-8S module la libération K^+ dépendante de dopamine au site présynaptique (Wang et al. 1985). Dans la substance noire du rat, la CCK exogène, administrée microiontophoriquement augmente la décharge de la cellule dopaminergique, provoquant comme le font les neuroleptiques, une hypersensibilité des autorécepteurs dopaminergiques (Skirboll et Hommer 1985),
- (5) la CCK-8 augmente la liaison des agonistes de la dopamine et réduit la liaison des antagonistes aux récepteurs membranaires du striatum (Agnati et al. 1985). Inversement, l'haloperidol, antagoniste de la dopamine, augmente la liaison de la CCK aux récepteurs du cortex cérébral (Chang et al. 1983, Fukamauci et al. 1987),

- (6) la CCK-8S potentialise les effets de la dopamine dans la région postérieure du noyau accumbens où il y a présence de neurones mixtes dopamine-CCK. Elle les réduit, au contraire, dans la partie antérieure où les fibres dopaminergiques et à CCK sont distinctes (Studler et al. 1985).

La présence de plusieurs peptides au sein d'un même neurone a été très souvent et très clairement démontrée chez les Vertébrés. Plus particulièrement la CCK a pu être co-localisée avec la substance P (Skirboll et al. 1982, Dalsgaard et al. 1982, Hökfelt et al. 1985, Tuschere et Seybold 1985, Tuschere et al. 1987), le neuropeptide Y (Ciofi 1987, Härfstrand et al. 1987), la somatolibérine (Ciofi 1987), l'ocytocine (Vanderhaeghen et al. 1981, Martin et al. 1983, Kiss et al. 1984), la corticolibérine et la vasopressine (Mezey et al. 1985), la met-enképhaline (Martin et al. 1983, Gall et al. 1987), le polypeptide intestinal vaso-actif (Ogawa et al. 1989).

La signification de la co-localisation de plusieurs peptides dans un même neurone reste obscure.

Fonctions de la CCK neuronale

Les propriétés physiologiques et neuropharmacologiques de la CCK neuronale sont multiples. Ainsi:

- (1) elle contrôle la prise de nourriture (Della-Fera et Baile 1979, 1980, Baile et Della-Fera 1985) et les attitudes comportementales médiées par la dopamine (Crawley 1985, Crawley et al. 1985),
- (2) elle régule les rythmes respiratoire (Denavit-Saubié et al. 1985) et cardiovasculaire (Härfstrand et al. 1987),
- (3) elle présente des effets antipsychotiques lors de schizophrénies neuroleptiques-résistantes (Moroji et al. 1982, Nair et al. 1983) et une action analgésique (Jurna et Zetler 1981) liée vraisemblablement à la libération d'opioïdes agissant au niveau de récepteurs Δ (Hong et Takemori 1989),

- (4) elle module les sécrétions antéhypophysaires *in vitro* et *in vivo*, jouant un rôle de libérine (Vanderhaeghen et al. 1985) provoquant la libération d'ACTH (Mezey et al. 1985), de prolactine (Malarkey et al. 1981), d'hormone de croissance (Morley et al. 1979),
- (5) elle stimule la libération de vasopressine par la posthypophyse (Marley et al. 1984).

Dégradation de la CCK

L'hydrolyse réalisée par des exopeptidases libérées dans l'espace extracellulaire est responsable de la perte rapide de signification des signaux peptidiques au niveau cérébral. Ainsi la CCK neuronale est très rapidement dégradée après exocytose (Deschodt-Lanckman et al. 1984, Deschodt-Lanckman 1985, Najdowski et al. 1987).

Les travaux les plus récents (Rose et al. 1989, Camus et al 1989) tendent à prouver qu'une sérine endopeptidase coupant la liaison Met-Gly représente la peptidase d'inactivation majeure de la CCK-8. D'autres voies peuvent exister, en particulier lorsque la sérine peptidase est inhibée. Dans ce cas, l'hydrolyse de la CCK-8 peut conduire à la formation de CCK-4 et de CCK-6 (Camus et al. 1989).

FORMES APPARENTÉES A LA CCK

La CCK et la gastrine ont le même pentapeptide C-terminal Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, séquence que l'on retrouve au niveau de la caeruleine, un peptide de dix acides aminés présent chez les Amphibiens. Ces trois peptides possèdent également une tyrosine sulfatée en position 6 à partir de l'extrémité C-terminale pour la gastrine, en position 7 pour la CCK et la caeruleine (fig. 3). Il semble évident que les activités spécifiques de ces trois peptides soient à mettre en relation avec les régions spécifiques qui différencient ces peptides.

Les précurseurs de la gastrine, de la CCK et de la caeruleine n'ont en commun que leur extrémité C-terminale. En particulier, différents précurseurs de la caeruleine ont été identifiés dont l'un au moins renferme deux séquences de la caeruleine (Richter et al. 1986, Vlasak et al. 1987). Les sites de clivage diffèrent également dans le cas de la progastrine et de la procaeruleine les clivages se font au niveau de paires de résidus basiques, dans celui de la pro-CCK, ils surviennent au niveau de singlets basiques.

Chez les Insectes, des peptides présentant une homologie de plus de 50 % avec la gastrine/CCK ont été isolés (fig. 3). Dénommés leucosulfakinines I et II chez la blatte *Leucophaea maderae* (Nachman et al. 1986a, b), périssulfakinines chez la blatte *Periplaneta americana* (Nichols et al. 1989), drosulfakinines chez la drosophile (Nichols et al. 1988), elles s'apparentent à la gastrine/CCK. Plus précisément, trois des cinq résidus sont communs Gly-X₁-Met-X₂-Phe-NH₂ et une tyrosine sulfatée est présente en position 6. Bien que présentant des homologies certaines avec la gastrine de par la position de leur résidu tyrosyl sulfate, les leucosulfakinines en diffèrent nettement par la présence de deux substitutions dans le tétrapeptide C-terminal: une histidine remplace un tryptophane et une arginine un acide aspartique. Ainsi le tripeptide C-terminal a la même séquence que l'extrémité C-terminale du FMRF-amide. Par contre leur partie N-terminale est proche de la partie N-terminale de la CCK-12. Ces molécules assurent la contraction de la musculature intestinale (Nachman et al. 1986a). L'action myotrope exercée par ces peptides nécessite obligatoirement la présence d'une tyrosine sulfatée, que celle-ci soit en

Cholécystokinine	:	SO_3 -Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
Gastrine	:	SO_3 -Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
Caeruléine	:	SO_3 pGlu-Gln-Asp-Tyr-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
Phyllocaeruléine	:	SO_3 pGlu-Glu-Tyr-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
Cionine	:	SO_3 SO_3 Asn-Tyr-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
Leucosulfakinine I	:	SO_3 Glu-Gln-Phe-Glu-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH ₂
Périsulfakinine I	:	SO_3 Glu-Gln-Phe-Glu-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH ₂
Leucosulfakinine II	:	SO_3 pGlu-Ser-Asp-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH ₂
Perisulfakinine II	:	pGlu-Ser-Asp-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH ₂
Drosulfakinine I	:	(SO ₃) Phe-Asp-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH ₂
Drosulfakinine II	:	(SO ₃) Asp-Gln-Phe-Asp-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH ₂

Figure 3 - Structure primaire des peptides apparentés à la gastrine et à la CCK. L'étude des correspondances concernant la partie C-terminale indique clairement l'existence de deux sous-familles de molécules.

position 6 ou 7 à partir de l'extrémité C-terminale (Nachman et al. 1989). Ainsi, chez les Insectes, la position de la tyrosine sulfatée ne semble pas primordiale. Cela semble être également le cas chez les Amphibiens et les Poissons chez lesquels gastrine et CCK ne sont pas identifiables séparément (Larsson et Rehfeld 1977).

Un peptide apparenté à la CCK (de séquence inconnue) est présent dans le système nerveux stomodermique de *Palinurus interruptus* (Turrigiano et Selverston 1989) d'où il peut être libéré à la suite d'une stimulation du nerf stomodermique. Il agit sur le rythme de contractions du moulin gastrique.

A l'aide de tests immunohistochimiques, des molécules apparentées à la gastrine/CCK ont également été identifiées chez les Ascidiacés (Thorndyke et Dockray 1986, Conlon et al. 1988). Plus proche de la gastrine pour les uns (Thorndyke et Dockray 1986), plus proche de la CCK pour les autres (Conlon et al. 1988) il s'agit en fait d'une molécule qui, en plus du térapeptide C-terminal commun à la gastrine et à la CCK, possède 2 résidus tyrosyl sulfatés en position 6 et 7 à partir de l'extrémité C-terminale (fig. 3) (Johnsen et Rehfeld 1990). La présence de ces deux résidus sulfatés, l'un en position 6, l'autre en position 7, laisse supposer qu'elle correspond à la molécule ancestrale de laquelle dériveraient la CCK et la gastrine des Mammifères.

MATERIEL ET METHODES

Matériel Biologique

Récolte

Notre étude a été réalisée sur une espèce de Néréidiens, *Nereis diversicolor* O.F. Müller, que nous avons récoltée à l'embouchure du fleuve côtier l'Aa à Petit-Fort-Philippe (Nord) ou à la station de Biologie de Luc-sur-Mer (Calvados).

Conservation

Les animaux, dès leur transfert au laboratoire, sont plongés dans l'azote liquide, ou, en vue du prélèvement ultérieur du cerveau, maintenus dans l'eau de mer, à 4°C. La limite prostomium-péristomium étant aisément identifiable, il nous était aisé de séparer, d'un coup de ciseaux fins, le prostomium du reste du corps. Sitôt prélevés, les prostomiums sont immédiatement immergés dans l'azote liquide et ce jusqu'à utilisation. Le reste du corps est également plongé dans l'azote liquide puis maintenu congelé à -20°C afin d'éviter au maximum tout risque de dégradation de la molécule peptidique recherchée.

Méthodes

Réalisation de l'extrait brut

Les molécules peptidiques sont extraites successivement à l'eau bouillante et à l'acide acétique 0,5 M (Rehfeld et al. 1985). Les concentrations obtenues, quoique faibles, sont supérieures à celles que fournissent les extractions à l'acide chlorhydrique ou au méthanol.

La procédure employée est la même, qu'il s'agisse de prostomiums isolés ou de corps entiers. L'extraction se déroule pendant 10 mn dans l'eau bouillante (25 prostomiums par ml d'eau ou 1 g de corps dans 5 ml d'eau). Après broyage au Polytron à vitesse maximale, l'extraction est poursuivie pendant 10 mn avant homogénéisation

(homogénéiseur type "S" Braun) et centrifugation (10.000 t/mn pendant 1 h à 4°C). Le culot est réextrait dans un même volume d'acide acétique 0,5 M et centrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant acide est additionné au précédent.

Purification de l'extrait

1- Préparation de l'échantillon pour l'injection en chromatographie liquide à haute performance

a) Passage sur cartouche Sep Pak C₁₈

Trois cartouches Sep Pak C₁₈ (Waters) montées en série permettent de réaliser une première chromatographie destinée à éliminer les composés hydrophiles de l'extrait acide. Les cartouches sont préalablement activées par 10 ml d'une solution d'acétonitrile à 80 %, équilibrées par 10 ml de milieu d'extraction (acide acétique 0,25 M) et lavées par 10 ml d'eau renfermant 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA).

Après passage de l'extrait, deux éluations successives sont réalisées; la première à l'eau -TFA 0,1 %, la seconde par un mélange 30 % acétonitrile-0,1 % TFA. Elles permettent d'éliminer les composés les plus hydrophiles. Une troisième élution par un mélange 50 % acétonitrile-0,1 % TFA permet de récupérer des peptides plus hydrophobes dont le matériel apparenté à la gastrine/CCK. Les colonnes sont enfin rincées par de l'acétonitrile à 80 % renfermant 0,1 % de TFA.

b) Passage sur colonne d'affinité

L'éluat est évaporé partiellement sous vide grâce à un évaporateur rotatif (Büchi) ou au Speed Vac afin d'éliminer l'acétonitrile, puis neutralisé par de l'ammoniaque et centrifugé (10.000 t/mn, 30 mn, 4°C) avant passage sur colonne d'affinité.

Préparation de la colonne d'affinité

Elle a été réalisée à l'INSERM U 16 selon une procédure mise au point par D. Croix.

Préparation du gel

La préparation du gel (Affi Gel-10, Bio Rad) nécessite deux lavages successifs au propanol (à -20°C) puis à l'eau bidistillée. A chaque fois, trois volumes de liquide de lavage sont utilisés pour un volume de gel. Les liquides de lavage sont éliminés après centrifugation à 3.000 t/mn pendant 5 mn à 4°C.

Préparation des anticorps

Le sérum de lapin renfermant les anticorps (anticorps 86 dirigé contre l'octapeptide C-terminal sulfaté de la cholécystokinine, fourni par G. Tramu, Université de Bordeaux I) est mélangé à un même volume de solution physiologique (NaCl à 9 ‰). La précipitation est réalisée par un même volume de sulfate d'ammonium. Après centrifugation (4.000 t/mn, 10 mn, 4°C), le culot est repris dans un même volume de sulfate d'ammonium dilué de moitié. Une nouvelle centrifugation permet de récupérer le culot, lequel est finalement dissous dans un volume d'eau égal à la moitié du volume de sérum de départ. Une dialyse dans une solution de NaCl à 9 ‰ (48 h à 4°C) est nécessaire avant de procéder au couplage avec l'Affi Gel-10.

Couplage des anticorps au gel

Après dialyse, les anticorps sont lyophilisés puis mélangés à l'Hépes 0,1 M, pH 7,8 à raison de 30 mg d'anticorps pour 6 ml de tampon Hépes. Afin de bloquer les groupes réactifs qui ne sont pas couplés aux immunoglobulines, 1 ml d'éthanolamine M, pH 8 est ajouté par ml de gel. Le gel est lavé abondamment à l'eau distillée puis au tampon phosphate 0,05 M avant d'être coulé lentement dans la colonne, préalablement rincée au tampon phosphate (1 h).

Utilisation de la colonne d'affinité

Avant utilisation, la colonne est lavée par du tampon phosphate salin (PBS)

Composition du PBS : NaCl (0,15 M)	8	g
KH ₂ PO ₄ (anhydre)	0,20	g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	2,29	g
Tween	0,01	%
Eau bidistillée	1	l

Le passage de l'extrait neutralisé se fait à un débit de 15 ml/h. La colonne est ensuite lavée par le même tampon dont la composition en NaCl et Tween est cependant augmentée (la molarité est de 0,25 M et la concentration en Tween de 0,05 %). Les concentrations plus élevées de NaCl et de Tween permettent d'éliminer les molécules non spécifiques adsorbées à la matrice d'autant que le volume de liquide de lavage utilisé est 5 à 10 fois celui de la colonne. L'élution de la colonne est enfin réalisée au même débit avec 2 ml d'acide propionique 1M suivie de PBS. Les fractions de 1 ml obtenues sont testées en RIA et seules celles qui se révèlent immunoréactives sont concentrées au Speed-Vac et réunies avant d'être analysées en HPLC.

2- Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Le choix de l'HPLC s'explique par la sensibilité et les performances de cette technique de séparation dans l'analyse de petites molécules. Elle assure une bonne résolution des mélanges de peptides présents en faible quantité et donne un bon rendement.

La purification du peptide a été réalisée sur une colonne ultrasphère octadecylsilane (ODS), C 18, 5 μ (150 mm de longueur x 5,6 mm de diamètre interne, Beckman) reliée à un système monopompe LKB. La densité optique des molécules éluées est lue à 226 nm. Les solvants utilisés sont l'acétonitrile (Backer) et l'eau (Milli Q,

Millipore) avec comme additif l'acide trifluoroacétique 0,1 % jouant un rôle de contre-ions. L'échantillon injecté en HPLC est collecté par fractions de 1ml/mn en sortie de colonne, lesquelles sont de nouveau testées en RIA.

Deux gradients ont été utilisés: (1) en HPLC 1 le gradient est linéaire, de 0 à 80 % d'acétonitrile en 30 mn; (2) en HPLC 2 de 0 à 20 % d'acétonitrile en 5 mn, de 20 à 40 % d'acétonitrile en 70 mn et enfin de 40 à 60 % d'acétonitrile en 25 mn. Les molécules de référence (CCK-4, 8S, 33, gastrine 1-17) ont permis d'étalonner la colonne. En HPLC 1, la CCK-4 (Peninsula Laboratories) est éluée à 39 % d'acétonitrile, la CCK-8S (Peninsula Laboratories) à 40,5 % d'acétonitrile, la CCK-33 (Peptide Institute) à 16 % d'acétonitrile et la gastrine 1-17 marquée (Kit RIA, Oris Industrie) à 44 % d'acétonitrile (fig. 6).



Dosage radioimmunologique

C'est une méthode analytique combinant la sensibilité des mesures radioactives et la spécificité de la réaction antigène-anticorps, permettant de doser des substances à des concentrations infimes.

1- Principe du dosage

Le principe du dosage repose sur la compétition entre un antigène marqué et l'antigène à doser, vis-à-vis d'un même anticorps présent en quantité limitée. A la fin de la période d'incubation, la quantité d'antigène marqué est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène à doser présent dans le tube. Les antigènes libres sont alors séparés des complexes antigène-anticorps par précipitation des complexes et élimination du surnageant.

2- Protocole expérimental

Un aliquot de 100 µl de chaque fraction collectée en HPLC ou après passage sur colonne d'affinité est prélevé en vue du dosage RIA. L'hormone radioactive

est de la CCK-8 (SO₄) marquée à l'iode¹²⁵ selon le procédé Bolton-Hunter ou plus rarement de la gastrine ¹²⁵I synthétique humaine (Kit GASK-PR, Oris Industrie).

Différents immunsérums ont été utilisés: un sérum "de routine" anti-CCK-8NS (Ac 15/8) présentant une même affinité pour la CCK et la gastrine, fourni par G. Tramu (Université de Bordeaux I); les anticorps 1651 et 1653 (Amersham) spécifiques de la gastrine. L'anticorps 1651 dirigé contre la gastrine 34 reconnaît toutes les formes de gastrine contenant la partie médiane ou C-terminale, par contre il ne reconnaît pas la CCK-4 et faiblement les CCK-8, -33 et -39. L'anticorps 1653 dirigé contre la gastrine humaine 17 est spécifique de l'extrémité N-terminale de la gastrine. Les réactions croisées avec d'autres peptides sont de ce fait inférieures à 1 %.

Le dosage nécessite dans un premier temps la réalisation d'une courbe d'étalonnage. Celle-ci consiste à calculer le pourcentage de liaison d'une série de concentrations connues d'antigènes avec une même quantité d'antigène marqué en présence d'une quantité limitée d'anticorps. A titre d'exemple, les valeurs des standards CCK-8S utilisés en présence d'anticorps 15/8 dilué au 1/800.000 sont de 0.57 pg, 1.14 pg, 2.28 pg, 4.56 pg, 11.14 pg, 57 pg, 114 pg, 285 pg, 570 pg. Tous dérivent de la dilution d'une solution mère de 5,7 ng/ml soit 0,5 nM.

Les standards CCK (100 µl) ainsi que les aliquots des différentes fractions à tester (100 µl) sont ajoutés à 500 µl de tampon RIA (tampon phosphate 0,05 M contenant 0,2 % de gélatine et 10 mM EDTA), pH 7,4. 100 µl d'anticorps sont additionnés et 2 heures plus tard 100 µl d'hormone marquée. Les tubes sont gardés une nuit à température ambiante.

La séparation de la fraction liée de la fraction libre se fait par utilisation de charbon actif.

RESULTATS ET DISCUSSION

Caractérisation de la molécule apparentée à la gastrine/CCK

La méthodologie employée (RP-HPLC) est rappelée figure 4. Les fractions collectées en sortie de colonne sont testées en RIA en utilisant différents anticorps spécifiques dirigés contre l'octapeptide C-terminal de la CCK ou la gastrine (fig. 5).

- l'anticorps 15/8 reconnaît autant la CCK-8S que la CCK-8NS ou la gastrine (Studler et al. 1984). C'est au niveau du pentapeptide C-terminal amidé que se situe l'épitope reconnu par l'anticorps.

- l'anticorps 1651 dirigé contre la gastrine 34 reconnaît toutes les formes de gastrine (G 17, G 34).

- l'anticorps 1653 spécifique de la gastrine humaine 17 à cause de sa spécificité N-terminale.

En HPLC, dans un gradient d'acétonitrile 0-80 %, 77 % du matériel immunoréactif est élué entre 33 et 51 % d'acétonitrile. La fraction majeure renfermant 23 % de l'immunoréactivité totale est élue entre 41 et 44 % d'acétonitrile (fig. 6). Les standards, CCK-4, CCK-8S, gastrine 17, CCK-33 sont respectivement élués à 39, 40,5, 44 et 46 % d'acétonitrile (fig. 6).

Comparativement, les anticorps 1651 et 1653 détectent des concentrations nettement plus faibles, voire nulles de matériel apparenté à la gastrine/CCK. Une réponse positive ne s'obtient que lorsque les extraits sont 5 à 10 fois plus concentrés. Dans ce cas, le matériel immunoréactif est élué dans les mêmes fractions que celles reconnues par l'anticorps 15/8.

Il n'y a pas correspondance entre la molécule recherchée et les standards. Certains de ceux-ci sont élués plus rapidement (CCK-4, CCK-8S), d'autres moins vite (gastrine 17, CCK-33) que ne l'est la majeure partie du matériel immunoréactif.

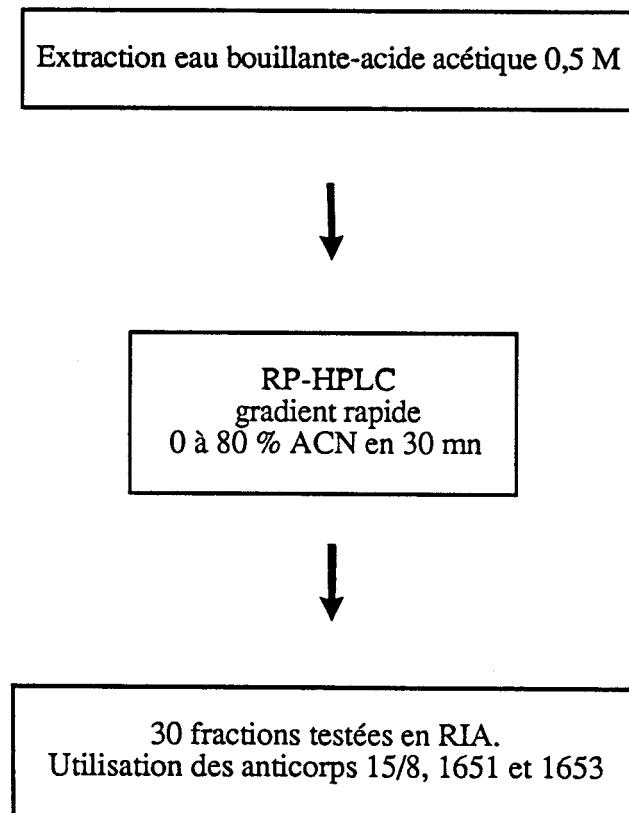


Figure 4 -Procédure de caractérisation de la molécule apparentée à la gastrine/CCK.

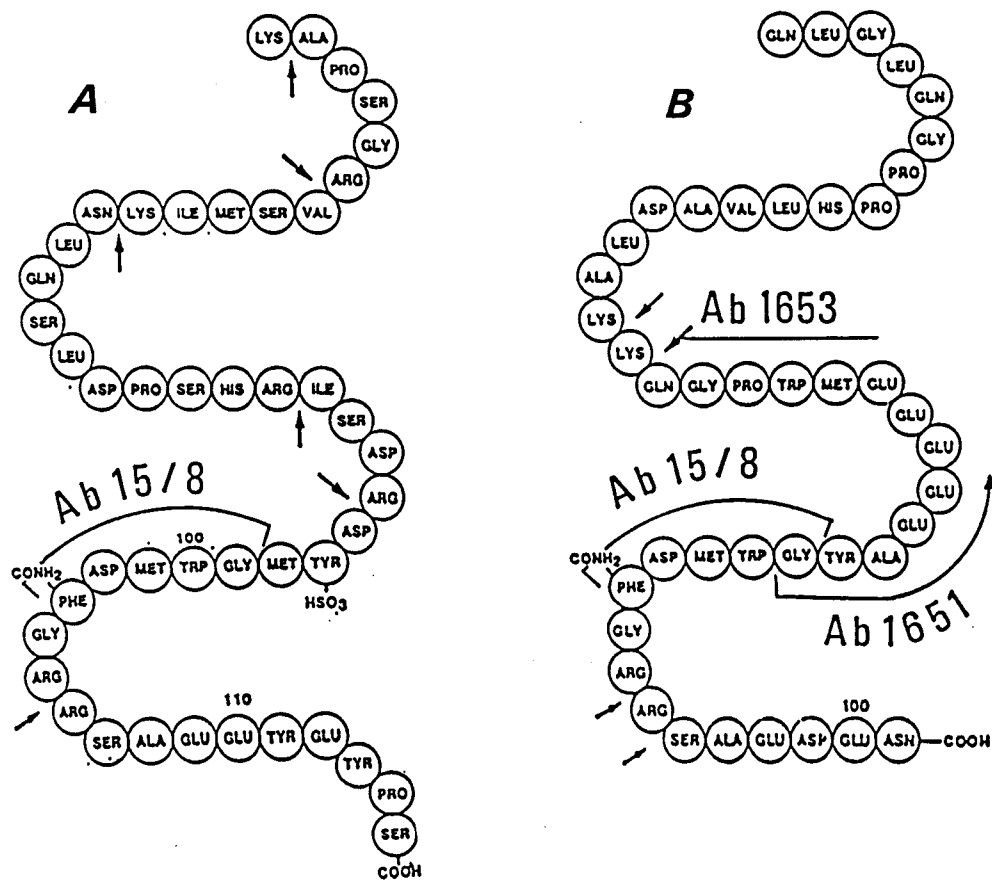


Figure 5 - Reconnaissance par les anticorps 15/8, 1651 et 1653 de séquences spécifiques de la partie C-terminale de la préproCCK et de la préprogastrine: (A) séquence 61-115 de la préproCCK; (B) séquence 54-101 de la préprogastrine. Les flèches indiquent les sites de coupure des précurseurs.

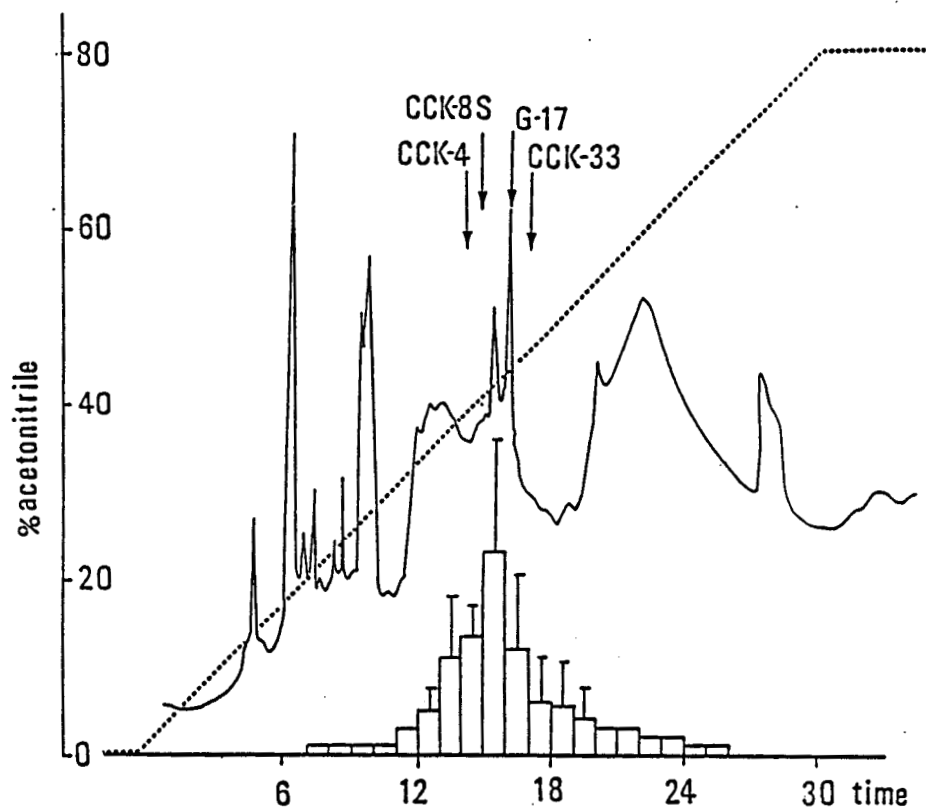


Figure 6 - Profil d'élution après chromatographie liquide à haute performance d'un extrait à l'eau bouillante-acide acétique de 25 prostomiums et immunoréactivité relative des différentes fractions. Les temps de rétention de la CCK-4, de la CCK-8S, de la CCK-33 et de la gastrine sont indiqués.

Les anticorps 1651 et 1653 sont spécifiques de la gastrine. Ils ne présentent de réaction croisée avec la CCK-8 que dans des proportions très faibles, inférieures à 2 %. Cependant, comme les concentrations qu'ils détectent sont particulièrement faibles, il ne peut être exclu que les valeurs enregistrées soient la conséquence de ces réactions croisées. Par ailleurs, comme le matériel reconnu par l'anticorps 15/8 ne l'est pas dans sa très grande majorité par les anticorps anti-gastrine, nous pouvons déduire que la molécule recherchée ne présente vraisemblablement pas d'autre homologie avec la gastrine, en dehors de l'extrémité C-terminale.

L'hypothèse selon laquelle les peptides d'Invertébrés apparentés à la gastrine/CCK des Mammifères étaient plus proches de la CCK que de la gastrine semblait relativement bien étayée (Duve et al. 1985, Conlon et al. 1988). En fait, les travaux récents suggèrent qu'il puisse en être autrement. En particulier, chez les Insectes, les leucosulfakinines (Nachman et al. 1986a, b) et les périssulfakinines (Veenstra, 1989) des blattes ainsi que les drosulfakinines de la drosophile (Nichols et al. 1988) possèdent une tyrosine en position 6 à partir de l'extrémité C-terminale (donc comparable à la gastrine). Les sulfakinines ne possèdent cependant que 3 des 5 résidus C-terminaux de la gastrine et de la CCK (fig. 3) et la question se pose désormais de leur appartenance même à la famille gastrine/CCK. Chez l'ascidie, la cionine (Johnsen et Rehfeld, 1990), molécule apparentée à la gastrine/CCK, possède deux tyrosines sulfatées, respectivement en position 6 et 7. Elle pourrait ainsi constituer la molécule ancestrale de laquelle sont issues la gastrine et la CCK des Mammifères.

Ne disposant pas d'anticorps susceptibles de reconnaître la position d'une éventuelle tyrosine sulfatée, il nous est impossible de préciser davantage le lien de parenté de notre molécule avec la gastrine et la CCK, seule l'extrémité C-terminale étant vraisemblablement, tout ou partie, commune.

Hétérogénéité de la molécule apparentée à la gastrine/CCK

Après RP-HPLC en gradient rapide (RP-HPLC₁), la plus grande partie du matériel immunoréactif est éluée dans les fractions renfermant de 33 à 51 % d'acétonitrile (fig. 6).

Le matériel issu de plusieurs RP-HPLC₁, équivalent à 200 prostomiums est soumis à une seconde RP-HPLC en gradient lent (RP-HPLC₂) (0 à 20 % d'acétonitrile en 5 mn, 20 à 40 % d'acétonitrile en 70 mn, 40 à 60 % d'acétonitrile en 25 mn). La procédure est rappelée figure 7. Dans ces conditions, plusieurs fractions nettement séparées les unes des autres, sont détectées par RIA (fig. 8). La plus hydrophobe est éluée pour des concentrations de 23 à 24 % d'acétonitrile (temps de rétention: 17 à 19 mn), la seconde pour des concentrations de 26,5 à 27,5 % (temps de rétention: 29 à 31 mn) et la plus hydrophile pour des concentrations de 29,5 à 30,5 % (temps de rétention: 39 à 42 mn).

La présence de plusieurs fractions immunoréactives traduit la nature hétérogène du matériel gastrine/CCK des Polychètes. Un tel résultat est à rapprocher des résultats obtenus chez les Mammifères, les Poissons et les Arthropodes. Chez les Mammifères, comme nous l'avons signalé précédemment, le métabolisme post-traductionnel du précurseur conduit à la formation de plusieurs formes moléculaires de longueur variable (fig. 2). Il semble en être de même chez les Poissons (Vigna et al. 1985), chez les Crustacés (Favrel et al. 1987), Van Wormhoudt et al. 1989) et chez certains Insectes (Duve et al. 1985) où l'existence de plusieurs formes moléculaires de masse différente a été démontrée. En particulier, chez *Calliphora vomitoria*, trois formes moléculaires dont l'une (le précurseur ?) de masse élevée coexistent (Duve et al. 1985). Par contre, les précurseurs à l'origine des sulfakinines d'Insectes ne semblent pas scindés en plusieurs peptides enchassés les uns dans les autres comme le sont les différentes

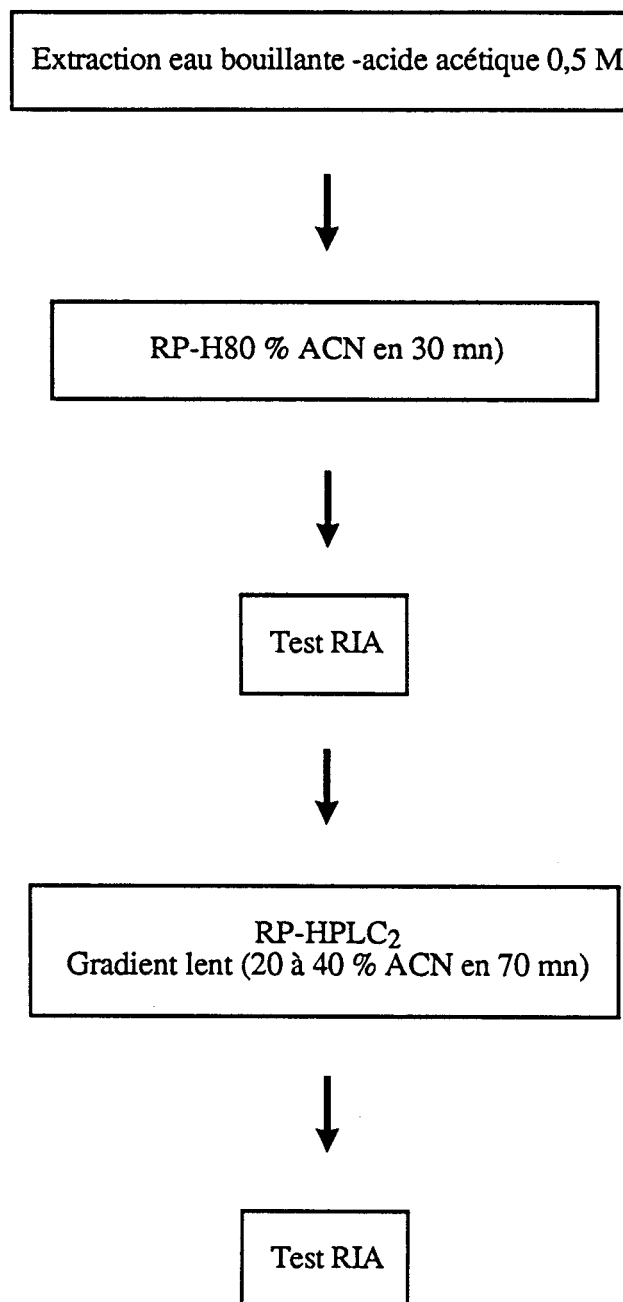


Figure 7 -Procédure de purification des molécules apparentées à la gastrine/CCK. Procédure réalisée par chromatographies successives à partir de prostomiums isolés.

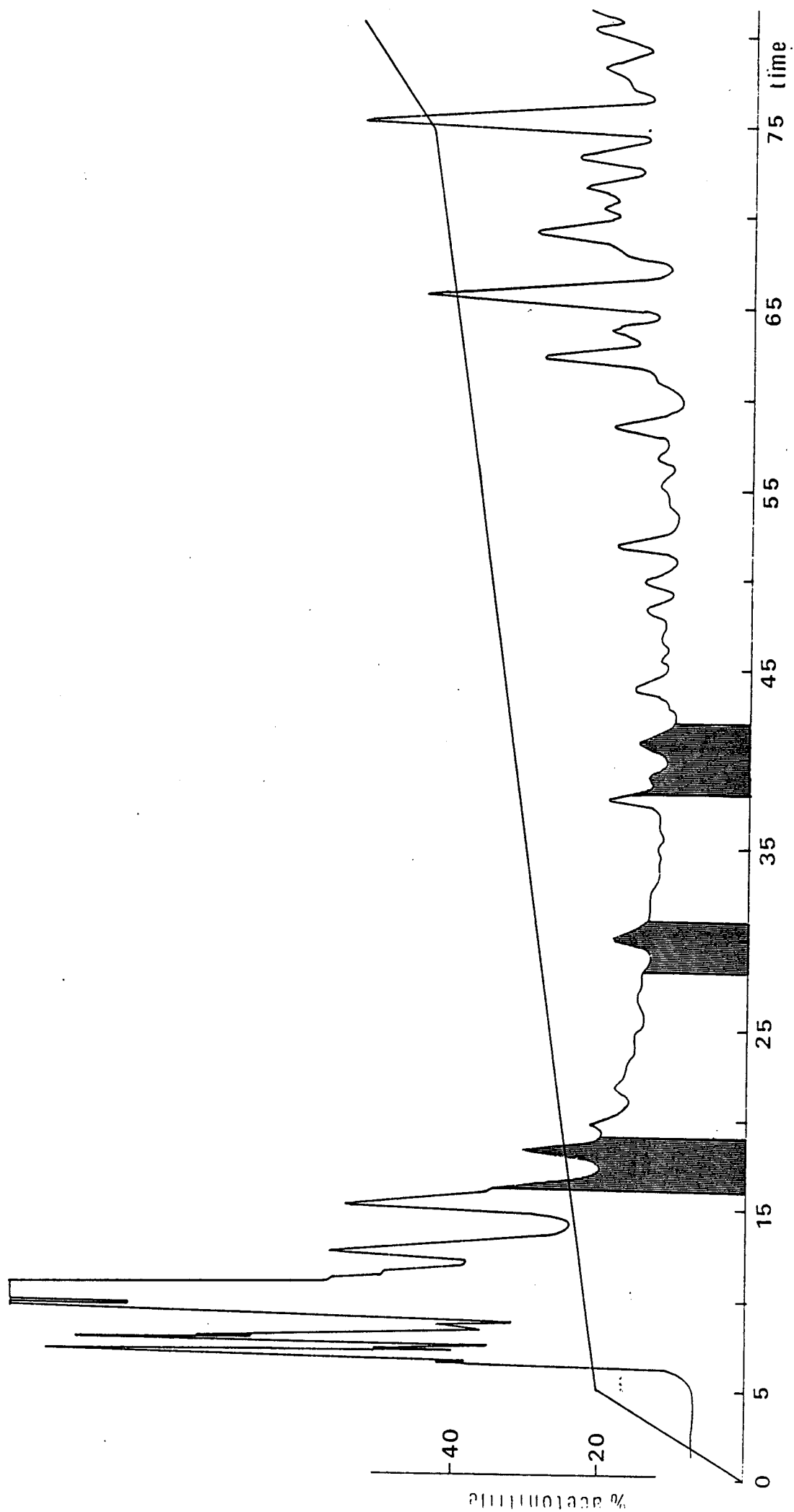


Figure 8 - Profil d'élution après RP-HPLC₂ du matériel apparenté à la gastrine/CCK. En grisé les zones immunoréactives

formes moléculaires de la CCK ou de la gastrine. Ainsi, les sulfakinines ne diffèrent les unes des autres que par des substitutions mineures d'acides aminés (fig. 3), la maturation de leur précurseur différente de celle de la préproCCK confortant l'hypothèse de leur appartenance à une famille peptidique originale.

Purification de la molécule apparentée à la gastrine/CCK

Le séquençage d'une molécule peptidique, qui est le but de la purification, ne peut se faire à moins de dix picomoles par acide aminé. Ainsi le séquençage d'un peptide de dix acides aminés ne peut être envisagé à moins de posséder quelques 100 pmol soit environ 10 ng de produit pur.

Chez les Néréidiens, après extraction à l'eau bouillante-acide acétique, les rendements, bien que supérieurs à ceux obtenus après extraction à l'HCl ou au méthanol, sont très faibles et difficilement mesurables. Dans notre système RIA, les mesures directes effectuées sur l'extrait se révèlent négatives ou à la limite de la détection même lorsqu'elles sont réalisées à partir d'extraits provenant de quelques cinquante prostomiums. Par contre en RP-HPLC₁, après injection d'un même extrait de cinquante prostomiums, l'immunoréactivité est détectable dans plusieurs fractions. Il est vraisemblable que lors des mesures directes, l'immunoréactivité "potentielle" de l'extrait est masquée par diverses molécules que l'évaporation réalisée avant le test RIA a concentré (dans le cas d'un extrait provenant de 50 prostomiums le volume est ramené de 4 ml à 100 µl).

Il n'en demeure pas moins que les valeurs obtenues même en RP-HPLC₁ sont faibles et que la relative pauvreté du cerveau en peptides ou autres molécules biologiquement actives, est une constante des Néréidiens. Ainsi un cerveau de *Nereis virens* ne renferme que 300 à 700 fmol de FMRF amide (Krajniak et Price 1990) et il faut de 20 à 30 cerveaux pour extraire suffisamment de SIF pour détecter une quelconque réponse biologique (Bulet, communication personnelle).

Pour augmenter les rendements nous avons été amené à extraire non seulement les peptides du cerveau, mais aussi ceux du ganglion sous-oesophagien et des nombreux ganglions de la chaîne nerveuse ventrale.

La purification nécessite une phase préparative. Réalisée sur cartouches de silice C₁₈ (Sep-Pak C₁₈), elle permet d'éliminer les molécules hydrophiles et permet de traiter de grands volumes. Lorsqu'on procède à des éluions successives correspondant à des concentrations croissantes d'acétonitrile (20, 30, 40, 50 %), le matériel immunoréactif est essentiellement élué par des concentrations d'acétonitrile de 40 et 50 %. Par contre, peu de matériel immunoréactif est élué par le mélange acétonitrile 30 %-acide trifluoroacétique 0,1 %. Il est à remarquer que la présence de peptides immunoréactifs dans plusieurs éluats consécutifs est vraisemblablement la conséquence de l'hétérogénéité de notre molécule au sein de l'extrait.

L'élimination des molécules hydrophiles ayant été réalisée par le mélange acétonitrile 30 %-acide trifluoroacétique 0,1 %, le matériel immunoréactif est élué à l'acétonitrile 50 %-acide trifluoroacétique 0,1 % avant passage sur colonne d'affinité (fig. 9). Les molécules retenues au niveau de la colonne d'affinité sont éluées à l'acide propionique 1 M et les fractions immunoréactives concentrées au Speed-Vac; l'évaporation permettant l'élimination de l'acide propionique. L'éluat enrichi est alors

soumis à une séparation par RP-HPLC; la chromatographie liquide à haute performance en phase réverse représentant la technique la plus performante pour la purification des peptides.

Chez *Nereis diversicolor*, les pigments sont particulièrement abondants et divers comme le suggère le nom d'espèce. Bien qu'ils soient très faiblement retenus en colonne d'affinité, ils sont suffisamment présents dans l'éluat pour qu'ils puissent interférer avec la molécule recherchée en RP-HPLC. Ainsi, les pigments correspondent à la majorité si ce n'est à la totalité des pics des profils d'élution de RP-HPLC₁. Pour les éliminer au maximum, deux étapes de RP-HPLC préliminaires sont indispensables (fig. 9). De la première, à gradient rapide (RP-HPLC₁), seules les fractions éluées pour des concentrations d'acétonitrile comprises entre 40 et 53 % sont collectées. Evaporées et réunies, elles sont soumises à une seconde séparation (RP-HPLC₂) à gradient lent.

Une vingtaine de fractions immunoréactives regroupées en quatre zones, bien délimitées les unes des autres, sont détectées en RIA (fig. 10). La molécule la plus hydrophile est éluée à 23-24 % d'acétonitrile (temps de rétention: 13-17 mn), la seconde à 26-27 % d'acétonitrile (temps de rétention: 25-30 mn), la troisième, la plus importante, à 29-31 % d'acétonitrile (temps de rétention: 37-43 mn) et la dernière à 33-34 % d'acétonitrile (temps de rétention: 50-53 mn). Trois de ces zones correspondent à celles précédemment démontrées lors de l'étude des prostomiums isolés, après passage direct de l'extrait en RP-HPLC₁ et RP-HPLC₂. La quatrième, plus hydrophobe n'avait pas été détectée. Comme il s'agit également de la moins importante des quatre zones identifiées, il est vraisemblable que nous n'avons pas été à même de la démontrer précédemment, étant en deça du seuil de sensibilité du test. Il est cependant à noter que dans le cas présent, notre extrait a été réalisé à partir de corps entiers et non à partir de

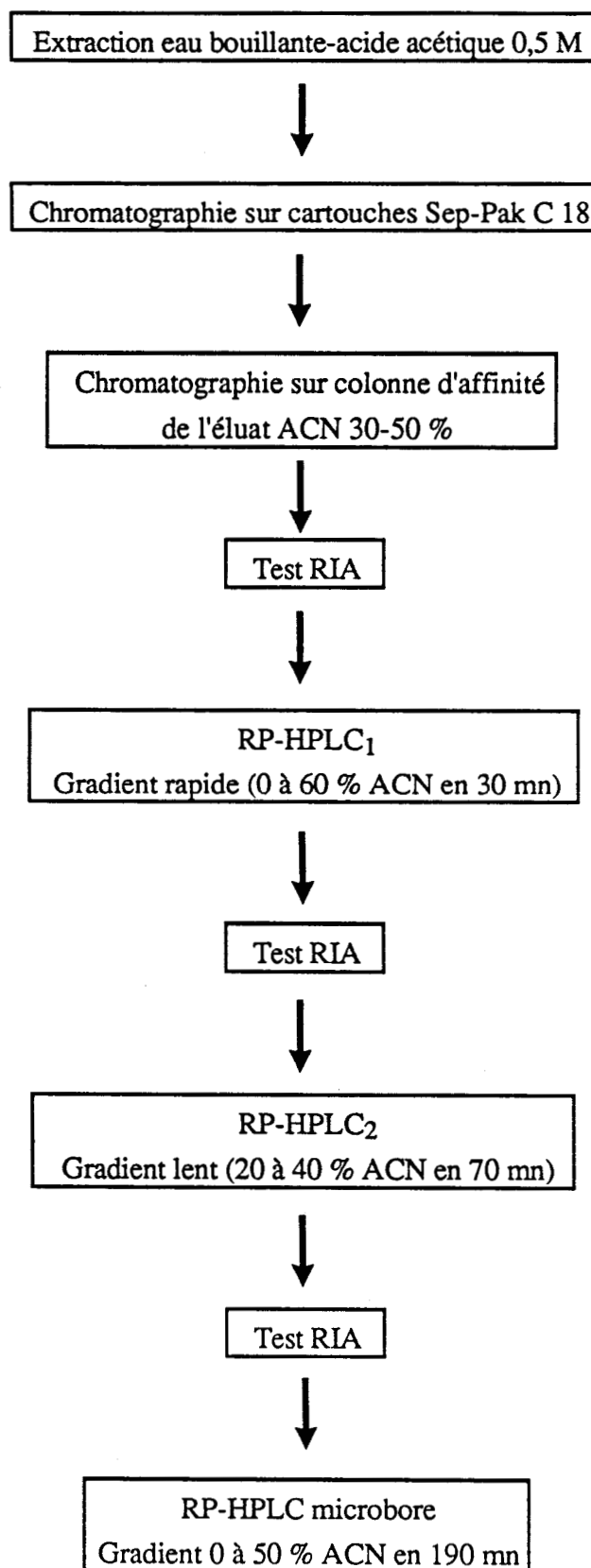


Figure 9 -Purification de la molécule apparentée à la gastrine/CCK. Procédure réalisée par chromatographies successives à partir de corps entiers

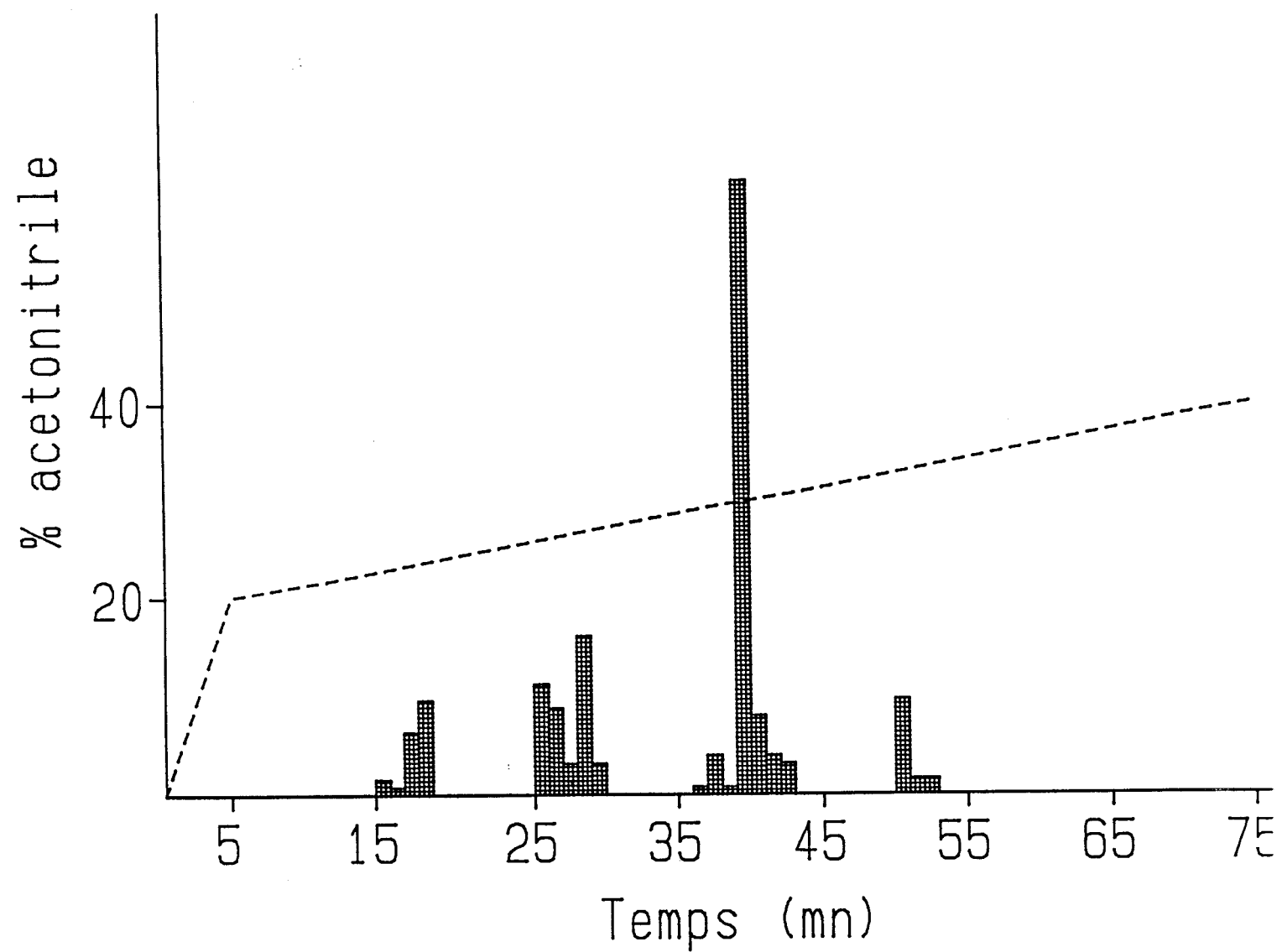


Figure 10 - Immunoréactivité relative des différentes fractions issues de la RP-HPLC₂ après passage successif sur cartouches Sep-Pak C 18, colonne d'affinité et RP-HPLC₁.

prostomiums isolés. Quoiqu'il en soit, ces résultats confirment clairement la nature hétérogène du matériel apparenté à la gastrine/CCK.

Après passage en RP-HPLC₂, 39 % de l'immunoréactivité totale est détectée dans une seule fraction (fig. 10) collectée à mi-gradient (29,6 % d'acétonitrile, temps de rétention: 40 mn). Après évaporation, le matériel immunoréactif de la fraction est soumis, dans le laboratoire du Professeur Tartar à l'Institut Pasteur de Lille, à une troisième RP-HPLC (RP-HPLC microbore) à gradient très lent (0 à 30 % d'acétonitrile en 130 mn puis 30 à 45% d'acétonitrile en 40 mn). Plusieurs pics sont observés sur le profil d'élution dont deux élués à 20 et 23 % d'acétonitrile sont immunoréactifs (fig. 11). Deux autres zones, l'une plus hydrophobe élue à 19,5 % d'acétonitrile, l'autre plus hydrophile élue à 40 % d'acétonitrile sont également immunoréactives. Il est surprenant que quatre fractions (sur 28) apparaissent immunoréactives, d'autant plus que la plus hydrophile est élue à 40 % d'acétonitrile... Il est donc vraisemblable qu'il y a eu dégradation de la molécule recherchée sans que l'on puisse en expliquer la raison puisque le matériel testé en RP-HPLC microbore provenait d'une seule et même fraction (sur les 70 que comportait la RP-HPLC₂). Ainsi l'absence d'absorbance de la fraction immunoréactive la plus hydrophile pourrait signifier que celle-ci ne renferme que le produit ultime de dégradation (2-3 acides aminés) de notre molécule, la partie C-terminale, laquelle correspondrait à l'épitope reconnu par l'anticorps 15/8.

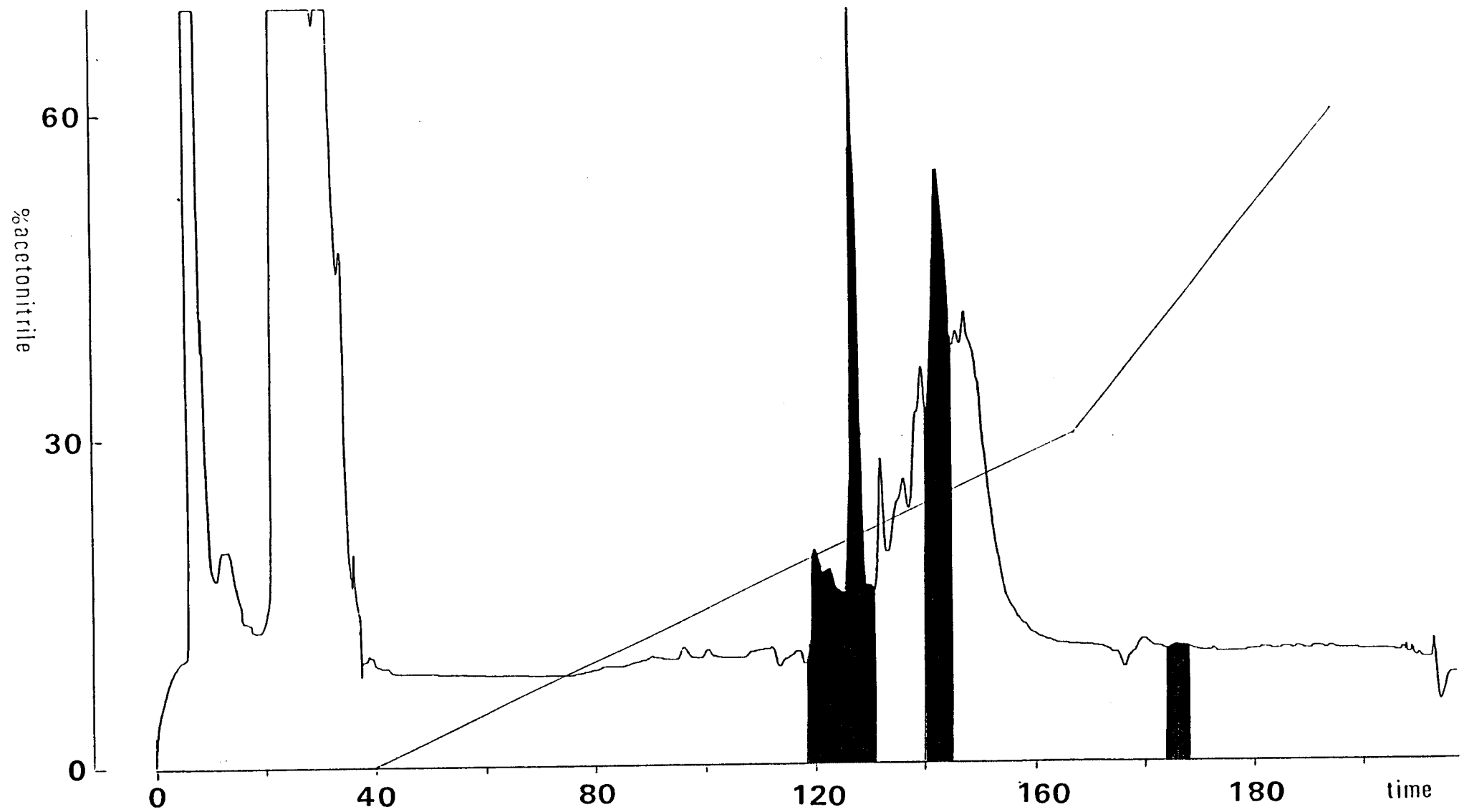


Figure 11 - Profil d'élution après HPLC microbore du matériel apparenté à la gastrine/CCK. En grisé, les zones immunoréactives.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

Les premières purifications de neuropeptides d'Invertébrés datent de cette dernière décennie. Nombre d'entre elles sont fondées sur les travaux immunohistochimiques réalisés avec des anticorps dirigés contre des peptides de Mammifères.

L'étude des neuropeptides d'Invertébrés est largement en retard sur celles consacrées aux Vertébrés et plus particulièrement aux Mammifères, qui, il faut le souligner, ne concernent que quelques espèces, rat, cobaye... homme.

L'absence de tests biologiques aisément réalisables chez les Invertébrés inférieurs est une des raisons de ce retard. Ainsi, chez les Annélides Polychètes, rares sont les tests: l'un concerne l'inhibition de la spermatogenèse des Néréidiens (Bulet et Porchet 1986), l'autre la maturation des spermatozoïdes d'*Arenicola marina* (Bentley 1985).

Au regard des résultats immunohistochimiques qui avaient permis de démontrer la présence de molécules apparentées à des peptides de Mammifères chez les Invertébrés, il devenait possible, grâce à l'utilisation de sondes hétérologues, de purifier de telles molécules en absence de tout test biologique.

La petite taille des centres nerveux des Invertébrés inférieurs constitue un handicap certain dans la purification des neuropeptides. De plus, les quantités de neuropeptides que renferment ces centres sont très faibles. Ceci est particulièrement vrai chez les Annélides Polychètes dont le cerveau ne renferme, par exemple, que 100 à 600 fmol de FMRF-amide (Krajniack et Price 1990). Cela est nettement moins vrai chez les Insectes et les Crustacés dont les organes neurohémaux renferment des quantités appréciables de peptides. Ainsi une paire de corps cardiaques de *Periplaneta americana* renferme 2,5 pmol de périsulfakinine I et 1,1 pmol de périsulfakinine II (Veenstra 1989).

De même, chacun des organes péricardiaux de homard contient quelques 2 pmol de peptides apparentés au FMRF-amide (Trimmer et al.1987).

Chez les Annélides Polychètes, bien qu'il existe une aire neurohémale cérébrale, la zone infracérébrale (fig. 1), la quantité de matériel immunoréactif détecté dans les extraits de prostomiums est très faible. Nous ne pouvons cependant affirmer que la molécule recherchée est une neurohormone, le test RIA ne permettant pas de détecter des molécules immunoréactives dans le milieu de culture où ont séjourné des prostomiums de *Nereis virens*. De ce fait, l'étude commencée sur des prostomiums isolés a été poursuivie sur des corps entiers; les travaux immunohistochimiques (Dhainaut-Courtois et al. 1985) ayant démontré l'existence de nombreuses cellules immunoréactives dans les nombreux ganglions de la chaîne nerveuse ventrale.

Désormais, la difficulté consistait à éliminer toute molécule étrangère au peptide recherché. Il est très difficile, malgré les chromatographies successives d'éliminer complètement le pigment. Par ailleurs, lorsque le nombre d'étapes de purifications augmente, le rendement diminue d'autant. Ainsi, on admet généralement que les pertes de matériel atteignent 20 % à chaque passage. Celles-ci peuvent être cependant beaucoup plus conséquentes: Duve et al. (1985) reportent que 90 % du matériel apparenté à la gastrine/CCK de la mouche *Calliphora vomitoria* était perdu lors du passage en HPLC.

Comme plusieurs molécules apparentées à la gastrine/CCK coexistent, la quantité de matériel requise dans un extrait, en vue de leur purification est d'autant plus importante. Ainsi, à la suite de la RP-HPLC₂ et en vue du passage en RP-HPLC microbore nous n'avons retenu qu'une seule fraction contenant 40 % du matériel immunoréactif total. Il est, par ailleurs, à craindre, comme le montrent nos résultats préliminaires en HPLC microbore, que cette fraction ne renferme encore plusieurs peptides. Confrontés à un même problème, la diversité de peptides immunoréactifs

(apparentés au FMRF-amide) et la nécessité de plusieurs étapes de purification, Trimmer et al. (1987) soulignent qu'à la suite de trois HPLC les pics immunoréactifs majeurs ne renfermaient plus qu'un vingtième du matériel extrait.

Si l'anticorps 15/8 reconnaît parfaitement les peptides de *Nereis diversicolor* apparentés à la gastrine/CCK, il ne reconnaît aucun des produits traduits *in vitro* ou *in ovo* à partir d'ARNm isolés de prostomiums (Guissi-Kadri 1989). En particulier, il est incapable de reconnaître un polypeptide de 70 kDa que reconnaissent des anticorps dirigés contre certaines séquences de la proCCK de Mammifères. Il est cependant hautement probable que les différents peptides reconnus par l'anticorps 15/8 dérivent de ce précurseur. L'hypothèse la plus séduisante consiste à penser que le précurseur subit une maturation en plusieurs étapes, rappelant celle que subit la proCCK de Mammifères, maturation qui engendrerait plusieurs molécules de poids moléculaire de plus en plus faible, ce que tendent à démontrer nos résultats obtenus en RP-HPLC₂. A noter toutefois que le précurseur a une masse moléculaire de 70 kDa, nettement supérieure à celle des préproCCK de Mammifères (≈ 13 kDa).

Nos travaux ont permis de mettre au point un procédé de purification. Il s'agira maintenant d'obtenir des quantités suffisantes de matériel à l'issue des étapes de chromatographie afin de déterminer la structure primaire du peptide le plus abondant. Rappelons que le but à plus long terme est de produire une sonde oligonucléotidique susceptible de cribler la cDNAtèque d'expression élaborée au laboratoire. Alors seulement, nous serons à même de savoir si le polypeptide de 70 kDa est le précurseur des peptides apparentés à la gastrine/CCK et si sa masse élevée est liée à la présence de séquences répétitives (cf le précurseur du FMRF-amide de l'aplysie, Taussig et al. 1988) ou à la présence de plusieurs familles peptidiques (cf le précurseur de la CDCH de la limnée, Vreugdenhil et al. 1988).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Agnati LF, Fuxe K, Benfenati F, Celani MF, Battistini N, Mutt V, Cavicchioli L, Galli G, Hökfelt (1983) *Neurosci Lett* 35: 179-183.
- Agnati LF, Fuxe K, Giardino L, Calza L, Zoli M, Battistini N, Benfenati F, Vanderhaeghen JJ, Guidolin D, Ruggeri M, Goldstein M (1985) Evidence for cholecystokinin-dopamine receptor interactions in the central nervous system of the adult and old rat. Studies on their functional meaning. *Ann NY Acad Sci* 448: 315-333.
- Baile CA, Della-Fera MA (1985) Central nervous system cholecystokinin and the control of feeding. *Ann NY Acad Sci* 448: 424-430.
- Balas D, Senegas-Balas F, Pradayrol L (1985) Long-term comparative effect of cholecystokinin and gastrin on mouse stomach, antrum, intestine and exocrine pancreas. *Am J Anat* 174: 27-43.
- Bardram L, Hilsted L, Rehfeld JF (1989) Cholecystokinin, gastrin and their precursors in pheochromocytomas. *Acta Endocr* 120: 479-484.
- Bengtsson P, Lundqvist G, Nilsson G (1989) Inhibition of acid formation and stimulation of somatostatin release by cholecystokinin-related in rabbit gastric glands. *J Physiol* 419:765-774.
- Bengtsson P, Nilsson G (1989) Cholecystokinin and gastrin inhibit histamine stimulated aminopyrine uptake in isolated rabbit gastric glands. *Uppsala J Med Sci* 94: 111-122.
- Bentley MG (1985) Sperm maturation (response in *Arenicola marina* L.: an *in vitro* assay for sperm maturation factor and its partial purification. *Int J Invert Reprod Dev* 8: 139-145.
- Bitar KN, Makhlouf GM (1982) Receptors on smooth muscle cells: characterization by contraction and specific antagonists. *Am J Physiol* 242: G400-G407.
- Bone EA, Rosenzweig SA (1988) Characterization of cholecystokinin receptors in toad retina. *Peptides* 9: 373-381.
- Brooks AM, Agosti A, Bertaccini G, Grossman MI (1970) Inhibition of gastric acid secretion in man by peptide analogues of cholecystokinin. *N Engl J Med* 282: 535-538.
- Brooks PA, Kelly JS (1985) Cholecystokinin as a potent excitant of neurons of the dentate gyrus of rats. *Ann NY Acad Sci* 448:361-374.
- Buchan AMJ, Polak JM, Solcia E, Capella C, Hudson D, Pearse AGE (1978) Electron immunohistochemical evidence for the human intestinal I cells as source of CCK. *Gut* 19: 403-407.
- Buffa R, Solcia E, Go VLW (1976) Immunohistochemical identification of the cholecystokinin cell in the intestinal mucosa. *Gastroenterol* 70: 528-532.

- Bulet P, Porchet M (1986) A new purification procedure for the neuropeptide controlling gametogenesis in Nereids (Annelida Polychaeta). In: Advance in Invertebrate Reproduction, M Porchet, JC Andriès, A Dhainaut eds, Elsevier, Amsterdam pp 498.
- Burnham DB, Williams JA (1986) Effects of carbachol, cholecystokinin, and insulin on protein phosphorylation in isolated pancreatic acini. J Biol Chem 257: 10523-10528.
- Calam J, Ellis A, Dockray GJ (1982) Identification and measurement of molecular variants of cholecystokinin in duodenal mucosa and plasma. J Clin Invest 69: 218-225.
- Camus A, Rose C, Schwartz JC (1989) Role of a serine endopeptidase in the hydrolysis of exogenous cholecystokinin by brain slices. Neuroscience 29: 595-602.
- Cantor P (1986) Evaluation of a radioimmunoassay for cholecystokinin in human plasma. Scand J Clin Lab Invest 46: 213-221.
- Cantor P, Petronijevic L, Pedersen JF, Worning H (1986) Cholecystokinin and pancreozymic effect of O-sulfated gastrin compared with non sulfated gastrin and cholecystokinin. Gastroenterol 91: 1154-1163.
- Cantor P, Rehfeld JF (1987) The molecular nature of cholecystokinin in human plasma. Clin Chim Acta 168: 153-158.
- Chang RSL, Lotti VJ (1986) Biochemical and pharmacological characterization of an extremely potent and selective non-potent cholecystokinin antagonist. Proc Natl Acad Sci USA 83: 4923-4926.
- Chang RSL, Lotti VJ, Martin GE, Chen TB (1983) Increase in brain ¹²⁵I cholecystokinin (CCK) receptor binding following chronic haloperidol treatment, intracisternal 6-hydroxydopamine or ventral tegmental lesions. Life Sci 32: 871-878.
- Ciofi P (1987) La cholécystokinine dans le système nerveux central. Immunohistochimie, colocalisation avec divers neuropeptides dans l'hypothalamus de quelques Mammifères dont l'homme. Thèse Doctorat, Lille.
- Conlon JM, Schwartz TW, Rehfeld JF (1988) Sulphated C C K-8-like peptides in the neural ganglion of the protochordate *Ciona intestinalis*. Reg Peptides 20: 241-250.
- Crawley JN (1985) Cholecystokinin potentiation of dopamine-mediated behaviors in the nucleus accumbens. Ann NY Acad Sci 448: 283-292.
- Crawley JN, Stivers JA, Blumstein LK, Paul SM (1985) Cholecystokinin potentiates dopamine-mediated behaviors: evidence for modulation specific to a site of coexistence. J Neurosci 5: 1972-1983.
- Dale WE, Turkelson CM, Solomon TE (1989) Role of cholecystokinin in intestinal phase and meal-induced pancreatic secretion. Am J Physiol 157: G782-G790.
- Dalsgaard LJ, Vincent SR, Hökfelt T, Lundberg JM, Daalstrom A, Schultzberg M, Dockray GJ, Cuello AC (1982) Coexistence of CCK and SP-like peptides in neurons of the dorsal root ganglia in the rat. Neurosci Lett 33: 159-163.

- Debas HT, Farooq O, Grossman MI (1975) Inhibition of gastric emptying is a physiologic action of cholecystokinin. *Gastroenterol* 68: 1211-1217.
- Delaire-Hestin A (1989) Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des neurosécrétions du cerveau de *Nereis virens*: purification des neuropeptides reconnus et identification des cellules concernées. Thèse Université, Lille.
- Della-Fera MA, Baile CA (1979) Cholecystokinin octapeptide: continuous picomole injections into the cerebral ventricles of sheep suppress feeding. *Science* 206: 471-473.
- Della-Fera MA, Baile CA (1980) CCK octapeptide injected into CSF and changes in food intake and rumen motility. *Physiol Behav* 24: 943-950.
- Della-Fera MA, Baile CA, Schneider BS, Grinker JA (1981) Cholecystokinin antibody injected in cerebral ventricles stimulates feeding in sheep. *Science* 212: 687-689.
- Del Valle J, Sugano K, Yamada T (1989) Glycine-extended processing intermediates of gastrin and cholecystokinin in human plasma. *Gastroenterol* 97: 1159-1163.
- Denavit-Saubié M, Hurlé MA, Morin-Surun MP, Foutz AS, Champagnat J (1985) The effects of cholecystokinin-8 in the nucleus tractus solitarius. *Ann NY Acad Sci* 448: 375-384.
- Deschenes RJ, Lorenz LJ, Haun RS, Roos BA, Collier K, Dixon JE (1984) Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 726-730.
- Deschodt-Lanckman M (1985) Enzymatic degradation of cholecystokinin in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 448: 87-98.
- Deschodt-Lanckman M, Koulischer D, Przedborski S, Lauwereys M (1984) Cholecystokinin octa- and tetrapeptide degradation by synaptic membranes. III Inactivation of CCK-8 by a phosphoramidon-sensitive endopeptidase. *Peptides* 5: 649-651.
- Dhainaut-Courtois N (1970) Contribution à l'étude morphologique des processus sécrétoires dans le système nerveux central et au niveau de la glande infracérébrale des *Nereidae* (Annélides Polychètes). Thèse Etat, Lille.
- Dhainaut-Courtois N, Dubois MP, Tramu G, Masson M (1985a) Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annelida Polychaeta) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. *Cell Tissue Res* 242: 97-108.
- Dhainaut-Courtois N, Golding DW (1988) Nervous system. In "The ultrastructure of Polychaeta". W Weistheide, CO Hermans eds, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 4: 89-110.
- Dhainaut-Courtois N, Tramu G, Beauvillain JC, Masson M (1986) A qualitative approach of the *Nereis* neuropeptides by use of antibodies to several vertebrate peptides. *Neurochem Int* 8: 327-338.

- Dhainaut-Courtois N, Tramu G, Marcel R, Malecha J, Verger-Bocquet M, Andriès JC, Masson M, Selloum L, Belemtougri G, Beauvillain JC (1985b) Cholecystokinin in the nervous systems of Invertebrates and Protochordate. Immunohistochemical localization of a cholecystokinin-8-like substance in Annelids and Insects. *Ann NY Acad Sci* 448: 167-187.
- Dodd J, Kelly JS (1981) The actions of cholecystokinin and related peptides on pyramidal neurones of the mammalian hippocampus. *Brain Res* 205: 337-350.
- Dodd PR, Edwarson JA, Dockray GJ (1980) The depolarization-induced release of cholecystokinin C-terminal octapeptide (CCK-8) from rat synaptosomes and brain slices. *Reg Peptides* 1:17-29.
- Durchon M (1984) Peptidic hormones in Annelids. *In* : Biosynthesis metabolism and mode of action of invertebrate hormones, JA Hoffman, M Porchet eds, Springer-Verlag, Berlin, pp 10-18.
- Duve H, Thorpe A, Rehfeld JF (1985) Localization and characterization of cholecystokinin (CCK)-like peptides in the brain of the blowfly *Calliphora vomitoria*. *In*: Neurosecretion and the biology of neuropeptides, H Kobayashi, HA Bern, A Urano eds, Jpn Sci Soc Press, Tokyo, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp 401-409.
- Eberlein GA, Eysselein VE, Gøbell H (1988) Cholecystokinin-58 is the major molecular form in man, dog and cat but not in pig, beef and rat intestine. *Peptides* 9: 993-998.
- Eberlein GA, Eysselein VE, Hesse WH, Gøbell H, Schaefer M, Reeve JR (1987) Detection of cholecystokinin-58 in human blood by inhibition of degradation. *Am J Physiol* 253: G477-G482.
- Emson PC, Lea CM, Rehfeld JF (1980) Cholecystokinin octapeptide: vesicular localization and calcium-dependent release from rat brain *in vitro*. *Life Sci* 26: 2157-2163.
- Eng J, Shiina Y, Pan CE, Blacher R, Chang M, Stein S, Yalow RJ (1983) Pig brain contains cholecystokinin octapeptide and several cholecystokinin desoctapeptides. *Proc Nat Acad Sci USA* 80: 6381-6385.
- Engelhardt RP, Dhainaut-Courtois N, Tramu G (1982) Immunohistochemical demonstration of a CCK-like peptide in the nervous system of a marine annelid worm, *Nereis diversicolor* O.F. Müller. *Cell Tissue Res* 227: 401-411.
- Eysselein VE, Eberlein GA, Hesse WH, Singer MF, Goebell H, Reeve JR Jr (1987) Cholecystokinin-58 is the major circulating form of cholecystokinin in canine blood. *J Biol Chem* 262: 214-217.
- Eysselein VE, Reeve SR Jr, Shively JE, Miller C, Walsh JH (1984) Isolation of a large cholecystokinin precursor from canine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6565-6568.

- Fan ZW, Eng J, Miedel M, Hulmes JD, Pan YCE, Yalow RS (1987) Cholecystokinin octapeptides purified from chinchilla and chicken brains. *Brain Res Bull* 18: 757-760.
- Fargeas MJ, Bassotti G, Fioramonti J, Bueno L (1989) Involvement of different mechanisms in the stimulatory effects of cholecystokinin octapeptide on gastrointestinal and colonic motility in dogs. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 1205-1212.
- Favrel P, Van Wormhoudt A, Studler JM, Bellon C (1987) Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinin peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea decapoda): intermolt variations. *Gen Comp Endocrinol* 65: 363-372.
- Fekete MT, Kádár T, Telegdy G (1981) Effect of cholecystokinin antiserum on the brain monoamine content in rats. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 57: 177-183.
- Fink CS, Hamosh M, Hamosh P, Denigiris SJ, Kasbekar DK (1985) Lipase secretion from dispersed rabbit gastric glands. *Am J Physiol* 248: G68-G72.
- Fölsch UD, Cantor P, Wlms H, Schafmayer A, Becker HD, Creutzfeld W (1987) Role of cholecystokinin in the negative feedback control of pancreatic enzyme secretion in conscious rats. *Gastroenterol* 92: 449-458.
- Fölsch UR, Winckler K, Wormsley K (1978) Influence of repeated administration of cholecystokinin and secretin on the pancreas of the rat. *Scand J Gastroenterol* 13: 663-671.
- Fourmy D, Zahidi A, Fabre R, Pradayrol L, Ribet A (1987) Receptors for cholecystokinin and gastrin peptides display specific binding properties and are structurally different in guinea-pig and dog pancreas. *Eur J Biochem* 165: 683-692.
- Fukamauci F, Yoshikawa T, Kaneno S, Shibuya S, Takahashi R (1987) The chronic administration of dopamine and methamphetamine changed the [³H]-cholecystokinin-8 binding sites in the rat frontal cortex. *Neuropeptides* 10: 221-225.
- Gall C, Lauterhorn J, Burks D, Seroogy K (1987) Co-localization of enkephalin and cholecystokinin in discrete areas of rat brain. *Brain Res* 403: 403-408.
- Gaudreau P, St-Pierre S, Pert CB, Quirion R (1987) Structure-activity studies of C- and N-terminal fragment of cholecystokinin 26-33 in guinea pig isolated tissues. *Neuropeptides* 10: 9-18.
- Gibbs J, Smith GP (1986) Gut peptides and feeding behavior : the model of cholecystokinin. In: *Feeding behavior - Neural and humoral controls*. RC Ritter, S Ritter, CD Barnes eds. Acad Press Orlando pp 329-352.
- Gibbs J, Smith GP (1988) Les peptides de l'appareil digestif et du cerveau. Le modèle de la cholécystokinine. *Ann Endocrinol* 49: 113-120.
- Golterman NR, Stengaard-Petersen K, Rehfeld JF, Christensen NJ (1981) Newly synthesized cholecystokinin in subcellular fractions of the rat brain. *J Neurochem* 36: 959-965.

- Go VLW, Hoffman AF, Summerskill WHJ (1970) Pancreozymin bioassay in man based on pancreatic enzyme secretion: potency of specific amino acids and other digestive products. *J Clin Invest* 49: 1558-1564.
- Green GM, Lyman RL (1972) Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 140: 6-12.
- Grimmelikhuijzen GJP, Graff D (1986) Isolation of Glu-Gly-Arg-Phe-NH₂ (Antho-RF Amide), a neuropeptide from sea anemones. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9817-9821.
- Gubler U, Chua AO, Hoffman BJ, Collier MJ, Eng J (1984) Cloned cDNA to cholecystokinin mRNA predicts an identical preprocholecystokinin in pig brain and gut. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4307-4310.
- Guissi-Kadri S (1989) Expression de gènes spécifiant des précurseurs de neuropeptides chez un ver marin *Nereis diversicolor*. Thèse Doctorat Université, Lille.
- Hammond C, Paupardin-Tristch D, Nairn AC, Greengard P, Gerschenfeld HM (1987) Cholecystokinin induces a decrease in Ca²⁺ current in snail neurons that appears to be mediated by protein kinase C. *Nature* 325: 809-811.
- Han SP, Allard LR, Beinfeld MC (1987) Peptides in rat brain immunoreactive for the amino terminus of cholecystokinin-33: distribution and chromatography. *Biochem Biophys Res* 149: 902-907.
- Härfstrand A, Fuxe K, Agnati L, Kitayama I, Cintra A, Janson AM, Kalia M, Vanderhaeghen JJ, Goldstein M, Terenius L (1987) Intracisternal administration of cholecystokinin-8 contracts the central cardiovascular effects of adrenaline and NPY. A study based on the coexistence of cholecystokinin, phenylethanolamine N-methyltransferase and neuropeptide Y immunoreactivity in neurons of the nucleus tractus solitarius. *Neurochem Int* 10: 481-494.
- Harper AA, Raper HS (1943) Pancreozymin a stimulant of the secretion of pancreatic enzyme in extract of the small intestine. *J Physiol* 102: 115-125.
- Hellstrom M (1985) Atropine and naloxone block the colonic contraction elicited by cholecystokinin and pentagastrin. *Acta Physiol Scand* 124: 25-33.
- Hermansen K (1984) Effects of cholecystokinin (CCK-4), non-sulfated CCK-8 and sulfated CCK-8 on pancreatic somatostatin, insulin and glucagon secretion in the dog: studies *in vitro*. *Endocrinology* 114: 1770-1775.
- Hersey SJ, May D, Schyberg D (1982) Stimulation of pepsinogen release from isolated gastric glands by cholecystokinin-like peptides. *Am J Physiol* 8: G192-G197.
- Hill DR, Campbell NJ, Shaw TM, Woodruff GN (1987b) Autoradiographic localization and biochemical characterization of peripheral type CCK receptors in rat CNS using highly selective nonpeptide CCK antagonists. *J Neurosci* 7: 2967-2976.

- Hill DR, Shaw TM, Woodruff GN (1987a) Species differences in the localization of "peripheral" type cholecystokinin receptors in rodent brain. *Neurosci Lett* 79: 286-289.
- Hill DR, Shaw TM, Woodruff GN (1989) Binding sites for ^{125}I -cholecystokinin in primate spinal cord are of the CCK-A subclass. *Neurosci Lett* 89: 133-139.
- Hökfelt T, Holets VR, Staines W, Meister B, Melander T, Schalling M, Schultzberg M, Freedman J, Björklund H, Olson L, Lindh B, Elfvin LG, Lundberg JM, Lindgren JA, Samuelsson B, Pernow C, Terenius L, Post , Everitt B, Goldstein M (1986) Coexistence of neuronal messengers-an overview. *Prog Brain Res* 68: 33-70.
- Hökfelt T, Rehfeld JF, Skirboll L, Ivemark B, Goldstein M, Markey K (1980) Evidence for coexistence of dopamine and CCK in mesolimbic neurons. *Nature* 285: 476-478.
- Hökfelt T, Skirboll L, Everitt B, Meister B, Brownstein M, Jacobs T, Faden A, Kuga S, Goldstein M, Markstein R, Dockray G, Rehfeld J (1985) Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the nervous system. Co-existence with classical neurotransmitters and other neuropeptides. *Ann NY Acad Sci* 448: 255-274.
- Hong EK, Takemori (1989) Indirect involvement of delta opioid receptors in cholecystokinin octapeptide-induced analgesia in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 594-598.
- Hopman WPM, Jansen JBMJ, Rosenbusch G (1984) Effect of equimolar amounts on long-chain triglycerides and medium-chain triglycerides on plasma cholecystokinin and gallbladder contraction. *Amer J Clin Nutr* 39: 356-359.
- Hutchinson JB, Dockray GJ (1981) Evidence that the action of cholecystokinin octapeptides on the guinea pig ileum longitudinal muscle is mediated in part by substance P release from the myenteric plexus. *Eur J Pharmacol* 69: 87-93.
- Ihse I, Lilja P, Lundquist I (1979) Trypsin as a regulator of pancreatic secretion in the pig. *Scand J Gastroenterol* 13: 873-880.
- Innis RB, Snyder SH (1980) Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6917-6921.
- Isaacs PET, Ladas S, Forgacs IC (1987) Comparison of ingested medium- and long-chain triglyceride on gallbladder volume and release of cholecystokinin and other gut peptides. *Dig Dis Sci* 32: 481-486.
- Ivy VA, Olberg E (1928) Hormone mechanism for gallbladder contraction. *Am J Physiol* 85: 381-383.
- Jansen JBMJ, Lamers CBHW (1983a) Radioimmunoassay of cholecystokinin in human tissue and plasma. *Clin Chim Acta* 131: 305-316.
- Jansen JBMJ, Lamers CBHW (1983b) Molecular forms of cholecystokinin in human plasma during infusion of bombesin. *Life Sci* 33: 2197-2205.

- Jansen JBMJ, Lamers CBHW (1987) Molecular forms of cholecystokinin in plasma from normal and gastrectomized human subject following a fat meal. *Peptides* 8: 801-805.
- Jensen RT, Lemp GF, Gardner JD (1980) Interaction of cholecystokinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2079-2083.
- Jensen RT, Wank SA, Rowley WH, Sato S, Gardner JD (1989) Interaction of CCK with pancreatic acinar cells. *Trends Pharmacol Sci* 10: 418-423.
- Jensen RT, Zhou ZC, Murphy RB, Hones SW, Stenikar I, Rovati LA, Gardner JF (1986) Structural features of various proglumide-related cholecystokinin receptor antagonists. *Am J. Physiol* 251: G839-G846.
- Johnsen AH, Rehfeld JF (1990) Cionin: a disulfotyrosyl hybrid of cholecystokinin and gastrin from the neural ganglion of the protochordate *Ciona intestinalis*. *J Biol Chem* 265: 3054-3058.
- Jurna I, Zetler G (1981) Antinociceptive effect of centrally administered caerulein and cholecystokinin octapeptide (CCK-8). *Eur J Pharmacol* 73: 323-331.
- Kanamaya S, Himeno S, Higashimoto Y, Yamasaki Y, Kitani T, Tarui S (1987) Plasma cholecystokinin octapeptide-like immunoreactivity in patients with hepatic cirrhosis. *Life Sci* 41: 1915-1920.
- Kasbekar DK, Jensen RT, Gardner JF (1983) Pepsinogen secretion from dispersed glands from rabbit stomach. *Am J Physiol* 7: G392-G396.
- Kiss JZ, Williams TH, Palkovits M (1984) Distribution and projections of cholecystokinin-immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 227: 173-181.
- Konturek SJ, Tasler J, Bilski J, De Jong AJ, Jansen JBMJ, Lamers CB (1986) Physiological role and localization of cholecystokinin release in dogs. *Am J Physiol* 250: G391-G397.
- Krajniak KG, Price DA (1990) Authentic FMRF amide is present in the Polychaete *Nereis virens*. *Peptides* 11: 75-77.
- Kuwahara A, Ozawa K, Yanaihara N (1986) Effects of cholecystokinin-octapeptide on gastric motility of anesthetized dogs. *Am J Physiol* 251:G678-G681.
- Lamers CBHW, Poitras P, Jansen JBMJ, Walsh JH (1983) Relative potencies of cholecystokinin-33 and cholecystokinin-8 measured by radioimmunoassay and bioassay. *Scand J Gastroenterol* 18 (suppl 82): 191-192.
- Larsson LI, Rehfeld JF (1977) Evidence for a common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin. *Nature* 269: 335-338.
- Leung MK, Stefano GB (1984) Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 955-958.

- Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA (1985) Cholecystokinin bioactivity in human plasma: molecular forms, responses to feeding and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest* 75: 1144-1154.
- Liddle RA, Goldfine ID, Williams JA (1984) Bioassay of plasma cholecystokinin in rats: effects of food, trypsin inhibitor, and alcohol. *Gastroenterol* 87: 542-549.
- Liddle RA, Green GM, Conrad CK, Williams JA (1986a) Proteins but no amino acids, carbohydrate or fats stimulate cholecystokinin secretion in the rat. *Am J Physiol* 251: G243-G248.
- Liddle RA, Morita ET, Conrad CK, Williams JA (1986b) Regulation of gastrin emptying in humans by cholecystokinin. *J Clin Invest* 77: 992-996.
- Louie DS, May D, Miller P, Owyang CH (1986) Cholecystokinin mediates feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in rats. *Am J Physiol* 250: G252-G259.
- Malarkey WB, O'Dorisio TM, Kennedy M, Cataland S (1981) The influence of vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin on prolactin release in rat and human monolayer culture. *Life Sci* 28: 2489-2495.
- Marley PD, Lightman SL, Forsling ML, Todd K, Goedert M, Rehfeld JR, Emson PC (1984) Localization and actions of cholecystokinin in the rat pituitary neurointermediate lobe. *Endocrinology* 114: 1902-1911.
- Martin R, Geis R, Holl R, Schäfer M, Voigt KH (1983) Co-existence of unrelated peptides in oxytocin and vasopressin terminals of rat neurohypophyses: immunoreactive methionine-enkephalin-, leucine-enkephalin- and cholecystokinin-like substances. *Neuroscience* 8: 213-227.
- Meyer DK, Krauss J (1983) Dopamine modulates cholecystokinin release in neostriatum. *Nature* 301: 338-340.
- Mezey E, Reisine TD, Skirboll L, Beinfeld M, Kiss JZ (1985) Cholecystokinin in the medial parvocellular subdivision of the paraventricular nucleus. Co-existence with corticotropin-releasing hormone. *Ann NY Acad Sci* 448: 152-156.
- Miazza B, Palma R, Lachance JR (1985) Jejunal secretory effect of intraduodenal food in humans. *Gastroenterol* 88: 1215-1222.
- Miyasaka K, Green GM (1984) Effect of partial exclusion of pancreatic juice on rat basal pancreatic secretion. *Gastroenterol* 86: 114-119.
- Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, McHugh PR (1986) Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Res* 362: 175-179.
- Morley TE, Melmed S, Briggs J, Carlson HE, Hersham JM, Solomon TE, Lamers C, Damassa DA (1979) Cholecystokinin octapeptide releases growth hormone from the pituitary *in vitro*. *Life Sci* 25: 1201-1206.

- Moroji T, Watanabe N, Aoki N, Itho S (1982) Antipsychotic effects of caerulein, a decapeptide chemically related to cholecystokinin octapeptide, on schizophrenia. *Int Pharmacopsychiat* 17: 255-273.
- Mutt V (1980) Cholecystokinin: isolation, structure and functions. *In* : Gastrointestinal hormones. GBJ Glass ed, New York, Raven Press, pp 169-221.
- Mutt V, Jorpes E (1971) Hormonal polypeptides of the upper intestine. *Biochem J* 125: 57-58.
- Nachman RJ, Holman GM, Cook BJ, Haddon WF, Ling N (1986b) Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. *Biochem Biophys Res Commun* 140: 357-364.
- Nachman RJ, Holman GM, Haddon WF, Ling N (1986a) Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science* 234: 71-73.
- Nachman RJ, Holman GM, Haddon WF, Vensel WH (1989) Effect of sulfate position on myotropic activity of the gastrin/CCK-like insect leucosulfakinins. *Int J Peptide Protein Res* 33: 223-229.
- Nair NPV, Bloom DM, Nestoros JN, Schwartz G (1983) Therapeutic efficacy of cholecystokinin in neuroleptic resistant schizophrenic subjects. *Psychopharmacol Bull* 19: 134-136.
- Najdowski T, De Pont JHM, Tesser GI, Penke B, Martinez J; Deschodt-Lanckman M (1987) Degradation of cholecystokinin octapeptide by the neutral endopeptidase EC 3.4.24.11 and design of proteolysis-resistant analogues of the peptide. *Neurochem Int* 10: 459-465.
- Nichols R, Schneuwly SA, Dixon JE (1988) Identification and characterization of a *Drosophila* homologue to the vertebrate neuropeptide cholecystokinin. *J Biol Chem* 263: 12167-12170.
- Ogawa R, Itho K, Kaneko T, Mizumo N (1989) Co-existence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and cholecystokinin (CCK)-like immunoreactivities in thalamocortical neuron in the ventrolateral nucleus of the rat. *Brain Res* 490: 152-156.
- Olsen O, Schaffalitzky de Muckadell OB, Cantor P (1986) The significance of plasma CCK and secretin in the oleate-stimulated pancreatico-biliary secretion in man. *Int J Pancreatol* 1: 363-372.
- Palacios JM, Savasta M, Mengod G (1989) Does cholecystokinin colocalize with dopamine in the human substance nigra? *Brain Res* 488: 369-375.
- Pendleton RG, Bendesky RJ, Schaffer L, Nolan TE, Gould RJ, Clineschmidt BV (1987) Roles of endogenous cholecystokinin in biliary, pancreatic and gastric function: studies with L-364,718, a specific cholecystokinin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 241: 110-116.

- Penke B, Kovács GL, Zsigo J; Kádár T, Szabo G, Kovacs K, Telegdy (1985) *In vivo* sulfation of cholecystokinin octapeptide. Possible interactions of the two forms of cholecystokinin with dopamine in the brain. *Ann NY Acad Sci* 448: 293-305.
- Pinget M, Straus E, Yalow RS (1978) Localization of cholecystokinin-like immunoreactivity in isolate nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 6324-6326.
- Pinget M, Straus E, Yalow RS (1979) Release of cholecystokinin peptides from a synaptosome-enriched fraction of rat cerebral cortex. *Life Sci* 25: 339-342.
- Porchet M, Cardon C (1972) Régulation de l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. *C R Acad Sci* 275: 2375-2378.
- Porchet M, Cardon C (1976) The inhibitory feed back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in Nereis (Polychaeta, Annelida). *Gen Comp Endocrinol* 30: 378-390.
- Porchet M, Dhainaut-Courtois N (1988) Neuropeptides and monoamines in Annelids. In "Neurohormones in Invertebrates". MC Thorndyke, GJ Goldsworthy eds, Cambridge University Press 33: 219-234.
- Proux JP, Miller CA, Li JP, Carney RL, Girardie A, Delage M, Schooley DA (1987) Identification of an arginin vasopressin-like diuretic hormone from *Locusta migratoria*. *Biochem Biophys Res Commun* 149: 180-196.
- Rattan S, Goyal RK (1986) Structure-activity relationship of subtypes of cholecystokinin receptors in the cat lower oesophageal sphincter. *Gastroenterol* 90: 94-102.
- Raufman JP, Kasbekar DK, Jensen RT, Gardner JD (1983) Potentiation of pepsinogen secretion from dispersed glands from rat stomach. *Am J Physiol* 245: G525-G530.
- Rehfeld JF (1986) Accumulation of non amidated preprogastrin and preprocholecystokinin products in porcine pituitary corticotrophs. *J Biol Chem* 261: 5841-5847.
- Rehfeld JF (1987) Preprocholecystokinin processing in the normal human anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3019-3023.
- Rehfeld JF, Hansen HF (1986) Characterization of preprocholecystokinin products in porcine cerebral cortex. *J Biol Chem* 261: 5832-5840.
- Rehfeld JF, Hansen HF, Marley PD, Stengaard-Pedersen K (1985) Molecular forms of cholecystokinin in the brain and the relationship to neuronal gastrins. *Ann NY Acad Sci* 448: 11-23.
- Reidelberger RD, O'Rourke (1989) Potent cholecystokinin antagonist L 364718 stimulates food intake in rats. *Am J Physiol* 257: R1512-R1518.
- Richter K, Egger R, Kreil G (1986) Sequence of preprocaerulein cDNAs cloned from skin of *Xenopus laevis*. A small family of precursors containing one, three or four copies of the final product. *J Biol Chem* 261: 3676-3680.

- Rose C, Camus A, Schwartz JC (1989) Protection by serine peptidase inhibitors of endogenous cholecystokinin released from brain slices. *Neuroscience* 29: 583-594.
- Rosenzweig SA, Madison LD, Jamieson JD (1984) Analysis of cholecystokinin-binding proteins using endo-b-N-acetylglucosaminidase F. *J Cell Biol* 99: 1110-1116.
- Rushakoff RJ, Goldfine ID, Carter JD, Liddle RA (1987) Physiological concentration of cholecystokinin stimulate amino-acid-induced insulin release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 395-401.
- Saito A, Goldfine ID, Williams JA (1980a) Characterization of receptors for cholecystokinin and related peptides in mouse cerebral cortex. *J Neurochem* 37: 483-490.
- Saito A, Sankaran H, Goldfine ID, Williams JA (1980b) Cholecystokinin receptors in the brain : characterization and distribution. *Science* 208: 1155-1156.
- Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong KY, Williams JA (1980) Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *J Biol Chem* 255: 1849-1853.
- Schick RR, Reilly WM, Roddy DR, Yaksh TL, Go VLW (1987) Neuronal cholecystokinin-like immunoreactivity is postprandially released from primate hypothalamus. *Brain Res* 418: 20-26.
- Schwartz TW (1983) Pancreatic polypeptide: a hormone under vagal control. *Gastroenterol* 85: 1411-1425.
- Skirboll L, Hökfelt T, Rehfeld JF, Cuello AC, Dockray GJ (1982) Coexistence of substance P and cholecystokinin-like immunoreactivity in neurons of the mesencephalic periaqueductal gray. *Neurosci Lett* 28: 35-39.
- Skirboll LR, Hommer DW (1985) Electrophysiological studies of the role of cholecystokinin in the substantia nigra and its interactions with dopamine. *Ann NY Acad Sci USA* 448: 275-282.
- Soll AH, Amirian DA, Thomas LP, Reedy LP, Elashoff JD (1984) Gastrin receptors on isolated canine parietal cells. *J Clin Invest* 73: 1434-1447.
- Solomon TE, Yamada T, Elashoff J, Wood J, Beglinger C (1984) Bioactivity of cholecystokinin analogues: CCK-8 is not more potent than CCK-33. *Am J Physiol* 247: G105-G111.
- Spanarkel M, Martinez J, Briet C, Jensen RT, Gardner JD (1983) Cholecystokinin-27-32-amide. A member of a new class of cholecystokinin receptor antagonists. *J Biol Chem* 258: 6746-6749.
- Stacher G, Steinringer H, Schmierer G, Schneider C, Winklehner S (1982) Cholecystokinin octapeptide decreases intake of solid food in man. *Peptides* 3: 133-136.

- Steigerwalt RW, Goldfine ID, Williams JA (1984) Characterization of cholecystokinin receptors on bovine gallbladder membranes. *Am J Physiol* 10: G709-G714.
- Steward JJ, Burks TF (1977) Action of cholecystokinin octapeptide on smooth muscle of isolated dog intestine. *Am J. Physiol* 232: E306-E310.
- Studler JM, Reibaud M, Tramu G, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP (1985) Distinct properties of cholecystokinin-8 and mixed dopamine-cholecystokinin-8 neurons innervating the nucleus accumbens. *Ann NY Acad Sci* 448: 306-314.
- Studler JM; Reibaud M, Tramu G, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP (1984) Pharmacological study on the mixed CCK-8/DNA meso-nucleus accumbens pathway: evidence for the existence of storage site containing the two transmitters. *Brain Res* 298: 91-97.
- Sugano K, Aponte GW, Yamada T (1985) Identification and characterization of glycine extended post-translational processing intermediates of progastrin in porcine stomach. *J Biol Chem* 260: 11724-11729.
- Svoboda M, Lambert M, Furnelle J; Christophe J (1982) Specific photoaffinity crosslinking of [¹²⁵I] cholecystokinin to pancreatic plasma membranes: Evidence for a disulfide-linked Mr 76,000 peptide in cholecystokinin receptors. *Regul Peptides* 4:163-172.
- Takahishi Y, Kato K, Hayashizaki Y, Wakabayashi I, Ohtsuka E, Matsuki S, Ikehara M, Matsubara K (1985) Molecular cloning of the human cholecystokinin gene by use of a synthetic probe containing deoxyinosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1931-1935.
- Tatemoto K, Jörnvall H, Siimesmaa S, Hallden G, Mutt V (1984) Isolation and characterization of cholecystokinin-58 (CCK-58) from porcine brain. *Febbs Lett* 174: 289-293.
- Taussig R, Nambu JR, Scheller RH (1988) Evolution of peptide hormones: an Aplysia CRF-like peptides. In: *Neurohormones in invertebrates* MC Thorndyke, GH Goldsworthy eds Cambridge Univ Press New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney pp 299-309.
- Telegdy G, Fekete M, Vérszegi M, Kadar T (1980) Effect of peptide hormones on biogenic amines of the central nervous system. In : "Advances in Pharmacological Research and Practice. Aminergic and Peptidergic Receptors". Knoll J, Vizi ES, Wolleman M eds. Pergamon Press Académiai Kiadó Budapest Vol 7: 169-185.
- Thorndyke M, Dockray GJ (1986) Identification and localization of material with gastrin)like immunoreactivity in the neural ganglion of a protochordate *Ciona intestinalis*. *Regul Peptides* 16: 269-279.

- Thor P, Laskiewicz J, Konturek P, Konturek SJ (1988) Cholecystokinin in the regulation of intestinal motility and pancreatic secretion in dogs. *Am J Physiol* 255: G498-G504.
- Trimmer BA, Kobierski LA, Kravitz EA (1987) Purification and characterization of FMRFamide immunoreactive substances from the lobster nervous system: isolation and sequence analysis of two closely related peptides. *J Comp Neurol* 266:16-26.
- Tsumaraya M, Nakajima T, Morinaga S, Shimosato Y, Suzuki M, Yamaguchi K (1986) Morphological variation of immunoreactive cell positive to cholecystokinin 33 (10-20) and gastrin 34 (1-15) in human duodenum. *Cell Tissue Res* 244: 519-525.
- Tuchscherer MM, Knox C, Seybold VS (1987) Substance P and cholecystokinin-like immunoreactive varicosities in somatosensory and autonomic regions of the rat spinal cord: a quantitative study of coexistence. *J Neurosci* 7: 3984-3995.
- Tuchscherer MM, Seybold VS (1985) Immunohistochemical studies of substance P, cholecystokinin-octapeptide, and somatostatin in dorsal root ganglia of the rat. *Neuroscience* 14: 593-605.
- Turkelson CM, Solomon TE, Bussjaeger L, Turkelson J, Rouk M, Shively JE, Ho FJ, Reeve JR Jr (1988) Chemical characterization of rat cholecystokinin-58. *Peptides* 9: 1255-1260.
- Turrigiano GG, Selverston AI (1989) Cholecystokinin-like peptide is a modulator of a crustacean central pattern generator. *J Neurosci* 9: 2486-2501.
- Vanderhaeghen JJ, Goldman S, Lotstra F, Van Reeth O, Deschepper C, Rossier J, Schiffmann S (1985) Co-existence of cholecystokinin- or gastrin-like peptides with other peptides in the hypophysis and the hypothalamus. *Ann NY Acad Sci* 448: 334-344.
- Vanderhaeghen JJ, Lotstra F, Vandesande F, Dierickx (1981) Coexistence of cholecystokinin and oxytocin-neurophysin in some magnocellular hypothalamo-hypophyseal neurons. *Cell Tissue Res* 221:227-231.
- Van Wormhoudt A, Favrel P, Guillaume J (1989) Gastrin/cholecystokinin-like post-prandial variations: quantitative and qualitative changes in the haemolymph of penaeids (Crustacea Decapoda) *J Comp Physiol B* 159: 269-273.
- Veenstra JA (1989) Isolation and structure of two gastrin/CCK-like neuropeptides from the american cockroach homologous to the leucosulfakinins. *Neuropeptides* 14: 145-149.
- Vigna SR, Fischer BL, Morgan JLM, Rosenquist GL (1985) Distribution and molecular heterogeneity of cholecystokinin-like immunoreactive peptides in the brain and gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol* 82C: 143-146.

- Vigna SR, Steigerwalt RW, Williams JA (1984) Characterization of cholecystokinin receptor in bullfrog (*Rana catesbeiana*) brain and pancreas. *Regul Peptides* 9: 199-212.
- Vigna SR, Thorndyke MC, Williams JA (1986) Evidence for a common evolutionary origin of brain and pancreatic cholecystokinin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4355-4359.
- Vizi SE, Bertaccini G, Impicciatore M, Knoll J (1973) Evidence that acetylcholine released by gastrin and related polypeptides contributes to their effect on gastrointestinal motility. *Gastroenterology* 64: 268-277.
- Vlasak R, Wiborg O, Richter K, Burgschwaiger S, Vuust J, Kreil G (1987) Conserved exon-intron organization in two different caerulein precursor genes of *Xenopus laevis*. Additional detection of an exon potentially coding for a new peptide. *Eur J Biochem* 169: 53-58.
- Von Schrenck T, Moran TH, Heinz-Erian P, Gardner JD, Jensen RT (1988) Cholecystokinin receptors on gallbladder muscle and pancreatic acinar cells: a comparative study. *Am J Physiol* 255: G512-G521.
- Vreugdenhil E, Jackson JF, Bouwmeester T, Smit G, Van Minnen J, Heerikhuizen HV, Klootwijk C, Joosse J (1988) Isolation, characterization and evolutionary aspects of a cDNA clone encoding multiple neuropeptides involved in the stereotyped egg-laying behaviour of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. In: The molecular basis of egg-laying behaviour in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. E Vreugdenhil ed Drukkerij All In, Katwijk pp 236.
- Walsh JH, Lamers CB, Valenzuela JE (1982) Cholecystokinin-octapeptide-like immunoreactivity in human plasma. *Gastroenterol* 82: 538-544.
- Wang RY, White FJ, Voigt MM (1985) Interactions of cholecystokinin and dopamine in the nucleus accumbens. *Ann NY Acad Sci* 448: 352-360.
- Wiley J, Owyang C (1987) Participation of serotonin and substance P in the action of cholecystokinin on colonic motility. *Am J Physiol* 252: G431-G435.
- Willems J, Urban L, Murase K, Randic M (1985) Actions of cholecystokinin octapeptide on rat spinal dorsal horn neurons. *Ann NY Acad Sci* 448: 385-402.
- Yabu M, Himeno S, Kariya Y, Fujita H, Tarui S (1989) Identification of gastrin- and cholecystokinin-cells in human gastric antrum and duodenum using *in situ* hybridization technique. *Acta Histochem Cytochem* 22: 309-314.
- You CH, Rominger JM, Chey WY (1983) Potentiation effect of cholecystokinin-octapeptide on pancreatic bicarbonate secretion stimulated by a physiologic dose of secretin in humans. *Gastroenterol* 85: 40-45.

- Yu DH, Huang SC, Wank SA, Mantey S, Gardner JD, Jensen RT (1990) Pancreatic receptors for cholecystokinin: evidence for three receptor classes. *Am J Physiol* 258: G86-G95.
- Yu DH, Noguchi M, Zhou ZC, Villanueva ML, Gardner JD, Jensen RT (1987) Characterization of gastrin receptors on guinea-pig pancreatic acini. *Am J Physiol* 253: G793-G801.
- Zhou Z, Eng J, Pan YCE, Chang M, Hulmes J, Raufman JP, Yalow RS (1985) Unique cholecystokinin peptides isolated from guinea pig intestine. *Peptides* 6: 337-341.

