

50376
1993
109

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
UF  OGIE

50376
1993
109

Année 1993

N° d'ordre 1049

THESE

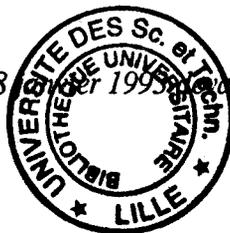
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

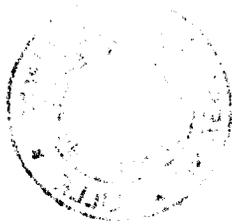
Béatrice SALZET-RAVEILLON

**CARACTERISATION ET MODE D'EXPRESSION D'UNE
PROTEINE ANTIBACTERIENNE (MPII) IMPLIQUEE DANS
LA DEFENSE DU MILIEU INTERIEUR DE L'ANNELIDE
POLYCHETE NEREIS DIVERSICOLOR**

Présentée le 18  1993 devant la Commission d'examen :



<i>Président</i>	<i>M. le Professeur A. Dhainaut</i>
<i>Rapporteurs</i>	<i>M. le Docteur J.-C. Beauvillain</i> <i>M. le Professeur J. Martial</i>
<i>Examineurs</i>	<i>Mme le Professeur N. Dhainaut-Courtois</i> <i>M. le Professeur S. Ball</i> <i>M. Le Professeur D. Zachary</i>



Je dédie cette thèse :

à

Michel

Mes Parents

Mes beaux-Parents

et

Mes Amis

AVANT PROPOS

J'exprime tous mes remerciements

à Monsieur le Professeur A. Dhainaut, Directeur de l'ERS 20 et de cette thèse, qui après avoir initié mes débuts dans la recherche, m'a fait bénéficier de ces précieux conseils et de sa bienveillance. Je vous remercie d'accepter de présider ce jury de thèse. Soyez assuré de ma gratitude et de mon respect.

à Monsieur le Docteur J. C. Beauvillain qui a été attentif à nos problèmes scientifiques lors de la mise en place des techniques d'hybridation *in situ* au sein du laboratoire. Je tiens également à le remercier d'avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude

à Monsieur le Professeur J. Martial qui m'a permis d'acquérir la formation nécessaire en biologie moléculaire et de réaliser une partie de ce travail au sein de son laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génie Moléculaire de l'Université de Liège. Je le remercie également d'accepter d'être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde considération.

à Madame le Professeur N. Dhainaut-Courtois qui grâce à ses efforts pour obtenir des contrats de recherche, a permis de financer le travail réalisé à l'université de Liège. Pour avoir accepté de faire partie de ce jury, je tiens à vous témoigner ma sincère gratitude et mon respectueux attachement.

à Messieurs les Professeurs S. Ball et D. Zachary pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

à Monsieur le Professeur M. Porchet Directeur du laboratoire au moment de mon entrée. Qu'il me permette de lui témoigner ma respectueuse reconnaissance.

à Madame le Docteur F. Rentier qui m'a si chaleureusement accueillie à Liège et qui a été un atout important pour la réalisation de cette thèse; trouve ici toute ma reconnaissance.

à Madame le Docteur A. Wattez et Messieurs les Docteurs C. Wattez et M. Bertout pour l'aide qu'ils m'ont apportée pour la rédaction de cette thèse, simplement au nom de l'amitié. Je tiens à vous exprimer ma profonde affection

à Monsieur le Docteur J.L. Baert pour les conseils scientifiques qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail, trouve ici ma profonde estime.

à Madame F. Bonet qui a assuré avec gentillesse la dactylographie et la mise en forme de cette thèse. Je te dis simplement merci.

Je ne saurais oublier dans mes remerciements toutes les personnes qui de près ou de loin, ont participé à la préparation de ce travail. Je pense en particulier à S. Demuynck, M. C. Slomianny, A. Desmons, L. Meunier, Y. Himpens, G. Montagne, N. Thesse et D. Lazarecki.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Page
AVANT PROPOS	
INTRODUCTION	1
MATERIEL BIOLOGIQUE : la néréis et les mécanismes de défense	3
I- Mode de vie et récolte des animaux	3
II- Anatomie	3
II-1 Le corps des néréis	3
II-2 Métamérie	3
II-3 Appareil circulatoire	4
II-4 Cœlome	4
III- Défense immunitaire	4
III-1 Cellules intervenant dans la défense du milieu intérieur	5
III-1.1 Eléocytes	5
III-1.2 Granulocytes	5
III-2 Mécanismes de défense	6
III-2.1 Immunité à médiation cellulaire	6
III-2.2 Immunité à médiation humorale	7
RESULTATS	9
Chapitre I	
Purification, caractérisation et identification d'une protéine à activité antibactérienne, induite dans le liquide cœlomique lors d'une agression bactérienne	9
I- Purification de la protéine antibactérienne	9
I-1 Chromatographie de gel filtration (Séphadex G 75)	9
I-2 Chromatographie d'échange d'anions (DEAE cellulose)	10
I-3 Vérification de l'activité antibactérienne des fractions positives obtenues	11
II- Caractérisation de la protéine antibactérienne	11
II-1 Western Blot	12
II-2 Neutralisation de l'activité antibactérienne par action d'anticorps	12

II-2.1 Neutralisation après immunoprécipitation à l'aide des anticorps polyclonaux anti-MPII	13
II-2.2 Neutralisation de l'activité bactérienne en présence de fer	14
III- Conclusion	161
Chapitre II	
Obtention et caractérisation de l'ADN complémentaire la MPII	17
I- Isolement et traduction des ARN cœlomiques	17
II- Obtention de l'ADNc codant pour la MPII par amplification génique (PCR)	18
II-1 Amplification enzymatique d'un fragment d'ADNc de la MPII à partir d'oligonucléotides spécifiques	19
II-1.1 Principe	19
II-1.2 Amplification	20
II-1.3 Clonage	21
II-1.4 Spécificité du fragment amplifié	22
II-2 Amplification enzymatique permettant d'obtenir l'extrémité 5' de l'ADNc (brin non codant) de la MPII	23
II-2.1 Principe	23
II-2.2 Amplification	24
II-2.3 Clonage	25
II-2.4 Vérification de la spécificité du fragment amplifié	26
II-3 Amplification enzymatique permettant d'obtenir l'extrémité 3' de l'ADNc (brin non codant) de la MPII	27
II-3.1 Principe	27
II-3.2 Amplification	28
II-3.3 Spécificité de la zone amplifiée par PCR	29
III- Corrélation entre l'ADNc amplifié et le ou les ARNm codant la MPII	30
III-1 Reconstruction de l'ADNc du transcrit de la MPII	30
III-2 Détection du ou des ARNm codant la MPII	31
IV- Conclusion	31
Chapitre III	
Expression de la protéine MPII	33
I- Réponse au stress bactérien impliquant la MPII	33
I-1 Libération de la MPII en réponse au stress	33
I-2 Cinétique de la libération de la MPII	35
I-3 Synthèse de la MPII	36
II- Etude de l'expression du gène de la MPII	39
II-1 Localisation des cellules exprimant le gène de la MPII	39

II-1.1	Localisation en hybridation <i>in situ</i> des cellules contenant l'ARNm codant la MPII	39
II-1.2	Localisation par immunohistochimie des cellules contenant la MPII	40
II-2	Expression du gène de la MPII après une agression bactérienne	40
II-2.1	Détection par la technique d'hybridation <i>in situ</i>	40
II-2.2	Détection par la technique du Dot Blot	40
III-	Conclusion	41
DISCUSSION GENERALE		44
MATERIEL ET METHODES		48
I-	Préparation du matériel biologique	48
I-1	Extraits solubles d'animaux	48
I-2	Prélèvement du liquide coelomique	48
I-3	Préparation des coelomocytes	48
I-3.1	Incorporation d'un précurseur radioactif <i>in vivo</i>	48
I-3.2	Incorporation d'un précurseur radioactif <i>in vitro</i>	48
I-4	Immunisation des animaux	49
I-4.1	Souches bactériennes	49
I-4.2	Milieu de culture liquide	49
I-4.3	Milieu de culture gélosé	49
I-4.4	Immunisation des vers	49
I-5	Tests d'activités antibactériennes	49
I-5.1	Test d'inhibition de croissance bactérienne sur gélose	49
I-5.2	Test d'inhibition de croissance bactérienne par turbidimétrie	50
II-	Méthodes biochimiques	50
II-1	Méthodes chromatographiques	50
II-1.1	Chromatographie de gel filtration	50
II-1.2	Chromatographie d'échange d'ions	51
II-2	Méthode de dosage protéique	51
II-3	Méthodes électrophorétiques	51
II-3.1	Electrophorèse monodimensionnelle en milieu dénaturant et réducteur	51
II-3.2	Révélation	52
II-3.3	Transfert électrophorétique des protéines	52

III-	Méthodes immunologiques	52
III-1	Immunodétection des protéines après transfert sur Immobilon-p (Western Blot)	52
III-2	Immunoprécipitation	53
III-3	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	54
III-4	Immunocytochimie en microscopie photonique	54
IV-	Méthodes de biologie moléculaire	55
IV-1	Extraction des acides ribonucléiques (ARN) totaux	55
IV-1.1	Précautions indispensables	55
IV-1.2	Préparation des ARN totaux	55
IV-1.2.a	Etape d'homogénéisation	55
IV-1.2.b	Ultracentrifugation	56
IV-1.3	Intégrité des ARN totaux	56
IV-2	Synthèse des premiers brins codants des d'acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc)	57
IV-3	Synthèse d'une queue poly (A) en 3' du 1er brin d'ADNc	57
IV-4	Amplification enzymatique par la réaction en chaîne avec la polymérase (PCR)	58
IV-4.1	Amorces	57
IV-4.2	Purification	58
IV-4.3	Réaction d'amplification	58
IV-5	Clonage des produits de PCR	59
IV-5.1	Préparation des produits de PCR	59
IV-5.2	Réaction de digestion enzymatique	59
IV-5.3	Ligation	60
IV-5.4	Introduction du plasmide dans les bactéries	61
IV-5.4.a	Bactéries utilisées	61
IV-5.4.b	Technique d'électroporation	61
IV-5.4.c	Technique au CaCl ₂	62
IV-6	Préparation d'ADN plasmidique	62
IV-6.1	Mini-préparation	62
IV-6.2	Préparation en masse	63
IV-7	Séquençage par la méthode de Sanger	63
IV-8	Méthodes d'analyse des acides nucléiques	64
IV-8.1	Extraction de l'ADN des cellules cœlomiques	64
IV-8.2	Souther blot	64
IV-8.3	Extraction des ARNm poly A+	65
IV-8.4	Northern blot	65
IV-8.5	Dot-blot	66

IV-8.6	Marquage de la sonde	66
IV-8.7	Hybridation	66
V	Hybridation moléculaire <i>in situ</i>	67
V-1	Précautions liées à la présence de RNAses	67
V-2	Préparation du matériel histologique	67
V-3	Marquage de la sonde	68
V-3.1	Marquage avec un nucléotide radioactif	68
V-3.2	Marquage avec un nucléotide non radioactif	68
V-4	Protocole d'hybridation	68
V-4.1	Préhybridation	68
V-4.2	Hybridation	69
V-4.3	Lavages	69
V-5	Détection du signal	70
V-5.1	Signal radioactif	70
V-5.2	Signal non radioactif	70

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'immunité des invertébrés apparaît très différente de celle des vertébrés tant dans les éléments constituant le système immunitaire que dans les réactions qui sont mises en jeu. De plus, elle a été beaucoup moins étudiée. En effet, jusqu'aux années soixante, les travaux relatifs à l'immunité des invertébrés sont restés rares et fragmentaires, malgré la découverte par Metalnikov dès 1882 du phénomène de phagocytose et de son interprétation par Metchnikoff (1924) chez l'étoile de mer et la daphnie. L'orientation de nos travaux sur les mécanismes de défense immunitaire des invertébrés et le choix de *Nereis diversicolor* O. F. Müller comme matériel d'étude ont été guidés par un certain nombre de faits.

Tout d'abord, l'organisation morphologique, la biologie et la physiologie des *Nereidae* sont maintenant bien connues. Appartenant à la classe des annélides polychètes, groupe systématique qui d'un point de vue phylogénique est situé à la base de la lignée évolutive des cœlomates, elles ont suscité depuis Durchon (1956) l'intérêt d'un grand nombre de chercheurs du laboratoire de Biologie Animale de Lille. Le système nerveux a été étudié tant du point de vue structural (Dhainaut-Courtois 1970; Dhainaut-Courtois et Golding, 1978) que de l'identification de différents neuropeptides (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985) dont certains, tel le FMRF-amide (Baratte *et al.*, 1990), ont été séquencés. Parallèlement, le contrôle endocrine de la gamétogenèse (Dhainaut, 1966a, 1966b, 1967, 1968, 1970; Bertout et Dhainaut 1971; Bertout 1976; Dhainaut et Porchet 1977) et de la régénération (Durchon, 1967; Durchon et Boilly, 1964; Boilly, 1974) a été étudié.

En ce qui concerne l'étude des mécanismes de défense contre les agressions extérieures chez les invertébrés, *N. diversicolor* présente un grand intérêt en raison de son mode de vie. La vase où ces animaux creusent leurs galeries apparaît comme un milieu très riche en matières organiques en décomposition et ce milieu est le siège de multiples proliférations bactériennes. Il se caractérise également par une teneur élevée en métaux lourds. La détermination de la nature des métaux a été réalisée (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991; Septier *et al.*, 1991). Dans ce milieu, les néréis prolifèrent et peuvent atteindre une densité de l'ordre de la centaine d'individus au mètre carré. Ces animaux doivent donc posséder des mécanismes de défense à la fois dans le domaine de la résistance aux métaux lourds et dans celui de l'immunité antibactérienne.

Les mécanismes de résistance vis-à-vis des métaux lourds ont fait l'objet d'un certain nombre de travaux chez *N. diversicolor*. Plusieurs métalloprotéines intervenant dans la détoxification du milieu intérieur de cette espèce ont ainsi été mises en évidence (Dennaï *et al.*, 1986). L'une d'entre elles, dénommée MP II, a été purifiée et caractérisée (Dhainaut *et al.*, 1987; Nejmeddine *et al.*, 1988) et sa séquence en acides aminés effectuée (Demuynck, 1992).

Dans le domaine des mécanismes de défense immunitaire, plusieurs travaux ont porté sur les processus de résistance aux infestations parasitaires et aux infections bactériennes. Les réactions d'encapsulation jouent un rôle important (Porchet-Henneré *et al.*, 1987a). Elles impliquent l'activation et la participation de plusieurs catégories de cellules du milieu intérieur (Dhainaut, 1984 ; Dhainaut et Porchet-Henneré 1988). Ces différents types de cellules coopèrent pour la réalisation d'un ensemble qui va isoler et séquestrer le corps étranger. La défense immunitaire contre l'infection bactérienne fait intervenir, à la fois des facteurs humoraux et une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Cette dernière est relativement bien connue grâce aux travaux de Dales (1979), Dales et Dixon (1980), Dhainaut et Porchet-Henneré (1988) qui ont décrit le rôle des coelomocytes dans le processus de phagocytose. En ce qui concerne l'intervention des facteurs humoraux, M'Béri (1988) a montré l'existence d'une protection antibactérienne induite après une agression bactérienne et la participation de différentes substances (lysozyme-like, hémagglutinine, β -glucuronidase) dans l'immunité à médiation humorale.

Le but de notre travail consiste à essayer d'apporter des réponses sur la protection antibactérienne induite dans le milieu intérieur de *N. diversicolor*. Dans un premier temps, nous avons donc entrepris la purification d'une ou des molécule(s) impliquée(s) dans la défense du milieu intérieur. Nous nous sommes ensuite posé la question de l'expression de cette ou de ces protéines et des variations éventuelles de leur synthèse, problème qui n'a pu être abordé qu'après avoir produit l'ADN complémentaire correspondant, utilisé comme sonde moléculaire. Nous envisagerons donc successivement ces trois aspects de nos résultats après avoir présenté le matériel biologique utilisé.

MATERIEL BIOLOGIQUE

LA NEREIS ET SES MECANISMES DE
DEFENSE IMMUNITAIRE

I- Mode de vie et récolte des animaux

Les *Nereis diversicolor*, animaux euryhalins, vivent dans la vase noire des estuaires où elles participent à la chaîne alimentaire du littoral marin. Elles creusent des galeries signalées à la surface par de petits orifices. Dans ce milieu, elles subissent le balancement des marées, ce qui les soumet à des variations de salinité importantes et implique une certaine capacité d'osmorégulation, mais également à des pollutions diverses (organiques, bactériennes et chimiques). Les animaux que nous avons utilisés pour nos expériences ont été récoltés dans l'estuaire de l'Aa à Petit-Fort-Philippe (Nord, France). Les vers récoltés sont maintenus dans l'eau de mer à environ 14°C et utilisés rapidement.

II- Anatomie

II-1 Le corps des néréis

Il est composé de trois régions successives non homologues : le prostomium, le métastomium et le pygidium.

- Le prostomium, ou segment antérieur, représente la tête; il porte des appendices céphaliques et des yeux.
- Le métastomium, région moyenne, est formé d'une succession de métamères homologues. En dehors du premier segment, appelé péristomium, chaque métamère porte une paire de parapodes, expansions latérales du corps garnies de nombreuses soies.
- Le pygidium correspond au segment postérieur du corps; il porte 2 cirres.

II-2 Métamérie

Chaque métamère (fig. 1) contient une cavité générale appelée cœlome, une paire d'organes excréteurs ventro-latéraux de type métanéphridie, une paire d'organes cilio-phagocytaires latéro-dorsaux (fig. 2), un tube digestif droit et une chaîne ganglionnaire ventrale métamérisée. La musculature du métamère comprend des muscles obliques ainsi que des muscles circulaires et longitudinaux constituant, avec l'épiderme, la paroi du corps.

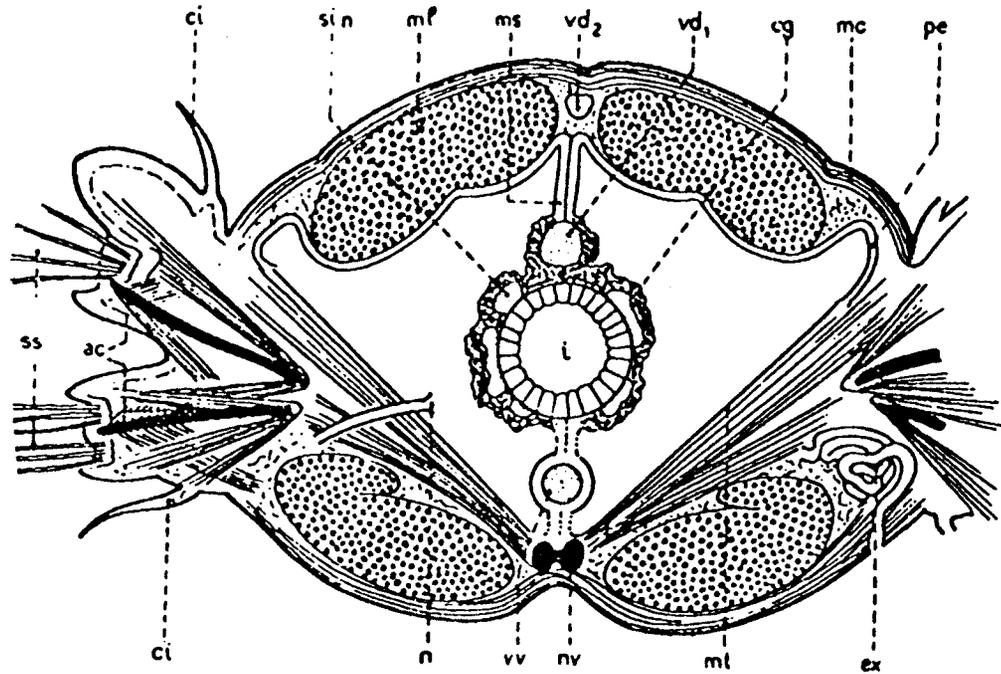


Figure 1. Coupe transversale d'un polychète néréidimorphe (d'après De Beauchamp, in Grassé, 1961). Ac : acicule ; cg : cellules chloragènes (splanchnopleure) ; ci : cirre ; ex : néphridie ; i : intestin ; mc : muscles circulaires ; ml : muscles longitudinaux ; ms : mésentère ; mt : muscles transversaux ; n : néphrostome ; nv : chaîne nerveuse ; pe : péritoine ; sin : sinus intestinaux ; ss : soies ; vd₁, vd₂ : vaisseaux dorsaux ; vv : vaisseau ventral .

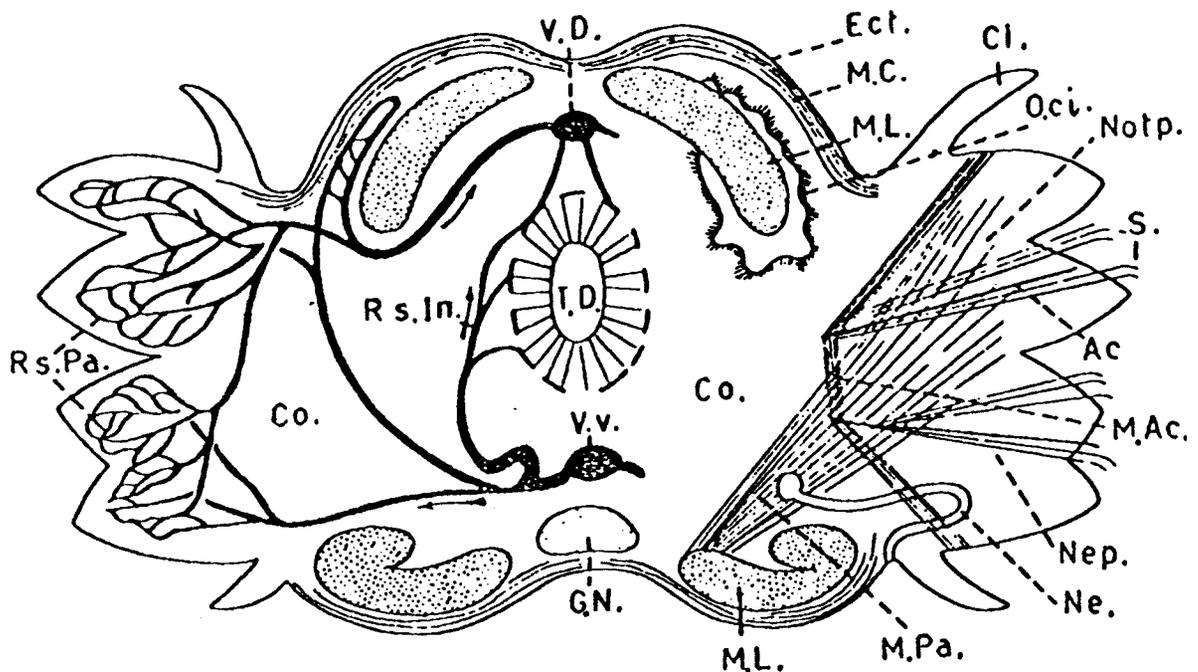


Figure 2. Coupe transversale schématique dans un segment de *Nereis* (d'après Prenant, in Brien, 1961). Ac : acicule ; Ci : cirre ; Co : coelome ; Ect : ectoderme ; G.N. : ganglion nerveux ; M.Ac. : muscles des acicules ; M.C. : muscles circulaires sous-ectodermiques ; M.L. : champs musculaires, latéro-dorsaux et latéro-ventraux ; M.Pa. : muscles parapodiaux ; Ne. : néphridie ; Nep. : neuropode ; Notp. : notopode ; O.ci. : organe cilio-phagocytaire ; Rs.In. : réseau sanguin intestinal ; Rs.Pa. : réseaux sanguins parapodiaux ; S. : soies ; T.D. : tube digestif ; V.D. : vaisseau longitudinal dorsal ; V.V. : vaisseau longitudinal ventral.

II-3 Appareil circulatoire

Les néréidiens sont caractérisés par un appareil vasculaire clos (fig.2) La paroi des vaisseaux, qui ne possède pas d'endothélium, est constituée principalement par deux feuillets du mésentère qui s'écartent. Deux vaisseaux sanguins longitudinaux, un dorsal et un ventral, sont reliés l'un à l'autre par des vaisseaux latéraux émettant des ramifications jusque dans la paroi des parapodes. Les vaisseaux dorsal et ventral communiquent en outre avec le plexus intestinal par de petits vaisseaux. Le plasma renferme des hémocytes et une protéine oxydable à base de fer, l'hémoglobine.

II-4 Cœlome

Au niveau de chaque métamère la cavité cœlomique est divisée par une cloison intersegmentaire ou dissépinement. Le cœlome renferme un liquide appelé lymphe périvasculaire ou liquide cœlomique. Ce dernier, complètement indépendant du sang vasculaire, n'est donc pas l'homologue de l'hémolymphe des mollusques et des arthropodes chez lesquels il n'y a pas de distinction formelle entre le sang et la lymphe périvasculaire. Deux catégories cellulaires baignent au sein de ce liquide cœlomique, les produits génitaux et des cœlomocytes (fig. 3). Ces derniers sont subdivisés en deux catégories : les éléocytes, impliqués dans la vitellogenèse, et les granulocytes, impliqués dans la défense du milieu intérieur, qui seront décrits en détail dans le paragraphe suivant de notre mémoire. Les produits génitaux mâles ou femelles se développent aux dépens du revêtement péritonéal du cœlome et se détachent précocement pour tomber dans le liquide cœlomique où ils croissent lentement jusqu'à la maturité sexuelle. L'espèce *N. diversicolor* ne présente pas d'épitoquie. Au moment de la maturité génitale, seul un changement de couleur dû aux produits génitaux visibles par transparence au travers du tégument est observé.

III- Défense immunitaire

Etant donné le rôle important joué par les cœlomocytes dans la défense du milieu intérieur des néréidiens, nous rappellerons brièvement dans cette partie les différents types de cœlomocytes connus et leurs caractéristiques morphologiques avant d'évoquer les mécanismes de défense.

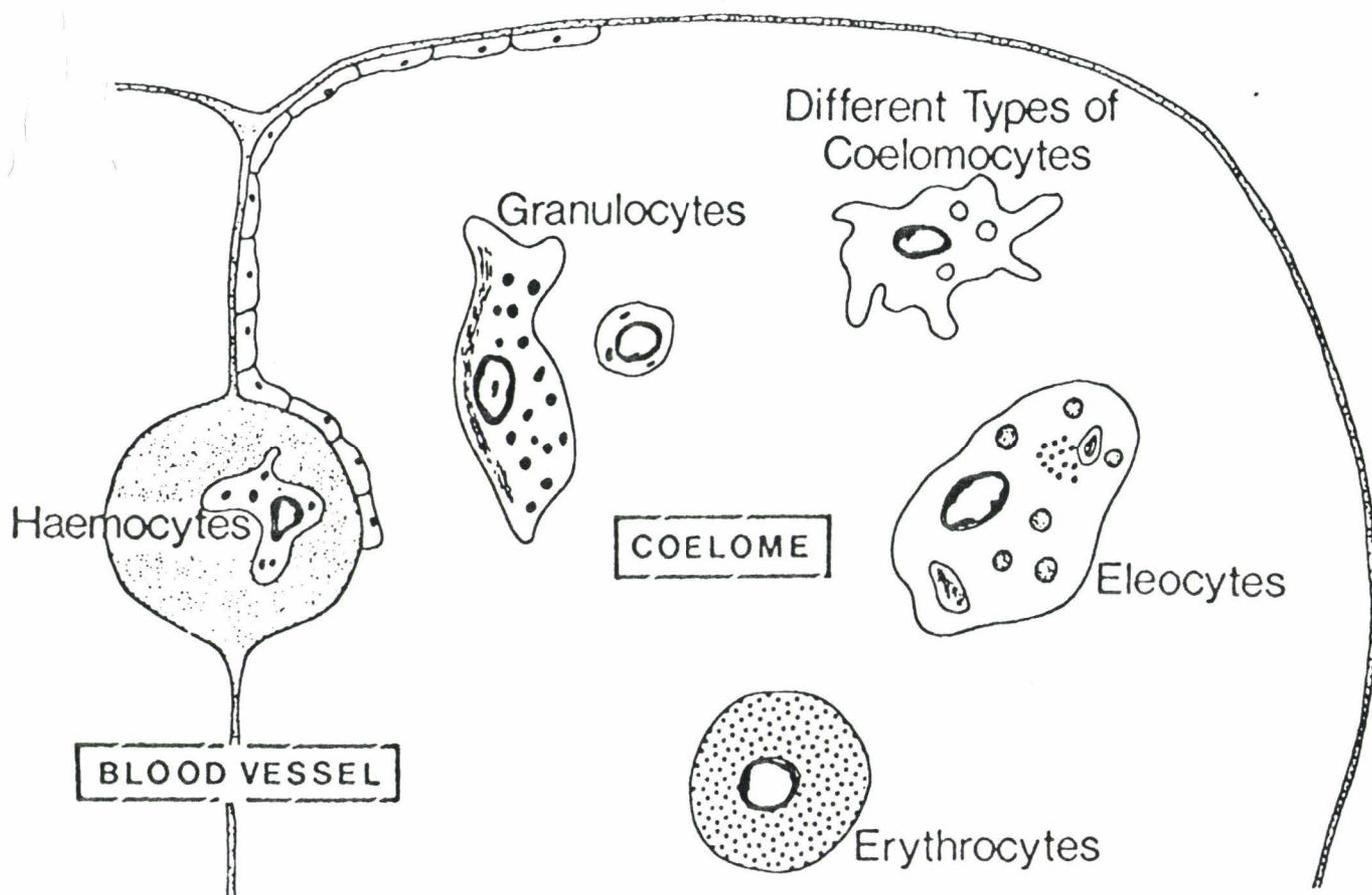


Figure 3. Schéma représentant les différents types cellulaires de la cavité cœlomique (Dhainaut et Porchet-Henneré, 1988).

III-1 Cellules intervenant dans la défense du milieu intérieur

Dans le cœlome, deux grandes catégories cellulaires peuvent être distinguées : les éléocytes et les granulocytes (Baskin, 1974 ; Dhainaut, 1984 ; Dhainaut et Porchet-Henneré, 1988 ; M'Béri, 1988).

III-1.1 Eléocytes

Ce sont des cellules non adhérentes, très polymorphes, mesurant en moyenne 30 μm de diamètre et à noyau central. Sur le vivant, ils sont caractérisés par la présence dans leur cytoplasme de nombreuses gouttelettes lipidiques jaunâtres ; ils présentent en ultrastructure des phagosomes contenant des sarcolytes (fig.4).

III-1.2 Granulocytes

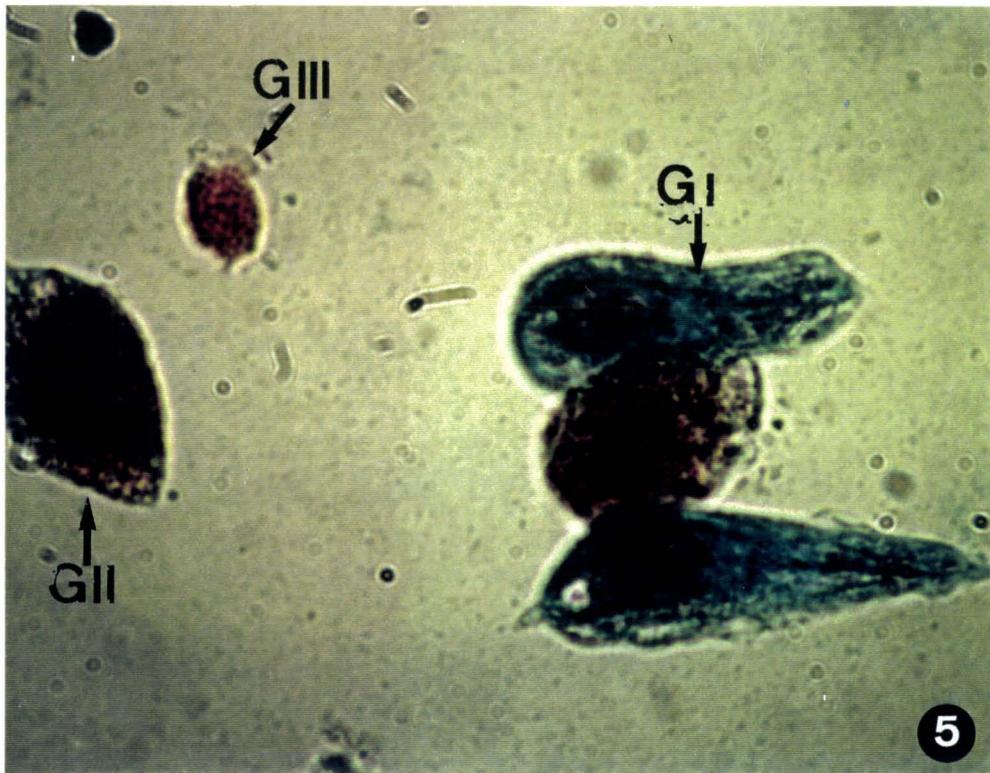
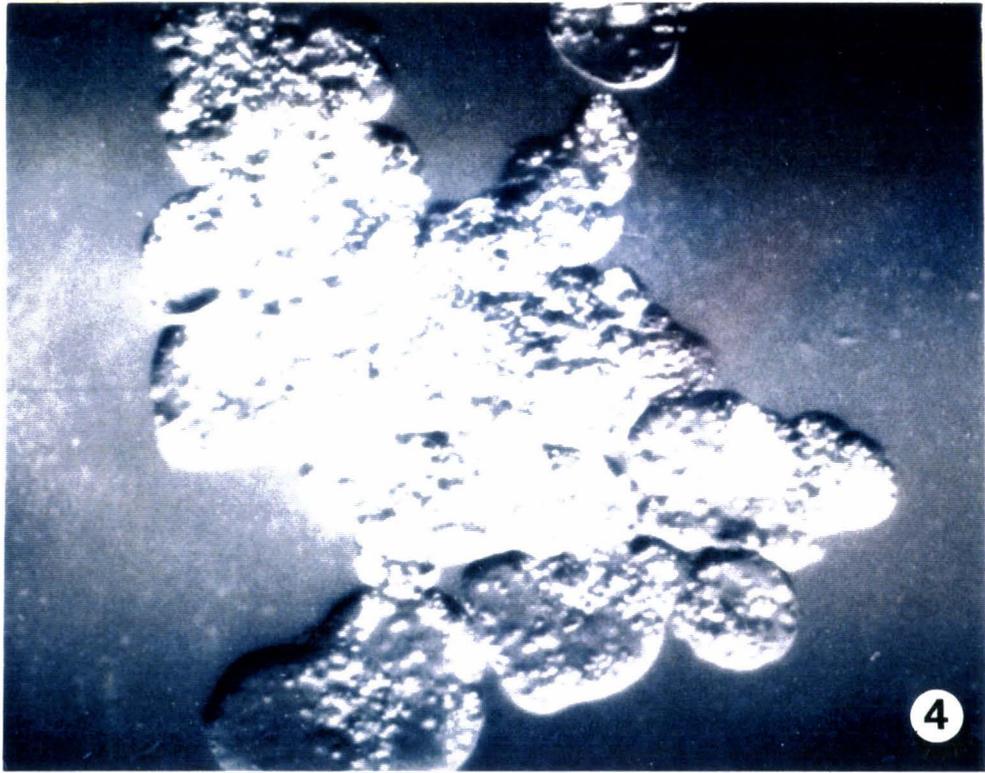
Ce sont des cellules à cytoplasme granuleux adhérentes entre elles (fig.5). Cinq types ont été définis (Baskin, 1974 ; Dhainaut, 1984), trois de ces types (I, II, III) ont été décrits en détail (Dhainaut et Porchet-Henneré, 1988 ; M'Béri, 1988).

- Les granulocytes de type I sont de grandes cellules fusiformes de 15 à 25 μm de long (fig.5), forme qu'elles perdent après étalement sur un support en présentant alors un voile circulaire. En ultrastructure, leur cytoplasme présente des faisceaux de microfilaments, des microtubules et deux types granules : les uns, de forme ovoïde, contiennent un matériel très dense aux électrons, les autres, de forme plus arrondie, sont moins denses aux électrons. Ces granules sont comparables à des lysosomes. Par leur structure les granulocytes de type I de *N. diversicolor* se rapprochent des granulocytes de type I de *Perinereis cultrifera* (Baskin, 1974 ; Dhainaut, 1984) et de *Lumbricus terrestris* (Linthicum *et al.*, 1977) ainsi que des leucocytes fibrillaires d'*Eisenia fetida* (Stang-Voss, 1971; Valembois, 1971a).

- Les granulocytes de type II sont, comme les granulocytes I, des cellules de grande taille (25 μm) mais de forme arrondie (fig. 5). Ils ne contiennent pas de microfilaments et sont caractérisés par la présence de nombreux pseudopodes. Leur noyau est légèrement excentré et leur cytoplasme contient un grand nombre de granules de différentes tailles et du glycogène. Ces caractéristiques rapprochent les granulocytes II des neutrophiles de mammifères (Dhainaut et Porchet-Henneré, 1988 ; M'Béri, 1988).

Figure 4. Observation sur le vivant (en microscopie à contraste de phase) d'un agrégat d'éléocytes chez *Nereis diversicolor*. Les globules lipidiques sont visibles à travers la membrane (M'Béri, 1988) (x 1500).

Figure 5. Vue en microscopie photonique de granulocytes de *N. diversicolor* colorés par la technique de Papanicolaou. Les granulocytes I (GI) sont caractérisés par la présence de microfilaments, les granulocytes II (GII) par un nombre important de granules et les granulocytes III (GIII) par leur petite taille et leur noyau volumineux (M'Béri, 1988) (x 11000).



- Les granulocytes de type III sont des cellules de petite taille (5 à 8 μm de diamètre) présentant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (fig.5). Ils apparaissent sous une forme circulaire et sont dépourvus de voile. Leur cytoplasme contient quelques granules. Au contact d'un support ils émettent des filopodes caractéristiques qui leur apportent une grande mobilité. Ils ressemblent aux amibocytes du polychète *Arenicola marina* (Dales et Dixon, 1982), aux coagulocytes de certains insectes (Ashok, 1976) et aux leucocytes du mollusque *Biomphalaria glabrata* (Jeong et Heyneman, 1976).

- Les autres types (IV et V) de granulocytes sont faiblement représentés (1% de l'ensemble des granulocytes). Le type IV présente un noyau lobé. Ces cellules émettent des pseudopodes très développés, renferment peu de granules et un grand nombre de microtubules mais ne possèdent pas de microfilaments. Par contre, le type V est caractérisé par un noyau sphérique accolé à la membrane plasmique.

Dans la suite du mémoire, les granulocytes de type I, II et III seront dénommés G I, G II et G III.

III-2 Mécanismes de défense

L'intervention de cellules et de facteurs spécifiques dans les mécanismes de défense, démontrée chez les vertébrés et les invertébrés, a permis de définir deux types d'immunité : à médiation cellulaire et à médiation humorale. Chez *N. diversicolor*, les connaissances des mécanismes de défense du milieu intérieur restent assez fragmentaires en ce qui concerne l'immunité à médiation humorale; par contre, des études ont pu établir l'intervention de processus de phagocytose et d'encapsulation dans l'immunité à médiation cellulaire (voir revue de Ratcliffe *et al.*, 1985).

III-2.1 Immunité à médiation cellulaire

Chez les invertébrés, la phagocytose se déroule selon les mêmes processus que ceux connus chez les vertébrés. Cependant, chez les invertébrés, les contacts se font le plus souvent au hasard avec une très faible spécificité. Des travaux récents (Porchet-Henneré et M'Béri, 1987) réalisés sur *N. diversicolor* et *Perinereis cultrifera* montrent que les animaux infectés font intervenir leur cœlomocytes pour éliminer les bactéries de leur milieu intérieur. Comme l'a signalé Dales (1979), les cœlomocytes qui ont phagocyté les bactéries semblent acquérir la propriété d'adhérer les uns aux autres pour former des amas cellulaires non structurés

sans corps nécrotique au centre. On observe ainsi la disparition des bactéries mais également une diminution du nombre des cœlomocytes circulants du liquide cœlomique. *In vitro*, il a pu être établi que la phagocytose est réalisée par les granulocytes de type II. Le matériel contenu dans ces cellules se déverse dans les phagosomes hébergeant les bactéries. Ce processus aboutit au déversement d'enzymes lytiques permettant la dégradation bactérienne. Cette réaction a également été signalée chez les insectes (Gagen et Ratcliffe 1976 ; Rowley et Ratcliffe 1976; Ratcliffe *et al.*, 1985), les échinodermes (Yui et Baynes, 1983), les mollusques (Yves *et al.*, 1973 ; Sminia *et al.*, 1974 ; Sminia et Van der Knaap, 1983) et les annélides, où la majorité des travaux ont été réalisés chez les oligochètes (chateaufreyaud-Duprat et Lestage 1980; Chateaufreyaud-Duprat *et al.*, 1983; Stein et Cooper 1983, 1988), et les polychètes (Baskin, 1974 ; Fitzgerald et Ratcliffe 1983 ; Porchet-Henneré *et al.*, 1987a).

Un phénomène bien connu chez les invertébrés, celui de l'encapsulation (Brehélin *et al.*, 1975 ; François 1975 ; Ratcliffe et Gagen 1977 ; Chateaufreyaud-Duprat *et al.*, 1981, 1983; Ratcliff *et al.*, 1985), a été observé chez *N. diversicolor* par Thomas dès 1930 ; cet auteur a appelé granulomata des masses d'aspect tumoral résultant de la dégénérescence des ovocytes et des soies. Après inoculation dans des animaux présentant des "tumeurs" de *Bacteria tumefaciens*, Thomas (1932) trouve ces bactéries à l'intérieur des cellules situées à la périphérie du granulomata. Des capsules ont été également observées par Porchet-Henneré (1969) autour du parasite *Cœlotropha durchoni* dans la néréis. Récemment, chez *N. diversicolor*, la genèse des capsules a été étudiée par la méthode expérimentale d'implants exogènes (Porchet-Henneré *et al.*, 1987a). La nature des différents types cellulaires intervenant dans la formation de la capsule a pu être élucidée en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques des granulocytes de types I, II et III (Porchet-Henneré *et al.*, 1990). La couche la plus interne, au contact avec le corps étranger, est formée de G III, la couche intermédiaire de G II et la couche la plus externe de G I.

III-2.2 Immunité à médiation humorale

Au niveau des mécanismes de défense faisant intervenir des substances humorales, M'Béri (1988) a signalé l'intervention de molécules de type hémagglutinines et lysosymes. Ces molécules sont largement distribuées chez les invertébrés. Les lysozymes et molécules

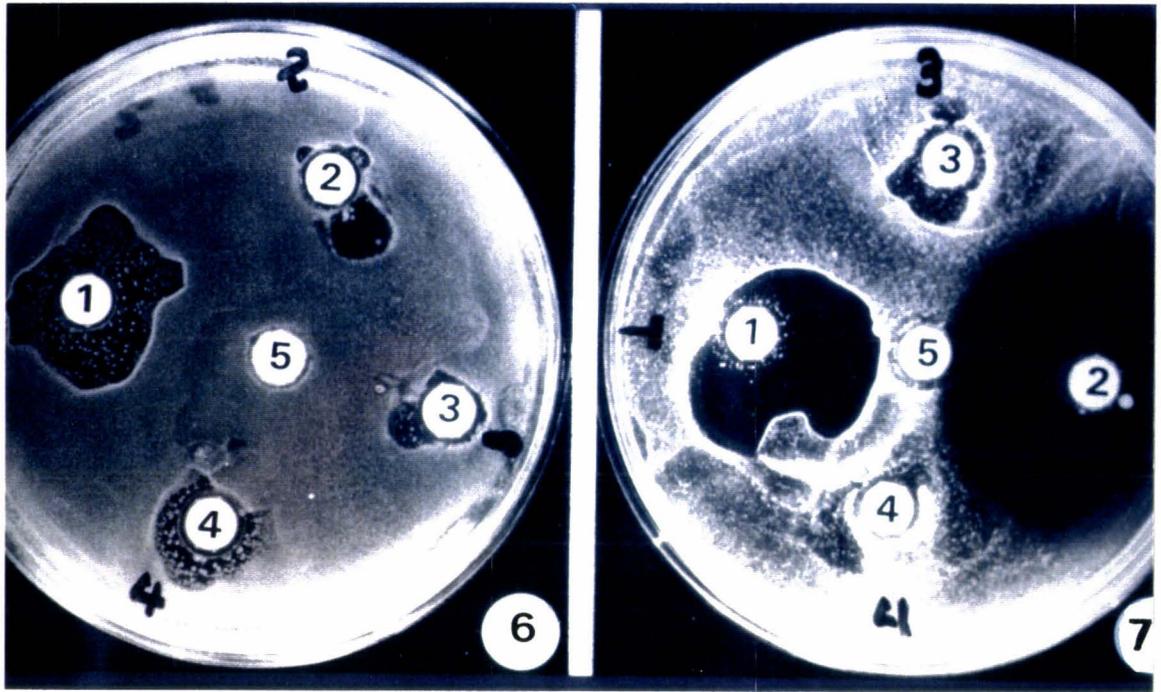
apparentées se retrouvent chez les insectes (Mohrig et Messner, 1968 ; Jollès et Jollès 1975 ; Anderson et Cook 1979 ; Zachary et Hoffmann, 1984 ; Engström *et al.*, 1985 ; Russel et Dunn 1990), les mollusques (Rodrick et Cheng, 1974 ; Cheng *et al.*, 1975 ; Cheng et Rodrick, 1975), les échinodermes (Jollès et Jollès, 1975) et les annélides (Perin et Jollès, 1972 ; Çotuk et Dales 1984 ; Lassalle et Lassègues 1986 ; Lassalle et Lassègues, 1988). Les hémagglutinines se retrouvent chez les annélides (Anderson 1980 ; Dales 1982 ; Stein *et al.*, 1982 ; Stein et Basch 1979 ; Stein et Cooper 1988 ; Cenini, 1983 ; Russel *et al.*, 1983), les mollusques (Hammarström et Kaba, 1969 ; Hardy *et al.*, 1977), les crustacés (Hall et Rowlands, 1974a, b) et les insectes (Scott, 1971 ; Lackie, 1981 ; Ratcliffe *et al.*, 1985).

En ce qui concerne l'existence de protéines antibactériennes, Dales et Dixon (1980) n'ont constaté aucune activité dans le liquide cœlomique, même après immunisation préalable avec des bactéries tuées. Récemment, en utilisant des méthodes plus sensibles, M'Béri (1988) a démontré l'existence d'une protection antibactérienne après immunisation de *N. diversicolor* par différentes espèces de bactéries. L'existence d'une molécule antibactérienne, à caractère basique, dont la masse moléculaire est de 10 kDa, a été démontrée. Parallèlement, des études relatives aux effets biologiques du cadmium sur *N. diversicolor* réalisées par Nejmeddine *et al.*, (1988) ont permis de démontrer l'existence d'une métalloprotéine intervenant dans les processus de détoxication. C'est une protéine de masse moléculaire proche de 10 kDa appelée métalloprotéine II (MPII) parce qu'elle apparaît sur le deuxième pic obtenu après chromatographie de filtration sur Sephadex G75 (Nejmeddine *et al.*, 1988). Son site de synthèse a pu être démontré, à l'aide d'anticorps (poly- et monoclonal) dirigés contre la MPII, comme étant les G I (Porchet-Henneré *et al.*, 1987b).

RESULTATS

Chapitre I

Purification, caractérisation et identification d'une protéine à activité antibactérienne, induite dans le liquide cœlomique lors d'une agression bactérienne.



Figures 6 et 7. Croissance d'*E.coli* (fig.6) et de *Micrococcus kristinae* (fig.7) en présence de disques pour antibactériogrammes neutres imbibés de 20 μ l de liquide cœlomique de *N. diversicolor* immunisées avec différentes espèces de bactéries (1 : *Pseudomonas aeruginosa*; 2 : *Escherichia coli*; 3 : *Bacillus cereus*; 4 : *Bacillus megaterium*) ou non immunisées (5). Après ensemencement et dépôt des disques, les boîtes de culture ont été placées à 37°C pendant 8 heures (d'après M'Béri, 1988).

A la suite de l'injection de différentes espèces de bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Micrococcus kristinae*), M'Béri (1988) a pu obtenir l'induction d'une protection antibactérienne dans le liquide cœlomique de *N. diversicolor* (figs. 6 et 7). Cette induction est maximale sur test d'inhibition de croissance de *M. kristinae* après l'injection d'*E. coli*. En outre, il a pu être établi que l'injection de cadmium (Cd) provoque également cette protection. Les études préliminaires effectuées par M'Béri (1988) ont montré l'apparition d'une protéine d'environ 10 kDa, à activité antibactérienne, dans le liquide cœlomique après immunisation. Cet auteur a montré que son comportement électrophorétique en milieu dénaturant et réducteur, de même que les tests préliminaires de détection réalisés à l'aide d'anticorps spécifiques, laissent supposer des analogies entre cette protéine antibactérienne et la métalloprotéine désignée sous le nom de MPII. Cette protéine, isolée par Nedjmeddine *et al.*, (1988), est capable de complexer le Cd lors d'une intoxication métallique.

Dans le but de vérifier cette analogie et de caractériser la ou les protéines antibactériennes, nous avons entrepris leur purification à la suite d'une immunisation des vers par l'injection d'une suspension de bactéries faiblement concentrée.

I- Purification de la protéine antibactérienne

Les différentes étapes de la purification sont résumées dans les schémas 1 et 2. Nous avons utilisé le protocole de purification mis au point, pour l'isolement de la MPII, par Nejmeddine *et al.* (1988) et comme test biologique la détection de l'activité antibactérienne (voir Méthodes p.50).

I-1 Chromatographie de gel filtration (Sephadex G75)

Le liquide cœlomique, prélevé 24 heures après immunisation des vers par une suspension d'*E. coli* (voir Méthodes p.49), a été soumis à une séparation en fonction de la masse moléculaire sur une colonne de gel filtration (Sephadex G75). Après passage sur la colonne, préalablement calibrée par des protéines de masse moléculaire connue, 4 pics ont été résolus (Planche 1, fig. a). Le premier pic (PI) correspond à des protéines de masse moléculaire supérieure à 70 kDa (sortant avec le volume d'exclusion), le second (PIIa) à des protéines de masse moléculaire comprise entre 30 et 50 kDa, le troisième (PIIb) à des protéines de masse

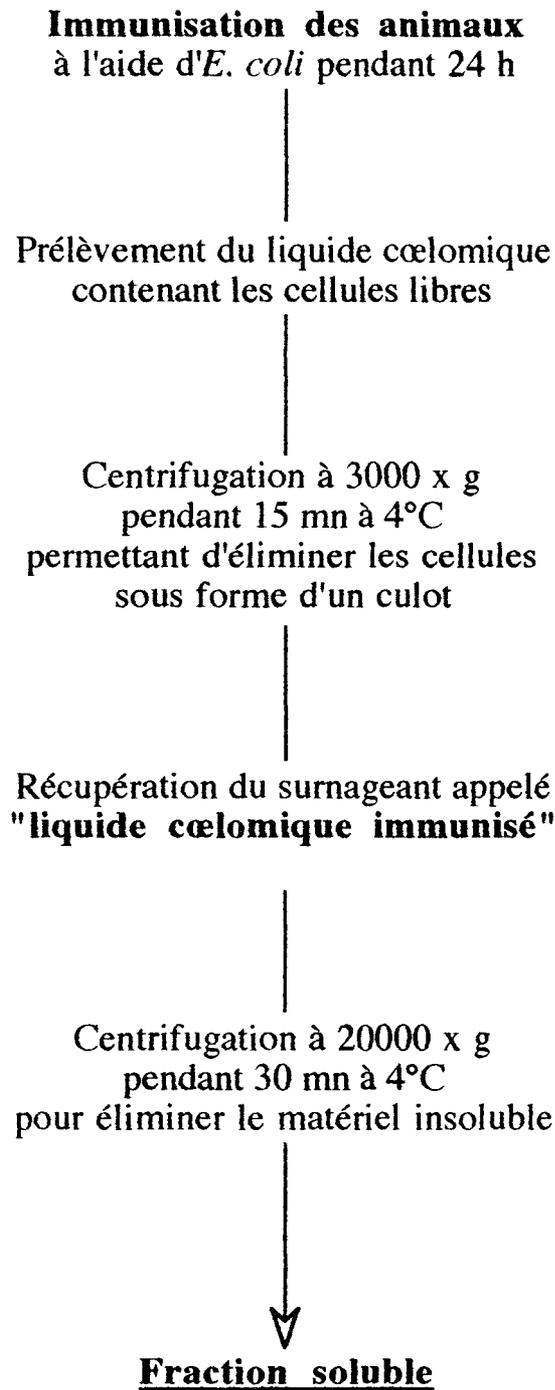


Schéma 1 : Représentation schématique des principales étapes d'obtention de la fraction soluble du "liquide cœlomique" après induction de la protection antibactérienne par immunisation des animaux à l'aide d'*E. coli*.

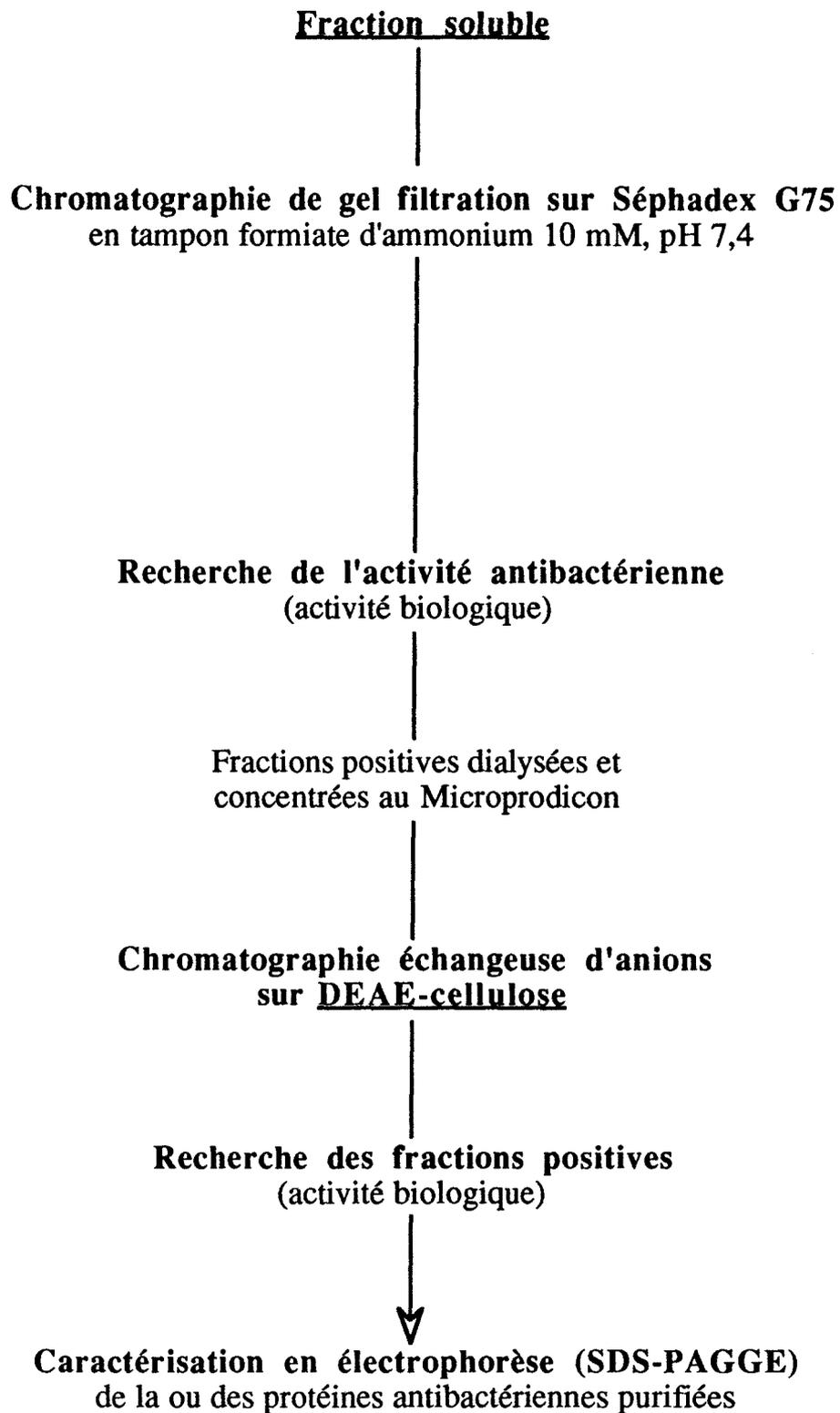


Schéma 2 : Représentation schématique des différentes étapes de purification de la ou des protéines antibactériennes induites dans le liquide cœlomique après immunisation de *N. diversicolor*

PLANCHE 1

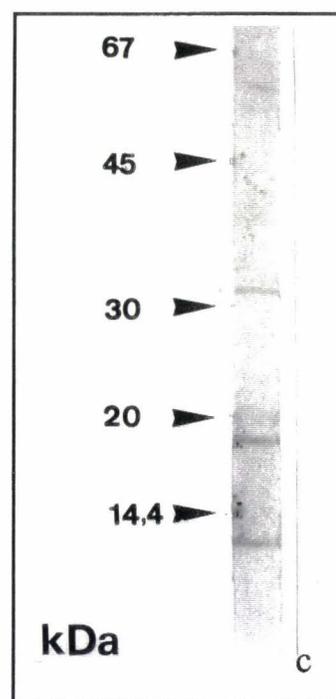
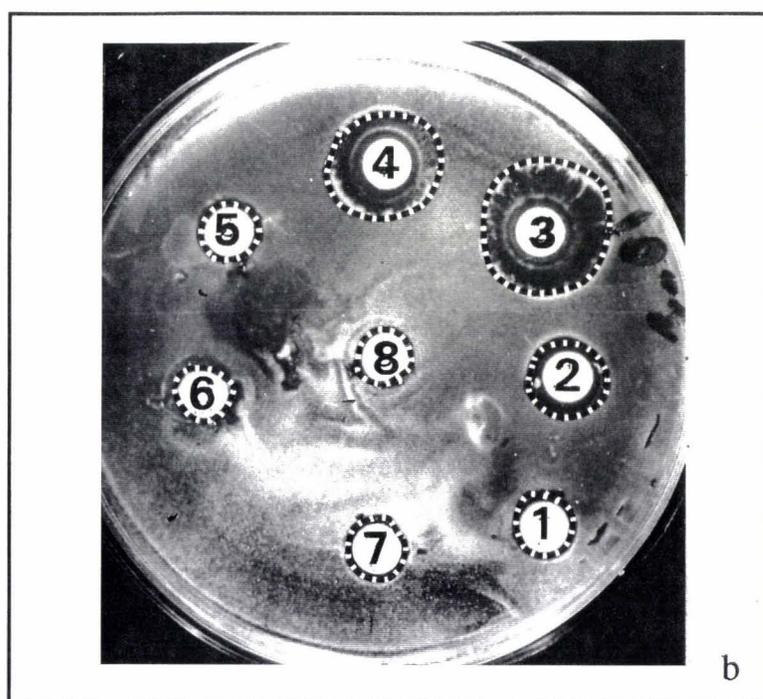
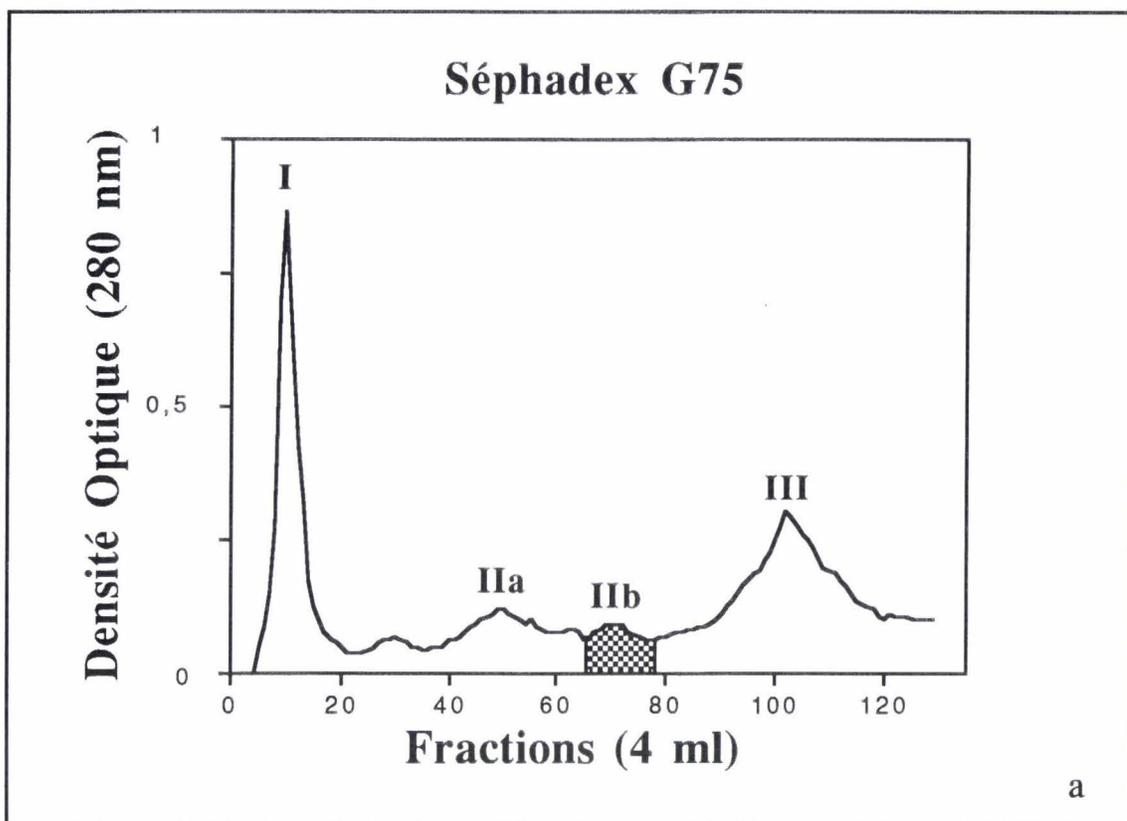
Purification par chromatographie de gel filtration "Sephadex G75" de la ou des protéines antibactériennes induites dans le liquide cœlomique après immunisation par injection d'une suspension d'*E. coli*.

- a- Profil d'élution des protéines du liquide cœlomique de *N. diversicolor* préalablement immunisées à l'aide d'une suspension d'*E. coli*, après chromatographie de gel filtration sur Séphadex G 75.

- b- Test d'inhibition de croissance, sur milieu de culture gélosé, de *M. kristinae*. Les disques antibactériogrammes neutres sont imbibés avec 20 µl des différentes fractions protéiques présentées dans la figure a (1 : Pic I; 2 : Pic II b; 3 : Pic II b concentré; 5 : Pic II a; 6 : Pic III) ou avec 20 µl de liquide cœlomique (4) ou de PBS (7) ou d'H₂O (8).
Les boîtes sont incubées 8 h à 37°C.

- c- Analyse électrophorétique en milieu dénaturant (SDS en présence de β-mercaptoéthanol) sur gel de polyacrylamide en gradient 5-25 % d'acrylamide du Pic II b obtenu après Séphadex G75 contenant la ou les protéines antibactériennes.

PLANCHE 1



moléculaire comprise entre 10 et 30 kDa et le dernier (PIII) à des protéines de masse moléculaire inférieure à 10 kDa.

La recherche des fractions possédant une activité antibactérienne a été réalisée grâce à un test d'inhibition de croissance sur milieu de culture gélosé. Des plages d'inhibition de croissance de *M. kristinae* sont détectées pour les fractions correspondant à celles du pic IIb (Planche 1, fig. b). Les autres fractions n'ont aucune incidence sur la croissance de *M. kristinae* (Planche 1, fig. b). Les fractions positives ont été dialysées et concentrées au Microprodicon.

La caractérisation électrophorétique en SDS-PAGGE en milieu réducteur des protéines constituant le pic IIb a mis en évidence, après coloration du gel au bleu de Coomassie (Planche 1, fig. c), 3 bandes majeures de masse moléculaire respectivement supérieure à 30 kDa (bande 1), inférieure à 20 kDa (bande 2) et inférieure à 14,4 kDa (bande 3). Les protéines de ce pic IIb ont été de nouveau séparées, non plus en fonction de leur masse, mais en fonction de leur point isoélectrique (pI) par une chromatographie d'échange d'anions.

I-2 Chromatographie d'échange d'anions (DEAE cellulose)

Après passage sur DEAE cellulose des fractions du pic IIb obtenues après Sephadex G75 et possédant l'activité biologique, un pic hétérogène a été obtenu. Trois parties (1, 2 et 3) dont une majeure notée 2, ont été définies (Planche 2, fig. a).

Les fractions recueillies ont été testées, comme précédemment, par un test d'inhibition de croissance sur milieu de culture gélosé. Les résultats ont montré que seules les fractions correspondant à la partie 2 présentent une plage d'inhibition de croissance de *M. kristinae* (Planche 2, fig. b). Les fractions des autres parties (1 et 3) du pic obtenu après DEAE cellulose n'ont aucune incidence sur la croissance de *M. kristinae*. Les fractions positives ont été dialysées et concentrées (voir Méthodes p.50).

La caractérisation électrophorétique des fractions positives du pic DEAE, après SDS-PAGGE en milieu réducteur, a montré la présence d'une seule bande colorée par le bleu de Coomassie, de masse légèrement inférieure à 14,4 kDa (Planche 2, fig. c) et estimée à 13,6 kDa.

PLANCHE 2

Purification par chromatographie échangeuse d'anions "DEAE cellulose" de la ou des protéines antibactériennes du pic II b obtenu après séparation sur gel filtration "Sephadex G75".

a- Profil du pic II b de Sephadex G 75, contenant l'activité antibactérienne, obtenu par chromatographie d'échange d'anions sur DEAE cellulose élué par un gradient de NaCl 0-0,5 M. Obtention d'un pic hétérogène constitué de 3 parties (1, 2, 3).

b- Test d'inhibition de croissance, sur milieu de culture gélosé, de *M. kristinae*. Les disques sont imbibés avec 20 µl des différentes parties (1, 2, 3) du pic obtenu après DEAE-cellulose ou avec 20 µl de PBS (IV).

I : Partie 1

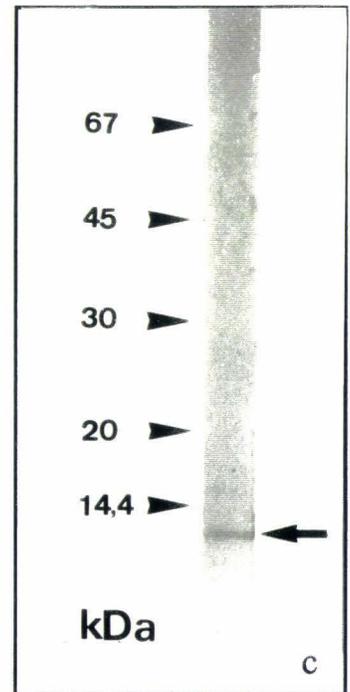
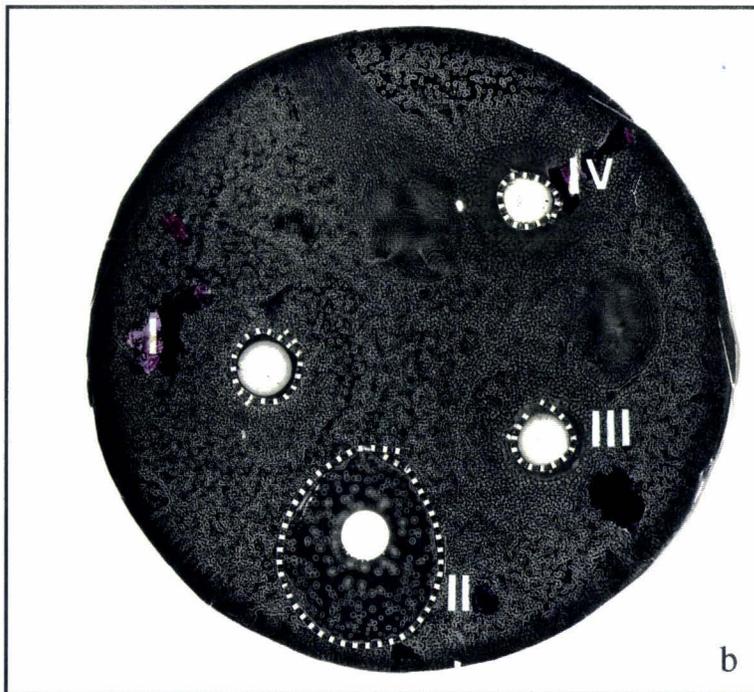
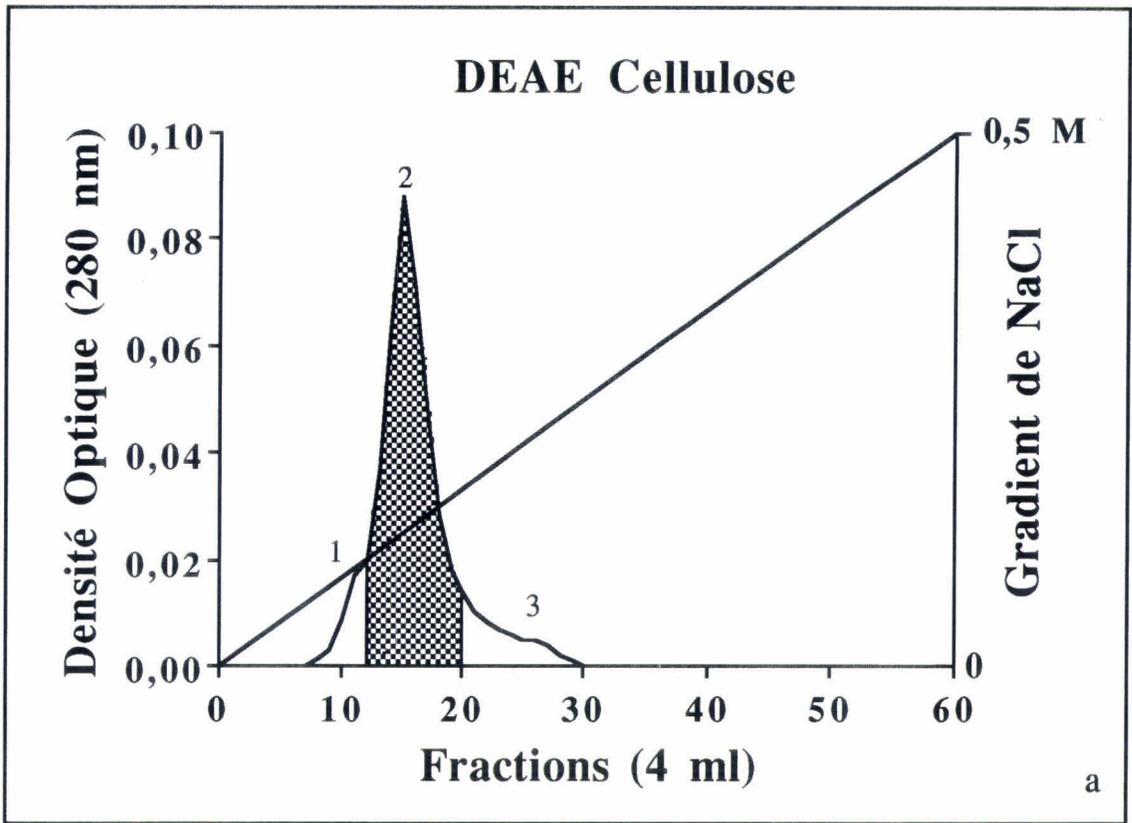
II : Partie 2

III : Partie 3.

Les boîtes sont incubées 8 h à 37°C.

c- Analyse électrophorétique de la partie 2 du pic obtenu après DEAE- cellulose, en milieu dénaturant (SDS en présence de β-mercaptoéthanol) sur gel de polyacrylamide en gradient continu 5-25 % d'acrylamide.

PLANCHE 2



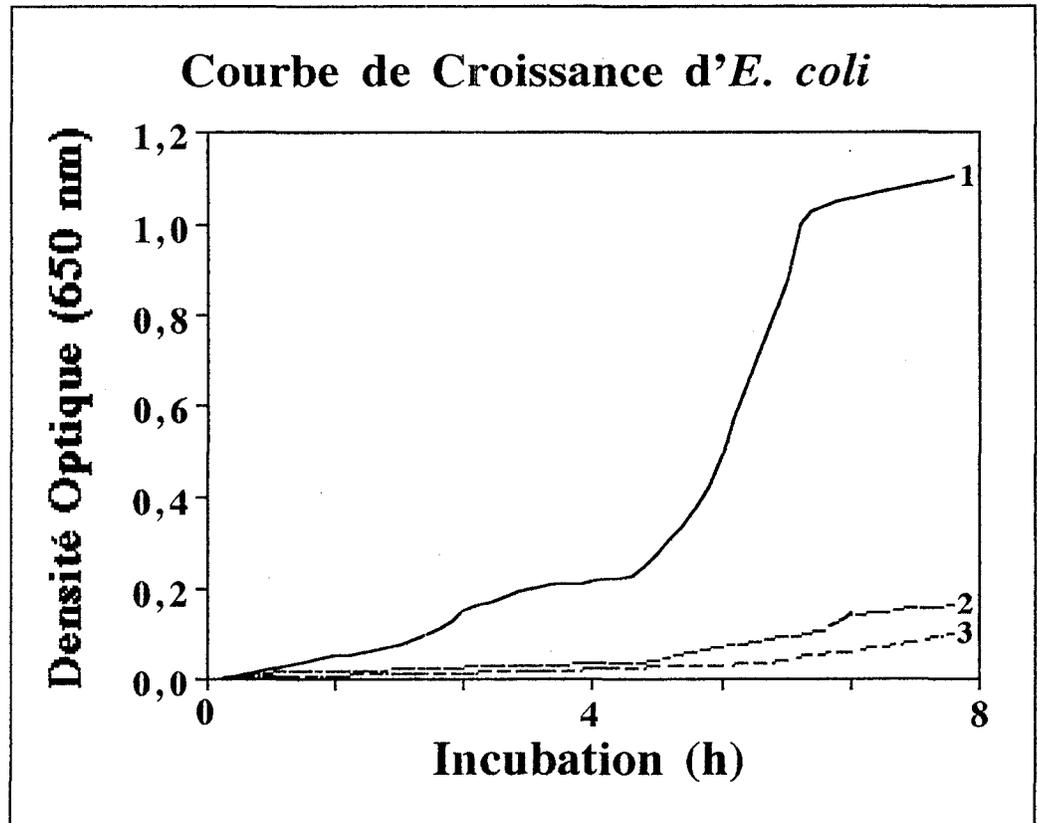


Figure 8 : Courbe de croissance d'*E. coli* en turbidimétrie en présence de 20 μ l de :

- 1 : PBS
- 2 : Pic II b positif après G 75
- 3 : Partie 2 positive du pic après DEAE cellulose

I-3- Vérification de l'activité antibactérienne des fractions positives obtenues

L'activité antibactérienne des fractions positives obtenues après purification sur Séphadex G75 et DEAE-cellulose a été vérifiée par la méthode de turbidimétrie. Les courbes de croissance établies jusqu'à 8 heures de culture sont présentées dans la figure 8. Elles montrent que la partie 2 du pic obtenu après DEAE cellulose, correspondant à une protéine de masse moléculaire inférieure à 14,4 kDa, présente une activité antibactérienne. Cette activité antibactérienne se traduit aussi bien sur des bactéries de type Gram+ (*M. kristinae*) que sur des bactéries de type Gram- (*E. coli*). Il est à noter que l'addition des fractions positives à une culture d'*E. coli* n'entraîne pas de diminution de la densité optique traduisant la lyse des bactéries mais seulement un retard de croissance. De même, pour une durée d'incubation supérieure à 8 heures, on constate que la courbe de croissance évolue ensuite de la même façon que la courbe de référence. En ce qui concerne le test d'inhibition de croissance sur milieu de culture gélosé on s'aperçoit que, dans la zone d'inhibition de croissance due à la MPII, les bactéries repoussent sous forme de colonies isolées et, qu'au bout de 24 heures, elles ont recouvert totalement cette zone d'inhibition préalable. Ces observations indiqueraient une activité bactériostatique plutôt qu'une activité bactéricide.

II- Caractérisation de la protéine antibactérienne

La protéine isolée du liquide cœlomique et possédant l'activité antibactérienne présente le même comportement chromatographique et électrophorétique que la métalloprotéine (MPII) de *N. diversicolor* isolée par Nejmeddine *et al.* (1988). Cette protéine, complexant le Cd, possède une masse moléculaire voisine de 13,6 kDa (Demuynck, 1991) qui avait été initialement estimée à environ 10 kDa (Nejmeddine *et al.*, 1988). L'étape suivante de notre étude a consisté à rechercher une éventuelle identité immunologique entre cette métalloprotéine et la protéine antibactérienne que nous avons purifiée. Nous avons utilisé l'anticorps polyclonal et monoclonal dirigés contre la métalloprotéine MPII pour son immunodétection d'une part par la technique d'identification immunologique des protéines après électro-transfert d'un gel d'électrophorèse (Western Blot) et d'autre part par la technique de la neutralisation de l'activité biologique par action d'anticorps spécifiques.

d'électrophorèse (Western Blot) et d'autre part par la technique de la neutralisation de l'activité biologique par action d'anticorps spécifiques.

II-1 Western Blot

Les protéines de la partie 2 du pic hétérogène obtenu après DEAE-cellulose (Planche 2, fig.a) possédant l'activité antibactérienne, ont été soumises à une électrophorèse (SDS-PAGGE en milieu réducteur), puis transférées sur membrane d'Immobilon-p (Millipore). L'immunodétection a été réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MPII. Les résultats du Western Blot ont montré que la protéine purifiée, de masse moléculaire inférieure à 14,4 kDa et colorée au bleu de Coomassie, est immunoréactive avec l'anticorps anti-MPII (fig. 9).

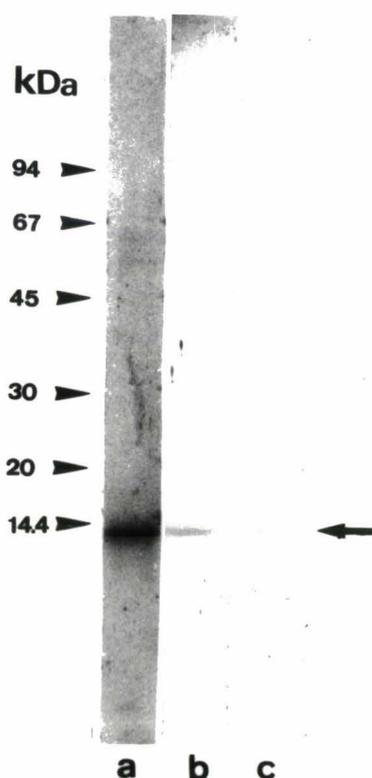


Figure 9.

Analyse électrophorétique en milieu dénaturant (SDS en présence de β -mercaptoéthanol) sur gel de polyacrylamide en gradient continu 5-25 % d'acrylamide.

- a - MPII.
- b - Partie 2 du pic obtenu après DEAE.
- c - Immunodétection, après transfert électrophorétique de la partie 2 du pic obtenu après DEAE-cellulose sur membrane de nitrocellulose, à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MPII.

II-2 Neutralisation de l'activité antibactérienne par action d'anticorps.

Les résultats obtenus en Western Blot ne fournissant qu'une donnée indicative sur la similitude des molécules, nous avons cherché à corrélérer l'activité antibactérienne et la neutralisation de celle-ci par l'action d'anticorps spécifiques.

II-2.1 Neutralisation après immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-MPII

- Immunoprécipitation

Une immunoprécipitation a été réalisée *in vitro* à l'aide de l'anticorps polyclonal dirigé contre la MPII ce qui permet l'élimination de la MPII du liquide coelomique d'animaux immunisés. La suppression totale de la MPII du liquide coelomique et la présence de celle-ci au niveau du complexe formé (protéine A-anti-MPII-MPII) ont été contrôlées par une électrophorèse (SDS PAGE en milieu réducteur) suivie d'un Western Blot avec détection de la MPII en utilisant les anticorps polyclonaux anti-MPII. Ainsi, après l'immunoprécipitation du liquide coelomique immunisé avec l' anticorps polyclonal anti-MPII, une bande inférieure à 14,4 kDa a été décelée après dissociation du complexe formé (Planche 3, fig. c) mais pas dans le cas du liquide coelomique immunisé obtenu après immunoprécipitation en MPII, appelé liquide coelomique immunisé immunosupprimé .

- Détection de l'activité antibactérienne

-Méthode de turbidimétrie

L'activité antibactérienne du liquide coelomique immunisé a été décelée avant et après immunoprécipitation. Les résultats (Planche. 3, fig. a) ont montré que le liquide coelomique immunisé et immunosupprimé, additionné à une culture d'*E. coli*, n'a pas d'incidence sur la croissance des bactéries qui malgré une phase de latence plus longue, évolue de façon comparable à celle d'*E. coli* en présence de PBS. Ce résultat est très différent de celui obtenu avec le liquide coelomique immunisé avant immunoprécipitation qui a montré une inhibition de la croissance de la culture d'*E. coli* (Planche. 3, fig. a).

-Test de croissance sur gélose

La perte de l'activité antibactérienne provoquée par la suppression de la MPII dans le liquide coelomique immunisé a été contrôlée par le test d'inhibition de croissance sur milieu de culture gélosé (Planche 3, fig. b). Un disque antibactériogramme imbibé de liquide coelomique immunisé et immunosupprimé ne présente plus de zone d'inhibition de croissance d'*E. coli*, à l'inverse de celui imbibé de liquide coelomique immunisé. De même, il a été vérifié que l'anticorps polyclonal anti-MPII

PLANCHE 3

Neutralisation de l'activité antibactérienne du liquide cœlomique par action de l'anticorps polyclonal dirigé contre la MP II.

a- Courbes de croissance d'*E. coli* obtenues par la méthode de turbidimétrie en présence de 20 µl de liquide cœlomique immunisé (1) ou de liquide cœlomique immunisé immunosupprimé en MP II (2) ou de 20 µl de PBS (3).

b- Test d'inhibition de croissance d'*E. coli* sur milieu de culture gélosé. Les disques antibactériogrammes ont été imbibés de 20 µl de :

1 : Liquide cœlomique non immunisé

2 : Liquide cœlomique immunisé

3 : Liquide cœlomique immunisé dilué (3/4)

4 : Liquide cœlomique immunisé immunosupprimé en MP II

5 : Anticorps polyclonal anti-MP II

6 : PBS.

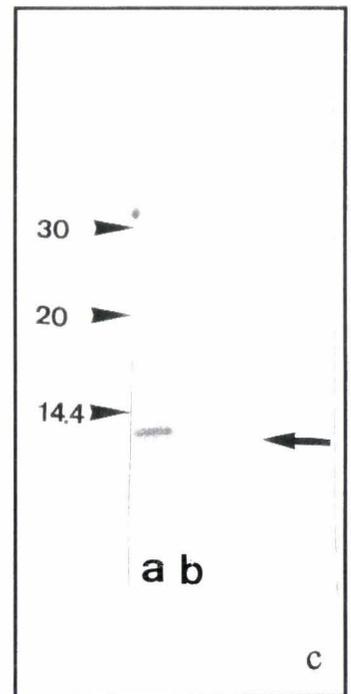
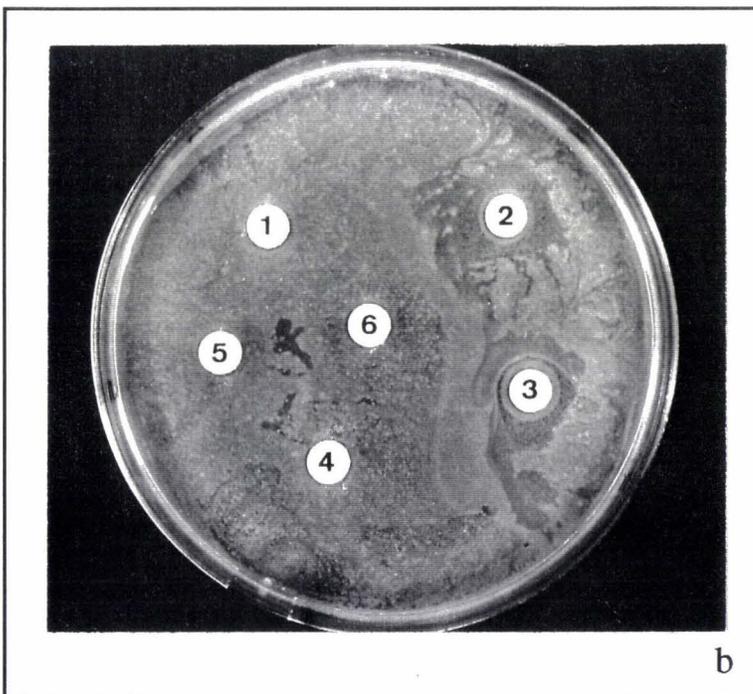
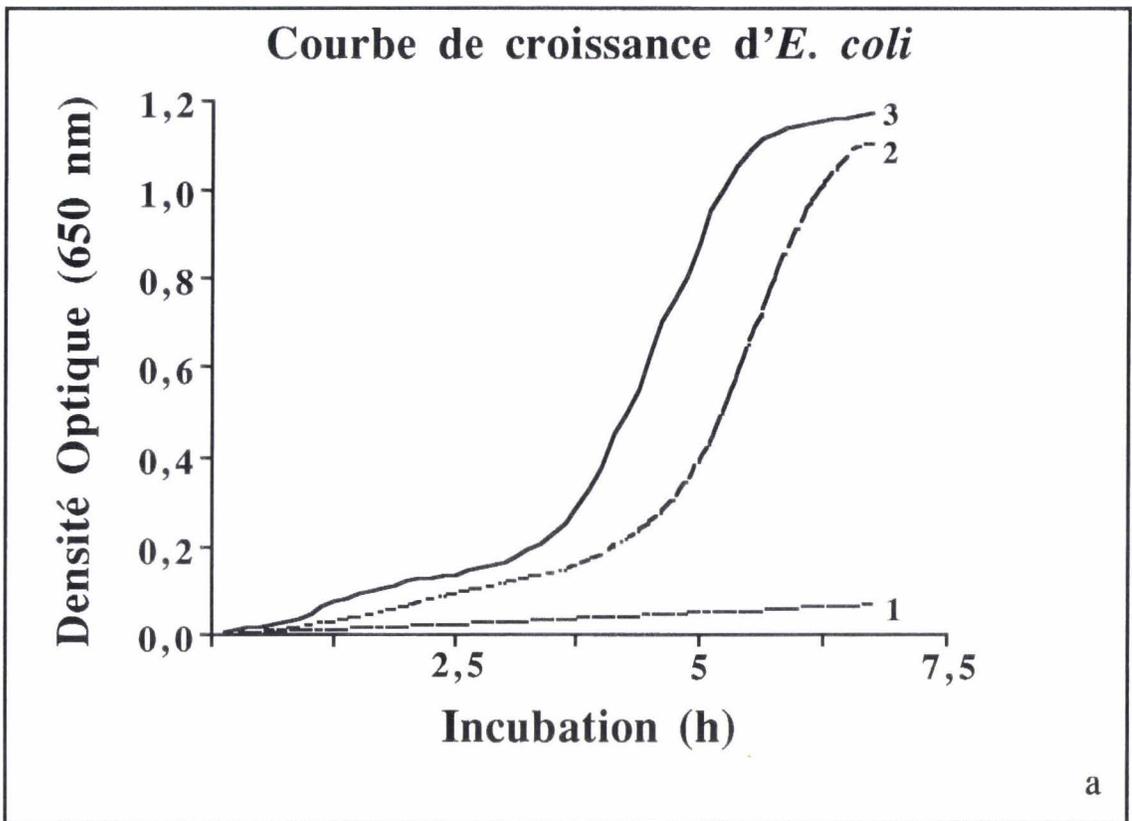
Les boîtes sont incubées 8h à 37°C.

c- Immunodétection après électrophorèse en milieu dénaturant (SDS en présence de β-mercaptoéthanol) sur gel de polyacrylamide en gradient 5-25 % d'acrylamide à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-MP II.

Piste a : Complexe formé après immunoprécipitation de la MP II du liquide cœlomique immunisé

Piste b : Liquide cœlomique immunisé immunosupprimé en MP II.

PLANCHE 3



ne provoque pas de modification de la croissance d'*E. coli* (Planche 3, fig. b).

Nous avons vérifié qu'une immunoprécipitation du liquide cœlomique immunisé avec un autre anticorps que celui dirigé contre la MPII ne provoquait pas la disparition de l'activité antibactérienne initiale. Pour cela, l'anticorps monoclonal dirigé contre une protéine appelée G2 car contenue dans les G II a été utilisé. Dans ce cas, le liquide cœlomique immunisé a gardé son activité antibactérienne (Planche 3, fig. b).

Nous avons pu établir que la suppression de la MPII du liquide cœlomique immunisé provoque la disparition de l'activité antibactérienne initiale.

II-2.2 Neutralisation de l'activité antibactérienne en présence de fer

Des travaux récents sur la MPII (Demuyneck *et al.*, 1991, 1992) ont permis d'établir que celle-ci présentait une identité de séquence sur les 33 premiers acides aminés du côté N-terminal avec la famille des Hémérythrine/Myohémérythrine de sipunculien. Ces molécules sont des pigments respiratoires, protéines non hémiques capables de fixer le fer. Comme la protéine MPII présente des analogies avec cette famille et que ces protéines ont une affinité pour le fer, il était intéressant de voir si cette affinité n'était pas responsable de l'activité antibactérienne en captant dans le milieu le fer indispensable à la croissance des bactéries. Pour cela, 3 types d'expériences, ayant pour but de modifier la teneur en fer du liquide cœlomique ou du milieu de culture, ont été réalisées : saturation en fer du liquide cœlomique immunisé ou du milieu de culture et épuisement en fer du milieu de culture.

- Saturation en fer du liquide cœlomique immunisé

L'incubation du liquide cœlomique immunisé avec du fer, sous forme de sulfate ferreux en excès (2,5 mM en concentration finale, pH 7,4), entraîne une disparition de l'activité antibactérienne qui se traduit par l'absence de zone d'inhibition de croissance (fig. 10). Ce résultat est comparable à celui obtenu dans le cas du liquide cœlomique immunisé et immunosupprimé (Planche 3, fig. b). Des disques antibactériogrammes servant de contrôle sont imbibés d'une solution de sulfate ferreux (2,5 mM,

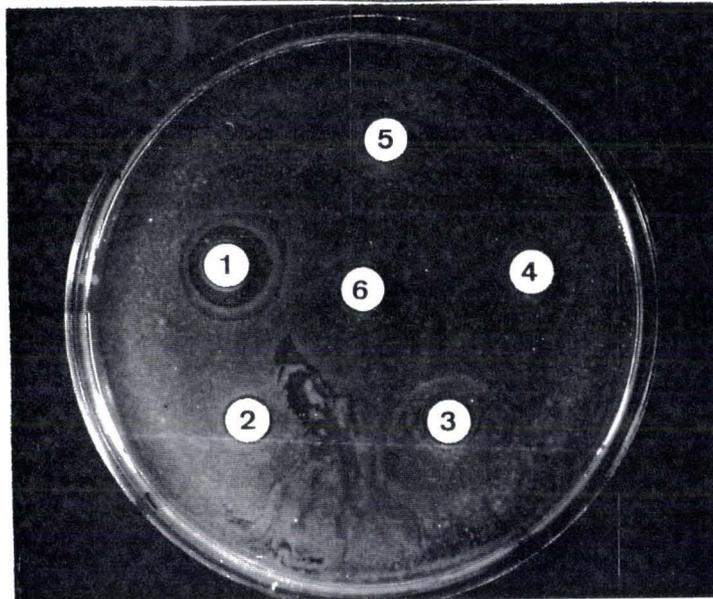


Figure 10 : Test d'inhibition de croissance de *E. coli* sur gélose.

Les disques antibactériogrammes ont été imbibés de 20 μ l de :

- 1 : Liquide cœlomique immunisé
- 2 : Liquide cœlomique immunisé additionné de fer
- 3 : Liquide cœlomique immunosupprimé en MP II
- 4 : Sulfate de fer, pH 7,4
- 5 : Anticorps polyclonal anti-MP II
- 6 : PBS.

pH 7,4) ou de PBS ; on constate que ces solutions ne perturbent pas la croissance d'*E. coli* (fig. 10).

- Saturation en fer du milieu de culture

L'expérience a consisté à ajouter au milieu de culture du fer en excès (en concentration finale 2,5 mM) et à étudier les répercussions sur l'activité antibactérienne initiale du liquide cœlomique après immunisation. Par la méthode de turbidimétrie, les résultats obtenus montrent que le liquide cœlomique n'a plus d'action sur la croissance d'*E. coli* (fig.11). Ce résultat est comparable à celui obtenu après saturation en fer du liquide cœlomique (fig. 10).

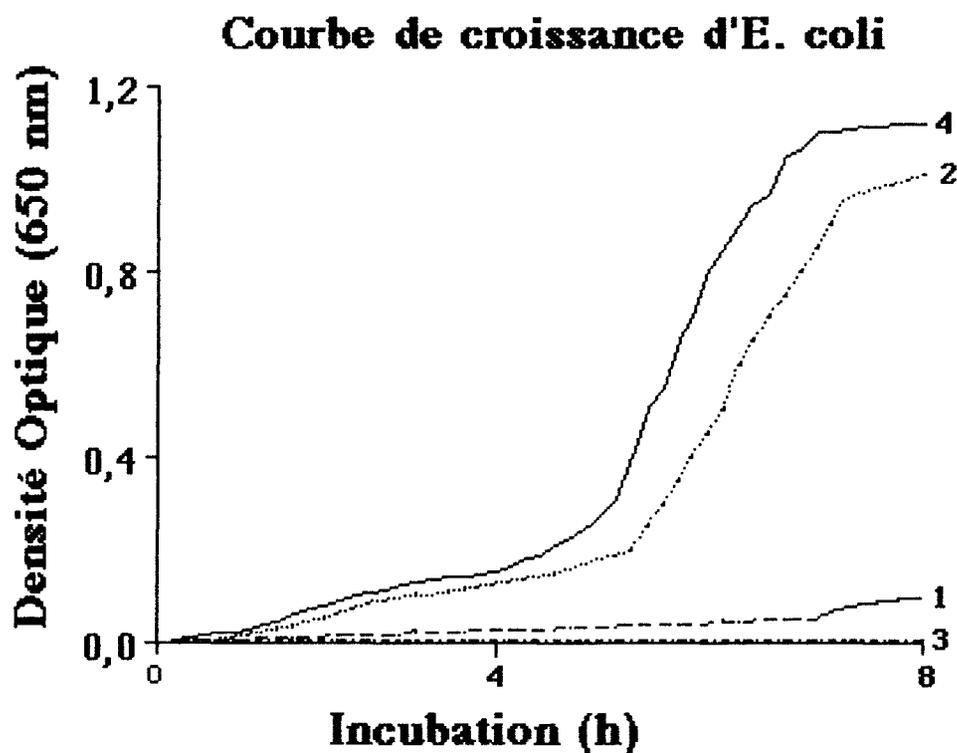


Figure 11.

Courbe de croissance d'*E. coli* en turbidimétrie en présence de 20 μ l de liquide cœlomique immunisé (1), de fer 2,5 mM (2), de phénantroline 1 mM (3) ou de PBS (4).

- Épuisement en fer du milieu de culture

Nous avons pu contrôler qu'un chélateur du fer (la phénantroline) présentait une activité antibactérienne se traduisant par une zone d'inhibition de croissance (fig.11). Cette action résulte de l'épuisement artificiel en fer du milieu de culture ayant ainsi une

répercussion sur l'assimilation du fer nécessaire à la croissance des bactéries. Dans le cas où la phénantroline a été préalablement saturée en fer, les résultats ont montré la perte de son activité initiale.

III- Conclusion

Nous avons pu établir que la protection antibactérienne, induite dans le liquide coelomique après immunisation, est portée par une protéine de masse moléculaire inférieure à 14,4 kDa (*ca* 13,6 kDa) présentant des analogies chromatographiques et électrophorétiques avec la métalloprotéine MPII. Ces analogies sont également de nature immunologique comme l'ont démontré l'utilisation du Western Blot et la neutralisation de l'activité antibactérienne à l'aide des anticorps spécifiques anti-MPII (polyclonal et monoclonal). Nous pouvons donc conclure que la protéine antibactérienne et la MPII semblent n'être qu'une seule et même molécule. Nous pouvons affirmer également que l'activité de la MPII est bactériostatique et utilise la complexation du fer comme mécanisme d'action. L'intervention du fer dans le mécanisme d'action est compatible avec l'homologie de séquence (61 % et 41 % d'identité), existant sur les 33 premiers acides aminés du côté N-terminal de la MPII, avec respectivement la Myohémérythrine et l'Hémérythrine du sipunculien *Themiste pyroides* (Klippenstein et al., 1976), homologie démontrée par Demuyneck *et al.* (1991).

Chapitre II

Obtention et caractérisation de l'ADN
complémentaire de la MPII.

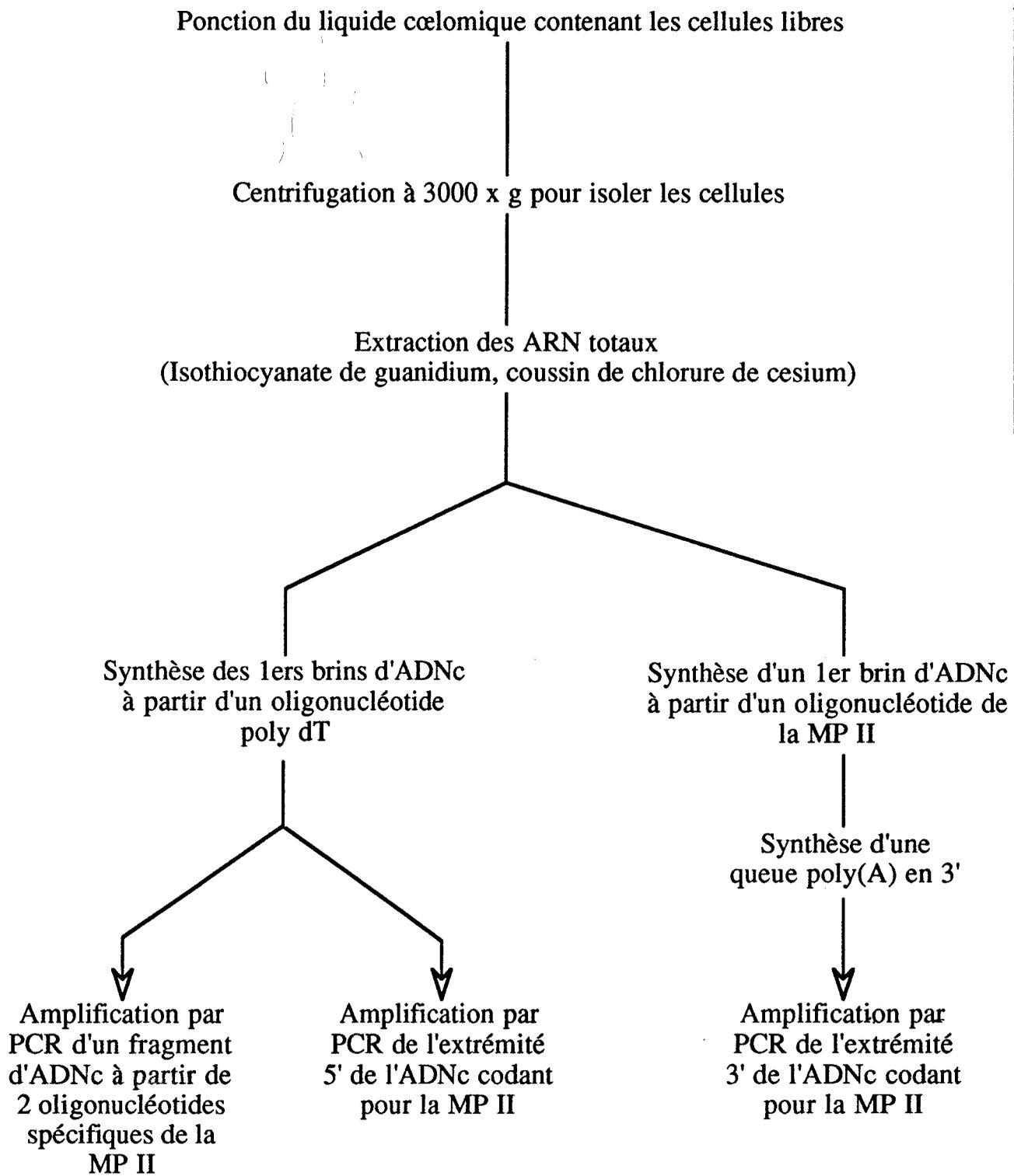


Schéma 3 : Principales étapes suivies pour l'obtention de l'ADN complémentaire codant pour la MP II en utilisant la méthode PCR.

Après avoir identifié la protéine à activité bactériostatique induite dans le liquide cœlomique lors d'injections d'une suspension d'*E. coli* faiblement concentrée ou de Cd comme étant la MPII, métalloprotéine capable de complexer le Cd, nous avons cherché à obtenir et à caractériser l'ADN complémentaire codant pour la MPII. Le génie génétique offre plusieurs méthodes d'obtention de l'ADNc. Notre choix s'est porté sur la méthode dite de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Elle consiste en une amplification enzymatique à l'aide de la DNA polymérase de *Thermophilus aquaticus* (Taq polymérase, Perkin-Elmer Cetus). Cette méthode présente l'avantage d'amplifier spécifiquement *in vitro* un grand nombre de copies d'une séquence définie d'ADN à partir d'oligonucléotides servant d'amorces. Dans le cas qui nous concerne, la méthode dite de la PCR était donc particulièrement adaptée puisque nous disposions d'éléments de séquence de la MPII *i.e.* la séquence N-terminale de 33 AA et un fragment interne non positionné de 33 AA. A partir de ces 2 fragments de la MPII, des oligonucléotides spécifiques ont été réalisés et ils ont été utilisés comme amorces. De manière à réaliser le séquençage des fragments amplifiés, le clonage de ceux-ci a été réalisé.

Les principales étapes utilisées pour l'obtention de l'ADNc codant la MPII sont résumées dans le schéma 3.

I- Isolement et traduction des ARN cœlomiques

Les ARN totaux des cellules libres du cœlome ont été isolés à l'aide de la technique classique utilisant l'isothiocyanate de guanidine et une séparation sur coussin de chlorure de césium. La qualité des ARN a été vérifiée en réalisant leur traduction *in vitro* en système acellulaire en lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine-³⁵S. L'identification des molécules de MPII traduites a été obtenue par détection de la méthionine-³⁵S incorporée dans les protéines nouvellement élaborées et immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MPII. L'analyse électrophorétique (SDS-PAGE en milieu réducteur) des produits traduits et immunoprécipités (fig. 12) a montré en fluorographie la présence d'un seul polypeptide immunoprécipité marqué (fig. 12, piste b) de masse moléculaire proche de 14 kDa. La spécificité de la traduction a été vérifiée en réalisant la même opération mais en remplaçant les ARN par de l'eau. Dans ce cas, l'analyse de la fluorographie n'a montré aucun produit immunoprécipitable. La traduction *in vitro* des ARN totaux a donc permis d'obtenir l'identification du précurseur de la MPII (polypeptide de 14 kDa)

et d'établir que les ARN isolés par la technique d'isothiocyanate de guanidium/CsCl contenaient le ou les ARN messager(s) codant la MPII.

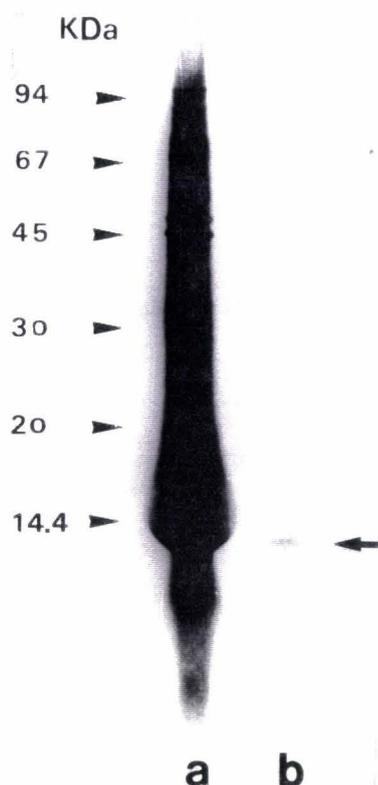


Figure 12.

Traduction des ARNm, isolés à partir de cellules libres du cœlome, en lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine-³⁵S. Fluorographie

a - Protéines traduites à partir des ARNm poly A+.
b - Immunoprécipitation des produits traduits à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MPII.

Temps d'exposition : 15 jours.

Les positions des standards de masse moléculaire sont figurées sur la gauche, celle du polypeptide immunoprécipité est indiquée par la flèche de droite.

II- Obtention de l'ADNc codant la MPII par amplification génique (PCR)

A partir des séquences d'acides aminés (AA) de la MPII connues : *i.e.* le fragment N-terminal de 33 AA (Demuynck *et al.*, 1991) et le fragment interne de 33 AA (Demuynck, 1992), la synthèse de 2 oligonucléotides spécifiques a été réalisée en tenant compte de la dégénérescence du code génétique. Pour cette étude nous avons choisi de définir comme référence pour l'orientation de l'ADNc le brin non codant car les brins d'ADNc non codants ont servi de matrice pour les PCR.

Les séquences des oligonucléotides synthétisés sont les suivantes:

Oligonucléotide n°1 : sens

5'-CCC-GGG-TCT-AGA-GA(G,A)-CC(G,T,A,C)-TA(T,C)-AA(A,G)-TGG-GA(T,C)-GA-3'
Ava I / Xba I

Oligonucléotide n°2 : antisens

5'-CCT-GCA-GAG-CTC-(A,G)AA-(G,A)TC-(C,T)TC-(G,A)TG-(C,T)TT-(C,T)TT-(G,A)TG-3'
Pst I / Sac I

Il est à noter que 2 sites de restriction (Ava I/Xba I et Pst I/Sac I) ont été ajoutés à l'extrémité 5' de chaque oligonucléotide ce qui a permis, dans la suite de l'étude, le clonage des fragments amplifiés.

La localisation de ces oligonucléotides, par rapport à la séquence en AA de la MPII, est présentée ci-dessous:

Fragment N-terminal de la MPII

5 10 15 20 25 30
 G F E I P E P Y K W D E S F Q V F Y E K L D E E H K G I F N A I F
 Ava I-Xba I----->

Fragment interne de la MPII

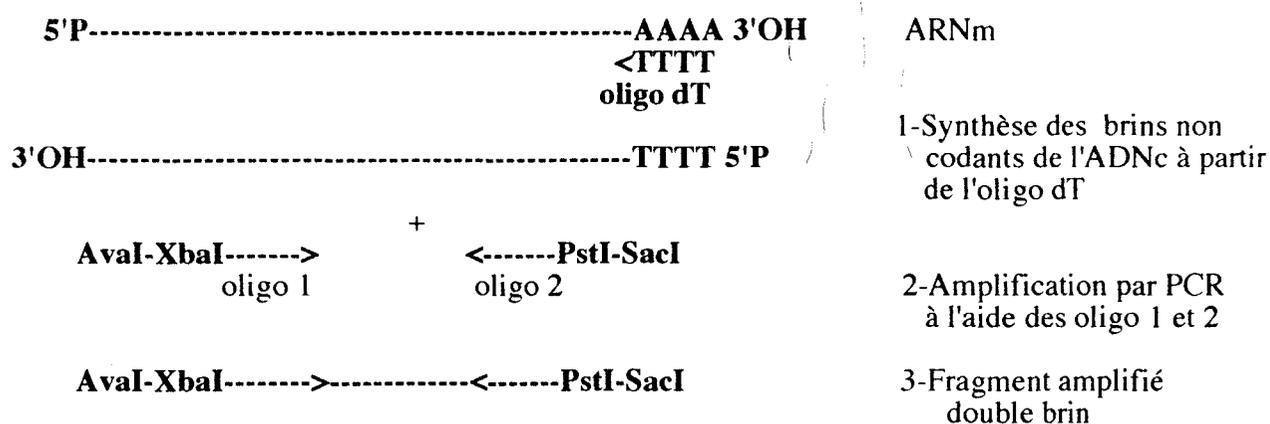
L K A S A S Y G D F D S H K K K H E D F L A V I R G L G A P V P Q
 <-----Sac I-Pst I

Les 2 oligonucléotides spécifiques de la MPII, ainsi qu'un oligonucléotide poly d(T)₁₅ contenant aussi un site de restriction BamHI (synthétisé par Eurogentec), ont été utilisés dans les différentes amplifications.

II-1 Amplification enzymatique d'un fragment d'ADNc de la MPII à partir d'oligonucléotides spécifiques

II-1.1 Principe

A partir des ARN totaux testés, les brins d'ADNc non codants ont été synthétisés en utilisant l'oligonucléotide poly-d(T). L'amplification enzymatique par PCR a été réalisée à partir de ces brins servant de matrices et à l'aide des 2 oligonucléotides spécifiques de la MPII comme amorces.



II-1.2 Amplification

La température d'hybridation calculée selon la méthode décrite dans la partie Méthodes (page.58), est de 47°C. Les conditions d'amplification sont 30 cycles de :

1 mn à 94°C

1,5 mn à 47°C

1,5 mn à 72°C

et une étape d'élongation pendant 5 mn à 72°C

L'analyse des produits de PCR en gel d'agarose 1,1 % et en tampon TEA, a permis de montrer l' amplification spécifique d'un fragment d'ADN dont la taille est proche de 250 pb (fig. 13).

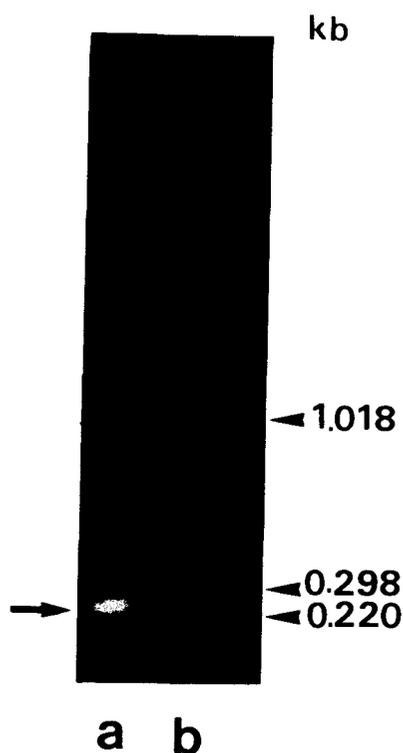


Figure 13.

Electrophorèse en gel d'agarose 1% du produit d'amplification des ARNm totaux des cellules du cœlome en utilisant comme amorce à la PCR des oligonucléotides spécifiques de la MPII.

a - 10 µl de la réaction de PCR.

b - Echelle d'ADN 1 kb (GIBCO-BRL).

La flèche sur la gauche indique la position du fragment amplifié.

II-1.4 Spécificité du fragment amplifié

La spécificité du fragment d'ADNc obtenu a été vérifiée, d'une part en utilisant la technique d'arrêt de traduction par hybridation spécifique (Berger et Kimmel, 1987) et, d'autre part en réalisant le séquençage de ce fragment.

-Arrêt de traduction

Le principe est basé sur le fait que, dans une population d'ARNm, lorsqu'un ARNm spécifique est hybridé avec sa séquence d'ADNc, on obtient l'arrêt de la traduction du polypeptide correspondant. Cette méthode comprend, après hybridation, une traduction *in vitro* et une immunoprécipitation suivie de l'analyse électrophorétique et de la fluorographie correspondante du (ou des) produit(s) traduit(s) immunoprécipitable(s).

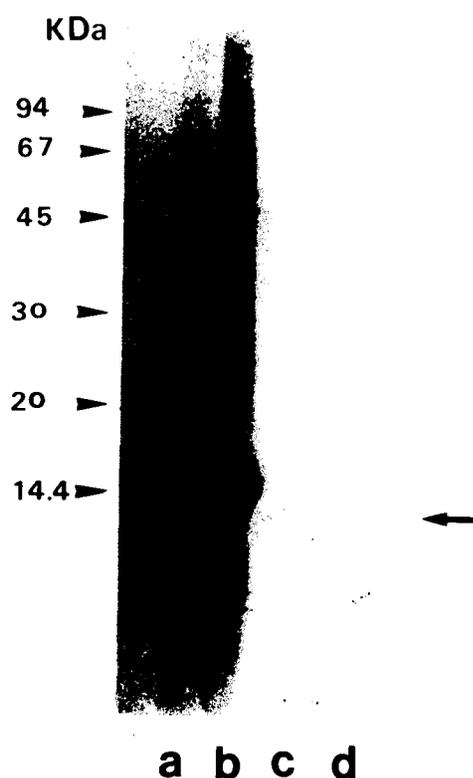


Figure 15.

Arrêt de traduction des ARN isolés des cellules libres du cœlome, en lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine-³⁵S.

- a - Produits obtenus après arrêt de traduction des ARN totaux.
- b - Produits obtenus après arrêt de traduction dans le cas où la dénaturation de l'hybride (ARNm-fragment de 250 pb) est réalisée.
- c - Immunoprécipitation des produits obtenus en piste a à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MPII.
- d - Immunoprécipitation des produits obtenus en piste b à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MPII.

La flèche de droite indique le polypeptide traduit et immunoprécipité.

En utilisant cette méthode et l'anticorps polyclonal anti-MPII, les résultats obtenus en fluorographie ont montré qu'à 42°C en présence de 50 % de formamide, lorsque l'on hybride le fragment amplifié (250 pb) aux ARNm correspondants, contenus dans les ARN totaux, on

n'obtient aucun polypeptide traduit et immunoprécipité (fig. 15, piste c). Par contre initialement, un polypeptide de 14 kDa (fig. 12) identifié à partir des ARN totaux comme étant le précurseur de la MPII est immunoprécipité. Si par dénaturation (100°C, 5 min), on déshybride le complexe formé (fragment 250 pb-ARNm spécifique) avant la traduction *in vitro*, on retrouve le polypeptide de 14 kDa (fig. 15, piste d) comme dans la traduction classique.

On peut donc affirmer que le fragment de 250 pb est capable de bloquer la traduction de la MPII.

- Séquençage

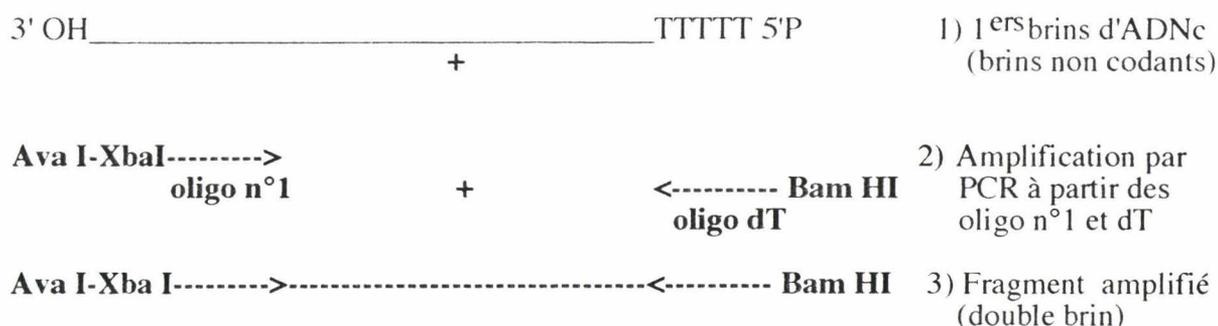
Le séquençage du fragment d'ADNc de 250 pb a été réalisé en utilisant la "T7 DNA polymerase" et le nucléotide dATP marqué par le ³⁵S. La séquence nucléotidique ainsi que la séquence déduite en acides aminés sont reportées dans la figure 16.

L'analyse de la séquence des acides aminés, déduite de la séquence nucléotidique, montre que le fragment d'ADNc amplifié correspond à la séquence spécifique du 15^{ème} au 73^{ème} résidus de la MPII (en ne tenant pas compte des oligonucléotides utilisés). Ce fragment d'ADNc (228 pb : valeur ne tenant pas compte des sites de restriction) a été utilisé comme sonde spécifique dans la suite du travail et appelé sonde MPII.

II-2 Amplification enzymatique permettant d'obtenir l'extrémité 5' de l'ADNc (brin non codant) de la MPII

II-2.1 Principe

Une amplification enzymatique par PCR a été réalisée en utilisant comme matrice les brins codant d'ADNc et comme amorces l'oligo-nucléotide n°1 et l'oligonucléotide poly d(T). Le principe d'obtention est schématisé ci-après :



II-2.2 Amplification

La température d'hybridation, calculée selon le principe décrit dans la partie Méthodes (p.58), est également de 47°C. Les conditions d'amplification sont 30 cycles de

1 mn à 94°C

1.5 mn à 47°C

1.5 mn à 72°C

et une étape d'élongation pendant 5 mn à 72°C.

L'analyse des produits de PCR en gel d'agarose a révélé l'amplification de plusieurs fragments (fig. 17) dont un, plus intense d'une taille voisine de 900 pb (taille estimée tenant compte des sites de restriction), qui correspond au fragment d'ADNc du transcrit allant du codon du 6^{ème} AA à la queue poly A.

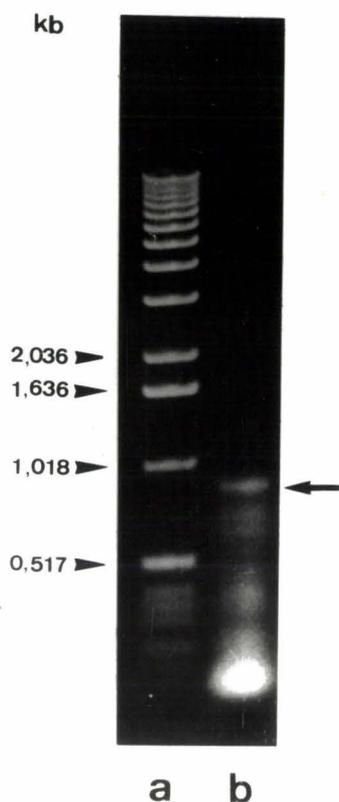


Figure 17.

Electrophorèse en gel d'agarose 1% du produit d'amplification des ARNm totaux des cellules du cœlome en utilisant comme amorce à la PCR des olinucléotides n°1 et dT.

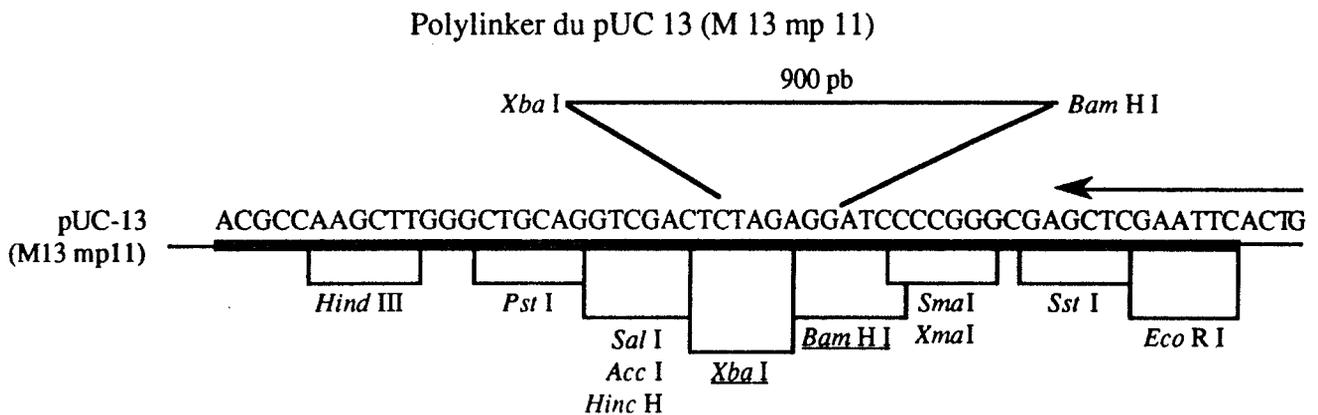
a - Echelle d'ADN 1 kb (GIBCO-BRL).

b - 10 µl de la réaction de PCR.

La flèche de droite indique la position du fragment amplifié majeur.

II.2.3 Clonage

Le clonage a été réalisé en utilisant les deux sites de restriction (Xba I et Bam HI) introduits dans les amorces (1 et Poly dT) et donc incorporés au fragment d'ADNc de 900 pb. Ces deux sites sont utilisés comme sites d'insertion dans le polylinker du plasmide pUC 13 (voir partie Méthodes p.59).



La transformation du vecteur recombiné a été réalisée comme précédemment dans la souche bactérienne *E. coli* RR1 Δ M15 en utilisant la méthode au CaCl_2 (voir partie Méthodes p.)

Le clonage a été vérifié en réalisant des mini-préparations d'ADN plasmidique des bactéries recombinées.

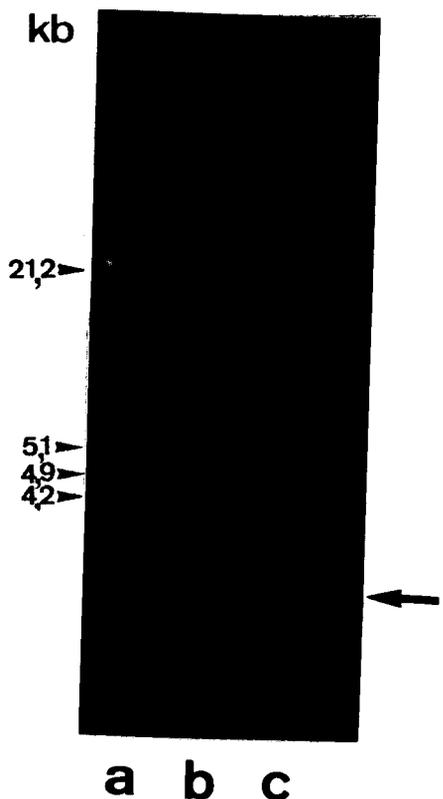


Figure 18.

Vérification du clonage du fragment de 900 pb amplifié dans le pUC 13 (sur gel d'agarose 1,1 % contenant du bromure d'éthidium), après digestion enzymatique (Pst I, Bam HI).

- a - Echelle d'ADN du phage λ digéré par Hind III et Eco RI.
- b - Plasmide non recombiné.
- c - Plasmide recombiné.

La flèche de droite indique la position du fragment cloné.

Après double digestion enzymatique par les enzymes de restriction Xba I et Bam HI pour sortir l'insert, les résultats ont montré que l'on retrouve le fragment de 900 pb dans certains clones (fig. 18), les autres clones correspondant à des "faux positifs".

II-2.4 Vérification de la spécificité du fragment amplifié.

- Réamplification spécifique

Après purification du fragment de 900 pb (voir partie Méthodes p.58), celui-ci a servi de matrice pour une seconde PCR, en utilisant cette fois les 2 oligonucléotides spécifiques de la MPII (oligonucléotides n°1 et n°2).

Les résultats ont montré, après amplification, un fragment (fig. 19) migrant comme la sonde MPII.

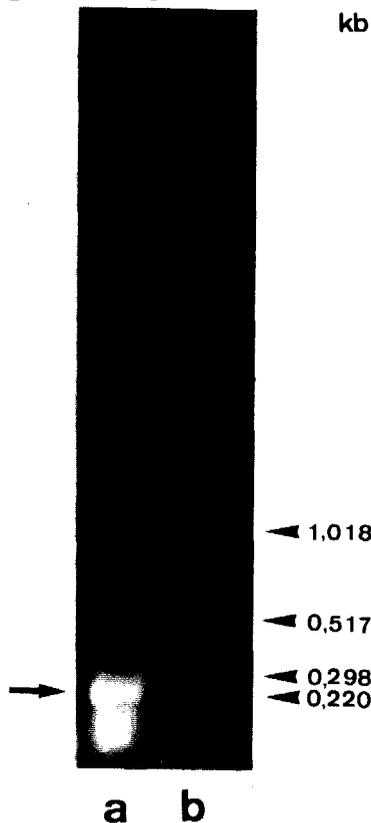


Figure 19.

Réamplification spécifique à partir du fragment de 900 pb amplifié en utilisant les deux oligonucléotides spécifiques de la MPII. (Séparation sur gel d'agarose 1,1 % contenant du bromure d'éthidium).

a - 10 μ l de la réaction de PCR.

b - Echelle d'ADN 1 kb (GIBCO-BRL).

La flèche de gauche indique la position du fragment amplifié.

1 GAG-CCG-TAT-AAG-TGG-GAT-GAG-TCC-TTC-CAG-GTC-TTC-TAC-GAG-AAG-CTT-GAT-GAA- 54
2 GAG-CCG-TAT-AAG-TGG-GAT-GAG-TCC-TTC-CAG-GTC-TTC-TAC-GAG-AAG-CTT-GAT-GAA- 54

1 GAA-CAC-AAG-CAA-ATC-TTC-AAT-GCC-ATC-TTC-GCC-CTT-TGC-GGA-GGA-AAC-AAC-GCT-108
2 GAA-CAC-AAG-CAA-ATC-TTC-AAT-GCC-ATC-TTC-GCC-CTT-TGC-GGA-GGA-AAC-AAC-GCT-108

1 GAC-AAC-CTG-AAG-TCT-CTC-GTT-GAC-GTC-ACT-GCC-AAC-CAC-TTC-GCC-GAT-GAG-GAG-162
2 GAC-AAC-CTG-AAG-TCT-CTC-GTT-GAC-GTC-ACT-GCC-AAC-CAC-TTC-GCC-GAT-GAG-GAG-162

1 GCC-ATG-ATG-AAG-GCG-TCT-GGT-TCC-TAG-GGA-GAC-TTC-GAT-TCC-CAC-AAG-AAG-AAG-216
2 GCC-ATG-ATG-AAG-GCG-TCT-GGT-TCC-TAG-GGA-GAC-TTC-GAT-TCC-CAC-AAG-AAG-AAG-216

1 CAC-GAG-GAC-TTC 228
2-CAC-GAG-GAC-TTC-TTG-GCT-GCT-ATC-CGT-GCC-GGA-GCC- 255

Figure 21 : Séquence nucléotidique du fragment amplifié à partir des deux oligonucléotides spécifiques de la MPH (ligne 1) et séquence des 250 premiers nucléotides du fragment de 900 pb (ligne 2).

- Hybridation avec la sonde MPII

Après clonage dans le pUC 13, l'étude en Southern Blot a montré que le plasmide recombiné contenant la bande 900 pb est reconnu par hybridation avec la sonde MPII (fig. 20, piste a), tout comme le fragment de 900 pb obtenu après digestion et purification (fig. 20, piste b).

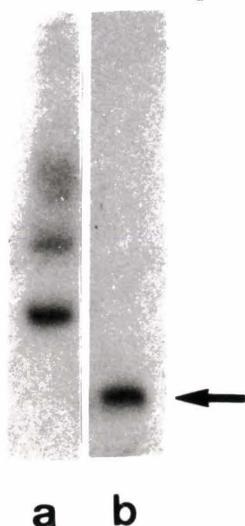


Figure 20.

Hybridation du fragment de 900 pb amplifié transféré sur membrane d'Immobilon M+ en utilisant la sonde MPII marquée au ^{32}P .

- a - Plasmide recombiné contenant le fragment de 900 pb amplifié.
- b - Fragment de 900 pb purifié.

La flèche indique la position du fragment cloné reconnu par la sonde.

- Séquençage partiel

Le séquençage partiel des 255 premiers nucléotides de ce fragment de 900 pb a montré une homologie parfaite avec la séquence de la sonde MPII (228 pb codant du 13^{ème} au 78^{ème} sans tenir compte des amorces) (fig. 21).

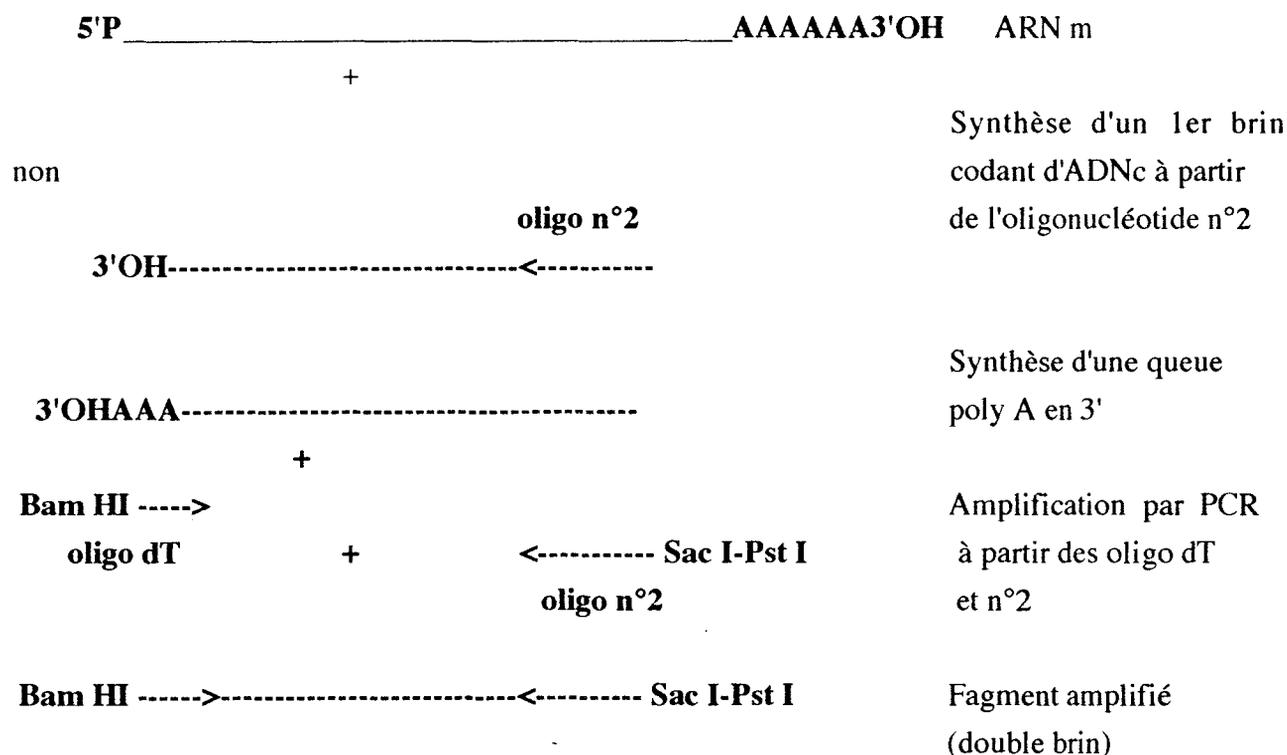
Ces résultats permettent donc de conclure que le fragment de 900 pb d'ADNc correspond bien à l'extrémité 5' du transcrit de la MPII.

II-3 Amplification enzymatique permettant d'obtenir l'extrémité 3' de l'ADNc de la MPII (brin non codant)

II-3.1 Principe

A partir des ARNm extraits de l'ensemble des cellules du coelome, il a été réalisé les brins non codants d'ADNc obtenus à partir de l'oligonucléotide n°2 utilisé comme amorce. A ce brin, une queue poly(A) a été additionnée en position 3'. Une amplification enzymatique a été ensuite réalisée en utilisant comme matrice ces brins d'ADNc et comme amorces l'oligonucléotide n°2 et l'oligonucléotide poly d(T).

Le principe d'obtention de l'extrémité 3' de l'ADNc de la MPII est schématisé ci-dessous :



II-3.2 Amplification

La température d'hybridation, calculée en tenant compte uniquement de l'oligonucléotide n°2, est donc de 47°C. Les conditions d'amplification sont 30 cycles de

1 mn à 94°C

1,5 mn à 47°C

1,5 mn à 72°C

et une étape d'élongation pendant 5 mn à 72°C

L'analyse électrophorétique des produits amplifiés a montré l'obtention, non pas d'un fragment unique, mais d'un ensemble de fragments dont les tailles sont estimées proches de 350 pb (fig. 22, piste c). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'on ne maîtrise pas le nombre d'adénines additionnées par la terminale transférase (TdT), pour réaliser la queue artificielle poly (A) en 3'.

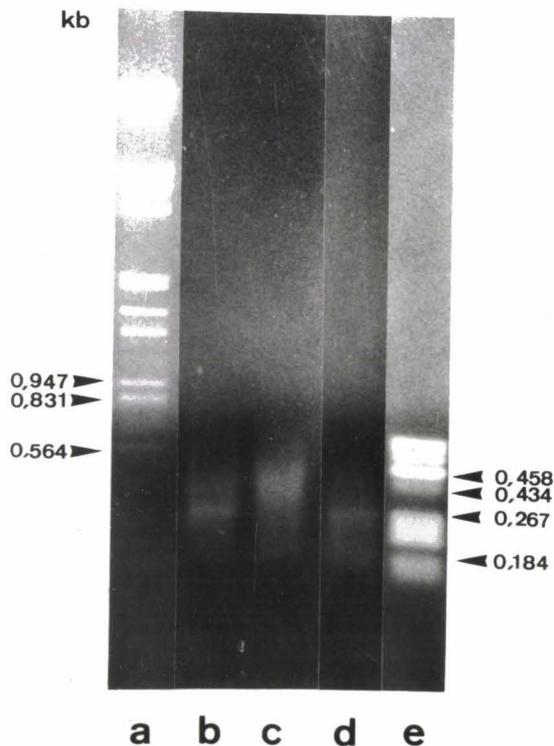


Figure 22.

Amplification de l'extrémité 3' du brin non codant de l'ADNc de la MPII. (Séparation sur gel d'agarose 1,1 % contenant du bromure d'éthidium).

- a - Echelle d'ADN du phage λ digéré par Hind III et Eco RI.
- b - Sonde MPII (témoin) amplifiée par PCR.
- c - 10 μ l de la réaction d'amplification.
- d - Réamplification spécifique à partir du résultat au niveau de la piste c en utilisant les 2 oligonucléotides spécifiques de la MPII
- e - Echelle d'ADN du pBR328 digéré par HaeIII

II-3.3 Spécificité de la zone amplifiée par PCR

- Réamplification spécifique

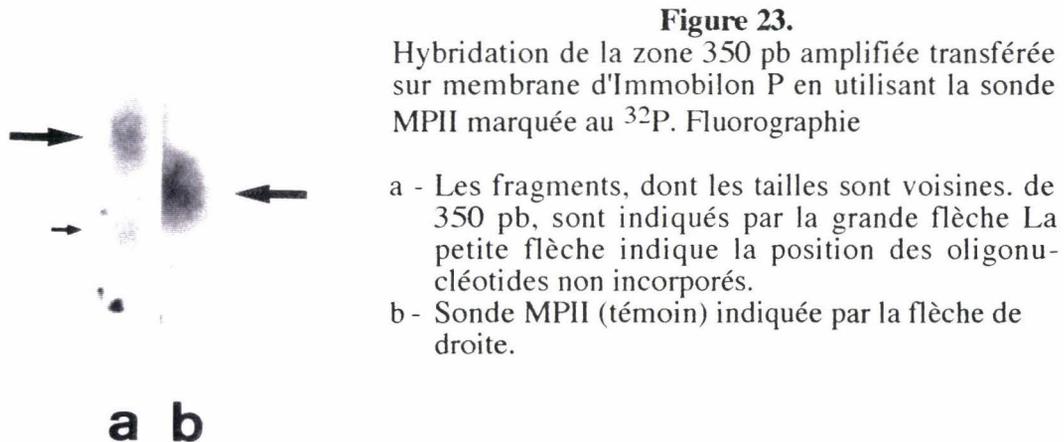
La technique a été la même que celle utilisée précédemment pour le fragment de 900 pb. Elle consiste en la purification des fragments obtenus et en la réalisation d'une amplification au moyen des oligonucléotides n°1 et n°2 utilisés comme amorces pour la PCR.

L'analyse du résultat de PCR montre l'amplification d'un fragment migrant (fig. 22, piste d) au même niveau que la sonde MPII de 250 pb (fig. 22, piste b). L'ensemble des fragments, dont les tailles sont proche de 350 pb, est capable d'amplifier un fragment de 250 pb à partir des oligonucléotides spécifiques utilisés pour l'amplification de la sonde MPII.

- Hybridation avec la sonde de 250 pb

L'étude en Southern Blot a montré que cet ensemble de fragments (dont la longueur est proche de 350 pb) a été reconnu par la

sonde M_{PII}, ce qui confirme le résultat de l'expérience de réamplification (fig. 23).

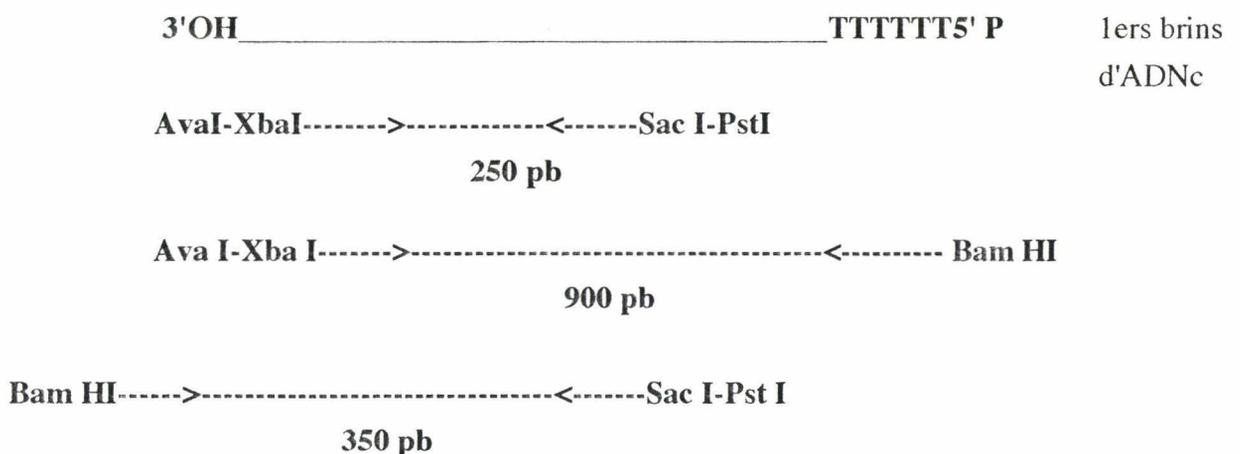


Nous pouvons donc supposer que cette zone d'ADNc amplifiée correspond à l'extrémité 3' du transcrit de la M_{PII}. Cependant seul le séquençage d'un ou de plusieurs de ces fragments pourra confirmer cette hypothèse.

III Corrélation entre l'ADNc amplifié et le ou les ARNm codant la M_{PII}

III-1 Reconstruction de l'ADNc du transcrit de la M_{PII}

Les résultats des 3 amplifications enzymatiques à partir des 3 oligonucléotides [1, 2, et l'oligo d(T)] ont permis d'obtenir des fragments d'ADN spécifique de l'ARNm codant la M_{PII} sous forme de 3 fragments schématisés ci-dessous :



Les valeurs estimées d'après la migration sur gel d'agarose des différents fragments permettent de déduire que la longueur de l'ARNm spécifique de la M_PII est proche de 1000 pb.

III-2 Détection du ou des ARNm codant la M_PII

Nous avons également recherché en Northern Blot la taille de l'ARNm codant la M_PII. L'analyse du Northern Blot, après hybridation entre la sonde M_PII marquée au P³² et les ARN totaux isolés des cellules libres du cœlome, a permis d'identifier une seule bande correspondant à l'ARNm spécifique de la M_PII. La taille de cet ARNm, qui migre légèrement plus loin que l'ARN 18S, peut être évaluée à environ 1 Kb (fig. 24). Cette longueur est compatible avec celle de l'ADNc reconstruit à partir des 3 fragments obtenus par PCR.

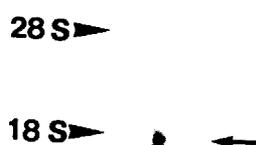


Figure 24.

Analyse en Northern Blot des ARN totaux extraits à partir des cellules libres du cœlome. 1 μ g d'ARN a été déposé sur le gel et hybridé avec la sonde M_PII marquée au ³²P.

Les pointes de flèches situent les ARN 18S et 28S. La petite flèche indique la position de l'ARN détecté.

IV- Conclusion

L'étude relatée dans ce chapitre a été rendue possible grâce au laboratoire de "Génie Génétique et de Biologie Moléculaire" dirigé par le Pr J. Martial de l'université de Liège (Belgique), où nous avons effectué une partie des manipulations.

Dans cette étude nous avons effectué la synthèse de l'ADNc codant la M_PII en utilisant la méthode d'amplification enzymatique dite de PCR à

partir de trois oligonucléotides (l'un du 6^{ème} au 14^{ème} AA du côté N-terminal, l'autre interne et le dernier contenant l'oligo dT) utilisés comme amorces et des premiers brins d'ADNc (brins non codants) obtenus à partir des ARNm de l'ensemble des cellules libres du coelome de *N. diversicolor*.

La taille de cet ADNc codant la MPII a été déduite à partir des trois fragments amplifiés et estimée à une valeur proche de 1 kb.

L'étude en Northern Blot des ARNm isolés des cellules libres du coelome a montré l'existence d'un seul type d'ARNm spécifique pour la MPII dont la taille est compatible avec celle obtenue par reconstruction de l'ADNc. De même, les résultats de traduction *in vitro* ont permis de mettre en évidence la présence d'un précurseur de 14 kDa pour la MPII. La différence de taille pourrait être due à la présence d'un peptide signal puisque la MPII est une protéine libérée dans le milieu extracellulaire. En ce qui concerne la structure de l'ARNm de la MPII, une partie non codante très importante peut être suspectée, puisque la longueur de la partie codante de l'ARNm d'une protéine de 119 AA est estimée à 357 pb.

L'analyse de la séquence en acides aminés établie à partir de l'ADNc obtenu a permis de confirmer l'homologie de séquence observée (Demuynck *et al.*, 1991) entre la MPII et la famille des Hémérythrines/Myohémérythrines des sipunculiens (fig. 25). De plus, l'analyse de la séquence nucléotidique permet de retrouver les acides aminés (25-H, 54-H, 58-E, 74-H 78-H) impliqués dans la fixation du fer, chez les sipunculiens. Ce résultat est à mettre en relation avec la capacité de la MPII à fixer le fer, (voir chapitre I), propriété qui lui conférerait son activité antibactérienne.

Chapitre III

Expression de la protéine M_{PII}.

La protéine antibactérienne induite dans le milieu intérieur de *N. diversicolor* après injection d'une suspension bactérienne a été identifiée comme étant la métalloprotéine MPII (chapitre I). Dans le chapitre présent (III), après avoir caractérisé la réponse antibactérienne, nous nous sommes intéressés aux modalités de l'expression de cette protéine. Dans un premier temps, la localisation des cellules spécifiques de la transcription et de la traduction de cette MPII a été envisagée. Pour cette étude, nous disposons en effet d'une sonde d'ADNc complémentaire du transcrite codant la MPII obtenue précédemment (chapitre II). Dans un second temps, la modification éventuelle de l'expression de cette protéine, notamment à la suite d'un stress bactérien, a été abordée.

I- Réponse au stress bactérien impliquant la MPII

L'injection d'*E. coli* dans le cœlome de *N. diversicolor* provoque l'apparition d'une protection antibactérienne due à la présence de la MP II dans le liquide cœlomique. Nous relaterons ici les études relatives à la caractérisation de la réponse antibactérienne impliquant la MPII : libération, cinétique de libération et synthèse de la MPII.

I-1 Libération de la MP II en réponse au stress

L'activité antibactérienne du liquide cœlomique de vers ayant été injectés avec des suspensions d'*E. coli* de diverses concentrations a été estimée sur test d'inhibition de croissance de *M. kristinae* sur milieu de culture gélosé 24 heures après l'immunisation. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 26.

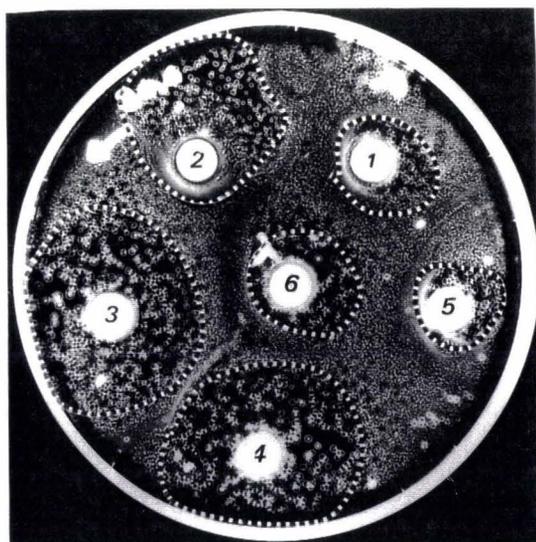


Figure 26.

Test d'inhibition de croissance, sur milieu de culture gélosé, de *M. Kristinae*. Les disques antibactériogrammes neutres sont imbibés avec 20 μ l de liquide cœlomique d'animaux immunisés avec un nombre variable d'*E. coli* :

1 : 2×10^6 bactéries/ml

2 : 4×10^6 bactéries/ml

3 : 8×10^6 bactéries/ml

4 : $1,6 \times 10^7$ bactéries/ml

5 : 0 (H_2O)

6 : 2×10^7 bactéries/ml (DL 50).

On observe que la zone d'inhibition de croissance de *M. kristinae* augmente de façon proportionnelle à la concentration des bactéries injectées dans le cœlome, ceci jusqu'à une concentration de $1,6 \times 10^7$ bactéries. Cette dernière correspond à la dose létale 50 (DL 50) qui provoque la mort de la moitié des animaux immunisés.

Parallèlement, le dosage du taux de MP II dans le liquide cœlomique a été effectué par le test ELISA en utilisant l'anticorps monoclonal anti-MP II. Les résultats montrent qu'une augmentation de la concentration en bactéries entraîne celle de la MP II présente dans le liquide cœlomique (fig. 27). Ce fait est compatible avec l'augmentation de l'activité antibactérienne précédemment observée.

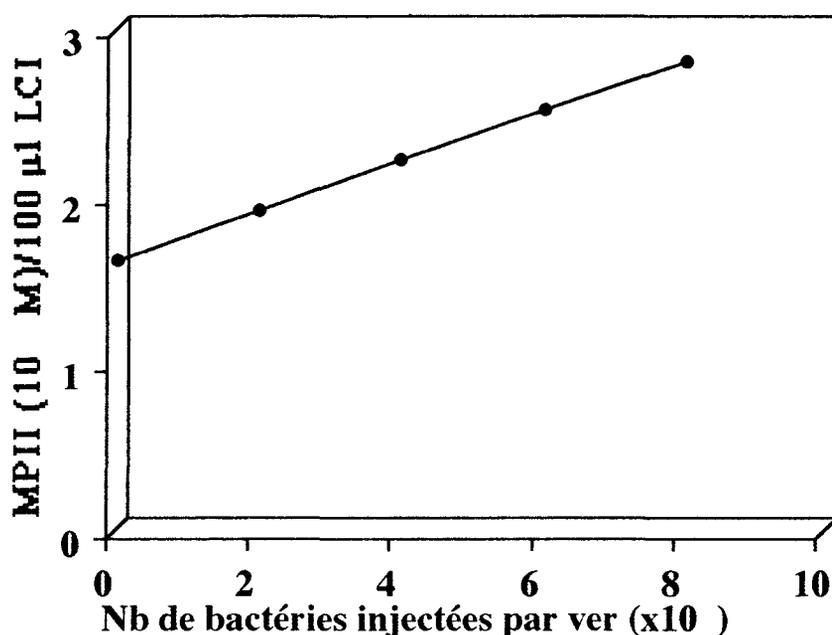


Figure 27. Evolution du taux de MP II dans le liquide cœlomique immunisé (LCI) en fonction du nombre d'*E. coli* injectées par ver. Après 24 heures d'immunisation. Le dosage de la MP II est réalisé par test ELISA à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MP II. Le taux de MP II est estimé par rapport à une gamme étalon obtenue à partir de la MP II purifiée par Demuynek (1991).

Une corrélation a pu être établie entre le nombre de bactéries injectées et le taux de MP II décelé dans le liquide cœlomique 24 heures après l'immunisation et ceci pour des concentrations inférieures à la DL 50.

I-2 Cinétique de la libération de la MPII

La concentration de MP II présente dans le liquide cœlomique après immunisation a été estimée en ELISA à différents temps après l'injection d'*E. coli* ou de *Vibrio alginolyticus*, ou à la suite d'une simple piqûre.

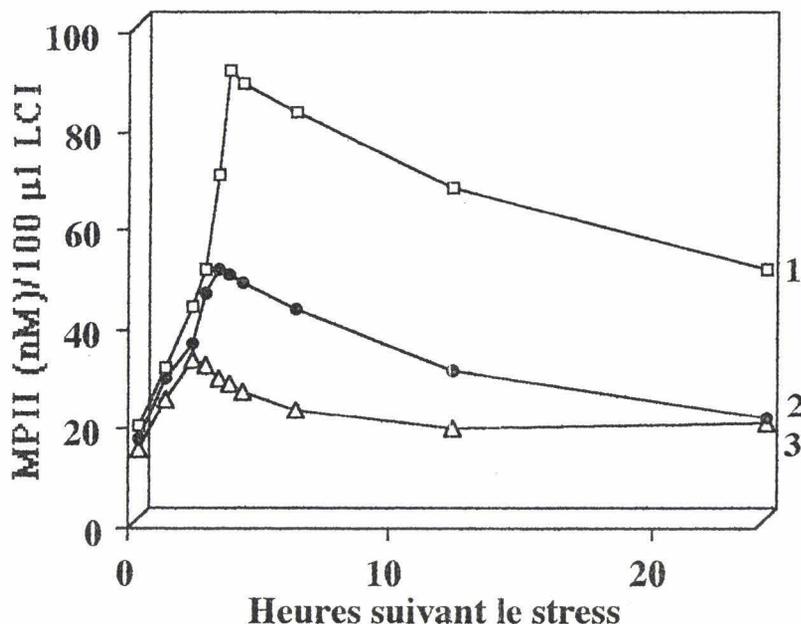


Figure 28 Cinétique de la libération de la MPII (dosée en ELISA à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MPII) par rapport à une concentration identique en protéine à la suite soit de l'injection d'une suspension d'*E. coli* (1), *V. alginolyticus* (2) ou soit après une simple piqûre (3). Le taux de MPII présente dans le liquide cœlomique immunisé (LCI) est estimé par rapport à une gamme étalon établie à partir de la MPII purifiée (Demuynck, 1991).

Les résultats obtenus (fig. 28) sont les suivants :

- Dans le cas de l'injection d'*E. coli*, le taux de MP II quintuple entre 1 et 3 heures après le stress. De plus, 24 heures après l'injection, ce taux est toujours supérieur au taux initial, ce qui est compatible avec les résultats précédents.
- Dans le cas de l'injection de *V. alginolyticus*, la même évolution est constatée mais avec cependant un maximum plus faible que celui obtenu avec *E. coli*.
- Dans le cas d'une simple piqûre, une légère augmentation du taux de MP II est également observée.

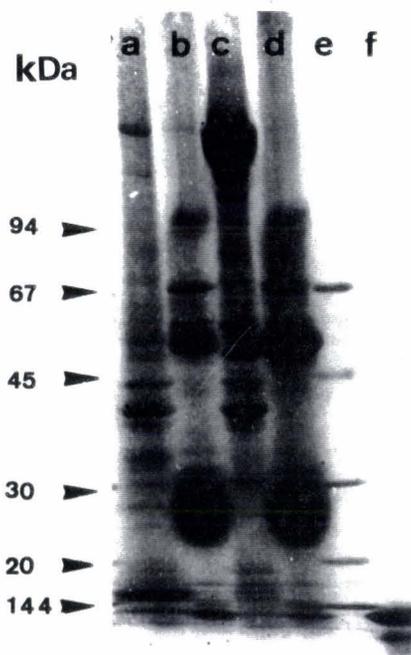


Figure 29A

Analyse électrophorétique en milieu dénaturant (SDS en présence de β -mercaptoéthanol) sur gel de polyacrylamide en gradient continu 5-25 % d'acrylamide.

- a - Liquide cœlomique immunisé (LCI*)
- b - MPII contenue dans (a) immunoprécipitée à l'aide de l'anticorps polyclonal correspondants
- c - Protéines totales des cœlomocytes
- d - MPII contenue dans les cœlomocytes (c) immunoprécipitée à l'aide de l'anticorps polyclonal correspondant
- e - Standards de masse moléculaire (flèches)
- f - MPII purifiée par Demuynek (1991)

a b c d

Figure 29B

Analyse en fluorographie des protéines nouvellement synthétisées au cours du marquage métabolique *in vivo* (24 h) en présence de leucine³H et séparées en électrophorèse (29A)

- a - Liquide cœlomique (LCI*)
- b - MPII immunoprécipitée de (a)
- c - Protéines totales contenues dans les cœlomocytes
- d - MPII immunoprécipitée contenues dans les cœlomocytes

Temps d'exposition : 15 jours.

Ces résultats montrent donc une libération rapide de la M_{PII} dans le milieu intérieur après l'injection de bactéries ou après une simple piqûre.

I-3 Synthèse de la M_{PII}

Dans ce chapitre est relaté une étude antérieure réalisée après la purification de la protéine antibactérienne : l'étude de la synthèse de la M_{PII}. Au cours de celle-ci, les variations éventuelles de la synthèse de la M_{PII} ont été étudiées après incorporation d'un précurseur radioactif la leucine tritiée (Leu-³H). Ces expériences ont été réalisées aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

- *In vivo*

*Protocole expérimental

Simultanément à l'injection de bactéries, la Leu-³H (1,2 MBq/ver) est introduite dans la cavité coelomique afin de rechercher les protéines nouvellement synthétisées. Après 24 heures d'incorporation, l'analyse des protéines du liquide coelomique et de celles contenues dans les cellules coelomiques a été réalisée par électrophorèse en milieu dénaturant (SDS en présence de β-mercaptoéthanol), suivie d'une fluorographie.

*Les résultats suivants ont été obtenus :

- A partir des protéines du liquide coelomique (fig. 29A, piste a), il a été retrouvé de la M_{PII}, immunoprécipitée à l'aide de l'anticorps monoclonal spécifique (fig. 29A, piste b). Par contre, la fluorographie correspondante ne montre pas de marquage de la M_{PII} immunoprécipitée (fig. 29B, piste b) ni des protéines du liquide coelomique (fig. 29B, piste a).
- Dans le contenu des coelomocytes (obtenus après élimination des produits génitaux sur tamis à mailles de 37 μm), la M_{PII} immunoprécipitée et colorée par le bleu de Coomassie (fig. 29A, piste d), ne révèle pas de radioactivité (fig. 29B, piste d). Le marquage, bien que faible, de l'ensemble des protéines coelomiques montre que l'incorporation du précurseur s'est effectivement produite.

- *In vitro*

Etant donné les difficultés d'obtention de résultats significatifs *in vivo*, une étude radioautographique en présence de Leu-³H, a été entreprise *in vitro*. Pour cette étude, des cultures de coelomocytes obtenus

après élimination des produits génitaux sur tamis, ont été effectuées. Lors de la mise en culture nous avons été confrontés à des problèmes de libération non spécifique de protéines (fig. 30) résultant de l'adhérence des cellules sur le support mais également à des problèmes d'agrégation des cellules entre elles. L'analyse du milieu de culture renouvelé tous les trois jours montre une diminution du taux des protéines libérées après 6 jours de culture (fig. 30).

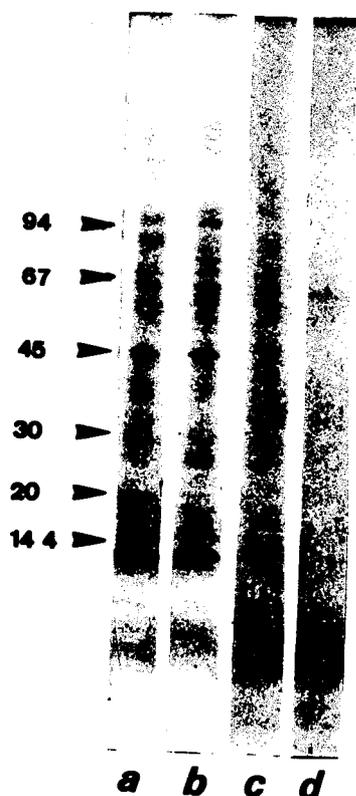


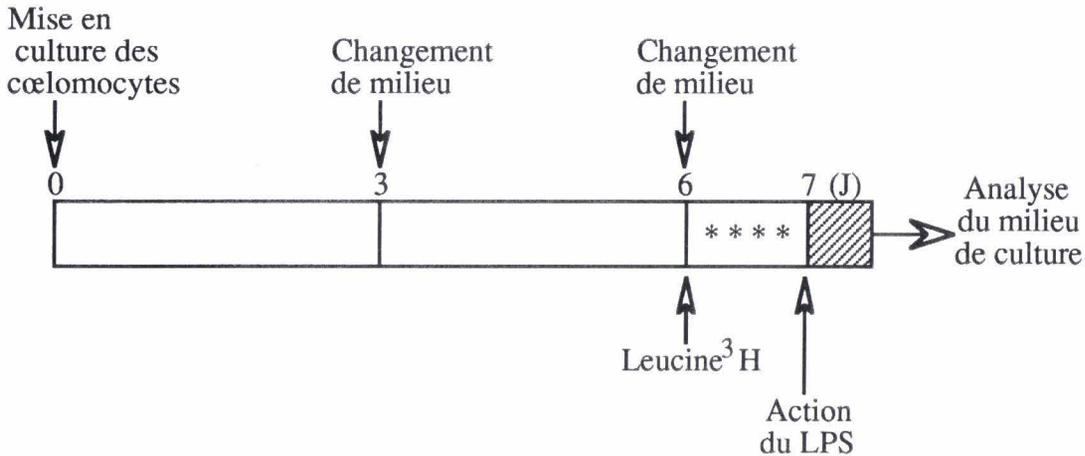
Figure 30.

Analyse électrophorétique en milieu dénaturant (SDS en présence de β -mercaptoéthanol) sur gel de polyacrylamide en gradient continu 5-25 % des milieux de culture des cœlomocytes, effectuée à chaque renouvellement (tous les 3 jours).

- a - 1^{er} renouvellement
- b - 2^{ème} renouvellement
- c - 3^{ème} renouvellement
- d - 4^{ème} renouvellement .

***Protocole expérimental**

Après 6 jours de mise en culture en présence de Leu-³H, une dégranulation est provoquée par addition de lipopolysaccharides (LPS) à une dose de 50 μ g par culture. Le protocole de l'expérience est résumé dans le schéma suivant.



*Résultats

L'analyse des protéines libérées dans le milieu de culture montre la présence de MPII (fig. 31A, piste b) qui n'est pas détectée en fluorographie (fig. 31B, piste b). Un marquage, quoique faible, est observé sur l'ensemble des protéines cœlomiques, ce qui permet d'affirmer que l'incorporation du précurseur s'est effectivement produite (fig. 31B, piste a).

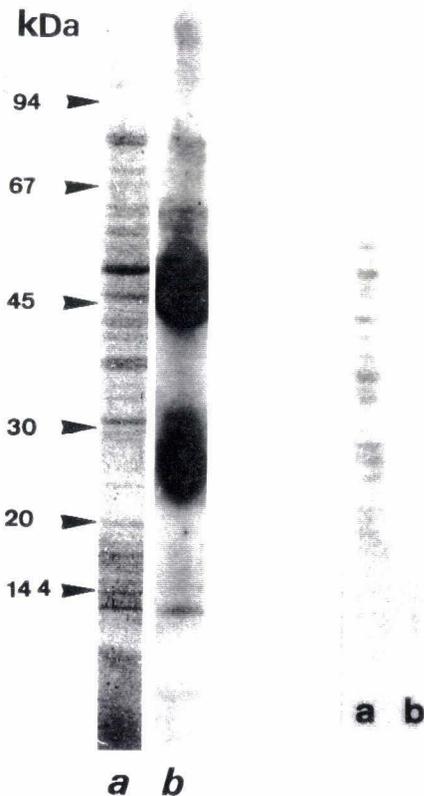


Figure 31A.

analyse électrophorétique en milieu dénaturant (SDS en présence de β -mercaptoéthanol) sur gel de polyacrylamide en gradient continu -25 % de milieu de culture après l'expérience d'incorporation de Leu- ^3H *in vitro* et l'induction d'une dégranulation par les LPS.

- Protéines totales du milieu de culture
- MPII obtenue après immunoprécipitation à l'aide des anticorps polyclonaux correspondants

Figure 31B.

Analyse en fluorographie au niveau des pistes a et b de la figure 31A des protéines ayant incorporé de la leucine- ^3H lors de l'expérience de marquage radioactif et de dégranulation spécifique.

Temps d'exposition : 15 jours.

Les difficultés liées aux problèmes de libération et de visualisation de la synthèse de la MPII nous ont amenés à envisager cette étude, non plus au niveau de la détection et de la quantification de la MPII nouvellement synthétisée, mais au niveau de l'expression du gène codant la MPII. Dans ce cas, ce sont les ARNm qui sont détectés.

II- Etude de l'expression du gène de la MPII

Sur des tissus fixés, congelés et coupés au cryostat, les réactions d'hybridation ont été réalisées en utilisant comme sonde le fragment d'ADNc de 250 pb, appelé sonde MPII, obtenu par la méthode PCR. La sonde MPII a été marquée soit au ³⁵S, soit à la digoxigénine.

II-1 Localisation des cellules exprimant le gène de la MPII

Les études relatives à la détermination du site de synthèse de la MPII ont été effectuées sur des animaux non immunisés.

II-1.1 Localisation en *hybridation in situ* des cellules contenant l'ARNm codant la MPII

L'examen microscopique de coupes de métamères ayant subi la technique d'hybridation *in situ* en utilisant la sonde MPII marquée soit au ³⁵S soit à la digoxigénine a révélé la présence d'un marquage au niveau d'un massif cellulaire d'une taille est supérieure à 200 μ m qui semble être libre dans le cœlome (Planche 4, fig. b; Planche 5, fig. c). Par contre, aucun signal n'a été détecté dans les G I libres dans le cœlome (Planche 4, fig. c) et dans les G I localisés autour du massif cellulaire (Planche 4, fig. b). De plus, il a été observé un marquage mais cette fois uniquement avec la sonde radioactive au niveau des muscles obliques et longitudinaux situés de part et d'autre de la chaîne nerveuse (Planche 5, figs a et b)

En résumé, nous avons pu déceler deux sites distincts contenant les ARNm spécifiques de la MPII : l'un au niveau d'un massif cellulaire situé dans la cavité cœlomique, l'autre dans la musculature. Par contre, les G I qui avaient été initialement identifiés comme étant le lieu de synthèse de la MPII (Porchet-Henneré, 1987) ne semblent pas contenir d'ARNm spécifiques de la MPII.

PLANCHE 4

**Détection en hybridation *in situ* des cellules exprimant l'ARNm codant la MPII sur coupes histologiques transversales de métamères de *N. diversicolor* à l'aide de la sonde MPII marquée au ³⁵S.
Coloration au bleu Azur (1‰)**

a : Massif (M) hybridé.

b : Détail de la photographie (a) montrant le massif cellulaire (M) hybridé. Noter que les granulocytes de type I (G I), localisés autour du massif, ne sont pas hybridés.

c : Granulocytes de type I (G I), libres dans le cœlome, non hybridés.

Barres d'échelle : 20µm

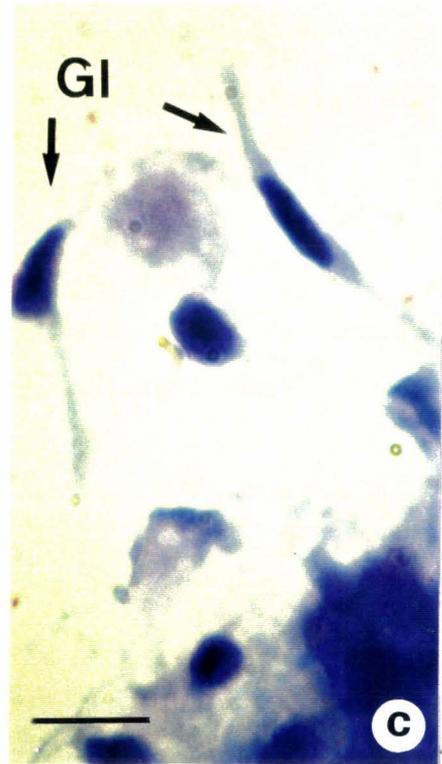
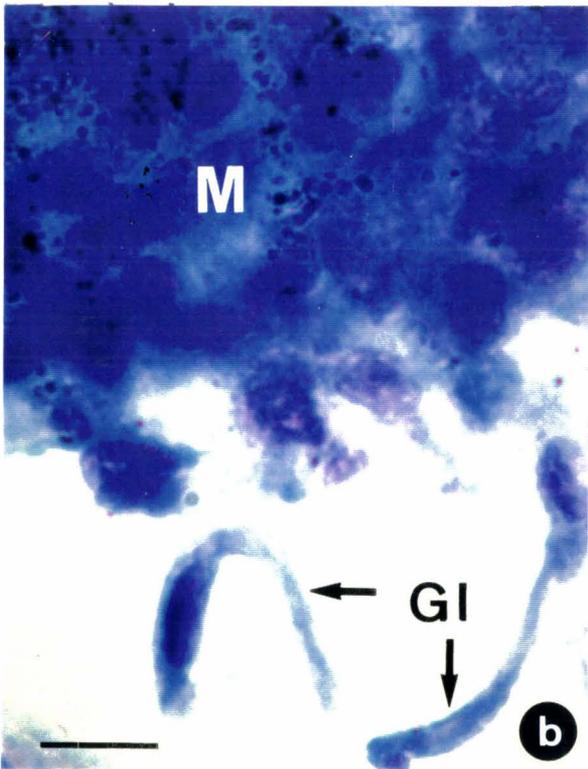
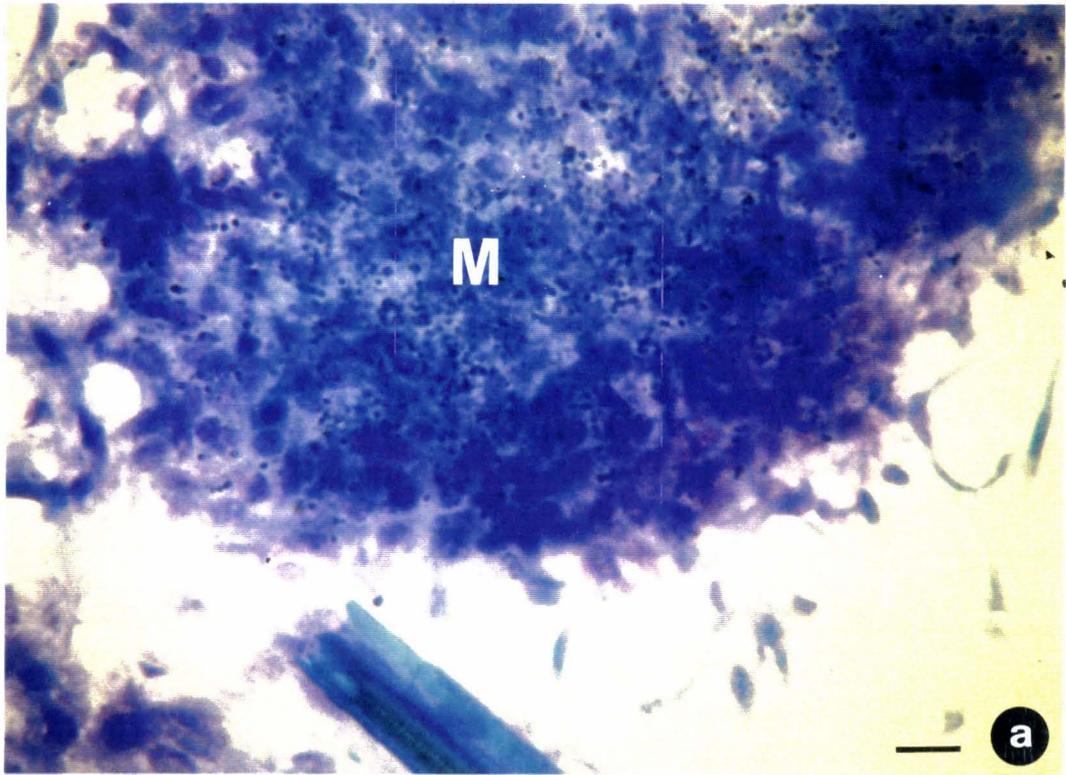
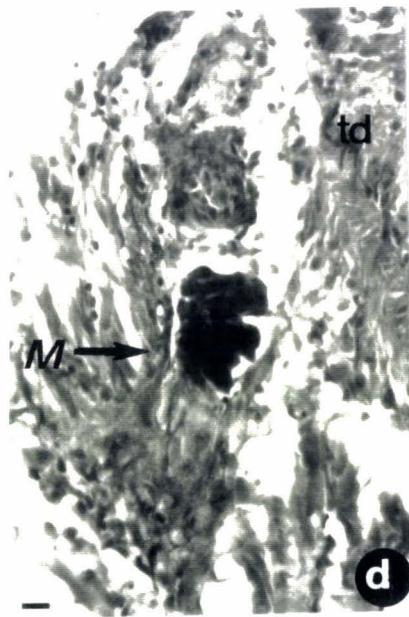
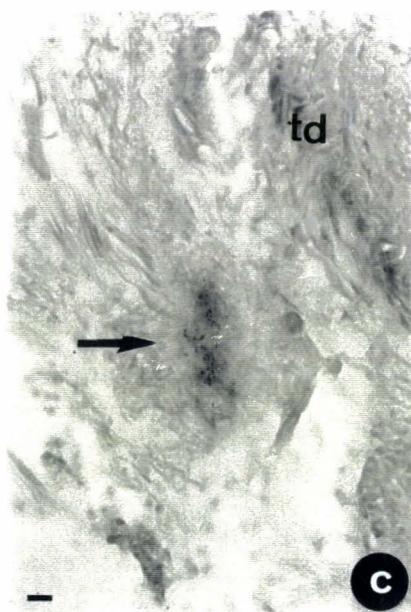
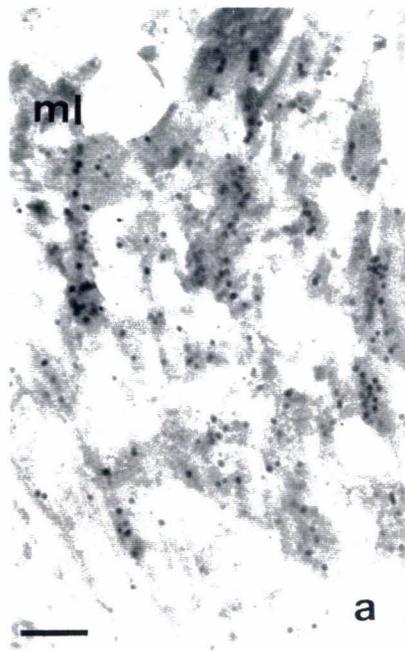


PLANCHE 5

Détection en hybridation *in situ* des cellules exprimant l'ARNm codant la MPII sur coupes histologiques transversales de métamères de *N. diversicolor* à l'aide de la sonde MPII marquée soit au ^{35}S (figs.a et b) soit à la digoxigénine (fig.c).
Coloration au bleu Azur (1‰) (figs.a et b)

- a et b : Noter la présence de grains d'argent au niveau des muscles longitudinaux (ml, fig a) et des muscles obliques (mo, fig b).
- c : Observer le marquage d'un massif cellulaire M (flèche) libre dans le coelome .
- d : Coupe histologique à un niveau voisin de celui de la coupe précédente (c) mais non traitée en *hybridation in situ* .
t.d ; tube digestif.

Barres d'échelle : 20µm



II-1.2 Localisation par immunocytochimie des cellules contenant la MPII

Si les études de Porchet-Henneré *et al.*, (1987) avaient montré que les G I contenaient la MPII, elles n'avaient pas révélé d'immunomarquage au niveau des massifs cellulaires que nous avons mis en évidence en hybridation *in situ*. Etant donné la difficulté, peut-être en raison de leur rareté, à repérer ces massifs sur des coupes histologiques nous avons repris l'étude de la localisation de la MPII en immunocytochimie en nous attachant à rechercher les massifs cellulaires préalablement détectés par hybridation *in situ*. Un immunomarquage a été obtenu au niveau de ces massifs et notamment à leur périphérie (planche 6, fig a), ainsi qu'au niveau des G I localisés autour du massif (planche 6, fig b) et des G I libres dans le coelome (planche 6, fig c).

II-2 Expression du gène de la MPII après une agression bactérienne

La détection des ARNm codant la MPII à la suite d'un stress bactérien a été abordée soit en hybridation *in situ*, soit après extraction des ARNm.

II-2.1 Détection par la technique d'hybridation *in situ*

De manière à obtenir une concentration plus élevée en G I, l'expérimentation a été réalisée sur des coupes de culot de coelomocytes obtenus à différents temps (3, 6, 18 et 24 heures après l'injection d'*E. coli* dans le milieu intérieur). L'analyse des coupes, après révélation des hybridations avec la sonde MPII radioactive, n'a montré aucun signal d'hybridation au niveau G I (Planche 7).

Les G I qui contiennent des granules de MPII, ne présentent donc pas d'ARNm spécifique de la MPII et ceci même à la suite d'un stress bactérien provoquant la libération de la MPII dans le milieu intérieur.

II-2.2 Détection par la technique du Dot Blot

Nous avons envisagé la possibilité d'une stimulation de la synthèse de la MPII avec une activation directe au niveau de la zone spécifiquement marquée précédemment. Cette étude a été abordée en Dot Blot vu les difficultés d'obtention de coupes histologiques passant par le

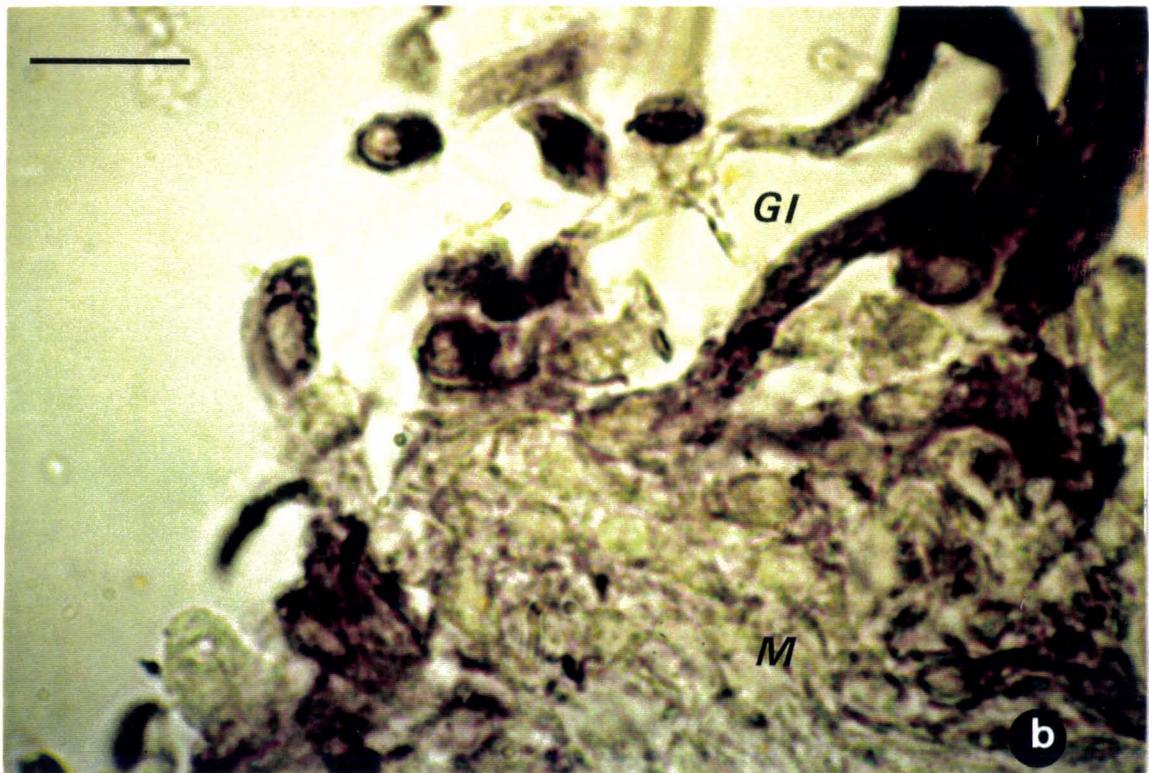
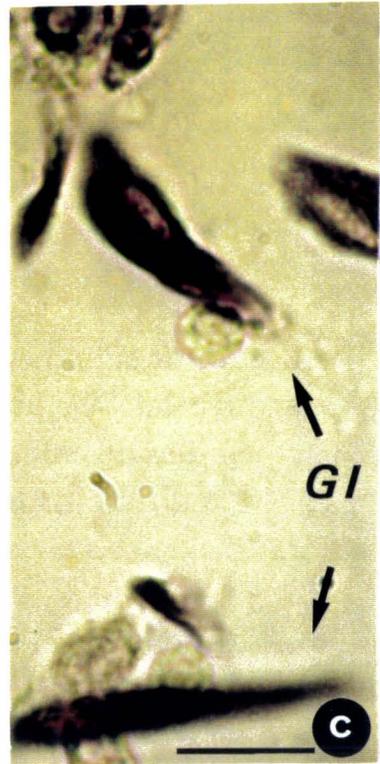
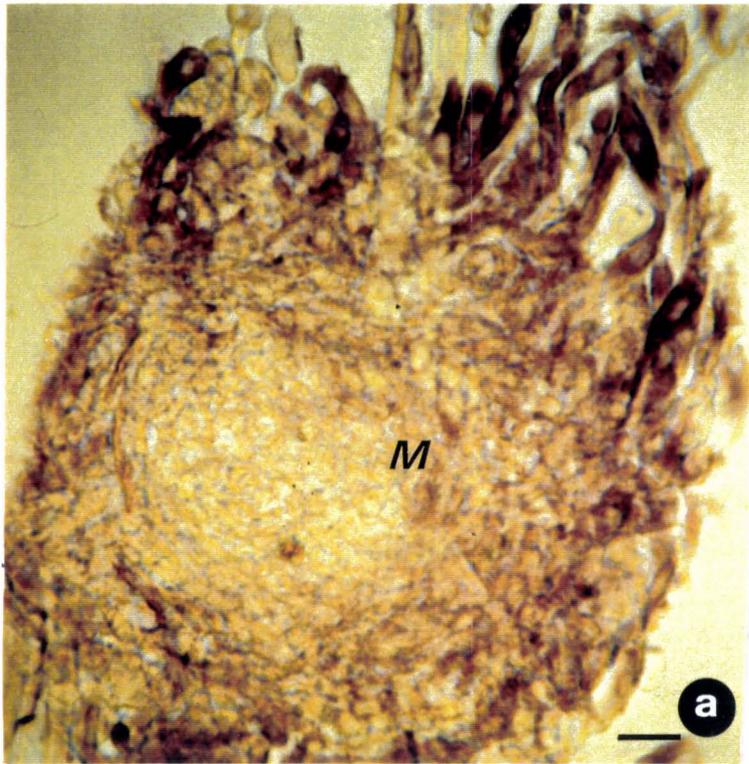
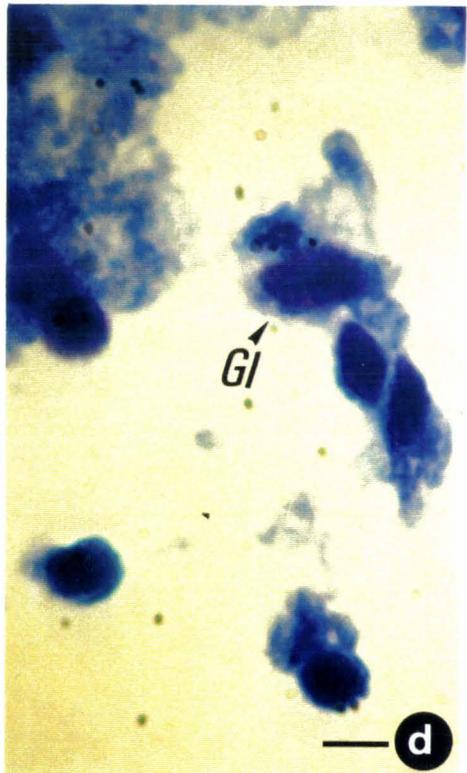
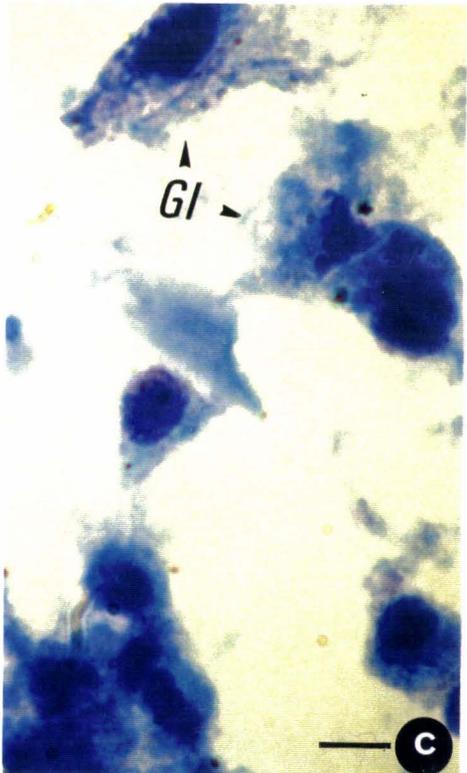
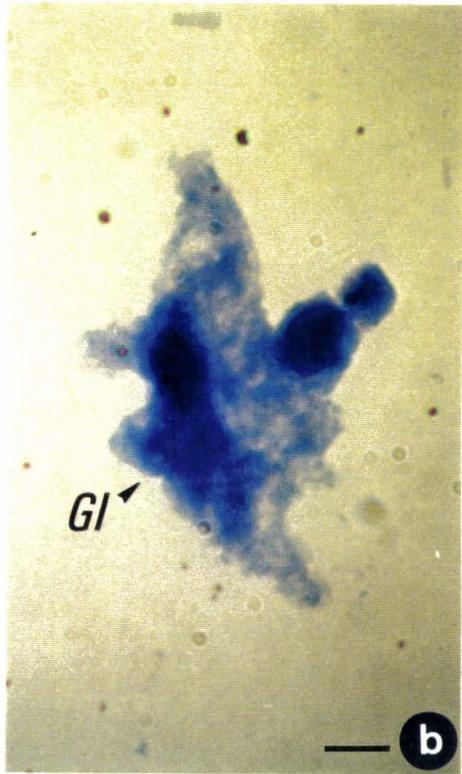
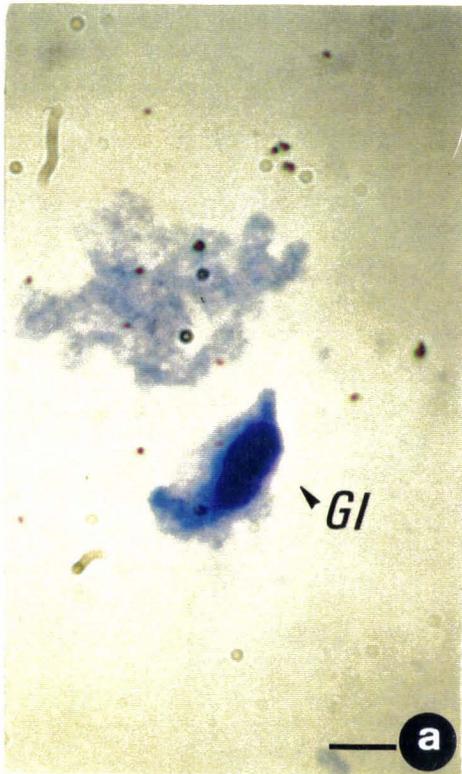


PLANCHE 7

Absence de signal en hybridation *in situ*, en utilisant la sonde MP11 marquée au ^{35}S , au niveau des granulocytes de type I (G I) sur des coupes de culot de cœlomocytes de *N. diversicolor* obtenus à différents temps (figs a : 3h; b : 6h; c : 18h; d : 24h) après un stress bactérien.

Coloration au bleu Azur (1‰)

Barres d'échelle : 20 μm



massif cellulaire détecté en hybridation *in situ* et en immunocytochimie avec l'anticorps anti-MPII.

Après extraction des ARNm des cellules libres du cœlome à l'aide d'un kit de micro-purification d'ARNm, une légère diminution du taux d'ARNm spécifique a pu être démontrée dans les premières heures suivant le stress bactérien (fig 32). Cette diminution est suivie d'une augmentation significative 24 heures après l'immunisation. Les résultats semblent montrer une reprise de la transcription des ARNm 24 heures après l'injection d'*E. coli*. Cette expériences ayant été réalisée une seule fois, ces résultats préliminaires devront être confirmés par une étude réalisée en Northern Blot.

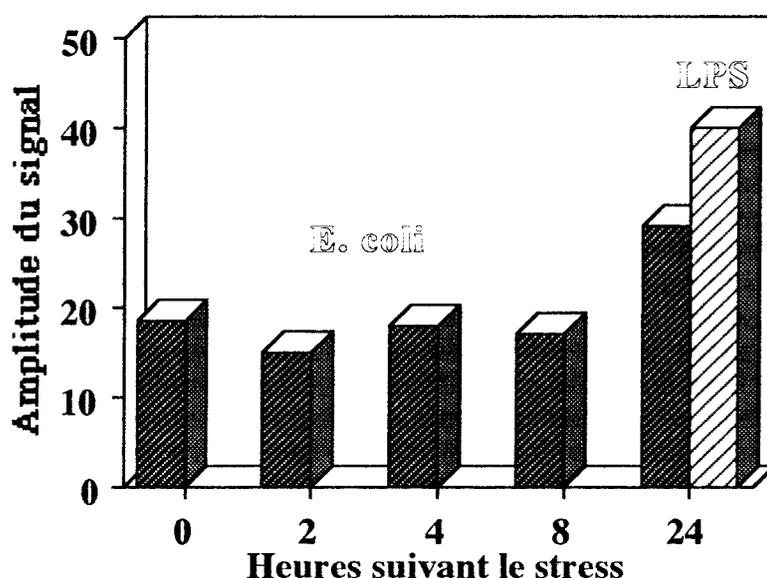


Figure 32 : Evolution du taux d'expression de l'ARNm codant la MPII à la suite d'un stress bactérien (*E. coli*) ou de l'action des Lipopolysaccharides (LPS). Détection en Dot Blot (1 μ g d'ARNm extraits des cellules libres du cœlome) à l'aide de la sonde MPII marquée au 32 P. Enregistrement densitométrique.

III- Conclusion

Dans notre étude chez *N. diversicolor* relative à la caractérisation de la protection antibactérienne induite dans le liquide cœlomique, la libération de la MPII a pu être établie ainsi qu'une corrélation entre le nombre de bactéries injectées et le taux de MPII libérée. Nous avons démontré que la libération de la MPII était un phénomène rapide résultant de la stimulation

des G I. Il faut rappeler que la mobilisation et l'activation des cœlomocytes aboutissant au phénomène de dégranulation ont déjà été mises en évidence *in vitro* chez *N. diversicolor* dans le cas de stimulations provoquées par des agents activateurs tels que l'ionophore calcium, les lipopolysaccharides ou le cadmium (M'Béri, 1988). Nous avons pu confirmer l'activation et la libération de la MPII (*in vivo*) dans le cas d'une agression bactérienne (*E. coli* ou *V. alginolyticus*) ou lors d'une simple piquûre mais avec une amplitude différente selon les stimuli. Les résultats sont comparables à ceux obtenus par M'Béri (1988) lors d'une dégranulation induite par des lipopolysaccharides chez *N. diversicolor* : la MPII, protéine contenue dans les G I (Porchet-Henneré *et al.*, 1987) et connue initialement pour sa capacité à fixer du Cd (Nejmeddine *et al.*, 1988), est expulsée dans le liquide cœlomique.

La stimulation des G I aboutissant à la libération de la MPII étant établie, nous avons envisagé les répercussions possibles de cette stimulation au niveau de la synthèse de la MPII. L'étude relative à la localisation des cellules responsables de cette synthèse, entreprise en hybridation *in situ* a permis de démontrer l'existence d'un massif cellulaire libre dans le cœlome présentant un signal intense. Les G I situées autour de ce massif ne présentent pas de signal en hybridation *in situ* mais sont par contre immunomarquées avec l'anticorps monoclonal anti-MPII tout comme les G I libres dans le cœlome. A partir de ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces massifs cellulaires seraient à l'origine des G I. et que seule la transcription du gène de la MPII se produirait dans les cellules situées dans le massif détecté en hybridation *in situ*. La traduction prendrait place dans les G I situés à la périphérie du massif et cesserait dans les G I libres.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux obtenus lors de l'étude de la synthèse de la MPII. Ainsi, après incorporation de leucine-³H et fluorographie, il n'a pas été possible de visualiser de nouvelles synthèses de MPII lors de la mise en culture de cœlomocytes. Ceci s'explique par le fait que lors de l'expérience, le tamisage des cellules libres du cœlome, effectué pour éliminer les produits génitaux, élimine également les massifs cellulaires détectés en hybridation *in situ*. Les résultats réalisés *in vitro* sont donc en accord avec le fait que les granulocytes "matures" ne semblent plus capables d'exprimer les ARNm codant la MPII.

Les expériences de détection des ARNm codant la MPII en Dot Blot ont mis en évidence un taux initial très faible et une augmentation de ce

taux 24 heures après l'immunisation. Ces résultats n'étant que préliminaires, ils devront être confirmés en Northern Blot. Il est à noter qu'après une agression bactérienne aucun signal n'est détecté en hybridation *in situ* au niveau des G I.

L'étude en hybridation *in situ* a permis de détecter chez *N. diversicolor* la présence d'ARNm codant la MPII au niveau d'un autre site : les muscles obliques et les muscles longitudinaux, muscles impliqués dans la locomotion. Si l'on tient compte du fait que Takagi et Cox (1991) ont démontré chez la même espèce l'existence d'une myohémérythrine présentant 81 % d'homologie avec la MPII, il est logique de penser que la sonde oligonucléotidique utilisée ait été capable de détecter également les ARNm spécifiques de cette myohémérythrine.

DISCUSSION GENERALE

Chez les annélides polychètes et plus spécifiquement chez *N. diversicolor*, les réactions de défense font appel à des processus immunitaires variés où l'immunité à médiation cellulaire joue un rôle important. Il a été démontré qu'au moins deux types de granulocytes décrits sous le nom de G II et G III (Dhainaut, 1984) sont impliqués dans les processus de phagocytose, notamment vis-à-vis des bactéries (Dhainaut et Porchet-Henneré, 1988). Face à des éléments de taille plus considérable (parasites, billes de latex) des processus de coopération cellulaire aboutissant à des processus d'encapsulation, ont été décrits avec précision (Porchet-Henneré *et al.*, 1987a).

Notre travail a porté, quant à lui, sur l'immunité à médiation humorale. En effet, il avait été constaté (M'Béri, 1988) qu'à la suite de l'injection de diverses espèces de bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Micrococcus kristinae*), il apparaissait dans le liquide cœlomique une substance exerçant un effet antibactérien notamment vis-à-vis d'*E. coli* et *M. kristinae*. Parallèlement, il avait été décelé dans le milieu intérieur de *N. diversicolor* la présence d'une protéine désignée sous le nom de MPII, protéine capable de complexer les métaux lourds et en particulier le cadmium (Nejmeddine *et al.*, 1988).

Dans un premier temps nous nous sommes attachés à vérifier la similitude pressentie entre la MPII et la protéine à activité antibactérienne. Nous avons notamment constaté la disparition de la réaction antibactérienne lorsque la MPII du liquide cœlomique, obtenu après immunisation des néréis, est éliminée par une immunoprécipitation réalisée à l'aide des anticorps anti-MPII. En caractérisant la réponse antibactérienne, nous avons montré qu'elle était due à la MPII qui présente un spectre d'activité assez large (bactéries Gram+ et Gram). Cette molécule est rapidement libérée dans le milieu extracellulaire où elle persiste pendant au moins 24 heures. La modalité de libération de la MPII dans le milieu intérieur ainsi que son spectre d'activité large rappellent les réactions de défense obtenues chez les insectes à la suite d'une agression bactérienne. En fait, ce type de réaction s'inscrit dans l'immunité à médiation humorale observée chez un grand nombre d'invertébrés (Ratcliffe *et al.*, 1985). Chez les insectes, le mécanisme de défense correspond à un processus inductible qui se traduit par l'apparition dans le sang d'une forte activité antibactérienne celle-ci impliquant la synthèse de plusieurs molécules de nature peptidique (ou de plusieurs familles de molécules) dont les spectres d'activité sont en général assez larges (Hoffmann, 1992). Différentes catégories ont pu être distinguées : les cécropines (Boman, 1974; Hultmark *et al.*, 1980,

1982 ; Boman *et al.*, 1991), les défensines (Keppi *et al.*, 1986 ; Dimarcq *et al.*, 1988, 1990), les attacines (Boman, 1974 ; Engström *et al.*, 1984 ; Hulmark *et al.*, 1983), les sarcotoxines (Ando et Natori 1988 ; Natori, 1977 ; Okada et Natori, 1983, 1984, 1985) et les diptérines (Dimarck *et al.*, 1988 ; Keppi *et al.*, 1989). En ce qui concerne les annélides oligochètes, l'existence de protéines bactériostatiques de 40 et 45 kDa a été signalée (Lassalle *et al.*, 1988 ; Lassègues et Lassègues 1980, 1988, Lassègues *et al.*, 1989 ; Roch *et al.*, 1981 ; Valembois *et al.*, 1982).

Différentes expériences de neutralisation de l'activité antibactérienne en présence de fer nous ont permis de démontrer que la MPII agit en complexant le fer nécessaire à la croissance des bactéries. Cette propriété de chélater le fer s'explique aisément par le fait que la MPII est apparentée aux hémérythrine (49% d'identité) et aux myohémérythrine (65 % d'identité) (Demuynck, 1992), pigments respiratoires connus essentiellement, avant les travaux de Demuynck (1992), chez un groupe également très primitif de coelomates : les sipunculien (Klippenstein *et al.*, 1976 ; Loerh *et al.*, 1978). Demuynck (1992) a montré que les acides aminés (25-H, 54-H, 58-E, 74-H 78-H) impliqués dans la fixation du fer sont retrouvés et conservés au cours de l'évolution.

Dans un second temps, nous avons abordé l'étude du gène codant la MPII. Par la méthode dite de PCR, l'ADNc codant la MPII a pu être obtenu sous la forme de trois fragments spécifiques. La spécificité du fragment de 250 pb a été contrôlée en arrêt de traduction et par la réalisation de son séquençage. Ce fragment a été appelé sonde MPII. Cette sonde nous a permis d'identifier l'ARNm spécifique de la MPII. Il s'agit d'un seul type d'ARN d'une longueur estimée à 1000 bases, et dont la traduction *in vitro* en milieu acellulaire a abouti à l'élaboration du précurseur de la MPII, polypeptide de 14 kDa (MPII : 13,6 kDa). Ces résultats ont permis d'établir que cet ARN est caractérisé par une partie non codante très importante. L'utilisation du fragment d'ADNc de 250 pb comme sonde a permis de réaliser une étude relative à l'expression du gène de la MPII en hybridation *in situ*.

La détection des cellules exprimant ce gène a montré tout d'abord la présence d'ARNm spécifique au niveau de muscles impliqués dans la locomotion. La présence chez *N. diversicolor* d'une myohémérythrine isolée et séquencée par Takagi et Cox (1991) molécule de 120 acides aminés, peut expliquer la détection d'un tel signal puisque la MPII présente 81,5% d'identité avec cette myohémérythrine (Demuynck, 1992). Des massifs cellulaires présentant un signal intense avec la sonde d'ADNc ont été également mis en évidence. Ces massifs sont entourés par des G I qui semblent s'en détacher.

L'étude réalisée immunocytochimique a mis en évidence à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MPII au niveau de la zone corticale du massif cellulaire. Ces massifs pourraient constituer des centres de prolifération et de différenciation des G I. Ces résultats sont intéressants car chez les invertébrés les centres de formation des cellules du milieu intérieur, appelés centres d'hématopoïèses, sont en général assez mal connus. Des tissus hématopoïétiques ont été décrits (revue de synthèse de Ratcliffe *et al.*, 1985) chez divers invertébrés (mollusques gastéropodes et céphalopodes, crustacés et insectes). Toutefois nombre de ces observations sont d'ordre morphologique et relèvent, pour un certain nombre d'entre-elles, uniquement de la microscopie photonique. Des données plus récentes chez les tuniciens révèlent la présence et la prolifération de "lymphocytes-like" en réponse à une agression (Raftos et Cooper, 1991). Chez les annélides, les données restent assez fragmentaire. Selon Valembois (1971a), les cœlomocytes des oligochètes trouveraient leur origine selon leurs catégories au niveau des feuilletts cœlomiques de la somatopleure et de la splanchnopleure. Plus récemment chez le ver de terre *Amyntas diffringens*, Friedman et Weis (1982) ont décrit la structure d'organes leucopoïétiques. Ces organes sont suspendus dans la cavité du cœlome au niveau des muscles. Toutefois ces auteurs mentionnent qu'ils n'ont pas été capables d'enregistrer de mitoses au niveau de ces organes. Chez les annélides polychètes la situation est encore plus fragmentaire, les seules observations récentes étant celles d'Eckelbarger (1976) qui signale, chez *Nicolea zostericola*, que les cœlomocytes semblent se différencier au niveau de sites spécifiques de l'épithélium cœlomique pariétal. Nos observations relatives au massif hématopoïétique des G I de *N. diversicolor* s'intègrent assez bien avec les observations morphologiques réalisées sur d'autres espèces d'invertébrés (Eckelbarger, 1976; Friedman et Weis, 1982). Notre méthodologie permet cependant de conclure de façon beaucoup plus certaine à l'existence de ces centres de différenciation.

D'une façon assez surprenante, les G I libres dans le cœlome ne semblent pas exprimer l'ARNm codant pour cette molécule. Aucun signal n'a pu être détecté, même dans le cas d'une stimulation par injection d'une suspension bactérienne faiblement concentrée, au niveau de ces G I qui pourtant sont loin d'être métaboliquement inactifs comme le prouve l'incorporation de précurseurs variés (leucine, glucose) visualisés en autoradiographie (Dhainaut, inédit). On est donc amené à envisager le fait que l'expression du gène codant la MPII, très active tant que les cellules sont dans le centre différenciateur, cesserait très rapidement quand les cellules deviennent matures et libres dans le milieu cœlomique. Des données comparables sont signalées chez les neutrophiles de mammifères pour l'expression de la myéloperoxydase (Weil *et al.*, 1987) et chez

les éosinophiles pour l'expression de la peroxydase (Gruart et al., 1992). Dans ces deux cas, les protéines semblent être synthétisées aux stades précoces de la différenciation et stockées ensuite dans les cellules matures jusqu'à leur libération. L'expression d'ARNm codant pour d'autres facteurs protéiques persiste par contre à un taux élevée. D'autre part, au niveau des mastocytes de souris, une modulation différentielle de l'activation génique a été démontrée (Gurish *et al.*, 1991) au niveau de motifs particuliers qui pourraient réguler le turn-over des ARNm (Shaw et Kamen, 1986 ; Caput *et al.*, 1986). En ce qui concerne notre travail, nous ne possédons pas actuellement de données sur la régulation génique.

Un dernier point de discussion concerne la reprise des synthèses d'ARNm codant la MPII observée après stimulation par injection soit de bactéries soit de lipopolysaccharides. Les résultats obtenus sont encore très préliminaires et auront besoin d'être confirmés. Ils rejoignent toutefois, dans une certaine mesure, les études relatives aux peptides antibactériens chez les insectes, chez lesquels la réponse à une agression implique des synthèses de plusieurs molécules antibactériennes. Dans le cas de *N. diversicolor*, nous avons constaté que les G I semblent incapables à la suite d'un stress bactérien de réinitier de nouveaux processus de transcription et de traduction pour la MPII. La seule cible potentielle pour la reprise de la synthèse des ARNm codant la MPII, semble être le massif hématopoïétique détecté en hybridation *in situ*. La confirmation de cette hypothèse impliquerait la possibilité que ce centre différenciateur puisse être directement modulé par des stimulations extérieures.

Vu les particularités de l'expression du gène de la MPII, il est indéniable que son analyse présente un intérêt primordial et doit être réalisée à court terme. Les connaissances acquises au cours de notre travail sur l'ADNc de la MPII serviront de base à cette analyse.

METHODES

I- Préparation du matériel

I-1 Extraits solubles d'animaux

Après avoir été lavés dans de l'eau de mer filtrée, les animaux sont homogénéisés à 4°C dans 2 volumes de Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 (TBS) à l'aide d'un homogénéiseur Polytron. L'homogénat obtenu est centrifugé 30 mn à 12 000 g à 4°C. Le culot issu de cette première centrifugation est repris, homogénéisé et centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Les 2 surnageants obtenus sont regroupés et centrifugés 30 mn à 20 000 g à 4°C. Le surnageant obtenu est translucide, il sera désigné sous le terme d'extrait brut.

I-2 Prélèvement du liquide coelomique

Le liquide coelomique des animaux, immunisés ou non, contenant les cellules coelomiques est collecté par ponction au niveau de la cavité coelomique à l'aide d'une pipette Pasteur effilée et stérile. Le liquide coelomique proprement dit est obtenu après une centrifugation de 15 mn à 12 000 g à 4°C afin d'éliminer les cellules. Le surnageant obtenu est clair, nous l'appelons liquide coelomique.

I-3 Préparation des coelomocytes

Après avoir ponctionné le liquide coelomique contenant les cellules libres du coelome *i.e.* coelomocytes et gamètes mâles ou femelles, nous avons séparé les coelomocytes sur un tamis de nylon à mailles de 37 μm . A l'inverse des gamètes, trop gros, les coelomocytes passant au travers des mailles sont récupérés sous forme d'un culot après une centrifugation de 5 mn à 3 000 g. Ils sont ensuite remis en suspension puis lavés dans du tampon phosphate 50 mM, NaCl 450 mM, pH 7,2 (PBS salé).

I-3.1 Incorporation d'un précurseur radioactif *in vivo*

Le marquage radioactif des protéines se fait par injection intracoelomique d'environ 1,2 MBq de L-(3,4,5-³H) Leucine (1,21 TBq/mmmole, CEA) par ver. Après incubation, les coelomocytes sont séparés des gamètes comme précédemment.

I-3.2 Incorporation d'un précurseur radioactif *in vitro*

Les coelomocytes sont incubés dans 0,5 ml de milieu en présence de Leucine tritiée à la dose de 1,2 MBq/ml. Le milieu utilisé est le milieu de culture employé pour les éléocytes de *Perinereis cultrifera*, il est dépourvu de leucine (Baert et Slomianny, 1987), avec pour seule modification un ajustement de la pression osmotique à 1000 mos par dilution. Les incubations ont été réalisées dans des boîtes de culture stériles à la température constante de 12°C.

I-4 Immunisation des animaux

I-4.1 Souches bactériennes

Deux types de souches bactériennes (*Escherichia coli* : Gram+, *Micrococcus kristinae* : Gram-) provenant de l'Institut Pasteur et cultivées en milieu gélosé, ont été utilisées.

I-4.2 Milieu de culture liquide

Les bactéries sont mises en suspension dans un milieu de culture LB (Luria Berloni) stérile ayant la composition suivante :

- extrait de levure (Difco)	5 g
- tryptone (Difco)	10 g
- NaCl	10 g
- H ₂ O milli-Q	qsp 1000 ml

le pH étant ajusté à 7,4

Les bactéries sont mises en culture à 37°C sous agitation orbitale jusqu'à obtention d'une densité optique (DO) de 0,7 (phase de croissance exponentielle) à 600 nm. La suspension bactérienne est centrifugée 15 mn à 3 000 g. Le culot de bactéries est repris, soit par du PBS salé (phosphate 0,1 M, NaCl 450 mM, pH 7,2) pour l'immunisation des vers, soit par du PBS (phosphate 0,1 M, NaCl 150 mM, pH 7,2) pour réaliser les tests d'inhibition de croissance.

I-4.3 Milieu de culture gélosé

Les bactéries sont cultivées en aérobiose à 37°C sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé à 1,2 %. Les boîtesensemencées sont placées à 37°C pendant 8 h.

I-4.4 Protocole d'immunisation

Une injection dans la cavité coelomique de 50 µl d'une suspension d'*E. coli* en phase exponentielle (repris dans du PBS salé de manière à obtenir une DO de 0,1) permet d'induire une protection antibactérienne (M'Béri, 1988). Les animaux immunisés sont ensuite placés à 13-14°C pendant 24 à 48 h.

I-5 Tests d'activités antibactériennes

I-5.1 Test d'inhibition de croissance bactérienne sur gélose

Les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve à 50°C pendant 30 mn de manière à sécher la gélose. Elles sont ensuite recouvertes par 1 ml de la suspension bactérienne (*M. kristinae* ou *E. coli*) au 1/200^{ème} de la suspension mère (phase exponentielle, DO 0,7). Un tapis bactérien est obtenu en laissant les boîtes à 37°C pendant 30 mn. Les boîtes

ainsi préparées reçoivent des disques antibactériogrammes neutres de 9 mm de diamètre (Difco), sur lesquels 25 μ l d'échantillon à tester sont déposés. Les disques témoins de la croissance bactérienne reçoivent un volume identique de PBS. Après 8 heures à 37°C, les réactions antibactériennes se traduisent par la présence de zones d'inhibition de croissance bactérienne autour des disques. De plus, on sait que dans ces conditions, le diamètre des zones d'inhibition de croissance est proportionnel à la concentration du facteur antibactérien présent dans l'échantillon.

I-5.2 Test d'inhibition de croissance bactérienne par turbidimétrie

La densité optique (DO) d'une culture en phase exponentielle de croissance est proportionnelle au nombre de bactéries qu'elle contient. Les cultures bactériennes (10 μ l d'une suspension à une DO de 0,7) ont été incubées dans 700 μ l de milieu LB en présence de la substance à tester (20 μ l).

L'évaluation de la concentration est appréciée en turbidimétrie. Dans ces conditions expérimentales, la croissance maximale des bactéries est donnée par l'échantillon qui a reçu un volume équivalent d'eau distillée stérile. On peut connaître le pourcentage de bactéries survivant à une quantité de substance anti-bactérienne donnée suivant le rapport :

$$\frac{\text{DO (culture + substance) } \times 100}{\text{DO (culture témoin)}}$$

II- Méthodes biochimiques

II-1 Méthodes chromatographiques

II-1.1 Chromatographie de gel filtration

La filtration sur tamis moléculaire permet de séparer les constituants d'un mélange selon leur masse moléculaire. La colonne utilisée dans notre étude est une colonne Sephadex G 75 (1 m de longueur et de 21 mm de diamètre) dont le domaine de fractionnement est compris entre 70 et 3 kDa. Après avoir coulé le gel préalablement gonflé dans du tampon formiate d'ammonium 0,01 M, pH 7,4 dégazé, la colonne est stabilisée par passage de 2 volumes du même tampon à un débit de 12 ml/h réglé par une pompe péristaltique (Gilson). Des fractions de 4 ml sont récupérées. L'enregistrement en continu des variations de la DO est effectué à 280 nm (zone du spectre d'absorption des protéines riches en acides aminés aromatiques). Les fractions ainsi obtenues sont ensuite testées pour la recherche de l'activité antibactérienne. Les fractions positives sont dialysées, concentrées 4 fois grâce au système Microprodicon (MDPC 310) et testées à nouveau.

II-1.2 Chromatographie d'échange d'ions

La zone de gel filtration contenant les substances antibactériennes, est soumise à une séparation sur colonne d'échange d'ions (15 mm x 40 mm). Le support utilisé est une résine d'échange d'anions DEAE cellulose (diéthylaminoéthyl ; Whatman DE 52), équilibrée dans du tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8,5. L'élution a lieu avec le même tampon. Les constituants retenus par la résine sont élués par un gradient de NaCl 0-0,5 M dans le tampon précédent. Le débit utilisé est de 12 ml/h tout au long de la chromatographie. Des fractions de 4 ml sont recueillies au bas de la colonne. Les constituants non élués par le gradient le sont à l'aide du tampon initial additionné de NaCl à une molarité finale d'1 M. L'activité antibactérienne des fractions obtenues est à nouveau testée sur milieu gélosé. Le dessalage du matériel protéique est effectué grâce au système Microprodicon (MDPC 310) qui permet également d'obtenir un matériel 4 fois plus concentré.

II-2 Méthode de dosage protéique

La concentration en protéines des différentes fractions est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) à l'aide du réactif de Biorad. La gamme étalon est établie à partir d'une solution de globulines bovines (Biorad).

II-3 Méthodes électrophorétiques

II-3.1 Electrophorèse monodimensionnelle en milieu dénaturant et réducteur (SDS-PAGGE)

L'électrophorèse est réalisée en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate) sur gel gradient de polyacrylamide (5-25 %, épaisseur 0,75 mm) selon la méthode de Laemmli (1970). Les échantillons sont traités par du tampon de reprise [Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2 % (P/V), β -mercaptoéthanol 5 % (V/V), bleu de bromophénol 0,01 % (P/V), sucrose 10 %]. Les protéines sont chauffées 3 mn au bain-marie à 100°C. La migration des protéines s'effectue en 2 temps. Une première migration dans un gel de concentration est réalisée à 20 mA pendant 30 à 60 mn, elle est suivie d'une deuxième migration dans le gel de séparation à 5 mA pendant 16 à 20 h. Ceci aboutit à la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Toutes ces opérations sont effectuées en utilisant le tampon de migration [Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM (P/V), SDS 0,1 %]. De manière à évaluer la masse moléculaire des différents constituants des échantillons, une comigration de protéines de masse moléculaire connue [phosphorylase B (94 kDa), albumine (67 kDa), ovalbumine (45 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur de trypsine (20 kDa), lactalbumine (14,4 kDa)] est réalisée.

II-3.2 Révélation

- Coloration du gel

Le gel est coloré au bleu de Coomassie R 250 à 0,1 % (P/V), dans de l'isopropanol 25 % (V/V), acide acétique 10 % (V/V), pendant 2 h puis décoloré à l'acide acétique 10 %.

- Fluorographie

Dans le cas de l'étude de matériel protéique radioactif, la révélation s'effectue par impression d'une émulsion photographique par les rayonnements β émis. Le gel, coloré au bleu de Coomassie comme précédemment, est traité par l'Amplify (Amersham) pendant 30 mn sous agitation. Le gel séché sur papier Whatman est mis en contact avec une plaque photographique (Kodak) préalablement exposée à un éclair de lumière orange diffuse (filtre Wratten 21 et papier Royal X-O mat de Kodak). L'exposition s'effectue pendant 1 à 3 semaines à -70°C .

II-3.3 Transfert électrophorétique des protéines

Selon la technique de Towbin *et al* (1979), après électrophorèse en gel de polyacrylamide dans les conditions précédemment décrites, le gel est équilibré pendant 10 mn dans le tampon de transfert [Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 17 %, SDS 0,01 %, pH 8,3]. Les protéines sont transférées sur une membrane d'Immobilon-P (Millipore) dans une cuve de transfert (Biorad) contenant le même tampon grâce au passage d'un courant de 250 mA pendant 5 h. Les protéines sont ensuite colorées de façon réversible dans un mélange contenant 1 ml de noir amide à 0,1 % (P/V) dans une solution de méthanol 45 %, acide acétique 10 % pour 100 ml de TBS, puis décolorées par des lavages dans du TBS.

III- Méthodes immunologiques

Les études immunologiques sont réalisées avec les anticorps anti-MPII (polyclonal, Dhainaut-Courtois *et al.*, 1987 et monoclonal, Porchet-Henneré *et al.*, 1988, sous forme de liquide d'ascite ou de surnageant de culture pur). Il s'agit des anticorps dirigés contre la métalloprotéine retrouvée dans les granulocytes II de *N. diversicolor*.

III-1 Immunodétection des protéines après transfert sur immobilon-P (Western Blot)

Après transfert des protéines sur membrane d'Immobilon-P, les sites de fixation libres de la membrane sont saturés par incubation de la membrane sous agitation, pendant 1 h à température ambiante dans le tampon TBS/Tween/lait [Tris/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05 % (P/V), lait écrémé en poudre (Gloria) 5 % (P/V)]. La membrane

est ensuite incubée pendant 2 h à température ambiante ou 1 nuit à 4°C en présence de l'anticorps monoclonal anti-MPII sous forme de liquide d'ascite dilué au 1/250 dans du tampon TBS/Tween (Tris/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05 %). Quatre lavages dans du TBS/Tween permettent d'éliminer les anticorps non fixés. Un anticorps secondaire réalisé chez la souris et contenant des anti-immunoglobulines G+M de souris (Pasteur diagnostics) couplées à la peroxydase (dilué au 1/5000 dans du TBS/Tween) est additionné. L'incubation dure 2 h à température ambiante. L'activité peroxydasique est révélée en incubant la membrane dans une solution contenant comme substrat le 4-chloro-1-naphtol à 0,3 % dissous dans 3 ml de méthanol, le tout dilué dans 50 ml de TBS et 10 µl d'eau oxygénée (Sigma) à 30 %. La réaction est arrêtée en plaçant la membrane dans de l'eau distillée.

III-2 Immunoprécipitation

- Utilisation de l'anticorps monoclonal

L'échantillon à immunoprécipiter est mis en contact pendant 2 h avec 5 µl de liquide d'ascite pur anti-MPII, le tout dilué dans 500 µl de TBS contenant du Triton X100 0,01 %, Phényl-Méthyl-Sulfonyl Fluoride (PMSF) 0,2 mM, additionné de 40 µl de Tris/HCl 0,75 M pH 8,8. Parallèlement, 5 mg de protéine-A-Sepharose 4B sont gonflés pendant 15 mn dans du tampon TBS pH 7,4 à 4°C. Après une centrifugation rapide à 1 000 g de manière à précipiter les billes de protéine A-sépharose, plusieurs lavages sont effectués avec le même tampon. Après 2 h d'incubation, la protéine A-sépharose est additionnée. L'ensemble est mis en incubation 1 nuit à 4°C sous agitation. Une centrifugation rapide permet d'obtenir le surnageant correspondant à la fraction immunosupprimée, le complexe formé par la sépharose protéine-A-anticorps-antigène constituant le culot. Les protéines immunoprécipitées ainsi que l'anticorps sont dissociés de la protéine A par traitement du complexe par 50 µl de tampon de Laemmli (IV-3.1) et chauffage à 100°C pendant 3 mn. Une dernière centrifugation rapide permet de séparer la protéine A-sépharose de l'éluat.

- Utilisation d'anticorps polyclonaux

5 mg de protéine-A-Sepharose 4B sont gonflés pendant 15 mn dans du tampon TBS pH 7,4. Après une centrifugation rapide (5 mn) à 1 000 g, de manière à précipiter la protéine A, plusieurs lavages sont effectués avec le même tampon. A la protéine-A sont additionnés 50 µl de PBS et 5 µl de l'anticorps polyclonal pur. L'ensemble est incubé à la température du laboratoire pendant une heure. L'échantillon à immunoprécipiter est ensuite mis en contact avec la protéine A-sépharose et l'anticorps, successivement une heure à la température du laboratoire puis une nuit à 4°C. Après l'incubation, une centrifugation rapide permet d'obtenir le surnageant correspondant à la fraction immunosupprimée. Le complexe formé (protéine-A-anticorps-antigène) est traité de la même façon que dans le cas de l'anticorps monoclonal.

Les difficultés liées aux problèmes de libération et de visualisation de la synthèse de la MPII nous ont amenés à envisager cette étude, non plus au niveau de la détection et de la quantification de la MPII nouvellement synthétisée, mais au niveau de l'expression du gène codant la MPII. Dans ce cas, ce sont les ARNm qui sont détectés.

II- Etude de l'expression du gène de la MPII

Sur des tissus fixés, congelés et coupés au cryostat, les réactions d'hybridation ont été réalisées en utilisant comme sonde le fragment d'ADNc de 250 pb, appelé sonde MPII, obtenu par la méthode PCR. La sonde MPII a été marquée soit au ^{35}S , soit à la digoxigénine.

II-1 Localisation des cellules exprimant le gène de la MPII

Les études relatives à la détermination du site de synthèse de la MPII ont été effectuées sur des animaux non immunisés.

II-1.1 Localisation en *hybridation in situ* des cellules contenant l'ARNm codant la MPII

L'examen microscopique de coupes de métamères ayant subi la technique d'hybridation *in situ* en utilisant la sonde MPII marquée soit au ^{35}S soit à la digoxigénine a révélé la présence d'un marquage au niveau d'un massif cellulaire d'une taille est supérieure à 200 μm qui semble être libre dans le cœlome (Planche 4, fig. b; Planche 5, fig. c). Par contre, aucun signal n'a été détecté dans les G I libres dans le cœlome (Planche 4, fig. c) et dans les G I localisés autour du massif cellulaire (Planche 4, fig. b). De plus, il a été observé un marquage mais cette fois uniquement avec la sonde radioactive au niveau des muscles obliques et longitudinaux situés de part et d'autre de la chaîne nerveuse (Planche 5, figs a et b)

En résumé, nous avons pu déceler deux sites distincts contenant les ARNm spécifiques de la MPII : l'un au niveau d'un massif cellulaire situé dans la cavité cœlomique, l'autre dans la musculature. Par contre, les G I qui avaient été initialement identifiés comme étant le lieu de synthèse de la MPII (Porchet-Henneré, 1987) ne semblent pas contenir d'ARNm spécifiques de la MPII.

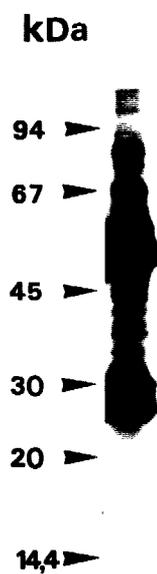


Figure. 33 Analyse électrophorétique en milieu dénaturant (SDS en présence de β -mercaptoéthanol) sur gel de polyacrylamide en gradient continu 5-25 % d'acrylamide des anticorps polyclonal anti-MPII (témoin négatif pour les expériences d'immunoprécipitation).

III-3 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Le test est réalisé sur plaque Falcon 3912 de 96 puits. Par puits, 100 μ l d'échantillon à tester sont déposés et laissés à température ambiante pendant 3 h, puis la solution antigénique est récupérée. Les sites non spécifiques sont saturés par 200 μ l de tampon TBS/Tween 20 (TT) additionnés de sérum albumine bovine 2 % (P/V), pendant 1 h à 37°C. Après lavages avec 200 μ l de TT, 100 μ l d'anticorps anti-MPII monoclonal (surnageant non dilué) ou polyclonal (dilué au 1/250) sont déposés pendant 2 h à 37°C. Après plusieurs lavages dans du TT, 100 μ l d'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase [soit dirigé contre les IgG de souris (dans le cas d'utilisation d'un anticorps primaire monoclonal) ou contre des IgG de lapin (dans le cas d'utilisation d'un anticorps primaire polyclonal)] dilué au 1/1000 dans du TT sont additionnés. Après 2 h d'incubation et plusieurs lavages, la révélation est obtenue en ajoutant 100 μ l d'un tampon substrat ayant la composition suivante :

- Orthophenylenediamine	9 mg
- Tampon citrate 0,1 M, pH 5,5	25 ml
- H ₂ O ₂	16 μ l

Après 15-30 mn à 37°C, la réaction est arrêtée par addition de 100 μ l d'HCl 1 N. La lecture de la DO s'effectue à 490 nm sur un lecteur de plaques de type MR 250 (Dynatech).

III-4 Immunocytochimie en microscopie photonique

Des tronçons de corps de 2 à 3 métamères ou des culots de cellules libres du liquide coelomique sont prélevés et fixés dans du Bouin Hollande (additionné de 10% de HgCl₂). Les pièces sont incluses dans de la paraffine puis débitées en coupes de 7 μ m et collées à l'albumine (ovalbumine au demi avec du glycérol). Les lames sont conservées à température ambiante à l'abri de la poussière. La technique d'immunopéroxydase indirecte a été utilisée. Après déparaffinage, les coupes sont traitées de la façon suivante :

- Immersion dans du Tampon Coons (NaCl 150 mM, véronal sodique 100 mM, pH 7,2) pendant 15 mn.
- Incubation avec l'anticorps primaire monoclonal anti-MPII (sous forme de surnageant de culture) pendant 1 nuit à température ambiante, sous atmosphère humide.
- 2 lavages de 10 mn dans le tampon Coons.
- Incubation 90 mn avec l'anticorps secondaire (IgG de lapin anti-IgG de souris conjugués à la peroxydase de Raifort ; Pasteur Diagnostics) dilué au 1/40 dans du tampon Coons.
- 2 lavages de 10 mn dans le tampon Coons.
- Révélation de l'activité peroxydasique par son oxydation grâce à une solution contenant 40 mg de 4-chloro-1-naphtol dissous dans 5 ml d'éthanol, le tout

dilué dans 100 ml de Tris/HCl 0.1 M pH 7,6. Deux cent microlitres d'eau oxygénée (Sigma) à 30 % sont ajoutés à l'ensemble.

- La réaction est arrêtée par immersion des lames dans de l'eau distillée.
- Les lames sont ensuite montées dans un mélange glycérine/Coons (9/1).

IV- Méthodes de biologie moléculaire

IV-1 Extraction des acides ribonucléiques (ARN) totaux

IV-1.1 Précautions indispensables

Il est crucial d'utiliser de la vaisselle et des solutions dépourvues de RNAses. Pour cela, un traitement des solutions tampons au diéthylpyrocarbonate (DEPC) est réalisé. Les solutions sont ensuite gardées dans des récipients et tubes à usage unique ou dans de la vaisselle dite "RNase free".

-Traitement de la vaisselle : 2 h à 200°C

-Traitement des solutions : préparation des produits "RNase free" avec de l'eau pour préparation injectable (PPI : eau pyrolysée à 900°C) ou avec de l'eau traitée au DEPC à 0,1 % pendant 12 heures. Dans ce dernier cas, le DEPC réagissant avec les résidus adénines des ARN, on l'élimine par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

-Traitement des plastiques (cônes, tubes eppendorfs): pendant 12 h dans de l'alcool 96° avec 0,1 % DEPC, puis autoclavage dans les mêmes conditions que précédemment.

-L'isolement des ARN s'effectue constamment avec des gants de latex stériles pour éviter les contaminations par des RNAses exogènes.

IV-1.2 Préparation des ARN totaux

La technique employée est celle d'Ullrich *et al.* (1977) modifiée par Chirgwin *et al.* (1979) utilisant l'isothiocyanate de guanidine. Ses principales étapes sont exposées ci-dessous :

IV-1.2.a Etape d'homogénéisation

Les cellules obtenues selon le protocole décrit en I-3, mais sans passage sur tamis, sont remises en suspension dans 5 ml d'une solution dénaturante (tampon GT) d'isothiocyanate de guanidium (10 ml/g), puis homogénéisées à température ambiante à l'aide d'un homogénéiseur de type Dounce.

- Composition du tampon GT:

- | | |
|---------------------------------------|-------------|
| - Isothiocyanate de guanidine (Fluka) | 4 M |
| - Citrate de sodium (Sigma), pH 7,2 | 25 mM |
| - N-Lauryl sarcosyl de sodium (Sigma) | 0,5 % (P/V) |
| - β-mercaptoéthanol (Sigma) | 0,1 M |

IV-2 Synthèse des brins codants des acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc)

Pour la synthèse des 1^{ers} brins d'ADNc, 10 μ g d'ARN totaux et 0,5 μ g d'oligo dT₁₅ contenant un site de restriction Bam HI en position 5' sont repris dans du TE pour obtenir un volume final de 10 μ l. Après 10 mn à 70 °C, on ajoute au mélange :

- dNTP 10 mM	1,5 μ l
- DTT 0.1 M	3 μ l
- Inhibiteur de RNase RNasine, GIBCO-BRL)	1 μ l
- Tampon de réaction 5X	4 μ l

Après 2 mn à 37°C, 18 unités de transcriptase réverse (M-MLV-RT: GIBCO-BRL) sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 30 mn à 37°C. Cette étape est renouvelée dans les mêmes conditions. Après action de la transcriptase réverse, l'hydrolyse de l'ARN est obtenue par l'action pendant 10 mn du tampon (40 μ l) de composition :

- NaOH	0,7 M
- EDTA	45 mM

Finalement l'ADNc est précipité à l'éthanol pendant 1 nuit à -20°C. Une centrifugation à 12 000 g pendant 15 mn à 4°C permet de récupérer l'ADNc qui est remis en suspension dans 2,5 μ l de TE 7,5. L'ADNc ainsi obtenu servira de matrice pour la PCR.

IV-3 Synthèse d'une queue poly (A) en 3' du 1er brin d'ADNc

L'addition d'une queue poly dA sur le 1er brin d'ADNc (obtenu dans notre expérience à partir d'un oligonucléotide spécifique MPII) est réalisée en utilisant la terminale transférase selon le protocole suivant :

Après 20 mn d'incubation à 37°C dans le mélange

- 2 μ l ADNc repris par TE
- 6 μ l tampon 5x : DTT 1 M
- Cacodylate de potassium 0,5 M, MgCl₂ 10 mM, pH 7,2
- 2 μ l dATP 10 mM
- 15 U terminale transférase (Boehringer-Mannheim)

la réaction est arrêtée par addition de 2 μ l d'EDTA 0,5 M pH 8. Une extraction au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol (Maniatis *et al.*, 1982) permet de récupérer l'ADNc muni de la queue poly (A). Celui-ci est repris par 2,5 μ l de TE 7,5 et servira de matrice pour la PCR.

IV-4 Amplification enzymatique par la réaction en chaîne avec la DNA polymérase de *Thermophilus aquaticus* (Polymerase Chain Reaction ou PCR)

IV-4.1 Amorces

La synthèse des oligonucléotides utilisés comme amorces pour la PCR a été réalisée par Eurogentec (Liège).

IV-4.2 Purification des oligonucléotides

Après synthèse, les oligonucléotides sont séchés à l'évaporateur concentreur SVH2000 (Savant). Le culot obtenu est solubilisé dans 100 μ l d'eau distillée. La purification consiste à séparer l'oligonucléotide complet de ses intermédiaires de synthèse. Pour cela, à un volume de solution sont additionnés deux équivalents de formamide déionisée (Sigma). L'ensemble est dénaturé 3 mn à 90°C, puis déposé sur un gel d'acrylamide à 20 % (bis acrylamide 0,53 % en urée 0,7 M). La migration s'effectue sous un voltage constant de 350 V dans le tampon TBE 1x. La migration de l'échantillon est arrêtée lorsque le front de migration, indiqué par le bleu de bromophénol déposé en parallèle, atteint les 2/3 du gel.

La bande correspondant aux oligonucléotides de taille attendue est détectée par son absorbance en ultra-violet (260 nm) en mettant le gel en contact avec une plaque de chromatographie couche mince de silice contenant un marqueur fluorescent (Merck, Darmstadt, RFA). Elle est ensuite découpée puis est éluée sous agitation dans du tampon TE 8 pendant 12 h à 37°C.

Les oligonucléotides sont séparés de l'éluat par chromatographie en phase réverse sur colonne "Elutip-d" commercialisée par Scheicher et Schuell (Dassel, Allemagne) en utilisant le protocole recommandé par le fabricant et dont le principe de base est décrit dans Sambrook *et al.* (1990). Ils sont ensuite concentrés par précipitation.

IV.4-3 Réaction d'amplification

-Réaction

La réaction est réalisée dans un volume final de 100 μ l, contenant 2 μ l d'ADNc ou d'ADNc queue poly (A) dans un tampon comprenant :

- 50 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 0,01 % gélatine (P/V)
- 100 μ M de chaque dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 2 μ M des deux amorces.

Le mélange est soumis à une dénaturation de 4 mn à 90°C, de manière à éviter les appariements des bases, puis 2 unités de Taq polymérase (Perkin-Elmer Cetus) sont

additionnées. Soixante-quinze microlitres d'huile minérale (Perkin-Elmer Cetus) sont ajoutés au-dessus du mélange pour éviter l'évaporation.

-Condition d'amplification

L'échantillon est soumis à 30 cycles d'amplification sur un appareil Thermojet (Eurogentec), chaque cycle comprenant :

- une dénaturation à 94°C pendant 1 mn
- une hybridation à x°C, x étant spécifique de chaque amorce, pendant 1,5 mn
- une élongation à 72°C pendant 1,5 mn.

En fin de réaction, une phase de 5 mn à 72°C est réalisée, elle permet de s'assurer que l'élongation des brins en cours est achevée. La température d'hybridation est calculée selon la méthode : $T = 2x(A+T) + 4x(C+G) - 5^\circ\text{C}$.

-Vérification de l'amplification

Dix microlitres de la réaction de PCR sont déposés en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire sur un gel d'agarose à 1,1 % en tampon TBE ou TEA 1x. Les produits de PCR et le marqueur sont visualisés sous ultra-violet à 304 nm après coloration au bromure d'éthidium, puis photographiés (Maniatis *et al.*, 1982).

IV-5 Clonage des produits de PCR

Le clonage est réalisé en utilisant les deux sites de restriction introduits dans les amorces. Le choix du vecteur s'est porté sur le plasmide pUC 13 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suède) possédant le gène de résistance à l'ampicilline (AMP) ainsi que le fragment du gène lac Z. Ces 2 systèmes seront utilisés pour sélectionner les bactéries transformées par un plasmide recombiné [plages blanches en présence de 5-bromo-4 chloro-3 indolyl-β galactoside (X-Gal) et d'isopropyl- β-D thio-β galactopyranoside (IPTG)] (Sambrook *et al.*, 1989). La transformation du vecteur recombiné est réalisée dans la souche bactérienne *E. coli* RR1 ΔM15 (RR 1, lac Z ΔM 15, F' lac I q ΔM15, pro A) (ATCC 35102).

IV-5.1 Préparation des produits de PCR

Après avoir éliminé l'huile minérale, le produit de réaction de PCR est extrait au phénol/chloroforme, puis au chloroforme, ce qui permet d'éliminer la Taq polymérase. L'ADN est récupéré par précipitation à l'éthanol puis remis en suspension dans 10 μl de TE.

IV-5.2 Réaction de digestion enzymatique

La double digestion avec des enzymes spécifiques est effectuée avec les tampons spécifiques et aux températures indiquées par le fabricant (Boehringer-Mannheim).

<u>1ère réaction</u> :	- produit de PCR	6-8 μ l
	- tampon 10X	2 μ l
	- enzyme de restriction	2 U
	- H ₂ O	20 μ l

Le temps de réaction est de 2 h ou plus.

Une deuxième digestion étant nécessaire, une précipitation à l'éthanol (Maniatis *et al.*, 1982) est réalisée de manière à éliminer le tampon spécifique de la première enzyme.

2ème réaction : - après précipitation, le produit est repris par 10 μ l de TE_{7,5} puis digéré selon le protocole classique (1ère réaction).

Notons qu'en parallèle le vecteur pUC 13 (purifié selon le principe décrit en IV-6.2) est également digéré par les deux mêmes enzymes pour permettre le clonage.

-Vérification de la digestion

Après chaque digestion, celle ci est contrôlée en déposant un aliquot sur gel d'agarose 1,1 % en TBE 1x (Maniatis *et al.*, 1982).

-Purification du produit digéré

Etant donné que dans certains cas d'amplification plusieurs bandes d'ADN sont présentes, il est nécessaire de purifier, après la digestion, le fragment d'intérêt avant de procéder à la ligation. La purification a lieu sur gel d'agarose 1,1 % en TEA 1x. Après estimation de la quantité d'ADN, la bande d'agarose contenant le fragment à cloner, est découpée puis mise dans un tube eppendorf en élution passive contre 1 ml de TE. Après une nuit à 37°C sous agitation, l'agarose est éliminé par une centrifugation de 15 mn à 12 000 g. L'ADN contenu dans l'éluat est extrait au phénol/chloroforme puis au chloroforme et finalement précipité à l'éthanol.

Pour le vecteur, la réalisation de cette purification a pour but d'obtenir le plasmide linéarisé et ainsi d'augmenter l'efficacité de la ligation avec l'ADN à cloner.

IV-5.3 Ligation

Elle est obtenue de l'insert au vecteur en utilisant la DNA ligase du bactériophage T4 qui catalyse la formation de liens phosphodiester entre les extrémités 5'-phosphate et 3'-hydroxyle des extrémités à bouts collants. Il est établi que, pour obtenir une efficacité maximale de ligation, le rapport insert/vecteur doit être égal ou proche de 3 en tenant compte de la taille du vecteur et de celle de l'insert. Après estimation des quantités de vecteur et d'insert, les concentrations respectives sont ramenées à la valeur adéquate pour respecter le rapport de 3. Le protocole utilisé est celui décrit par Sambrook *et al.* (1989):

Réaction:

- fragment de PCR digéré
- pUC 13 linéarisé
- tampon de ligation 10X 3 μ l
- ATP 10 mM 3 μ l
- DTT 10mM 3 μ l
- ligase T4 DNA 1 U
- H₂O qsp 30 μ l

Le tampon de ligation 10X est fourni avec l'enzyme (Pharmacia). La réaction de ligation s'effectue une nuit à 12°C.

IV-5.4 Introduction du plasmide dans les bactéries

IV-5.4.a Bactéries utilisées

La transformation du plasmide recombiné est réalisée dans la souche bactérienne *E. coli* RR1 Δ M15 (RR1, lac Z Δ M15, F'lac I ϕ Δ M15, proA) (ATCC 35102). Elle est cultivée dans le milieu LB (III-1.2) à 37°C, température optimale de croissance, et en milieu gélosé selon la méthode décrite en III-1.3. L'ensemencement des bactéries s'effectue à partir d'une colonie isolée. Une préculture d'une nuit sert d'ensemencement (1/50) à la culture proprement dite.

IV-5.4.b Technique d'électroporation

-Préparation des bactéries

500 ml de milieu LB préalablement chauffés à 37°C sont ensemencés (1/50) à partir d'une préculture d'une nuit d'*E. coli*. Lorsque la DO à 600 nm atteint la valeur de 0,5, la culture est refroidie dans de la glace pendant 30 mn puis centrifugée à 2 000 g pendant 15 mn. Le culot de bactéries est remis en suspension dans 250 ml d'HEPES (N-[2-hydroxyethyl] piperazine- N'-[2-ethane sulfonic acid])-HCl 1 mM pH 7,4 glacé puis de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot obtenu est dissous dans 125 ml de la solution d'HEPES-HCl. Une centrifugation identique à la précédente permet de récupérer les bactéries qui sont reprises dans 20 ml d'un mélange eau-glycérol 10 % prérefroidi à 4°C. Après une dernière centrifugation à 2 800 g pendant 10 mn, le culot bactérien est repris par 1 ml d'eau-glycérol 10 % glacé, puis aliquoté par 50 μ l et finalement congelé rapidement dans un mélange carboglace/éthanol. Les bactéries ainsi préparées sont conservées à -70°C jusqu'à leur utilisation.

-Transformation

L'électroporation est basée sur l'application d'une impulsion électrique brève de haut voltage permettant la perméabilisation temporaire des bactéries, et ainsi l'entrée du plasmide recombiné. Après la ligation, 10-20 μ l de la réaction de ligation contenant le plasmide sont incubés pendant 1 mn avec 40 μ l de bactéries préparées spécialement pour

l'électroporation. Le mélange est "électroporé" dans des cuvettes de 0,2 cm à électroporation (Eurogentec, Liège) dans les conditions recommandées par le fabricant : 2500 V, 40 μ F, 192 Ω . Immédiatement après l'impulsion, 1 ml de LB est ajouté et l'ensemble est incubé 1 h à 37°C. Les bactéries transformées sont étalées à raison de 100 μ l/boîte sur milieu gélosé additionné de 50 μ g/ml d'AMP, 0,01 % d'XGal et 0,5 M d'IPTG.

Après 1 nuit à 37°C, les colonies de bactéries transformées par un plasmide recombiné, apparaissent sous forme de colonies blanches. Celles-ci sont récupérées individuellement à l'aide d'un cure-dent stérile, puis mises en culture 1 nuit à 37°C, de manière à amplifier le plasmide pour pouvoir réaliser une préparation d'ADN plasmidique et vérifier la présence de l'insert après digestion enzymatique appropriée.

IV-5.4.c Technique au CaCl₂

-Préparation des bactéries

A 500 ml de LB est additionné 1 ml d'une préculture d'une nuit d'*E. coli* à 37°C. Lorsque la DO (600 nm) de la culture atteint 0,3 en moins d'1 h, celle-ci est refroidie sur glace, puis centrifugée à 2 000 g pendant 15 mn à 4°C. Le culot bactérien est repris par 25 ml de MgCl₂ 0,1 M prérefroidi une nuit à 4°C. Immédiatement après, il est soumis à une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. Les bactéries sont reprises par 0,5 ml de CaCl₂ 0,1 M toujours prérefroidi à 4°C. L'ensemble est placé sur la glace pendant 1-4 h. Les bactéries ainsi préparées sont dites "compétentes".

-Transformation

Aux 10-20 μ l de mélange de ligation sont ajoutés 80-90 μ l de tampon de transformation et 100 μ l de cellules compétentes. L'ensemble est placé 15 mn sur glace puis un choc thermique (3 mn à 42°) est réalisé. Le choc thermique provoque permettant la pénétration du plasmide dans les bactéries. Immédiatement après le choc, 800 μ l de LB sont additionnés et le mélange est incubé 1 h à 37°C sous agitation. Les bactéries transformées sont déposées, à raison de 100 μ l/boîte, sur milieu gélosé contenant les facteurs de sélection (50 μ g/ml d'AMP, 0,01 % d'Xgal et 0,5 M d'IPTG).

La récupération des colonies transformées par le plasmide recombiné est identique à celle de la transformation par électroporation.

IV-6 Préparation d'ADN plasmidique

IV-6.1 Mini-préparation

Deux millilitres d'une préculture d'*E. coli* transformée d'une nuit, sont centrifugés 5 mn à 12 000 g, les bactéries sont reprises successivement par 300 μ l de tampon 1 (Tris/HCl pH 8, 50 mM ; EDTA 10 mM ; RNase 400 μ g/ml) puis par 300 μ l de tampon 2 (NaOH 200 mM ; SDS 1 %).

L'ensemble est agité manuellement et délicatement puis incubé 5 mn à température ambiante. Cette étape permet la dénaturation des protéines. Après cette étape, 300 μ l d'un tampon potassium pH 8) sont ajoutés sous agitation douce provoquant la précipitation de l'ADN chromosomique qui est éliminé par une centrifugation de 15 s. Le plasmide contenu dans le surnageant est extrait au phénol/chloroforme, puis finalement précipité à l'isopropanol.

IV-6.2 Préparation en masse

Cent millilitres de culture d'*E. coli* transformée sont centrifugés à 3 000 g pendant 15 mn. Les bactéries sont lavées plusieurs fois dans du TNE (Tris/HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 %), puis remis en suspension dans 10 ml de TTE (Tris/HCl 100 mM pH 8, Triton X-100 5 %, EDTA 50 mM pH 8). La lyse des bactéries est obtenue par addition de 2 mg/ml de lysozyme pendant 30 mn. La réaction enzymatique est arrêtée par dénaturation des protéines à 100°C pendant 2-3 mn. Les débris bactériens sont éliminés du surnageant par centrifugation à 8000 t/mn pendant 15 mn. L'addition de 1,45 g de CsCl et de 0,2 mg de bromure d'éthidium (BET) pour 1,4 ml de surnageant et une centrifugation de 3000 t/mn pendant 5 mn, permettent de séparer le surnageant de la solution de Triton. L'ADN plasmidique est récupéré sélectivement par ultracentrifugation à 45000t/mn (rotor VTI) pendant 8 h sur gradient de CsCl (1,55 g/ml) dans un tube "quick seal". Le plasmide, visualisé sous forme d'une bande rose, est prélevé à l'aide d'une aiguille. Le BET est éliminé par 3 extractions (V/V) avec du N-butanol saturé par de l'eau distillée. Le plasmide purifié est finalement précipité à l'isopropanol.

IV-7 Séquençage par la méthode de Sanger et Coulson (1977)

Cette méthode est basée sur l'incorporation d'acide didéoxyribonucléique de manière aléatoire dans un brin d'ADN en synthèse, provoquant une fin de chaîne spécifique. Le séquençage d'ADN double brin utilise des dNTP dont un est marqué au ^{35}S en position α pour permettre l'autoradiographie des fragments. Le kit de séquençage (Sequenase, Pharmacia) utilise la DNA polymérase du phage T7, l'amorce "universel" du phage T7 et "revers" du phage M 13. Les échantillons de chacune des réactions sont déposés sur gel de polyacrylamide 5 % (Acrylamide-bis acrylamide 19:1 contenant 7M d'urée en TBE) préalablement chauffé par passage du courant 30 mn à 60 W. La migration des échantillons s'effectue toujours à la même puissance. Après l'électrophorèse, le gel est traité pour être autoradiographié selon le protocole décrit dans Sambrook *et al.* (1990).

IV-8 Méthodes d'analyse des acides nucléiques

IV-8.1 Extraction de l'ADN des cellules cœlomiques

La préparation des cœlomocytes est semblable à celle relatée en II-3 sans passage sur tamis. L'extraction de l'ADN est réalisée. Les principales étapes sont exposées ci-dessous :

- Les cellules congelées sont broyées dans un mortier contenant 5 ml de TNE et 0,5 ml de SDS 10 % en présence d'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre, en évitant toute décongélation. Le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant 15 mn. Les protéines sont éliminées par traitement au phénol/chloroforme, puis au chloroforme. La précipitation à l'éthanol absolu de l'ADN est instantanée et forme des fibres qui sont récupérées autour d'une pipette Pasteur, puis séchées.

- Traitement de l'ADN extrait :

L'ADN, repris dans du Tris/HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM (TE 8), est soumis successivement à l'action de RNAses : 100 µg/ml (dépourvues de DNAses grâce à un traitement à 100°C pendant 10 mn) pendant 90 mn à 37°C, puis à celle de la protéinase K à 500 ng/ml, SDS 1 % pendant 2 h 30 à 37°C. Les protéines dénaturées par ce traitement sont éliminées par deux extractions phénol/chloroforme, chloroforme. L'ADN est récupéré après une précipitation à l'éthanol, puis dialysé contre du TE pendant 24 h.

- Purification par ultracentrifugation en gradient de CsCl :

Le but de cette purification est d'éliminer d'éventuels polysaccharides contaminant l'ADN. A l'ADN est additionné du CsCl (1,2 g/ml). L'ensemble est déposé sur un coussin de CsCl (1,55g/ml), puis ultracentrifugé à 30 000 g (SW 40 Beckman) pendant 48 h. L'ADN, qui apparaît sous forme d'une bande, est récupéré puis dialysé contre du TE pour éliminer toutes traces de CsCl

IV-8.2 Southern Blot

Après la séparation électrophorétique de l'ADN, digéré ou non, sur gel d'agarose 1,1 % en TBE, le gel est traité de la façon suivante :

- HCl 250mM pendant 10 mn, puis lavage à l'eau distillée
- dénaturation pendant 45 mn par immersion du gel dans une solution NaOH 0,5 N, NaCl 1 M.
- neutralisation pendant 1h par une solution de NaCl 1,5 M, Tris/HCl 0,5 M pH 7

L'ADN est transféré sur membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) pendant 18 h par flux passif (10x SSC, 1x SSC= NaCl 0,15 M, Na acétate 0,015 M) selon la technique décrite par Southern (1975). La membrane est ensuite rincée dans du 2x SSC, puis

séchée. La fixation de l'ADN est rendue irréversible par cuisson à 80°C pendant 2 h. La membrane est conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.

IV-8.3 Extraction des ARNm poly A+

L'extraction des ARN poly A+ est réalisée en utilisant le kit de microextraction (Quick Prep Micro mRNA purification Kit) vendu par la firme Pharmacia. Les avantages de cette méthode sont sa standardisation et le fait que les sources potentielles de RNAses sont limitées. La préparation des cœlomocytes est la même que celle relatée en II-3 à l'exception près que l'on ne filtre pas sur tamis, et en tenant compte des précautions nécessaires pour éviter les contaminations par les RNAses .

IV-8.4 Northern Blot

Les ARN (5 µg de poly A+ ou 30 µg de totaux) sont déposés sur gel d'agarose 1,2 % en tampon MOPS et en présence de formaldéhyde.

-Préparation de l'échantillon

L'ARN est traité de la façon suivante:

- ARN
- tampon MOPS 5X(Acide 3[N-morphilino]-propéinésulfonique, pH 7, 0,1 M ; acétate de sodium 40 mM ; EDTA 5 mM) 2 µl
- formaldéhyde 3,5 µl
- formamide 10 µl
- H₂O qsp 20 µl

L'échantillon est dénaturé par chauffage 15 mn à 65°C, puis immédiatement placé sur glace et finalement repris par 2 µl de tampon de reprise de composition :

- glycérol 50 %
- EDTA pH 8 1 mM
- acétate de sodium 40 mM
- bleu de bromophénol 0,25 %
- xylène cyanol FF 0,25 %

- Electrophorèse

L'échantillon est déposé sur gel d'agarose 1,2 % en tampon MOPS 1X ayant subi au préalable une migration de 5 mn à 5 V/cm. La migration s'effectue à 3-4 V/cm.

- Transfert sur membrane de nylon

Après l'électrophorèse, le gel d'agarose est rincé 2 fois par 200 ml de 10x SSC. L'ARN est transféré sur une membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) par flux

passif de 10x SSC pendant 6-18 h. La membrane est ensuite rincée 5 mn dans 6x SSC à température ambiante. Les ARN sont fixés définitivement par cuisson (2 h à 80°C).

IV-8.5 Dot-Blot

La technique consiste à déposer directement les ARN sur la membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) sous forme de spots.

- Préparation des ARN

Les ARN (1 μg de poly A+ ou 30 μg de totaux) sont repris par 2 μl de tampon composé de 3 volumes de la solution 1 (formamide 500 μl , formaldéhyde 162 μl , MOPSx5 200 μl) auxquels, après chauffage 5 mn à 65°C, est additionné de 1 volume de 20xSSC froid.

- Préparation de la membrane

L'échantillon est déposé sous forme de spots (1-2 μl). La membrane est ensuite cuite 2h à 80°C (fixation des ARN) puis conservée à 4°C.

IV-8.6 Marquage de la sonde

La sonde d'ADNc est marquée à l'aide du kit "random priming" (Boehringer) ayant comme principe le multiamorçage au hasard. Le protocole utilisé est celui recommandé par le fabricant, en utilisant comme enzyme le fragment klenow de la DNA polymérase I d'*E. coli*, les dNTPs dont l'un, le dCTP est marqué au ^{32}P en position α (3000 Ci/mmol) et des hexanucléotides statistiques comme amorces pour l'enzyme. Les sondes marquées ont une activité spécifique très élevée (10⁹ cpm/ μg ADN). A l'issue du marquage, la sonde est précipitée à l'éthanol. (Maniatis *et al.*, 1982).

IV-8.7 Hybridation moléculaire

La technique se fait en deux étapes : la préhybridation qui permet de réduire la fixation non spécifique de la sonde, puis l'hybridation proprement dite.

- Préhybridation

La membrane est incubée à 42°C pendant au minimum 2 h dans une solution de composition :

- 6x SSC

- 1x Solution Denhardt

100x solution Denhardt :

Sérum albumine bovine (SAB)	2 g
polyvinylpyrrolidone	2 g
Ficoll	2 g
H ₂ O	qsp 100 ml

- SDS 0,5 %

- 100 mg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé (ADNss).

- Hybridation

L'hybridation avec la sonde s'effectue à 42°C en présence de formamide pendant 18 h dans un tampon de composition :

- 6x SSC
- 1x solution de Denhardt
- 0,5 % SDS
- 100 µg/ml ADNss
- 50 % formamide.

- Lavages et exposition

Cette étape a pour but de décrocher la sonde fixée de façon non spécifique. Pour cela, 2 facteurs sont pris en considération : la température et la salinité. La membrane est ensuite lavée successivement dans du : 2x SSC, 0,1 % SDS, 30 mn à température ambiante ; 2xSSC, 0,1 % SDS, 30 mn à 45°C ; 1x SSC, 0,1 % SDS, 30 mn à température ambiante ; 1xSSC, 0,1 % SDS, 30 mn à 45°C ; 0,1x SSC, 0,1 % SDS, 15 mn à température ambiante.

La membrane est séchée puis mise en exposition sur film Hyperfilm MP (Amersham) à -70°C en présence de deux écrans intensifiants (Dupont de Nemours) pendant une durée de 1 à 7 jours.

V- Hybridation moléculaire *in situ*

L'hybridation *in situ* (HIS) consiste à reconnaître une séquence spécifique d'acide nucléique donné (ADN ou ARN), en utilisant comme sonde une séquence d'acide nucléique de base complémentaire. Cette technique permet d'identifier et de localiser une séquence donnée d'acide nucléique au sein d'un tissu ou d'une population cellulaire, en utilisant une sonde dans laquelle a été incorporé un marqueur identifiable.

V-1 Précautions liées à la présence de RNAses

Pour éviter la présence et l'action de RNAses au cours des expériences d'HIS, des précautions très rigoureuses semblables à celles décrites pour l'extraction des ARN (VI-1.1) sont nécessaires.

V-2 Préparation du matériel histologique

Des tronçons de corps de 2 à 3 métamères ou des culots de cellules libres du liquide coelomique sont prélevés et fixés pendant 4 h à 4°C dans du paraformaldéhyde à 4 %

en tampon phosphate 0,2 M pH 7,2. Les pièces sont ensuite lavées à 4°C dans du tampon phosphate 0,2 M pH 7,2 contenant 15 % de sucrose, incluses dans un cryoprotecteur (Tissue-Tek), puis plongées dans du méthyl-2-butane refroidi à l'azote liquide. Les blocs sont ensuite conservés à -70°C jusqu'à la réalisation des coupes. Les pièces, sectionnées au cryostat en coupes transversales de 10 μ m d'épaisseur, sont récupérées sur des lames gélatinées (gélatine 10 %, alun de chrome 10 %). Ces lames peuvent ensuite être conservées plusieurs semaines à -70°C jusqu'à leur utilisation.

V-3 Marquage de la sonde

La sonde utilisée est une sonde d'ADNc obtenue à partir de l'ARN messager spécifique de la MPII. La quantité de sonde utilisée en HIS étant faible, 100 ng de sonde seulement sont marqués.

V-3.1 Marquage avec un nucléotide radioactif

Le marquage est réalisé avec le kit de multiamorçage au hasard ("random priming", Boehringer Mannheim) en utilisant comme nucléotide radioactif le ^{35}S dATP en position α et le fragment klenow de la polymérase I comme enzyme. Après le marquage, la sonde est précipitée à l'éthanol. Elle peut être ainsi conservée plusieurs semaines à -20°C (demi-vie 87,2 jours).

V-3.2 Marquage avec un nucléotide non radioactif

Le marquage de la sonde est réalisé en utilisant le kit "DNA non-radioactive labeling and detection" commercialisé par Boehringer Mannheim. Le protocole est basé sur le principe de multiamorçage au hasard, en utilisant un nucléotide marqué à la digoxigénine et le fragment de klenow de l'ADN polymérase I comme enzyme. Après le marquage, la sonde est précipitée à l'éthanol et peut être conservée plusieurs mois à -20°C.

V-4 Protocole d'hybridation

V-4.1 Préhybridation

Cette étape consiste à préparer les coupes pour l'hybridation avec la sonde. Les lames sorties du congélateur sont mises durant 1 h à température ambiante.

-Préhybridation pour sonde radioactive

Les lames sont plongées dans 2 bains (10 mn puis 45 mn) de préhybridation (4xSSC, 1x solution Denhardt). Une acétylation est ensuite réalisée afin de réduire le bruit de fond. Les lames sont plongées 10 mn dans un bain de :

- 4x SSC	100 ml
- triéthanolamine ajusté à pH 8	1,3 ml
- Anhydride acétique (ajouté extemporanément)	250 μ l

Les coupes sont déshydratées par 4 bains rapides d'éthanol absolu et séchées 4 h à l'air à l'abri de la poussière.

-Préhybridation pour sonde non radioactive

Cette étape est réduite à 2 bains de 30 mn dans du 2x SSC. Les coupes ne sont pas déshydratées.

V-4.2 Hybridation

-Pour sonde radioactive

La sonde est dénaturée 5 mn à 100°C dans un tampon d'hybridation de composition :

- 4x SSC
- 50 % formamide
- Tampon phosphate 120 mM
- 1x solution de Denhardt
- 1x Sarcosyl
- DTT 100 mM

Vingt-cinq microlitres de tampon d'hybridation contenant 0,5 ng de sonde sont déposés sur chaque coupe. Les lames sont ensuite placées à 42°C pendant 18 h en chambre humide.

-Pour sonde non radioactive

La sonde est dénaturée 5 mn à 100°C dans un tampon d'hybridation de composition :

- 4x SSC
- 50 % formamide
- 1x solution de Denhardt
- 1x sarcosyl
- 0,1 % SDS
- 5 % agent bloquant du kit sonde froide ou 100 mg/ml ADNss

Vingt-cinq microlitres de tampon d'hybridation contenant 5 ng de sonde sont déposés sur chaque coupe. Les lames sont ensuite placées à 42°C pendant 18 h, en chambre humide.

V-4.3 Lavages

Ils ont pour but de décrocher la sonde fixée de façon non spécifique. Pour cela, on fait varier 2 facteurs : la température et la salinité.

-Pour la sonde radioactive

- 4 x SSC, DTT 10mM, rinçage rapide
- 1 x SSC, 10 mn à température ambiante
- 1 x SSC, 45 mn à température ambiante
- 1 x SSC, 10 mn à 42°C
- 1 x SSC, 45 mn à 42°C
- 0,1 x SSC, 10 mn à température ambiante

Après les lavages, les lames sont déshydratées par passage rapide dans 4 bains d'éthanol absolu, puis séchées à l'air.

-Pour la sonde non radioactive

- 2 x SSC 0,1 % SDS, 30 mn à température ambiante
- 2 x SSC 0,1 % SDS, 30 mn à 42°C
- 1 x SSC 0,1 % SDS, 30 mn à température ambiante
- 1 x SSC 0,1 % SDS, 30 mn à 42°C
- 0,1 x SSC 0,1 % SDS, 15 mn à température ambiante.

Après les lavages, les coupes ne sont pas déshydratées.

V-5 Détection du signal**V-5.1 Signal radioactif**

L'hybride [sonde marquée-ARNm] émet un rayonnement β , capable d'impressionner une émulsion photographique. La technique utilisée est l'autoradiographie, méthode qui permet d'obtenir des images compatibles avec l'observation au microscope. Elle se fait en trois étapes: dépôt de l'émulsion, révélation, coloration des lames

Les lames sont plongées dans une émulsion liquide (LM1, Amersham) puis séchées verticalement à l'abri de la lumière. Elles sont stockées 2 à 3 semaines dans une boîte étanche contenant un dessiccateur (gel de silice). Pour la révélation, les lames sont plongées 5 mn dans le révélateur (D19, Kodak) puis lavées 10 mn dans l'eau courante et 2 fois 5 mn dans l'eau distillée. Finalement les lames sont colorées au bleu Azur II (1 ‰) et montées dans du Xam.

V-5.2 Signal non radioactif

L'hybride [sonde marquée à la digoxigénine-ARNm] est révélé en utilisant le kit de détection "DNA non-radioactive labeling and detection" commercialisé par Boehringer Mannheim. Le principe est basé sur l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la digoxigénine, puis d'un second anticorps dirigé contre le premier, marqué à la phosphatase alcaline. L'ensemble des produits, prêts à l'emploi, est contenu dans le kit.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson R.S.**, 1980. Hemolysins and hemagglutinins in the coelomic-fluid of a polychaeta annelid *Glycera dibranchiata*. *Biol. Bull.*, **159**, 259-268.
- Anderson R.S. et Cook M.L.**, 1979. Induction of lysozyme-like activity in the hemolymph and hemocytes of an insect, *Spodoptera eudania*. *J. Invert. Pathol.*, **33**, 197-203.
- Ando K., Okada M. et Natori S.**, 1987. Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *Biochemistry*, **26**, 226-230.
- Ashok K.R.**, 1976. Ultrastructure of the larval hemocytes of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera : Gelechiidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, **5**, 187-195.
- Baert J.-L. et Slomianny M.-C.**, 1987. Heterosynthetic origin of the major yolk protein, vitellin, in a Nereid *Perinereis cultrifera* (Polychaeta annelid). *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B**, 1191-1199.
- Baratte B., van Minnen J., Masson M., Dhainaut-Courtois N.**, 1990. Immunocytochemical localization of FMRF-amide-like material in three Polychaete Annelids Nereidae (*Nereis diversicolor*; *Nereis virens* et *Perinereis cultrifera*). *C. R. Acad. Sci, sér. III*, **311**, 495-500.
- Baskin G.**, 1974. The coelomocytes of Nereid polychaetes. *Contemp. Topics Immunol.*, **4**, 55-64.
- Berger S.L. et Kimmer A.R.**, 1987. Guide to molecular cloning techniques. In *Methods in enzymology*, Abelson J.N. & Simon M.I., Eds, Acad Press, Orlando, **152**.
- Bertout M.**, 1976. Action de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur les synthèses d'acides nucléiques au cours de la spermatogenèse. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **282**, 1613-1626.
- Bertout M. et Dhainaut A.**, 1971. Etude cytochimique et autoradiographique de l'ovogenèse de *Nereis diversicolor* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles et en absence d'hormone cérébrale. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **17**, 371-387.
- Boilly B.**, 1974. Mode d'action du cerveau sur la régénération caudale de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). *Wilhelm Roux' Archiv.*, **174**, 195-204.
- Boman H.G., Faye I., Gudmundson G.H., Lee J.Y. et Lindholm D.A.**, 1991. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.*, **210**, 23-31.
- Boman H.G., Faye I., von Hofsten P., Kockum K., Lee J.-Y., Xanthopoulos K.G., Bennich H., Enstrom A., Merrifield R.S. et Andreu D.**, 1985. One of the primary structure of lysozyme, cecropins and attacins from *Hyalophora cecropia*. *Dev. Comp. Immunol.*, **9**, 551-558.
- Boman H.G., Nilsson-Faye I., Paul K. et Rasmuson T.**, 1974. Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect. Immun.*, **10**, 136-145.

- Bradford M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
- Brehélin M., Hoffmann J.A., Matz G. et Porte A.**, 1975. Encapsulation of implanted foreign bodies by hemocytes in *Locusta migratoria* and *Melolontha melolontha*. *Cell Tissue Res.*, **160**, 283-289.
- Brien P.**, 1961. Eléments de Zoologie, Notions d'anatomie comparée Tome II. Cœlomates Invertébrés, 1-714.
- Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Shimer S. et Cerami A.**, 1986. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1670.
- Cenini P.**, 1983. Comparative studies on haemagglutinins and haemolysins in an annelid and a primitive crustacean. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 159-164.
- Chateaufreynaud-Duprat P.**, 1971. Etude des réactions de défense de nature humorale chez le lombricien *Eisenia fetida*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **273**, 1647-1649.
- Chateaufreynaud-Duprat P. et Izoard F.**, 1973. Etude des mécanismes de défense chez *Lumbricus terrestris*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **276**, 2859-2862.
- Chateaufreynaud-Duprat P. et Lestage J.**, 1980. Etude *in vitro* des diverses fonctions des leucocytes de *Lumbricus terrestris* dans les réactions immunitaires. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **291**, 889-892.
- Chateaufreynaud-Duprat P., Laulan A., et Lestage J.**, 1983. Apparition de l'immunité cellulaire et humorale dans le règne animal. Modèle du Lombric., **81**, 159-164.
- Chateaufreynaud-Duprat P., Lestage J. et Izoard F.**, 1981. Some functions of *Lumbricus* leukocytes in protection mechanisms. In Aspects of developmental and comparative immunology, Solomon J.P., Ed., Pergamon Press, New York, pp. 11-16.
- Cheng T.C. et Rodrick G.E.**, 1974. Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam *Mya arenaria*. *Bull.*, **147**, 311-320.
- Cheng T.C., Rodrick G.E., Foley D.A. et Koehler S.A.**, 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, **25**, 261-265.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J. et Rutter W.J.**, 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.*, **18**, 5294-5299.
- Çotuk A. et Dales R.P.**, 1984. Lysozyme activity in the cœlomic fluid and cœlomocytes of the earthworm *Eisenia fetida* Sav. in relation to bacterial infection. *Comp. Biochem. Physiol.*, **78A**, 469-474.
- Dales R.P.**, 1979. Defense of Invertebrates against bacterial infections. *J. Royal Soc. Med.*, **72**, 688-696.
- Dales R.P.**, 1982. Haemagglutinins and haemolysins in the body fluids of *Neoamphitrite figulus* and *Arenicola marina* (Annelida Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.*, **73**, 663-668.

- Dales R.P. et Dixon L.R.J.**, 1980. Responses of polychaete annelids to bacterial infection. *Comp. Physiol.*, **67**, 391-396.
- Dales R.P. et Dixon L.R.J.**, 1982. Polychaetes. *In* Invertebrate blood cells. Ratcliffe N.A. & Rowley A.F., Eds, Acad. Press New York, **I**, pp. 35-74.
- Demuynck S.**, 1992. Identification des métalloprotéines (myohémérythrine et hémoblogine) liant le cadmium chez l'annélide polychète endobenthique *Nereis diversicolor*. Distribution tissulaire et cinétique du métal en conditions expérimentales. Thèse d'Université, Lille, 1-48.
- Demuynck S., Sautière P., Van Beeumen J. et Dhainaut-Courtois N.**, 1991. Homologies entre les hémérythrines des sipunculien et une métalloprotéine complexant le cadmium (MP II) d'une annélide polychète, *Nereis diversicolor*. *C. R. Acad. Sci.*, **312**, 317-322.
- Dennaï N., Dhainaut-Courtois N., Bouquegneau J.M. et Nejmeddine A.**, 1986. Effets du cadmium et du mercure sur un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F.Müller). Mécanismes de détoxification. *C. R. Acad. Sci.*, **302**, 489-494.
- Dhainaut A.**, 1966a. Etude ultrastructurale de l'évolution cytoplasmique au cours des premiers stades de l'ovogenèse chez *N. pelagica*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **262**, 2616-2619.
- Dhainaut A.**, 1966b. Etude ultrastructurale de l'évolution cytoplasmique chez *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète) à l'approche de la maturité sexuelle. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **262**, 2740-2743.
- Dhainaut A.**, 1967. Etude de la vitellogenèse chez *N. diversicolor* par autoradiographie à haute résolution. *C. R. Acad. Sci Paris*, **265**, 434-436.
- Dhainaut A.**, 1968. Etude par autoradiographie à haute résolution de l'élaboration des mucopolysaccharides acides au cours de l'ovogenèse de *Nereis diversicolor*. *J. Microscopie*, **7**, 1075-1080.
- Dhainaut A.**, 1970. Contribution à l'étude de la gamétogenèse des Néréidiens dans les conditions naturelles et en absence d'hormone cérébrale. Thèse Doct. Sci. Nat. Lille.
- Dhainaut A.**, 1984. Aspects cytophysiologiques des cœlomocytes de Néréidiens (Annélides Polychètes). *Arch. Anat. microsc. Morph. exp.*, **73**, 133-150.
- Dhainaut A. et Porchet M.**, 1977. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *P. cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. II. Etude autoradiographique des ovocytes jeunes. *Biol. Cell.*, **28**, 233-240.
- Dhainaut A. et Porchet-Henneré E.**, 1988. Haemocytes and cœlomocytes. *Microfauna marina*, **4**, 215-230.
- Dhainaut A., Raveillon B., M'Béri M., Porchet-Henneré E. et Demuynck S.**, 1989. Purification of an antibacterial protein in the cœlomic fluid of *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta). Similitude with a cadmium-binding protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94C**, 555-560.
- 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, Sciences Naturelles, Lille, 191 p.

- Dhainaut-Courtois N., Demuyneck S. et Salzet-Raveillon B.,** 1991. Mécanismes de détoxification chez les poissons et invertébrés marins. *Oceanis*, **17**, 403-419.
- Dhainaut-Courtois N., Dubois M.-P., Tramu G., Masson M.,** 1985. Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annelida polychaeta) of substance immunologically related to vertebrate neuropeptides. *Cell Tissue Res.*, **242**, 97-108.
- Dhainaut-Courtois N. et Golding D.W.,** 1978. Nervous System. In The ultrastructure of Polychaeta, Westheide W. & Hermans C.O., Eds, *Microfauna Marina*, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York, **4**, pp. 89-110.
- Dhainaut-Courtois N., Nejmeddine A., Baert J.-L. et Dhainaut A.,** 1987. Localisation immunocytochimique en microscopie électronique d'une protéine complexant le cadmium chez un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **305**, Sér. III, 237-241.
- Dimarcq J.L., Zachary D., Hoffmann J.A., Hoffmann D., Reichart J.M.,** 1990. Insect immunity : expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterin, in *Phormia terranova*. *EMBO J.*, **9**, 2507-2515.
- Dimarcq J.L., Keppi E., Dunbat B.,** 1988. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible anti-bacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino acid sequence of the predominant member, dipterin A. *Eur. J. Biochem.*
- Durchon M.,** 1956. Influence du cerveau sur les processus de régénération caudale chez les Néréidiens. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, **94**, 1-9.
- Durchon M.,** 1967. Rôle du système nerveux dans la régénération chez les Annélides. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **92**, 319-331.
- Durchon M. et Boilly B.,** 1964. Etude ultrastructurale de l'influence de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur le développement des ovocytes de *Nereis diversicolor* (Annélide Polychète) en culture organotypique. *C. R. Acad. Sci.*, **155**, 504-506.
- Eckelbarger, K.J.,** 1976. Origin and development of the amoebocytes of *Nicolea zostericola* (Polychaeta : Terebellidae) with a discussion of their possible role in oogenesis. *Mar. Biol.*, **36**, 169-182.
- Engström A., Engström P., Tao S.J., Carlsson A. et Bennich H.,** 1984. Insect immunity, the primary structure of the antibacterial protein attacin F and its relation of two native attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, **3**, 2065-2070.
- Engström A., Xanthopoulos K.G., Boman H.G. et Bennich H.,** 1985. Amino acid and xDNA sequences of lysozyme from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, **4**, 2119-2122.
- François J.,** 1975. L'encapsulation hémocytaire expérimentale chez le lépisme *Thermobia domestica*. *J. Insect Physiol.*, **21**, 1535-1546.
- Fitzgerald S.W. et Ratcliffe N.A.,** 1983. Evidence for the presence of subpopulation of *Arenicola marina* coelomocytes identified by their selective responses toward Gram+ and Gram- Ve bacteria. *Develop. Comp. Immunol.*, **6**, 23-34.
- Friedman M.M. et Weiss L.,** 1982. The leukocytic organ of the megascolecid earthworm *Emynthas diffringens* (Annelida, Oligochaeta). *J. Morphol.*, **174**, 251-258.

- Gagen S.J. et Ratcliffe N.A.**, 1976. Studies on the *in vivo* cellular reactions and fate of injected bacteria in *Galleira mellonella* and *Pieris brassicae*. *J. Invert. Pathol.*, **28**, 17-24.
- Grassé P.P., Poisson R. et Tuzet O.**, 1961. Précis de Zoologie Tome I, Invertébrés, 1-739.
- Gruart V., Truong M.-J., Plumas J., Zandecki M., Kusnierz J.-P., Prin L., Vinatier D., Capron A. et Capron M.**, 1992. Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. *Amer. Soc. Hematol.*
- Gurisch M.F., GHildyal N., Arm J., Austen K.F., Avraham S., Reynolds D., Stevens R.L.**, 1991. Cytokine mRNA are preferentially increased relative to secretory granule protein mRNA in mouse bone marrow-derived mast cells that have undergone IgE-mediated activation and degranulation. **146**, 1527-1533.
- Hall J.L. et Rowlands D.T.**, 1974a. Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physiochemical characterization. *Biochemistry*, **13**, 821-827.
- Hall J.L. et Rowlands D.T.**, 1974b. Heterogeneity of lobster agglutinins. II. Specificity of agglutinin-erythrocyte binding. *Biochemistry*, **13**, 828-832.
- Hammarstrom S. et Kabat E.A.**, 1969. Purification and characterization of a blood group A reactive hemagglutinin from the snail, *Helix pomatia* and a study of its combining site. *Biochemistry*, **8**, 1696-1705.
- Hardy S.W., Grant P.T. et Fletcher T.C.**, 1977. The haemagglutinin in the tissue fluid of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, with specificity for sialic acid residues in glycoproteins. *Experientia*, **33**, 767-769.
- Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T. et Boman H.G.**, 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, **106**, 7-16.
- Hultmark D., Engström A., Anderson K., Steiner H., Bennich H., et Boman H.G.**, 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, **2**, 571-576.
- Hultmark D., Engström A., Bennich H., Kapur R. et Boman H.G.**, 1982. Insect immunity. Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. *Eur. J. Biochem.*, **127**, 207-217.
- Jeong K.H. et Heyneman K.**, 1976. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata* : morphology and behavior of granulocytic cells *in vitro*. *J. Invert. Pathol.*, **28**, 357.
- Jollès J. et Jollès P.**, 1985. The lysozyme from *Asterias rubens*. *Eur. J. Biochem.*, **54**, 19-23.
- Keppi E., Dimarcq J.-L., Lambert J., Zachary D., Reichhart J.-M., Hoffmann D., Keller R. et Hoffmann J.**, 1986. Recherches sur les mécanismes de défense antibactérienne chez les Insectes : isolement de peptides antibactériens dans l'hémolymph du Diptère *Phormia terranova*. *C. R. Acad. Sc. Paris, Sér. III*, **303**, 155-159.
- Keppi E., Pugdey A.P., Lambert J., Wicker C., Dimarcq J.-L., Hoffmann J.A., et Hoffmann D.**, 1989. Mode of action of dipterin A, a bactericidal peptides induced in the hemolymph of *Phormia terrenovae* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **10**, 229-239.

- Klippenstein G.L., Cote J.L. et Ludlam S.E.**, 1976. The Primary structure of myohemerythrin. *Biochemistry*, **15**, 1128-1136.
- Lackie A.M.**, 1981. Humoral mechanisms in the immune response of insect larvae of *Hymenolepis diminuta* (Gestoda). *Parasit. Immunol.*, **3**, 201-208.
- Laemli U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lassalle F. et Lassègues M.**, 1986. Humoral defences on earthworms : lysozyme and yellow pigment. *Immun. Biol.*, **173**, 231.
- Lassalle F. et Lassègues M.**, 1988. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. IV. Evidence, activity induction and purification of *Eisenia fetida* lysozyme (Annelidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B**, 187-192.
- Lassègues M., Roch Ph. et Valembois P.**, 1989. Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid : specificity of the induced activity. *J. Invert. Pathol.*, **54**, 28-31.
- Linthicum D.S., Stein E.A., Marks D.H. et Cooper E.L.**, 1977. Electron microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Tissue Res.*, **185**, 315-330.
- Loehr J.S., Lammers P.J., Brimhall B. et Hermodson M.A.**, 1978. In *Primary structure of myohemerythrin from the Annelid Nereis diversicolor*, Takagi T. & Cox J.A., Eds, *FEBS Lett.*, **285**, 25-27.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.**, 1982. *Molecular cloning.*
- M'Béri M.**, 1988. Dégranulation des coelomocytes au cours des réactions immunitaires d'un Invertébré marin : *Nereis diversicolor* (Annélide Polychète). Caractérisation des coelomocytes d'après leurs récepteurs membranaires, identification et rôle biologique des produits extrudés. Thèse d'Université,
- Metalnikow S.**, 1924. Phagocytose et réactions des cellules dans l'immunité. *Ann. Inst. Pasteur*, **38**, 787-826.
- Metalnikow S.**, 1927. L'infection Microbienne et l'Immunité chez la Mite des Abeilles *Galleria mellonella*. Monograph. Institut Pasteur, Masson, Ed., Paris, 140 p.
- Metchnikoff E.**, 1983. Lectures on the comparative pathology of inflammation. English translation by F.A. and E.H. Starling. Dover Press, New York, 1968.
- Morhig W., Messner B.**, 1968. Immunoreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Factor in humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. *Biol. Zentrallblatt*, **87**, 439-469.
- Natori S.**, 1977. Bactericidal substance induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *J. Insect Physiol.*, **23**, 1169-1174.
- Nejmedddine A., Dhainaut-Courtois N., Baert J.-L., Sautière P., Fournet B., et Boulenguer P.**, 1988. Purification and characterization of a cadmium-binding protein from *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.*, **89C**, 321-326.
- Okada M. et Natori S.**, 1983. Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem. J.*, **211**, 727-734.

- Okada M. et Natori S.**, 1984. Mode of action of a bactericidal protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem. J.*, **222**, 119-124.
- Okada M. et Natori S.**, 1985. Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *J. Biol. Chem.*, **160**, 7174-7177.
- Perin J.P. et Jolles P.**, 1972. The lysozyme from *Nephtys hombergii* (Annelid). *Biochim. Biophys. Acta.* **163**, 283-289.
- Porchet-Henneré E.**, 1969. Corrélations entre le cycle de la Coccidie *Cælotropha durchoni* et celui de son hôte *Nereis diversicolor* (Annélide polychète). *Z. Parasitenkunde*, **31**, 299-314.
- Porchet-Henneré E.**, 1990. Cooperation between different cœlomocyte populations during the encapsulation response of *Nereis diversicolor* demonstrated by using monoclonal antibodies. *J. Invert. Pathol.*, **56**, 1-9.
- Porchet-Henneré E., et M'Béri M.**, 1987. Cellular reactions of the Polychaete Annelid *Nereis diversicolor* against cœlomic parasites. *J. Invert. Pathol.*, **50**, 58-66.
- Porchet-Henneré E., M'Béri M., Dhainaut A. et Porchet M.** 1987a. Ultrastructural study of the encapsulation-response of the Polychaete Annelid *Nereis diversicolor*. *Cell Tissue Res.*, **248**, 463-471.
- Porchet-Henneré E., Nejmeddine A., Baert J.-L. et Dhainaut-Courtois N.**, 1987b. Selective immunostaining of type 1 granulocytes of the Polychaete Annelid *Nereis diversicolor* by a monoclonal antibody against a cadmium-binding protein (MP II).
- Ratcliffe N.A. et Gagen S.J.**, 1976. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vivo*: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Piereis brassicae* larvae. *J. Invert. Pathol.*, **28**, 373-382.
- Ratcliffe N.A. et Gagen S.J.**, 1977. Studies on the *in vivo*: cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell*, **9**, 73-85.
- Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W. et Rhodes C.P.**, 1985. Invertebrate Immunity : Basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.*, **97**, 183-350.
- Raftos D.A. et Cooper E.L.**, 1991. Proliferation of lymphocytes-like cells from the solitary tunicate, *Slyela clava* in response to allogeneic stimuli. *J. Exp. Zool.*, **160**, 391-400.
- Roch P. et Cooper E.L.**, 1991. Cellular but not humoral antibacterial activity of earthworms is inhibited by Aroclor 1254. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **22**, 283-290.
- Roch Ph., Valembos P., Lassègues M. et Cassand P.**, 1981. Protective activity of the coelomic fluid of a lumbricid *Eisenia fetida*. *Dev. Comp. Immunol.*, **5**, suppl. 1, 81-86.
- Rodrick G.E. et Cheng T.C.**, 1974. Activities of selected hemolymph enzymes in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *J. Invert. Pathol.*, **24**, 374-375.
- Rowley A.F. et Ratcliffe N.A.**, 1976. An ultrastructural study of the *in vivo* phagocytosis of *Escherichia coli* by the hemocytes of *Calliphora erythrocephala*. *J. Ultrastruct. Res.*, **55**, 193-202.

- Russell C.S., Rodriguez J. et Lai P.-S.**, 1983. Hemagglutinin activity by earthworm leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, **12**, 531-547.
- Russell V.W. et Dunn P.E.**, 1990. Lysozyme in the pericardial complex of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, **20**, 501-509.
- Salzet-Raveillon B., Rendier-Delrue F., Dhainaut A.**, 1992. Detection of mRNA encoding an antibacterial metalloprotein (MP II) by *in situ* hybridization with a cDNA probe generated by Polymerase Chain Reaction in the worm *Nereis diversicolor*. *Cell. Molec. Biol.*, **39**, à paraître.
- Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T.**, 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition.
- Sakamaki K., Tomonoag M., Tsukui K. et Nagata S.**, 1989. Molecular cloning and characterization of a chromosomal gene for human eosinophil peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 16828.
- Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R.**, 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, **74**, 5463-5464.
- Scott M.T.**, 1971. Recognition of foreignness in invertebrates. II. *In vitro* studies of cockroach phagocytic haemocytes. *Immunol.*, **21**, 817-828.
- Septier F., Demuyneck S., Thomas P. et Dhainaut-Courtois N.**, 1991. Bioaccumulation de métaux lourds chez une annélide polychète estuarienne : *Nereis diversicolor*. *Oceanol. Acta*, **11**, 263-274.
- Shaw G. et Kamen R.**, 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.*, **46**, 659.
- Sminia T.**, 1974. Haemopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography. *Cell Tissue Res.*, **150**, 443-454.
- Sminia T. et Van der Knaap W.**, 1981. The internal defence system of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Develop. Comp. Immunol.*, **5**, Suppl. 1; Pergamon Press, pp. 87-97.
- Southern E.M.**, 1975. Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503.
- Stang-Voss Ch.**, 1971. Zur Ultrastruktur der Blutzellen wirbellose ser tiere. IV. Die Hämozyten von *Eisenia fetida* L. (Sav.) (Annelidae). *Z. Zellforsch.*, **117**, 451-462.
- Stein E.A. et Basch P.F.**, 1979. Purification and binding properties of hemagglutinin from *Biomphalaria glabrata*. *J. Invert. Pathol.*, **33**, 10-18.
- Stein E.A. et Cooper E.L.**, 1983. Inflammatory responses in annelids. *Amer. Zool.*, **23**, 145-156.
- Stein E.A. et Cooper E.L.**, 1988. *In vitro* agglutinin production by earthworm leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, **12**, 531-547.
- Stein E.A., Wojdani A. et Cooper E.L.**, 1982. Agglutinins in the earthworm *Lumbricus terrestris* : Naturally occurring and induced. *Dev. Comp. Immunol.*, **6**, 407-421.

- Steiner H., Hultmark D., Engström A., Bennich H. et Boman H.G., 1981.** Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, **292**, 246-248.
- Takagi T. et Cox J.A., 1991.** Primary structure of myohemerythrin from the annelid *Nereis diversicolor*. *FEBS*, **285**, 25-27.
- Thomas J. A., 1930.** Etude d'un processus néoplasique chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller dû à la dégénérescence des oocytes et quelquefois des soies. *Arch. Anat. Microsc.*, **XXVI**.
- Towbin H., Staehelin T. et Gordon J., 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350.
- Valembois P., 1971a.** Etude ultrastructurale des cœlomocytes du lombricien *Eisenia fetida* Sav. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **96**, 572.
- Valembois P., 1971b.** Origine et fonction des amœbocytes actifs au cours d'une xenogreffe de paroi du corps chez *Eisenia fetida* Sav. (*Lombricus*). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272**, 2097-2100.
- Valembois P., Roch Ph., Lassègues M. et Cassand P., 1982.** Antibacterial activity of the hemolytic system of *Eisenia fetida*. *J. Invert. Pathol.*, **40**, 21-27.
- Van der Knaap W.P.W., Bools A.M.H., van Asselt L.A. et Sminia T., 1983.** Specificity and memory in increased defence reactions against bacteria in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 435-443.
- Weil S.C., Rosner G.L., Reid M.S., Chisholm R.L., Farber N.M., Spitznagel J.K. et Swanson M.S., 1987.** cDNA cloning of human myeloperoxidase : Decrease in myeloperoxidase mRNA upon induction of HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2057.
- Yui M.A. et Bayne C.J., 1983.** Echinoderm immunology : bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol. Bull.*, **165**, 473-486.
- Yves M., Golvan J. et Mougeot G., 1973.** Mise en évidence des propriétés cytoadhérentes des cellules de l'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata* parasité par *Schistosoma mansoni*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **276**,
- Zachary D., Hoffmann D., 1984.** Lysozyme is stored in the granules of certain haemocytes types in *Locusta*. *J. Insect Physiol.*, **00**, 000-000.

