

50376
1993
246

50376
1993
246

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

N° d'ordre 1179

THESE

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

PAR

Thierry DUGIMONT



A RETOUR

CARACTERISATION DE NEUROPEPTIDES D'UN VER MARIN (*NEREIS DIVERSICOLOR*, ANNELIDE POLYCHETE) : APPROCHES IMMUNOLOGIQUE ET MOLECULAIRE

Présentée le 24 septembre 1993 devant la commission d'examen:

Président	M PORCHET, Professeur
Rapporteurs	D LEPRINCE, Chargé de Recherche CNRS J VAN MINNEN, Professeur
Examineurs	JC ANDRIES, Professeur JJ CURGY, Professeur

*à Ambre et sylvie
à mes parents
à mes amis*

Remerciements

J'exprime mes remerciements à Monsieur le Professeur M. Porchet de m'avoir accueilli avec confiance dans son laboratoire et par voie de conséquence, de m'avoir offert le premier contact avec le monde de la recherche. Qu'il soit également remercié pour l'honneur qu'il me fait en présidant mon jury.

Je suis très heureux et honoré de compter parmi les membres de mon jury le Dr. J. van Minnen avec qui nous entretenons une collaboration depuis le début de ma thèse. En me fournissant les anticorps et autres sondes oligonucléotidiques, il a permis la réalisation d'une grande part de ce travail. Qu'il en soit sincèrement remercié ainsi que nos autres collègues néerlandais, Dr. N.D. de With et Dr. A. Smit pour les fructueuses et aimables conversations que j'ai eues avec eux.

Je suis particulièrement honoré par la présence du Dr. D. Leprince qui a accepté d'être un des rapporteurs de cette thèse. Il m'a également offert la possibilité de poursuivre mon travail alors que je me situais dans une impasse. Puisse-t-il trouver à travers ces quelques lignes le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je suis grandement redevable à Monsieur le Professeur D. Stéhelin (Directeur du laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Institut Pasteur de Lille) pour m'avoir permis de travailler plusieurs mois dans son laboratoire. Sans cette autorisation je n'aurais pu réaliser une grande part des expériences de biologie moléculaire incluses dans ce mémoire. Je profite de ce dernier pour lui exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements s'adressent aussi à tous les membres de ce laboratoire qui m'ont à un moment ou à un autre aidé.

J'exprime ma sincère gratitude à Monsieur le professeur J.C. Andries qui a toujours suivi l'évolution de mon travail avec une grande disponibilité. Nous avons fréquemment discuté de conversations et de projets scientifiques dans un climat de confiance et de complicité. Puisse ce travail être le gage de ma sincère reconnaissance.

Il est très difficile de ne pas sombrer dans des écrits passionnels lorsque l'on veut remercier son directeur de thèse. Il ne faut pas non plus être trop banal, alors l'originalité est peut être la solution. Embarqués sur un même navire, nous avons essuyé les "mêmes tempêtes" et apprécié les "mêmes douceurs des îles". Le bateau est pratiquement ancré au port mais j'espère sincèrement que nous respirerons ensemble à nouveau l'air du large. Merci à vous Jean-Jacques, pour votre présence constante à mes cotés.

Je remercie Monsieur le Professeur A. Dhainaut pour la bienveillance dont il a fait preuve à mon égard, en me permettant d'achever mon travail au sein de son unité de recherche (ERS 20, laboratoire de phylogénie moléculaire des Annélides).

J'exprime ma sincère gratitude au Dr. E. Porchet-Henneré pour l'intérêt qu'elle a bien voulu m'accorder ainsi que pour l'ensemble des fructueux travaux réalisés sous sa tutelle durant l'année de mon D.E.A.

Je me dois de remercier très sincèrement M. Fikry et M. Masson qui ont réalisé un travail considérable de rédaction avec un dynamisme qui n'a d'égal que la bonne humeur avec laquelle elles ont contribué à la réalisation de ce manuscrit. L'aide technique et le soutien moral témoignés, notamment dans les derniers mois, ont été, croyez le, particulièrement appréciés.

Il me faut encore remercier A. Flourens pour la gentillesse et la disponibilité dont elle a fait preuve lors de mon stage dans le laboratoire d'oncologie moléculaire du Pr D. Stéhelin. J'adresse également mes remerciements au Dr. V. Laudet pour les nombreux avis et conseils toujours distillés avec une grande amabilité.

Mes remerciements seraient incomplets si je ne saluais pas toute personne ayant montré un intérêt à mon égard au cours de cette thèse, notamment Y. Himpens et D. Lazarecki.

Enfin, je remercie dans leur ensemble, mes collègues enseignant de biologie animale pour leur accueil et la confiance qu'ils me témoignent.

Publications

Dugimont T., Dhainaut-Courtois N., van Minnen J., de With N.D., and Curgy J.J. (1992a). Some polypeptides in the nervous system of the marine worm *Nereis diversicolor*, are related to the Sodium Influx Stimulating Peptide of the Pulmonate freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *General and Comparative Endocrinology*, **87**, 120-126.

Dugimont T., Guissi-Kadri S., and Curgy J.J. (1992b). Precursors of molecules related to mammalian opioid peptides in brain of a marine worm. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **39**, 300-307.

Porchet-Henneré E., and Dugimont T. (1992). Adaptability of the coccidian *Coelotropha* to parasitism. *Developmental and Comparative Immunology*, **16**, 263-274.

Porchet-Henneré E., Dugimont T., and Fischer A. (1992). Natural killer cells in a lower invertebrate, *Nereis diversicolor*. *European Journal of Cell Biology*, **58**, 99-107.

Participations aux congrès

Dugimont T. et Porchet-Henneré E. Isolement d'anticorps monoclonaux dirigés contre des coelomocytes de *Nereis diversicolor* (Annelide, Polychète). Présentation d'un poster et communication orale. XIIème Congrès des jeunes chercheurs, sophia-Antipolis, 6-10 juillet 1989.

Porchet-Henneré E., Dugimont T., Baert J.L., Masson M., and Dhainaut A. Cooperation between granulocytes during encapsulation response in *Nereis*. 5th ISDCI Congress, Portland, Oregon, USA, 4-9 august 1991.

ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BC	Bag cells
BCP	Bag cells peptide
BET	Bromure d'éthidium
CDC	Caudo-dorsal cells
CDCH	Caudo-dorsal cells hormone
CDCP	Caudo-dorsal cells peptide
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CPM	Coups par minute
CsCl	Chlorure de césium
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EDTA	Acide Ethylène diamine tétraacétique
ELH	Egg-laying hormone
FLRF	Phénylalanine-Leucine-Arginine-Phénylanine (Phe-Leu-Arg-Phe)
FMRF	Phénylalanine-Méthionine-Arginine-Phénylanine (Phe-Met-Arg-Phe)
H ₂ O ₂	Eau oxygénée
HCl	Acide chlorydrique
IPTG	Isopropyl thiogalactopyranoside
LiCl	Chlorure de lithium
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
NaCH ₃ COO	Acétate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Soude
NT	Nucléotides
PBS	Tampon phosphate salin
PBSi	PBS invertébré
PEG	Polyéthylèneglycol
PFU	Unité formant plage
PMSF	Phényl méthyl sulfonyl fluoride
SAB	Sérum albumine bovine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SISP	Sodium influx stimulating peptide
SNC	Système nerveux central
TCA	Acide trichloracétique
TEMED	N, N, N', N' tétraméthylène diamine
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl galactoside;

Acides Aminés	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

TAMPONS, MILIEUX et REACTIFS

Tampon Coons	Véronal sodique	100 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,2	
Tampon d'électrophorèse des protéines	Tris	25 mM
	Glycine	190 mM
	SDS	0,1 %
	pH 8,3	
Tampon Denhardt's	Ficoll	1%
	Polyvinylpyrrolidone	1%
	Serum albumine bovine	1%
Tampon de transfert des protéines	Tris	25 mM
	Glycine	190 mM
	Méthanol	10 %
	pH 8,3	
Tampon DNase RQ1	Tris-HCl pH 7,9	40 mM
	NaCl	10 mM
	MgCl ₂	6 mM
	CaCl ₂	0,1 mM
Tampon FTB	Tampon KMES	10 mM
	(KOH 10 mM pH 6,2 à 6,3 + MES* 10 mM)	
	RbCl	100 mM
	MnCl ₂	45 mM
	CaCl ₂	50 mM
	Héxamine cobalt trichloride	3 mM
	* Acide Morpholinoethane sulfonique	
Tampon Gluc TE	Glucose	50 mM
	Tris	20 mM
	EDTA pH 8	20 mM
Tampon G T	Isothiocyanate de guanidium	4,7 M
	Acétate de sodium	0,02 M
	Sarcosynate de sodium	0,5 %
	Tris-HCl	0,05 M
	β mercaptoéthanol	0,1 M

Tampon KAC	CH ₃ COOK	2,5 M
	CH ₃ COOH	2,5 M
	pH 5	
Tampon MOPS 10X	MOPS*	0,19 M
	CH ₃ COONa 2 M	25 ml
	EDTA 0,5 M	20 ml
	pH 7 avec NaOH 3M	
* Acide Morpholinopropane sulfonique		
Tampon PBS	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,2	10 mM
	NaCl	150 mM
Tampon PBSi	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,4	50 mM
	NaCl	0,56 M
Tampon SM	NaCl	100 mM
	MgSO ₄ , H ₂ O	8 mM
	Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
	Gélatine à 2%	0,01%
Tampon SSC 20X	NaCl	3 M
	C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ *	0,3 M
	pH 7	
* Citrate de sodium		
Tampon STE	Tris-HCl, pH 8	10 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA, pH 8	1 mM
Tampon STET	Sucrose	8%
	Tris, pH 8	80 mM
	EDTA, pH 8	25 mM
	Triton X100	0,5%
Tampon TAE	Tris	40 mM
	CH ₃ COOH glacial	1 ml
	EDTA, pH 8	1 mM
Tampon TBE	Tris	89 mM
	Acide borique	89 mM
	EDTA, pH 8	2 mM

Tampon TBS	Tris-HCl, pH 7,4 NaCl	50 mM 150 mM
Tampon TBSL	Tampon TBS additionné de Lait Gloria écrémé en poudre 5%	
Tampon TBST	Tampon TBS additionné de Tween 20 à 0,05%	
Tampon TE	Tris-HCl, pH 8 EDTA, pH 8	10 mM 1 mM
Tampon TMN	Tris-HCl pH 8 MgCl ₂ NaCl	50 mM 10 mM 10 mM
Tampon TNE	Tris-HCl, pH 8 NaCl EDTA pH 8	50 mM 100 mM 200 mM
Milieu de Barth	NaCl	88 mM
	KCl	1 mM
	Ca(NO ₃) ₂	0,33 mM
	CaCl ₂	0,41 mM
	MgSO ₄	0,82 mM
	NaHCO ₃	2,4 mM
Milieu LB	NaCl	0,5%
	Bactotryptone	1%
	Extrait de levure	0,5%
	pH 7,5	
Milieu LB agar	LB + agar	1,2% (phage)
	LB + agar	1,5% (plasmide)
"Top Agar"	LB + agarose	0,8%
Milieu 2XTY	NaCl	0,5%
	Bactotryptone	1,6%
	Extrait de levure	1 %
Bromure d'éthidium (BET)		10 mg/ml

Bleu de charge 6X	Bleu de bromophénol	0,25%
	Sucrose	40 %
	EDTA	6 mM
Mélange chloroformique	Chloroforme	24 V
	Alcool isoamylique	1 V
Phénol	8 Hydroxyquinoléine	0,1%
	β mercaptoéthanol	0,2%
	pH équilibré à 8 avec Tris 1 M	

Génotypes des souches bactériennes employées

JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi D(lac-proAB)</i> F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15</i>]
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i> F' [<i>proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)</i>]
PLKF'	<i>recA hsdR^{-M}⁺ mcrA⁻ mcrB⁻ lacZ supE44 galK2 galT22 metB1 hsdR2</i> (F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10(tet^R)</i>)
TG1	<i>supE hsdD 5 thiD (lac-pro AB)</i> F' (<i>tra D 36 pro AB⁺ lac I^q lacZDΔ M15</i>)
DH5α	<i>supE 44 Δlac U169 (Φ 80 lacZ ΔM15) hsdR 17 recA1 endA1</i> <i>gyrA 96 thi-1 relA1</i>

Résumé

Nous avons tenté, au cours de notre étude, de caractériser chez *Nereis diversicolor* (Annélide, Polychète) des neuropeptides apparentés, d'une part, au "Sodium Influx Stimulating Peptide"(SISP) mis en évidence chez la limnée, et d'autre part, à la dynorphine1-17 et à l' α -néo-endorphine, molécules membres de la famille des opioïdes, décrits chez les Mammifères. Les ARNm extraits du cerveau des animaux ont été traduits *in vitro* (lysate de réticulocytes de lapin) ou *in vivo* (ovocytes de *Xenopus laevis*). Pour chaque type de molécule (SISP et opioïdes), nous avons observé une adéquation satisfaisante concernant la reconnaissance, par les anticorps spécifiques utilisés, entre les polypeptides traduits dans les systèmes acellulaire et cellulaire et les protéines extraites du cerveau des animaux. L'ensemble des données obtenues est en faveur de l'existence chez *N. diversicolor*, de grands précurseurs (60 à 80 kDa) à partir desquels des produits actifs pourraient dériver.

Afin de compléter nos résultats, nous avons entrepris une approche moléculaire en élaborant une banque d'expression à partir des ARNm poly-A⁺ de cerveaux de néréis dans le vecteur λ ZAPII. La recherche de clones spécifiant une molécule apparentée au SISP a été effectuée à l'aide d'un criblage immunologique et à l'aide d'un criblage avec un ADNc codant le SISP chez la limnée. Les molécules sélectionnées par ces criblages ont été sous-clonées dans le plasmide pUC18, puis séquencées en phage M13mp18. Bien que toutes les données immunologiques nous indiquaient que des molécules de néréis pouvaient être apparentées au SISP de limnée, les séquences des inserts sélectionnés par les réactifs utilisés ne nous ont pas permis de confirmer ces données.

Des expériences de "RT-PCR" sur ARNm de cerveaux de néréis ont été réalisées pour tenter d'amplifier des fragments d'ADN montrant des homologies. Des sondes oligonucléotidiques ont été synthétisées à partir des séquences les moins dégénérées et les plus conservées du SISP de la limnée d'une part, et de la prodynorphine de trois Mammifères (Homme, porc, rat) d'autre part. Pour les deux types de molécules envisagées, des fragments d'ADN ont été amplifiés, sous-clonés dans le plasmide pCRII, puis séquencés. Les séquences obtenues sont discutées après les avoir confrontées aux données des banques.

SOMMAIRE

	page
INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
MATERIEL ET METHODES	11
I. Matériel biologique	11
II. Dissection et isolement des cerveaux	11
III. Etude des ARN du cerveau de <i>Nereis diversicolor</i>	11
III.1. Extraction des ARN	11
III.2. Préparation des ARN poly-A ⁺	12
III.2.1. Traitement des ARN par le chlorure de lithium	12
III.2.2. Sélection des ARNm poly-A ⁺	12
III.2.2.1. Préparation de la colonne oligo-dT	12
III.2.2.2. Préparation des échantillons d'ARN	13
III.2.2.3. Séparation des ARNm poly-A ⁺	13
IV. Traduction des ARNm en lysat de réticulocytes de lapin	13
IV.1. Traduction des ARNm en présence de méthionine ³⁵ S	13
IV.1.1. Protocole opératoire	13
IV.1.2. Evaluation du pouvoir informatif des ARNm en fonction de la radioactivité incorporée dans les protéines néosynthétisées	14
IV.1.2.1. Evaluation quantitative	14
IV.1.2.2. Evaluation qualitative	14
IV.2. Traduction des ARNm en présence de méthionine froide	15
V. Traduction des ARNm dans les ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	15
VI. Extraction des protéines ovocytaires	15
VII. Analyse des produits de traduction	16
VII.1. Electrophorèse	16
VII.1.1. Gel de séparation	16
VII.1.2. Gel de concentration	16
VII.1.3. Migration électrophorétique	17
VII.2. Transfert des produits de traduction, (technique du "Western blot")	17
VII.3. Immunodétection des produits traduits	17
VII.3.1. Anticorps dirigés contre le SISP de limnée	17
VII.3.2. Anticorps dirigés contre des opioïdes de Mammifères	18
VII.3.3. Caractérisation des produits traduits	18
VII.3.4. Test ELISA	19
VIII. Immunohistochimie sur coupes de cerveaux et métamères de <i>Nereis</i>	19
VIII.1. Préparation des tissus	19
VIII.2. Réaction immunohistochimique	20
IX. Extraction et purification de l'ADN de <i>N. diversicolor</i>	20

IX.1.	Extraction de l'ADN des cellules coelomiques	20
IX.2.	Purification de l'ADN en gradient de chlorure de césium	21
IX.3.	Digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction	21
IX.4.	Séparation électrophorétique de l'ADN génomique	22
IX.5.	Transfert des fragments de restriction sur membrane de nitrocellulose	22
X.	Elaboration d'une banque d'expression à partir d'ARN messagers de cerveaux de <i>N. diversicolor</i>	22
X.1.	Synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc)	23
X.2.	Synthèse du second brin d'ADNc	23
X.3.	Extraction de l'ADNc double brin	24
X.4.	Réalisation de "bouts francs" sur l'ADNc double brin	24
X.5.	Ligation des adaptateurs possédant le site <i>EcoRI</i>	24
X.6.	Phosphorylation des extrémités <i>EcoRI</i>	25
X.7.	Digestion par l'enzyme <i>XhoI</i>	25
X.8.	Sélection des ADNc en fonction de leur taille	25
	X.8.1. Préparation de la colonne de gel filtration	26
	X.8.2. Passage des ADNc au travers de la colonne	26
X.9.	Ligation des ADNc dans le vecteur λ ZAPII	26
X.10.	Empaquetage <i>in vitro</i> de l'ADN phagique recombiné	27
X.11.	Titration de la banque d'ADNc	27
	X.11.1. Obtention des bactéries perméables	27
	X.11.2. Etalement de la banque	28
	X.11.3. Amplification de la banque	28
	X.11.4. Détermination du pourcentage de clones recombinés	29
XI.	Criblage de la banque d'ADNc	29
XI.1.	Criblage immunologique	29
	XI.1.1. Epuisement des anticorps	30
	XI.1.2. Sélection des clones immunopositifs	30
XI.2.	Criblage à l'aide d'une sonde d'ADNc spécifiant le SISP chez la limnée	31
XII.	Production en grande quantité de phages sélectionnés	32
XII.1.	Vérification de la présence d'insert au sein des phages	32
	XII.1.1. Réalisation des "ministocks"	32
	XII.1.2. Préparation d'ADN phagique	32
	XII.1.3. Digestion des ADN phagiques	33
	XII.1.4. Analyse électrophorétique des ADN digérés	33
XII.2.	Préparation de gros stock d'inserts	33
XII.3.	Préparation des inserts	34
XIII.	Sous-clonage des inserts en plasmide pUC18	35
	XIII.1. Digestion du vecteur	35
	XIII.3. Préparation des bactéries compétentes	35

XIII.4. Transfection des plasmides recombinés	36
XIII.5. Etalement des mélanges de transfection	36
XIII.6. Vérification de la présence des inserts après extraction de l' ADN plasmidique	37
XIII.7. Préparation massive de plasmides recombinés	37
XIII.8. Elimination d'un segment du vecteur flanquant l'ADNc d'intêret	38
XIV. Cartographie de l'insert de 2,9 kbp	38
X.V. Sous-clonage des inserts en phage M13mpl8	39
XV.1. Digestion du fragment d'intêret	39
XV.2. Digestion du phage M13	39
XV.3. Ligation des fragments de digestion dans le phage M13	40
XV.4. Préparation des bactéries compétentes	40
XV.5. Transfection des phages recombinés	40
XV.6. Etalement des mélanges de transfection	40
XV.7. Préparation des matrices	40
XVI Marquage des sondes utilisées	41
XVI.1. Marquage de l'ADNc selon la technique dite de "random prime"	41
XVI.1.1. Protocole opératoire	41
XVI.1.2. Purification de la sonde	41
XVI.2. Marquage de l'ADNc selon la technique dite de "nick translation"	42
XVI.3. Marquage des sondes oligonucléotidiques	42
XVI.3.1. Protocole opératoire	42
XVI.3.2. Purification de la sonde	43
XVI.3.3. Evaluation du marquage	43
XVII. Hybridations moléculaires	43
XVII.1. Hybridation des inserts (ou des fragments amplifiés par PCR) sur l'ADN génomique de néréis	43
XVII.1.1. Préhybridation	43
XVII.1.2. Hybridation	43
XVII.1.3. Lavages de la membrane	44
XVII.2. Hybridation de sondes oligonucléotidiques synthétisées à partir du SISP de limnée	44
XVII.2.1. Calcul des conditions d'hybridation	44
XVII.2.2. Préhybridation	45
XVII.2.3. Hybridation	45
XVII.2.4. Lavages	45
XVIII. Amplification de séquence sur ARN extraits de cerveaux de <i>Nereis</i> (technique de RT-PCR : "Retro transcription - Polymerase Chain Reaction")	46
XVIII.1. Rétro-transcription	46
XVIII.2. Elaboration des amorces	46

XVIII.2.1.	Amorces élaborées à partir des séquences spécifiant la préprodynorphine chez diverses espèces: homme, porc et rat	46
XVIII.2.2.	Amorces élaborées à partir de la séquence spécifiant le SISP chez la limnée	47
XVIII.3.	Purification des amorces	47
XVIII.4.	Amplification de fragments d'ADN selon la technique de PCR	48
XVIII.5.	Clonage des produits amplifiés par PCR	48
XVIII.5.1.	Ligation des produits amplifiés dans le pCRII	49
XVIII.5.2.	Transformation des plasmides recombinés	49
XIX.	Séquençage des fragments d'ADN sélectionnés	50
XIX.1.	Séquençage des fragments d'ADN clonés dans le phage M13mp18	50
XIX.2.	Séquençage des fragments d'ADN clonés dans les plasmides pCRII et pUC18	50
RESULTATS		52
I.	Immunocytochimie	52
I.1.	Sur coupes de cerveau	52
I.2.	Sur coupes de métamères	52
II.	Extraction et caractérisation des protéines du cerveau de <i>Nereis</i> apparentées aux neuropeptides envisagés dans ce travail : SISP et opioïdes	52
III.	Traduction des ARNm de cerveau de <i>N. diversicolor</i>	53
III.1.	Caractéristiques et capacité informative des ARNm du cerveau de <i>N. diversicolor</i>	53
III.1.1.	Evaluation quantitative du pouvoir informatif des ARNm	53
III.1.2.	Evaluation qualitative du pouvoir informatif des ARNm	54
III.2.	Caractérisation de polypeptides apparentés au SISP de <i>L. stagnalis</i>	54
III.2.1.	Traduction des ARNm en lysat de réticulocyte de lapin	54
III.2.2.	Traduction des ARNm dans les ovocytes de <i>X. laevis</i>	54
III.3.	Caractérisation de polypeptides apparentés à la dynorphine 1-17 et à l' α -néo-endorphine de Mammifèrestraduits dans les ovocytes de <i>X.laevis</i>	55
III.3.1.	Séparation électrophorétique et immunotransfert	55
III.3.2.	Test ELISA	55
IV.	Elaboration d'une banque d'expression à partir des ARNm du cerveau de <i>Nereis</i>	56
IV.1.	Synthèse du 1er brin d'ADNc	56

IV.1.1.	Evaluation quantitative de la synthèse du 1er brin	56
IV.1.2.	Evaluation qualitative de la synthèse du 1er brin	57
IV.2.	Synthèse du 2ème brin d'ADNc	57
IV.2.1.	Evaluation quantitative de la synthèse du 2ème brin	57
IV.2.2.	Evaluation qualitative de la synthèse du 2ème brin	57
IV.3.	Réalisation de bouts francs sur les ADNc, ligation d'adaptateurs contenant le site <i>EcoRI</i> et phosphorylation des extrémités <i>EcoRI</i>	58
IV.4.	Sélection des ADNc en fonction de leur taille	58
IV.4.1.	Analyse quantitative	58
IV.4.2.	Analyse qualitative	58
IV.5.	Ligation des ADNc sélectionnés dans le vecteur λ ZAPII	59
IV.6.	Titration de la banque	59
IV.7.	Amplification de la banque	59
V.	Criblage de la banque d'ADNc	59
V.1.	Criblage immunologique	59
V.2.	Criblage à l'aide d'une sonde d'ADNc spécifiant le SISP chez la limnée	60
VI.	Production massive des phages sélectionnés et sortie d'insert	60
VI.1.	Contrôle de la présence d'un insert	60
VI.1.1.	Phages sélectionnés par le criblage immunologique	60
VI.1.2.	Phages sélectionnés à l'aide de la sonde d'ADNc	61
VI.2.	Production massive de phages recombinés et isolement de l'insert	61
VII.	Sous clonage du fragment d'ADN (3,8 kpb) sélectionné par le criblage immunologique en plasmide pUC18	62
VII.1.	Ligation du fragment dans les bras du vecteur	62
VII.2.	Transfection des plasmides recombinés	62
VII.3.	Vérification de la recombinaison des plasmides	62
VII.4.	Elimination du fragment d'origine phagique	63
VII.4.1.	Principe	63
VII.4.2.	Résultat de la transfection du fragment de 5,6 kpb	64
VII.5.	Cartographie de l'insert	65
VIII.	Hybridation moléculaire de la sonde oligonucléotidique SISP 7 sur le plasmide recombiné de 5,6 kpb, digéré par <i>AccI</i> et <i>KpnI</i>	65
IX.	Sous-clonage du fragment d'ADN sélectionné par le criblage utilisant la sonde d'ADNc dans le vecteur M13mp18	65

	IX.1. Isolement de l'insert de 1,4 kpb	65
	IX.2. Sous-clonage dans le phage M13	65
X	Séquençage de fragments d'ADN sélectionnés	66
	X.1. Séquençage partiel du fragment d'ADN sélectionné par le criblage immunologique	66
	X.2. Séquençage partiel des fragments d'ADN sélectionné à l'aide de la sonde d'ADNc	66
XI.	"Polymerase chain reaction" (PCR)	67
	XI.1. Amplification d'un fragment à l'aide des amorces élaborées à partir de la séquence du SISP de la limnée	67
	XI.2. Amplification d'un fragment à l'aide des amorces élaborées à partir des séquences de prodynorphine de Mammifères	68
	DISCUSSION ET CONCLUSION	69
	BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Lors des deux dernières décennies, de nombreux peptides ont été identifiés dans le système nerveux central (SNC) des Vertébrés. Malgré l'intérêt récent que suscitent les neuropeptides d'Invertébrés, les travaux les concernant sont restés minoritaires.

Le plus souvent, les peptides ont d'abord été caractérisés et isolés chez des Vertébrés, puis leurs homologues ont été mis en évidence chez des Invertébrés ; c'est, par exemple, le cas des peptides de type opioïde : Met- et Leu-enképhaline isolées du cerveau de porc (Hughes *et al.*, 1975) et identifiées chez *Mytilus edulis* (Leung et Stephano, 1983; 1984). Parfois, l'homologie est imparfaite. C'est le cas des peptides de structure voisine à l'insuline caractérisés chez *L. stagnalis* -le MIP : "molluscan insulin-related peptide"- (Ebberink et Joosse, 1985 ; Ebberink *et al.*, 1987 ; Smit *et al.*, 1988) ou chez *Bombyx mori* -la bombyxine- (Nagasawa *et al.*, 1984, 1986). Un autre exemple est illustré par les leukosulfakinines de blatte, dont la structure est apparentée à celles de la gastrine et de la cholécystokinine (Nachmann *et al.*, 1986 a, b).

Inversement, quelques peptides préalablement isolés chez un Invertébré ont été caractérisés ultérieurement chez un Vertébré. Dans cette catégorie se trouvent le facteur activateur -"head activator"- de l'hydre (Bodenmüller et Schaller, 1981) et les peptides apparentés au FMRF (Phe-Met-Arg-Phe) de mollusques (Boer *et al.*, 1980 ; Dockray *et al.*, 1981 ; Chen *et al.*, 1989).

Enfin, des peptides propres aux Invertébrés ont été décrits tels l'ELH -"egg-laying hormone"-, hormone de ponte d'*Aplysia californica* (Chiu *et al.*, 1979), la CDCH -"caudo-dorsal cells hormone"-, hormone de ponte chez *Lymnaea stagnalis* (Ebberink *et al.*, 1985) ont été mis en évidence chez les mollusques ou encore l'AKH -hormone adipokinétique- mise en évidence chez *Locusta migratoria* (Stone *et al.*, 1976).

L'étude d'un neuropeptide peut être envisagée de trois façons. La première stratégie utilise les propriétés biologiques de la molécule. Ainsi ont été isolés les neuropeptides contrôlant la ponte chez l'aplysie (Scheller *et al.*, 1982) et chez la limnée (Ebberink *et al.*, 1985), et un neuropeptide ayant un rôle dans l'homéostasie de la limnée : le SISP -"sodium influx stimulating peptide"- (De With *et al.*, 1991)

La seconde approche utilise des dosages immunologiques à l'aide d'anticorps hétérologues pour détecter les molécules au cours de leur purification. C'est ainsi que l'on a décrit des peptides apparentés aux opioïdes chez la moule (Leung et Stephano, 1984), à la cholécystokinine chez le crustacé *Palaemon serratus* (Favrel *et al.*, 1987), et à l'arginine vasopressine chez le criquet (Proux *et al.*, 1987).

La troisième approche est une stratégie alternative, qui met en œuvre des techniques de biologie moléculaire et qui peut permettre d'éviter les étapes souvent lourdes, parfois hasardeuses si la molécule est instable, de la purification d'un peptide. Cette dernière stratégie conduit, à la connaissance du ou des gènes spécifiant les neurosécrétions après clonage des séquences concernées. Ainsi, en vertu du code génétique, la séquence nucléotidique du ou des gènes de neuropeptides permet d'établir la séquence primaire en acides aminés de ce peptide, sans avoir recours à l'isolement biochimique et à la purification de ces molécules.

Nous nous sommes intéressé, dans ce travail, à deux types de neuropeptides : à l'homologue du SISP de limnée et aux molécules apparentées à des opioïdes de la famille des dynorphines. L'étude de l'homologue du SISP se justifie par le rôle connu de cette molécule dans l'osmorégulation chez la limnée. Notre intérêt concernant les molécules apparentées aux opioïdes chez *Nereis diversicolor* est justifié par : a) les résultats immunohistochimiques antérieurs (Dhainaut-Courtois *et al.* 1985a,b; 1986; Dhainaut-Courtois et Golding, 1988), b) l'existence de précurseurs de grande taille et leur indication phylogénétique sur l'origine ancestrale de ces molécules. Nous avons tenté d'appréhender les problèmes en choisissant des stratégies, devenues classiques, de biologie moléculaire. Cette attitude reste cependant originale pour le modèle -un ver marin néréidien, *N. diversicolor*- et pour la ou les molécules d'intérêt, neuropeptides et/ou précurseurs de ces derniers.

GENERALITES

Les néréidiens (Annélides Polychètes) constituent un modèle biologique relativement simple dans l'étude de la neuroendocrinologie. En particulier, des neurosécrétions cérébrales contrôlent la gamétogenèse mâle et la gamétogenèse femelle (Durchon 1948, 1949, 1952, 1965). Ultérieurement, l'influence du SNC a été démontrée dans les mécanismes de croissance somatique et de régénération (Boilly et Boilly-Marer, 1972; Boilly, 1974).

Des différences significatives de l'activité neurosécrétrice du cerveau s'observent au cours de la vie des vers (Durchon, 1952, 1962 ; Hauenschild, 1956, 1963 ; Durchon *et al.*, 1965 ; Golding, 1965 ; Clark, 1966 ; Porchet, 1970 ; Durchon et Porchet, 1971) ; l'activité endocrine cérébrale, importante durant la phase juvénile, diminue progressivement lors de la sexualisation, pour devenir pratiquement nulle pendant la période de reproduction des animaux. Cette diminution de l'activité endocrine cérébrale est sous contrôle de facteurs externes : photopériode et température. Par ailleurs, l'inhibition cérébrale est levée après l'injection d'ovocytes immatures dans la cavité coelomique de jeunes *Perinereis cultrifera* (Durchon 1952) et à l'inverse les ovocytes matures par la sécrétion d'une substance à effet feed-back bloquent la production hormonale du cerveau, Porchet et Cardon (1972, 1976) et Cardon et Porchet (1973). Au cours de la vie de l'animal, il s'établit un équilibre susceptible d'évoluer entre l'activité cérébrale et l'activité génitale. L'activité génitale prend peu à peu l'avantage sur l'activité cérébrale jusqu'à la maturité sexuelle totale de l'animal (Porchet, 1974). Une même rétroaction peut être obtenue par de la 20-hydroxyecdysone (Porchet *et al.*, 1984). Ces expériences sont à rapprocher des travaux de Gaillet (1985) qui a identifié une substance voisine de ce stéroïde dans le liquide coelomique des animaux.

Bien que les études expérimentales employées par les auteurs précédents ne leur aient pas révélé le ou les sites précis de synthèse des neuropeptides, des études morphofonctionnelles, utilisant la microscopie photonique et la microscopie électronique couplées à l'emploi d'anticorps dirigés contre des peptides de Vertébrés, ont permis d'élaborer une anatomie fine du SNC (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985a,b, 1986; Dhainaut-Courtois et Golding, 1988). De nombreux peptides, immunologiquement

Tableau 1 - Distribution chez les Néréidiens de substances
immunologiquement apparentées à des peptides de Vertébrés
et d'Invertébrés (tableau emprunté à A. Delaire, thèse 1989)

Famille de Peptides	Distribution				Référence
	Cerveau	G S O	C N V	Autres tissus	
<u>Opiacés</u>					
Leu-enképhaline	+	+	+	ovocytes	1
Met-enképhaline	+		+		2
α -endorphine	+			SNP	1
β -endorphine	+		+		
α -néoendorphine	+	+			2
Dynorphine 1-17	+			spermatocytes	2
<u>Hormones hypothalamiques</u>					
Somatostatine	+	+	+	ovocytes	2
GRF	+	+	+		1-2
CRF	+	+	+		1
Vasopressine	+	+	+		3
<u>Hormone antéhypophysaire</u>					
β -MSH	+	+	+		1
<u>Hormones gastrointestinales</u>					
CCK	+	+	+	intestin	4-5
Substance P	+	+	+		1
VIP	+	+	+		1
Insuline	+			SNP	3
<u>Divers</u>					
Angiotensine	+				3
FMRF amide	+	+	+	intestin	6
CDCH	+				7
Neuroparsine	+	+	+		8

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

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

3 - Dhainaut-Courtois and Golding, 1988

4 - Engelhardt *et al.*, 1982

5 - Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985b ; Baratte *et al.*, 1990.

6 - Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988 ; Baratte *et al.*, 1990, 1991

7 - Dhainaut-Courtois et coll., communication personnelle

8 - Dhainaut-Courtois et coll., communication personnelle

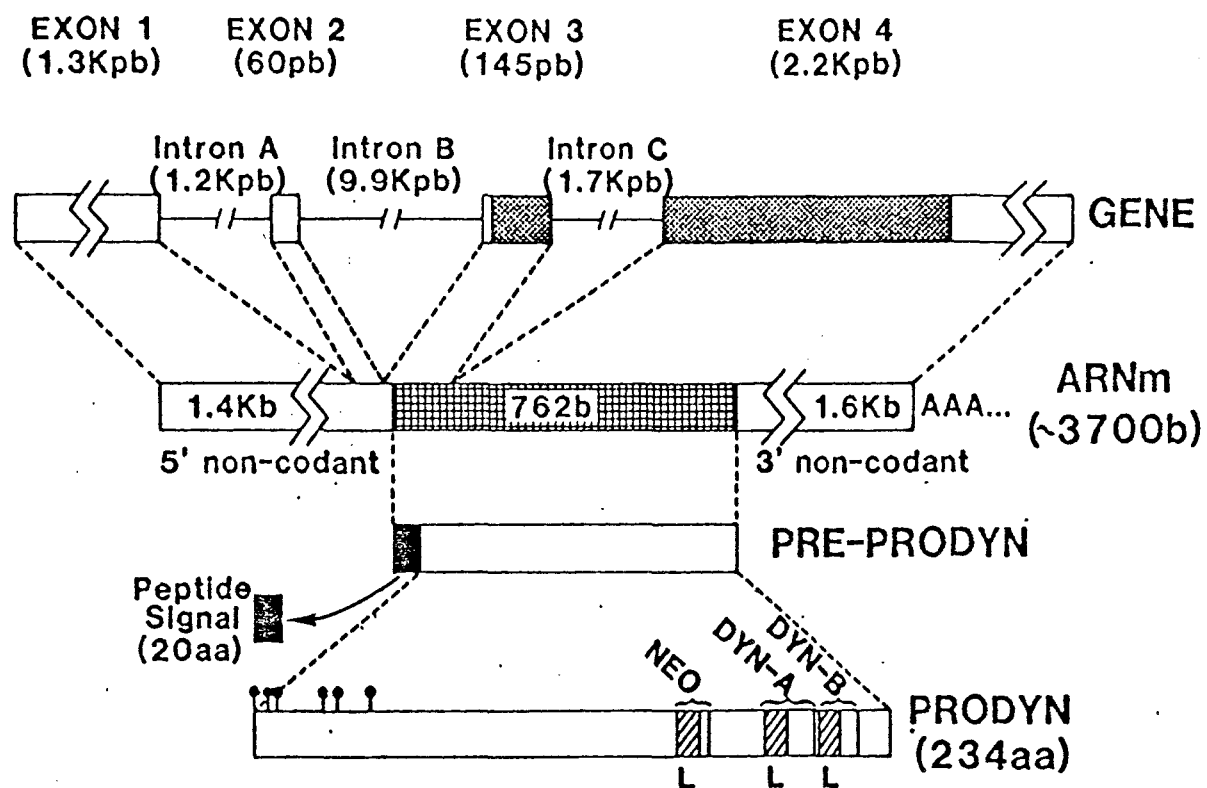
GSO, Ganglion sous-oesophagien ; CNV, Chaîne nerveuse ventrale ; SNP, Système nerveux périphérique ; GRF, Growth hormone releasing factor ; CRF, Corticotropin releasing factor ; MSH, Melanocyte stimulating hormone ; CCK, Cholécystokinine ; VIP, Vasoactive intestinal peptide ; CDCH, Caudo- dorsal cell hormone.

apparentés à des peptides de Vertébrés ou d'Invertébrés, ont été détectés dans le cerveau des néréidiens (tableau 1).

A ce jour, le rôle exact de ces molécules apparentées à leurs homologues de Vertébrés n'a pas été défini. Vraisemblablement, la plupart de ces substances agissent comme neurotransmetteur et/ou neuromodulateur (Dhainaut-Courtois, 1970). Cette hypothèse est renforcée par les résultats de Golding et May (1982) qui décrivent une exocytose de granules de sécrétion dans le neuropile des Polychètes. Toutefois, certaines de ces substances pourraient agir comme de véritables neurohormones. Jusqu'à présent, l'unique démonstration expérimentale d'une activité biologique d'une substance cérébrale est celle d'une neurosécrétion inhibitrice de la spermatogenèse (SIF : "spermatogenesis inhibiting factor"). Dès 1963, Durchon et ses collaborateurs entreprennent de purifier cette molécule. Il s'agit d'un neuropeptide de faible masse moléculaire ne renfermant pas d'acide aminé aromatique (Cardon 1970, Cardon *et al.*, 1981). Cette molécule probablement riche en glycine et en proline possède un point isoélectrique compris entre 6,3 et 6,4 (Porchet *et al.*, 1985 ; Bulet et Porchet, 1986). Malgré les travaux complémentaires de Delaire-Hesdin (1989) la structure de ce neuropeptide inhibiteur de la spermatogenèse reste encore à élucider.

Les approches biochimiques mises en oeuvre pour purifier et analyser les neuropeptides d'Invertébrés restent souvent délicates. La petite taille des cellules nerveuses des Invertébrés inférieurs, tels les Annélides Polychètes, constitue un handicap certain. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser des techniques de biologie moléculaire dans le double but d'acquérir des informations sur les propriétés et éventuellement les rôles des neuropeptides de *N. diversicolor* et d'éviter l'écueil représenté par la faible quantité de matériel présent dans le cerveau, ainsi que les lourdes étapes d'isolement et de purification des peptides. Notre approche est à notre connaissance originale chez les Néréidiens. L'étude de l'expression de gènes spécifiant des précurseurs de neuropeptides chez *Nereis* ayant été précédemment initiée dans notre laboratoire (Guissi-Kadri, 1989 ; Guissi-Kadri *et al.*, 1990 ; Dugimont *et al.*, 1992a, b). Ces premiers travaux suggèrent l'existence dans le cerveau des néréidiens de grands précurseurs à partir desquels différents neuropeptides actifs pourraient être maturés. Cette hypothèse n'est pas sans rappeler les résultats observés lors de l'étude des 3 familles d'opioïdes de Mammifères : les endorphines, les enképhalines et

Schéma de la biosynthèse de la pré-prodynorphine humaine (d'après Patey et Rossier, 1986)



† Cystéine

▨ L=Leu-enképhaline

▨ NEO=Néo-endorphine

▨ DYN-A=Dynorphine A (1-17)

▨ DYN-B=Dynorphine B

les dynorphines (Kachaturian *et al.*, 1985 ; Patey et Rossier, 1986). Les peptides de chaque famille sont obtenus après maturation de leur précurseur spécifique. La préproopiomélanocortine (POMC) donne naissance aux endorphines, mais aussi à l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et aux hormones mélanotropes (Mains *et al.*, 1977). La préproenképhaline libère la Leu-enképhaline, la Met-enképhaline et des peptides dérivés (Davis *et al.*, 1985). Les membres de la famille des dynorphines, comprenant les dynorphines A et B, l' α -néo-endorphine et la β -néo-endorphine, sont issus du clivage de la préprodynorphine (Christensson-Nylander *et al.*, 1985 et schéma ci-contre). La composition en acides aminés de chacun de ces précurseurs a été déterminée par le clonage et le séquençage d'ADNc (Nakanishi *et al.*, 1979 ; Kakidani *et al.*, 1982 ; Noda *et al.*, 1982). La séquence du gène de la préprodynorphine est connue chez le porc (Golstein *et al.*, 1981; Kakidani *et al.*, 1982), chez le rat (Weber et Barchas, 1983 ; Civelli *et al.*, 1985) et chez l'homme (Horikawa *et al.*, 1983). Des études d'homologies de séquences nucléotidiques ont indiqué que le gène humain spécifiant la préprodynorphine montrent 85% d'homologie avec celui du porc et 75% avec celui du rat ; les séquences des produits actifs étant très conservées (Lewis et Erikson, 1986). La préprodynorphine, molécule possédant une masse moléculaire de 30 kDa, subit un premier clivage enzymatique pour donner naissance à l' α -néo-endorphine, la β -néo-endorphine, les dynorphine A (1-17) et B (1-29) encore appelée leumorphine. La dynorphine A(1-17) conduit après clivage enzymatique à la formation de dynorphine A (1-8), alors que la dynorphine B (1-29) permet la libération de dynorphine B (1-13) ou rimorphine. Ces deux derniers peptides (dynorphine A (1-8) et dynorphine B (1-13)) peuvent libérer une molécule de Leu-enképhaline. Les produits actifs maturés à partir du précurseur possèdent une grande affinité pour les récepteurs aux opioïdes de type K chez les Mammifères (Hölldt *et al.*, 1983) et semblent par conséquent impliqués dans les mécanismes de nociception (Kuroda *et al.*, 1986). D'autres rôles, aussi variés que la contraction de l'iléon, la stimulation de la sécrétion de prolactine ou encore un rôle dans la nutrition, ont été avancés (Neal et Newman, 1989). Ces neuropeptides impliquent également une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions calcium, ce qui les ferait intervenir dans des processus d'inhibition de libération des neurotransmetteurs (White *et al.*, 1985). Chez les Mammifères, les opioïdes pourraient réguler les réponses à la douleur et au stress (Akil *et al.*, 1984). Des substances

immunologiquement apparentées aux opioïdes ont été également mises en évidence chez des Mollusques : *Limax maximus* (Kavaliers *et al.*, 1985), *Mytilus edulis* (Kream *et al.*, 1980)) et chez des Insectes : *Calliphora vomitoria* (Duve et Thorpe, 1983) et *Periplaneta americana* (Kavaliers *et al.*, 1987). Des opioïdes ont été détectés chez des Annélides (Alumets *et al.*, 1979 ; Rémy et Dubois, 1979 ; Zipser, 1980 ; Osborne *et al.*, 1982; Rzasa *et al.*, 1984 ; Verger-Bocquet *et al.*, 1987). Selon Golding et May (1982), la plupart de ces peptides joueraient un rôle de neuromodulateur. En 1987, Leung et Stephano émettent l'hypothèse de l'existence d'un précurseur commun à l' α -néo-endorphine et à la dynorphine chez les Invertébrés. La vérification de cette hypothèse chez un Néréidien devenait particulièrement intéressante, non seulement dans le cadre de la conservation phylogénétique des molécules, mais aussi dans celui du maintien d'un même processus de maturation. L'ensemble de ces connaissances est à rapprocher de celles obtenues chez des Mollusques Gastéropodes qui ont fait l'objet d'une étude moléculaire approfondie. Les Gastéropodes possèdent un système nerveux relativement simple, constitué d'environ 20000 neurones polyploïdes facilement identifiables. Ces neurones ont fait l'objet d'études ultrastructurales, physiologiques, immunologiques, endocrinologiques et moléculaires chez une espèce d'eau douce, la limnée (*L. stagnalis*) et chez une espèce marine, l'aplysie (*A. californica*) (Geraerts et Joosse, 1984 ; Roubos, 1984 ; Mayeri et Rothman, 1985). Ces deux espèces se caractérisent par un comportement stéréotypé au moment de la ponte. Lors de celle-ci, alors que l'animal s'immobilise, il y a interruption de la prise de nourriture et accélération des contractions musculaires cardiaques et du tractus génital (Cobbs et Pinsker, 1982 ; Rothman *et al.*, 1985 ; Geraerts *et al.*, 1988a, b).

Une stimulation électrique de cellules nerveuses particulières appelées "bag cells" (BC) chez l'aplysie et "caudo-dorsal cells" (CDC) chez la limnée provoque la sécrétion de l'hormone de ponte, respectivement l'ELH et la CDCH (Kits, 1980 ; Ter Maat *et al.*, 1983). Les hormones agissent sur l'ovaire et provoquent la ponte (Geraerts *et al.*, 1983, 1984). Les structures primaires de l'ELH et de la CDCH ont été respectivement déterminées par Chiu *et al.*, (1979) et par Ebberink *et al.*, (1985). Ces hormones de ponte ont une action directe sur l'ovaire en initiant et en régulant la ponte, mais ne contrôlent pas le comportement stéréotypé de l'animal (Joosse et Geraerts, 1983 ; Mayeri et Rothman, 1985).

Scheller *et al.*, (1983) et Jackson *et al.*, (1986) montrent que l'ELH et les autres produits de sécrétion (α BCP, β BCP, γ BCP,...) sont issus d'une même préprohormone. Chez la limnée, Geraerts *et al.*, (1985) et Vreugdenhil *et al.*, (1985) aboutissent à la même conclusion : la CDCH est co-sécrétée avec d'autres produits (α CDCP, β CDCP, β_1 CDCP, calfluxine,...) issus de la maturation d'un grand précurseur synthétisé par les CDC.

Des clones codant pour ces 2 préprohormones ont été recherchés et isolés à partir d'une banque d'ADNc. La séquence primaire en acides aminés de ces 2 préprohormones a été déduite de la séquence des ADNc (Scheller *et al.*, 1982, 1983 ; Nambu et Scheller, 1986 ; Vreugdenhil *et al.*, 1988a). Ces molécules précurseurs représentent la forme initiale inactive, à partir de laquelle différents peptides interviennent dans les divers processus physiologiques de ponte. Chacun de ces produits, issu de la maturation de la molécule précurseur, contrôle une étape particulière des mécanismes impliqués dans la ponte (Kaldany *et al.*, 1985 ; Vreugdenhil *et al.*, 1988a). Certains de ces peptides sont des neurotransmetteurs agissant sur des neurones voisins (Rothman *et al.*, 1985 ; Ter Maat *et al.*, 1988).

Il est intéressant de souligner l'homologie structurale de ces deux précurseurs chez les deux Mollusques. Bien que l'homologie globale des deux préprohormones soit faible (environ 28%), elles possèdent toutes deux un peptide signal de 20 acides aminés et des sites de clivage hautement conservés (Vreugdenhil *et al.*, 1988b). De plus, la comparaison des séquences en acides aminés des peptides matures révèle des homologies non négligeables : 51% entre CDCH et ELH (Chiu *et al.*, 1979), 69% entre α CDCP et α BCP (Ebberink *et al.*, 1985). L'organisation structurale des précurseurs et les homologies de séquence des peptides actifs suggèrent l'existence de mécanismes physiologiques similaires impliqués dans la ponte, mécanismes contrôlés par des neuropeptides apparentés (Vreugdenhil *et al.*, 1988b).

Chez l'aplysie, le précurseur de l'ELH est spécifié par cinq gènes regroupés en une famille qui s'expriment dans les BC et la glande atriale. Ces gènes montrent une forte homologie entre eux (90%) et sont différemment exprimés en fonction du type cellulaire (Scheller *et al.*, 1982, 1983 ; Mahon *et al.*, 1985).

Chez la limnée, le précurseur de la CDCH est spécifié par une famille de gènes comprenant les gènes CDCH I et CDCH II. L'homologie entre les 2 gènes est élevée (90%). Une délétion de 17 pb dans la région carboxy-terminale de CDCH II conduit à la production d'une "CDCH-like".

En 1983, Scheller *et al.*, émettent l'hypothèse que chez les Gastéropodes les deux gènes codant ces précurseurs ont été engendrés par duplication d'un gène ancestral. La même hypothèse a été proposée par Nambu et Scheller en 1986 pour les gènes de l'ELH de plusieurs espèces d'aplysie.

Chez les Mollusques, un autre précurseur peptidique a été bien étudié au niveau moléculaire ; il s'agit du précurseur du FMRF-amide. Ce dernier a été mis en évidence à différents degrés d'évolution du règne animal et possède de nombreux rôles biologiques (Baratte, 1990). Le gène spécifiant le FMRF-amide chez l'aplysie a été caractérisé par Taussig *et al.*, (1985). Il présente une organisation originale puisqu'il code un grand précurseur renfermant 28 copies du pentapeptide Phe-Met-Arg-Phe-Gly. Chaque pentapeptide est flanqué de résidus basiques qui constituent des sites de clivages protéolytiques (Loh et Gainer, 1983). L'acide aminé glycine, situé à l'extrémité carboxy-terminale, est le substrat de l'amidation qui conduit au FMRF-amide (Taussig *et al.*, 1988). Ce précurseur comprend aussi une copie du pentapeptide Phe-Leu-Arg-Phe-Gly et libère, après maturation post-traductionnelle, un FLRF-amide. L'existence au sein du précurseur de 28 copies de FMRF et une de FLRF n'est pas sans rappeler la structure également complexe du précurseur des enképhalines chez l'homme. En effet, ce précurseur possède une copie de Leu-enképhaline et 7 copies de Met-enképhaline (Comb *et al.*, 1982).

Chez la limnée, une autre molécule impliquée dans la régulation des flux d'ions Na^+ a fait l'objet d'une étude de biologie moléculaire. Ce peptide, nommé SISP, stimule l'entrée d'ions Na^+ du milieu extérieur vers l'hémolymphe de l'animal, *via* le tégument, comme l'ont démontré les études *in vivo* et *in vitro* (de With et van der Schors, 1986 ; de With *et al.*, 1988). La limnée est capable de régler précisément la concentration en Na^+ de son milieu intérieur (Kulhman et Feiden, 1976 ; de With, 1977, 1980). Cette homéostasie est en grande partie due à une pompe à Na^+ présente dans le tégument et dont l'activité est inversement proportionnelle à la concentration en Na^+ dans l'hémolymphe (Chaisemartin, 1969 ; Greenaway, 1970 ; de With et van der Schors, 1982, 1983). L'entrée de Na^+ *via* le tégument contrebalance la perte de Na^+ rénale (de With et van der Schors, 1984) ; cette dernière est également limitée par une réabsorption sodique à partir de l'urine (de With, 1980 ; de With et van der Schors, 1984). Ces auteurs précisent que l'entrée d'un ion Na^+ implique la sortie d'un ion H^+ . Un échange d'anions survient simultanément : un ion Cl^- entrant pour un ion HCO_3^- .

sortant, ce dernier provenant de la réaction enzymatique de l'anhydrase carbonique (de With *et al.*, 1987). De With *et al.*, (1988) démontrent que le SISP agit au niveau de la pompe Na^+/K^+ ATPase permettant le transfert actif des ions. Ces systèmes d'échanges Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dépendant de l'anhydrase carbonique, entretenus par une pompe Na^+/K^+ ATPase dans la paroi du corps de la limnée, ressemblent à ceux présents dans les branchies de poissons d'eau douce (Evans, 1975).

Le système neuroendocrine de la limnée est impliqué dans l'homéostasie hydrominérale (Wendelaar-Bonga, 1970, 1972 ; Roubos, 1973 ; Soffe *et al.*, 1978, 1979 ; de With et van der Schors, 1983, 1986 ; de With *et al.*, 1991). Parmi les produits de sécrétion, le SISP représente le premier facteur natrémique caractérisé chez un Invertébré (de With *et al.*, sous presse).

Le SISP est présent au niveau des ganglions cérébraux et dans une zone neurohémale appelée "median lip nerve" (MLN) (de With et van der Schors, 1986). Il est synthétisé par des cellules, les "yellow cells" (YC) localisées dans les ganglions pariétaux et viscéraux (Boer *et al.*, 1992). Ces cellules pourraient aussi avoir un rôle, par l'intermédiaire de leurs neurosécrétions, dans la régulation de la fonction rénale (Wendelaar-Bonga, 1970).

La biologie moléculaire a apporté des informations sur la séquence nucléotidique du gène spécifiant le SISP, ainsi que sur la séquence en acides aminés de son précurseur. Une banque d'ADNc de limnée a été criblée à l'aide de fragments d'ADN amplifié par PCR ("polymerase chain reaction") (Vreudenhil *et al.*, 1988a ; Smit *et al.*, 1988). La préprohormone du SISP montre une architecture relativement simple, puisqu'elle contient une séquence signal et une copie unique de l'hormone (de With *et al.*, 1991).

Il est depuis longtemps établi que *N. diversicolor*, habitant en eau saumâtre, est capable d'une régulation osmotique (Schlieper, 1929 ; Beadle, 1937 ; Smith, 1955, 1959 ; Hohendorf, 1963 ; Oglesby, 1970). En 1955, Fretter démontre, dans des conditions de faible salinité, une entrée active d'ions Na^+ contre le gradient de concentration chez ce ver. Dans les mêmes conditions, Jorgensen et Dales (1957) décrivent une entrée active d'ions Cl^- . Les transports actifs de ces ions, du milieu extérieur vers le liquide coelomique de l'animal *via* le tégument, sont un des principaux mécanismes permettant à l'animal de rester hyperosmotique vis-à-vis d'un milieu extérieur de faible salinité. Par ailleurs, il y a également réduction de la perméabilité de la surface du

corps aux sels (Oglesby, 1965a, b, 1968, 1969 ; Smith, 1970a) et/ou à l'eau (Jorgensen et Dales, 1957) et filtration au niveau des néphridies d'une urine hypoosmotique vis-à-vis du liquide coelomique (Potts et Parry, 1964 ; Smith, 1970b). L'ensemble de ces travaux physiologiques permet de conclure à une entrée active d'ions Na^+ (et Cl^-) du milieu ambiant vers le milieu intérieur de l'animal, en particulier chez une espèce euryhaline comme *N. diversicolor*.

La mise en évidence d'une neurohormone facilitant l'entrée de Na^+ du milieu extérieur vers l'hémolymph de la limnée nous a incité à tenter de démontrer l'existence d'une molécule apparentée au SISP chez la néréis.

Pour ce faire, dans un premier temps, nous avons éprouvé les capacités informatives des ARNm isolés de cerveaux de *N. diversicolor* dans divers systèmes de traduction, système cellulaire (ovocytes de *Xenopus laevis*) ou acellulaire (lysate de réticulocytes de lapin). Des informations ont été obtenues en caractérisant certains produits de traduction par des anticorps dirigés contre des séquences déterminées du SISP de limnée d'une part et par des anticorps dirigés contre la dynorphine 1-17 et des anticorps dirigés contre l' α -néo-endorphine d'autre part. Dans un second temps, nous avons tenté de définir chez *N. diversicolor* les séquences nucléotidiques codant la ou les molécules homologues au SISP de limnée, ainsi que la ou les molécules homologues à des opioïdes de Vertébrés. Les résultats obtenus par les réactions immunochimiques lors des premières étapes de notre travail, nous ont incité à élaborer une banque d'expression à partir d'ADNc synthétisés sur les ARNm poly- A^+ extraits de cerveaux de *N. diversicolor*. La banque d'ADNc a été criblée à l'aide des anticorps dirigés contre des séquences connues du SISP chez la limnée, ainsi qu' à l'aide d'une sonde d'ADNc de ce Mollusque. La technique de PCR a également été employée après rétro-transcription des ARN extraits de cerveaux de néréis. Les amorces oligonucléotidiques utilisées lors des cycles d'amplification ont été élaborées à partir des séquences les mieux conservées et les moins dégénérées du SISP. Cette seconde stratégie a également été utilisée pour la détection de gènes spécifiant les précurseurs d'opioïdes.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique

Le modèle biologique utilisé pour ce travail est le ver marin *Nereis diversicolor* (Annélide, Polychète). Les animaux sont récoltés dans la vase de l'estuaire de l'Aa, à Petit- ou Grand-Fort-Philippe, (Nord, France) (fig. 1). Les vers sont conservés à 4°C dans l'eau de mer naturelle, sans nourriture, jusqu'à leur utilisation.

II. Dissection et isolement des cerveaux

La dissection doit être menée rapidement pour préserver l'intégrité des molécules du matériel disséqué. Pour ce faire, les animaux sont décapités par série de dix. L'ablation du cerveau s'effectue sous loupe binoculaire. Une incision réalisée à l'aide de ciseaux de Pascheff permet de dégager le segment antérieur de l'animal ou prostomium (fig. 2). La séparation de ce dernier du corps entraîne inévitablement les ganglions cérébroïdes, couramment appelés cerveau, ainsi que des palpes facilement éliminés par deux autres incisions. La forme des ganglions cérébroïdes est celle des ailes étalées d'un papillon (fig. 3). Après présentation de la face ventrale du prostomium vers l'expérimentateur, les ganglions cérébroïdes sont facilement isolés par simple grattage et immédiatement congelés dans l'azote liquide, où ils sont conservés.

III. Etude des ARN du cerveau de *N. diversicolor*

III.1. Extraction des ARN

Il nous est apparu que les ARN isolés du cerveau de *N. diversicolor* sont des molécules particulièrement fragiles, très sensibles aux hydrolyses enzymatiques. En conséquence, des précautions opératoires strictes sont appliquées au cours des manipulations: vaisselle stérilisée à 200°C durant 2 h, plastiques traités au diéthylpyrocarbonate (DEPC) à 0,1% dans l'éthanol et stérilisés à 100°C. Les solutions ne pouvant être autoclavées sont traitées au DEPC à 0,1% et leur utilisation est différée de 24 h.

Les ARN totaux de cerveaux de *Nereis* sont extraits et traités selon une méthode modifiée décrite par Guissi-Kadri (1990). Les cerveaux sont broyés dans un tampon GT. Les molécules d'ADN sont brisées mécaniquement par passage au travers de l'aiguille d'une seringue. Les acides nucléiques sont séparés par centrifugation isopycnique en chlorure de césium (CsCl). Le culot contenant les ARN est

repris dans du tampon TE contenant 1% de sodium dodécyl sulfate (SDS) et ceux-ci sont extraits par le mélange chloroforme/butanol (4V/1V). L'addition d'1/10^e de volume d'acétate de sodium (NaCH₃COO) 3 M et de 2,2 volumes d'éthanol absolu froid permet, après une nuit à -20°C, la précipitation des ARN.

III.2. Préparation des ARN poly-A⁺

III.2.1. Traitement des ARN par le chlorure de lithium (LiCl)

Le traitement des ARN par le LiCl est celui décrit par Guissi-Kadri (1990). Après une centrifugation de 10 mn à 14600 x g, les culots sont rincés à l'éthanol 70%, séchés et traités deux fois par une solution de LiCl 2 M pour éliminer les molécules bicaténaïres. Deux lavages à l'éthanol 70% permettent d'éliminer toute trace de LiCl avant que les culots soient repris dans de l'eau traitée au DEPC. Les ARN sont précipités à -20°C après addition d'1/10^e de volume de NaCH₃COO et 2,2 volumes d'éthanol absolu.

III.2.2. Sélection des ARNm poly-A⁺

Les ARNm polyA⁺ sont sélectionnés à l'aide d'un gel d'oligo-dT-cellulose fourni dans le "kit" de purification d'ARNm commercialisé par Stratagène (Poly-(A) quick mRNA purification kit).

III.2.2.1. Préparation de la colonne oligo-dT

Avant utilisation, les colonnes sont disposées verticalement pour permettre au gel de sédimenter. Une seringue placée à l'extrémité supérieure de la colonne permet d'éliminer le tampon de stockage et de tasser le gel au fond de celle-ci. Le gel est traité 2 fois par une solution saline à forte concentration (Tris-HCl¹ 10 mM, pH 7,5, EDTA² 1 mM, NaCl³ 0,5 M).

¹ Acide chlorydrique

² Ethylène diamine tétracétate

³ Chlorure de sodium

III.2.2.2. *Préparation des échantillons d'ARN*

Les ARN précipités dans l'éthanol absolu sont centrifugés à 12000 x g pendant 1 h. Les culots sont rincés deux fois à l'éthanol 70% et séchés sous air comprimé avant d'être repris dans le tampon de dilution des échantillons 10X (Tris-HCl, 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 5 M) dilué au 1/10^e dans de l'eau traitée au DEPC.

III.2.2.3. *Sélection des ARNm poly-A⁺*

Les échantillons d'ARN sont dénaturés pendant 10 mn à 65°C et refroidis dans la glace avant d'être déposés délicatement à la surface du gel, à raison d'une goutte par seconde. Cette opération est répétée une seconde fois après avoir récolté le premier effluent. La colonne est rincée 2 fois par 200 µl d'une solution saline fortement concentrée, incluse dans le "kit", avant d'être lavée 3 fois par une solution saline faiblement concentrée (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M). Les ARNm poly-A⁺ sont récupérés en employant 200 µl de tampon d'élution (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM), préchauffé à 65°C. Cette opération est répétée 4 fois, de façon à obtenir une solution de 800 µl d'ARNm poly-A⁺. La concentration des ARNm poly-A⁺ est estimée à l'aide d'un spectrophotomètre dont la longueur d'onde est réglée à 260 nm. Les échantillons sont précipités par 1/10^e de volume de NaCH₃COO 3 M et par 2 à 3 volumes d'alcool absolu pendant une nuit à -20°C.

IV. Traduction des ARNm en lysat de réticulocytes de lapin

Le "kit" de traduction des ARNm en système acellulaire choisi est celui commercialisé par la société Amersham (réf.M90Y, Amersham, France). Les conditions opératoires sont celles préconisées par la société Amersham. Ce système acellulaire eucaryotique permet la traduction d'un grand nombre d'ARNm exogènes de masse moléculaire élevée (Clemens, 1984).

IV.1. Traduction des ARNm en présence de méthionine-³⁵S

IV.1.1. Protocole opératoire

Un mélange réactionnel appelé "premix" est préparé avant d'ajouter les ARNm.

Ce "premix" est constitué de :

- Lysat de réticulocytes de lapin	140 μ l
- Méthionine ^{35}S (SJ 1515, Amersham, France)	17,5 μ l
activité spécifique supérieure à 1000 Ci/mmol	
- Eau distillée	8,75 μ l

Le volume réactionnel doit être de 50 μ l réparti de la façon suivante :

	Témoin (négatif)	Echantillon
Eau	5 μ l	-
Eau contenant les ARN Poly-A ⁺ à tester (1 μ g/ μ l)	-	5 μ l
Premix	45 μ l	45 μ l

L'incubation s'effectue à 30°C pendant 1 h.

IV.1.2. Evaluation du pouvoir informatif des ARNm en fonction de la radioactivité incorporée dans les protéines néosynthétisées

IV.1.2.1. *Evaluation quantitative*

A 1 ml de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM additionné de méthionine non radioactive (4 mg/ml) on ajoute 1 μ l du mélange de traduction. La précipitation des protéines est obtenue en déposant 2 gouttes d'acide trichloroacétique glacé (TCA) à 100%. La réaction se poursuit pendant 2 h à 4°C. L'ensemble est filtré sur une pastille en fibre de verre et rincé par 4 lavages successifs au TCA 10%, au TCA 5% , à l'eau distillée et au mélange éthanol/éther (V/V). Après séchage des filtres, la radioactivité est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (LKB Wallac 1215 rack beta). Les filtres sont placés dans des fioles à scintillation contenant du lipofluor (J.T. Baker) utilisé comme liquide scintillant. Trois mesures concernant le même échantillon sont réalisées afin d'obtenir une valeur moyenne de la radioactivité contenue dans des prises de faible volume (1 μ l).

IV.1.2.2. *Evaluation qualitative*

Le reste de chaque échantillon (47 μ l) est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS 5-25% pour évaluer la qualité des ARNm traduits en protéines. Après électrophorèse, le gel est coloré au bleu de Coomassie, puis décoloré par l'acide acétique à 10%. Après séchage du gel, celui-ci est placé en autoradiographie à -70°C.

IV.2. Traduction des ARNm en présence de méthionine froide

Le protocole opératoire permet la synthèse *de novo* de polypeptides et précède les expériences d'immunodétection. Le protocole opératoire est le suivant :

Lysat de réticulocytes	40 μ l
Méthionine 1mM	5 μ l
Eau contenant les ARNm poly-A ⁺ à tester (1 μ g/ μ l)	5 μ l

Les conditions d'incubation utilisées sont les mêmes que celles décrites pour la traduction en présence de méthionine radioactive. Un témoin négatif (eau distillée ne contenant pas d'ARNm) est réalisé dans les mêmes conditions.

V. Traduction des ARNm dans les ovocytes de *Xenopus laevis*

Les ovocytes sont séparés des cellules folliculaires par la collagénase dispase (Boehringer, Mannheim) à 1 mg/ml pendant 2 h sous agitation. Les ovocytes sont incubés pendant 24 h dans un milieu de Barth, additionné de plusieurs antibiotiques : théophylline 0,5 mM, pénicilline à 10 mg/ml, streptomycine à 10 mg/ml, ainsi que du pyruvate de sodium 2,5 mM. 50 nl d'une solution d'ARNm poly-A⁺ à 5 μ g/ μ l sont injectés dans chaque ovocyte. Ces derniers sont placés dans un milieu de Barth contenant de la gentamycine à 50 μ g/ml. L'incubation se poursuit pendant 5 à 6 jours en renouvelant le milieu tous les jours, jusqu'à l'extraction des protéines. Des ovocytes témoin subissent une injection d'eau distillée sans ARNm et sont traités selon le même protocole. Les injections d'ARNm dans les ovocytes ont été aimablement effectuées par F. Fournier (Laboratoire de physiologie cellulaire, dirigé par le Professeur Guilbault, Université de Lille I).

VI. Extraction des protéines ovocytaires

Les ovocytes sont homogénéisés par groupe de cinq dans 200 μ l de tampon (Tris-HCl 75 mM, pH 6,8, SDS 1%, β -mercaptoéthanol 1%, phényl-méthyl-sulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM). L'homogénat est centrifugé à 10000 x g pendant 5 mn. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et dilué au 1/3 pour être analysé en électrophorèse. Cette technique est aussi utilisée pour extraire les protéines des cerveaux de *N. diversicolor*.

Les protéines libérées par les ovocytes dans leur milieu d'incubation sont précipitées par 0,2 volume de TCA (50% m/v) en présence de 2 μ g de sérum albumine bovine (SAB) qui joue le rôle d'entraîneur. Ces précipités sont récupérés par une centrifugation à 10000 x g pendant 5 mn. Le culot est lavé par de l'acétone froide puis remis en suspension dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM pour l'analyse électrophorétique.

VII. Analyse des produits de traduction

VII.1. Electrophorèse

Les produits traduits *in vitro* ou *in ovo* sont séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide-SDS 5-25% selon la méthode de Laemmli (1970).

VII.1.1. Gel de séparation

Le gradient de polyacrylamide-SDS 5-25% est réalisé au moyen d'un formeur de gradient. Les solutions utilisées pour ce gel sont les suivantes :

	5%	25%
Tampon Tris-HCl 0,75 M, pH 8,8	25 ml	25 ml
Acrylamide	2,5 g	12,5 g
Bis-acrylamide	0,066 g	0,33 g
Saccharose	—	9 g
Eau	qsp 50 ml	qsp 50 ml

L'électrophorèse s'effectue en milieu dénaturant en ajoutant aux solutions précédentes du SDS à 0,1% final. Deux catalyseurs sont ajoutés extemporanément pour former le réseau du gel : persulfate d'ammonium à 10% (9 μ l) et N, N, N', N' tétraméthylènediamine (TEMED)(4 μ l) pour 9 ml de gel.

VII.1.2. Gel de concentration

Il s'agit d'un gel homogène à la concentration de 5% d'acrylamide. Le mélange suivant est réalisé :

Tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	12,5 ml
Acrylamide	2,5 g
Bis-acrylamide	0,066 g
Eau	qsp 50 ml

Les conditions dénaturantes nécessitent l'addition de SDS à 0,1% final. Les mêmes catalyseurs, persulfate d'ammonium à 10% et TEMED, sont ajoutés à raison de 50 μ l et 5 μ l respectivement pour 4 ml de gel.

VII.1.3. Migration électrophorétique

Les échantillons sont dilués au 1/3 en ajoutant à 30 μ l de mélange de traduction, 30 μ l du tampon de dilution des échantillons (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) et 30 μ l du tampon de reprise des échantillons (Tris-HCl 65 mM, pH 6,8, SDS 2%, saccharose 10%, β -mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,1%). L'ensemble est chauffé 3 mn dans un bain-marie bouillant avant d'être déposé dans le gel. Un mélange de protéines, témoin de masse moléculaire 94 kDa (phosphorylase B), 67 kDa (albumine), 43 kDa (ovalbumine), 30 kDa (anhydrase carbonique), 20,1 kDa (inhibiteur de la trypsine) et 14,4 kDa (α -lactalbumine), permet d'estimer les masses moléculaires des produits traduits. La migration électrophorétique se déroule à 15 mA pendant 20 h, dans le tampon Tris 25 mM pH 8,3, glycine 190 mM, SDS 0,1%. Une partie du gel est colorée au bleu de Coomassie à 0,1% dans un mélange isopropanol 25%, acide acétique 10%, eau 65%, 2 h sous agitation. Ce fragment de gel est partiellement décoloré par l'acide acétique 10% et constitue un témoin de migration.

VII.2. Transfert des produits de traduction (technique du "Western blot")

La technique de transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose est celle décrite par Towbin *et al.*, (1979). Après séparation électrophorétique des produits traduits, les gels sont équilibrés dans le tampon de transfert pendant 30 mn. La nitrocellulose (porosité 0,45 μ m) est équilibrée dans ce même tampon pendant 20 mn. L'électrotransfert des protéines du gel sur la nitrocellulose est réalisé à 45 V pendant 5 h ou à 12 V sur la nuit à température ambiante. Une partie de la nitrocellulose est colorée par le mélange noir amido 0,1%, méthanol 45%, acide acétique 10% pendant 30 mn et constitue un témoin de transfert des protéines.

VII.3. Immunodétection des produits traduits

VII.3.1. Anticorps dirigés contre le SISP de limnée

Les anticorps employés pour cette technique sont :

- anticorps polyclonaux dirigés contre une séquence N-terminale (10-19) du Sodium Influx Stimulating Peptide (SISP) de limnée, nommés : anti-SISP 10-19
- anticorps polyclonaux dirigés contre la partie C-terminale (67-76) du SISP, appelés anti-SISP 67-76

- anticorps monoclonaux dirigés contre une fraction purifiée en chromatographie liquide haute performance (CLHP) du SISP, appelés : anti-SISP 1-77.

Tous ces anticorps ont été aimablement fournis par le Dr J. Van Minnen (Vrije Universiteit, Amsterdam, Netherlands) et leur préparation a été décrite par De With *et al.*, (1991).

VII.3.2. Anticorps dirigés contre des opioïdes de Mammifères.

Les anticorps utilisés sont les suivants:

- Anticorps polyclonaux dirigés contre la dynorphine 1-17.
- Anticorps polyclonaux dirigés contre l' α -néo-endorphine.

Ces anticorps ont été gracieusement fournis par le Pr. G. Tramu (Bordeaux, Laboratoire de Neurocytochimie fonctionnelle). La spécificité de ces anticorps a été contrôlée par R.I.A (radio immuno-assay). Les résultats ne montrent pas de réactions croisées (Dugimont *et al.*, 1992b).

Afin d'augmenter la crédibilité de nos résultats, nous avons perfectionné la spécificité des immunoréactions mettant en oeuvre les anticorps polyclonaux anti-dynorphine et anti- α -néo-endorphine en utilisant les immunosera préalablement saturés avec leur antigène spécifique ou non spécifique. Les différents anticorps sont placés 24 h sous agitation à 4°C en présence de leur antigène spécifique ou non spécifique : anti-dynorphine 1-17 / dynorphine 1-17 ; anti-dynorphine 1-17/ α -néo-endorphine ; anti- α -néo-endorphine/ α -néo-endorphine ; anti- α -néo-endorphine/dynorphine 1-17. Les proportions sont 5 mg d'antigène pour 1 ml de sérum pur. Certains lots d'anticorps ainsi saturés sont utilisés immédiatement, tandis que d'autres sont employés après un traitement au charbon-dextran qui permet d'enlever l'excès d'antigènes libres dans la solution. Ces divers anticorps préalablement saturés avec leur antigène spécifique ou non spécifique ont été utilisés dans les "techniques de "Western-blot" et d'ELISA" ("enzyme linked immunosorbent assay")

VII.3.3. Caractérisation des produits traduits

L'immunoréaction commence par la saturation des sites libres de la nitrocellulose en incubant la membrane dans le tampon de saturation TBSL pendant 2 h. La feuille de nitrocellulose est ensuite incubée toute la nuit avec les anticorps primaires dilués au 1/100^e dans le tampon TBSL. Une série de 4 lavages avec le tampon TBST précède les 2 h d'incubation de la nitrocellulose avec les anticorps secondaires, marqués à la peroxydase, dilués au 1/1500^e dans le tampon TBST. Une

même série de 4 lavages avec le tampon TBST précède l'étape de révélation des complexes immuns.

Cette révélation utilise le mélange suivant :

Tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM	100 ml
4-chloro-1-naphtol à 0,3% dans le méthanol	6 ml
Eau oxygénée (H ₂ O ₂)	20 µl

Lors de la révélation, la membrane de nitrocellulose est mise en contact avec le substrat de la peroxydase (H₂O₂) et avec un chromogène (4-chloro-1-naphtol, Biorad) qui, incolore sous forme réduite, se colore en violet sous forme oxydée. La coloration de la nitrocellulose, qui est la manifestation de la réaction enzymatique de la peroxydase vis-à-vis de son substrat, se déroule à température ambiante et à l'obscurité de 15 à 30 mn. La réaction est arrêtée par de l'eau distillée.

VII.3.4. Test ELISA

Les plaques à 96 puits sont tapissées avec 50 µl d'un homogénat d'ovocytes injectés d'une solution d'ARNm de cerveau de *N. diversicolor*, et incubent une nuit à 4°C. Les puits des plaques sont saturés avec le tampon TBS additionné de sérum albumine bovine (SAB) à la concentration de 0,1% finale. L'incubation avec les anticorps primaires (préalablement saturés ou non) dilués au 1/100^e dans le tampon TBSB se réalise à 37°C pendant 2 h. Trois lavages avec le tampon TBS additionné de SAB précèdent l'incubation à température ambiante pendant 1 h 30 mn avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase dilués au 1/10000^e. Après une nouvelle série de lavages, l'immunoréaction est révélée en additionnant 9 mg d'orthophényldiamine (OPD) et 16 µl d'H₂O₂, substrat de la peroxydase, à 25 ml de tampon de révélation à 0,1 M additionné d'acide citrique 0,1 M (Sigma USA). La détermination de la densité optique de chaque puits se réalise à l'aide d'un lecteur de plaque (MR 500 Dynatech) réglé à 490 nm. Outre l'épuisement des anticorps, d'autres témoins de réaction sont réalisés en omettant soit l'anticorps primaire soit l'anticorps secondaire.

VIII. Immunohistochimie sur coupes de cerveaux et métamères de *Nereis*

VIII.1. Préparation des tissus

Les tissus sont fixés par immersion pendant 24 h dans du Bouin Hollande, sans acide acétique mais contenant 10% d'une solution saturée de chlorure mercurique. Les tissus sont déshydratés par passages successifs dans des alcools d'ordre croissant, 70% (30 mn), 96%

(30 mn) et 100% (1 h), puis lavés une nuit dans un bain d'alcool butylique. Les échantillons sont inclus dans de la cytoparaffine afin de permettre la confection des coupes. Ces dernières, d'une épaisseur de 7 μm , sont réalisées dans le plan transversal ou sagittal, en se référant à la situation de l'organe en place dans l'animal.

VIII.2. Réaction immunohistochimique

La technique utilisée est celle décrite par Engelhardt *et al.*, (1982). Les coupes déparaffinées dans deux bains de toluène sont réhydratées progressivement par passages successifs dans des bains d'alcool d'ordre décroissant, 100%, 96% et 70%. Les préparations sont immergées dans du tampon de Coons avant d'être incubées une nuit à température ambiante en chambre humide avec l'anticorps primaire spécifique, (anti-SISP 10-19, anti-SISP 67-76 ou anti-SISP 1-77) dilué au 1/500^e dans ce tampon. Après 2 lavages de 5 mn dans ce même tampon, les coupes incubent avec l'anticorps secondaire, sérum de mouton anti-IgG de souris ou sérum de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase de Raifort, (Diagnostic Pasteur) dilué au 1/40^e dans le tampon de Coons. Cette incubation est réalisée en chambre humide à température ambiante pendant 1 h 30. Après 2 lavages dans le tampon de Coons, l'activité de la peroxydase se révèle par l'oxydation d'une solution de 4-chloro-1-naphtol (Sigma) à 0,4 g/l dans du tampon Tris 0,1 M, pH 7,6, en présence d'H₂O₂ 0,15%. La réaction est interrompue par immersion dans l'eau distillée. Les lames sont montées dans un mélange eau/glycérol (V/V) pour être observées au microscope photonique. Les coupes présentant une immunoréactivité pour les anticorps testés sont décolorées dans un bain d'acétone qui élimine la coloration bleue foncée produite par le 4-chloro-1-naphtol oxydé. Les préparations sont rincées à l'eau distillée et sont colorées selon la méthode modifiée de Clark (1955), (le chromotrope 2R a été remplacé par l'hématoxyline de Groat). Cette coloration séquentielle permet de distinguer les différents types neuronaux immunoréactifs. Des "coupes témoins" sont réalisées en les incubant dans des milieux réactionnels dépourvus d'anticorps primaires ou secondaires.

IX. Extraction et purification de l'ADN de *N. diversicolor*

IX.1. Extraction de l'ADN des cellules cœlomiques

Les cellules sont collectées dans la cavité cœlomique des animaux par ponction à l'aide d'une pipette Pasteur effilée, et immédiatement placées dans du tampon PBS_i. Les cellules sont centrifugées pendant 10 mn (1100 x g, 4°C), puis lavées dans le même tampon pour éliminer les hématies. La suspension cellulaire est centrifugée dans les mêmes conditions et les culots obtenus sont

congelés dans l'azote liquide et peuvent être stockés à -70°C . L'extraction d'ADN est réalisée selon le protocole de Maniatis *et al.*, (1989), que nous avons modifié. Les culots sont rassemblés et broyés dans un mortier rempli d'azote liquide. 5 ml de tampon TNE et 0,5 ml de SDS 10% sont ajoutés aux cellules congelées. L'ensemble est broyé en évitant toute décongélation, jusqu'à l'obtention d'une fine poudre blanche. La préparation est mise à incuber à 37°C sous agitation douce pendant 15 mn. Les protéines sont éliminées par une double extraction phénol/chloroforme et chloroforme. La phase supérieure aqueuse est précipitée en ajoutant $1/10^{\text{e}}$ de volume de NaCH_3COO 3 M et 2 à 3 volumes d'éthanol absolu froid, puis placée à -20°C . L'ADN précipité est récupéré par enroulement de fibres autour d'une pipette Pasteur recourbée. L'ADN est séché, repris dans du tampon TE, avant de subir une double digestion enzymatique: a) RNase A à $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ (dépourvue de DNase grâce à un chauffage à 100°C pendant 10 mn) à 37°C pendant 1 h 30, b) protéinase K à 500 mg/ml pendant 1 h à 37°C en présence de 1% SDS. Une double extraction au phénol/chloroforme et chloroforme permet d'éliminer les enzymes additionnées (RNase et protéinase K) et d'éventuelles protéines contaminantes. L'ADN présent dans la dernière phase aqueuse est à nouveau précipité et récupéré, puis repris comme précédemment. La préparation d'ADN est dialysée pendant plusieurs heures contre du TE 0,1X, en changeant régulièrement le tampon.

IX.2. Purification de l'ADN en gradient de chlorure de césium

La purification de l'ADN est rendue nécessaire par la présence de mucopolysaccharides contaminants. Les mucopolysaccharides peuvent être éliminés par une ultracentrifugation en gradient de CsCl. Le CsCl est pesé à raison de $1,2\text{ g/ml}$ de solution d'ADN. Le mélange est agité avec précaution jusqu'à dissolution totale du CsCl, puis soumis à une ultracentrifugation pendant 48 h à $81500 \times g$. La bande d'ADN est récupérée par aspiration. Le matériel est dialysé contre du TE 0,1X, pH 7,4 sous agitation à 4°C pendant 24 h pour éliminer toutes traces de CsCl.

IX.3. Digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction

Les digestions sont réalisées sur $10\text{ }\mu\text{g}$ d'ADN préalablement chauffé 10 mn à 60°C . La solution d'ADN est diluée au $1/2$ avec de l'eau stérile. Le tampon de l'enzyme (10X) est ajouté à raison d' $1/10^{\text{e}}$ du volume final de la réaction. L'enzyme additionnée en large excès (50U) assure une digestion totale de l'ADN génomique. La

digestion s'effectue à 37°C pendant 4 h et est interrompue en ajoutant 1/6^e du volume final de bleu de charge.

IX.4. Séparation électrophorétique de l'ADN génomique

Les produits de digestion de l'ADN génomique sont déposés dans un gel d'agarose à 1% dans un tampon TAE 1X contenant du BET à 0,25 µg/ml. Un aliquot d'ADN génomique non digéré et d'ADN du phage λ digéré par une ou deux enzymes connues sont également déposés dans le gel. L'ADN génomique non digéré permet de vérifier son intégrité, alors que l'ADN du phage λ constitue un témoin de taille des fragments de restriction. La migration est réalisée durant la nuit à 25 V dans un tampon TAE 1X. Le gel est observé aux ultra-violets à 312 nm et photographié.

IX.5. Transfert des fragments de restriction sur membrane de nitrocellulose

Le transfert de l'ADN est réalisé selon la méthode décrite par Southern (1975). Après électrophorèse, le gel est traité par une solution HCl 0,25 M pendant 15 mn, sous agitation, dans le but d'hydrolyser les bases puriques des fragments d'ADN et ainsi faciliter le transfert de ces derniers. Après un rinçage de 5 mn à l'eau distillée, le gel est traité par une solution dénaturante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) pendant 1 h puis par une solution de neutralisation (Tris 0,5 M, pH 7,5, NaCl 1,5 M) pendant 45 mn. En parallèle, la membrane de nitrocellulose est humidifiée 5 mn dans l'eau distillée, puis placée 20 mn dans du tampon SSC 10X. Le transfert des fragments de restriction s'effectue dans du tampon SSC 10X pendant la nuit. Une cuisson de 2 h à 80°C permet de fixer les fragments d'ADN sur la nitrocellulose.

X. Elaboration d'une banque d'expression à partir d'ARN messagers de cerveaux de *N. diversicolor*

Toute la vaisselle utilisée pour l'élaboration de la banque est stérilisée à 200°C et les solutions et tampons sont autoclavés ou filtrés. Le protocole expérimental choisi pour l'élaboration de la banque d'expression est celui préconisé par Stratagène, société qui nous a fourni les kits, et est optimisé pour 5 µg d'ARNm poly-A⁺.

X.1. Synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc)

Le premier brin d'ADNc est synthétisé à l'aide de la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine (Molonay). L'amorce est un oligonucléotide de 50 mers dont la séquence est la suivante :

5' GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAG(T)18 3'

Séquence "GAGA"

Xho I

Cette amorce contient une séquence "GAGA", qui protège le site de restriction de l'enzyme *Xho I*, et présente une séquence poly-dT de 18 nucléotides.

Le milieu de réaction suivant est réalisé :

Tampon 10X de synthèse du premier brin	5 µl
Mélange de nucléotides (dATP, dGTP, dTTP, <u>5méthyl dCTP</u>)	3 µl
Amorce oligo-dT	2 µl
Eau	17 µl
Inhibiteur de ribonucléases	1 µl
ARN poly-A ⁺ (5 µg)	20 µl

L'ensemble est placé 10 mn à température ambiante pour permettre aux amorces de s'associer aux ARNm poly-A⁺.

Transcriptase inverse (18 U/µl)	2,5 µl
---------------------------------	--------

La présence d'un groupement méthyl sur chaque cytosine du premier brin permettra d'éviter la digestion des ADNc par les enzymes de restriction utilisées dans les étapes ultérieures.

Un contrôle est réalisé en prélevant 5 µl de ce mélange que l'on ajoute à 0,5 µl de α ³²P dCTP (800 Ci/mmol). Cet aliquot permet l'analyse qualitative et quantitative de la synthèse du premier brin d'ADNc. L'échantillon et son témoin sont placés 1 h à 37°C. Après l'incubation, le témoin radioactif est congelé à -20°C pour une analyse ultérieure, tandis que l'échantillon "froid" subira la synthèse du second brin d'ADNc.

X.2. Synthèse du second brin d'ADNc

Aux 45 µl du mélange contenant l'hybride ADNc/ARNm sont ajoutés :

Tampon de synthèse du second brin	40 µl
Mélange de nucléotides (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	6 µl
Eau	300 µl
α ³² P dCTP (800 Ci/mmol)	2 µl
Ribonucléase H (4 U/µl)	1 µl
ADN polymérase I (10 U/µl)	6,5 µl

Après agitation douce, l'échantillon est placé à 16°C pendant 2 h 30.

X.3. Extraction de l'ADNc double brin

L'ADNc double brin est extrait par 400 µl d'un mélange phénol/chloroforme (V/V). Après une agitation vigoureuse et une brève centrifugation, la phase supérieure contenant les acides nucléiques est à nouveau traitée par 400 µl de chloroforme. Le même protocole aboutit à la récupération d'une nouvelle phase supérieure à laquelle sont ajoutés 1/10^e de NaCH₃COO 3 M et 2 à 3 volumes d'éthanol absolu afin de précipiter les ADNc pendant une nuit à -20°C. Le lendemain, les ADNc sont centrifugés à 17000 x g pendant 1 h à 4°C. Les culots sont rincés à l'éthanol 70% et séchés sous air comprimé avant d'être repris dans 43,5 µl d'eau stérile. Un contrôle est effectué en prélevant 5 µl du mélange précédent ; cet aliquot est conservé à -20°C pour une analyse ultérieure.

X.4. Réalisation de "bouts francs" sur l'ADNc double brin

Des extrémités franches sont réalisées sur les ADNc dans le but de leur greffer ultérieurement des adaptateurs contenant un site de restriction pour l'enzyme *EcoRI*, ceci en vue d'une intégration dans un vecteur.

Aux 38,5 µl restant de l'étape X.3 sont additionnés :

Tampon 10X de l'ADN polymérase du phage T4	5 µl
Mélange des désoxyribonucléotides à 2,5 mM	2,5 µl
ADN polymérase de T4 (2,9U/µl)	3,5 µl

L'ensemble est placé à 37°C pendant 30 mn. Le volume final est amené à 100 µl en additionnant de l'eau stérile. Les ADNc à "bouts francs" sont extraits par le mélange phénol/chloroforme, puis chloroforme, avant d'être précipités pendant une nuit à -20°C.

X.5. Ligation des adaptateurs possédant le site *EcoRI*

La ligation des adaptateurs permettra d'obtenir une extrémité cohésive nécessaire à l'insertion dans les "bras" du vecteur. Après centrifugation à 17000 x g pendant 30 mn, les culots sont rincés à l'éthanol 70%, séchés et finalement repris dans 7 µl d'une solution contenant les adaptateurs possédant le site *EcoRI*.

Les adaptateurs sont constitués par deux oligonucléotides de longueur respective de 9 et 13 mers dont les séquences sont les suivantes :

5' AATTCGGCACGAG 3'
 3' GCCGTGCTC 5'

L'oligonucléotide de 9 mers est phosphorylé pour qu'il puisse être ligué aux extrémités "aveugles" des ADNc préalablement synthétisés. Inversement, l'oligonucléotide de 13 mers est déphosphorylé pour éviter toute ligation sur les autres extrémités cohésives.

Le mélange suivant est alors ajouté :

Tampon de ligation 10X	1 µl
ATP 10 mM	1 µl
ADN ligase de T4 (4 WU/µl)	1 µl

La ligation se poursuit pendant 20 h à 8°C. Celle-ci est interrompue en plaçant l'échantillon à 70°C pendant 30 mn.

X.6. Phosphorylation des extrémités *EcoRI*

La phosphorylation de l'oligonucléotide de 13 mers permettra la ligation des ADNc dans le vecteur phagique livré sous une forme déphosphorylée. Les échantillons sont centrifugés brièvement et refroidis à température ambiante avant d'être phosphorylés. Aux 10 µl précédents sont ajoutés :

Tampon de ligation 10X	1 µl
ATP 10 mM	2 µl
Eau stérile	6 µl
Polynucléotide kinase de T4 (10U/µl)	1 µl

L'incubation s'effectue à 37°C pendant 30 mn. L'enzyme est inactivée en chauffant à 70°C pendant 30 mn.

X.7. Digestion par l'enzyme *XhoI*

Le site de restriction pour l'enzyme *XhoI* se situe en 3' de l'amorce utilisée par la transcriptase lors de la construction du premier brin d'ADNc. Après digestion par *XhoI*, l'extrémité cohésive obtenue est utilisée comme deuxième site d'insertion dans les bras du vecteur. Il s'agit donc d'un clonage orienté *EcoRI/XhoI*.

La digestion se réalise à 37°C pendant 1 h 30 en ajoutant dans le tube :

Tampon d'enzyme <i>XhoI</i>	28 µl
<i>XhoI</i> (45U/µl)	2 µl

En fin de réaction sont ajoutés 5 µl de tampon STE 10X.

X.8. Sélection des ADNc en fonction de leur taille

Selon le principe de la chromatographie en gel filtration, les grands segments d'ADNc sortiront les premiers de la

colonne, suivis par les plus petits et finalement par les nucléotides libres.

X.8.1. Préparation de la colonne de gel filtration

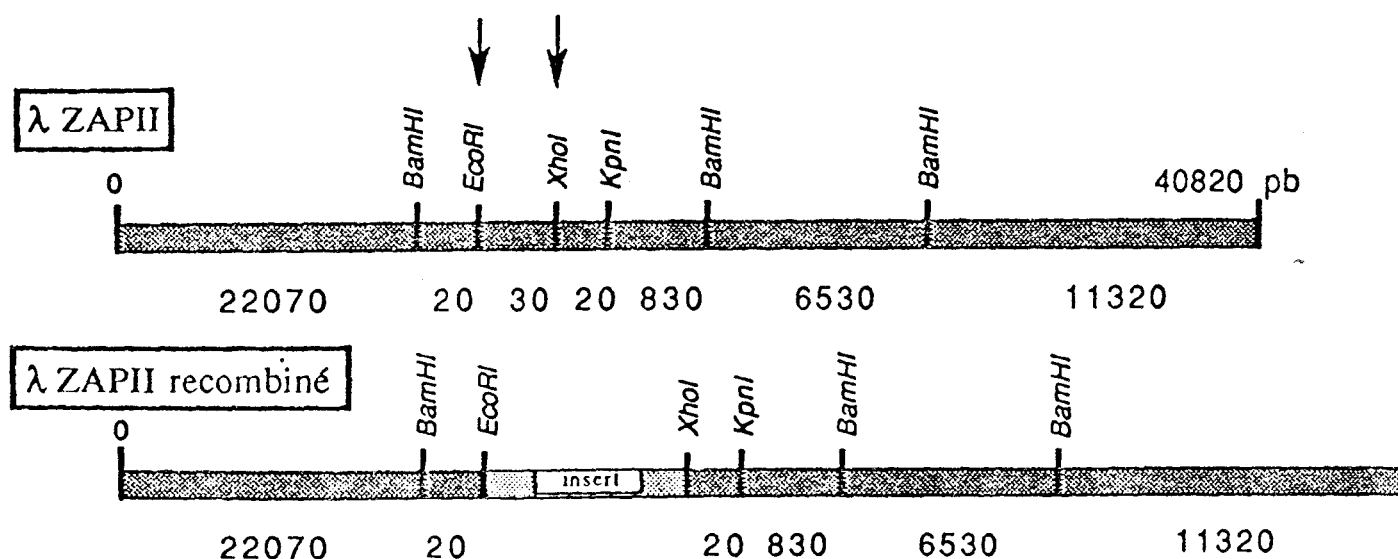
Un coton stérile est placé au fond d'une seringue de 1 ml. La seringue est remplie avec le gel Sephacryl 400 jusqu'à son extrémité supérieure. L'ensemble est placé dans un tube et centrifugé 2 mn à 600 x g, ce qui tasse le gel au fond de la seringue. Cette dernière est à nouveau remplie avec le gel de Sephacryl 400 et centrifugée une seconde fois. La colonne ainsi préparée est rincée par 2 injections de 300 μ l de tampon STE.

X.8.2. Passage des ADNc au travers de la colonne

Les ADNc sont déposés au sommet de la colonne après avoir placé la base de celle-ci dans un tube de type "Eppendorf" stérile. L'ensemble est disposé dans un tube de type "Falcon" de 15 ml pour subir une centrifugation de 2 mn à 600 x g. Les plus grands ADNc se trouvent dans le premier éluat. La même opération peut être répétée plusieurs fois en déposant 50 μ l de tampon STE au sommet de la colonne. Chaque nouvelle centrifugation conduit à l'obtention d'ADNc de plus en plus petits jusqu'à élution des nucléotides libres. Chaque fraction récupérée peut être testée en minigel d'agarose. Après analyse des ADNc contenus dans chaque fraction, ceux-ci subissent une double extraction phénol/chloroforme et chloroforme, avant d'être précipités sur la nuit en ajoutant 2 à 3 volumes d'éthanol absolu froid. L'addition d'acétate de sodium n'est pas nécessaire car le tampon STE contient suffisamment de sels pour la précipitation.

X.9. Ligation des ADNc dans le vecteur λ ZAPII

Site d'insertion de l'ADNc



Après une centrifugation d'1 h à 17000 x g à 4°C, le culot est rincé, séché et repris dans 10 µl d'eau stérile. Le mélange suivant est réalisé :

Solution contenant les ADNc	5 µl
Tampon de ligation 10X	0,5 µl
ATP 10mM (pH 7,5)	0,5 µl
Vecteur UNI ZAP XR (digéré <i>EcoRI/XhoI</i>) (1 µg/ µl)	1 µl
ADN ligase de T4 (4 WU/ µl)	0,5 µl

Un témoin de ligation est effectué en mélangeant

UNI ZAP vecteur digéré <i>EcoRI/XhoI</i> (1µg/ µl)	1 µl
Insert test (0,4 µg/µl) pBR322 digéré <i>Sall/EcoRI</i>	1,6 µl
Tampon de ligation 10X	0,5 µl
ATP 10mM (pH 7,5)	0,5 µl
ADN ligase de T4 (4U/µl)	0,5 µl
Eau stérile	0,9 µl

La ligation est réalisée à 12°C pendant 20 h, puis 2 h à température ambiante.

X.10. Empaquetage *in vitro* de l'ADN phagique recombiné

Le système d'encapsulation *in vitro* utilisé est celui préconisé par la société Stratagène : système "gigapack II Gold packaging extract". L'empaquetage se réalise à 22°C durant 2 h et concerne 5 µl de mélange de ligation. Après l'incubation, on ajoute 500 µl de tampon SM et 20 µl de chloroforme. Un mélange délicat et une centrifugation de quelques secondes permettent la récupération des phages recombinés *in vitro* contenus dans le surnageant. Ils seront stockés à 4°C en attendant d'être titrés.

X.11. Titrage de la banque d'ADNc.

X.11.1. Obtention des bactéries perméables

A partir d'une colonie bactérienne de PLK F' sélectionnée sur boîtes LB/Agar à 1,2% additionnée de tétracycline à 12,5 µg/ml, on réalise une culture liquide qui incube une nuit. Les cellules sont centrifugées et suspendues dans du sulfate de magnésium (MgSO₄) 10 mM. Les bactéries ainsi traitées peuvent être utilisées pour toutes manipulations ultérieures dans un délai de 24 à 48 h. Avant

utilisation, les cellules sont diluées avec du MgSO_4 10 mM de façon à atteindre une densité optique de 0,5 à la longueur d'onde de 600 nm.

X.11.2. Etalement de la banque

Pour déterminer le titre de la banque, 2 μl des 500 μl du mélange d'encapsulation sont prélevés et dilués au $1/10^6$ dans le tampon SM. De ces 20 μl , 1 μl est prélevé. Simultanément, 1 μl de la banque est également prélevé et placé dans un autre tube. 200 μl de bactéries (souche PLK F') perméables sont ajoutés dans chaque tube. Le contact phages/bactéries se déroule à 37°C pendant 15 mn. A la suite de ce contact, 3,5 ml de "Top Agar" (Milieu LB additionné d'agarose à 0,8%), MgSO_4 10 mM à 45°C, sont ajoutés au mélange phages/bactéries. Après une légère agitation, le "Top Agar" est répandu sur un fond d'agar concentré (1,5%) préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Ces dernières incubent à 37°C une nuit.

X.11.3. Amplification de la banque

Il est nécessaire d'amplifier une banque d'ADN phagique recombiné. Cependant de multiples cycles d'amplification ne sont pas conseillés, car les phages recombinés ont une croissance plus lente que les phages sauvages et seraient alors moins représentés. En fonction du titre initial, des dilutions de la banque sont réalisées de façon à obtenir la confluence des plages de lyse. Par le biais de ces dilutions, la banque dans sa totalité est "étalée" en présence de bactéries PLK F'. Cette souche bactérienne n'étant pas restrictive (mcr A⁻, mcr B⁻) aucun ADN hémiméthylé ne sera pas digéré. Les boîtes de Pétri sont placées à 37°C pendant 5 à 8 h pour obtenir des plages de lyse. 4 ml de tampon SM sont répandus à la surface de la gélose de chaque boîte que l'on place à 4°C toute la nuit, sous agitation. Les surnageants enrichis en phages sont rassemblés et additionnés de chloroforme à 5% final. Après un mélange, la banque est incubée 15 mn à température ambiante. Une centrifugation de 5 mn à 3000 x g permet d'éliminer les débris bactériens. Le surnageant est à nouveau récupéré et additionné de chloroforme à 0,3% final. Ce dernier permet de conserver les phages à 4°C pendant plusieurs semaines. Il est à noter qu'après passage en PLK F', les ADN phagiques recombinés ne sont plus hémiméthylés et peuvent être mis en contact avec des souches restrictives (mcr A⁺, mcr B⁺). La détermination du pourcentage de phages recombinés peut être estimée en employant une souche bactérienne dont le génotype comprend le gène de la β -galactosidase (*lac Z*) permettant la sélection par la couleur (cf. matériel et méthodes, chapitre X.11.4.). La souche *E.coli* XL1 Blue est candidate à cette fonction.

X.11.4. Détermination du pourcentage de clones recombinés

Cette étape est impérative car le pourcentage de clones recombinés traduit la représentativité de la cDNAthèque. Des aliquots de la banque amplifiée sont étalés selon le protocole d'amplification. Les bactéries infectées sont des *E. coli* XL1 Blue ; elles permettent de connaître rapidement le rapport entre phages recombinés et non recombinés. Le site d'insertion des ADNc se trouve dans le gène *lac Z* codant pour la β -galactosidase. L'insertion d'un ADNc change la phase de lecture du gène *lac Z* et le rend inactif. En présence d'IPTG (isopropyl-thiogalactopyranoside) (inducteur) et d'X-gal (5 bromo-4-chloro-3 indolyl galactoside) (substrat de la β -galactosidase), le gène *lac Z* d'un phage non recombiné s'exprimera au sein des bactéries. La β -galactosidase, obtenue après transcription du gène *lac Z* et traduction, est active et transformera son substrat (X-gal) en présence d'IPTG, pour développer une coloration bleue. A l'inverse, les phages recombinés ayant un gène *lac Z* modifié exprimeront une protéine de fusion, molécule hybride, résultant de l'association d'une partie de la β -galactosidase (inactive) et de la protéine codée par l'ADNc intégré.

- Obtention des bactéries XL1 Blue perméables: le protocole est le même que celui utilisé pour les PLK F'.

- Préparation du "Top Agar" : pour 50 ml de "Top", on ajoute :
 400 μ l d'IPTG (100 mM) repris dans de l'eau stérile
 500 μ l d'X gal (49 mM) repris dans du diméthylformamide

- La détermination du taux de phages recombinés est réalisée par des dilutions de la banque par entraînement . A 100 μ l de chaque dilution sont additionnés 100 μ l de bactéries perméables. 3,5 ml de "Top Agar" sont ajoutés après 15 mn de contact phages/bactéries. L'ensemble est répandu sur un fond d'agar concentré (1,5%) préalablement coulé dans des boîtes de Pétri.

XI. Criblage de la banque d'ADNc

XI.1. Criblage immunologique

Les divers antisera employés doivent subir un épuisement contre les bactéries utilisées dans les étapes de criblage car l'animal immunisé pourrait avoir synthétisé des anticorps contre les antigènes domestiques d'*E. coli*, ce qui rendrait les immunoréactions aspécifiques.

XI.1.1. Epuisement des anticorps

Une colonie d'*E. coli* XL1 Blue, reprise après isolement sur boîte de Pétri, est ensemencée dans 100 ml de milieu de culture LB. La culture se poursuit une nuit à 37°C sous agitation, puis est centrifugée à 3000 x g pendant 20 mn. Le culot de bactéries est repris dans 10 ml de tampon phosphate salin (PBS). La suspension bactérienne est congelée à -70°C, décongelée puis soumise aux ultra-sons. Cette opération est répétée 3 fois pour lyser les cellules. A ces 10 ml de lysat est ajouté 1 ml de sérum pur. Le mélange est agité 1 h à 4°C, puis centrifugé à 12000 x g pendant 15 mn. Le surnageant ne contient plus, théoriquement, d'anticorps dirigés contre des antigènes bactériens, il peut donc être utilisé en immunoréaction.

XI.1.2. Sélection des clones immunopositifs

Les anticorps employés pour cribler la banque d'ADNc sont les anticorps polyclonaux anti-SISP 10-19, synthétisés par un lapin. Des dilutions de la banque de phages sont réalisées de façon à obtenir environ 10^4 plages de lyse par boîte. Pour chaque étalement, 100 μ l d'une suspension de phages (contenant environ 10^4 clones) sont mis en contact pendant 15 mn avec 100 μ l de bactéries XL1 Blue avant d'être mélangés à 3,5 ml de "Top Agar" selon le protocole décrit précédemment. Les boîtes sont incubées 4 à 5 h à 42°C, en fonction de la vitesse d'apparition des plages de lyse. Lorsque ces dernières sont bien visibles, les filtres de nitrocellulose, préalablement imprégnés d'une solution d'IPTG à 10 mM, sont placés à la surface de la gélose. Les boîtes sont placées dans une étuve à 37°C pendant 5 h. Durant cette incubation, les protéines de fusion sont induites et transférées sur la membrane de nitrocellulose par simple contact avec la gélose. L'empreinte exacte de la boîte ainsi obtenue est soumise à une série de lavages : les membranes sont plongées 3 fois 10 mn dans un tampon de lavage TBST. La saturation des sites non spécifiques est réalisée en plaçant les filtres dans du tampon TBSL pendant 30 mn. Les membranes de nitrocellulose subissent alors 3 lavages de 10 mn dans du tampon TBST. Chaque disque de nitrocellulose est incubé une nuit sous agitation avec 6 ml d'une solution d'anticorps anti-SISP 10-19 diluée au 1/100^e dans un tampon TBSL. Les filtres sont ensuite lavés 3 fois avec le tampon TBST. Ces derniers incubent 1 h 30 à température ambiante dans une solution diluée au 1/2000^e d'anticorps secondaires anti-lapin marqués à la peroxydase (Diagnostic Pasteur). Trois nouveaux lavages avec le tampon TBST précèdent l'ultime étape de la révélation des complexes immuns formés. Pour ce faire, 60 mg de 4-chloro-1-naphtol sont dissous dans 20 ml de méthanol froid. L'ensemble est ajouté à 100 ml de tampon PBS. Le mélange précédent est alors

additionné de 60 μ l d' H_2O_2 à 30%. La révélation des filtres de nitrocellulose se déroule à température ambiante et à l'obscurité de 15 à 30 mn selon le principe décrit dans le paragraphe VII.3.3. La réaction est interrompue en plongeant les filtres dans l'eau distillée. Ceux-ci sont séchés à l'obscurité et peuvent être confrontés à leur boîte de Pétri correspondante. La présence d'une coloration bleue violacée sur la membrane de nitrocellulose traduit la reconnaissance, par l'anticorps anti-SISP, des protéines de fusion des clones recombinés. Les clones positifs sont repiqués en pointant les plages de lyse concernées à l'aide d'un cure-dents. Les phages sont suspendus dans 1 ml de milieu SM auquel est ajoutée 1 goutte de chloroforme pour assurer une bonne conservation des particules à 4°C. Ces étapes de criblage doivent être renouvelées plusieurs fois dans le but d'obtenir 100% de plages de lyse positives sur une même boîte. A ce stade, les phages recombinés sont considérés comme purifiés et spécifiques pour la séquence d'intérêt.

XI.2. Criblage à l'aide d'une sonde d'ADNc spécifiant le SISP chez la limnée

Des dilutions de la banque de phages sont réalisées de façon à obtenir environ 2.10^5 pfu par boîte. Lors des étalements de la banque, 100 μ l d'une suspension phagique sont mis en présence de 100 μ l de bactéries DP50 avant d'être mélangés à 3,5 ml de "Top Agar". L'incubation se déroule à 37°C pendant la nuit. Les molécules d'ADN phagique recombinées sont dénaturées pendant 2 mn avec un tampon de dénaturation et neutralisées pendant 5 mn avec un tampon de neutralisation. Les fragments d'ADN phagique sont fixés sur une membrane de nitrocellulose par une cuisson de 2 h à 80°C. Les filtres de nitrocellulose sont incubés au moins 30 mn à 42°C dans un tampon de préhybridation 7,5XSSC, avant d'être confrontés durant une nuit au tampon d'hybridation 7,5XSSC contenant la sonde préalablement marquée par la radioactivité (paragraphe XV.I.). La nitrocellulose subit 2 lavages de 15 mn en 2XSSC à 42°C (lors du premier criblage) ou 2 lavages de 15 mn en 0,1XSSC additionné de 0,1% SDS (lors des deux derniers criblages), avant d'être séchée et placée en autoradiographie. Pour chaque rondelle de nitrocellulose déposée, un réplikat est réalisé et celui-ci est traité selon le même protocole. La comparaison d'un filtre et de son réplikat permettra d'éliminer des signaux autoradiographiques aspécifiques ("points de sonde").

XII. Production en grande quantité des phages sélectionnés

Avant de passer à la production massive des phages sélectionnés, il est prudent de vérifier la qualité de leur ADN. Pour se faire, des "ministocks" de phages sont réalisés en vue d'une extraction de leur matériel génétique.

XII.1. Vérification de la présence d'insert au sein des phages

XII.1.1. Réalisation des "ministocks"

Les phages d'une plage de lyse sont mis en contact avec 200 μ l d'une suspension de bactéries XL1 Blue perméables pendant 15 mn à 37°C ; ce mélange est dilué par 10 ml de milieu LB. L'ensemble est incubé à 37°C sous agitation de 4 à 8 h, jusqu'à l'obtention de la lyse avancée des bactéries. A ce stade, 100 μ l de chloroforme sont ajoutés pour éliminer les éventuelles bactéries persistantes. Après agitation, le mélange est placé à température ambiante pendant 15 mn. Ce "ministock" de phages peut être conservé à 4°C avant utilisation.

XII.1.2. Préparation d'ADN phagique

La préparation d'ADN phagique s'effectue à partir de 3 ml de "ministock" de suspension de phages auxquels sont ajoutés 150 μ l de DNase I à 1 mg/ml et 50 μ l de RNase à 2 mg/ml, dans le but d'éliminer les acides nucléiques bactériens. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30 mn. L'étape suivante consiste à éliminer les enzymes ajoutées (notamment la DNase I) dans le mélange, car celles-ci pourraient ultérieurement dégrader l'ADN phagique. L'élimination des enzymes s'effectue à 37°C pendant 5 mn, en ajoutant dans le tube: Tris-HCl 20 mM, pH 8, EDTA 20mM, pH 8 et 3,4 mg de protéinase K. La capside des phages est détruite par l'addition de 85 μ l de sarcosyl 20%. Le tout est incubé 1 h à 37°C. L'ADN subit successivement 3 extractions par le phénol (V/V), par le mélange phénol/chloroforme (V/V) et par le chloroforme. Chaque extraction est suivie d'une brève centrifugation de 3 mn. La phase supérieure contenant l'ADN est précipitée pendant la nuit à -20°C en ajoutant 1/10^e de NaCH₃COO 3 M et 2 à 3 volumes d'éthanol absolu. La suspension de molécules est centrifugée 30 mn à 17000 x g. Le culot d'acides nucléiques est rincé, séché, repris dans 100 μ l de tampon TE, puis dilué par microdialyse contre ce même tampon pendant 1 h (Millipore VS 0,025 μ m).

XII.1.3. Digestion des ADN phagiques

Les enzymes *EcoRI* et *XhoI* doivent être utilisées pour digérer les ADN phagiques recombinés, puisque les ADNc ont été clonés dans ces sites de restriction. L'expérience nous a montré que cette double digestion restait inefficace. En conséquence, notre choix s'est porté sur l'enzyme *BamHI* dont 2 motifs de restriction encadrent le site de clonage multiple. La digestion est réalisée sur 20 μ l de solution d'ADN dialysé auxquels sont ajoutés 2 μ l de tampon d'enzyme 10X et 1 μ l d'enzyme *BamHI* à 10U/ μ l, pendant 1 h à 37°C. 4 μ l de bleu de charge (6X) sont ajoutés au mélange de digestion avant que celui-ci soit analysé par électrophorèse.

XII.1.4. Analyse électrophorétique des ADN digérés

Les échantillons sont déposés dans un gel d'agarose à 1% dans un tampon TAE. La migration s'effectue à 50 V.

XII.2. Préparation de gros stocks d'inserts

Les bactéries perméables sont préparées selon le protocole déjà décrit. Cependant, la concentration des cultures diffère. Pour cette production de phages en masse, la culture de bactéries doit être en fin de phase exponentielle de croissance et, par conséquent, la suspension doit atteindre une densité optique de 1,4 à 600 nm. Après centrifugation, le culot de bactéries est repris par une quantité suffisante de MgSO_4 10 mM afin d'obtenir la même D.O.

50 ml de milieu LB/ MgSO_4 10 mM sont additionnés à 2 ml de "ministock" (10^8 à 10^9 phages/ml), l'ensemble est placé à 37°C pendant 15 mn. 50 ml de bactéries perméables (D.O. 1,4) sont ajoutés au mélange précédent, ainsi que 400 ml de milieu LB/ MgSO_4 10 mM, pour obtenir 500 ml de culture. Un témoin est réalisé en plaçant 50 ml de bactéries dans 450 ml de milieu LB/ MgSO_4 , sans addition de phages, de façon à suivre l'évolution de la lyse des échantillons. L'ensemble est incubé à 37°C sous forte agitation jusqu'à l'obtention de la lyse avancée des bactéries. Celle-ci intervient après 4 à 5 h d'incubation. Pour parfaire l'élimination des bactéries, 5 ml de chloroforme sont additionnés à la culture. Après 15 mn à température ambiante, la culture est centrifugée à 7500 x g pendant 10 mn, afin d'éliminer les débris bactériens. Une fraction du surnageant (15 ml) est conservée à 4°C en ajoutant quelques gouttes de chloroforme ; celle-ci constitue un nouveau stock de phages fortement concentré. Le reste de la préparation subit un traitement au PEG (polyéthylèneglycol 6000) dans le but de précipiter les phages. La culture est versée délicatement dans un erlen placé dans la glace, contenant 50 g de PEG et 12,5 g de NaCl. L'ensemble est agité délicatement jusqu'à dissolution complète du mélange PEG/NaCl

et laissé une nuit à 4°C. Les phages précipités sont récupérés par centrifugation de la culture à 9800 x g pendant 20 mn. Après élimination des surnageants, les culots sont séchés et toutes traces de PEG soigneusement éliminées. Les culots (correspondant à 500 ml de culture) sont repris par 8 ml de tampon TMN 0,5 M. Une extraction par un égal volume de chloroforme, suivie d'une centrifugation à 2000 x g pendant 15 mn, permet d'éliminer une grande partie des protéines présentes dans l'échantillon. Celles-ci forment une "galette" à l'interface des phases aqueuse et chloroformique. La phase aqueuse (supérieure) est prélevée et pesée ; si son poids n'atteint pas 9,5 g, elle est amenée à ce poids avec du tampon TMN 0,5 M. Cette solution est alors ajoutée à 6,5 g de CsCl, ce qui conduit au volume final de 10 ml et la concentration finale en CsCl à 0,65 g/ml. Ces 10 ml sont répartis dans 2 tubes à centrifuger en évitant la formation de bulles d'air. Les tubes à sceller (Quick seal, ref. 344389, Beckman) sont minutieusement équilibrés, soudés et centrifugés à 328000 x g pendant 4 h à 14°C.

Les particules phagiques migrent dans le tube en fonction de leur densité et se rassemblent en une bande opalescente. Celle-ci est récupérée à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue de 1 ml. Pour éliminer le CsCl, les échantillons sont dialysés contre un tampon STE 3 fois 30 mn, puis une nuit à 4°C sous agitation. Au total, environ 3 ml de solution phagique sont obtenus. Les phages sont alors traités par la protéinase K à 20 mg/ml 5 mn à température ambiante, puis par du sarcosinate 0,5% final, 2 h à 37°C. Les ADN phagiques sont extraits au phénol, phénol/chloroforme, chloroforme avant d'être précipités par 2 à 3 volumes d'éthanol absolu. Les fibres d'ADN sont enroulées autour d'une pipette Pasteur à bout recourbé, rincées à l'éthanol 70%, séchées et reprises dans 500 µl de tampon TE 1X.

La solution d'ADN subit alors une digestion par l'enzyme *BamHI* à 40U/µl pendant 4 h à 37°C. Les produits de digestion sont précipités pour être repris dans un volume de 50 µl, avant d'être séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% dans un tampon TAE.

XII.3. Préparation des inserts

Lorsque les fragments de restriction sont nettement séparés, l'insert est libéré du gel d'agarose en découpant une fenêtre aussi précise que possible, de façon à ne pas prélever un excès de gel. Ce découpage s'effectue sur une table à ultra-violets, le plus rapidement possible afin de ne pas endommager l'ADN. Ce fragment de gel est lui-même découpé en petits éléments à l'aide d'un scalpel stérile. Ces fragments sont placés dans une unité de filtration (ultrafree LC 0,45 µm), qui est mise à flotter sur de l'azote liquide pendant 5 mn, ce qui permet une congélation rapide du matériel. L'ensemble est décongelé lentement à température ambiante avant de subir une centrifugation de 15 mn à 17000 x g. Le filtrat récupéré est placé dans

une seconde unité de filtration (ultrafree LC 10K NMWL) pour y subir une autre centrifugation de 5 mn à 17000 x g. Ces opérations sont renouvelées tant qu'un filtrat est obtenu après chaque centrifugation. Les inserts ainsi obtenus sont dialysés contre de l'eau distillée avant d'évaluer leur concentration en gel d'agarose.

XIII. Sous-clonage des inserts dans le plasmide pUC18

XIII.1. Digestion du vecteur

Le plasmide est digéré par l'enzyme de restriction ayant permis de sortir l'insert dans l'étape précédente ; il s'agit donc ici de *BamHI*.

XIII.2. Ligation de l'insert dans le vecteur

Le rapport insert/vecteur doit être de l'ordre de 5, en tenant compte de la taille des molécules, ce qui rend les calculs de concentration spécifiques pour chaque fragment d'ADN cloné.

Exemple: le nombre de molécules de pUC 18 dans 10 ng nous est donné par le rapport : masse/taille, c'est-à-dire 10 ng/2,7 kpb, soit environ 4 molécules de vecteur. Il faut par conséquent 20 (4 fois 5) molécules d'insert. Pour déterminer la quantité d'insert à liguer, correspondant à 20 molécules, il suffit d'effectuer l'opération inverse : 20 fois 3,8 kpb (taille du fragment inséré), soit environ 76 ng.

Composition du mélange de ligation :

Insert	3,5 µl (76 ng)
pUC 18	1 µl (10 ng)
Tampon ligase (pUC)5X	2 µl
Ligase (pUC)(1U/µl)	1 µl
Eau	qsp 10 µl

La ligation se poursuit une nuit à 14°C.

XIII.3. Préparation des bactéries compétentes

Une culture d'*E. coli* JM109 est réalisée dans le milieu 2XTY, jusqu'à ce qu'elle atteigne la phase exponentielle. La culture est alors stockée une nuit à 4°C, puis est diluée au demi et placée à 37°C sous agitation pour qu'une nouvelle phase exponentielle soit atteinte. La croissance cellulaire est alors arrêtée en plaçant la culture dans la glace. L'ensemble des manipulations suivantes s'effectue dans la glace.

Les bactéries sont centrifugées pendant 10 mn à 1100 x g; le surnageant est éliminé et les culots sont repris par 3 ml d'eau physiologique. La suspension bactérienne est à nouveau centrifugée. Après élimination des surnageants, les culots sont homogénéisés dans 3 ml du tampon de perméabilisation FTB. L'ensemble est placé dans la glace pendant 20 mn, puis centrifugé pendant 10 mn à 800 x g. Le surnageant est éliminé et les culots repris dans 0,6 ml de tampon FTB. Le mélange est placé à nouveau 5 mn dans la glace après l'addition d'une goutte de diméthyl-sulfoxyde DMSO. Une goutte de β -mercaptoéthanol à 2,25 M (dans de l'acétate de potassium 40 mM, pH 7,4) est ajoutée au mélange précédent. La suspension bactérienne est encore refroidie 10 mn dans la glace avant d'y ajouter une goutte de DMSO. A ce stade, les bactéries perméabilisées peuvent être conservées au froid et restent utilisables pendant 24 h.

XIII.4. Transfection des plasmides recombinés

Le mélange de ligation est additionné à 100 μ l de bactéries compétentes. Après agitation douce, les échantillons sont placés 20 mn dans la glace, ce qui permet aux plasmides d'adhérer à la paroi des bactéries. Ces dernières subissent alors un choc thermique dans un bain-marie à 37°C pendant 90 s, ce qui induit la pénétration des plasmides dans les bactéries. Celles-ci sont à nouveau refroidies 2 mn dans la glace. La suspension est diluée par 400 μ l de milieu 2XTY. Le mélange de transfection incube 45 mn à 37°C. 10 μ l de vecteur non recombiné à 1 ng/ μ l mis en présence de 100 μ l de bactéries compétentes constituent le témoin de transfection.

XIII.5. Etalement des mélanges de transfection

3 ml de "Top Agar" à 0,8% contenant 30 μ l d'IPTG à 24 mg/ml et 30 μ l d'XGal à 30 mg/ml sont répandus sur un fond de milieu LB gélosé à 1,5%. Le mélange de transfection est divisé en deux parties (1/10^e, 9/10^e) dans le but d'obtenir des colonies bactériennes bien isolées. Ces deux étalements sont incubés à 37°C une nuit. Le témoin subit le même protocole. Les bactéries des colonies blanches peuvent être réétalées sur des boîtes LB à 1,2% d'agar contenant de l'ampicilline à 50 μ g/ml. Des extractions d'ADN plasmidique seront effectuées sur ces colonies afin de vérifier la recombinaison des plasmides.

XIII.6. Vérification de la présence des inserts après extraction de l'ADN plasmidique

Les étalements bactériens sont raclés et additionnés à 300 µl de tampon STET. Après une agitation vigoureuse, 50 µl d'une solution de lysosyme à 10 mg/ml dans un tampon GlucTE sont ajoutés à l'ensemble. Les échantillons sont vivement agités et mis à bouillir pendant 40 secondes. Ils subissent une centrifugation de 5 mn à 17000 x g. L'ADN bactérien est éliminé à l'aide d'un cure-dents. Le volume réactionnel de chaque échantillon est ajusté à 400 µl avec de l'eau stérile avant d'y ajouter 40 µl de NaCH₃COO 3 M et 440 µl d'isopropanol froid pour précipiter l'ADN plasmidique. Les échantillons sont centrifugés 30 mn à 17000 x g et les surnageants éliminés; les culots sont lavés à l'éthanol 70%, séchés et repris dans 30 µl d'eau. Une digestion de l'ADN plasmidique par l'enzyme *Bam*HI, suivie d'une analyse électrophorétique, permet de sélectionner les clones recombinés.

XIII.7. Préparation massive de plasmides recombinés

Après la sélection exposée au paragraphe précédent, le clone bactérien d'intérêt est mis en culture dans 250 ml de LB à 37°C. L'incubation se poursuit jusqu'à obtenir une densité optique comprise entre 1 et 1,5 (fin de phase exponentielle). Lorsque la DO souhaitée est atteinte, une solution de chloramphénicol dans l'éthanol est ajoutée afin d'obtenir la concentration finale de 170 µg/ml. L'ensemble est placé à 37°C pendant 18 à 21 h. Après centrifugation de la culture 10 mn à 3000 x g, le culot est repris dans le mélange suivant :

- 5 ml de Gluc TE
- 10 ml de tampon de lyse (SDS 1%, NaOH 0,2 M)

La suspension bactérienne est agitée et placée 5 mn dans la glace. 5 ml de tampon KAC sont ajoutés au mélange précédent. Après une agitation douce, l'ensemble est conservé 7 mn dans la glace. Le lysat est centrifugé pendant 10 mn à 3000 x g et le surnageant filtré au travers d'un coussin de laine de verre autoclavée. Le filtrat est précipité à l'isopropanol (V/V) et placé à -20°C sur la nuit. Le précipité est récupéré par une centrifugation de 30 mn à 17000 x g. Le culot est séché, repris dans 3 ml de TE avant d'ajouter 1,25 g/ml de CsCl. 100 µl d'une solution de BET à 2 mg/ml sont additionnés au mélange précédent. La solution est centrifugée à 230000 x g durant la nuit. Le BET permet de visualiser les bandes d'ADN bactérien et plasmidique. La bande inférieure, correspondant à l'ADN plasmidique, est prélevée à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue de 1 ml. Le BET est éliminé par

3 extractions à l'isopropanol (V/V). La préparation est dialysée contre de l'eau pendant plusieurs heures en renouvelant régulièrement les bains pour éliminer toute trace de CsCl. Après un ultime test de digestion enzymatique par *BamHI* et une vérification par électrophorèse, les échantillons sont aliquotés et conservés à -20°C.

XIII.8. Elimination d'un segment du vecteur flanquant l'ADNc d'intérêt

La stratégie employée à ce sujet est détaillée dans le chapitre "Résultats", paragraphe VII.4. Elle consiste, après le sous clonage en plasmide pUC 18 à éliminer un fragment d'ADN d'origine phagique entraîné lors de la digestion par l'enzyme *BamHI* dans l'étape de sortie des inserts. Le plasmide recombiné amputé de ce fragment est circularisé par une ligase et transfecté dans des bactéries JM109 rendues compétentes.

Le mélange de ligation est le suivant :

Solution de plasmide recombiné (5,6 kbp)	8 µl (25 ng)
Tampon de ligation 10X	2 µl
Ligase (1U/µl)	2 µl
Eau	qsp 20 µl

La transfection et son témoin sont réalisés selon le protocole déjà évoqués.

XIV. Cartographie de l'insert de 2,9 kpb

Plusieurs enzymes appartenant au site de clonage multiple ("polylinker") du plasmide pUC 18 ont été testées sur le plasmide recombiné avec l'insert de 2,9 kpb. Ces digestions ont pour but de connaître le nombre et la nature des sites de restriction présents dans l'insert, de découper ce dernier en plusieurs fragments qui seront confrontés ultérieurement à une sonde oligonucléotidique, spécifique du SISP de la limnée, et enfin d'améliorer les conditions de séquençage de l'insert, en raccourcissant ce dernier. En effet, seul(s), le (ou les) fragment(s) hybridé(s) avec la sonde oligonucléotidique seront séquencés. Les 9 enzymes suivantes ont été utilisées : *AccI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SacI*, *Sall*, *SmaI*, *SphI* et *XbaI*. Les digestions s'effectuent à 37°C pendant 30 mn (à l'exception de *SmaI* à 25°C) sur 1 µg de plasmide. Dans chaque cas, le mélange suivant est :

pUC recombiné (500 ng/µl)	2 µl
Eau	18 µl
Tampon d'enzyme 10X	2 µl
Enzyme (5 à 10U/µl)	1 µl

Le principe de ces digestions repose sur l'existence d'un site de restriction dans le plasmide ; en absence d'un même site dans l'insert, le plasmide recombiné sera coupé une fois et donc linéarisé. A l'inverse, si un ou plusieurs sites de restriction existent dans l'insert, le plasmide recombiné sera coupé en deux ou plusieurs fragments. L'analyse électrophorétique des produits de digestion permet d'obtenir une réponse rapide.

XV. Sous-clonage des inserts en phage M13mp18

Le fragment d'intérêt (1,9 kpb) est digéré par une enzyme de restriction de façon à obtenir des fragments d'ADN de taille inférieure. Ces produits de digestion sont clonés dans le phage M13mp18 (technique du "shot gun"). Les phages recombinés sont étalés et leur contenu en ADN confronté à la sonde oligonucléotidique SISP7 ayant permis d'isoler ce fragment.

XV.1. Digestion du fragment d'intérêt

Ce fragment est digéré par l'enzyme *Sau3A* dont le site de restriction n'existe pas dans le site de clonage multiple du phage M13, mais est compatible avec celui de l'enzyme *BamHI* présent dans le "polylinker". Les digestions sont réalisées sur environ 500 ng d'ADN dans un volume réactionnel de 20 µl.

XV.2. Digestion du phage M13

Il faut signaler ici que le fragment de 1,9 kpb a été obtenu par une double digestion *KpnI/AccI*. Ce fragment possède donc des extrémités cohésives spécifiques pour ces deux enzymes. Si la séquence reconnue par la sonde oligonucléotidique SISP7 se situe à l'une ou l'autre des extrémités de la molécule de 1,9 kpb, un clonage dans le site *BamHI* ne permettra pas d'isoler le clone d'intérêt. C'est pourquoi trois digestions distinctes ont été réalisées sur le phage M13 :

- une digestion par l'enzyme *BamHI*
- une double digestion par les enzymes *BamHI* et *KpnI*
- une double digestion par les enzymes *BamHI* et *AccI*

Les digestions se réalisent sur environ 50 ng de vecteur dans un volume de 20 µl pendant 1 h à 37°C.

XV.3. Ligation des fragments de digestion dans le phage M13

La ligation est réalisée dans un volume de 20 μ l à 14°C pendant la nuit, en utilisant un rapport de 1/1 entre le vecteur et les produits à cloner.

XV.4. Préparation des bactéries compétentes

Les bactéries utilisées sont des *E. coli* TG1 mâles. La compétence des bactéries est obtenue selon le protocole décrit au paragraphe XIII. 3.

XV.5. Transfection des phages recombinés

La totalité du mélange de ligation est ajouté à 100 μ l de bactéries TG1 compétentes et placé 20 mn dans la glace. Les bactéries subissent un choc thermique à 37°C pendant 90 s et sont replacées immédiatement dans la glace avant l'étalement.

XV.6. Etalement des mélanges de transfection

Deux tubes contenant 200 μ l de bactéries TG1 indicatrices additionnées de 50 μ l d'X-Gal (30 mg/ml) et 50 μ l d'IPTG (24 mg/ml) sont préparés. Dans un tube est déposé 1/10^e du mélange de transfection et dans l'autre les 9/10^e restant. Les deux échantillons sont repris par 3 ml de "Top Agar" et étalés sur un fond de milieu LB gélosé. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant la nuit.

XV.7. Préparation des matrices

Les matrices simple brin sont produites à partir des clones sélectionnés dans le but de séquencer les fragments d'ADN insérés. Si les plages de lyse blanches obtenues après étalement des mélanges de transfection sont bien isolées, elles peuvent être piquées directement avec un cure-dents. Ce dernier est placé dans 12,5 ml de milieu 2XTY en présence de bactéries TG1 mâles pendant 4 à 5 h sous agitation à 37°C. Après une centrifugation de 5 mn à 3000 x g, le surnageant est récupéré et ajusté à 10 ml auxquels sont ajoutés 1 ml de PEG (à 40%) et 1 ml de NaCl (5M). La précipitation se poursuit à 4°C pendant la nuit. Après une centrifugation de 5 mn à 3000 x g, les culots sont soigneusement séchés et repris dans 400 μ l de tampon TE filtré. Les échantillons subissent une extraction par 400 μ l de phénol puis par 400 μ l de chloroforme et enfin par 400 μ l d'éther. La phase supérieure est éliminée par aspiration et la phase inférieure est additionnée d'1/10^e de volume de NaCH₃COO et 2 à

3 volumes d'éthanol absolu pendant 2 h à -20°C. Après une centrifugation de 30 mn à 17000 x g, les culots sont rincés à l'éthanol 70%, séchés et repris dans 30 µl d'eau. Les matrices sont testées en déposant 2 µl dans un minigel d'agarose à 1% dans le tampon TBE additionné de BET.

XVI. Marquage des sondes utilisées

XVI.1. Marquage de l'ADNc selon la technique dite de "ramdom prime"

XVI.1.1. Protocole opératoire

Les conditions opératoires utilisées sont celles préconisées par la société Boehringer Mannheim. Un marquage concerne environ 100 ng de sonde dénaturée. Le volume final de la réaction est de 20 µl répartis de la façon suivante :

Sonde (ADNc dénaturé)	9 µl
d ATP 0,5 mmol/l dans Tris	1 µl
d GTP " "	1 µl
d TTP " "	1 µl
Mélange hexanucléotidique dans tampon de réaction 10X	2 µl
α ³² P dCTP, 3000 Ci/mM	5 µl
Enzyme de Klenow 2U/µl	1 µl

L'ADNc est dénaturé avant le marquage en le plaçant 10 mn à 95°C. L'incubation s'effectue sur la nuit à 37°C. La réaction est interrompue en ajoutant 2 µl d'EDTA à 0,2 M, pH 8 ou par chauffage à 65°C pendant 10 mn.

XVI.1.2. Purification de la sonde

Les nucléotides non incorporés lors du marquage sont éliminés par passage sur colonne de gel filtration ("quick spin column", Boehringer, Mannheim). Le tube est rincé par 20 µl d'eau distillée pour éviter la perte de matériel. L'ensemble du mélange réactionnel est déposé sur l'extrémité supérieure de la colonne qui subit alors une centrifugation de 4 mn à 1100 x g. Les ADNc marqués sont récupérés dans le premier éluat.

XVI.2. Marquage de l'ADNc selon la technique dite de "nick translation".

Un marquage concerne environ 300 ng de sonde dénaturée. Le volume final réactionnel est de 50 μ l répartis de la façon suivante:

Sonde ADNc (300ng)	10 μ l
Tampon d'enzyme contenant les dXTP(5X)	10 μ l
α 32 P dCTP 3000 Ci/mM	5 μ l
Enzyme	7 μ l
eau	qsp 50 μ l

L'incubation se réalise à 15°C pendant 1 h. La réaction est arrêtée par la protéinase K pendant 10 mn à 37°C. La sonde ainsi marquée est purifiée sur colonne G50 ("quick spin column" cf. paragraphe XVI.I.2.), puis dénaturée avec de la soude à la concentration finale de 100 mM. Une goutte de rouge de phénol est ajoutée pour visualiser la basicité de la solution.

XVI.3. Marquage des sondes oligonucléotidiques

XVI.3.1. Protocole opératoire

Les sondes oligonucléotidiques simple brin sont récupérées selon le protocole de Rosenberg *et al.*, (1980) et Collins et Hunsaker (1985). Les sondes sont reprises dans de l'eau stérile de façon à obtenir une concentration de 30 ng/ μ l.

Le mélange réactionnel est le suivant :

- eau stérile contenant la sonde (30 ng/ μ l)	5 μ l
- tampon 10X de transférase terminale (cacodylate de sodium 1 M, MgCl ₂ 1 mM, MnCl ₂ 1 mM, DTT 1 mM)	2 μ l
- eau distillée	1 μ l.
- α 32 P dCTP (3000 Ci/mM)	5 μ l

L'ensemble est placé à 65°C pendant 10 mn pour assurer la dénaturation de la sonde oligonucléotidique, puis est refroidi dans la glace. 2 μ l de déoxynucléotidyl transférase terminale (Amersham) sont ajoutés au mélange précédent. Le marquage s'effectue à 37°C pendant 2 h, avant d'être interrompu par l'addition d'1 μ l d'EDTA 0,5 M, pH 7,4. 10 μ l d'ADN dénaturé de sperme de saumon (10 mg/ml) sont ajoutés avant précipitation des échantillons.

XVI.3.2. Purification de la sonde

La sonde marquée est purifiée par une précipitation d'une nuit à -20°C en présence de 2 µl de NaCH₃COO 3 M et 60 µl d'éthanol absolu à -20°C. Une centrifugation pendant 1 h (17000 x g, à 4°C) permet d'obtenir un culot contenant la sonde ; l'ADN de sperme de saumon joue son rôle d'entraîneur. Le culot est lavé par 600 µl d'éthanol 70%, séché et repris dans 500 µl d'eau.

XVI.3.3. Evaluation du marquage

L'efficacité du marquage est évaluée par la détermination de l'incorporation des nucléotides radioactifs dans 5 µl de milieu réactionnel au moyen d'un compteur β (LKB), dont la longueur d'onde est réglée entre 110 et 212 nm. Il est souhaitable que la radioactivité soit supérieure à 5.10⁶ cpm pour que la sonde ait une bonne efficacité.

XVII. Hybridations moléculaires

XVII.1. Hybridation des inserts (ou des fragments amplifiés par PCR) sur l'ADN génomique de néréis

XVII.1.1. Préhybridation

La préhybridation se déroule pendant 2 h à 42°C dans une solution de préhybridation :

Formamide	50%
SSC	5X
Solution de Denhardt's	5X
SDS	0,1%
ADN de sperme de saumon à 25 µg/ml final	

XVII.1.2. Hybridation

La solution d'hybridation est de composition identique à celle de préhybridation. Il suffit d'y ajouter la sonde marquée après une dénaturation de 10 mn à 95°C. L'incubation se poursuit pendant 15 à 20 h à 42°C. Après utilisation, la solution d'hybridation peut être conservée à -20°C et réemployée ultérieurement. La nitrocellulose est alors soumise à une série de lavages.

XVII.1.3. Lavages de la membrane de nitrocellulose

Les lavages sont de stringence croissante dans le but d'éliminer progressivement les hybridations non spécifiques. Les 4 lavages suivants ont été réalisés :

- 2 lavages en SSC 2X, SDS 0,1%, 15 mn à 25°C
- 1 lavage en SSC 0,1X, SDS 0,1%, 15 mn à 55°C
- 1 lavage en SSC 0,1X, SDS 0,1%, 15 mn à 60°C

Après le dernier lavage, la nitrocellulose est séchée sur papier Whatman 3, puis placée en autoradiographie dans un sac plastique scellé.

XVII.2. Hybridation de sondes oligonucléotidiques synthétisées à partir du SISP de limnée

XVII.2.1. Calcul des conditions d'hybridation

Les séquences nucléotidiques des sondes sont les suivantes:

SISP 7: GCG TCG TAT GAG CTC ATG GGG ACT GAG GGC A
(31 mers)

SISP 8: ACC GAG CTG CCC ATT CGA AGT GGA CTC TGG
(30 mers)

Ces sondes oligonucléotidiques ont déjà permis d'obtenir des résultats chez la limnée (Boer *et al.*, 1992). Le critère déterminant de l'hybridation moléculaire est le degré nommé T_m ("melting temperature"), c'est-à-dire la température à laquelle 50% des molécules d'ADN sont théoriquement sous forme monocaténaire. Le T_m est affecté par la force ionique du milieu, par le pourcentage en bases G+C, par la longueur de la sonde oligonucléotidique et par la concentration en agent déstabilisant la double hélice d'ADN telle la formamide. Nous avons déterminé le T_m en appliquant la formule issue de l'analyse de ces différents facteurs par Meinkoth et Wahl (1984).

$$T_m = 81,5 + 16,6 \text{ Log}(\text{Na}^+) + 0,41 (\% \text{ GC}) - \frac{500}{L} - 0,61 (\% \text{ formamide})$$

Une force ionique de 5X SSC correspond à un milieu standard utilisé dans les expériences d'hybridation. Les caractéristiques des 2 sondes, ainsi que l'ensemble des paramètres utilisés pour le calcul de leur T_m respectif sont résumées dans le tableau suivant :

Localisation des séquences	SISP 7 N-terminale	SISP 8 C-terminale
Caractéristiques des sondes:		
%G+C	61	60
Longueur	31 mers	30 mers

Conditions utilisées: (Na⁺)=1M ; formamide 50%

Dans ces conditions, les T_m déterminées d'après la formule de Meinkoth et Wahl sont de 60°C pour la sonde SISP7 et 59°C pour la sonde SISP8. Il est usuel, selon Lathe (1985), de pratiquer les hybridations à une température inférieure de 5 à 25°C à la T_m. Nous avons par conséquent réalisé les préhybridations et hybridations à 42°C.

XVII.2.2. Préhybridation

La membrane de nitrocellulose est incubée 2 h à 42°C dans une solution de préhybridation :

Formamide	50%
SSC	5X
Solution de Denhardt's	5X
SDS	0,1%
ADN de sperme de saumon dénaturé à 25 µg /ml final	

XVII.2.3. Hybridation

L'ADN de la sonde marquée (300 ng) est dénaturé et l'ensemble est incorporé dans une solution d'hybridation:

Formamide	50%
SSC	5X
Solution de Denhardt's	5X
SDS	0,1%
ADN de sperme de saumon dénaturé à 25 µg/ml final	

L'hybridation se poursuit de 18 à 24 h à 42°C.

XVII.2.4. Lavages

Nous avons réalisé des lavages de stringence considérée comme moyenne. En effet, la divergence entre la séquence nucléotidique des sondes (SISP de la limnée) et celle des ADN de *Nereis* augmente l'instabilité des hybridations. L'augmentation de la stringence des lavages a été établie par une diminution progressive de la force ionique, en maintenant une température constante.

Une série de 6 lavages a été réalisée :

Séquence partielle des gènes de la prodynorphine chez l'Homme (1), le porc (2) et le rat (3)

1 TCAAACGC**T**ATGGGGGCTTTTTGCGCAAATACCCCAAGAGGAGCTCAGAGGTGGCTGGGG
OD1
2 TCAAACGTTATGGGGGCTTTCTGCGCAAATACCCCAAAAGGAGCTCAGAAGTGGCTGGGG
3 CCAAACGC**T**ATGGCGGCTTTTTTGCGCAAATACCCCAAGAGGAGCTCCGAGATGACTGGGG

AGGGGGACGGGGXXXXXXATAGCAXXXXXXTGGGCCATGAGGACCTGTACAAACGCTATG
AGGGGGATGGGGXXXXXXACAGGGATAAGGTGGGT CATGAAGACCTGTACAAGCGCTACG
ACGAGGACAGGGGGCCAGGATGGGGATCAGGTAGGGCATGAGGACCTGTACAAACGCTATG

GGGGCTTCTTGCGGGCGCATTCGTCCCAAGCTCAAGTGGGACAACCAGAAAGCGCTATGGCG
OD2
GGGGCTTCTTACGGCGCATTCGTCCCAAGCTCAAGTGGGACAACCAGAAAGCGCTATGGTG
GGGGCTTCTTGCGGGCGCATTCGCCCCAAGCTTAAGTGGGACAACCAGAAACGCTATGGTG

GTTTTCTCCGGCGCCAGTTCAAGGTGGTGACTCGGTCTCAGGAAGATCCGAATGCTTACT
 GTTTTCTCCGGCGCCAGTTCAAGGTGGTTACTCGGTCTCAGGAAGACCCCAATGCCTATT
 GTTTTCTGCGGCGTTCAGTTCAAGGTGGTGACTCGGTCCCAGGAGAACCCCAATACCTATT

CTGGAGAXXXXGCTTTTGTATGCA
ATGAAGAXXXXGCTTTTGTATGTG — 3' non codant
CCGAAGATTTAGATGTTGTATGGA

↓ Encadre la séquence spécifiant l' α -néoendorphine.

Encadre la séquence spécifiant la dynorphine 1-17.

- 2 lavages en SSC 5X, SDS 0,1%, 40°C, 15 mn
- 2 lavages en SSC 2X, SDS 0,1%, 40°C, 15 mn
- 2 lavages en SSC 1X, SDS 0,1%, 40°C, 15 mn

XVIII. Amplification de séquences sur ARN extraits de cerveaux de *Nereis*. (Technique de RT-PCR: "Retro-transcription-Polymerase Chain Reaction")

XVIII.1. Rétro-transcription

Chaque rétro-transcription s'effectue avec 15 µg d'ARN contenus dans 25 µl d'eau chauffés à 90°C pendant 2 mn.

Au mélange précédent sont ajoutés :

Oligo "random" (100 mg/ml)	1 µl
dATP	1 µl
dGTP	1 µl
dTTP	1 µl
dCTP	1 µl
RNAsin (Promega)	2 µl
SAB	2 µl
Tampon de rétro-transcription(5X)	10 µl
Transcriptase inverse (50U/µl)	2,5 µl
qsp H ₂ O	50 µl

La réaction se réalise à 37°C pendant 1 h et est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 mn.

XVIII.2. Elaboration des amorces

Toutes les amorces oligonucléotidiques utilisées ont été synthétisées à partir de séquences les plus conservées et les moins dégénérées en se référant aux alignements et à la comparaison des séquences nucléotidiques recensées chez diverses espèces.

XVIII.2.1. Amorces élaborées à partir des séquences spécifiant la préprodynorphine chez diverses espèces : homme, porc et rat

Par souci de clarté, seule une partie de la séquence codante pour la préprodynorphine est représentée ci-contre. Les séquences choisies pour la synthèse des amorces oligonucléotidiques sont soulignées. Une amorce est élaborée à partir de la lecture directe de

Séquence de l'ADNc spécifiant le SISP chez la limnée

5' TGCTATTTGCGCCGAAAGAAACATTGTGTGTGGCGCTTTTCACCTGACTTCAGTGACGTAACGAATTCT
TCTAATCAAAATGCTGTCCTCCGTAGCCCTCAGATATCTCCTGGTCCTGTCCCTGGCGTTCTTGGCAGTT
GTCACGTCC *TCAAGAACCCAATCCAGGTT**CGCGTCGTATGAGCTCATGGGGACTGAGGGCACAGA**
SISP 7
ATGCGTCACCACTAAAACGATTTCA**CAAATATGCTATCAGTGTGCTACAAGACACGAAGACAGTTTTGTA**
OS1
CAAGTTTACCAGGAATGTTGCAAGAAGGAAATGGGTCTGAGAGAGTACTGTGAAGAGATCTAT**ACCGAG**
OS2
CTGCCCATTCTGAAGTGGACTCTGGCAGCCCAACAAATAA *AGGACATCAACATGGGCTTTAATACAT
SISP 8 **OS3**
CTAAAAACAACACATCATTAAAGAAATTTTCTCCTGTTGAATTGTAAGCTGATGTTGAAAGACTAAATAA
ACATAAATACC-POLY (A) -3'

Les astérisques encadrent la séquence spécifiant la neurohormone.
Les séquences des sondes SISP7 et SISP8 sont représentées en gras.
Les séquences soulignées correspondent aux séquences des amorces utilisées dans les expériences de PCR(OS1, OS2,OS3).

la séquence, l'autre est synthétisée selon la lecture en inverse complémentaire soit :

* oligo prodynorphine 1 (OD1) (lecture directe)

5' T(C)TN C(A)GN AAA(G) TAC(T) CCN AAG(A) AG 3'

* oligo prodynorphine 2 (OD2) (lecture inverse complémentaire).

5' TTC(T) TGA(G) TTA(G) TCC CAC(T) TT 3'

XVIII.2.2. Amorces élaborées à partir de la séquence spécifiant le SISP chez la limnée.

Les séquences choisies pour la synthèse des amorces oligonucléotidiques sont soulignées dans la séquence de l'ADNc du SISP de limnée ci-contre.

* oligo SISP 1 (OS1) (lecture directe)

5' CAA(G) ATA(TC) TGC(T) TAT CAG(A) TG 3'

* oligo SISP 2 (OS2) (lecture directe)

5' GAA(G) TGT(C) TGC(T) AAG(A) AAG(A) GAA(G) ATG3'

* oligo SISP 3 (OS3) (lecture inverse complémentaire)

5' TAC(T) TTA(G) TTN GGC(T) TGC CA 3'

XVIII.3. Purification des amorces

Les oligonucléotides de synthèse (Eurogentec, Belgique) sont repris dans 200 µl d'eau. 20 µl sont prélevés pour être purifiés; le reste est stocké à -20°C. A ces 20 µl sont ajoutés 20 µl de ficoll à 10% dans le tampon TBE 2X. Un témoin composé de ficoll à 5% dans du TBE 1X additionné de bleu cyanol et de bleu de bromophénol est réalisé pour suivre la migration. La séparation électrophorétique des amorces se réalise dans un gel dénaturant (urée 20 g/40 ml) d'acrylamide à 20% (acrylamide 20%, bis-acrylamide 1%) dans le tampon TBE 1X. Le mélange est agité à 37°C avant d'ajouter les catalyseurs (persulfate d'ammonium 0,06% et TEMED 0,01% final). L'électrophorèse est réalisée à 20 mA jusqu'à ce que le bleu de cyanol atteigne l'extrémité du gel. Les oligonucléotides apparaissent sous la forme d'une tâche sombre lorsque le gel est placé sous une lampe "UV blanche". Les oligonucléotides sont récupérés en découpant une fenêtre dans le gel. Le morceau de gel est broyé et repris dans 200 µl d'eau à 4°C sur la nuit. Le mélange est filtré sur des unités de filtration, soumises à une centrifugation de 3 mn à 500 x g. La concentration des oligonucléotides dans l'éluat est déterminée par une mesure de la D.O à 260 nm.

XVIII.4. Amplification de fragments d'ADN selon la technique de PCR

Le volume réactionnel final est de 100 μ l répartis de la façon suivante :

Tampon de réaction PCR (10X)	10 μ l
Mélange des dNTP	1 μ l
SAB	2 μ l
1 ^{ère} amorce (200 pmoles)	x μ l
2 ^{ème} amorce (200 pmoles)	y μ l
TAQ polymérase	0,5 μ l
Mélange de rétrotranscription	2 μ l
Eau	qsp 100 μ l

Une goutte d'huile est ajoutée au mélange réactionnel pour éviter l'évaporation durant les cycles d'amplification. Les cycles utilisés lors des amplifications sont les suivants :

- dénaturation de la matrice à 94°C pendant 1 mn
- hybridation des amorces sur la matrice à 37°C pendant 1 mn
- montée à 72°C en 5 mn et élongation des chaînes par extension d'amorces à 72°C pendant 1 mn

Le cycle est répété 3 fois avant d'en entamer un autre :

- dénaturation à 94°C pendant 1 mn
- hybridation des amorces à 50°C pendant 1 mn
- élongation des chaînes par extension d'amorces à 72°C pendant 1 mn

Ce second cycle est répété 35 fois.

Les produits obtenus sont soumis à une seconde étape d'amplification en utilisant des amorces dont les séquences se trouvent au sein des séquences amplifiées. Cette technique, dite du "nesting", permet d'éliminer d'éventuelles bandes d'ADN artéfactuelles. Les produits obtenus après chaque réaction de PCR sont analysés par une électrophorèse en gel d'agarose à 3% dans le tampon TBE (1X) contenant du BET. Les fragments d'ADN retenus peuvent être à nouveau amplifiés en piquant directement dans la bande du gel. Il suffit alors de placer le matériel ainsi prélevé dans un milieu réactionnel de PCR pour obtenir une nouvelle amplification.

XVIII.5. Clonage des produits amplifiés par PCR

Le clonage des produits amplifiés par PCR s'effectue dans un vecteur particulier : le plasmide pCRII (Invitrogen). Ce vecteur

permet un clonage dit de "TA cloning". Ce système profite de la propriété de la TAQ polymérase utilisée dans les expériences de PCR d'ajouter un déoxyadénosine à l'extrémité 3' des produits amplifiés. La présence d'une adénine en 3' peut être utilisée pour insérer les produits amplifiés dans un vecteur exhibant une thymine en 3' au niveau du site d'insertion.

XVIII.5.1.Ligation des produits amplifiés dans le pCRII

Le volume réactionnel est de 10 μ l répartis de la façon suivante :

Tampon de ligation (10X)	1 μ l
pCRII (50 ng)	2 μ l
Produits amplifiés par PCR	x μ l
T4 ADN ligase	1 μ l
Eau	qsp 10 μ l

Le rapport vecteur/insert doit être de l'ordre de 5 en tenant compte de la taille des molécules respectives. Les volumes sont ajustés en fonction de la concentration de la solution contenant le produit amplifié. L'ensemble est incubé une nuit à 14°C.

XVIII.5.2.Transformation des plasmides recombinés

Les bactéries utilisées sont des *E. coli* DH5 α qui permettent d'obtenir des transformations très efficaces. Ces bactéries sont rendues perméables selon le protocole cité au paragraphe XIII.3. Les transformations et l'étalement des bactéries sont réalisés selon les protocoles décrits aux paragraphes XIII.4. et XIII.5. Il est cependant inutile d'ajouter de l'IPTG dans le "Top Agar" car le gène *lac Z* de ces bactéries n'est pas inductible. Les bactéries sont incubées 24 h à 37°C. Les colonies blanches sont repiquées sur des boîtes de Pétri contenant de l'ampicilline à 50 μ g/ml. Le site de clonage du pCRII étant encadré par deux sites de restriction pour l'enzyme *EcoRI*, il est facile de vérifier la présence d'un insert après une digestion par cette enzyme (paragraphe XIII.6.).

XIX. Séquençage des fragments d'ADN sélectionnés

XIX.1. Séquençage des fragments d'ADN clonés dans le phage M13mp18

Le séquençage s'effectue selon la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Cette technique repose sur la synthèse de brins d'ADN à partir d'une matrice monobrin (phage M13) contenant le fragment à séquencer. La synthèse se réalise à l'aide d'une ADN polymérase (TAQ polymérase) et est initiée au site de fixation d'une amorce venant s'hybrider sur la matrice en amont du fragment à séquencer. L'amorce utilisée est la suivante :

5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' (amorce dite "forward")

Le milieu réactionnel contient également les quatre déoxynucléotides triphosphates (dXTP) et leurs équivalents sous forme de didéoxynucléotides (ddXTP) qui, une fois incorporés, empêchent l'élongation de se poursuivre par l'absence du résidu hydroxyle. La technique de Sanger permet donc d'obtenir, au terme de la réaction de séquençage, un mélange de fragments de différentes tailles mais se terminant tous par un des ddXTP. Les fragments sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide dénaturant (urée 50 g/100 ml) à 6% dans le tampon TBE 1X filtré.

Les réactions de séquence ont été effectuées en utilisant le "kit" commercialisé par Applied Biosystems, dont la caractéristique est l'utilisation d'amorces marquées par un fluorochrome. Quatre mélanges réactionnels sont préparés ; ils ne diffèrent que par la couleur du fluorochrome et du ddXTP utilisé. La réaction de séquence s'effectue à 70°C pendant 10 mn par l'intermédiaire de la TAQ polymérase. La réaction est arrêtée en plaçant les échantillons dans la glace. Les contenus des quatre tubes (correspondant à une matrice) sont rassemblés et précipités en présence de NaCH₃COO 0,2M et d'éthanol absolu. Après une centrifugation de 30 mn à 17000 x g, les culots contenant l'ADN sont rincés à l'éthanol 70%, séchés et repris dans 6 µl d'un mélange formamide désionisé (5µl)/EDTA 5 mM (1 µl). Les molécules d'ADN sont chauffées à 100°C pendant 2 mn. Au cours de l'électrophorèse, un système de détection laser du séquenceur (Applied Biosystems 370A) permet de repérer et de différencier chaque fluorochrome en fonction de sa longueur d'onde d'émission.

XIX.2. Séquençage des fragments d'ADN clonés dans les plasmides pCRII et pUC18

Dans ce cas, la technique repose sur la synthèse *in vitro* de brins d'ADN à partir d'une matrice double brin (plasmide pCRII ou

pUC18) contenant le fragment à séquencer. La synthèse se réalise à l'aide de la TAQ polymérase et est initiée au site de fixation d'une amorce venant s'hybrider sur le plasmide d'un côté ou de l'autre du fragment à séquencer. Ce système permet de séquencer les deux extrémités d'un fragment de taille élevée ou de confirmer la séquence dans les deux sens d'un fragment de petite taille. Les amorces utilisées sont les suivantes :

5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' (amorce dite "forward")

5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3' (amorce dite "reverse")

Le mélange réactionnel d'un volume final de 20 µl contient :

Matrice d'ADN double brins	1,5 µg
Amorce ("reverse" ou "forward")(100 ng/µl)	1 µl
Mélange réactionnel	9,5 µl

Le "mix" contient la TAQ polymérase, les quatre dXTP et leurs équivalents sous forme de ddXTP fluorescents. Selon le principe décrit au paragraphe précédent, lorsqu'un ddXTP est incorporé, il empêche la poursuite de l'élongation. Les réactions de séquence sont réalisées par l'intermédiaire d'un appareil de PCR dont le programme est le suivant :

- dénaturation des matrices à 96°C pendant 30 s
- hybridation des amorces sur la matrice à 50°C pendant 15 s
- élongation des chaînes par extension d'amorces à 60°C pendant

4 mn

Le cycle est répété 25 fois. Les échantillons sont purifiés sur colonne (Biospin G30 Biorad), puis séchés sous vide. Ils peuvent être stockés à -20°C pendant un mois à l'abri de la lumière. Avant d'être déposés sur gel dénaturant de polyacrylamide à 6%, les échantillons sont repris dans le mélange formamide désionisé/EDTA et analysés dans le séquenceur Applied Biosystems 370A, selon le principe déjà décrit.

RESULTATS

RESULTATS

I. Immunocytochimie

I.1. Sur coupes de cerveau

Des cellules immunoréactives aux anticorps anti-SISP 10-19 et anti-SISP 1-77 de limnée ont été observées dans différents noyaux ganglionnaires. Le détail des résultats est rapporté dans l'article paru dans "*General and Comparative Endocrinology*" (Dugimont *et al.*, 1992a), mais les données principales peuvent être résumées ainsi : a) une forte immunoréaction est obtenue dans les noyaux 10, 14, 17 et 20, alors qu'une réaction plus modérée est constatée au niveau des péricaryons des noyaux 7 et 26, b) certaines extrémités axonales dans la zone infracérébrale (zone neurohémale) sont immunopositives vis-à-vis des 2 antisera préalablement cités (fig. 4), c) aucune réaction positive n'a été obtenue en utilisant l'antisérum anti-SISP 67-79.

I.2. Sur coupes de métamères

Au niveau de la chaîne nerveuse ventrale, 2 péricaryons ventraux ainsi que les fibres géantes dorsales et latérales sont immunoréactifs aux anticorps anti-SISP 10-19 et anti-SISP 1-77 (fig. 4 et Dugimont *et al.*, 1992a). L'anticorps anti-SISP 67-76 ne marque aucune cellule. Pour chaque préparation, 2 témoins ont été réalisés pour assurer la spécificité des réactions ; 1) un témoin "blanc" pour lequel l'immunoréaction est réalisée en omettant l'incubation avec les anticorps primaires anti-SISP 10-19 ou anti-SISP 1-77 ; 2) un témoin dans lequel l'immunoréaction est réalisée en utilisant les antisera préalablement saturés par l'antigène. Aucune immunoréaction positive n'a été observée dans ces expériences de contrôle.

II. Extraction et caractérisation des protéines du cerveau de *Nereis* apparentées aux neuropeptides envisagés dans ce travail : SISP et opioïdes.

La mise en évidence de molécules apparentées au SISP et aux opioïdes peut être également approchée par l'extraction des protéines cérébrales et la confrontation de celles-ci avec des anticorps spécifiques de chacun de ces neuropeptides.

Les antisera anti-SISP 10-19 et anti-SISP 1-77 révèlent une série de polypeptides de masse moléculaire de 15, 37, 39, 42, 54, 62, 72 et 80 kDa (fig. 8). Les expériences de contrôle déjà citées ne révèlent aucune immunoréactivité (Dugimont *et al.*, 1992a). Les anticorps anti-

dynorphine 1-17 et anti- α -néo-endorphine reconnaissent des polypeptides de masse moléculaire identique à celles des produits immunorévélés après traduction *in vivo* des ARNm (60, 62, 65 et 70 kDa ; fig. 9). Il faut noter qu'un polypeptide de 56 kDa est reconnu par les deux lots d'anticorps dans cette expérience (Dugimont *et al.*, 1992b).

III. Traduction des ARNm de cerveau de *N. diversicolor*

L'intégrité des ARNm étant une condition prérequis de notre travail, l'analyse préalable de ces ARN constitue une étape obligatoire de notre étude.

III.1. Caractéristiques et capacité informative des ARNm du cerveau de *N. diversicolor*

La capacité informative des ARNm peut être estimée après traduction de ces derniers en lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine-³⁵S. Une évaluation quantitative totale du pouvoir informatif des ARNm est apportée par la détermination de la radioactivité contenue dans les polypeptides néosynthétisés et précipités au TCA. Une évaluation qualitative du pouvoir informatif des ARNm est obtenue après analyse électrophorétique des produits traduits en gel de polyacrylamide-SDS 5-25% et par autoradiographie.

III.1.1. Evaluation quantitative du pouvoir informatif des ARNm

A la fin de la période de synthèse *in vitro* des protéines en lysat de réticulocytes, un aliquot d'1 μ l du milieu réactionnel est prélevé et les protéines sont précipitées au TCA. La comparaison de la radioactivité présente dans les échantillons et celle dans les contrôles témoigne du pouvoir informatif des ARNm.

Pour 1 μ l de mélange de traduction prélevé, les valeurs moyennes de radioactivité sont les suivantes:

-Témoin eau (témoin négatif)	8000 cpm
- Lot d'ARN I	203000 cpm
- Lot d'ARN II	193000 cpm

Ces résultats montrent une réelle traduction des ARNm puisque la radioactivité obtenue dans les 2 lots (ARNm provenant de 2 extractions différentes de vers dans le même état de maturation) est très nettement supérieure à celle du témoin.

III.1.2. Evaluation qualitative du pouvoir informatif des ARNm

Les polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin sont analysés en gel de polyacrylamide SDS 5-25%. Les protéines nouvellement synthétisées sont détectées par autoradiographie (fig. 5) ou par l'enregistrement densitométrique des autoradiogrammes (fig. 6). Dans les 2 lots d'ARNm, des différences notables apparaissent en fonction de leur intégrité. Les ARNm les mieux conservés permettent d'obtenir, après traduction, des polypeptides dont les masses moléculaires s'échelonnent entre 15 et 120 kDa. La traduction du second lot d'ARNm mène à la synthèse de polypeptides dont les masses moléculaires sont comprises entre 15 et 70 kDa. La différence entre les 2 enregistrements densitométriques est due à la dégradation des plus grands ARNm. Il est évident que nous nous sommes efforcé d'utiliser des lots d'ARNm de capacité informative élevée de façon à optimiser l'ensemble de nos résultats.

III.2. Caractérisation de polypeptides apparentés au SISP de *L. stagnalis*

La présence de polypeptides apparentés au SISP de la limnée a été abordée par des traductions d'ARNm de cerveau de néréis en lysat de réticulocytes ou en ovocytes de *X. laevis*. Les produits traduits apparentés au SISP ont été analysés au moyen de techniques électrophorétiques et de transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose et mis en évidence à l'aide de réactions immunologiques (Dugimont *et al.*, 1992a).

III.2.1. Traduction des ARNm en lysat de réticulocyte de lapin

Trois polypeptides de masse moléculaire respective 64, 72 et 80 kDa ont été reconnus par l'anticorps anti-SISP 10-19 (fig. 7). Aucune réactivité n'est observée dans les 2 témoins suivants: 1) un témoin dans lequel la suspension d'ARNm est remplacée par de l'eau distillée, 2) un témoin dans lequel la réaction immunologique est réalisée en utilisant l'antisérum préalablement épuisé par l'antigène (SISP). Par ailleurs, l'anticorps anti-SISP 67-76 ne réagit avec aucun polypeptide.

III.2.2. Traduction des ARNm dans les ovocytes de *X. laevis*

Dans le système de traduction *in vivo* qu'est l'ovocyte de *X. laevis*, trois polypeptides sont également reconnus par

l'antisérum anti-SISP 10-19, ainsi que par l'anticorps anti SISP 1-77 Ces polypeptides possèdent des masses moléculaires de 43, 72 et 80 kDa (fig. 8). Aucun polypeptide ne s'est révélé positif dans les réactions de contrôle évoquées ci-dessus. Comme précédemment, l'anticorps anti-SISP 67-79 ne reconnaît aucun polypeptide traduit dans ce système acellulaire.

III.3. Caractérisation de polypeptides apparentés à la dynorphine 1-17 et à l' α -néo-endorphine de Mammifères traduits dans les ovocytes de *X.laevis*

La présence de polypeptides apparentés à la dynorphine 1-17 et à l' α -néo-endorphine de Mammifères a été révélée par des traductions d'ARNm de cerveaux de néréis dans des ovocytes de *X.laevis*. La quantité des produits traduits apparentés à ces opioïdes a été évaluée par des tests ELISA, la qualité des molécules a été analysée par électrophorèse et immunotransfert (Dugimont *et al.*, 1992b).

III.3.1. Séparation électrophorétique et immunotransfert

Les produits traduits dans les ovocytes sont analysés en électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 5-25%-SDS. Les polypeptides ainsi séparés sont transférés sur une membrane de nitrocellulose et confrontés aux anticorps anti-dynorphine 1-17 ou aux anticorps anti- α -néo-endorphine, saturés ou non par leur antigène. Quatre polypeptides de masse moléculaire 60, 62, 65 et 70 kDa sont reconnus par les deux types d'anticorps (fig. 9). Les immunoréactions disparaissent lorsque les protéines sont confrontées aux antisera préalablement saturés par leur antigène. Aucune immunoréaction n'est obtenue dans un témoin correspondant aux protéines extraites d'ovocytes injectés par de l'eau distillée dépourvue d'ARNm de néréis.

III.3.2. Test ELISA

Cette technique rapide a été utilisée dans le but de démontrer la spécificité des immunoréactions obtenues avec les anticorps anti-dynorphine 1-17 et avec les anticorps anti- α -néo-endorphine. Nous avons remarqué que les anticorps saturés par un antigène non spécifique (anti-dynorphine 1-17/ α -néo-endorphine ou anti- α -néo-endorphine/dynorphine 1-17) montraient une immunopositivité plus faible par rapport à celle obtenue avec les anticorps non saturés. Ces résultats ne concordaient pas avec ceux acquis lors du contrôle de la spécificité des immunosera en RIA (Dugimont *et al.*, 1992b). La technique de l'ELISA a permis de tester plusieurs lots d'anticorps :

- anticorps non saturés
- anticorps saturés avec l'antigène spécifique
- anticorps saturés avec l'antigène non spécifique
- anticorps saturés avec l'antigène non spécifique et traités au charbon/dextran.

L'hypothèse était que la diminution de l'intensité de la réaction obtenue avec les anticorps saturés par un antigène non spécifique n'était pas due à une réaction croisée mais à un encombrement stérique causé par l'excès d'antigène libre dans le milieu réactionnel. L'ensemble des résultats est résumé par la figure 10. Ces résultats montrent :

- une réelle traduction des ARNm d'intérêt
- qu'un antigène non spécifique peut réduire l'intensité d'une immunoréaction, sans pour autant provoquer une réaction croisée.
- qu'un traitement au charbon/dextran permet d'éliminer l'excès d'antigène (non spécifique) libre et de restituer une intensité de réaction proche de celle obtenue avec l'anticorps non traité. Cette hypothèse a été confirmée lors de techniques d'immunotransfert utilisant les divers lots d'anticorps précédemment cités (Fig.9).

IV. Elaboration d'une banque d'expression à partir des ARNm du cerveau de *Nereis*

De nombreux contrôles sont réalisés dans les étapes clés de la construction de la banque, afin d'assurer un suivi dans l'élaboration de la cDNAtèque.

IV.1. Synthèse du 1^{er} brin d'ADNc

La synthèse du 1^{er} brin d'ADNc est contrôlée en prélevant 5 µl du mélange réactionnel auxquels sont ajoutés 0,5 µl de α ³²P dCTP (800 Ci/mmol). Des évaluations quantitatives et qualitatives de l'incorporation de α ³²P dCTP dans le 1^{er} brin d'ADNc synthétisé peuvent être pratiquées.

IV.1.1. Evaluation quantitative de la synthèse du 1^{er} brin

Cette évaluation consiste à comparer la radioactivité incorporée dans le 1^{er} brin par rapport à la radioactivité totale de l'échantillon.

Pour 1 µl de mélange réactionnel, les valeurs obtenues sont les suivantes :

- | | |
|--------------------------------|------------|
| - témoin blanc | 18 cpm |
| - radioactivité incorporée | 3000 cpm |
| - radioactivité non incorporée | 100000 cpm |

IV.1.2. Evaluation qualitative de la synthèse du 1^{er} brin

Cette évaluation permet de connaître les tailles globales des premiers brins d'ADNc synthétisés. Après avoir déposé les 3 μ l restant du mélange réactionnel dans un gel d'agarose, celui-ci est séché et placé en autoradiographie. Le résultat se traduit par une "traînée" d'acides nucléiques hybrides (ARNm/ADNc) comprise entre quelques dizaines de nucléotides et 5000 nucléotides (fig. 11). En fonction de l'intensité inégale de la "traînée", il semble que les 1^{ers} brins d'ADNc, ayant une taille comprise entre 1000 et 3000 nucléotides, soient les plus représentés (fig. 11).

IV.2. Synthèse du 2^{ème} brin d'ADNc

Des valeurs quantitatives et qualitatives peuvent être à nouveau déterminées en fonction de la radioactivité incorporée dans le 2^{ème} brin d'ADNc.

IV.2.1. Evaluation quantitative de la synthèse du 2^{ème} brin

Le contrôle de la synthèse du 2^{ème} brin s'effectue après une extraction de l'ADNc double brin en prélevant 5 μ l du mélange contenant l'ensemble des ADNc. Comme pour l'évaluation de la synthèse du 1^{er} brin, les valeurs de radioactivité incorporée et non incorporée sont comparées.

Pour 1 μ l de milieu réactionnel, les valeurs suivantes sont obtenues :

- Témoin blanc	12	cpm
- Radioactivité incorporée	2000	cpm
- Radioactivité non incorporée	300000	cpm

IV.2.2. Evaluation qualitative de la synthèse du 2^{ème} brin

La migration électrophorétique des ADNc formés révèle après autoradiographie une "traînée" d'ADNc, qui s'échelonne de quelques dizaines de nucléotides à environ 5000 nucléotides. Cette large distribution des ADNc est intéressante, puisqu'elle augmente la représentativité de la banque d'expression (fig. 12).

IV.3. Réalisation de bouts francs sur les ADNc, ligation d'adaptateurs contenant le site *EcoRI* et phosphorylation des extrémités *EcoRI*

Pour éviter des pertes de matériel, ces étapes ne sont pas contrôlées aussi précisément que les synthèses du 1^{er} et 2^{ème} brin d'ADNc. On suit ces réactions en repérant la radioactivité à l'aide d'un compteur Geiger. Dans ces étapes, les ADNc double brin subissent deux précipitations à l'éthanol absolu qui éliminent la majeure partie de la radioactivité non incorporée. La radioactivité résiduelle correspond, en majorité, à la radioactivité incorporée dans l'ensemble des ADNc.

IV.4. Sélection des ADNc en fonction de leur taille

Les ADNc sont séparés par chromatographie en gel filtration. Chaque fraction récoltée est analysée quantitativement et qualitativement.

IV.4.1. Analyse quantitative

La radioactivité contenue dans 1 μ l de chaque fraction est évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Les valeurs suivantes ont été obtenues :

- Témoin blanc	13 cpm
- Fraction I	444 cpm
- Fraction II	213 cpm
- Fraction III	1576 cpm
- Fraction IV	5494 cpm
- Fraction V	16314 cpm
- Fraction VI	50340 cpm
- Fraction VII	66979 cpm

IV.4.2. Analyse qualitative

3 μ l de chaque fraction sont analysés en électrophorèse dans un gel d'agarose à 1%. L'autoradiographie du gel montre une "traînée" d'ADNc pour les fractions I et II et un signal diffus dans les très bas poids moléculaires pour les autres fractions. Les ADNc de la fraction I (de 300 à 4000 nucléotides) et de la fraction II (quelques dizaines de nucléotides jusqu'à 1500 nucléotides) sont rassemblés et seront insérés dans les bras du vecteur d'expression (fig. 13).

IV.5. Ligation des ADNc sélectionnés dans le vecteur λ ZAP II

Pour éviter des pertes de matériel, le contrôle de la ligation n'est pas réalisé sur les échantillons d'ADNc, mais sur un insert test (pBR322 digéré par *Sall* et *EcoRI*) traité dans les mêmes conditions. La totalité du mélange réactionnel témoin est déposée dans un gel d'agarose à 1%. Une seule bande de 46 kDa, correspondant au vecteur recombiné, est visible, ce qui rend compte d'une ligation efficace.

IV.6. Titrage de la banque

Après empaquetage *in vitro* de la totalité des vecteurs (ADN phagiques recombinés ou non), le titre de la banque originelle est déterminé sur des aliquots de cette suspension. Le système d'empaquetage *in vitro* utilisé a permis d'atteindre un titre de 5.10^5 phages dans 500 μ l. Le pourcentage réel de phages recombinés n'est pas déterminé dans cette étape, car les dilutions de phages sont mises en contact avec des bactéries qui ne permettent pas une sélection par le système Xgal/IPTG.

IV.7. Amplification de la banque

La banque est amplifiée en étalant la totalité de la suspension de phages. En fonction du titre de la banque originelle, des dilutions sont réalisées pour obtenir des boîtes de Pétri contenant approximativement 20000 plages de lyse. Les phages étant mis en contact avec les bactéries PLKF', seul le titre de la banque amplifiée a pu être estimé à 5.10^9 phages/ml. La détermination du pourcentage de phages recombinés nécessite l'utilisation d'une souche bactérienne permettant la sélection par le système Xgal/IPTG. L'infection de bactéries XL1 Blue par les phages a permis d'évaluer le taux de phages recombinés à 90%.

V. Criblage de la banque d'ADNc

V.1. Criblage immunologique

Les anticorps anti-SISP 10-19 polyclonaux ayant fourni de nombreux résultats positifs lors des immunodétections précédemment citées ont été choisis pour le criblage de la cDNAthèque. Lors du premier criblage, 6.10^5 clones ont été analysés. 13 d'entre eux ont montré une immunoréaction. Ces 13 clones sont repiqués, placés dans un milieu SM, avant d'être réétalés et à nouveau confrontés aux anticorps anti-SISP 10-19. Les dilutions de phages utilisées lors de ce deuxième criblage ont

été réalisées de façon à obtenir des boîtes contenant une centaine de plages de lyse. Parmi les 13 clones sélectionnés, 3 ont confirmé leur immunopositivité.

Pour chacun de ces 3 clones, les valeurs respectives de 13, 38 et 17% de clones positifs obtenus témoignent de l'entraînement de clones non spécifiques lors du premier repiquage. Trois autres criblages se sont révélés nécessaires pour confirmer l'immunopositivité des clones sélectionnés et atteindre 100% de plages positives. Il faut souligner l'évolution logique de ce criblage de banque. Chaque étape doit permettre d'éliminer les faux positifs, de confirmer les clones spécifiques et d'atteindre graduellement les 100% de positivité, qui traduisent l'isolement et la pureté d'un ADN recombiné.

V.2. Criblage à l'aide d'une sonde d'ADNc spécifiant le SISP chez la limnée

Lors de ce criblage, 10^6 phages ont été étalés. Trois d'entre eux ont montré un signal d'hybridation. Les trois clones sont repiqués, pour être à nouveau confrontés à la sonde d'ADNc. Deux criblages supplémentaires ont été nécessaires pour isoler et purifier un clone avant de le caractériser.

VI. Production massive des phages sélectionnés et sortie d'insert

VI.I. Contrôle de la présence d'un insert

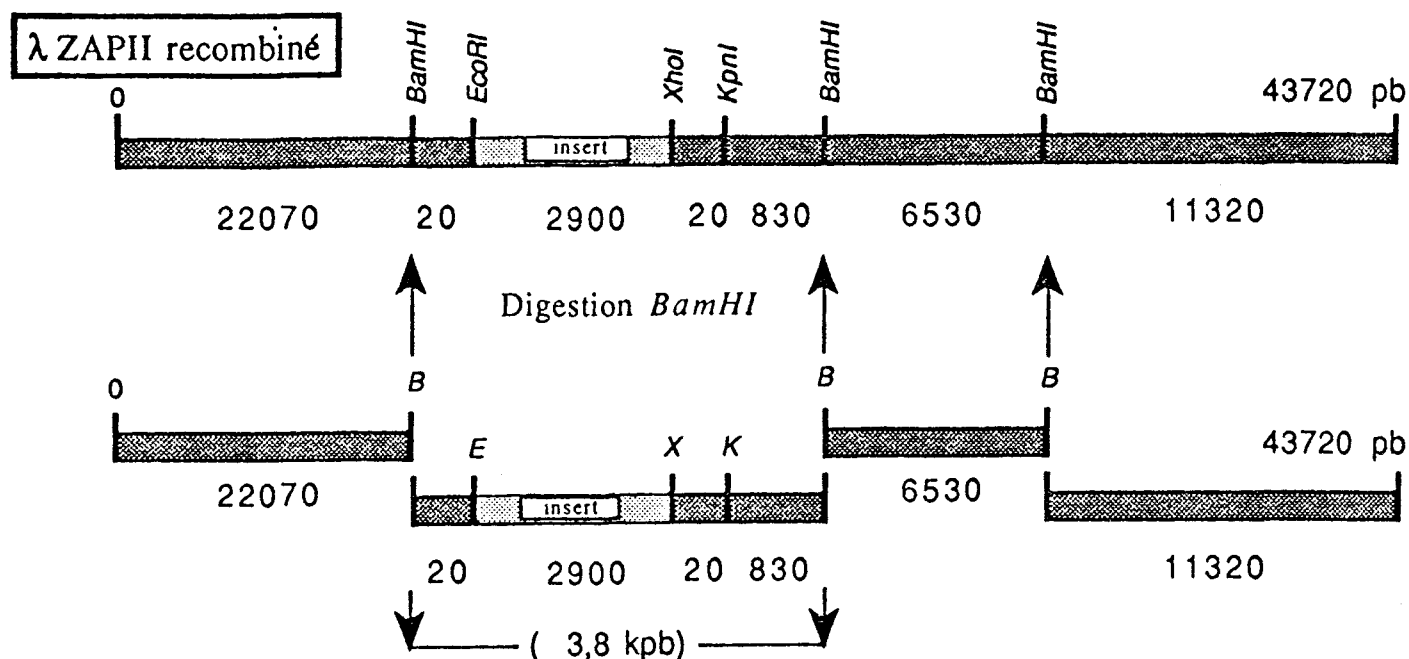
VI.1.1. Phages sélectionnés par le criblage immunologique

L'insertion de l'ADNc dans le vecteur phagique est orientée et se réalise dans les sites de restriction *EcoRI* et *XhoI*. Pour mettre en évidence les inserts en électrophorèse, l'ADN des phages recombinés doit être digéré par ces deux enzymes. L'expérience montre que cette double digestion reste inefficace et rend la sortie des inserts impossible. L'hypothèse la plus probable pour expliquer cet échec est que les sites de restriction *EcoRI* et *XhoI* ont été modifiés lors des multiples cycles de réplication de l'ADN. En conséquence, nous avons isolé les inserts par une digestion par *BamHI*. En effet, le vecteur possède 2 sites de restriction pour cette enzyme ; ces deux sites encadrent celui de clonage multiple du vecteur où est inséré l'ADNc. La digestion par *BamHI* libère inévitablement avec l'insert un fragment d'ADN phagique de 870 nucléotides (voir schéma ci-après).

Tableau 2 - Digestions enzymatiques de l'ADN phagique recombiné

Enzymes utilisées \ Fragments de restriction	Phage sauvage	Phage recombiné
<i>Sma I</i>	22, 07 8, 27 5, 93 4, 55	22, 07 8, 27 7, 45 * 5, 93
<i>Kpn I / Sac I</i>	18, 68 17, 05 3, 47 1, 51 0,10	18, 68 17, 05 3, 47 3, 00 * 1, 51
<i>Sac I / Hind III</i>	22, 03 8, 42 4, 36 3, 99 0, 57 0, 45 0, 07	22, 03 8, 42 4, 36 3, 99 3, 40 * 0, 57 0, 07

* Fragments contenant l'insert de 2,9 kpb



La digestion par *Bam*HI du phage λ ZAPII non recombiné conduit à la libération de 4 fragments de taille respective de 22,07, 11,32, 6,53 et 0,87 kpb. Le profil électrophorétique du vecteur phagique, sélectionné après la même digestion, montre 4 fragments de 22,07, 11,32, 6,53 et 3,8 kpb (fig. 14, piste a). Ce dernier correspond à un segment contenant l'insert. Par soustraction, la taille réelle de l'ADNc est estimée à 2,9 kpb (3,8-0,87 kpb).

Plusieurs autres digestions (*Sma*I, *Kpn*I/*Sac*I, *Sac*I/*Hind*III) ont été réalisées sur cet ADN phagique recombiné et conduisent à la même conclusion (fig. 14, exemple de digestion par *Sma*I et tableau 2).

VI.1.2. Phages sélectionnés à l'aide de la sonde d'ADNc

Le profil électrophorétique de digestion de l'ADN phagique par l'enzyme *Bam*HI montre quatre fragments de taille respective de 22,07, 11,32, 6,53 et 2,3 kpb. Selon le principe décrit dans le paragraphe précédent, la taille réelle de l'insert peut être estimée à 1,4 kpb (2,3-0,87 kpb).

VI.2. Production massive de phages recombinés et isolement de l'insert

Une culture phagique de 500 ml a permis d'obtenir, après toutes les étapes de purification des échantillons, une quantité d'insert estimée à environ 2,5 μ g. Le système d'isolement d'insert, satisfaisant pour la pureté des échantillons, n'a pas donné le rendement attendu. Il ne subsiste en effet qu'une centaine de nanogrammes

d'insert après cette étape. Cette quantité d'insert reste cependant suffisante pour le sous clonage en plasmides (fig. 15).

VII. Sous-clonage du fragment d'ADN (3,8 kpb) sélectionné par le criblage immunologique en plasmide pUC18

VII.1. Ligation du fragment dans les bras du vecteur

Le rapport insert/vecteur doit être de l'ordre de 5 en tenant compte des tailles respectives des molécules. Les valeurs utilisées pour cette ligation ont été préalablement citées dans le chapitre "Matériel et méthodes", paragraphe XIII. 2.

VII.2. Transfection des plasmides recombinés

La transfection est contrôlée indirectement en plaçant 10 ng de pUC18 sauvage en présence de bactéries compétentes. Ce mélange de transfection témoin, étalé sur un "Top Agar" contenant de l'Xgal et de l'IPTG, génère l'apparition de colonies bactériennes bleues si la transfection est efficace. Le résultat de la transfection des plasmides recombinés montre une variabilité en fonction des critères suivants :

- l'activité enzymatique de la ligase
- le traitement utilisé pour rendre les bactéries compétentes
- les durées de choc thermique

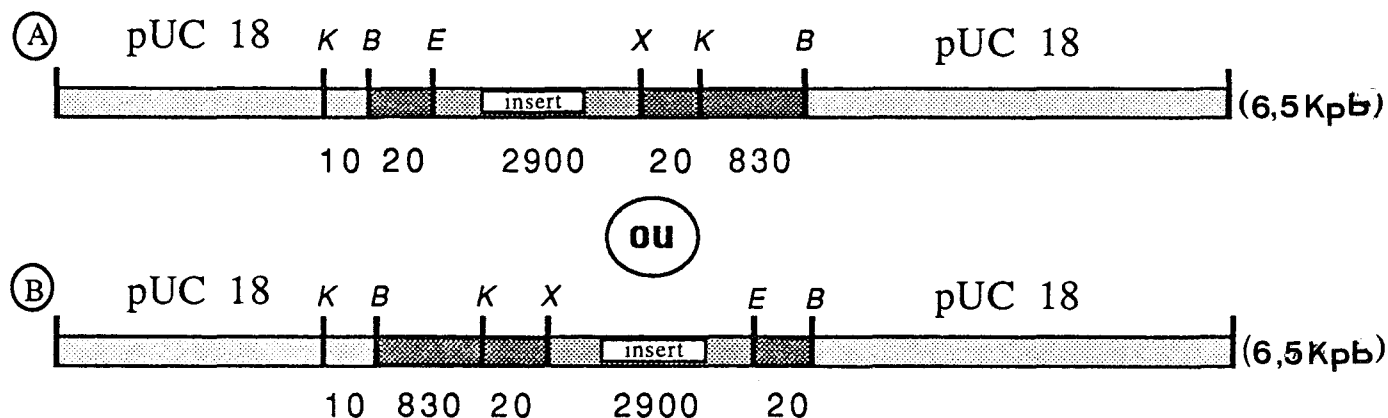
Cette variabilité se traduit par l'obtention de colonies bactériennes blanches en nombre plus ou moins important. Le pourcentage de colonies blanches n'a atteint que 10%.

VII.3. Vérification de la recombinaison des plasmides

Cette étape consiste à préparer de l'ADN plasmidique à partir de colonies bactériennes blanches isolées et de digérer cet ADN avec l'enzyme *BamHI*. L'analyse électrophorétique permet de déterminer rapidement les plasmides recombinés. 12 colonies bactériennes ont été repiquées. Le résultat de l'électrophorèse révèle une seule recombinaison effective (fig. 16, piste b). Seul l'ADN plasmidique d'un clone est digéré en 2 fragments de 2,7 kpb et 3,8 kpb. Ces fragments correspondent respectivement au plasmide linéaire et au fragment sous-cloné. A ce stade, le plasmide recombiné possède une taille moléculaire de 6,5 kpb (2,7 + 3,8 kpb), comme cela est illustré ci-après.

Insertion du fragment de 3,8 kpb dans le pUC 18
selon l'orientation (A) ou (B)

pUC 18 recombiné



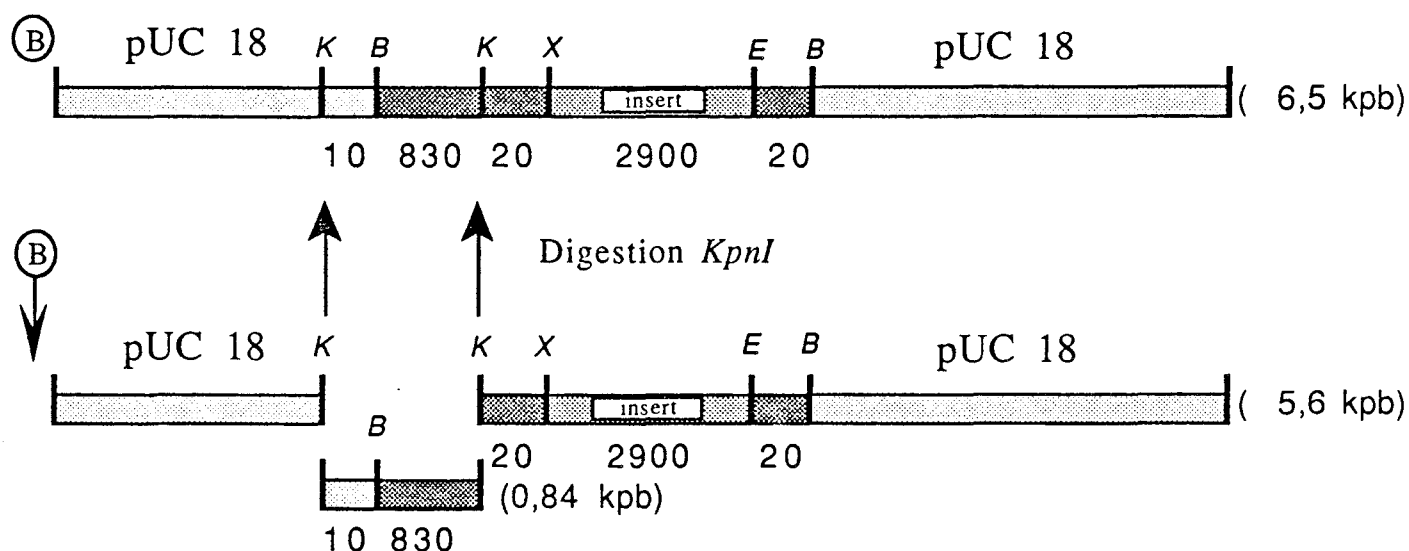
phage insert pUC 18



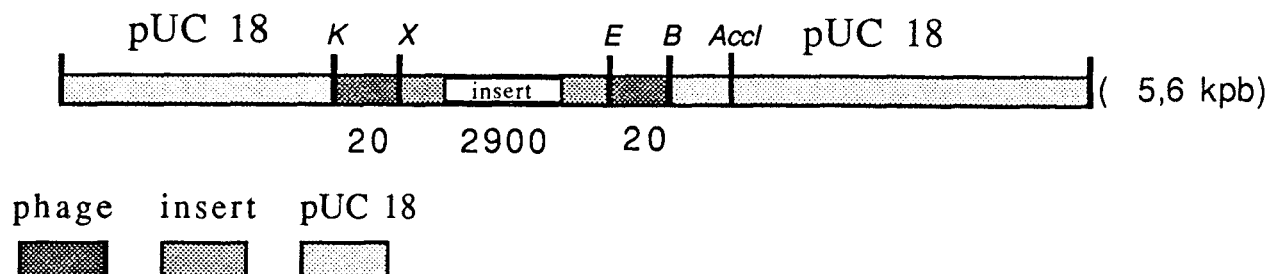
VII.4. Elimination du fragment d'origine phagique

VII.4.1. Principe

L'existence de 2 sites de restriction pour l'enzyme *KpnI*, l'un sur le plasmide, l'autre sur le fragment d'origine phagique cloné, permet d'éliminer la majeure partie de ce fragment, si toutefois le sens d'insertion dans le site unique *BamHI* du plasmide est celui du schéma suivant:



↓ Elimination du fragment de 0,84 kpb
ligation du fragment de 5,6 kpb
(circularisation du plasmide)

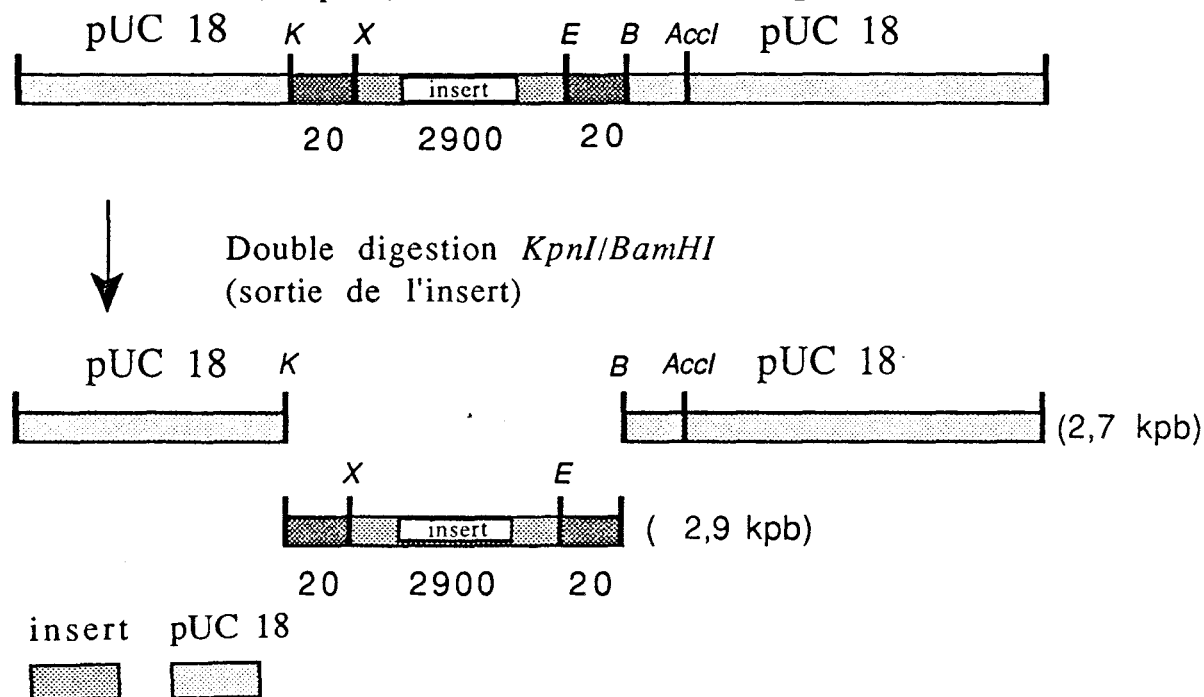


Le profil électrophorétique du plasmide sélectionné après une digestion par *KpnI* révèle 2 fragments de 0,84 kpb et 5,6 kpb. Ce fragment de 5,6 kpb est représenté (cf schéma) par le pUC18 (2,7 kpb) contenant un insert de 2,9 kpb. Ce résultat précise le sens d'orientation du fragment cloné. Le clone sélectionné lors de cette étape est mis en culture en vue de l'extraction de l'ADN plasmidique. Après digestion par *KpnI*, le fragment de 5,6 kpb retenu sera ligué et transfecté dans des bactéries JM109.

VII.4.2. Résultat de la transfection du fragment de 5,6 kpb

Il faut souligner une différence considérable en ce qui concerne le rendement de cette transfection. En effet, lorsque le mélange de transfection est étalé sur les boîtes contenant le mélange Xgal/IPTG, toutes les colonies sont blanches. Une double digestion par les enzymes *BamHI* et *KpnI* permet de sortir l'insert du vecteur.

12 colonies blanches ont été repiquées et l'ADN plasmidique de celles-ci testé. Le profil électrophorétique de l'ADN plasmidique digéré par les enzymes *KpnI* et *BamHI* révèle 2 fragments attendus de 2,7 kpb (pUC) et un insert de 2,9 kpb (schéma ci-dessous et fig. 17).



L'insert peut alors être caractérisé en effectuant une carte de restriction ou être séquencé.

VII.5. Cartographie de l'insert

Parmi les neuf enzymes testées, seule *AccI* coupe le vecteur recombiné en 3 fragments de 4,6 kpb, 0,8 kpb et 0,24 kpb. Ce résultat démontre l'existence de 2 sites de restriction pour l'enzyme *AccI* dans l'insert. Le même plasmide digéré par *AccI* et *KpnI* libère 4 fragments de 2,7 kpb (pUC), 1,9 kpb, 0,8 kpb et 0,2 kpb (fig. 18A).

VIII. Hybridation moléculaire de la sonde oligonucléotidique SISP7 sur le plasmide recombiné de 5,6 kpb, digéré par *AccI* et *KpnI*

L'homologie de séquence entre la sonde oligonucléotidique N-terminale concerne uniquement le fragment de 1,9 kpb, puisque seul ce dernier montre un signal autoradiographique (fig. 18B). Une digestion partielle du plasmide recombiné fait apparaître un signal d'hybridation beaucoup plus faible. Le fragment de 1,9 kpb est récupéré et sous-cloné en pUC18. Une double digestion *AccI/KpnI* des plasmides obtenus permet de sélectionner rapidement le clone d'intérêt (fig. 18C).

IX. Sous-clonage du fragment d'ADN sélectionné par le criblage utilisant la sonde d'ADNc dans le vecteur M13mp18

IX.1. Isolement de l'insert de 1,4 kpb

Une double digestion par les enzymes de restriction *KpnI* et *BamHI* permet de libérer le fragment d'ADN d'intérêt préalablement estimé à 1,4 kpb. Les trois clones repiqués montrent le même profil électrophorétique. Le fragment de 1,4 kpb est extrait du gel et directement cloné dans le phage M13mp18.

IX.2. Sous-clonage dans le phage M13

Le fragment est ligué dans le vecteur ; la transfection du mélange de ligation dans les bactéries TG1 mâles permet d'obtenir des plages de lyse blanches. Des matrices simple brin réalisées à partir d'une pfu permettront de déterminer la séquence des clones sélectionnés.

X. Séquençage des fragments d'ADN sélectionnés

X.1. Séquençage partiel du fragment d'ADN sélectionné par le criblage immunologique

Le segment de 1,9 kpb a été digéré par *Sau3A*. Les segments de restriction ont été insérés dans le vecteur M13mp18 selon la technique du "shot gun". La sonde oligonucléotidique SISP7 nous a permis de sélectionner un insert de 132 nucléotides dont la séquence a été établie comme suit :

5' GTT TTC ACC CAC TTT GTG GTG CGT GAA GAC GCG CAA CTG CTG TAC
GGT TTT AAC AAT AAA CAA GAG CGC ACA TTG TTC AAA GAG TTG ATC
AAA ACC AAC GGC GTC GGC CCG AAG TTG GCG GC 3'

La séquence soulignée est celle reconnue par la sonde SISP7.

La recherche d'homologie en nucléotides dans les banques de données (GENBANK) ne permet pas d'établir une relation avec une séquence connue. Nous avons pourtant remarqué une homologie de 50% au niveau de la séquence reconnue par la sonde SISP7 de 31 mers (nucléotides symbolisés en gras). Ce pourcentage semble suffisant pour obtenir un signal d'hybridation (fig.18B). La traduction de cette séquence de 132 nucléotides dans les six phases de lecture révèle une phase de lecture ouverte. La séquence protéique obtenue (41 acides aminés), comparée à celles présentes dans les banques de données, montre une homologie de 100% avec une protéine de résistance aux ultra-violets d'*E. coli* (*ruvA*) :

Nter VFTHFVVREDAQLLYGFNNKQERTLFKELIKTNG
VGPKLAL Cter

La séquence soulignée représente la zone reconnue par les anticorps anti-SISP 10-19. Dans cette région, cinq acides aminés (symbolisés en gras) sur dix sont en coïncidence avec le gène de résistance aux ultra-violets d'*E. coli*. (*ruvA*).

X.2. Séquençage partiel des fragments d'ADN sélectionné à l'aide de la sonde d'ADNc

Parmi les clones sélectionnés, deux ont permis d'obtenir des séquences de 171 et 213 nucléotides.

1
5' AGG TTA ACG CTG TCA GCC CCA CCA CCA TGC CGA AGC ACA GTT
AAC GCA CAG TAC GAC CAC GGA AAA ATG CGG GCA AAG GAA GAT ACT
CAT CTG GAT AGC ATA ATT CAC CCA CCA TGC CCA AGA ACA CGG TCC
AAT CCC TGC GGG AAG CCG CCT TTT GCG ATG GGA TCG GTA 3'

171

1

5' CAA CTG ACT GAA GAA AAA CCT GCA GTC AGT AGT TTA ACA ACT
GAG TCT GTC GTA CTG ACC ATA GGT TAT GTC ATT TAA CTT ACT TCA
GGA TAT ATT ACT GAA TAC AGC TTT ATC ATG AAC CTG TTA CAG TTT
ATC CAT AAC ATG ATC CAC AGC TTA TGT GAA CGA GGT CCC GGC CCA
TGA GTG ACA AGG ATT GTA GCG ATG TGG GGT TCT TTA 3'

213

La recherche d'homologie en nucléotides dans les banques de données ne révèle aucune homologie significative avec une molécule connue. De plus, seule la séquence de 171 nucléotides montre une phase de lecture ouverte (57 acides aminés).

N^{ter}RLTLSAPPPCRSTVNAQYDHGKMRAKEDTHLDSIIHPPCPRTSRNPCGKPPF
AMGSV C^{ter}

Cette protéine putative ne montre aucune homologie avec les séquences recensées dans les banques de données.

XI. "Polymerase chain reaction"(PCR)

XI.1. Amplification d'un fragment à l'aide des amorces élaborées à partir de la séquence du SISP de la limnée

Le couple d'amorce OS1 et OS3 a été utilisé lors de la première amplification. Aucun fragment n'était visible dans le test d'un aliquot de 10 µl du milieu de réaction. Cependant, l'utilisation du couple d'amorces OS2 et OS3 a permis d'amplifier trois fragments (fig.19). Nous avons choisi de caractériser le fragment dont la taille (180 nucléotides) se rapprochait le plus de celle attendue (les séquences ayant servies à la synthèse des amorces sont distantes d'une centaine de nucléotides au sein de la séquence du SISP de limnée). Le fragment sélectionné a été cloné dans le plasmide pCRII et séquencé directement dans ce vecteur par l'intermédiaire d'une réaction de "PCR-séquence" utilisant les amorces universelles "reverse" et "forward" (cf Matériel et méthodes, paragraphe XIX.2.). Une séquence de 184 nucléotides a été déterminée :

1

5' TAC TTG TTG GGT TGC CAT GCA TTA CCA TCA TTT CCT GAT
GCA ATG ATA TAC GAT GGC TTA ACC TTG GCC AAA TTT CTA
CGA CGT CTT ACA ATG TAC TAA CAA CTC TTA CCA CCG CGG CAC
CAC GTG GCA CCA CGT GGC ACC ATG CCT AAC CAC ATC AGG AGC
TAT GGT GGC AGC CGA ACA AGT A 3'

184

Dans ce fragment amplifié, la même amorce OS3 (italique et soulignée) s'est hybridée deux fois. La séquence inverse complémentaire en 3' (soulignée) est le résultat de l'amplification. La recherche dans les banques de données n'a révélé aucune homologie significative, ni avec

une séquence nucléotidique connue, ni avec une séquence en acides aminés déjà établie.

XI.2. Amplification d'un fragment à l'aide des amorces élaborées à partir des séquences de prodynorphine de Mammifères

Dans cette expérience, le couple d'amorce OD1 et OD2 a permis d'amplifier un fragment unique d'environ 350 nucléotides (fig. 20). Ce fragment a été cloné et séquencé dans le vecteur pCRII. Une séquence de 375 nucléotides a été déterminée :

1
 5' *TTC TGG TTG TCC CAC TTT ACC TAC AAA ATT GCC CAT CTA ATA*
GAT ACA CCA GGG ATT CAG CTA CTA ATG AAT AGG TAA AAT CCT TAG
AGA CTT TTG CAA AGC ATC AGG TTT TAG AAT AAT GAA TGG TAG
ACT AGG AGA AAA ACA ACA AAC TTG TGA TTA TAC ATG CTA CAA
 AAG CAA TGG TGG AGC TAG TCT TAT AGA CTA TTT ACT ATG TAG GAC
 CAA CAA GTA TAC GAA CTG TTA ACA ACC TAG TAG TAA TGC CAA AAG
 AGC AGA ATC AGG CCG CCA TGC AAT AAA CAT AAC TCT GTC GTG CCC
 AAC CTC CAA TGT CCC CCC AAA AGA TAT AAA TGG TAC CCA GGA CCA
 AAG TTA CAA GTG GGA CAA TCA GAA 3'

375

Un phénomène semblable d'appariement de la même amorce OD2 (italique) se retrouve dans les étapes d'amplification de ce fragment d'ADN. La recherche dans les banques de données révèle une homologie de 63% (pour les 51 nucléotides de la séquence soulignée ci-dessus) avec le gène de la POMC de *X. laevis*. La POMC est un des trois précurseurs d'opioïdes chez les Vertébrés.

Nereis diversicolor

- Figure 1 - *Nereis diversicolor* dans son milieu naturel.
- Figure 2 - Tête de *N. diversicolor* ; les yeux sont portés par un segment nommé prostomium dans lequel se trouvent les ganglions cérébroïdes. (X 10)
- Figure 3 - Ganglions cérébroïdes nommés habituellement "cerveau" isolés après dissection. (X 50)

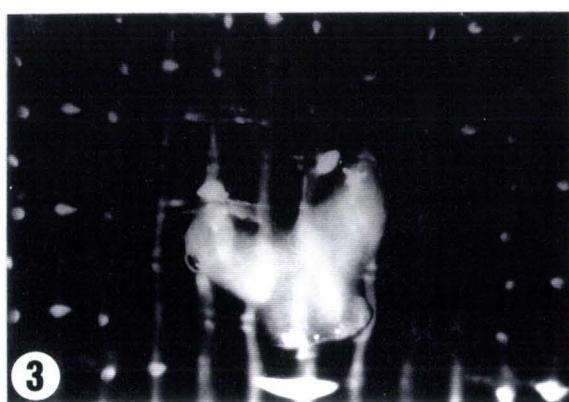


Figure 4 - Réactions immunocytochimiques obtenues avec les anticorps polyclonaux anti-SISP 10-19 sur coupes parasagittales de cerveau (a, b, c, d et e) et sur coupe transversale de métamère (f).
Les chiffres arabes indiquent les noyaux ganglionnaires.
B: cerveau ; BV: vaisseau sanguin ; DGF: fibre géante dorsale ; Ep: épiderme ; ICR: région infracérébrale ; LGF: fibre géante latérale ; M: muscle ; Np: neuropile ; VNC: chaîne nerveuse ventrale.

a-d. Les noyaux ganglionnaires cérébraux présentent de nombreux périkaryons fortement marqués. Une immunoréactivité est observée également dans le neuropile.

(a, b X 200 ; c, d X 360).

e. La photographie représente la région infracérébrale qui est un complexe neuroglandulovasculaire. Les flèches indiquent des terminaisons axonales aboutissant à cette zone.

(X 360).

f. Coupe transversale de la chaîne nerveuse ventrale. Les fibres géantes dorsale et latérales et deux périkaryons symétriques ventraux (flèches) sont immunoréactifs.

(X 220).

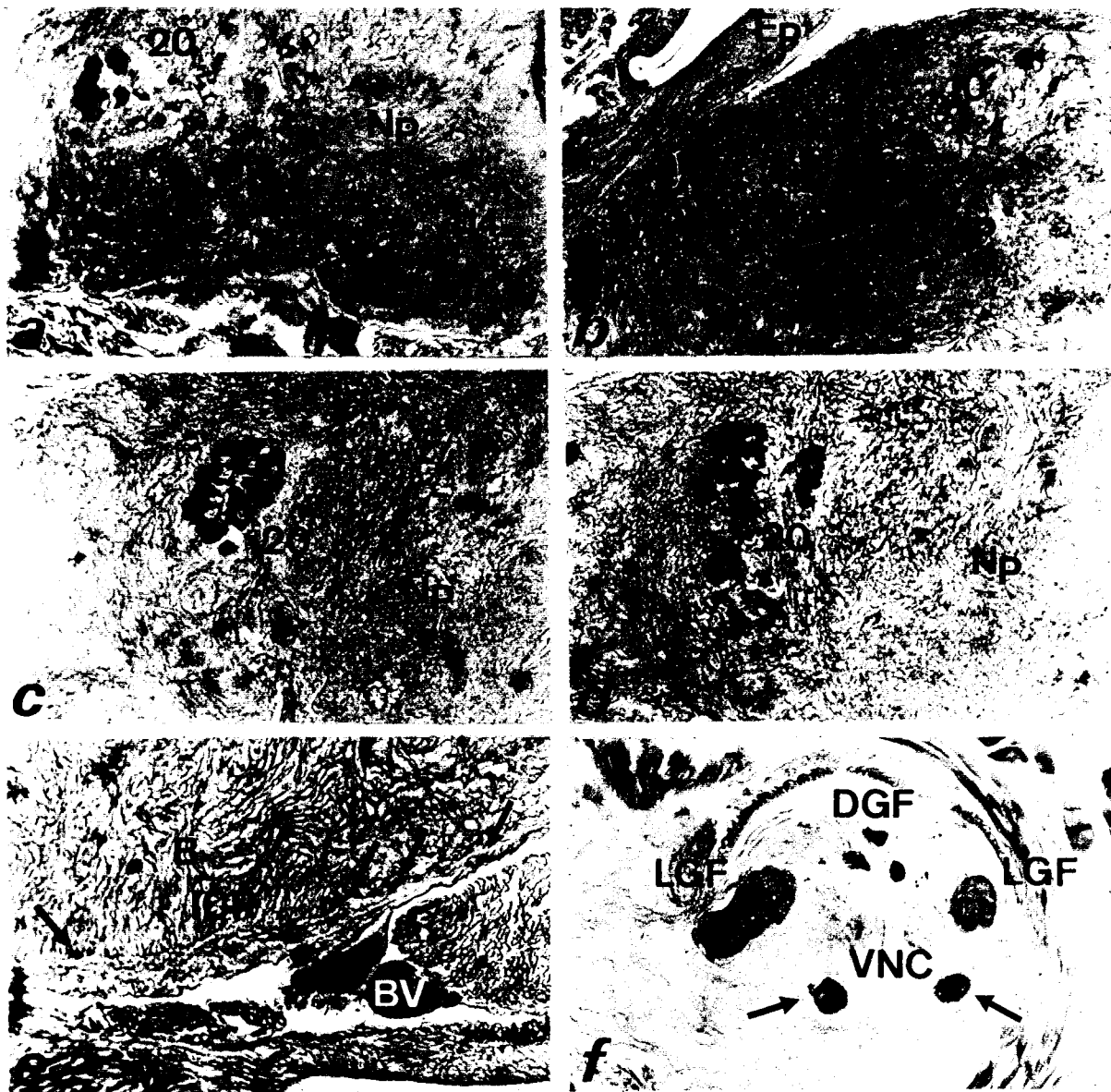


Fig.4

Figure 5 - Autoradiogrammes obtenus à partir d'un gel de polyacrylamide 5-25% SDS après migration des polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin.

a. Témoin : lysat de réticulocytes de lapin incubé auquel a été ajouté de l'eau distillée ne contenant pas d'ARNm.

b, c. Traduction *in vitro* de 2 lots d'ARNm extraits de cerveau.

Figure 6 - Enregistrements densitométriques des autoradiogrammes de la figure 5.

Les graphes a, b et c représentent respectivement les pistes a, b et c de la figure 5.

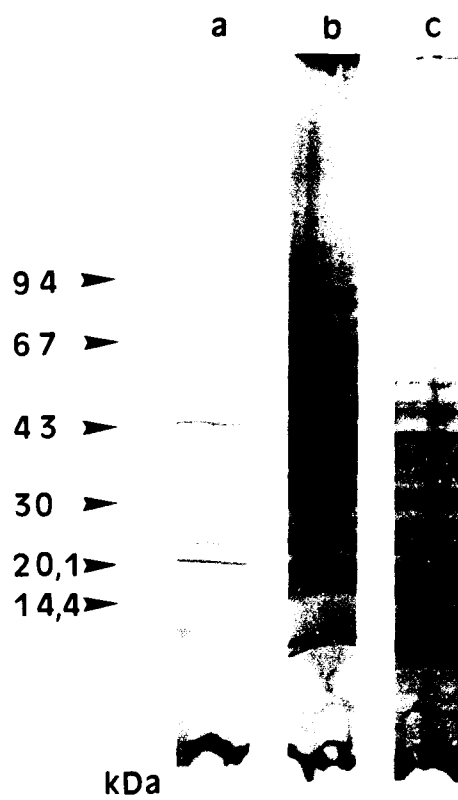


Fig. 5

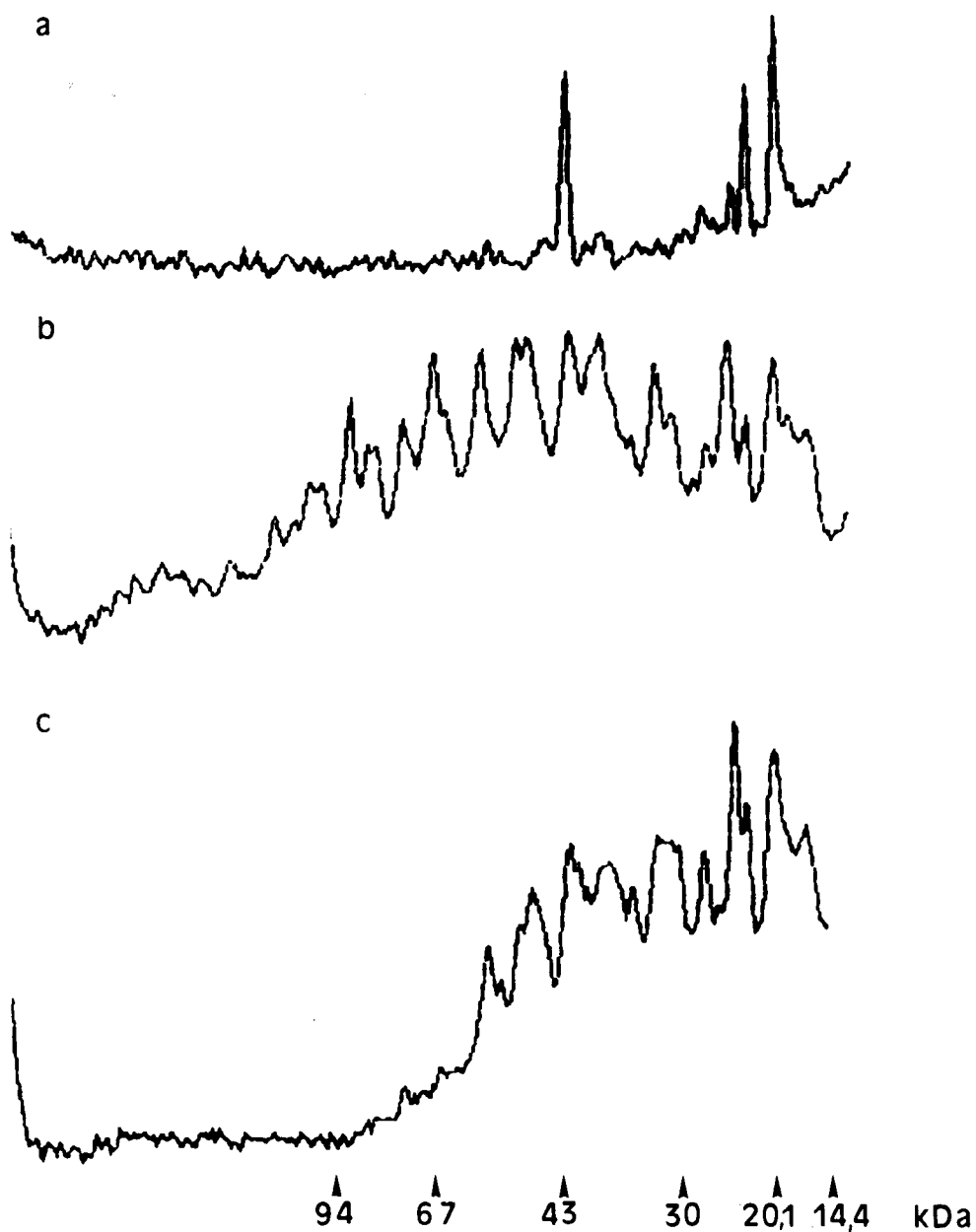


Fig. 6

Figure 7 - Immunotransferts des produits traduits *in vitro* (lysate de réticulocytes de lapin) à partir d'ARNm poly-A⁺ de cerveau après électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 5-25% SDS.

Les échantillons et leurs témoins sont incubés avec les anticorps polyclonaux anti-SISP 10-19.

a. Témoin de b : lysate de réticulocytes de lapin additionné d'eau distillée ne contenant pas d'ARNm poly-A⁺.

b. Polypeptides traduits immunorévélés par les anticorps.

c. Témoin de b : même échantillon que b incubé avec les anticorps préalablement saturés par l'antigène.

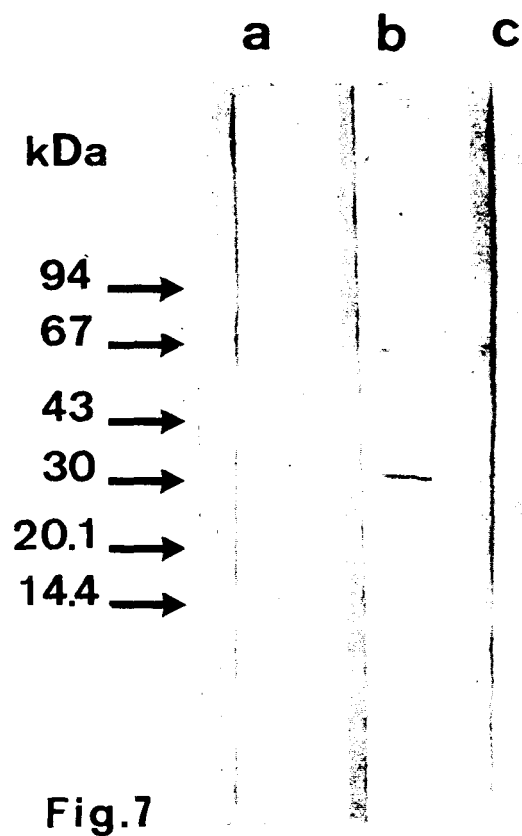


Figure 8 - Immunotransfert des produits traduits *in vivo* (ovocytes de *Xenopus laevis*) à partir d'ARNm poly-A⁺ du cerveau et des protéines extraites du cerveau de *N. diversicolor* après électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 5-25% SDS. Les immunoréactions des pistes a, b, c et d ont été réalisées avec les anticorps polyclonaux anti-SISP 10-19. Les immunoréactions des pistes e, f et g ont été réalisées avec les anticorps monoclonaux anti-SISP 1-77.

a. Protéines extraites du cerveau.

b. Témoin de c : polypeptides isolés à partir d'ovocytes injectés avec de l'eau distillée ne contenant pas d'ARNm poly-A⁺.

c. Polypeptides isolés à partir d'ovocytes injectés avec des ARNm poly-A⁺ de cerveau.

d. Témoin de c : même échantillon que c incubé avec les anticorps préalablement saturés par l'antigène.

e. Témoin de f : même échantillon que b.

f. Même échantillon que c.

g. Témoin de f : même échantillon que f incubé avec les anticorps préalablement saturés par l'antigène.

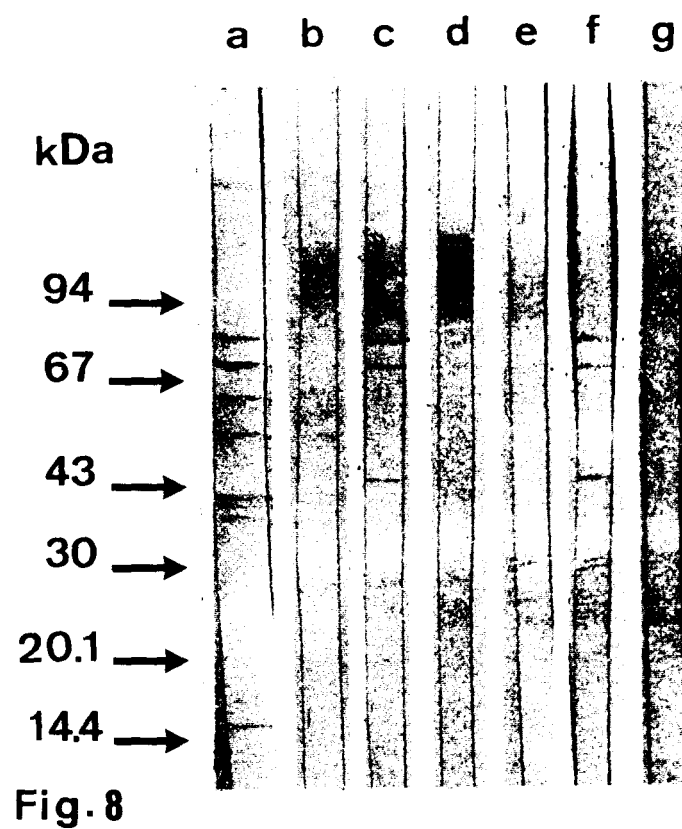


Figure 9 - Immunotransferts des produits traduits *in vivo* (ovocytes de *X. laevis*) à partir d'ARNm poly-A⁺ de cerveau après électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 5-25% SDS. Les immunoréactions des pistes a, b, c et d ont été réalisées avec les anticorps anti-dynorphine 1-17. Les immunoréactions des pistes e, f, g et h ont été réalisées avec les anticorps anti- α néo-endorphine. (Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec Guissi-Kadri S.).

piste a et e - protéines extraites du cerveau.

piste b et f - polypeptides immunorévélés isolés à partir d'ovocytes injectés avec des ARN poly A⁺ de cerveau

piste c et g - témoins respectifs de b et f: polypeptides isolés à partir d'ovocytes injectés avec de l'eau distillée ne contenant pas d'ARNm

piste d et h - témoins respectifs de b et f: même échantillon que b et f incubé avec les anticorps préalablement saturés par les antigènes spécifiques.

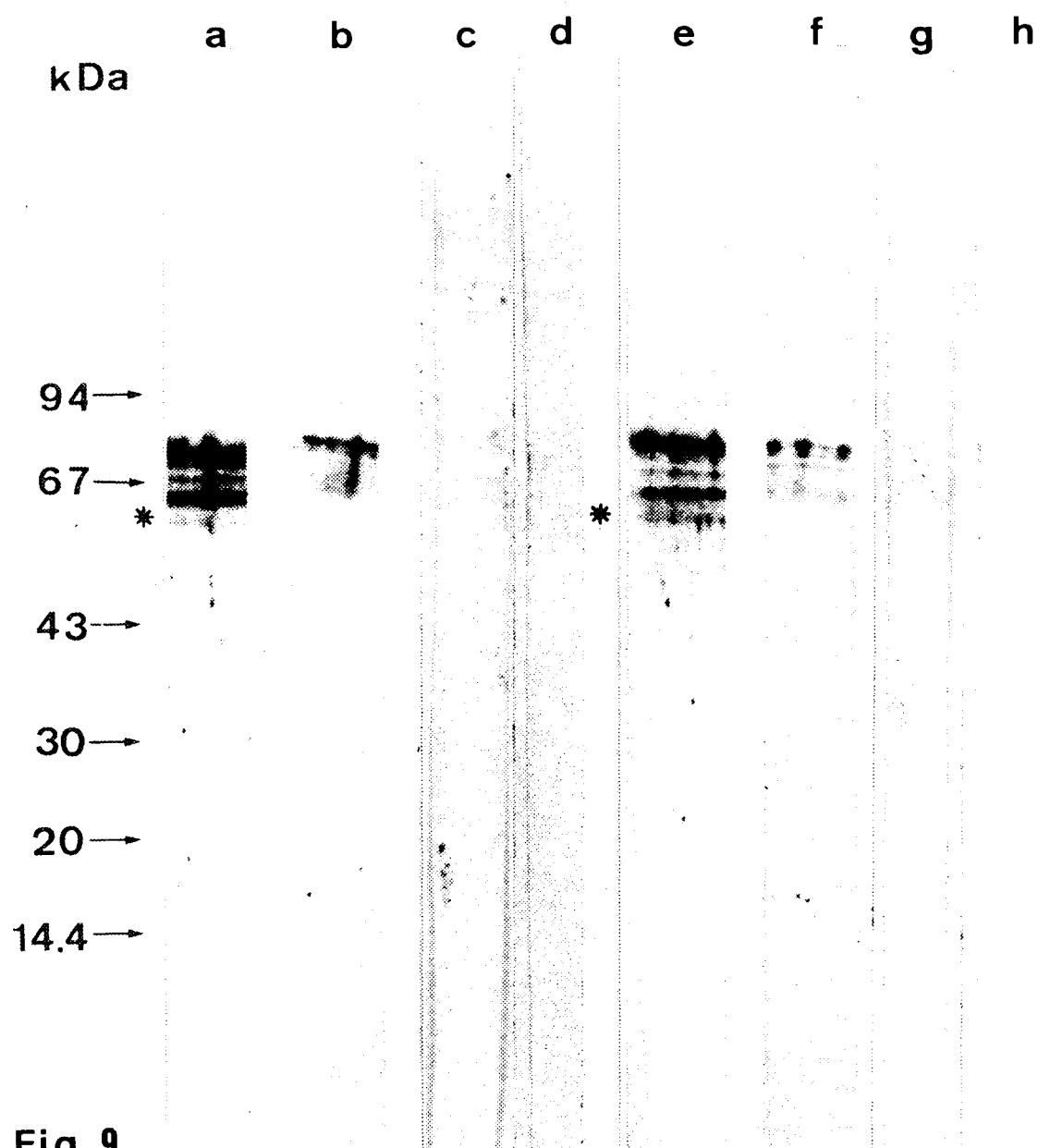
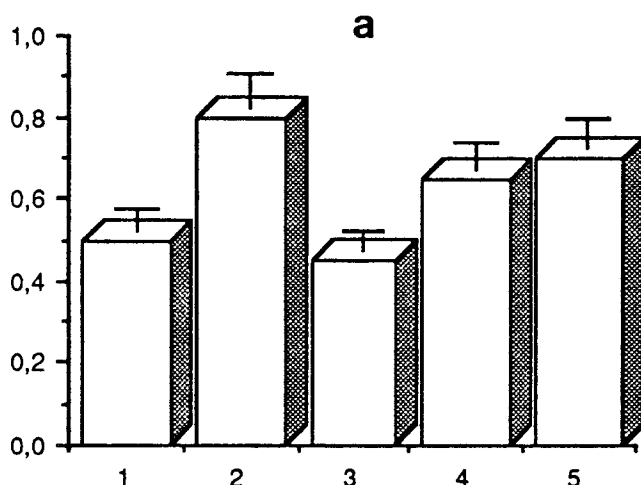
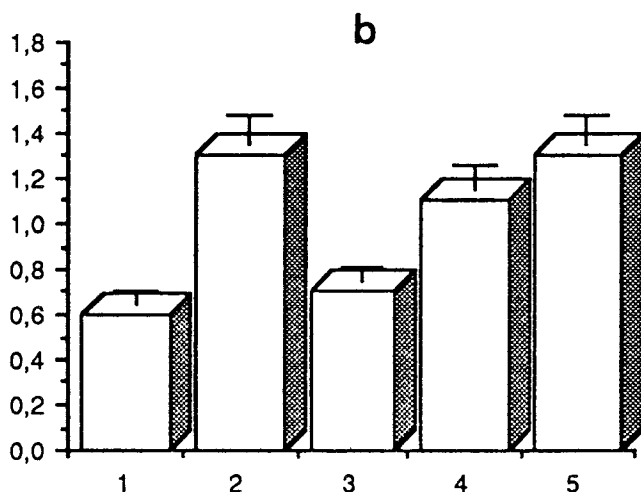


Fig. 10 Immunodétections des produits traduits *in vivo* par les anticorps anti-dynorphine 1-17 (a) et par les anticorps anti- α néo-endorphine (b) par test ELISA



- 1) Ovocytes témoins injectés par de l'eau distillée
- 2) Ovocytes témoins injectés par une solution d'ARNm
- 3) Ovocytes injectés par une solution d'ARNm incubés avec les anticorps préalablement saturés avec la dynorphine 1-17
- 4) Ovocytes injectés par une solution d'ARNm incubés avec les anticorps pré-incubés avec l' α néo-endorphine
- 5) Ovocytes injectés par une solution d'ARNm incubés avec le même lot d'anticorps que 4) mais traité au charbon dextran



- 1) Ovocytes témoins injectés par de l'eau distillée
- 2) Ovocytes témoins injectés par une solution d'ARNm
- 3) Ovocytes injectés par une solution d'ARNm incubés avec les anticorps préalablement saturés avec l' α néo-endorphine
- 4) Ovocytes injectés par une solution d'ARNm incubés avec les anticorps pré-incubés avec la dynorphine 1-17
- 5) Ovocytes injectés par une solution d'ARNm incubés avec le même lot d'anticorps que 4) mais traité au charbon dextran

- Figure 11 - Analyse qualitative de la synthèse du 1^{er} brin d'ADNc après séparation électrophorétique des échantillons dans un gel d'agarose à 1%.
- Figure 12 - Analyse qualitative de la synthèse du 2^{ème} brin d'ADNc après séparation électrophorétique des échantillons dans un gel d'agarose à 1%.
- Figure 13 - Analyse électrophorétique dans un gel d'agarose à 1% des ADNc fractionnés en fonction de leur taille après passage en chromatographie de gel filtration (Sephacryl S 400).

Le témoin de masses moléculaires est représenté par le phage λ digéré par les enzymes *EcoRI* et *HindIII* (la taille de quelques fragments de restriction est indiquée). Les flèches visualisent le départ des migrations.



Fig.11 kpb

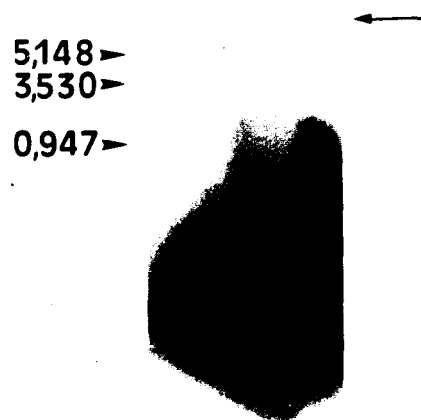


Fig.12 kpb

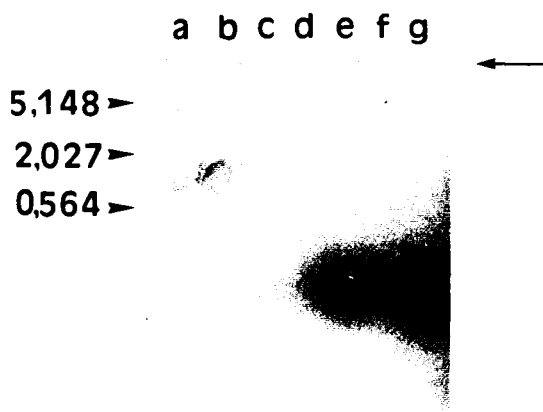


Fig.13 kpb

Figure 14 - Digestions enzymatiques de l'ADN du phage sélectionné et analyse électrophorétique dans un gel d'agarose à 1% des fragments de restriction.

- a. Digestion de l'ADN phagique par l'enzyme *BamHI*.
- b. Digestion de l'ADN phagique par l'enzyme *SmaI*.

L'astérisque indique le fragment d'ADN contenant l'insert d'intérêt de 2,9 kpb.

Figure 15 - Analyse électrophorétique dans un gel d'agarose à 1% du fragment de 3,8 kpb.

- a. Fragment de 3,8 kpb isolé.
- b. Témoin de masses moléculaires (phage λ et plasmide pSPTBM20 digérés par *StyI* et *SauI*) (la taille de quelques fragments de restriction est indiquée).

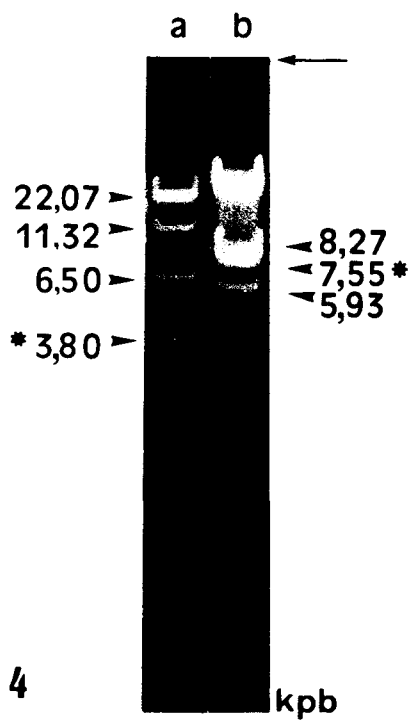


Fig.14

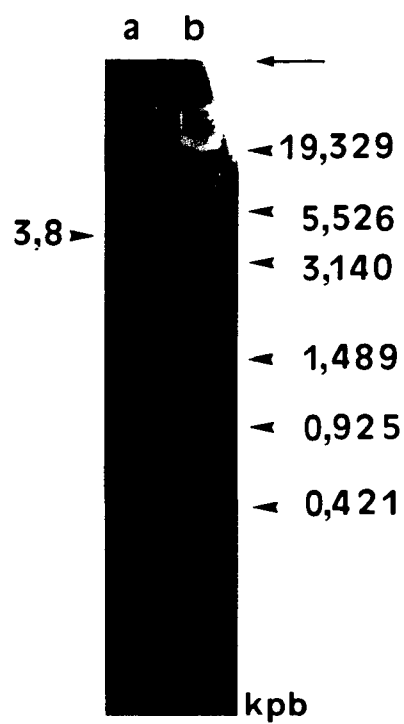


Fig.15

Figure 16 - Analyse électrophorétique des ADN plasmidiques sélectionnés après digestion par l'enzyme *BamHI*.

- a. Témoin de masses moléculaires (phage λ et plasmide pSPTBM20 digérés par *StyI* et *SauI*) (la taille de quelques fragments de restriction est indiquée).
- b. Plasmide recombiné contenant le fragment d'intérêt de 3,8 kpb.
- c, d. Plasmides non recombinés.

Figure 17 - Analyse électrophorétique dans un gel d'agarose à 1% d'un ADN plasmidique sélectionné après digestion par les enzymes *BamHI* et *KpnI*.

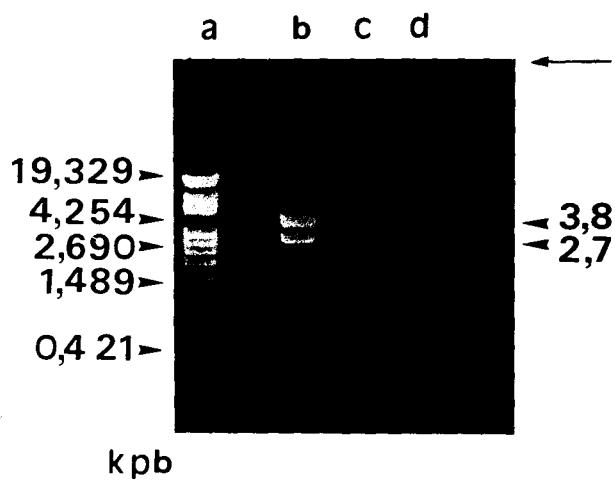


Fig.16

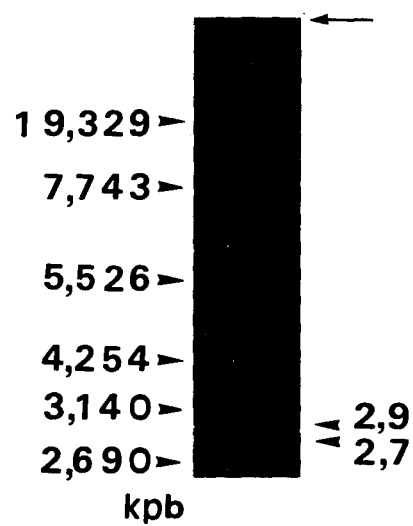


Fig.17

Figure 18A - Analyse électrophorétique dans un gel d'agarose à 1% d'un ADN plasmidique digéré par les enzymes *AccI* et *KpnI*.

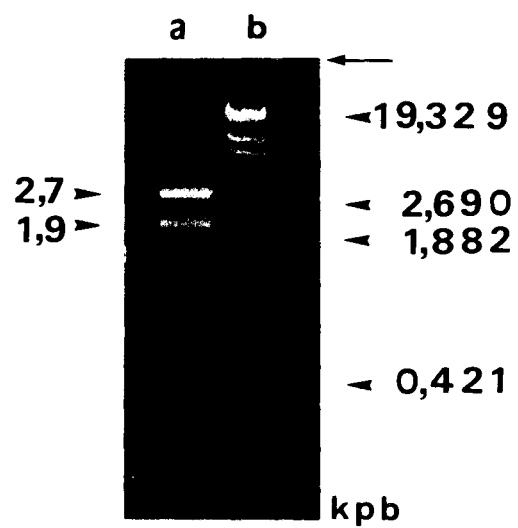
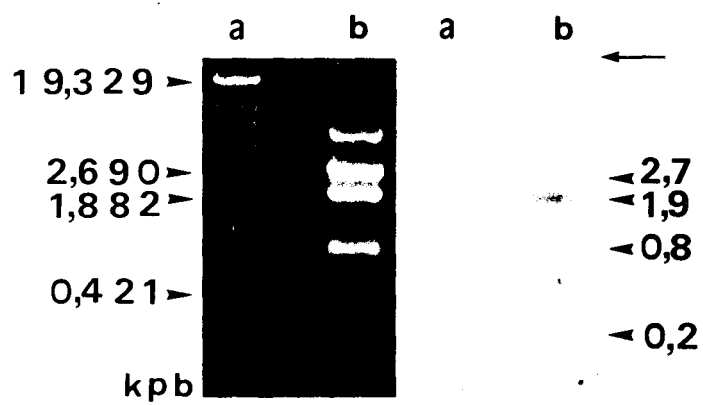
- a. Témoin de masses moléculaires (phage λ et plasmide pSPTBM20 digérés par *StyI* et *SauI*) (la taille de quelques fragments de restriction est indiquée).
- b. Fragments de restriction obtenus après une digestion du plasmide par les enzymes *AccI* et *KpnI*.

Figure 18B - Hybridation moléculaire de la sonde oligonucléotidique dirigée contre une séquence N-terminale du SISP de la limnée sur les fragments de restriction obtenus après digestion par *AccI* et *KpnI*, transférés sur nitrocellulose (technique du Southern blot).

- a. Aucune hybridation aspécifique sur les témoins de masses moléculaires.
- b. Signal d'hybridation sur le fragment de 1,9 kpb ainsi que sur une forme partiellement digérée du plasmide.

Figure 18C - Analyse électrophorétique dans un gel d'agarose à 1% d'un ADN plasmidique digéré par les enzymes *AccI* et *KpnI*.

- a. Séparation du plasmide (2,7 kpb) du fragment d'intérêt (1,9 kpb).
- b. Témoin de masses moléculaires (phage λ et plasmide pSPTBM20 digérés par *StyI* et *SauI*) (la taille de quelques fragments de restriction est indiquée).



- Figure 19 -a) Témoin de masses moléculaires
(pHA digéré par *Hinf II*, la taille de quelques fragments de restriction est indiquée)
- b) Analyse électrophorétique dans un gel d'agarose à 3% des fragments amplifiés par les amorces OS2 et OS3
L'astérisque indique le fragment cloné et séquencé

- Figure 20 -a) Témoin de masses moléculaires
(pHA digéré par *Hinf II*, la taille de quelques fragments de restriction est indiquée)
- b) Analyse électrophorétique dans un gel d'agarose à 3% des fragments amplifiés par les amorces OD1 et OD2
L'astérisque indique le fragment cloné et séquencé

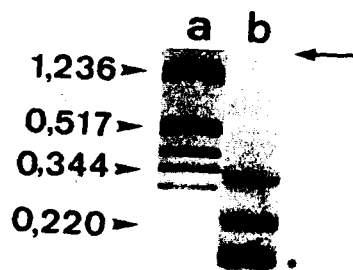


Fig.19

kpb

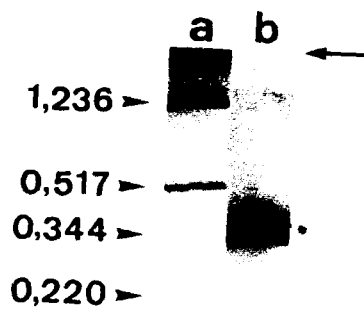


Fig.20

kpb

DISCUSSION

CONCLUSION

DISCUSSION ET CONCLUSION

La connaissance des données physiologiques anciennes concernant *N. diversicolor* (Schlieper, 1929; Beadle, 1937; Smith, 1955, 1959; Hohendorf, 1963; Oglesby, 1970) et les contacts scientifiques privilégiés de notre groupe avec nos collègues d'Amsterdam (Dr. de With, Dr. Smit, Dr. van Minnen) nous ont conduit à tenter de caractériser un des neuropeptides apparentés au SISP de *L. stagnalis*. La stratégie moléculaireiste devait nous permettre d'éviter les étapes souvent lourdes, de l'isolement et de la purification d'un neuropeptide, en particulier chez un animal dépourvu de glandes endocrines. Nous étions en droit de penser que les techniques d'ADN recombinés *in vitro* nous mèneraient à la connaissance des séquences nucléotidiques codant pour l'analogue du SISP chez la néréis, et par déduction à la détermination de la séquence en acides aminés de cette molécule.

Avant d'initier une étude approfondie en biologie moléculaire, il était nécessaire, d'avoir des informations préliminaires concernant l'éventuelle présence de cette(ces) molécule(s) dans l'espèce étudiée. Notre premier objectif a donc été d'extraire les ARNm de cerveaux de *N. diversicolor* et d'éprouver leurs capacités informatives. Les protocoles adaptés à notre matériel (Guissi-Kadri, 1989), ont permis d'obtenir des ARNm dans un bon état de conservation. L'extraction des ARN est menée en présence d'isothiocyanate de guanidium pour éviter une dégradation de ces acides nucléiques par des RNases endogènes. Les ARN sont également traités au LiCl afin d'éliminer les acides nucléiques bicaténaires. Enfin, le passage des ARN sur une colonne d'affinité oligo-dT cellulose permet de sélectionner des ARNm poly-A⁺ dont le degré de pureté est satisfaisant pour mener à bien la suite de notre expérimentation.

Des traductions d'ARNm poly-A⁺ ayant des capacités informatives élevées ont déjà été réalisées dans notre laboratoire (Guissi-Kadri, 1989; Benouareth *et al.*, 1989; Guissi-Kadri *et al.*, 1990). La capacité informative des ARNm poly-A⁺ a été testée en réalisant les traductions dans un système acellulaire : le lysat de réticulocytes de lapin. Les polypeptides obtenus, analysés par électrophorèse en milieu dénaturant, ont une masse moléculaire comprise entre 15 et 120 kDa. Ces valeurs coïncident avec celles déjà proposées par Guissi-Kadri en 1989. L'obtention constante de polypeptides de 15 à 120 kDa, lors des traductions d'ARNm poly-A⁺ provenant de différentes préparations, démontre l'efficacité de notre protocole d'extraction.

La qualité des préparations d'ARNm nous a conduit à envisager la caractérisation d'un ou de plusieurs polypeptides apparentés au SISP de la limnée à partir des ARNm isolés de cerveaux de néréis. Les anticorps utilisés dans ce but ont été essentiellement des anticorps polyclonaux anti-SISP 10-19, dont les immunorévélation ont été confirmées par un

anticorps monoclonal anti-SISP 1-77. Il faut souligner que les épitopes reconnus par ces deux lots d'anticorps sont différents (Van Minnen, com. personnelle). Les anticorps dirigés contre la partie C-terminale du SISP de la limnée ont également été utilisés, mais ils n'ont jamais montré d'immunoréactivité, ni vis-à-vis de polypeptides traduits *in vitro* (lysats de réticulocytes) ou *in vivo* (ovocytes de *X. laevis*), ni vis-à-vis de protéines natives extraites de cerveaux de néréis.

Les anticorps anti-SISP 10-19 nous ont permis de caractériser certains produits synthétisés *in vitro* ou *in vivo* à partir d'ARNm poly-A⁺ de cerveaux de néréis. Trois polypeptides traduits en lysat de réticulocytes de lapin, de masse moléculaire 64, 72 et 80 kDa, ont été révélés par ces anticorps. Deux de ces trois polypeptides, 72 et 80 kDa, sont également reconnus par les mêmes anticorps après traduction en ovocytes de *X. laevis*. Les plus petits produits obtenus dans les deux systèmes de traduction (*in vitro* et *in vivo*) et reconnus par ces anticorps diffèrent d'une façon significative, respectivement 64 kDa et 43 kDa. Cette différence de masse moléculaire peut s'expliquer par la présence de protéases dans les ovocytes, enzymes qui reconnaîtraient des signaux protéolytiques au niveau des polypeptides traduits et par conséquent induiraient la formation de produits de maturation (Soreq et Miskin, 1981). En conséquence, nous suggérons que le polypeptide de 43 kDa traduit *in vivo* et reconnu par les anticorps anti-SISP 10-19 pourrait être un produit de maturation du polypeptide traduit *in vitro* de 64 kDa. Cette hypothèse est confortée par la reconnaissance par les mêmes anticorps de 8 polypeptides de 15, 37, 39, 42, 54, 62, 72, et 80 kDa extraits du cerveau des animaux. Nous pouvons ainsi remarquer une adéquation satisfaisante entre les polypeptides traduits dans les systèmes cellulaire et acellulaire et entre les produits synthétisés *in situ*, natifs du cerveau. Par exemple, les polypeptides immunorévélés de 72 et 80 kDa sont présents après traduction des ARNm dans les systèmes cellulaire et acellulaire, mais également dans les extraits protéiques natifs de cerveaux. Les polypeptides traduits *in vitro* (64 kDa) et *in vivo* (43 kDa) reconnus par les anticorps pourraient correspondre respectivement aux polypeptides de 62 et 42 kDa extraits du cerveau.

Il a été démontré, chez les Invertébrés comme chez les Vertébrés, que les neurohormones dérivent généralement d'une molécule précurseur. Chez la néréis, des molécules de grande taille (60 à 70 kDa) reconnues par des anticorps dirigés contre le précurseur de la cholécystokinine de Mammifères (Guissi-Kadri, 1989 ; Guissi-Kadri *et al.*, 1990) ou par des anticorps dirigés contre deux opioïdes, la dynorphine 1-17 et l' α -néo-endorphine (Dugimont *et al.*, 1992b) ont été mis en évidence et ont été interprétés comme des molécules précurseurs des neuropeptides correspondants.

En ce qui concerne les molécules apparentées au SISP, nos résultats peuvent être interprétés de façon identique. Des précurseurs

de grande taille ont par ailleurs été décrits chez d'autres espèces d'Invertébrés. Ils appartiennent à deux catégories : soit il s'agit de précurseurs renfermant de multiples copies d'un même peptide (ex : le précurseur du FMRF-amide de l'aplysie de 71 kDa renfermant 28 copies du pentapeptide Phe-Met-Arg-Phe-Gly ; Taussig *et al.*, 1985) ; soit de précurseurs dont dérivent plusieurs peptides exprimant différentes activités biologiques (ex : le précurseur de la CDCH de la limnée, de 30 kDa à partir duquel sont libérés 12 peptides différents ; Vreugdenhil *et al.*, 1988a).

Dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons classer le ou les précurseurs de la molécule reconnue par des anticorps anti-SISP chez la néréis dans l'une ou l'autre de ces catégories. Il faut d'ailleurs remarquer que la masse moléculaire du précurseur du SISP de limnée et celles des précurseurs des molécules de néréis sont très différentes : 11 kDa chez la limnée (de With *et al.*, sous presse) et 80 kDa chez la néréis.

Ces résultats ont été confortés par des travaux immunohistochimiques. Les immunoréactions positives obtenues avec les anticorps anti-SISP 10-19, confirmées par les anticorps monoclonaux anti-SISP 1-77, au niveau des cellules des noyaux ganglionnaires 7, 10, 14, 17 et 20 témoignent de la présence de molécules ayant des épitopes communs avec le SISP dans le cerveau de néréis. De plus, les immunoréactions constatées dans le SNC à proximité de la région infracérébrale (aire neurohémale) du cerveau de néréis suggèrent que ces neuropeptides sont libérés dans le milieu intérieur, agissant en tant que neurohormones.

L'existence de transports actifs d'ions Na^+ à travers le tégument chez diverses espèces d'eau douce ou d'eau saumâtre (situation d'adaptation des espèces aux eaux de faible salinité) et nos résultats immunologiques nous ont incité à poursuivre notre étude par une approche de biologie moléculaire. Celle-ci consistait à élaborer une banque d'ADNc à partir des ARNm poly- A^+ isolés du cerveau de néréis, afin de déterminer les séquences codantes pour la ou les molécules reconnues par les anticorps anti-SISP. La cDNAtèque a été construite dans un lambdoïde : le phage λ ZAP II. La synthèse de cette banque d'expression a été strictement contrôlée lors de la formation des 2 brins d'ADNc et les ADNc de grande taille ont été sélectionnés par l'intermédiaire d'une chromatographie en gel filtration avant d'être "empaquetés" dans le système *in vitro* Gigapack Gold. Les ADNc de grande taille sont effectivement "empaquetés" avec une grande efficacité dans ces conditions. La banque d'ADNc ainsi élaborée devait être représentative de la population totale des ARNm spécifiques du cerveau, puisque des titres de 10^6 phages/ml avant amplification et de $5 \cdot 10^9$ phages/ml après amplification ont été obtenus. De plus, le pourcentage élevé de phages recombinés, supérieur à 90%, signe la représentativité de la banque. La recherche de clones d'intérêt dans

cette cDNAthèque a été entreprise par criblage immunologique en utilisant les anticorps anti-SISP 10-19, d'une part, et par criblage à l'aide d'une sonde d'ADNc spécifique du SISP de limnée, d'autre part. Le criblage immunologique et celui réalisé avec la sonde d'ADNc n'ont permis d'isoler respectivement que 3 et 2 clones, parmi les 6.10^5 et 10^6 analysés. Les clones sélectionnés après le criblage immunologique ont été sous clonés en plusieurs étapes, dans le plasmide pUC18. Les inserts ont été clonés dans les sites *EcoRI/XhoI* et par là-même leur intégration orientée. Une double digestion par ces 2 enzymes aurait dû permettre de séparer l'insert des "bras" du vecteur phagique. En pratique, cette double digestion est restée absolument inefficace, quels que soient les efforts et modifications envisagés pour améliorer les conditions d'hydrolyse enzymatique; cette situation peut rendre compte d'une modification ou détérioration des sites de restriction ayant servi au clonage. L'existence d'un site de restriction pour l'enzyme *BamHI* de part et d'autre du site de clonage nous a permis de surmonter le handicap précédent et d'isoler les inserts du vecteur phagique. Après digestion par *BamHI* des ADN phagiques sélectionnés, les profils électrophorétiques obtenus sont identiques et montrent un fragment de 3,8 kpb ne s'expliquant que par la présence d'un insert, résultat d'une véritable recombinaison *in vitro*. Cette digestion entraîne inévitablement un fragment d'ADN phagique de 870 nucléotides. Le fragment de 3,8 kpb a été sous cloné en pUC18. L'existence d'un site de restriction pour l'enzyme *KpnI* dans le pUC18 et d'un autre dans la séquence d'ADN du vecteur phagique résultant de la digestion par *BamHI* permet d'éliminer la majeure partie de cet ADN phagique, et d'obtenir des plasmides recombinés contenant un insert de 2,9 kpb. Nous avons tenté de raccourcir ce fragment afin de ne séquencer en priorité que les régions présentant des homologies vis-à-vis du SISP de limnée. Pour se faire, nous avons réalisé des digestions avec diverses enzymes du site multiple de clonage du pUC18. Seule une des enzymes utilisées, *AccI*, a permis de découper le fragment de 2,9 kpb en 3 sous fragments de 1,9, 0,8 et 0,2 kpb. Ces produits de digestion ont été séparés par électrophorèse, transférés sur une membrane de nitrocellulose, et confrontés à la sonde oligonucléotidique SISP7. La sonde SISP7 s'est hybridée uniquement sur le fragment de 1,9 kpb. Nous avons alors décidé de digérer ce fragment par une enzyme de restriction dont le site spécifique ne possède que 4 bases, *Sau3a*, dans le but d'obtenir des produits de digestion de plus petite taille, qui ont été clonés dans le vecteur phagique M13mp18 (technique du "shot gun"). L'objectif était de confronter l'ADN des phages M13 recombinés à la sonde SISP7 'marquée pour ne sélectionner que le ou les phages d'intérêt. Les inserts des clones manifestant un signal d'hybridation avec la sonde SISP7 ont été intégrés dans un phage M13mp18 pré-digéré par les enzymes *KpnI* et *BamHI* (cette dernière possède un site compatible avec celui de l'enzyme *Sau3a*). Nous pouvions alors conclure

que le signal autoradiographique obtenu était dû à l'hybridation de la sonde SISP7 au niveau de l'extrémité qui présente le site de restriction pour l'enzyme *KpnI*. Le regroupement et l'analyse des séquences de clones sélectionnés conduisent à la détermination d'une séquence de 132 nucléotides dont une seule phase de lecture est ouverte et code pour 44 acides aminés. La recherche d'homologie en acides aminés dans les banques de données nous a indiqué une homologie de 100% avec une protéine codée par le gène *ruvA* d'*E. coli*, gène conférant la résistance aux ultraviolets de cette bactérie. Ce résultat se conçoit dans la mesure où l'anticorps anti-SISP 10-19 reconnaît un ou plusieurs épitopes formés par un enchaînement de 10 acides aminés dont 5 sont en parfaite coïncidence au sein des séquences du SISP de limnée et de la protéine *ruvA* d'*E. coli*. ; une homologie de 50% dans la séquence de reconnaissance des anticorps pouvant suffire à provoquer des réactions croisées entre l'anticorps utilisé et les deux antigènes d'origines très éloignées. Les résultats obtenus après hybridation de la sonde nucléotidique SISP7 sur le fragment de 1,9 kpb s'expliquent de la même façon. En effet, une homologie de 50% est à nouveau constatée entre la sonde SISP7 élaborée à partir de la séquence du SISP de limnée et la séquence que nous avons déterminée. Cette homologie de 50% dans cette région sensible a manifestement induit une hybridation qui nous a mené à une impasse.

Les bactéries transformées par un vecteur recombiné avec une séquence d'intérêt ont été sélectionnées à l'aide d'une sonde d'ADNc spécifique du SISP de limnée. Après vérification de la présence de l'insert, ce dernier a été directement sous cloné en phage M13mp18 pour en établir la séquence. Parmi les différentes séquences obtenues, l'une d'entre elles possède une phase de lecture ouverte dont on peut déduire la structure primaire d'une protéine putative. Cependant, la nature de cette protéine n'a pu être précisée car aucune homologie significative en acides aminés n'a été observée après une recherche dans les banques de données. Il nous est donc impossible de classer cette protéine putative dans une famille connue.

Nos approches, bien que classiques en biologie moléculaire, ne nous ont pas permis de confirmer nos approches immunologiques concernant la présence chez la néréide d'une molécule apparentée au SISP de limnée.

Une stratégie alternative mettant en oeuvre la technique de "RT-PCR" a donc été entreprise. Nous espérons pouvoir déterminer de cette façon des séquences montrant des homologies entre les gènes étudiés chez les deux modèles envisagés. En conséquence, des amorces oligonucléotidiques ont été élaborées de façon à minimiser les chances d'amplifications de fragments sans intérêt. En effet, les amorces ont été choisies à partir de la séquence de l'ADNc du SISP de limnée, dans des régions spécifiant des acides aminés déterminés par des triplets peu dégénérés. Nous avons cependant rencontré un problème répétitif dans

ces expériences, puisque la même amorce s'est hybridée deux fois, amplifiant un fragment d'ADN à priori sans intérêt. Ce phénomène d'hybridation d'une même amorce en sens inverses sur les deux brins d'ADN constitue un obstacle dont la probabilité est non négligeable et qui relativise la réussite de la technique de PCR. On peut palier à ces échecs en mettant en oeuvre une très lourde approche (temps, problèmes péculiaires) consistant en une modification des amorces, ainsi qu'en une variation des conditions de PCR.

En guise de conclusion, bien que l'entrée active d'ions Na^+ du milieu extérieur vers le milieu intérieur de l'animal soit l'un des mécanismes fondamentaux de l'adaptation d'une espèce hyperosmotique vis-à-vis du milieu où elle vit (eau douce ou eau saumâtre), il ne nous a pas été possible par notre approche moléculaireiste de démontrer l'existence d'une neurohormone apparentée au SISP. Au terme de cette étude, nous ignorons si les molécules exhibant des épitopes reconnus par les anticorps anti-SISP 10-19 (polyclonaux) et anti-SISP 1-77 (monoclonaux) jouent un rôle dans l'osmorégulation. En tout état de cause elles présentent des différences avec le SISP de limnée : taille des précurseurs différente, absence de reconnaissance par l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale du SISP.

Parallèlement à notre étude, la purification et l'isolement de peptides cérébraux a été effectuée, dans notre laboratoire, après double extraction eau bouillante-acide acétique. Les fractions issues d'un premier passage en CLHP des extraits neutres ou acides ont été testées avec l'anticorps anti-SISP 10-19 (Andries, commun-pers.). Seules deux fractions présentent une faible immunoréactivité. Toutes deux proviennent de l'extrait acide (l'extraction acide à la suite d'une extraction à l'eau bouillante permet l'obtention de peptides de poids moléculaire élevé, Rehfeld *et al.*, 1985). La plus immunoréactive est éluee à une concentration d'acétonitrile relativement élevée, ce qui traduit l'hydrophobicité de cette(ces) molécule(s). Toutefois, les mêmes réserves s'imposent quant à la conclusion de l'existence de molécules homologues du SISP. Seul l'isolement biochimique et la connaissance de la structure primaire de l'homologue du SISP chez la néréis nous permettraient d'élaborer des sondes oligonucléotidiques homologues qui optimiseraient enfin nos chances de caractériser le ou les gènes spécifiant l'homologue du SISP chez cette Annélide.

Le second objectif de notre travail était de caractériser chez la néréis des molécules apparentées aux opioïdes de la famille des dynorphines : dynorphine 1-17 et α -néo-endorphine de Mammifères. Les opioïdes actuellement recensés chez les Mammifères peuvent être classés en 3 familles : les endorphines, les enképhalines et les dynorphines. Cette classification est fondée sur l'existence de molécules précurseurs à partir desquelles dérivent ces neuropeptides. Les

séquences géniques spécifiant ces précurseurs, ainsi que leur séquence en acides aminés, sont parfaitement déterminées chez quelques espèces (Nakanishi *et al.*, 1979 ; Kakidani *et al.*, 1982 ; Noda *et al.*, 1982). En 1987, Leung et Stephano suggèrent, d'après les travaux d'Horikawa *et al.*, (1983), une origine ancestrale commune pour ces 3 précurseurs. De plus, les gènes spécifiant ces précurseurs montrent des arrangements en exons et introns très similaires (Horikawa *et al.*, 1983). Depuis quelques années, les opioïdes font l'objet de nombreuses études chez les Invertébrés. Ainsi, des molécules de type opioïde ont été recensées chez l'unicellulaire *Tetrahymena* (Le Roith *et al.*, 1982) et chez de nombreux Métazoaires Invertébrés, parmi lesquels les Insectes (Rémy *et al.*, 1978, 1979 ; Gros *et al.*, 1978 ; Rémy et Dubois, 1981 ; Hansen *et al.*, 1982 ; Duve et Thorpe, 1983 ; El-Salhy *et al.*, 1983 ; Pagés *et al.*, 1983 ; Romeuf et Rémy, 1984 ; Verhaert et De Loof, 1985 ; Duve *et al.*, 1986), les Mollusques (Martin *et al.*, 1979, 1983 ; Ottaviani *et al.*, 1990), les Annélides Oligochètes (Alumets *et al.*, 1979 ; Aros *et al.*, 1980 ; Gesser et Larsson, 1986 ; Kaloustian et Rzasz, 1986), Achètes (Zipser, 1980 ; Flanagan et Zipser, 1986 ; Leake *et al.*, 1986) et Polychètes (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985a, 1986 ; Dhainaut-Courtois et Golding, 1988 ; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988 ; Diaz-Miranda *et al.*, 1991).

Si les isollements biochimiques d'opioïdes d'Invertébrés restent peu nombreux (Leung et Stephano, 1984 ; Stephano et Leung, 1984 ; Lüschen *et al.*, 1991), des recherches nombreuses sont orientées vers la caractérisation de récepteurs d'opioïdes, preuves indirectes de l'existence de ces neuropeptides, (Kream *et al.*, 1980 ; Stephano *et al.*, 1980 ; Stephano et Scharrer, 1981 ; Santoro *et al.*, 1985 ; Zipser *et al.*, 1988). Notre intérêt concernant les opioïdes s'inscrivait dans le cadre d'une étude phylogénétique de ces molécules ubiquitaires dans le règne animal, et devait nous permettre de tester l'hypothèse de Leung et Stephano (1987), selon laquelle il existerait un précurseur commun à la dynorphine 1-17 et à l' α -néo-endorphine chez les Invertébrés.

Les anticorps utilisés dans cette étude sont des anticorps anti-dynorphine 1-17 ou anti- α -néo-endorphine. Ils nous ont permis de caractériser certains produits traduits *in vivo* ou *in vitro* à partir d'ARNm poly-A⁺ extraits de cerveaux de néréis. Des résultats préliminaires concernant cette approche immunologique ont déjà été obtenus dans notre groupe (Guissi-Kadri, 1989). Ces informations ont été confirmées et complétées (Dugimont *et al.*, 1992b). Des produits traduits *in vivo*, de masse moléculaire comprise entre 60 et 70 kDa, ont été reconnus par les deux anticorps. Ces derniers ont également reconnu des protéines natives extraites de cerveaux de néréis, protéines de masse moléculaire comprise entre 60 et 70 kDa. Toutes les immunoréactions ont été strictement contrôlées lors des immunotransferts, comme lors des tests ELISA. Ces derniers sont précieux car la technique mise en oeuvre associe sensibilité de détection et rapidité de manipulation. Ainsi nous avons pu nous convaincre de la spécificité des immunoréactions et

par voie de conséquence du bien fondé de l'utilisation des anticorps. Ces tests sont d'autant plus intéressants qu'ils nous donnent des informations quantitatives; les valeurs de densité optique traduisant l'intensité des immunoreconnaitances. Une différence significative de densité optique est observée entre les échantillons nommés "expériences" et leurs témoins, aussi bien pour les anticorps anti-dynorphine 1-17 que pour les anticorps anti- α -néo-endorphine. Une telle différence d'intensité de réaction révèle une réelle traduction de polypeptides dans les ovocytes de *X. laevis* injectés par une solution d'ARNm. La présence d'opioïdes endogènes dans les ovocytes de batracien expliquerait le "bruit de fond" observé dans le témoin. Nos résultats immunologiques ont été vérifiés par deux contrôles supplémentaires. Le premier contrôle est représenté par des ovocytes injectés par une solution d'ARNm dont les produits de traduction sont confrontés aux anticorps préalablement incubés avec leur antigène spécifique. Dans ces expériences, l'intensité des immunoréactions est nettement diminuée, ce qui traduit une saturation efficace des anticorps. Un deuxième contrôle est réalisé en confrontant les produits traduits *in vivo* aux anticorps pré-incubés avec un antigène non spécifique (ex : anti-dynorphine/ α -néo-endorphine). Dans ce cas, une diminution de l'intensité est encore observée. Ce résultat peut rendre compte, soit d'une réaction croisée pouvant remettre en cause l'ensemble de notre étude immunologique, soit d'un encombrement stérique dû à l'excès d'antigènes libres, même non spécifiques dans le milieu réactionnel. Pour en décider, nous avons confronté les produits traduits *in vivo* à des anticorps pré-incubés avec un antigène non spécifique, puis traités par un passage sur charbon/dextran. Ce procédé permet d'éliminer l'excès d'antigènes libres présents non spécifiques dans le milieu réactionnel. Dans cet ultime contrôle, le recouvrement d'une immunoréaction identique, ou pratiquement identique, à celle obtenue lors d'expériences au cours desquelles ont été employés des anticorps n'ayant subi aucune saturation, argue en faveur de l'existence d'un encombrement stérique empêchant l'accès des anticorps aux antigènes spécifiques. Ces résultats obtenus par tests ELISA ont été confirmés par les immunotransferts sur nitrocellulose de produits traduits *in vivo*. La reconnaissance par les anticorps anti-dynorphine 1-17 et par les anticorps anti- α -néo endorphine de protéines extraites de cerveaux de néréis d'une part, et de produits traduits *in vivo* ou *in vitro* d'autre part, nous a incité à poursuivre notre recherche en tentant de caractériser le ou les gènes spécifiant ces opioïdes chez la néréis.

Nous avons donc élaboré des amorces oligonucléotidiques à partir des séquences les plus conservées et les moins dégénérées des gènes spécifiant la prodynorphine chez l'Homme; le porc et le rat. Deux séquences ont été définies et utilisées dans les expériences de "RT-PCR". Un seul fragment d'ADN de 375 nucléotides a été amplifié et entièrement séquencé. Dans cette expérience, comme précédemment, la

même amorce s'est hybridée dans les 2 sens assurant l'amplification de ce fragment de 375 nt. La recherche dans les banques de données révèle une homologie de 63% sur une cinquantaine de nucléotides entre ce fragment et le gène de la POMC du xénope (Deen *et al.*, 1991). Toutefois, l'homologie se situe dans une région intronique du gène, sans phase de lecture ouverte, ce qui tendrait à suggérer du fait que nous ayons pratiqué une "RT-PCR", une contamination de la préparation d'ARN par de l'ADN de néréis, lequel aurait été amplifié. Néanmoins, indirectement nos résultats suggèrent l'existence d'opioïdes et de leurs précurseurs chez cette Annélide. Pour confirmer la présence de telles molécules, d'autres préparations d'ARN, ainsi que d'autres conditions de PCR (essentiellement d'autres amorces) seraient à envisager.

Au terme de cette étude concernant quelques neuropeptides du SNC de *N. diversicolor*, nous suggérons l'existence de précurseurs de grandes tailles non seulement pour les peptides de la famille des opioïdes, mais également pour une molécule ayant été reconnue par les anticorps anti-SISP. Les résultats concernant les opioïdes se rapprochent des connaissances acquises chez les Mammifères dont les précurseurs sont de taille importante, bien qu'il existe une différence notable entre les molécules comparées : 30 kDa versus 60 à 70 kDa. Les résultats obtenus, après une longue et lourde expérimentation ayant pour objet une neurohormone ayant un rôle dans l'osmorégulation, et si toutefois une telle molécule existe chez la néréis, révèlent une situation différente de celle décrite chez la limnée. En effet, les immunoréactions montrent la présence chez la néréis de grandes molécules, à qui nous conférons le rôle de précurseurs, à partir desquelles un ou des produits actifs pourraient dériver. La taille de ces molécules précurseurs est différente de celle déterminée pour le précurseur du SISP chez la limnée (11 kDa) (de With *et al.*, sous presse). De plus, l'impossibilité de conclure à la présence d'un facteur natrémique par les diverses techniques employées nous incite à croire que les molécules, qui nous occupent chez l'Annélide et chez le Mollusque, doivent comprendre des divergences majeures.

Notre conviction actuelle, exprimée bien évidemment dans le strict cadre de toutes les molécules envisagées dans ce travail, est que la divergence au niveau moléculaire entre les espèces envisagées est bien plus grande que peuvent le laisser prévoir des résultats obtenus par des techniques immunologiques, même sérieusement contrôlées.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Akil H., Watson S.J., Young E., Lewis M., Kachaturian H. and Walker J.M., 1984. Endogenous opioids : biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7, 223-225.
- Alumets J., Hakanson R., Sundler F. and Thorell J., 1979. Neuronal localization of immunoreactive enkephalin and β -endorphine in the earthworm. *Nature* 279, 805-806.
- Aros B., Wenger T., Vigh B. and Vigh-Teichmann I., 1980. Immunohistochemical localization of substance P and ACTH-like activity in the central nervous system of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Acta Histochem* 66, 262-268.
- Baratte B., 1990. Caractérisation chez une Annélide Polychète (*Nereis diversicolor* O. F. Müller) de peptides apparentés au FMRF-amide. Localisation immunocytochimique, purification, structure. Thèse d'Université, Sciences de la Vie et de la Santé, Lille.
- Baratte B., Gras-Masse H., Ricart G., Bulet P. and Dhainaut-Courtois N., 1991. Isolation and characterization of authentic Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ and the novel Phe-Thr-Arg-Phe-NH₂ peptide from *Nereis diversicolor*. *Eur J Biochem* 198, 627-633.
- Baratte B., van Minnen J., Masson M. et Dhainaut-Courtois N., 1990. Localisation par voie immunohistochimique d'un matériel apparenté au FMRF-amide chez trois Annélides Polychètes *Nereidae* (*Nereis diversicolor*, *Nereis virens*, *Perinereis cultrifera*). *C R Acad Sci Paris* 311, 495-500.
- Beadle L. C., 1937. Adaptation to changes of salinity in the polychaetes. I. Control of body volume and of body fluid concentration in *Nereis diversicolor*. *J exp Biol* 14, 56-70.
- Benouareth D. E., Dhainaut-Courtois N., Porchet-Henneré E. and Cury J. J. 1989. Translation in a cell-free system and in *Xenopus* oocytes, of mRNA which specify a cadmium-binding protein in *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta). *Biol Cell* 67, 167-171.
- Bodenmüller H. and Schaller H. C., 1981. Conserved amino acid sequence of a neuropeptide, the head activator, from coelenterates to humans. *Nature* 293, 579-580.

- Boer H. H., Montagne-Wajer C., van Minnen J., Ramkema M. and de Boer P., 1992.** Functional morphology of the neuroendocrine sodium influx stimulating peptide system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*, studied by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Cell Tissue Res* **268**, 559-566.
- Boer H. H., Schot L. P. C., Veenstra J. A. and Reichelt D., 1980.** Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRFamide. *Cell Tissue Res* **213**, 21-27.
- Boilly B., 1974.** Mode d'action du cerveau sur la régénération caudale de *Nereis diversicolor* (Annélide Polychète). *Wilhem Roux Archiv* **174**, 195-209.
- Boilly B. et Boilly-Marer Y., 1972.** Rôle des contacts tissulaires dans le déclenchement de la morphogenèse régénératrice chez la *Nereis*. *Bull Soc Zool Fr* **97**, 296-308.
- Bulet P. and Porchet M., 1986.** A new purification procedure for the neuropeptide controlling gametogenesis in Nereids (Annelida Polychaeta). *In: Advances in Invertebrate reproduction*. Porchet M., Andries J.C., Dhainaut A. (eds). Elsevier, Amsterdam, 1-498.
- Cardon C., 1970.** Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de *Nereis diversicolor* O. F. Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation. *Bull Soc Zool Fr* **95**, 543-549.
- Cardon C., Durchon M. et Porchet M., 1981.** Purification par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) de l'hormone cérébrale de *Nereis diversicolor* et de *Perinereis cultrifera*. *Reprod Nutr Develop* **21**, 383-390.
- Cardon C. et Porchet M., 1973.** Purification partielle d'une substance responsable de la rétroaction génitale sur l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. *C R Acad Sci Paris* **277**, 1761-1764.
- Chaisemartin C., 1969.** Adaptations aux variations de salinité et régulation comparée du turn-over sodique chez les mollusques dulçaquicoles. *C R séances Soc Biol Paris* **163**, 2422-2425.

- Chen S. T., Tsai M. S. and Shen C. L., 1989. Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the formosan monkey (*Macaca cyclopsis*). *Peptides* **10**, 825-834.
- Chiu A. Y., Hunkapillar M., Heller E., Stuart D. K., Hood L. E. and Strumwasser F., 1979. Neuropeptide egg laying hormone of *Aplysia californica* : Purification and primary structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 6656-6660.
- Christensson-Nylander I., Nyberg F., Ragnarsson U. and Terenius L., 1985. A general procedure for analysis of proenkephalin B derived opioid peptides. *Reg Peptides* **11**, 65-76.
- Civelli O., Douglass J., Goldstein A. and Herbert E., 1985. Sequence and expression of the rat prodynorphin gene. *Proc Natl Acad Sci* **82**, 4291-4295.
- Clark R. B., 1955. The posterior lobes of the brain in *Nephtys* and the mucus glands of the prostomium. *Q J Microsc Sci* **96**, 545-565.
- Clark R. B., 1966 The integrative action of a worm's brain. *Symp Soc exper Biol USA* **20**, 345-379.
- Clemens M.J., 1983. Translation of eucaryotic messenger RNA in cell-free extracts. *In* : Transcription and Translation, a practical approach. Hames B.D. and Higgins S.J. (eds). IRL press, Oxford, Washington DC, 231-270.
- Cobbs J. S. and Pinsker H. M., 1982. Role of bag cells in egg deposition of *Aplysia brasiliana*. I. Comparison of normal and elicited behaviours. *J Comp Physiol* **147A**, 523-535.
- Collins M. L. and Hunsaker W. R., 1985. Improved hybridization assays employing tailed oligonucleotides probes and nick-translated plasmid probes. *Anal Biochem* **151**, 211-224.
- Comb M., Seeburg P. H., Adelman J., Eiden L. and Herbert H., 1982. Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* **295**, 663-666.
- Davis T. P., Porreca F., Burks T. F. and Dray A., 1985. The proenkephalin fragment, peptide E : central processing and CNF activity *in vivo*. *Eur J pharmacol*, **111**, 177-183.

- Deen P. M. T., Terwel D., Bussemakers M. J. M., Roubos E. W. and Martens G. J. M. 1991. Structural analysis of the entire proopiomelanocortin gene of *Xenopus laevis*. Eur J Biochem **201**, 129-137.
- Delaire-Hesdin A., 1989. Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des neurosécrétions du cerveau de *Nereis virens* : purification des neuropeptides reconnus et identification des cellules concernées. Thèse d'Université, Sciences de la vie et de la santé, Lille.
- de With N. D., 1977. Evidence for the independant regulation of specific ions in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* (L.). Proc Kon Ned Akad Wet **C80**, 109-120.
- de With N. D., 1980. Water turn-over, ultrafiltration, renal water reabsorption and renal circulation in fed and starved specimens of *Lymnaea stagnalis*, adapted to different osmolarities. Proc Kon Ned Akad Wet **C83**, 109-120.
- de With N. D., Ebberink R. H. M. and van der Schors R. C., 1987. Neurohormonal control of sodium metabolism in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. In: Neurobiology, Molluscan models. Boer H. H., Geraerts W. P. M., Joosse J. (eds). North-Holland, Amsterdam, Oxford, New York, 357-360.
- de With N. D., Li K. W., van Minnen J., van der Schors R. C., Smit A. B., Thijsen S. F. T. and Boer H. H., 1991. Neuroendocrine control of hydromineral regulation in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. In: Molluscan neurobiology. Kits K. S., Boer H. H., Joosse J. (eds). North-Holland, Amsterdam, 335-339.
- de With N. D., Roel C., van der Schors R. C. and Ebberink R. H. M.. The sodium influx stimulating peptide of the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis* ; purification and primary structure of a novel neuropeptide involved in sodium homeostasis. (in press).
- de With N. D., Slootstra J. W. and van der Schors R. C., 1988. The bioelectrical activity of the body wall of the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis* : effects of neurotransmitters and the sodium influx stimulating neuropeptides. Gen Comp Endocrinol **70**, 216-223.

- de With N. D. and van der Schors R. C., 1982. On the interrelations of the Na^+ and Cl^- influxes in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. J Comp Physio 148, 131-135.
- de With N. D. and van der Schors R. C., 1983. Neuroendocrine aspects of sodium and chloride metabolism in the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. In: Molluscan neuroendocrinology. Lever J. and Boer H. H. (eds). Mon Royal Neth Academy of Arts and Sciences. North-Holland Publishing Co, Amsterdam, Oxford, New York, 208-213.
- de With N. D. and van der Schors R. C., 1984. Urine composition and kidney function in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Comp Biochem Physiol 79A, 99-103.
- de With N. D. and van der Schors R. C., 1986. Neurohormonal control of Na^+ and Cl^- metabolism in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Gen Comp Endocrinol 63, 344-352.
- 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 d'Etat Sciences Naturelles, Lille.
- Dhainaut-Courtois N., Dubois M. P., Tramu G. and Masson M., 1985a. Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O. F. Müller (Annelida Polychaeta) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. Cell Tissue Res 242, 97-108.
- Dhainaut-Courtois N. and Golding D. W., 1988. Nervous system. In: The ultrastructure of Polychaeta. Westheide W., Hermans C. O.(eds). Microfauna marina, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York 4, 89-110.
- Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Beauvillain J. C. and Masson M., 1986. A qualitative approach of the *Nereis* neuropeptides by use of antibodies to several vertebrate peptides. Neurochem Int 8, 327-338.
- Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Marcel R., Malecha J., Verger-Bocquet M., Andriès J. C., Masson M., Selloum L., Belemtougri G. and Beauvillain J. C., 1985b. Cholecystokinin in the nervous systems of Invertebrates and Protochordates. Immunohistochemical localization of a cholecystokinin-8-like substance in Annelids and Insects. In: Neuronal Cholecystokinin, Ann NY Acad Sci 448, 167-187.

- Diaz-Miranda L., Escalona de Motta G. and Garcia-Arraras J. E., 1991.** Localization of neuropeptides in the nervous system of the marine annelid *Sabellastarte magnifica*. Cell Tissue Res. **266**, 209-217.
- Dockray G. J., Vaillant C. and Williams R. G., 1981.** New vertebrate brain-gut peptide related to a molluscan neuropeptide and an opioid peptide. Nature **293**, 656-657.
- Dugimont T., Dhainaut-Courtois N., van Minnen J., de With N. D. and Cury J. J., 1992a.** Some polypeptides in the nervous system of the marine worm, *Nereis diversicolor*, are related to the Sodium Influx Stimulating Peptide of the pulmonate freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. Gen Comp Endocrinol **87**, 120-126.
- Dugimont T., Guissi-Kadri S. and Cury J. J., 1992b** Precursors of molecules related to mammalian opioid peptides in brain of a marine worm. Int J Peptide Protein Res **39**, 300-307.
- Durchon M., 1948.** Epitoque expérimentale chez deux polychètes : *P. cultrifera* et *N. irrorata*. C R Acad Sci Paris **227**, 157-158.
- Durchon M., 1949.** Inhibition de l'épitoque par le prostomium chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). C R Acad Sci Paris **229**, 81-82.
- Durchon M., 1952.** Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes: l'épitoque et la stolonisation. Ann Sc Nat Zool Biol Anim **14**, 119-206.
- Durchon M., 1962.** Induction et inhibition expérimentale de l'épitoque par homogreffes chez les Néréidiens. Bull Soc Zool Fr **87**, 575-582.
- Durchon M., 1965.** Evolution phylogénétique et ontogénétique de l'épitoque chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). C R Acad Sci Paris **241**, 445-447.
- Durchon M., Boilly B. et Dhainaut A., 1965.** Recherches en culture organotypique sur l'action de l'hormone cérébrale des Néréidiens (Annélides Polychètes). C R Soc Biol Fr **159**, 106-113.
- Durchon M., Montreuil J. et Boilly-Marer Y., 1963.** Résultats préliminaires sur la nature chimique de l'hormone inhibitrice du cerveau des Néréidiens. C R Acad Sci Paris **257**, 1807-1808.

- Durchon M. et Porchet M., 1971.** Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. *Gen Comp Endocrinol* **16**, 555-565.
- Duve H. and Thorpe A., 1983.** Immunocytochemical identification of α -endorphine-like material in neurons of the brain and corpus cardiacum of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. *Cell Tiss Res* **233**, 415-422.
- Duve H., Thorpe A. and Scott A., 1986.** Localization and characterization of opioid-like peptides in the nervous system of the blowfly *Calliphora vomitoria*. In : Handbook of Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms. Stefano G. B. (ed). CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, 197-211.
- Ebberink R. H. M. and Joosse J., 1985.** Molecular properties of various snail peptides from brain and gut. *Peptides* **6**, suppl. 3, 451-457.
- Ebberink R. H. M. , van Loenhout H., van Beek J., De Wilde K. and van Minnen J., 1987.** Characterization of peptides isolated from growth-controlling neuroendocrine cells of *Lymnaea stagnalis* with immunoreactivity to anti-insulin. In: Neurobiology, Molluscan Models, H. H. Boer, W. P. M. Geraerts, J. Joosse (eds), North Holland Publ. Comp., Amsterdam, 224-227.
- Ebberink R. H. M., Van Loenhout H., Geraerts W. P. M. and Joosse J., 1985.** Purification and amino acid sequence of the ovulation hormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 7767-7771.
- El-Salhy M. , Falkmer S., Kramer K. J. and Speirs R. D., 1983.** Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca and corpora allata of an adult lepidopteran insect, *Manduca sexta* (L.). *Cell Tissue Res* **232**, 295-317.
- Engelhardt R. P., Dhainaut-Courtois N and Tramu G., 1982.** Immunohistochemical demonstration of a CCK-like peptide in the nervous system of a marine annelid worm, *Nereis diversicolor* O. F. Müller. *Cell Tissue Res* **227**, 401-411.
- Evans D. H., 1975.** Ionic exchange mechanisms in fish gills. *Comp Biochem Physiol A*, **51**, 491-495.

- Favrel P., Van-Wormhoudt A., Studler J. M., and Bellon C., 1987.** Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinin peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea decapoda) intermolt variations. *Gen Comp Endocrinol* **65**, 363-372.
- Flanagan T. and Zipser B., 1986.** Opioid-peptide and substance P immunoreactivity in cytological preparations and tissue homogenates of the leech CNS. *In* : Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms. Stefano G. B. (ed). CRC Press, Boca Raton, Florida, 165-180.
- Fretter V., 1955** Uptake of radioactive sodium (^{24}Na) by *Nereis diversicolor* O. F. Müller and *Perinereis cultrifera* Grube. *J mar biol Ass UK* **34**, 151-160
- Gaillet N., 1985.** Mise en évidence et rôle physiologique des ecdystéroïdes chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). Thèse 3ème cycle, Lille.
- Geraerts W. P. M., Buma P. and Hogenes Th. M., 1984.** Isolation of neurosecretory granules from the neurohemal areas of peptidergic systems of *Lymnaea stagnalis*, with special reference to the ovulation hormone producing caudo-dorsal cells. *Gen Comp Endocrinol* **52**, 212-217.
- Geraerts W. P. M. and Joosse J., 1984.** Freshwater snails (Basommatophora). *In*: The mollusca. Tompa A. S., Verdonk N. H., Van den Biggelaar J. A. M. (eds). Acad Press, New York, 7, 142-207.
- Geraerts W. P. M., Tensen C. P. and Hogenes Th. M., 1983.** Multiple release of peptides by electrically active neurosecretory caudo-dorsal cells of *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Lett* **41**, 151-155.
- Geraerts W. P. M., Ter Maat A. and Vreugdenhil E., 1988a.** The peptidergic neuroendocrine control of egg-laying behaviour in *Aplysia* and *Lymnaea*. *In*: Invertebrate Endocrinology. Laufer H. and Downer G. H. (eds). Alan R. Liss, New York, 141-231.
- Geraerts W. P. M., Vreugdenhil E. and Ebberink R. H. M., 1988b.** Bioactive peptides in Molluscs. *In*: Invertebrate Peptide Hormones. Thorndyke M. C. and Goldsworthy G. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, 377-468.

- Geraerts W. P. M., Vreugdenhil E., Ebberink R. H. M. and Hogenes Th. M., 1985.** Synthesis of multiple peptides from a larger precursor in the neuroendocrine caudo-dorsal cells of *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Lett* **56**, 241-246.
- Gesser B. P. and Larsson L.I., 1986.** Enkephalins may act as sensory transmitters in earthworms. *Cell Tissue Res* **246**, 33-37.
- Golding D. W., 1965.** Endocrinology and morphogenesis in *N. diversicolor*. *Gen Comp Endocrinol* **5**, 651.
- Golding D. W. and May B. A., 1982.** Duality of secretory inclusions in neurons. Ultrastructure on the corresponding sites of release in Invertebrates nervous systems. *Acta Zool (Stockholm)* **63**, 229-238.
- Goldstein A., Fischli W., Lowney L.T., Hunkapiller M. and Hood L., 1981.** Porcine pituitary dynorphin : complete amino acid sequence of the biologically active heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 7219-7223.
- Greenaway P., 1970.** Sodium regulation in the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). *J exp Biol* **53**, 147-163.
- Gros C., Lafon-Cazal M. et Dray F., 1978.** Présence de substances immunoréactivement apparentées aux enképhalines chez un insecte, *Locusta migratoria*. *C R Acad Sci Paris* **287**, 647-650.
- Guissi-Kadri S., 1989.** Expression de gènes spécifiant des précurseurs de neuropeptides chez un ver marin *Nereis diversicolor*. Thèse d'Université, Sciences de la Vie et de la Santé, Lille.
- Guissi-Kadri S., Bulet P. and Cury J. J., 1990.** Polypeptides related to mammalian procholecystokinin in the brain of an Invertebrate, a marine worm, *Nereis diversicolor*.: Evidence from *in ovo* translation of mRNA. *Gen Comp Endocrinol* **77**, 339-347.
- Hansen B. L., Hansen G. N. and Scharrer B., 1982.** Immunoreactive material resembling vertebrate neuropeptides in the corpus cardiacum and corpus allatum of the insect *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res* **225**, 319-326.

- Hauenschild C., 1956.** Hormonale Hemmung der Geschlecht-streife und metamorphose bei dem polychaeten *Platynereis dumerilii*. Z Naturforsch **11B**, 125-132.
- Hauenschild C., 1963.** Postembryonale Entwicklungsteuerung durch ein Gehirn hormon bei *Pl. dumerilii*. Verhandl deutsch zoll Gesellsch (München), 3-120.
- Hohendorf K., 1963.** Der Einfluss der temperatur auf die Salzgehaltstoleranz und osmoregulation von *Nereis diversicolor* O. F. Müller. Kieler Meeresforsch **19**, 196-218.
- Höllt V., Seizinger B.R., Garzon J. and Loh H.H., 1983.** Receptors selectivities in the three opioid peptide families. In "Biochem. and clinical aspects of neuropeptides : synthesis, processing and gene structure", Völker, Höllt *et al.*, eds, 59-72.
- Horikawa S., Takai T., Takahashi H., Noda M. and Morimoto Y., 1983.** Isolation and structural organisation of the human preproenkephalin B gene. Nature **306**, 611-614.
- Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W. , Fothergill L. A., Morgan B. A. and Morris H. R., 1975.** Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opioat agonist activity. Nature **258**, 577-579.
- Jackson J. F., Vreugdenhil E., Johnson K. J. and Hall F. H., 1986.** Genes encoding molluscan gonadotropic hormones. Biochem Soc Symp **52**, 83-90.
- Joosse J. and Geraerts W. P. M., 1983.** Endocrinology. In: The Mollusca. Saleuddin A. S. W., Wilbur K. M. (eds). Acad Press, New York, **4**, 317-406.
- Jorgensen C. B. and Dales R. P., 1957.** The regulation of volume and osmotic regulation in some nereid polychaetes. Physiol Comp Oecol **4**, 357-374.
- Kachaturian H., Lewis M.E., Schafer M.K.H. and Watson S.J., 1985.** Anatomy of the CNS opioid system. Trends Neurosci. **8**, 111-119.

- Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda M., Morimoto Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Nakanishi S. and Numa S., 1982.** Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -néo-endorphine/dynorphin precursor. *Nature* **298**, 245-249.
- Kaldany P. R. J., Nambu J. R. and Scheller R. H., 1985.** Neuropeptides in identified *Aplysia* neurons. *Ann Rev Neurosci* **8**, 431-455.
- Kaloustian K. V. and Rzasa P. J., 1986.** Immunochemical evidence on the occurrence of opioid-and gastrin-like peptides in tissues of the earthworm *Lumbricus terrestris*. In : Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms. Stefano G. B. (ed). CRC Press, Boca Raton, Florida, 73-85.
- Kavaliers M., Guglick M.A. and Hirst M., 1987.** Opioid involvement in the control of feeding in an insect, the american cockroach. *Life Sciences* **40**, 665-672.
- Kavaliers M., Hirst M. and Teskey G.C., 1985.** Opioid systems and feeding in the slug, *Limax maximus* : similarities to and implications for Mammalian feeding. *Brain Res Bull* **14**, 681-685.
- Kits K. S., 1980.** States of excitability in the ovulation hormone producing neuroendocrine cells of *Lymnaea stagnalis* (Gasteropoda) and their relation to the egg-laying cycle. *J Neurobiol* **11**, 397-410.
- Kream R.M., Zukin R.S. and Stephano G.B., 1980.** Demonstration of two classes of opioate binding sites in the nervous tissue of the marine mollusc *Mytilus edulis*. *J Biol Chem* **225**, 9218-9224.
- Kuhlmann D. and Feiden F., 1976.** Untersuchungen zur homöostatischen regulation der osmolalität der hämolymph von *Lymnaea stagnalis* L. (Gastropoda, Basommatophora). *Zool Jahrb Abt Allg Physiol Tiere* **80**, 82-100.
- Kuroda H., Baskin D.S., Matsui T., Loh H.H., Hosobushi Y. and Lee N.M., 1986.** Effects of dynorphin 1-13 on opioate binding and dopamine and GABA uptake in stroked cat brain. *Brain Res.* **379**, 68-74.
- Laemmli U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lathe R., 1985.** Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J Mol Biol* **183**, 1-12.
- Leake L. D., Crowe R. and Burnstock G., 1986.** Localisation of substance P-, somatostatin-, vasoactive intestinal polypeptide- and met-enkephalin-immunoreactive nerves in the peripheral and central nervous systems of the leech (*Hirudo medicinalis*). *Cell Tissue Res* **243**, 345-351.
- Le Roith D., Liotta A. S., Roth J., Shiloach J., Lewis M. E., Pert C. B. and Krieger D. T., 1982.** Corticotropin and β -endorphin-like materials are native to unicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 2086-2090.
- Leung M. K. and Stephano G. B., 1983.** Isolation of molluscan opioid peptides. *Life Sci* **33**, suppl. I, 77-80.
- Leung M. K. and Stephano G. B., 1984.** Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 955-958.
- Leung M.K. and Stephano G.B., 1987.** Comparative neurobiology of opioids in the Invertebrates with special attention to senescent alterations. *Progress in Neurobiology* **28**, 131-159.
- Lewis R.V. and Erickson B.W. 1986.** Evolution of proenkephalin and prodynorphin. *Amer Zool* **26**, 1027-1032.
- Loh Y. P. and Gainer H., 1983.** Biosynthesis and processing of neuropeptides. *In: Brain peptides*. Krieger D. T., Brownstein M. J., Martin J. B. (eds). John Wiley and sons, New York, 79-116.
- Lüschen W., Buck F., Willig A. and Jaros P. P., 1991.** Isolation, sequence analysis, and physiological properties of enkephalins in the nervous tissue of the shore crab *Carcinus maenas* L. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 8671-8675.
- Mahon A. C., Nambu J. R., Taussig R., Shyamala M., Roach A. and Scheller R. H., 1985.** Structure and expression of the egg-laying hormone family in *Aplysia*. *J Neurosci* **5**, 1872-1880.
- Mains R.E., Eipper B.A. and Ling N., 1977.** Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc Natl Acad Sci* **74**, 3014-3018.

- Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook T., 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 2nd edition.
- Martin R., Frösch D., Weber E. and Voigt K. H., 1979.** Met-enkephalin-like immunoreactivity in a cephalopod neurohemal organ. *Neurosci Lett* **15**, 253-257.
- Martin R. , Stefano G. B. and Voigt K. H., 1983.** Neuronal distribution of immunoreactive enkephalin-like material in *Octopus*, *Mytilus*, and *Lymnaea* ganglia. 12th Conference Eur Endocrin Abs **72**. Sheffield.
- Mayeri E. and Rothman B. S., 1985.** Neuropeptides and the control of egg-laying behaviour in *Aplysia*. In: Model neural networks and behaviours. Selvertson A. I. (ed). New York, Plenum Press,. 285-301.
- Meinkoth J. and Wahl G., 1984.** Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal biochem* **138**, 267-284.
- Nachman R. J., Holman G. M., Cook B. J., Haddon W.F. and Ling N., 1986a.** Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. *Biochem Biophys Res Commun* **140**, 357-364.
- Nachman R. J., Holman G. M. , Haddon W.F. and Ling N. , 1986b.** Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science* **234**, 71-73.
- Nagasawa H., Kataoka H., Isogai A., Suzuki S., Suzuki A., Ishizaki H., Mizoguchi A., Fujiwara Y. and Susuki At., 1984.** Amino-terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone: homology with insulin. *Science* **226**, 1344-1345.
- Nagasawa H., Kataoka H., Isogai A., Suzuki S., Suzuki A., Mizoguchi H., Fujiwara Y., Susuki At., Takahashi S. Y. and Ishizahi H., 1986.** Amino acid sequence of the prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 5840-5843.
- Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A.C.Y., Cohen S.N. and Numa S., 1979.** Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature* **278**, 423-427.

- Nambu J. R. and Scheller R. H., 1986. Egg-laying hormone genes of *Aplysia* : Evolution of the ELH gene family. *J Neurosci* **6**, 2026-2036.
- Neal C.R. Jr and Newmann S.W., 1989. Prodynorphin peptide distribution in the forebrain of the Syrian hamster and rat : a comparative study with antisera against dynorphin A, dynorphin B, and the C-terminus of the prodynorphin precursor molecule. *J Comp Neurol* **288**, 353-386.
- Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S. and Numa S. 1982. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal pre-proenkephalin. *Nature* **295**, 202-206.
- Oglesby L. C., 1965a. Steady-state parameters of water and chloride regulation in estuarine nereid polychaetes. *Comp Biochem Physiol* **14**, 621-640.
- Oglesby L. C., 1965b. Water and chloride fluxes in estuarine nereid polychaetes. *Comp Biochem Physiol* **16**, 437-455.
- Oglesby L. C., 1968. Responses of estuarine polychaetes to osmotic stress. *Biol Bull* **134**, 118-138.
- Oglesby L. C., 1969. Inorganic components and metabolism; ionic and osmotic regulation : annelida, Sipuncula and Echiura. *In* : Chemical Zoology. Florkin M. and Scheer B.T. (eds). Academic Press, New York, London, 211-310.
- Oglesby L. C., 1970. Salt and water balance in *Nereis*. *Comp Biochem Physiol* **36**, 449-466.
- Osborne N.N., Patel S. and Dockray G., 1982. Immunohistochemical demonstration of peptides, serotonin and dopamine β -hydroxylase-like material in the nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*. *histochemistry* **75**, 573-583.
- Ottaviani E., Petraglia F., Montagnani G., Cossarizza A., Monti D. and Franceschi C., 1990. Presence of ACTH and β -endorphin immunoreactive molecules in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) and their possible role in phagocytosis. *Regulatory Peptides* **27**, 1-9.

- Pagés M., Jeménez F., Ferrus A., Peralta E., Ramirez G. and Gelpi E., 1983.** Enkephalin-like immunoreactivity in *Drosophila melanogaster*. *Neuropeptides* **4**, 87-98.
- Patey G. and Rossier J., 1986.** Découverte, anatomie et biosynthèse des différentes familles de peptides opioïdes endogènes. *Ann. Endocrinol.* **47**, 71-87.
- Porchet M., 1970.** Relations entre le cycle hormonal cérébral et l'évolution ovocytaire chez *Perinereis cultrifera*. *Gen Comp Endocrinol* **15**, 220-231.
- Porchet M., 1974.** Activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. Thèse d'Etat, Sciences Naturelles Lille.
- Porchet M. et Cardon C., 1972.** Régulation de l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. *C R Acad Sci Paris* **275**, 2375-2378.
- Porchet M. and Cardon C., 1976.** The inhibitory feed back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in *Nereis* (Polychaetes, Annelids). *Gen Comp Endocrinol* **30**, 378-390.
- Porchet M. and Dhainaut-Courtois N., 1988.** Neuropeptides and monoamines in Annelids. *In: Neurohormones in Invertebrates*. Thorndyke M. C. and Goldworthy G. J.(eds). Cambridge Univ Press, 219-234.
- Porchet M., Dhainaut-Courtois N., Cardon C. and Bataille M., 1985.** Structure and functions of neuropeptides of Polychaete Annelids. *In: Neurosecretion and the biology of neuropeptides*. Kobayashi *et al.* (eds). Springer Verlag Berlin, 377-385.
- Porchet M. , Gaillet N., Sauber F., Charlet M. and Hoffman J. A., 1984.** Ecdysteroids in Annelids. *In: Biosynthesis, metabolism and mode of action of Invertebrates hormones*. Hoffman J. A. and Porchet M. (eds). Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. 436-438.
- Potts W. T. W. and Parry G., 1964.** Osmotic and ionic regulation in Animals. Pergamon Press, London, 1-423.
- Proux J. P., Miller C. A., Li J. P., Carney R. L., Girardie A., Delaage M. and Schooley D. A., 1987.** Identification of an arginine vasopressin-like diuretic hormone from *Locusta migratoria*. *Biochem Biophys Res Commun* **149**, 180-186.

- Rehfeld J. F., Hansen H. F., Marley P. D. and Stengaard-Pedersen K., 1985.** Molecular forms of cholecystokinin in the brain and the relationship to neuronal gastrins. *Ann NY Acad Sci* **448**, 180-186.
- Rémy C.H., and Dubois M.P., 1979.** Localisation par immunofluorescence de peptides analogues aux α -endorphines dans les ganglions infraoesophagiens du lombricide *Dendrobaena subrubicunda* Eisen. *Experientia* **35**, 137-138.
- Rémy C. H. and Dubois M. P., 1981.** Immunohistological evidence of methionine enkephalin-like material in the brain of the migratory locust. *Cell Tissue Res* **218**, 271-278.
- Rémy C. H., Girardie J. et Dubois M. P., 1978.** Présence dans le ganglion sous-œsophagien de la chenille processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff) de cellules révélées en immunofluorescence par un anticorps anti- α -endorphine. *C R Acad Sci Paris* **286**, 651-653.
- Rémy C. H., Girardie J. and Dubois M. P., 1979.** Vertebrate neuropeptide-like substances in the suboesophageal ganglion of two insects: *Locusta migratoria* R. and F. (Orthoptera) and *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). Immunocytological investigation. *Gen comp Endocr* **37**, 93-100.
- Romeuf M. and Rémy C., 1984.** Early immunohistochemical detection of somatostatin-like and methionine-enkephalin-like neuropeptides in the brain of the migratory locust embryo. *Cell Tissue Res* **236**, 289-292.
- Rosenberg H. F., Ackerman S. J. and Tenen D. G., 1990.** An alternative method for labeling oligonucleotide probes for screening cDNA libraries. *Biotechniques* **8**, 384.
- Rothman B. S., Mayeri E. and Scheller R. H., 1985.** The bag cells neurons of *Aplysia* as a possible peptidergic multi-transmitter system :From genes to behavior. *In: Gene expression in brain.* Zomzely-Neurath C., Walker W. A. (eds). New York. John Wiley and sons Inc, 235-274.
- Roubos E. W., 1973.** Regulation of neurosecretory activity in the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (L.). A quantitative electron microscopical study. *Z Zellforsch* **146**, 177-205.

- Roubos E. W., 1984.** Cytobiology of the ovulation-neurohormone producing caudo-dorsal cells of the snail *Lymnaea stagnalis*. Int Rev Cytol **89**, 295-346.
- Rzasa P.J., Kaloustian K.V. and Prokop E.K., 1984.** Immunocytochemical evidence for Met-enkephaline-like and Leu-enkephalin-like peptides in tissues of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Comp Biochem Physiol **77C**, 345-350.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, **74**, 5463-5467.
- Santoro C., Hall L. H. and Zukin R. S., 1985.** Opioid receptor subtypes in *Drosophila melanogaster*. Int Narcotic Res Conf, Falmouth, Mass. Abstr 0-22.
- Scheller R. H., Jackson J. F. , Mc Allister L. B., Schwartz J. H., Kandel E. R. and Axel R., 1982.** A family of genes that codes for ELH, a neuropeptide eliciting a stereotyped pattern of behavior in *Aplysia*. Cell **28**, 707-719.
- Scheller R. H., Jackson J. F., Mc Allister L. B., Rothman B. S., Mayeri E. and Axel R., 1983.** A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behaviour. Cell **32**, 7-22.
- Schlieper C., 1929.** Uber die Einwirkung neiderer salzkonzentrationen auf marine organismen. Z vergl Physiol **9**, 478-514.
- Smit A. B., Vreugdenhil E., Ebberink R. H. M., Geraerts W. P. M., Klootwijk D. and Joosse J., 1988.** Growth controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. Nature **331**, 535-538.
- Smith R. I., 1955.** Comparison of the level of chloride regulation by *Nereis diversicolor* in different parts of its geographical range. Biol Bull mar biol lab, Woods Hole **109**, 453-474.
- Smith R. I., 1959.** Physiological and ecological problems of brackish water. Proc Ann Biol (Colloquium Oregon, St College) **20**, 59-69.
- Smith R. I., 1970a.** Chloride regulation at low salinities by *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta). I. Uptake and exchanges of chloride. J exp Biol **53**, 75-92.

- Smith R. I., 1970b. Hypo-osmotic urine in *Nereis diversicolor*. J exp Biol 53, 101-108.
- Soffe S. R., Benjamin P. R. and Slade C. T., 1978. Effects of environmental osmolarity on blood composition and light microscope appearance of neurosecretory neurones in the snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). Comp Biochem Physiol 61A, 577-584.
- Soffe S. R., Slade C. T. and Benjamin P. R., 1979. Environmental osmolarity and neurosecretory neurones in *Lymnaea stagnalis* (L.). Malacologia 18, 583-586.
- Soreq H. and Miskin R., 1981. Secreted proteins in the medium of microinjected *Xenopus* oocytes are degraded by oocytes proteases. FEBS Lett 128, 305-310.
- Southern E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98, 503-517.
- Stefano G. B. and Leung M. K., 1984. Presence of met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ in molluscan neural tissues. Brain Res 298, 362-365.
- Stefano G. B. and Scharrer B., 1981. High affinity binding of an enkephalin analog in the cerebral ganglion of the insect *Leucophaea maderae* (Blattaria). Brain Res 225, 107-114.
- Stephano G. B., Kream R. M. and Zukin R. S., 1980. Demonstration of stereospecific opiate binding in the nervous tissue of the marine mollusc *Mytilus edulis*. Brain Res 181, 445,450.
- Stone J. V., Mordue W., Batley K. E. and Morris H. R., 1976. Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. Nature 263, 207-211.
- Taussig R., Kaldany R. P., Rothbard J. B., Schoolnick G. and Scheller R. H., 1985. Expression of the L11 neuropeptide gene in the *Aplysia* central nervous system. J Comp Neurol 238, 53-64.
- Taussig R., Nambu J. R. and Scheller R. H., 1988. Evolution of peptide hormones : an *Aplysia* CRF-like peptide. In : Neurohormones in Invertebrates. Thorndyke M. C. and Goldsworthy G. J. (eds). Cambridge Univ Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, 299-309.

- Ter Maat A., Geraerts W. P. M., Jansen R. F. and Bos N. P. A., 1988.** Chemically mediated positive feedback generates long lasting afterdischarge in a molluscan neuroendocrine system. *Brain Res* **438**, 77-82.
- Ter Maat A., Lodder J. C. and Wilbrink M., 1983.** Induction of egg-laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis* by environmental stimulation of the release of ovulation hormone from the caudo-dorsal cells. *Int J Invert Reprod* **6**, 239-247.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J., 1979.** Electrophoretic transfert of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure an some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.
- Verger-Boquet M., Malécha J. and Tramu G., 1987.** Immunohistochemical localization of opioid peptides in the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*. *Cell Tissue Res* **250**, 63-71.
- Verhaert P. and De Loof A., 1985.** Immunocytochemical localization of a methionine-enkephalin resembling neuropeptide in the central nervous system of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *J Comp Neurol* **239**, 54-61.
- Vreugdenhil E., Geraerts W. P. M., Jackson J. F. and Joosse J., 1985.** The molecular basis of the neuro-endocrine control of egg-laying behaviour in *Lymnaea*. *Peptides* **6**, 465-470.
- Vreugdenhil E., Jackson J. F., Bouwmeester T., Smit A.B., van Minnen J., van Heerikhuizen H., Klootwijk J. and Joosse J., 1988a.** Isolation, characterization and evolutionary aspects of a cDNA clone encoding multiple neuropeptides involved in the stereotyped egg-laying behaviour of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *In: The molecular basis of egg-laying behaviour in the freshwater snail Lymnaea stagnalis*. Vreugdenhil E. (ed). Drukkerij All In Katwijk, 23-36.
- Vreugdenhil E., Bogerd J., Mahon A., Bouwmeester T., Klootwijk J. and Joosse J., 1988b.** The genomic organization of the ovulation-hormone gene family of *Lymnaea stagnalis*. *In: The molecular basis of egg-laying behaviour in the freshwater snail Lymnaea stagnalis*. Vreugdenhil E. (ed). Drukkerij All In Katwijk, 37-54.

- Weber E. and Barchas J.D., 1983. Immunohistochemical distribution of dynorphine B in rat brain relation to dynorphin A and α -néo-endorphine systems. Proc Natl Acad Sci USA **80**, 1125-1129.
- Wendelaar-Bonga S. E., 1970. Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L). Z Zellforsch **108**, 190-225.
- Wendelaar-Bonga S. E., 1972. Neuroendocrine involvement in osmoregulation in a freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*. Gen Comp Endocrinol (suppl) **3**, 308-316.
- White J.D., Stewart K.D., Krause J.E. and Mc Kelvy J.F., 1985. Biochemistry of peptide secreting neurons. Physiol Rev **65**(3), 553-606.
- Zipser B., 1980. Identification of specific leech neurons immunoreactive to enkephalin. Nature **283**, 857-858.
- Zipser B., Ruff M. R., O'Neill J. A. B., Smith C. C., Higgins W. J. and Pert C. B., 1988. The opiate receptor, a single 110 kDa recognition molecule appears to be conserved in *Tetrahymena*, leech, and rat. Brain Res **463**, 296-304.

