

UNIVERSITE DE RENNES I  
DEA de BIOLOGIE & AGRONOMIE  
Option BIOLOGIE AQUACOLE

**Jean Pascal BERGÉ**

**PURIFICATION DE PEPTIDES  
IMMUNOLOGIQUEMENT APPARENTES AUX  
GASTRINES/CHOLECYSTOKININES CHEZ  
QUELQUES CRUSTACES DECAPODES :  
ACTION SUR LA SYNTHÈSE PROTEIQUE**

Laboratoire de Biologie Marine de CONCARNEAU

1990 - 1991

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie Marine du Collège de France à Concarneau.*

*Mes remerciements s'adressent au Docteur Y. Le Gal, sous directeur au Collège de France qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis d'effectuer ce travail .*

*Je remercie le Docteur A. Van Wormhoudt, directeur de recherches CNRS qui a dirigé mon tout premier travail de recherches; pour sa scientifique et technique tou au long de ce travail.*

*Mes remerciements sincères s'adressent également au Docteur D. Sellos et à Monsieur P. Le Chevalier pour leur aimable collaboration.*

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>1 PURIFICATION DE FRACTIONS PEPTIDIQUES BIOLOGIQUEMENT APPARENTÉES AUX G/CCK DE VERTÉBRES CHEZ DEUX ESPÈCES DE CRUSTACÉS DECAPODES: <u>PENAEUS VANNAMEI</u> ET <u>NEPHROPS NORVEGICUS</u></b>	
<b>1.1 INTRODUCTION</b> .....	4
<b>1.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	5
1.2.1 Dissection des animaux .....	5
1.2.2 Extraction .....	5
1.2.3 Filtration sur gel de sephadex .....	5
1.2.4 Détection des G/CCK"like": Dotting et RIA .....	6
1.2.4.1 Anticorps à disposition .....	6
1.2.4.2 Dotting .....	7
1.2.4.3 Dosage radioimmunologique .....	7
1.2.5 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse .....	8
1.2.6 Dosage des protéines .....	9
<b>1.3 RESULTATS</b> .....	9
1.3.1 Extraction .....	9
1.3.2 Dosage radioimmunologique: titre de l'antisérum .....	10
1.3.3 Filtration moléculaire sur gel de Sephadex .....	10
1.3.3.1 Pédoncule oculaire de <u>Nephrops norvegicus</u> .....	10
1.3.3.2 Pédoncule oculaire de <u>Penaeus vannamei</u> .....	10
1.3.3.3 Estomac de <u>Nephrops norvegicus</u> .....	10
1.3.4 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse .....	13
1.3.4.1 Pédoncule oculaire de <u>Nephrops norvegicus</u> .....	13
1.3.4.2 Pédoncule oculaire de <u>Penaeus vannamei</u> .....	13
1.3.4.3 Estomac de <u>Nephrops norvegicus</u> .....	13
1.3.5 Dotting .....	20
<b>1.4 DISCUSSION</b> .....	20
<b>1.5 CONCLUSION</b> .....	23

**2 EFFETS DE FRACTIONS PARTIELLEMENT PURIFIÉES DE G/CCK,  
IMMUNOLOGIQUEMENT APPARENTÉES DE LA LANGOUSTINE SUR  
L'INCORPORATION DE LEUCINE TRITIÉE DANS LES PROTÉINES  
DE L'HÉPATOPANCRÉAS DE PALAEON SERRATUS**

<b>2.1 INTRODUCTION</b> .....	24
<b>2.2 MATERIEL ET METHODES</b> .....	24
2.2.1 Animaux étudiés .....	24
2.2.2 Injection .....	24
2.2.3 Extraction des hépatopancréas .....	25
2.2.4 Dosage des protéines .....	25
2.2.5 Mesure de l'incorporation .....	25
2.2.6 Test statistique .....	26
<b>2.3 RESULTATS</b> .....	26
2.3.1 Sélection des fractions les plus actives .....	26
2.3.2 Etude comparative G 17I/fraction E <sub>1</sub> /proglumide .....	28
<b>2.4 DISCUSSION</b> .....	28
<b>2.5 CONCLUSION</b> .....	30
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	31

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'endocrinologie des invertébrés peut être approchée en recherchant des molécules assimilables aux peptides ou aux stéroïdes biologiquement actifs de vertébrés, notamment à l'aide de méthodes immunochimiques (dosage radioimmunologique: RIA). Les antigènes d'invertébrés reconnaissent les antiséras spécifiques des hormones peptidiques de vertébrés. Ainsi, la présence chez les invertébrés, de nombreuses substances immunologiquement apparentées aux hormones peptidiques de vertébrés a pu être confirmée (Vanderhaegen *et al*, 1975; Dockray, 1976; Le Roith *et al*, 1980; Le Roith *et al*, 1981; Fritsch *et al*, 1982). Les peptides hormonaux de vertébrés seraient donc des molécules phylogénétiquement plus anciennes.

Chez les vertébrés, la régulation de l'activité digestive est essentiellement exercée par le "jeu" de nombreuses hormones gastrointestinales parmi lesquelles les gastrines et les cholecystokinines (G/CCK) (Della Ferra *et al*, 1980; Hidehazu Tsukamoto *et al*, 1986; Kuwahara *et al*, 1986; Lotti V.J *et al* 1986;...). Les gastrines et les cholecystokinines de vertébrés appartiennent à une même famille de peptides partageant un large spectre d'activité au niveau du tube digestif et du système nerveux.

Quelle que soit l'espèce animale où les G/CCK ont été isolées, une identité partielle de séquence des deux hormones a été mise en évidence (fig n°1). La séquence du pentapeptide-amide-C terminal (Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) est commune aux deux types de peptides mais aussi à la caeruleine et à la phyllocaeruleine, deux peptides isolés de la peau de deux grenouilles différentes (Anastaris *et al*, 1968; Anastaris *et al*, 1969). Ces homologies structurales leur confèrent des propriétés biologiques voisines, le térapeptide C-terminal constitue en effet le site biologiquement actif des G/CCK et des caeruleines (Tracy et Gregory, 1964). Ce térapeptide est d'ailleurs retrouvé dans les peptides de langoustine (Favrel *et al* 1991) Cependant, chacun de ces peptides possède une action préférentielle et des potentialités biologiques différentes chez les vertébrés.

Les gastrines comme les cholecystokinines présentent une hétérogénéité moléculaire liée à la taille. Les différentes formes représentent des extensions N-terminales du térapeptide C-terminal responsable de l'activité biologique. Ces extensions N-terminales sont de nature différents pour les gastrines et les cholecystokinines. Il est actuellement admis que les formes de grande taille représentent des précurseurs biosynthétiques des formes plus petites (Rehfeld et Uvnas Wallenstein, 1978; Golterman *et al*, 1980).

D'après Rehfeld (1984), 4 caractéristiques moléculaires de base peuvent définir le système des G/CCK.

La première caractéristique est l'*homologie*. Quelle que soit l'espèce animale étudiée on retrouve toujours le pentapeptide C-terminal identique. On peut aussi trouver des homologies ailleurs que dans le site actif C-terminal. Toutefois au stade actuel des connaissances elles n'ont pas de signification physiologique.

La deuxième caractéristique est l'*hétérogénéité*. Une variation de taille des molécules est observable pour les gastrines et les cholecystokinines, elle constitue ce que l'on appelle la macrohétérogénéité. En parallèle on peut avoir des différences covalentes mineures dues à des dérivations sur des résidus amino-acides, cela s'appelle la microhétérogénéité. Ces dérivations sont de deux types: une amidation du résidu C-terminal Phe ou une estérification par l'acide sulfurique du groupe phénol sur le résidu Tyr. L'existence de plusieurs formes moléculaires d'une hormone (à la place d'une substance simple) influence profondément la réponse des cellules cibles. Pour une cellule donnée, la taille de la molécule entraîne des variations de réponse. En général les formes de grande taille sont moins actives que les plus petites. Les dérivations simples des résidus amino-acides, déterminent plus le potentiel biologique que les différences de taille.

L'*ubiquité* est la troisième caractéristique du système des G/CCK. Les gastrines et les cholecystokinines sont présentes dans de nombreux tissus: tube digestif, cerveau, neurones, pancréas... Toutefois la présence de l'une exclut généralement celle de l'autre.

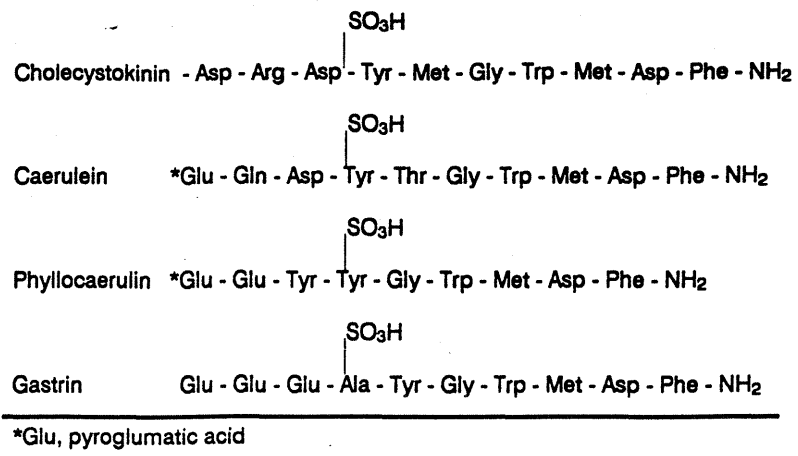
Enfin la dernière caractéristique concerne les *différences principales*; l'observation du système G/CCK suggère que parmi plusieurs formes moléculaires, il y a plus d'une forme dominante. Cette prédominance varie selon les cellules cibles. L'observation des différentes formes montre que le procédé post-traductionnel des peptides varie selon les tissus.

Toute molécule répondant à ces quatre caractéristiques générales pourra donc être apparentée au système des G/CCK "like".

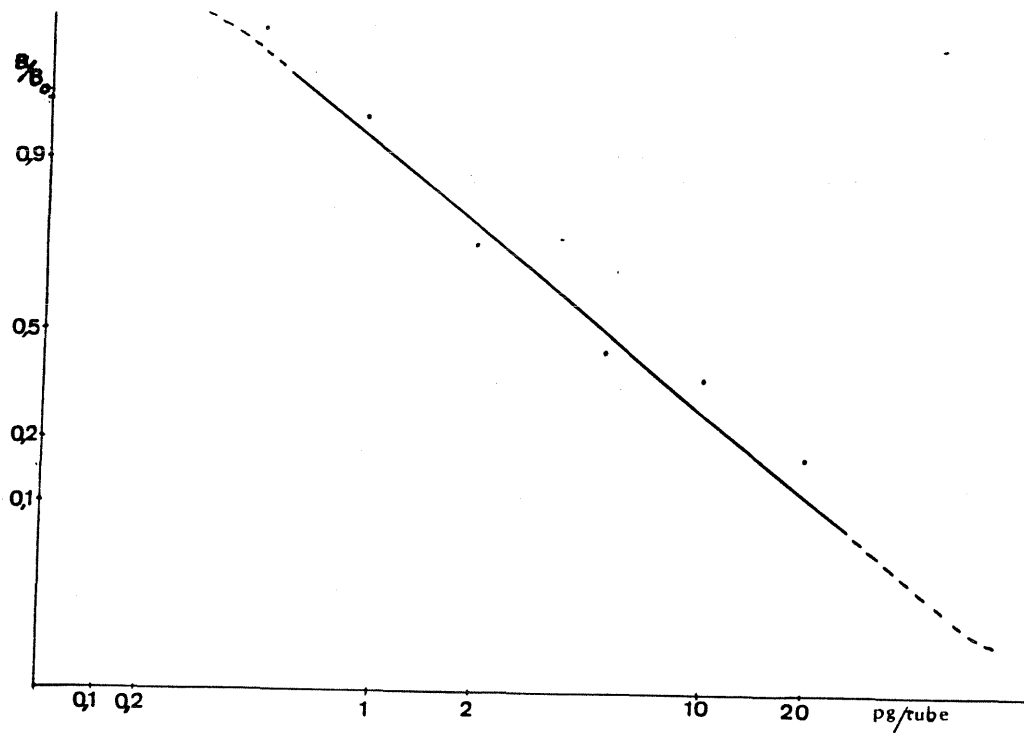
La présence de substances immunologiquement apparentées aux G/CCK de vertébrés est détectée chez les crustacés décapodes (Favrel, 1988; Turrigiano G.G, 1989). Un protocole de purification est même établi pour Palaemon serratus et Nephrops norvegicus (Favrel, 1988).

Dans un premier temps, nous allons nous attacher à la **purification des G/CCK** immunologiquement apparentées aux hormones peptidiques de vertébrés (G/CCK "like") chez les deux espèces précitées.

Dans un deuxième temps, à l'aide des fractions purifiées, le **rôle biologique des G/CCK "like"** et particulièrement leur action sur la synthèse protéique vont être étudiés.



**Figure n°1:**  
 Sequence d'acides aminés



**Figure n°2:**  
 gamme étalon du RIA

# **1 - PURIFICATION DE FRACTIONS PEPTIDIQUES IMMUNOLOGIQUEMENT APPARENTÉES AUX G/CCK DE VERTEBRES CHEZ DEUX ESPÈCES DE CRUSTACÉS DECAPODES: PENAEUS VANNAMEI NEPHROPS NORVEGICUS**

## **1.1 INTRODUCTION**

La purification de peptides, identifiés par leur immunoréactivité, est intéressante car elle permet d'accéder à la composition en acides aminés et à la séquence des dits peptides.

Une approche évolutive peut alors être abordée, par comparaison avec leurs analogues immunologiques de vertébrés.

De plus la connaissance de la structure primaire de ces peptides va permettre leur synthèse chimique donc leur obtention en grandes quantités, ce qui élargit considérablement le champ des investigations. Par exemple des études d'activité biologique, de fonction physiologique vont pouvoir être menées tout comme l'étude de leur métabolisme et de leur mode d'action moléculaire.

Les peptides synthétiques pourront être utilisés comme épitopes pour l'élaboration d'anticorps mono ou polyclonaux, ou bien, ils pourront servir de sonde pour trouver les gènes correspondant dans une banque de cDNA.

Actuellement, en ce qui concerne les G/CCK de crustacés décapodes, seul un peptide a été séquencé (fraction D de l'estomac de Nephrops norvegicus) (Favrel *et al* 1991). Les techniques de tamisage moléculaire et de chromatographie liquide haute performance en phase inverse (HPLC-PI) utilisées lors de précédentes purifications (Favrel 1988) apparaissent toutes indiquées pour notre étude.

Dans un premier temps la purification se fera à partir de pédoncules oculaires de deux espèces (Nephrops norvegicus et Palaemon serratus), permettant ainsi une étude comparative interspécifique. Ensuite afin de disposer de suffisamment de peptides, les G/CCK "like" seront extraites à partir d'estomacs de langoustine.



## 1.2 MATERIEL ET METHODES

### 1.2.1 DISSECTION DES ANIMAUX

Les pédoncules oculaires sont coupés à l'aide de ciseaux, la coupure se faisant le plus près possible de la tête de l'animal afin de prélever la plus grande quantité. Pour les pédoncules de Penaeus vannamei, ils ont été envoyés déjà prélevés et lyophilisés par le Centre Océanique du Pacifique (IFREMER Tahiti); les langoustines quand à elles proviennent de pêcheries locales.

L'ensemble estomac-oesophage de Nephrops norvegicus est aussi prélevé, excisé, vidé de son contenu puis congelé dans l'azote liquide.

### 1.2.2 EXTRACTION

#### Pédoncule oculaire de Nephrops norvegicus

Cent dix grammes de pédoncules frais sont congelés à l'azote puis broyés au broyeur à bille. Le tout est mis dans 0,5 l d'eau distillée en ébullition pendant 20 minutes, ceci permet l'élimination de nombreuses activités enzymatiques, notamment celles des protéases. L'extrait aqueux est centrifugé 10 min à 3000g. Les peptides intéressants étant de faible poids moléculaire (1000-2500 Da) on récupère le surnageant (250 ml). Le culot est réhomogénéisé dans de l'eau distillée puis soumis aux ultrasons afin de fractionner les grosses molécules, le tout est centrifugé 10 min à 3000g et 275 ml de surnageant sont récupérés. Les 525 ml de surnageant sont alors congelés à l'azote liquide et lyophilisés.

#### Pédoncule oculaire de Penaeus vannamei

Cent cinquante grammes de pédoncules lyophilisés sont à notre disposition. Le processus d'extraction est similaire à celui précédemment cité, 1,05 l de surnageant est récupéré et lyophilisé. Toutefois un problème de viscosité apparaît, car la quantité de molécules présente dans l'extrait aqueux est beaucoup plus élevée que pour la langoustine (la quantité de départ est beaucoup plus grande). Afin d'éviter les problèmes de colmatage de gel, les lyophilisats sont repris dans 200 ml d'eau puis centrifugés 10 min à 14000g et seul le surnageant est récupéré. Des cycles de congélation/décongélation sont effectués afin d'éliminer le maximum de sucres.

#### Estomac de Nephrops norvegicus

Cent soixante dix grammes d'estomacs (correspondant à 10 kg de langoustines) sont congelés dans l'azote et broyés au broyeur à bille, le processus d'extraction est identique à celui des pédoncules oculaires, 1,65 l de surnageant est récupéré et lyophilisé.

### 1.2.3 FILTRATION SUR GEL DE SÉPHADEX

D'après les précédentes expérimentations (Favrel 1988) un gel G 50 fine (Pharmacia) est utilisé car il permet une résolution maximale. Sa gamme de fractionnement est de 1500-30000 Da. La colonne (100\*2,5 cm) est équilibrée avec de l'acétate d'ammonium 0,01M, pH=8,4.

□ Pédoncule oculaire de Nephrops norvegicus

Les lyophilisats sont homogénéisés dans 30 ml de tampon acétate d'ammonium 0,01M, pH=8,4, centrifugés 15 min à 8000g (rotor SORVAL SS 34). Le surnageant est déposé par fractions de 15 ml sur la colonne de G 50 fine.

Le débit de filtration est de 24 ml/h, des fractions de 8,2 ml sont collectées. L'absorption à 280 nm est mesurée pour chaque tube et une aliquote de 500 µl par tube est prélevée afin de détecter les fractions intéressantes par radio-immunologie.

□ Pédoncule oculaire de Penaeus vannamei

Les fractions lyophilisées sont d'abord homogénéisées avec 20 ml de tampon acétate d'ammonium 0,01M, pH=8,4, puis elles sont centrifugées 15 min à 8000g (rotor SORVAL SS 34). Le surnageant est déposé en 2 fois 10 ml sur la G 50 fine.

Le débit de filtration est de 24 ml/h et des fractions de 12 ml sont collectées. L'absorbance à 280 nm est mesurée et pour chaque tube une aliquote de 500 µl est prélevée pour le dosage radio-immunologique.

□ Estomac de Nephrops norvegicus

Le lyophilisat est repris dans 36 ml de tampon acétate d'ammonium 0,01M, pH=8,4, puis centrifugé 15 min à 8000g (rotor SORVAL SS 34). Trois dépôts, de 12 ml chacun, de surnageant sont effectués sur la colonne G 50 superfine.

Le débit de filtration est de 22,6 ml/h, des fractions de 11,3 ml sont collectées. L'absorbance à 280 nm est mesurée et une aliquote de 500 ul pour chaque fraction est prélevée.

## 1.2.4 Détection des G/CCK "like": **Dotting RIA**

### 1.2.4.1 Anticorps à disposition

Différents anticorps dirigés contre des séquences spécifiques communes aux gastrines et cholecystokinines peuvent être utilisés pour détecter les fractions positives:

antisérum offert par le docteur Tramu (INSERM U 156 Lille) obtenu après immunisation d'un lapin et dirigé contre Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>, il reconnaît la séquence carboxyterminale commune aux G/CCK,

antisérum Rehfeld 8017, dirigé contre Gln-Gly-Pro-Trp-Leu,

antisérum Rehfeld 3208, dirigé contre Gly-Trp-Met-Asp-Phe-Gly,

antisérum Van Minnen, dirigé contre Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>, cette séquence est aussi nommée FMRF.

Ces 4 antisérum peuvent être utilisés pour la technique du Dotting (cf 1.2.4.2), par contre pour le RIA (cf 1.2.4.3) seul l'antisérum Tramu sera utilisé.

### **1.2.4.2 Dotting**

#### Principe

L'extrait à tester est fixé sur une membrane de nitrocellulose qui piège les molécules dans son réseau de fibres. On applique ensuite une solution contenant les IgG spécifiques (l'antisérum Tramu est polyclonal) afin de former le complexe Ag-Ac. Ce complexe est révélé par un anticorps secondaire dirigé contre les IgG. L'anticorps secondaire est couplé à la biotine, on a donc formation du complexe Ac I-Ac II/biotine. Une solution de la phosphatase alcaline (enzyme de révélation) couplée à la streptavidine (protéine bactérienne hautement spécifique de la biotine) est alors appliquée. La sensibilité de détection est très élevée car on peut coupler 5 phosphatases alcaline à une streptavidine. La phosphatase alcaline en présence de son substrat développe alors une réaction colorée. Un kit Amersham: "blotting detection kit for rabbit Ab RPN 23" est utilisé.

#### Protocole

Deux µl d'extrait à tester sont déposés sur la membrane de nitrocellulose. Une gamme de dilution est effectuée permettant ainsi une estimation de la quantité de protéines immunologiquement repérables.

### **1.2.4.3 Dosage radioimmunologique**

#### Principe

La méthode repose sur une compétition entre un antigène marqué à l'iode 125 et ce même antigène non marqué mais de concentration connue (peptide synthétique) ou inconnue (échantillon contenant l'antigène à doser) vis à vis de l'antisérum.

Le dosage radio-immunologique (RIA) utilisé pour doser les peptides immunologiquement apparentés aux G/CCK de vertébrés est un dosage hétérologue, l'antigène à doser étant vraisemblablement différent de l'antigène de synthèse de type vertébré.

#### Protocole

Le dosage consiste à déterminer la quantité apparente de peptide immunoréactif dans les extraits en se référant à une gamme étalon de G 17 I humaine (gastrine 17 iodée) traitée dans les mêmes conditions que les essais. Les points de la gamme sont incubés en double. Un témoin (B0) ne contenant pas d'hormone marquée (G17 <sup>125</sup>I) est incubé. La liaison non spécifique est évaluée grâce à l'incubation de 2 SAC (sans anticorps) qui ne contiennent ni anticorps ni G 17 I. La courbe étalon est réalisée à partir d'une solution mère de G 17 I à 1 µg/50 µl que l'on dilue dans de l'eau distillée pour avoir les concentrations finales suivantes:

0,5,10,25,50,,250,500,1000 pg/ml

Le dosage est réalisé en deux étapes:

incubation de la G 17 humaine (courbe étalon) et du peptide immunoréactif (extraits) avec de l'antisérum anti CCK (antisérum Tramu) pendant 24<sup>h</sup> à 4°C

ajout du traceur radioactif (G17 I, 2500 cpm).

Le milieu réactionnel a la composition suivante:

50 µl d'extrait aqueux à doser

150 µl de tampon véronal-HCl 0,02M, pH=8,4

50 µl d'anticorps Tramu 1/391000 dans le tampon véronal-HCl 0,02M, pH=8,4, 3%BSA

50 µl de G 17 I humaine iodée (2500 cpm)

Après 3 jours d'incubation à 4°C la précipitation est réalisée par adjonction d'un ml de charbon dextran au milieu réactionnel. La solution de charbon dextran est composée de:

- 4% de charbon SXX extra
- 10% de sérum de cheval
- 0,4% dextran T70 (Sigma)
- Veronal HCl, pH=8,4

Les tubes sont agités au vortex, puis après 30 min d'incubation dans la glace ils sont centrifugés à 3000g pendant 20 min. La radioactivité "libre" contenue dans les culots est mesurée au compteur LKB.

#### Expression des résultats

La courbe standard exprimée sous la forme  $B/B_0$  en fonction de  $\log(H)$  est sigmoïdale. De manière à faciliter l'expression des résultats et calculer le coefficient de régression de la courbe, cette expression est linéarisée grâce à la transformation logit et devient  $\text{Logit } B/B_0 = a \ln(H) + b$  (Feldman et Rodbart, 1971), où  $\text{Logit } B/B_0 = \ln(B/B_0 / 1 - B/B_0)$ . B représente la radioactivité liée à l'anticorps en présence d'une quantité donnée de G 17 étalon (ou de peptide immunoréactif).  $B_0$ , est la radioactivité liée à l'anticorps en l'absence de G 17 étalon. H, correspond à la concentration en hormone froide.

### **1.2.5 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse**

#### Principe

Le principe de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (HPLC-PI) repose sur la propriété des peptides de polarité différentes d'être élués séquentiellement. Les colonnes d'HPLC-PI retiennent les composés hydrophobes. En effet leur matrice est non polaire (ou hydrophobe), car elle est composée de chaînes carbonnées C<sub>2</sub>, C<sub>8</sub>, ou C<sub>18</sub>, et l'éluant, qui constitue la phase polaire, est mobile. Les peptides sont élués en fonction de leur hydrophobicité (liée à la composition en acides aminés) par des gradients de phase mobile dont la concentration, en solvant organique, croît. La séparation est réalisée sous de fortes pressions (100 bars).

## Caractéristiques

Deux appareils sont utilisés:

**LKB** (modèle 2150), injecteur Rhéodyne (modèle 7125), détecteur ultraviolet à filtre (Uvicord LKB 2158),

**Spectra Physics 8800**, injecteur Rhéodyne (7125), détecteur à longueur d'onde variable (Spectra 100).

Différentes colonnes séparatives sont utilisées.

La première phase de séparation est réalisée sur une colonne d'octadecylsilane (ODS) (Altex, 5  $\mu$ m, 25\*0,46 cm), préalablement équilibrée dans la phase mobile A (n propanol/eau/TFA:170/300/0,68). Le solvant B est composé de n propanol/eau/TFA:700/300/0,68. Le débit et l'élution par le solvant B (gradient) diffèrent selon les composés injectés (pédoncule oculaire ou estomac; pics C,D ou E) (cf 1.3.4).

Les fractions immunoréactives obtenues après cette première chromatographie en phase inverse, sont lyophilisées avant d'être séparées sur une colonne d'alkyl-phenyl microbondapack (30\*0,39 cm; Waters associates, Massachussets). Les solvants d'élution sont:

A (eau/TFA:800/0,58)

B (eau/acetonitrile/TFA:320/480/0,54)

Le débit d'élution est de 0,9 ml/min, la collecte se fait à raison d'un tube par min. Le gradient servant à l'élution diffère selon les composés injectés (cf 1.3.4).

La dernière étape séparative testée est réalisée sur une colonne nucléosil: C<sub>18</sub> (CL, 300 A, 25\*0,46 cm). Les solvants d'élution sont identiques à ceux utilisés pour la colonne d'alkyl-phenyl. Le débit d'élution est de 0,9 ml/min et la collecte se fait à raison d'un tube par min. Tout comme précédemment le gradient d'élution diffère selon les composés (cf 1.3.4).

Tout au long de ces étapes de purification, l'élution est contrôlée par l'enregistrement de l'absorption à 276 ou 226 nm.

### **1.2.6 Dosage des protéines**

La méthode utilisée est celle décrite par Bradford (1976). Une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 100  $\mu$ g/ml est utilisée comme solution étalon.

## **1.3 RESULTATS**

### **1.3.1 Extraction**

#### Pédoncule oculaire de Nephrops norvegicus

La quantité de protéines totales déterminée dans l'extrait brut aqueux des pédoncules oculaires est de 2.8 mg/ml. Avant la filtration on a donc 84 mg de protéines.

#### □ Estomac de Nephrops norvegicus

Après extraction à l'eau on obtient 8,6 mg/ml de protéines totales, soit 310 mg. Par dosage radio-immunologique (cf 1.2.4.3 et 1.3.2) on trouve 0.36 ng/ml soit environ 13 ng de G 17 I équivalents. Cette valeur est largement sous estimée car le dosage est hétérologue. On peut donc supposer que des quantités suffisantes de peptides sont présentes pour justifier leur purification.

#### **1.3.2 Dosage radioimmunologique: titre de l'antisérum**

D'après les expériences de Favrel (1988) dans les mêmes conditions, il apparaît que la dilution adéquate pour avoir un déplacement correct de la liaison de l'hormone marquée à l'anticorps, par les antigènes à doser, est de 1/350000 (dilution finale 1800000). Dans un premier temps, l'antisérum a été utilisé à une dilution de 1/391000 (dilution finale 1/1955000). Un déplacement de 50% de la liaison de l'hormone marquée à l'anticorps est obtenu pour environ 5 pg/tube de G 17 I humaine non marquée (cf courbe étalon: fig n°2).

Une diminution de la sensibilité ( les valeurs de la gamme ne montraient pas un déplacement de 50%) a conduit à revoir la dilution de l'anticorps. Différentes dilution de l'antisérum ont été testées afin de déterminer celle permettant 45% de liaison de l'hormone marquée (cf fig n°2) Suite à cette réévaluation, l'antisérum a été utilisé a une dilution de l'ordre de 1/220000.

#### **1.3.3 Filtration moléculaire sur gel de Séphadex**

##### **1.3.3.1 Pédoncule oculaire de Nephrops norvegicus**

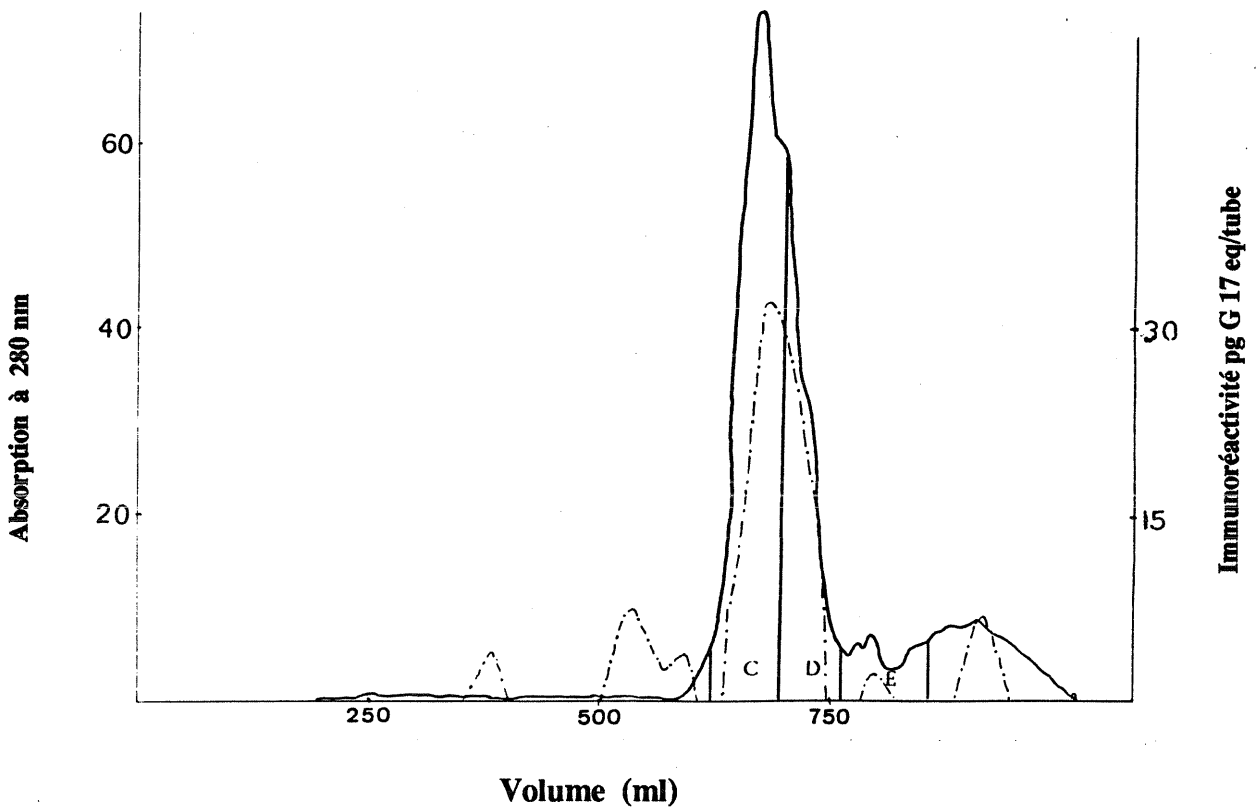
La figure n°3 montre le profil chromatographique de l'extrait brut. Le dosage radio-immunologique des différentes fractions permet de repérer au moins 4 composants, appelés B,C,D,E pour reprendre la terminologie de Favrel (1988). Les composants C, D, E de masse apparente 2200, 1800, et 1200 Da sont intéressants pour une purification par chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

##### **1.3.3.2 Pédoncule oculaire de Penaeus vannamei**

L'extrait brut déposé sur la colonne de Séphadex G 50 fine a le profil chromatographique représenté sur la figure n°4. L'immunoréactivité, comme pour les extraits de pédoncules de langoustine, est éluee sous forme de différents composants. Les formes C,D,E sont retrouvées. Les quantités de G 17 I équivalents en pg sont sensiblement les mêmes que celles détectées dans les pédoncules de langoustine (1200 pg).

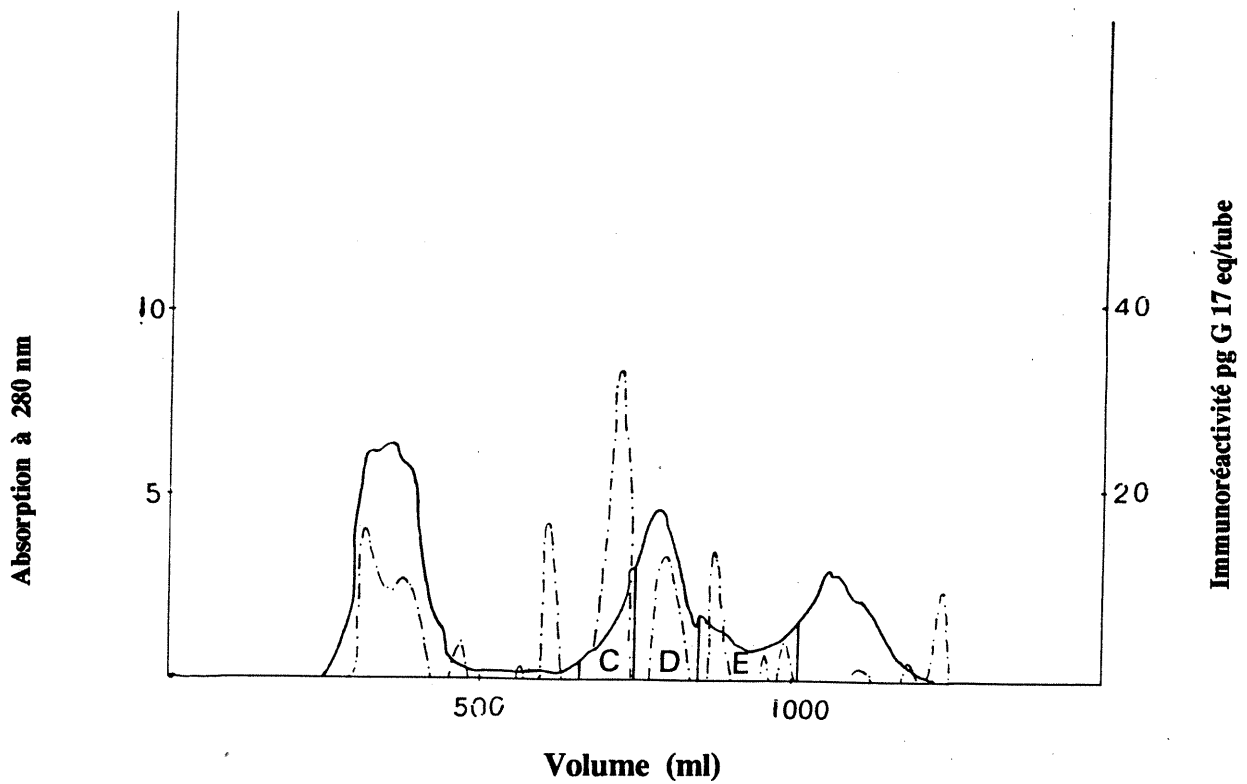
##### **1.3.3.3 Estomac de Nephrops norvegicus**

Là encore le profil chromatographique (cf fig n°5 ) est similaire à ceux obtenus pour les pédoncules oculaires, avec toutefois de quantités plus importantes de protéines éluées avec le volume mort (l'absorbance est plus importante). Les composés C,D,E sont là encore détectés mais cette fois leur concentration en G 17 I équivalents est plus importante (10200 pg).

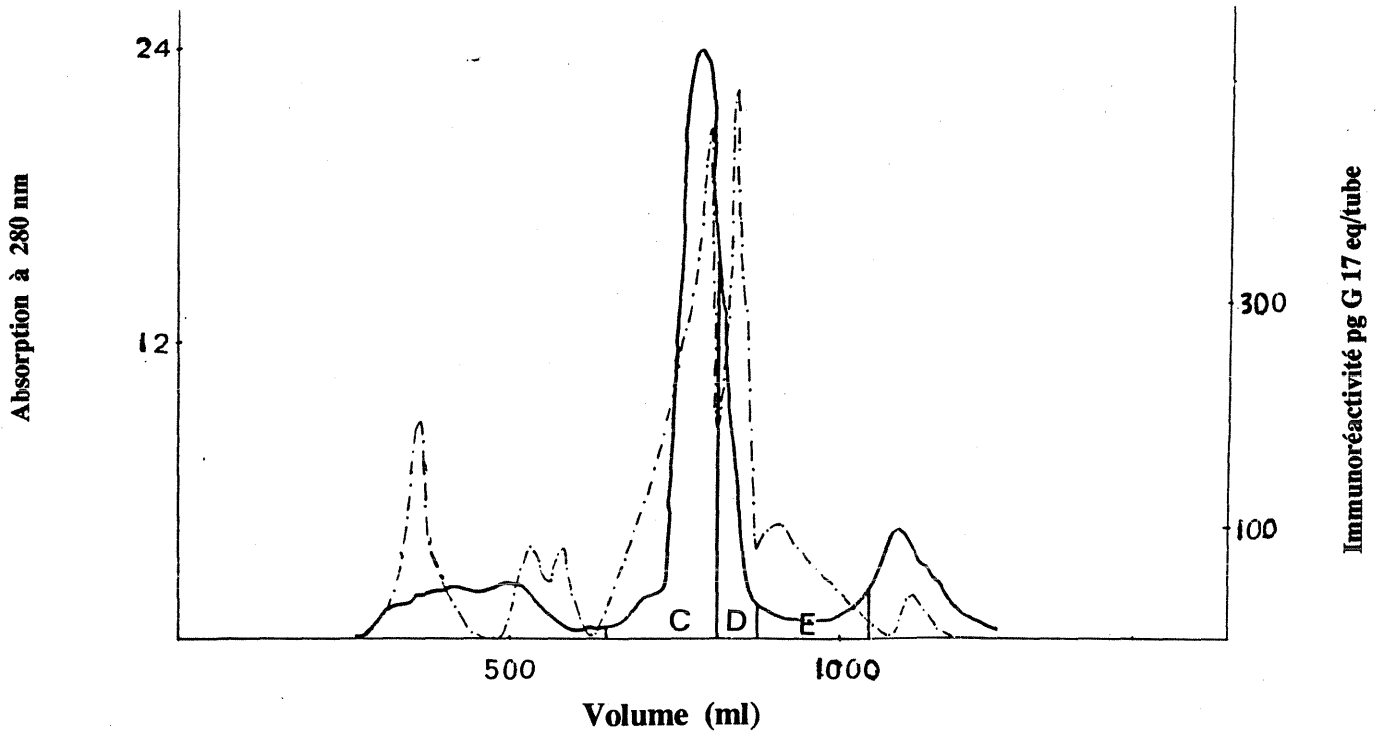


**Figure n°3**  
 Fractionnement moléculaire de pédoncule oculaire de *Nephrops norvegicus* sur une colonne de Sephadex G 50 fine

----- Absorption à 280 nm      - - - - Immunoréactivité



**Figure n°4:**  
 Fractionnement moléculaire de pédoncule oculaire de *Penaeus vannamei* sur une colonne de Sephadex G 50 fine



**Figure n°5**  
 Fractionnement moléculaire d'estomac de Nephrops norvegicus sur une colonne de Sephadex G 50 fine



### **1.3.4 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse**

#### **1.3.4.1 Pédoncule oculaire de Nephrops norvegicus**

Les fractions immunoréactives C, D, E de la figure n°3 sont fractionnées par HPLC-PI sur une colonne ultrasphère ODS. Pour chaque composé les conditions d'élution diffèrent (cf fig n°6).

Pour la fraction C, la majeure partie de l'immunoréactivité est éluée avec le volume mort (cf fig n°6a). Deux pics immunoréactifs sont toutefois détectés vers 40-41 ml et 51-52 ml. Ces valeurs sont néanmoins très faibles, ne dépassant pas 5pg G 17 eq/tube. L'absorption très faible à 226 nm semble confirmer le peu de composés injectés.

Tout comme pour la fraction C, l'immunoréactivité de la fraction D est en majeure partie éluée avec le volume mort (cf fig n°6b). Le bruit de fond important et l'absence de pic dominant empêche la détermination du volume d'élution de l'immunoréactivité de cette fraction. Comme précédemment aucun pic d'absorption à 226 nm n'est observé.

Afin d'éluer la radioactivité de la fraction E au delà du volume mort, le tampon A est légèrement modifié (cf fig n°6c). Malgré cela, l'immunoréactivité est majoritairement décelée dans le volume mort. Les quantités de G 17 eq sont très faibles, le maximum étant de 17 pg/ml.

#### **1.3.4.2 Pédoncule de Penaeus vannamei**

Aucune tentative de purification des fractions immunoréactives C,D,E de la figure n°4 n'a été effectuée en HPLC-PI.

#### **1.3.4.3 Estomac de Nephrops norvegicus**

Les fractions C,D,E immunoréactives, de la figure n°5, sont fractionnées par HPLC-PI sur les différentes colonnes d'après l'ordre suivant: ODS/Phenyl/Nucleosil. Le suivi des différentes fractions se fait par mesure de l'absorbance à 280 nm et par un dosage radio-immunologique.

□ fraction C

La fraction C, isolée lors de la filtration moléculaire, est purifiée par HPLC-PI. Le profil chromatographique obtenu sur colonne ODS est représenté sur la figure n°7a. L'immunoréactivité est éluée pour un volume de 38 à 50 ml et pour 13 à 20% de n-propanol. Ce large étalement de l'immunoréactivité traduit en fait la présence de plusieurs composés (C et D) non dissociés par le tamisage moléculaire (purification incomplète).

Ces 12 ml vont être lyophilisés puis repris dans le tampon A de la colonne phényl  $\mu$  Bondapack, le profil chromatographique obtenu est représenté sur la figure n°7b. Les différentes fractions sont alors bien séparées. L'immunoréactivité éluée pour un volume de 28 à 33 ml et pour 47 à 52% de solvant B (28,2 à 31,2% d'acétonitrile) traduit la présence du composé C<sub>2</sub>, sous produit du composé C (Favrel 1991). L'immunoréactivité associée au composé D est quand à elle éluée pour un volume de 19 à 25 ml et pour 40 à 45% de solvant B (24 à 27% d'acétonitrile).

Les fractions C immunoréactives, obtenues lors des chromatographies précédentes (fig n°7b et 8b) sont alors injectées sur une colonne Nucléosil. Le profil chromatographique obtenu est représenté sur la figure n°7c. L'immunoréactivité est majoritairement éluée pour un volume de 15 ml et 53% de solvant B (31,8% d'acétonitrile).

#### □ fraction D

La procédure est identique à celle utilisée pour le composé C.

La purification sur colonne ODS laisse apparaître 2 associations de pics immunoréactifs (figure n°8a). La première fraction immunoréactive est momentanément appelée D<sub>0</sub>, elle est éluée pour un volume de 30 à 32 ml et 6 à 8% de solvant B. La deuxième fraction est, quand à elle, éluée pour un volume de 46 à 51 ml et 17 à 19% de solvant B. Comme précédemment il s'agit de plusieurs composés non encore dissociés (C+D). Seule cette dernière fraction est injectée sur une colonne phényl  $\mu$  Bondapack (figure n°8b). Les différents composés jusque là non dissociés sont ici séparés. L'immunoréactivité éluée pour un volume de 17 à 22 ml et pour 40 à 45% de solvant B (24 à 27% d'acétonitrile) traduit la présence du composé D. Le composé C<sub>2</sub> est quand à lui élué pour un volume de 27 à 32 ml et pour 47 à 52% de solvant B (28,2 à 31,2% d'acétonitrile).

La dernière étape de purification se fait sur une colonne Nucléosil.

Le profil chromatographique de la fraction D<sub>0</sub> montre que 3 composés immunoréactifs différents sont alors séparés (figure n°8d). La fraction D<sub>0</sub> était donc une association de plusieurs composés. L'immunoréactivité éluée pour un volume de 18 à 20 ml et pour 30 à 34% de solvant B (18 à 20,4% d'acétonitrile) traduit la présence du composé E. Les composés D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>, sous produits du composé D (Favrel 1991), sont élués pour un volume de 26 à 27,5 ml et pour 43 à 46% de solvant B (25,8 à 27,6% d'acétonitrile). La dernière fraction éluée à 15 ml, 25% de solvant B (15% d'acétonitrile) semble être une nouvelle fraction non décrite précédemment, elle est nommée E<sub>1</sub>.

Les fractions D immunoréactives, obtenues lors des chromatographies précédentes (fig n°7b et 8b) sont injectées sur la colonne Nucléosil. Le profil chromatographique obtenu est représenté sur la figure n°8c. Deux pics immunoréactifs apparaissent. Le premier élué pour un volume de 5 ml et pour 40% de solvant B (24% d'acétonitrile) traduit la présence du composé D<sub>2</sub>. Le deuxième élué à 33 ml et 81 à 83% de solvant B (48,6 à 49,8% d'acétonitrile) représente une fraction non décrite précédemment, elle est appelée C<sub>0</sub>.

#### o fraction E

La colonne ODS n'est pas utilisée pour la purification de cette fraction. La première étape se fait donc sur une colonne phényl  $\mu$  Bondapack (fig n°9a). L'immunoréactivité est majoritairement éluée pour un volume de 15 à 17 ml et un pour 36,6 à 39,4% de solvant B (22 à 23,6% d'acétonitrile).

Après passage sur une colonne Nucléosil (fig n°9b, 4 lots de 200  $\mu$ l), l'immunoréactivité est décelée pour un volume de 26 à 33 ml et pour 29 à 38% de solvant B (17,4 à 22,8% d'acétonitrile).

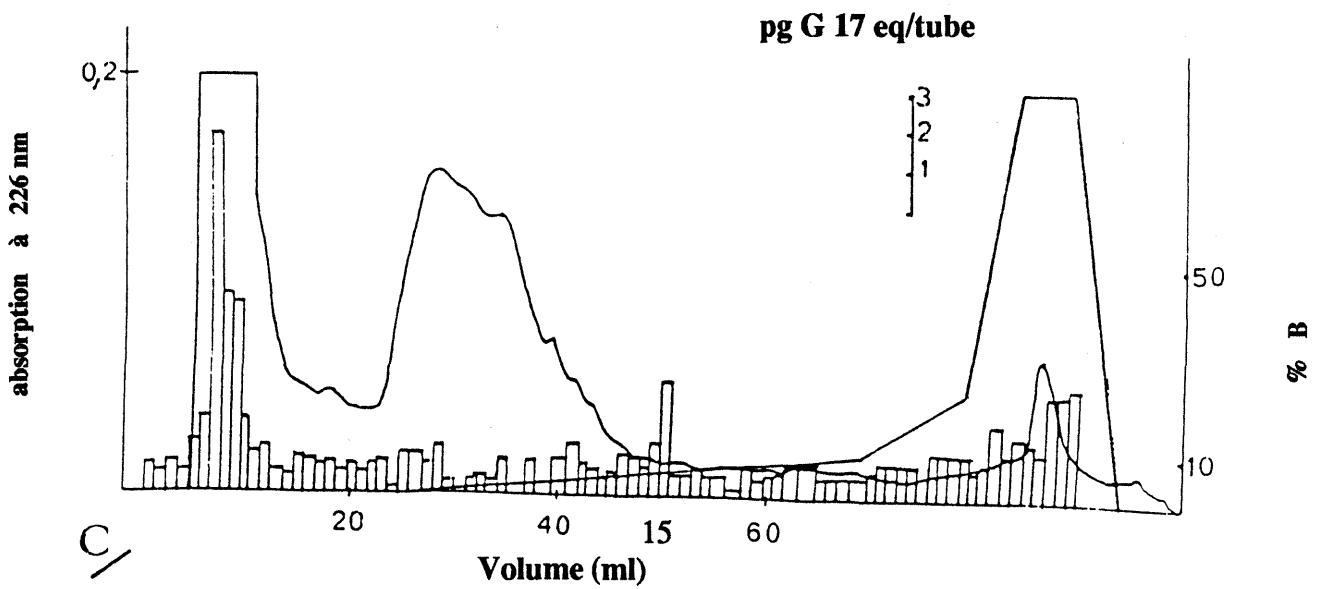
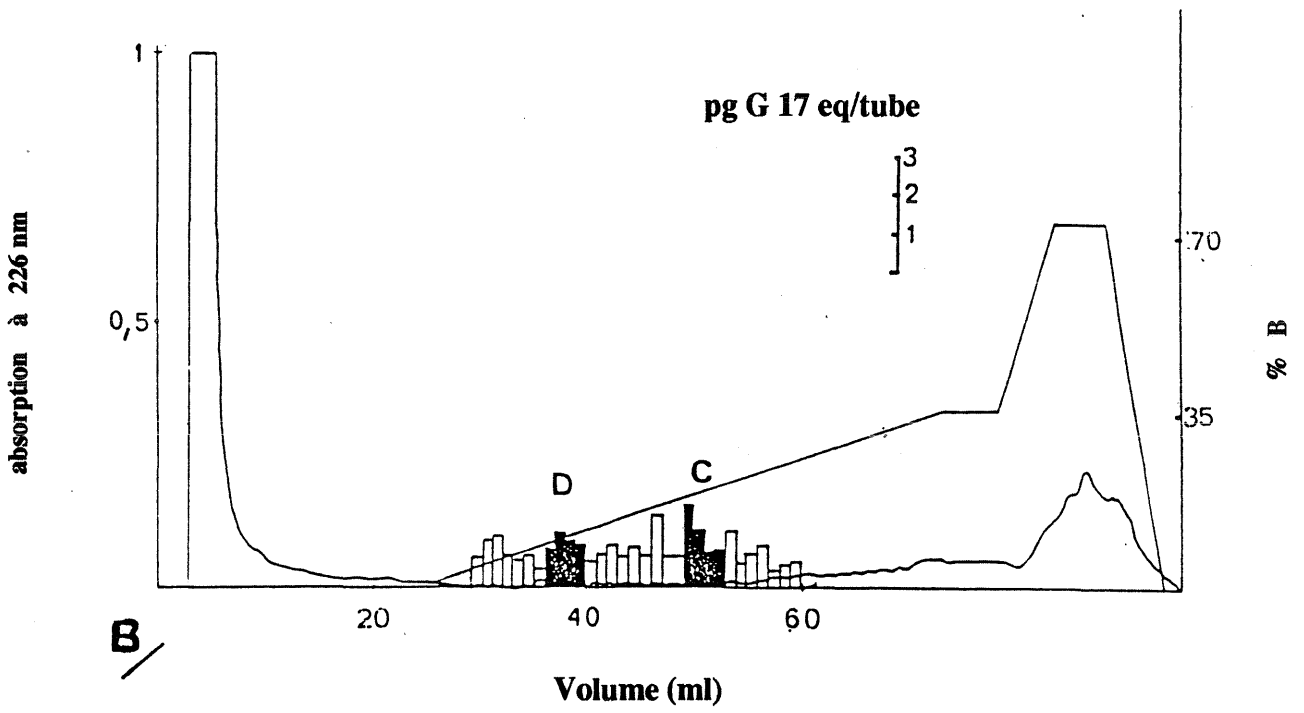
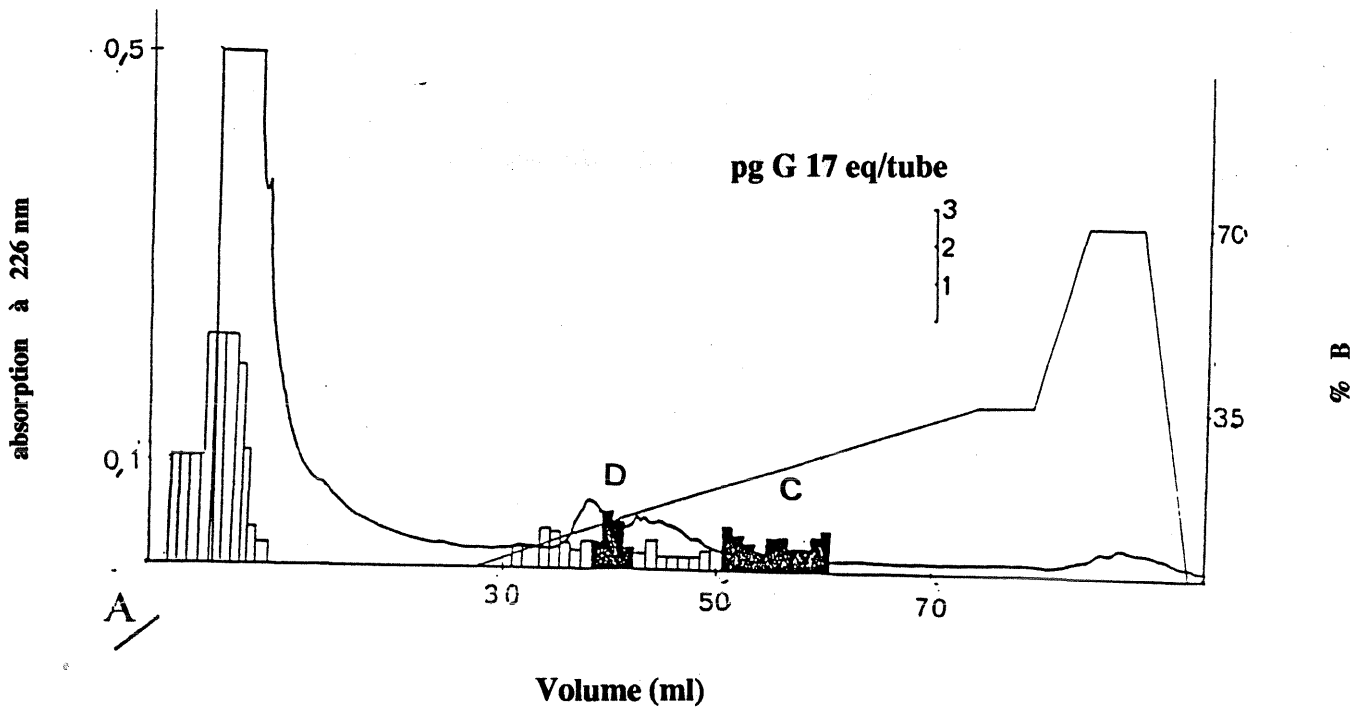
**Figure n°6**

**Chromatographie liquide haute performance en phase inverse des G/CCK de pédoncule oculaire de Nephrops norvegicus sur colonne ODS**

**a) composant C. La colonne ultrasphère ODS (Beckman, 5m, 25\*0,46 cm) est équilibré avec 100% de solvant A (17% n-propanol/0,1% TFA). L'élution est réalisé en isocratique pendant 40 min puis par un gradient linéaire de solvant B de 0 à 35% (17 à 35,5% réel de propanol) pendant 100 min. Le débit est de 0,5 ml/min, les fractions sont collectées toutes les 2 min.**

**b) composant D. Les conditions d'élution sont identiques à celles décrites pour la figure n°6a.**

**c) composant E. La colonne est équilibrée avec 100% de solvant A (3,5% n\_propanol/0,1% TFA). L'élution est réalisée en isocratique pendant 40 min puis par un gradient linéaire de 0 à 10% (3,5 à 10,5% réel de n-propanol) pendant 90 min. Le débit est de 0,5 ml/min, les fractions sont collectées toutes les deux minutes.**



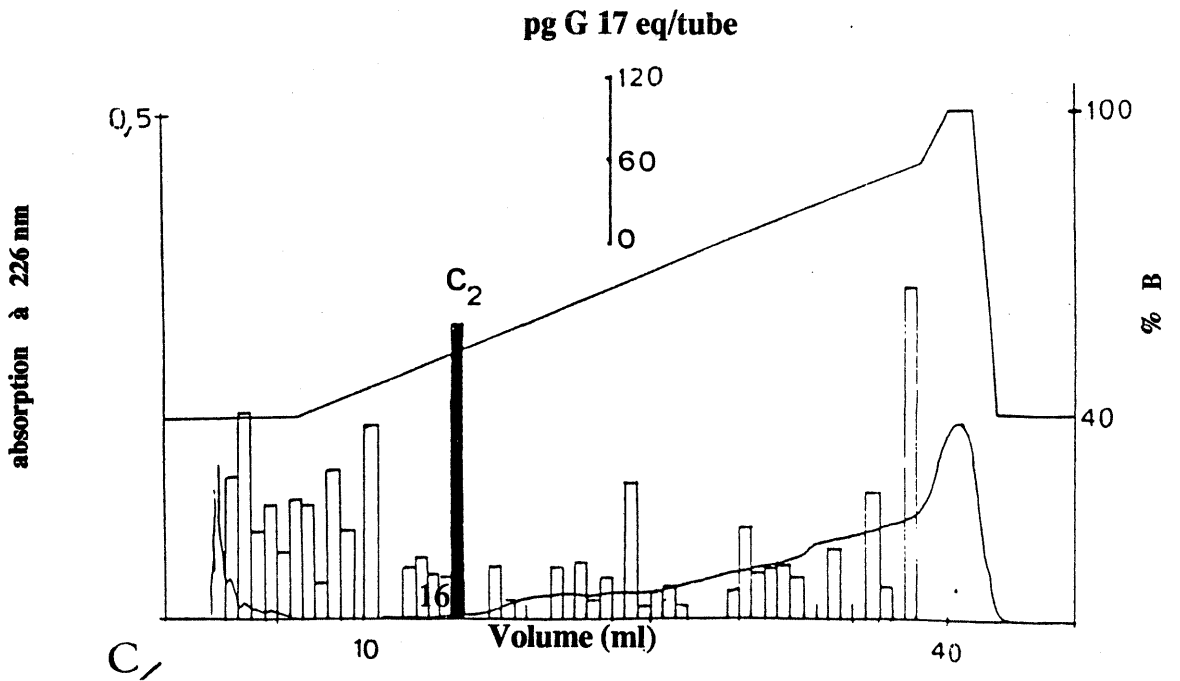
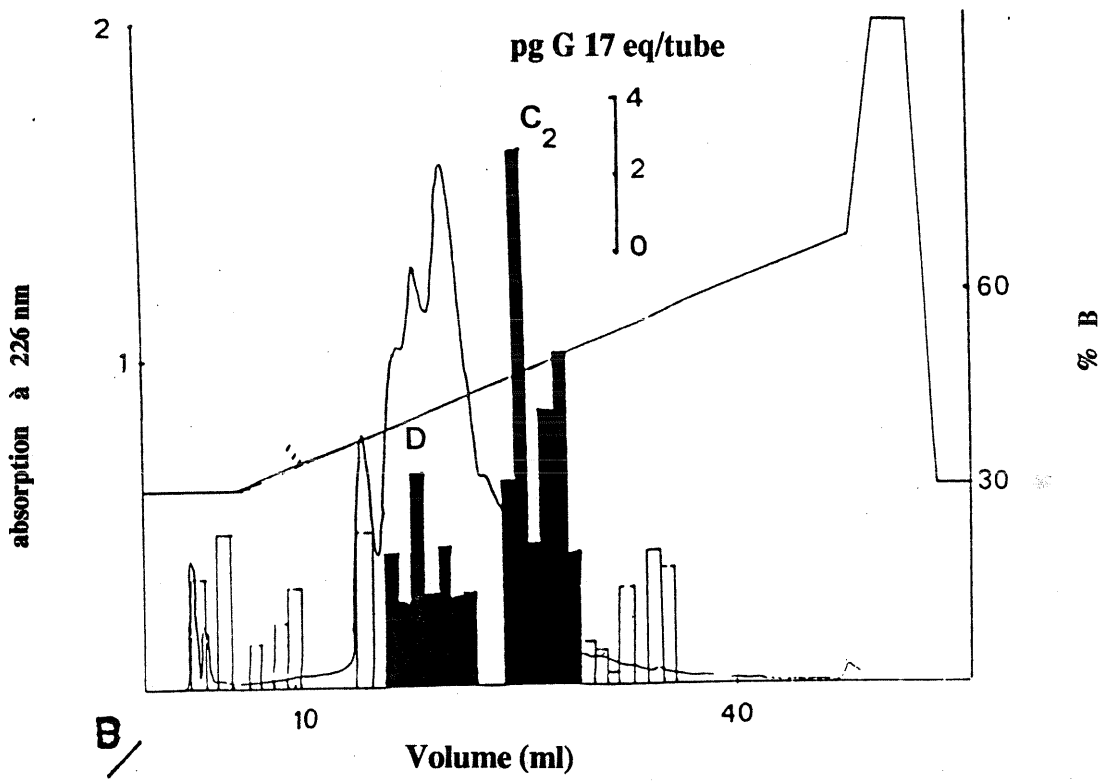
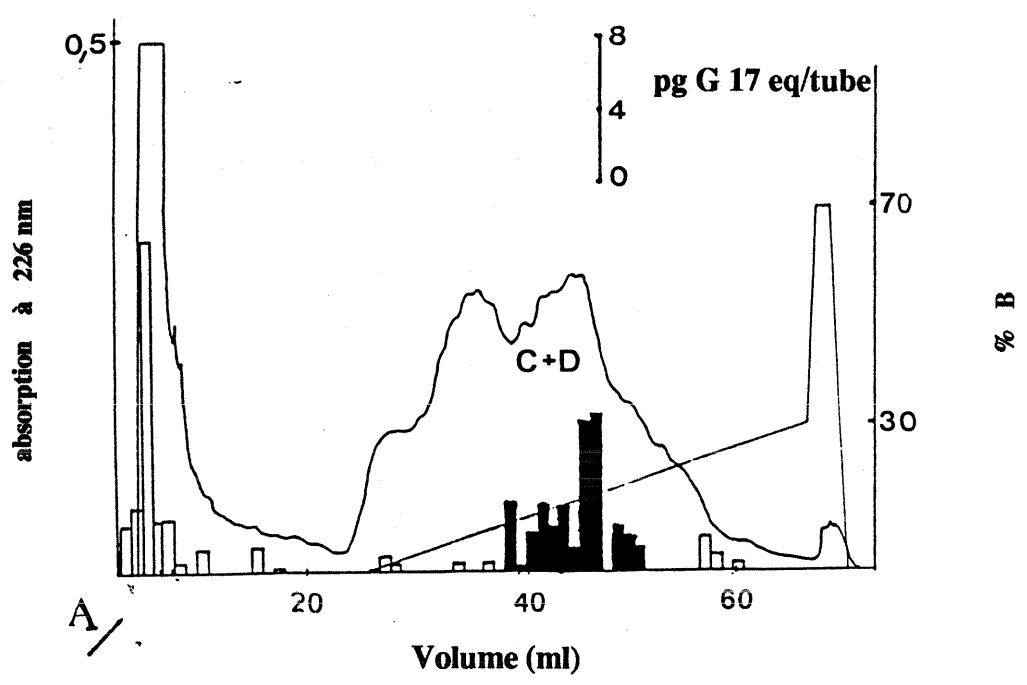
**Figure n°7**

**Chromatographie liquide haute performance en phase inverse des G/CCK de Nephrops norvegicus: composant C de l'estomac.**

a) La colonne ultrasphère ODS est équilibrée avec 100% de solvant A (17% n-propanol/0,1% TFA). L'élution est réalisée en isocratique pendant 40 min puis par un gradient linéaire de solvant B de 0 à 30% (17 à 32,9% de n-propanol) pendant 40 min. Le débit est de 0,5 ml/min, les fractions sont collectées toutes les 2 min.

b) Rechromatographie des fractions immunoréactives du composant C obtenues à l'issue de la chromatographie précédente (fig n°7a) sur une colonne Phényl m Bondapack (Waters associates, 0,39\*30 cm), qui est équilibrée avec 70% de solvant A (0,11% TFA/H<sub>2</sub>O) et 30% de solvant B (60% CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA). L'élution est réalisée en isocratique pendant 7 min puis avec un gradient linéaire de solvant B de 30 à 68% pendant 46 min. Le débit est de 0,9 ml/min, des fractions de 0,9 ml sont collectées.

c) Rechromatographie des fractions immunoréactives C obtenues à l'issue des chromatographies précédentes (fig n°6b et 7b) sur une colonne Nucléosil C18 (CL, 300 A, 25\*0,46 cm), qui est équilibrée avec 60% de solvant A (0,11% TFA dans H<sub>2</sub>O). L'élution est réalisée en isocratique pendant 10 min puis avec un gradient linéaire de solvant B de 40 à 89% pendant 50 min. Le débit est de 0,9 ml/min, des fractions de 0,9 ml sont collectées.



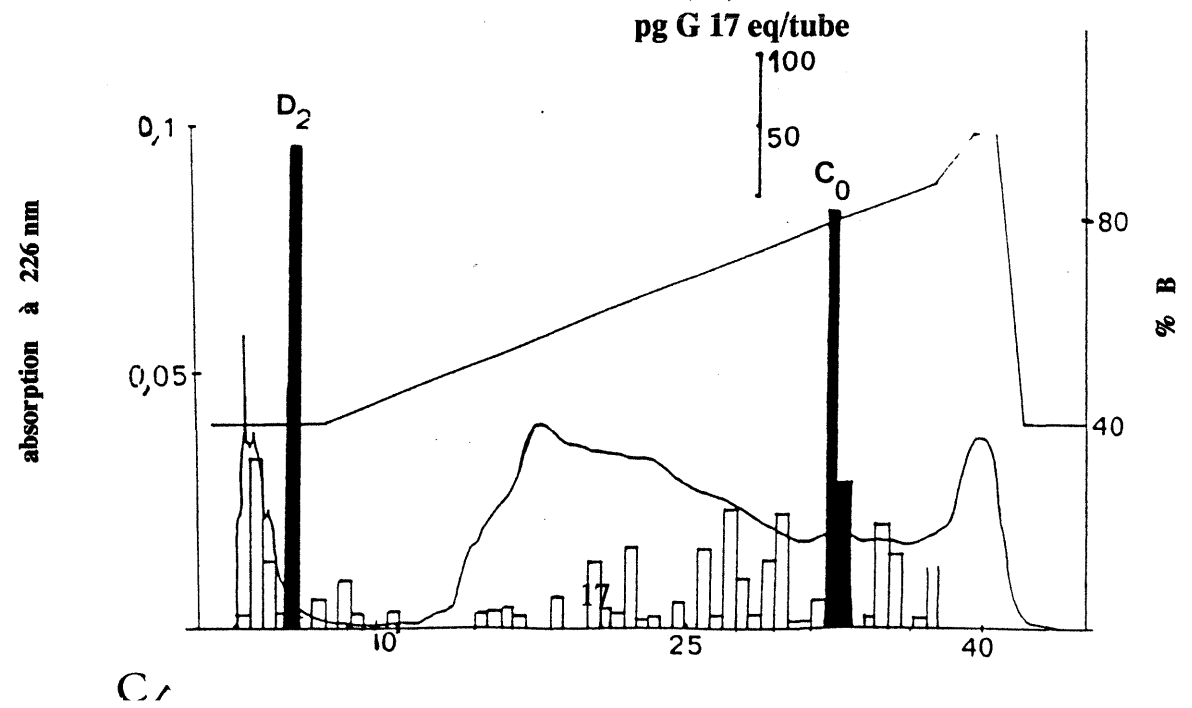
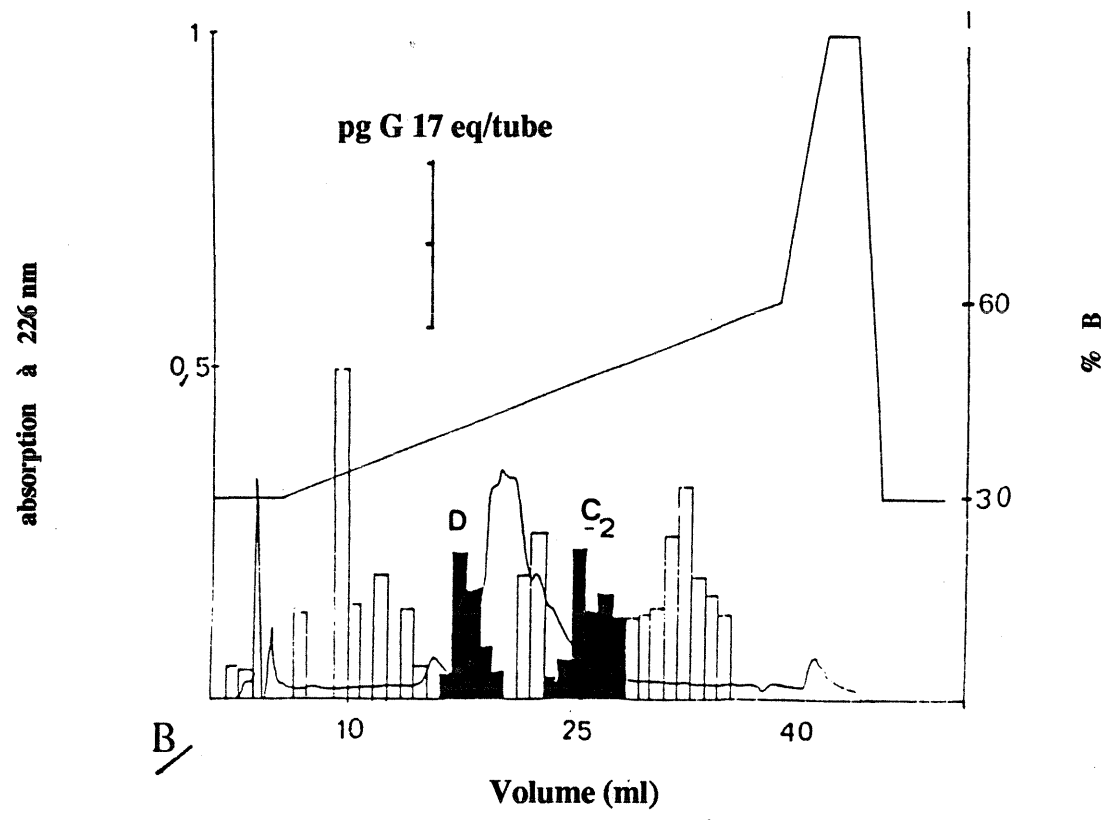
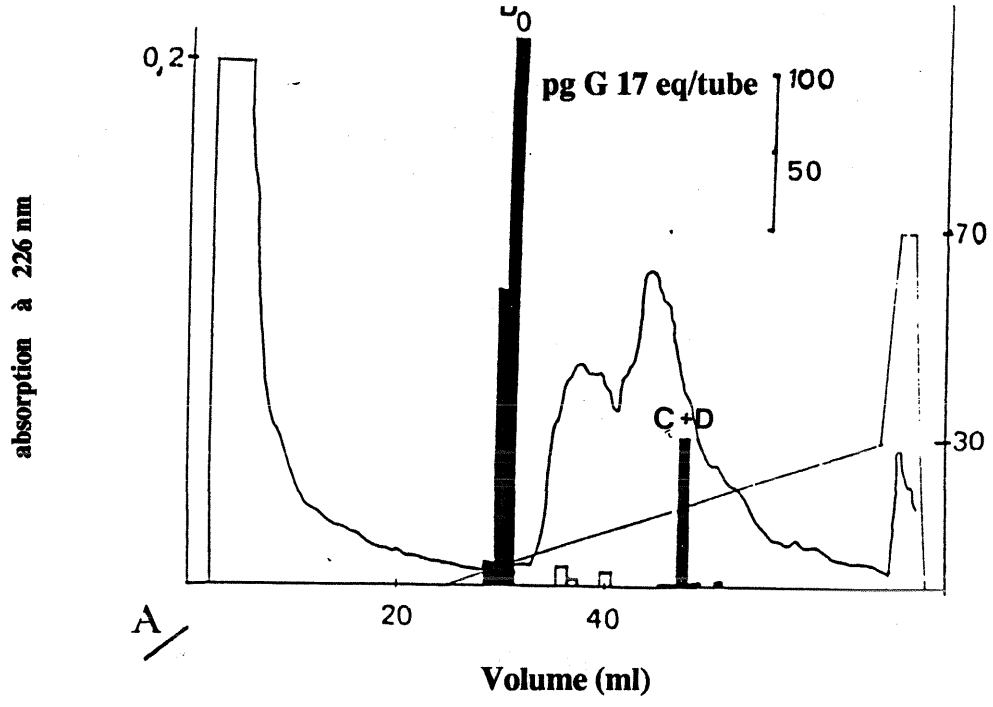
**Figure n°8**

Chromatographie liquide haute performance en phase inverse des G/CCK de *Nephrops norvegicus*: composant D de l'estomac.

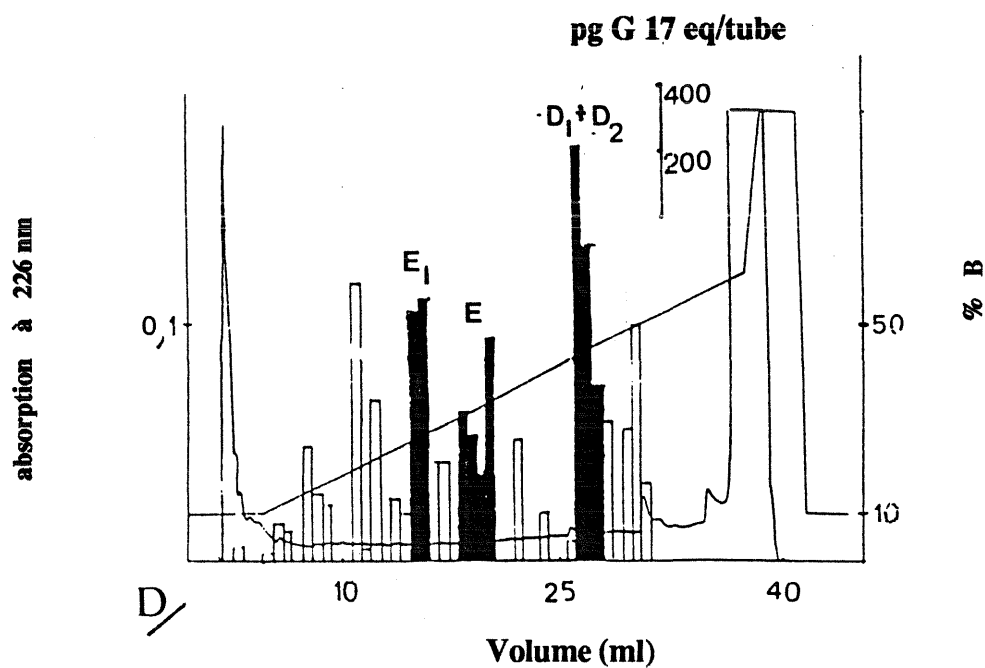
a) colonne ODS, les conditions d'élution sont identiques à celles décrites pour la figure n°7a.

b) Rechromatographie des fractions immunoréactives des composants C&D non dissociés à l'issue de la chromatographie précédente (figure n°8a) sur une colonne phényl m Bondapack (Waters associates 0,39\*30 cm) qui est équilibrée avec 70% de solvant A (0,11% TFA dans H<sub>2</sub>O) et 30% de solvant B (60% CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA). L'élution est réalisée en isocratique pendant 5 min puis avec un gradient linéaire de solvant B de 30 à 60% pendant 37 min. Le débit est de 0,9 ml/min, des fractions de 0,9 ml sont collectées.

c) Rechromatographie des fractions immunoréactives D obtenues à l'issue des chromatographies précédentes ( fig n°7b et 8b) sur une colonne Nucléosil. Les conditions d'élution sont identiques à celles décrites pour la figure n°7c.







**Figure n°8d**

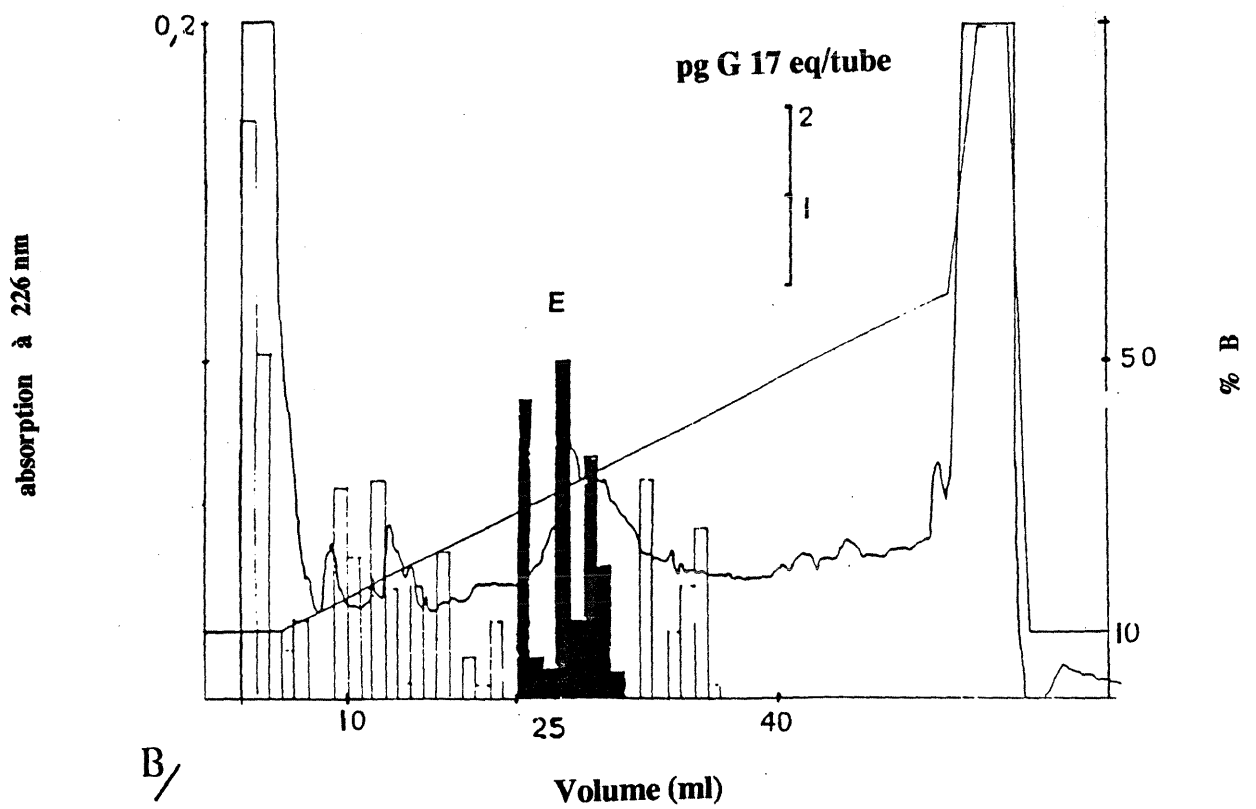
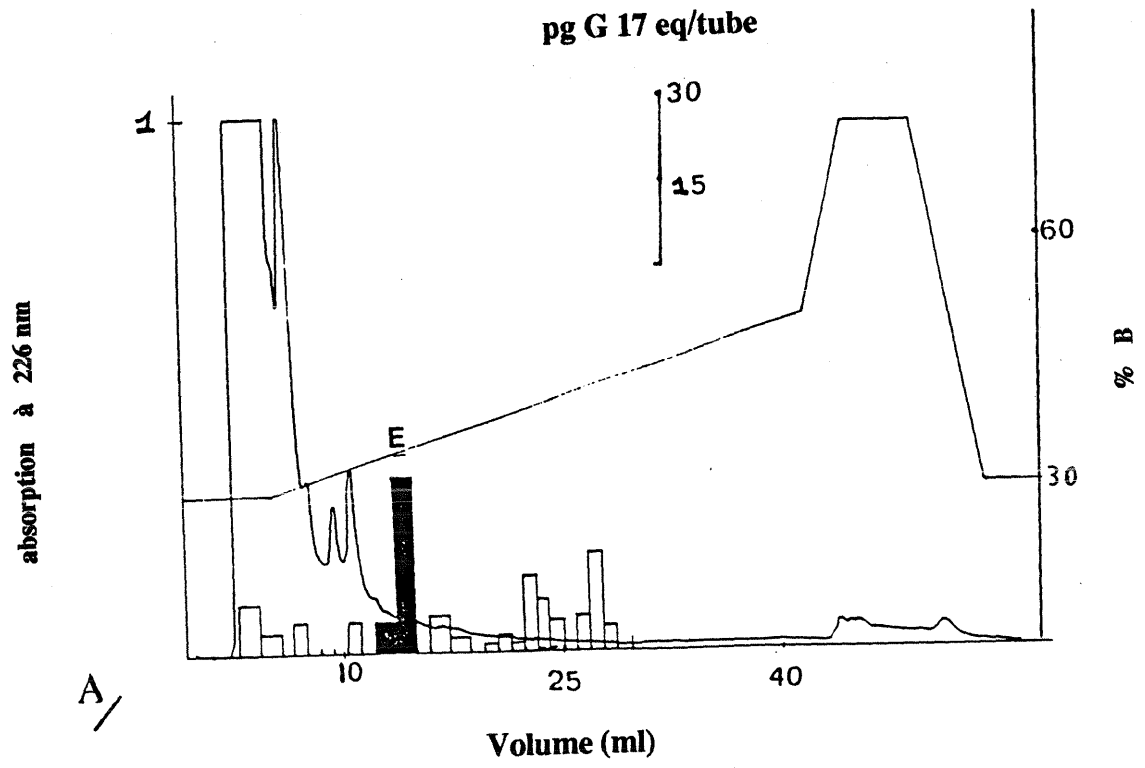
Rechromatographie des fractions immunoréactives D0 obtenues à l'issue de la chromatographie sur colonne ODS de la figure n°8a, sur une colonne Nucléosil qui est équilibrée avec 90% de solvant A (0,11% TFA dans H<sub>2</sub>O). L'éluion est réalisée en isocratique pendant 8 min puis avec un gradient linéaire de solvant B (60% CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA) de 10 à 60% pendant 47 min. Le débit est de 0,9 ml/min, des fractions de 0,9 ml sont collectées.

**Figure n°9**

Chromatographie liquide haute performance en phase inverse des G/CCK de Nephrops norvegicus: composant E de l'estomac.

a) La colonne **phényl  $\mu$  Bondapack** est équilibrée avec 70% de solvant A (0,11% TFA dans H<sub>2</sub>O) et 30% de solvant B (60% CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA). L'élution est réalisée en isocratique pendant 11 min puis avec un gradient linéaire de solvant B de 30 à 63% pendant 38 min. Le débit est de 0,9 ml/min, des fractions de 0,9 ml sont collectées.

b) Rechromatographie des fractions immunoréactives obtenues à l'issue de la chromatographie précédente (figure n°9a) sur une colonne **Nucléosil** équilibrée avec 90% de solvant A (0,11% TFA dans H<sub>2</sub>O) et 10% de solvant B (60% CH<sub>3</sub>CN/0,1% TFA). L'élution est réalisée en isocratique pendant 6 min puis avec un gradient linéaire de solvant B de 10 à 60% pendant 42 min. Le débit est de 0,9 ml/min, des fractions de 0,9 ml sont collectées.



### 1.3.5 Dotting

Afin de vérifier la spécificité des antiséras à notre disposition, les différents tubes récoltés à la sortie de la G 50 fine des pédoncules oculaires de Penaeus vannamei (cf fig n°4) sont soumis à la technique du Dotting. Les anticorps suivants sont testés:

Rehfeld 8017	(fig n°10a)
Rehfeld 3208	(fig n°10b)
Van Minnen	(fig n°10c)

Deux zones se révèlent positives quel que soit l'anticorps utilisé: 288-432 ml et 672-900ml. La deuxième zone contient les G/CCK"like" (d'après le RIA) tandis que la première zone correspond à un pic d'absorption optique où l'immunoréactivité est non spécifique.

### 1.4 DISCUSSION

Les résultats obtenus mettent en évidence la présence de peptides immunologiquement apparentés aux G/CCK de vertébrés chez les deux espèces étudiées: Penaeus vannamei et Nephrops norvegicus. Les quantités détectées par dosage radioimmunologique sont toutefois très différentes s'il s'agit de pédoncule oculaire ou d'estomac. La relative rareté des peptides, immunologiquement apparentés aux G/CCK de vertébrés, dans les pédoncules oculaires, se retrouve chez les deux espèces et est confirmée par Favrel (1988). De ce fait aucune tentative de purification ne peut être menée à terme car elle nécessiterait beaucoup trop de matériel biologique (en l'occurrence ici des pédoncules oculaires). Les expérimentations comparatives interspécifiques ont donc été abandonnées.

Les quantités de G/CCK évaluées dans l'estomac de Nephrops norvegicus, bien que plus conséquentes par rapport au pédoncule oculaire, sont toutefois plus faibles que celles détectées dans l'estomac du crabe Cancer magister (Larson et Vigna 1983). Il est donc probable que l'antisérum que nous utilisons réagit faiblement avec les G/CCK"like" de crustacés. En conséquence, les taux établis ne représentent pas les quantités réelles de peptides, les quantités sont largement sous estimées. Les sites antigéniques des G/CCK de langoustine et de crevette sont probablement structurellement légèrement différents de l'épitope correspondant des G/CCK de vertébrés, c'est pourquoi il a fallu extraire une quantité importante d'estomacs.

La spécificité des antiséras à notre disposition est évaluée par la technique du Dotting sur les pédoncules oculaires de Penaeus vannamei à la sortie de la colonne G 50 fine. Tous les anticorps reconnaissent les G/CCK"like" mais aussi d'autres molécules. Ceci est dû à une mauvaise dilution donc à un problème de sensibilité. Ainsi l'antisérum fourni par Van Minnen a une faible spécificité car, bien que dirigé contre Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>, il reconnaît les G/CCK"like". Il ne peut donc être affirmé par cette méthode qu'il s'agit bien de G/CCK que l'on purifie

Les analyses chromatographiques montrent, pour les G/CCK des espèces étudiées, une hétérogénéité moléculaire liée à la taille. Les différentes fractions C,D,E se retrouvent aussi bien dans les pédoncules oculaires que dans les estomacs.

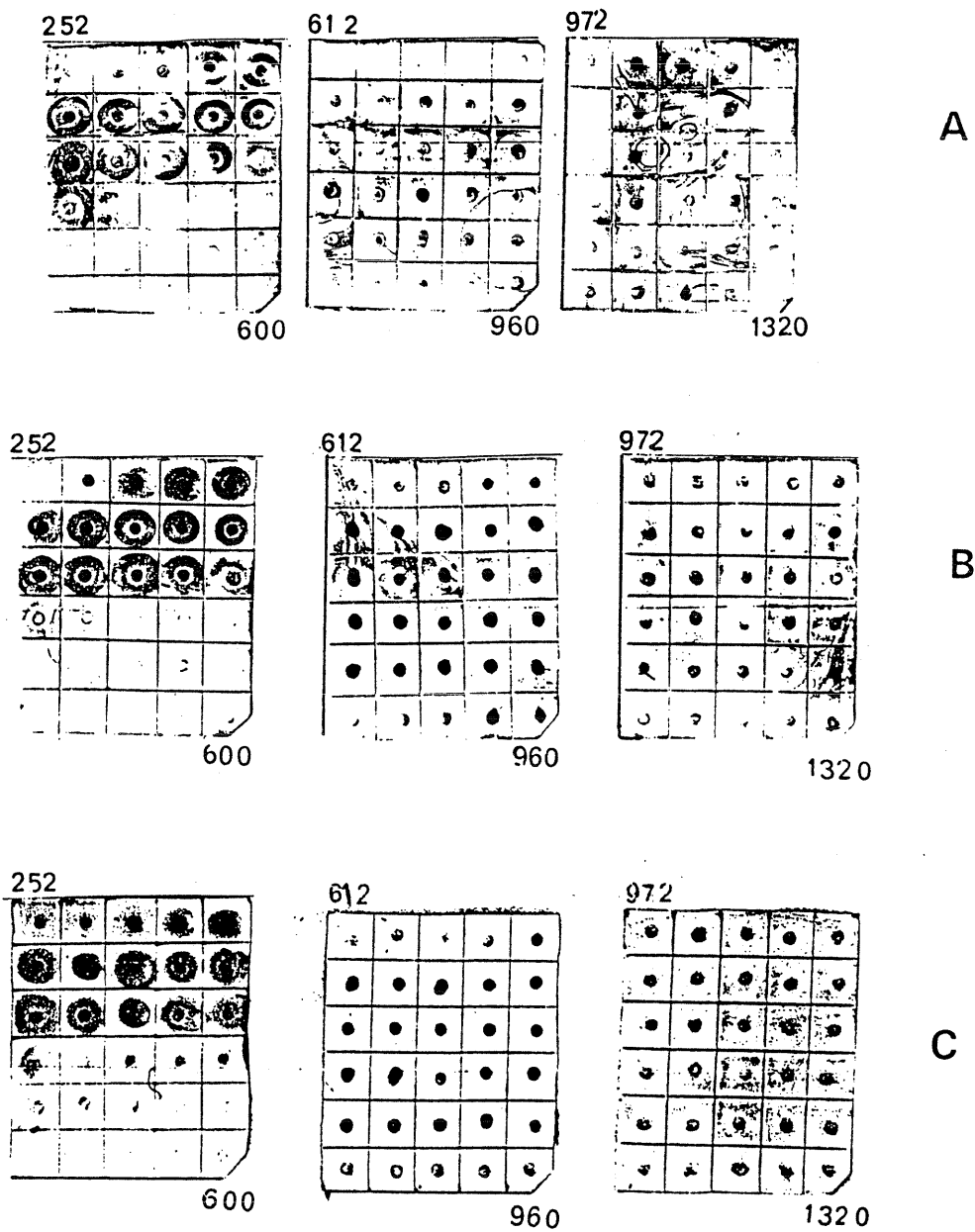


Figure n°10:

Dotting des G/CCK "like" de pédoncule oculaire de *Penaeus vannamei* après passage sur une colonne G 50 fine (les volumes d'élution sont représentés en ml)

A: antisérum Rehfeld 8017, dilution 1/833

B: antisérum Rehfeld 3208, dilution 1/833

C: antisérum Van Minnen, dilution 1/833

Par rapport aux expérimentations similaires utilisant le même antisérum, menées par Favrel (1988) sur l'estomac de Nephrops norvegicus, des différences notables apparaissent. Tout les quantités, bien que relativement identiques après le tamisage moléculaire, sont nettement inférieures dès la première étape de purification en HPLC-PI et ceci quelle que soit la fraction étudiée.

Les variations quantitatives se situent principalement au niveau du rendement de purification sur colonne ODS (perte de 80% de l'immunoréactivité). Ces pertes peuvent être partiellement imputées aux nombreuses lyophilisations (Petrides 1986) et à une diminution de l'immunoréactivité au cours de la purification. L'hypothèse de la présence de substances visqueuses diminuant l'adsorption des fractions sur la colonne ODS et entraînant leur élution avec le volume mort (Favrel 1988) est à écarter. En effet l'immunoréactivité décelée dans le volume mort n'est pas extrêmement importante et n'influe donc pas sur les quantités recueillies. Il est donc impossible de quantifier les peptides en cours de purification. Le dosage radioimmunologique permet toutefois une analyse qualitative.

Le profil chromatographique obtenu pour l'extrait brut d'estomac de Nephrops norvegicus montre des résultats comparables à ceux décrits chez divers invertébrés, avec toutefois des différences notables. Ainsi chez le crabe Cancer magister, une seule forme de masse comparable à la fraction C est mise en évidence (Larson et Vigna 1983); des formes D et E sont détectées dans les extraits stomacaux du mollusque Aplysia californica (Strauss et al 1975), dans l'intestin du ver de terre Lumbricus terrestris (Rzasa et al 1982) ou dans les tissus nerveux de la mouche Calliphora vomitoria (Dockray et al 1981).

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse permet d'affiner la caractérisation des peptides de type G/CCK, mais aucune fraction n'a pu être complètement purifiée (pas de pic d'absorption optique unique) empêchant ainsi une analyse de la composition en acides aminés. Il faut tout de même noter que les temps de rétention des composants C et D sont relativement semblables (sur colonnes ODS et phenyl  $\mu$  Bondapack) ce qui laisse présager une structure proche (mais non identique car les temps de rétention sont différents sur colonne Nucleosil).

Les temps de rétention des différents composés sont relativement identiques à ceux déjà décrits (Favrel 1991) et les "sous produits" des diverses fractions sont présents (C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>), ce qui confirme le bon déroulement des premières étapes de purification.

## 1.5 CONCLUSION

La purification des G/CCK de langoustine (Nephrops norvegicus) et de crevette (Penaeus vannamei) montre que ces peptides présentent des caractéristiques chromatographiques similaires. Le profil de la filtration moléculaire est quasiment invariant, qu'il s'agisse de pédoncule oculaire ou d'estomac et ceci chez l'une ou l'autre des deux espèces étudiées.

Le principe d'ubiquité exposé par Rehfeld (1981) semble respecté, les G/CCK"like" de langoustine sont au moins présentes dans deux tissus: le tissu nerveux (pédoncule oculaire) et l'estomac. L'hétérogénéité commune à la famille des G/CCK (Rehfeld 1981) est elle aussi retrouvée, car chez les deux espèces étudiées au moins trois fractions, de taille moléculaire différente, sont observées. Il semble donc que aussi bien Nephrops norvegicus que Penaeus vannamei possèdent des membres authentiques de la famille des hormones gastrointestinales de type gastrine et cholecystokinine.

Les faibles quantités apparentes de peptides (faible immunoréactivité et faible absorption optique) n'ont pas permis de mener à terme la purification; notamment en ce qui concerne le composé qui nous intéressait.

L'extraction de plus grosses quantités de matériel biologique liée à l'utilisation d'un antisérum plus spécifique peut permettre une purification complète et, une analyse de la composition en acides aminés. Ainsi un anticorps, ayant par exemple comme épitope le composé D synthétique (Ser-Glu-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Trp-Leu) obtenu par Favrel et al (1991) sur Nephrops norvegicus, faciliterait la reconnaissance des G/CCK"like" et, permettrait d'améliorer les étapes de purification (et par là même les rendements). Une chromatographie d'affinité serait même envisageable.

## **2 . EFFETS DE FRACTION PARTIELLEMENT PURIFIEES DE G/CCK, IMMUNOLOGIQUEMENT APPARENTEES DE LA LANGOUSTINE SUR L'INCORPORATION DE LEUCINE TRITIEE DANS LES PROTEINES DE L'HEPATOPANCREAS DE PALAEON SERRATUS**

### **2.1 INTRODUCTION**

Afin de vérifier la validité de la purification décrite dans le premier chapitre, nous avons voulu tester biologiquement les différentes fractions collectées. Le test *in vivo* qui semble le plus indiqué et le plus facile à mettre en oeuvre consiste à mesurer l'augmentation de l'incorporation de L-Leu <sup>3</sup>H dans les protéines cytosolubles du pancréas (effet trophique de la gastrine et des CCK) (Johnson 1981).

Pour des raisons de commodité et de disponibilité en matériel biologique, les composants purifiés à partir d'estomac de langoustine sont injectés à des crevettes Palaemon serratus. Celles ci sont regroupées en lots homogènes (même poids moyen et même stade d'intermue) afin de permettre des comparaisons et d'éviter une trop grande incidence du cycle d'intermue sur la physiologie et le métabolisme des crevettes.

La fiabilité du test est vérifiée par l'injection, dans les mêmes conditions expérimentales, de G 17 I humaine, qui en cas de réussite du test, entraîne des variations notables sur l'incorporation de L-Leu <sup>3</sup>H. Enfin par utilisation d'un inhibiteur spécifique (la proglumide) l'appartenance, des composants purifiés, à la famille des G/CCK pourra être confirmée.

### **2.2 MATERIEL ET METHODES**

#### **2.2.1 Animaux étudiés**

Les crevettes Palaemon serratus sont pêchées dans la baie de Concarneau. Elles sont choisies préférentiellement aux autres crevettes de part leur grande taille.

Les crevettes sont acclimatées pendant quelques jours, au laboratoire, dans des bacs d'eau de mer oxygénés. Les stades d'intermue sont déterminés suivant la méthode de Drach et Tchernigovzeff (1967) et les animaux de stade D<sub>0</sub> dans un premier temps puis de stade D<sub>1</sub>'' sont sélectionnés.

#### **2.2.2 Injection**

- Choix des fractions à injecter



Après passage sur une colonne Nucleosil en HPLC-PI (cf 1.2.6), les fractions les plus immunoréactives sont sélectionnées (C, C<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>+D<sub>2</sub>, E et E<sub>1</sub> des figures n°6c,7d,7c). Elles sont comparées entre elles au vue de leur action sur l'incorporation de Leucine tritiée. La ou les fractions les plus actives sont alors testées, avec ou sans proglumide (inhibiteur spécifique de la G 17 (Hahne *et al* 1981, Bunney B.S *et al* 1985, Barbaz B.S *et al* 1985)), et comparées à l'action de la G 17I humaine.

#### □ Préparation des échantillons

Pour ce test *in vivo* sur Palaemon serratus, des lots relativement homogènes de 8 crevettes sont utilisés (même stade d'intermue et même poids moyen) pour chaque fraction testée.

Chaque échantillon à injecter est d'abord lyophilisé, puis on ajoute 45 µl de Leucine tritiée (L-(3-4-5-<sup>3</sup>H)) en solution à 1 mCi/ml (chaque fraction reçoit donc 45 µCi). Le tout est de nouveau lyophilisé et repris dans 45 µl d'eau de mer. Cinq µl de la solution radioactive obtenue sont alors injectés dans la musculature abdominale de la crevette.

Une valeur moyenne et un écart type vont être déterminés à l'aide des 8 valeurs obtenues pour chaque fraction étudiée.

### 2.2.3 Extraction des hépatopancréas

Deux heures après l'injection, les hépatopancréas sont prélevés, après ouverture de la partie dorsale du céphalotorax, broyés (dans un potter ou aux ultrasons) dans 300 ou 500 µl de tampon phosphate pH=7, 10 mM puis centrifugés pendant quelques minutes à 10000 rpm (microfuge Beckman). Le surnageant est prélevé tandis que le culot est éliminé.

### 2.2.4 Dosage des protéines

Pour chaque échantillon, des aliquotes de 5 et 10 µl de surnageant d'extrait d'hépatopancréas sont prélevés pour le dosage des protéines. Les protéines solubles sont mesurées selon la méthode décrite par Lowry *et al* (1951). Une solution d'albumine sérique (BSA) à 1 mg/ml est utilisée comme solution étalon.

### 2.2.5 Mesure de l'incorporation

Une aliquote (100 µl) de surnageant d'extrait d'hépatopancréas est précipitée en présence de 10 ml de TCA 10% pendant 1/2 h à 4°C. Les précipités sont alors récupérés sur des filtres en fibre de verre Whatman GF.F, lavés (2 fois par 10 ml de TCA 10%, une fois par 10 ml d'Éthanol et une fois par 10 ml d'un mélange Éthanol/éther:50/50) séchés puis introduits dans des fioles de comptage contenant 3 ml de scintillant Beckman.

Parallèlement, une aliquote de 20 µl de surnageant d'extrait est diluée dans 3 ml de scintillant. Ceci va permettre de déterminer la radioactivité totale soluble dans l'extrait (L-(3,4,5-<sup>3</sup>H) Leucine, protéines solubles).

Les fioles sont comptées au compteur (intertechnique SL 3000) après disparition de la chemoluminescence. Le quenching (comptage réalisé contre un témoin interne) est quand à lui négligeable. La radioactivité, exprimée en cpm, est rapportée à la quantité de protéines précipitées, de façon à exprimer la radioactivité en cpm/mg de protéines. Le pourcentage d'incorporation est aisément calculé en faisant le rapport protéines précipitées/protéines totales.

### 2.2.6 Test statistique

Afin de pouvoir vérifier si les résultats obtenus sont significatifs, un test statistique est indispensable. En ce qui concerne la comparaison de l'incorporation en cpm/mg de protéines, notre choix s'est porté sur le test de Student-Fisher.

## 2.3 RÉSULTATS

### 2.3.1 Sélection des fractions les plus actives

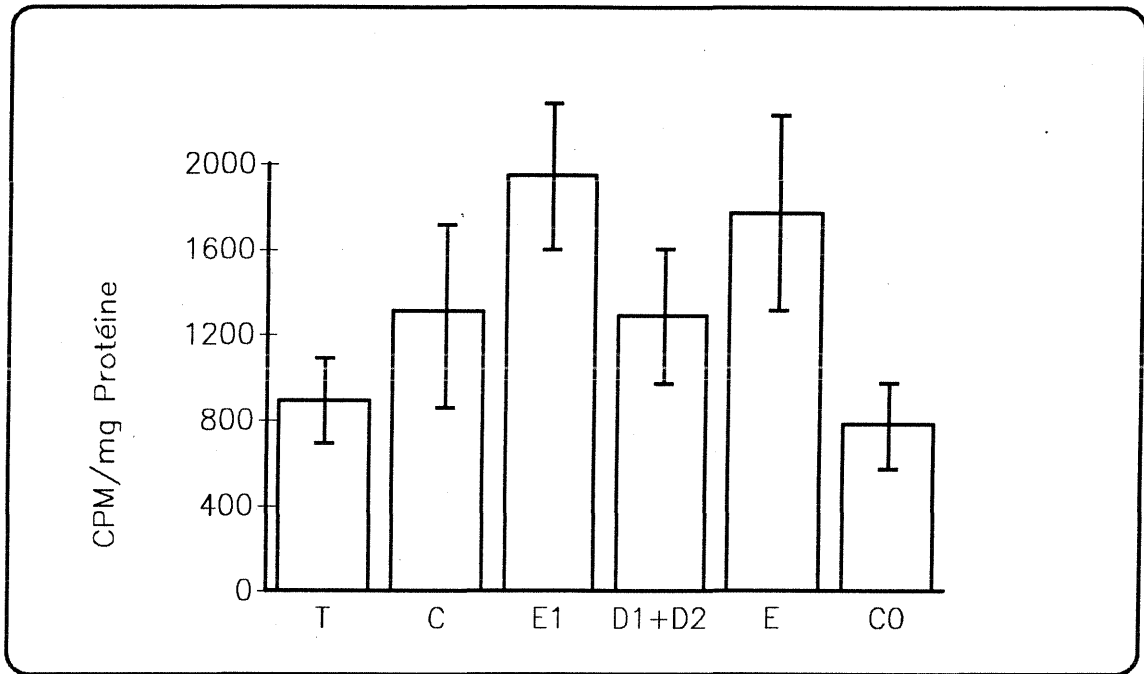
Dans cette expérience les crevettes sont toutes au stade d'intermue D<sub>0</sub>. Les résultats sont consignés dans le tableau n°1.

FRACTION	Qté injectée par crevette pg/G 17 eq	cpm/mg de protéines	% incorporation	Test de Student significativité
témoin		895 ± 178	6,7 ± 1,8	1,00
C	98,4	1314 ± 462	11,4 ± 3,2	0,18
E <sub>1</sub>	43,4	1948 ± 382	9,9 ± 1,9	0,04
D <sub>1</sub> +D <sub>2</sub>	101,3	1293 ± 301	8,7 ± 2,7	0,01
E	154,6	1773 ± 441	11,4 ± 1,9	0,09
C <sub>0</sub>	121,7	787 ± 214	6,8 ± 2,7	0,77

**Tableau N°1**

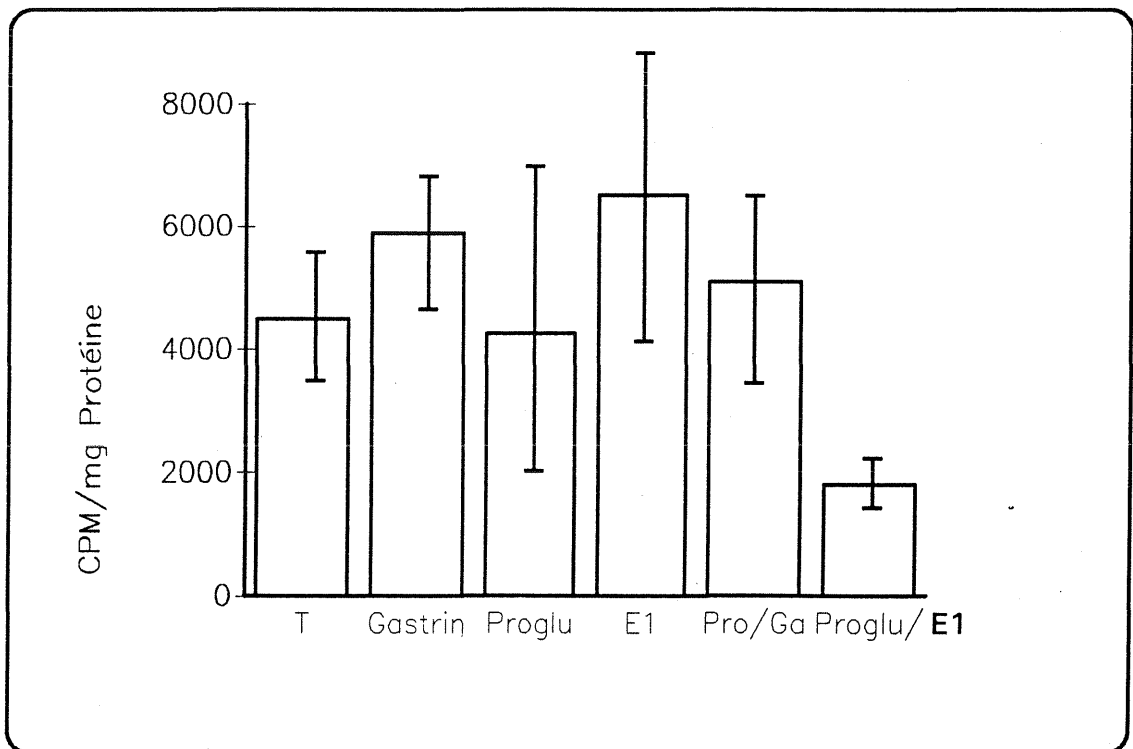
Comparaison de l'action des fractions immunoréactives sur l'incorporation de Leucine tritiée

Pour toutes les fractions exceptée C<sub>0</sub>, on observe une augmentation de la radioactivité incorporée dans les protéines cytosolubles (fig n°11).



**Figure n°11**

Effet de fractions partiellement purifiées de G/CCK immunologiquement apparentées de *Nephtrops norvegicus* sur l'incorporation de Leucine tritiée dans les protéines cytosolubles de l'hépatopancréas de *Palaeomon serratus*



**Figure n°12**

Comparaison de l'action de la G 17I, de la proglumide et de la fraction E1 sur l'incorporation de Leucine tritiée

### 2.3.2 Etude comparative G 17 I/fraction E<sub>1</sub>/proglumide

Les crevettes utilisées sont majoritairement au stade D1''. Les résultats sont consignés dans le tableau n°2.

SUBSTANCE	Qté injectée par crevette pg/G 17 eq	cpm/mg de protéines	% incorporation	Test de Student significativité
témoin		4492 ± 997	12,4 ± 2,9	1,00
Gastrine	200.10 <sup>3</sup>	5889 ± 1035	18,8 ± 3,0	0,06
Proglumide	250.10 <sup>3</sup>	4265 ± 2688	10,2 ± 2,8	0,87
E <sub>1</sub>	21,7	6506 ± 2327	16,8 ± 2,3	0,50
Proglu/Gast	250.10 <sup>3</sup> /200.10 <sup>3</sup>	5089 ± 1494	13,4 ± 3,3	0,93
Proglu/E <sub>1</sub>	250.10 <sup>3</sup> /21,7	1791 ± 281	13,5 ± 2,9	

Tableau N°2  
Comparaison de l'action de la fraction E<sub>1</sub>, de la G17 I et de la proglumide, sur l'incorporation de Leucine tritiée.

La figure n°12 représente l'action des différentes substances testées.

## 2.4 DISCUSSION

Les différentes fractions partiellement purifiées, à partir d'estomac de Nephrops norvegicus, obtenues par HPLC-PI, provoquent une stimulation de l'incorporation de Leucine tritiée dans les protéines cytosolubles de l'hépatopancréas de Palaemon serratus. Toutes ces fractions (exceptée la fraction C<sub>0</sub> qui ne semble pas avoir une action significative: test de Student-Fisher non probant) auraient un rôle trophique sur l'hépatopancréas.

L'accroissement maximal de la radioactivité associée aux protéines (cpm/mg de protéines) est obtenu pour la fraction E<sub>1</sub>. Le pourcentage d'incorporation correspondant est lui aussi élevé par rapport au lot témoin. Le test de Student-Fisher permet de valider ces résultats et d'affirmer que la fraction E<sub>1</sub> a une action positive non négligeable sur l'incorporation de Leucine tritiée donc sur la synthèse protéique. Il convient de remarquer que les quantités utilisées de peptides, partiellement purifiés, sont inégales. En ce qui concerne la fraction E<sub>1</sub>, la quantité injectée, par crevette, est la plus faible de toutes. On peut donc supposer qu'à quantité égale, cette fraction se serait nettement différenciée du lot par la forte incorporation de Leucine tritiée qu'elle entraîne. Ces différentes constatations nous ont amené à sélectionner la fraction E<sub>1</sub> pour des expérimentations complémentaires.

Afin d'évaluer l'influence de cette fraction, une étude comparative est menée en injectant, dans les mêmes conditions, expérimentales de la G 17I, qui semble être le peptide synthétique le mieux approprié (Favrel 1988) et de la proglumide.

Au vu des résultats, il apparaît clairement que la fraction E<sub>1</sub> et la G 17I agissent favorablement sur l'incorporation de Leucine tritiée, tandis que la proglumide seule n'a pas d'action (identique au témoin). Le test de Student-Fisher, par rapport au témoin, est probant pour la G 17I (seuil de significativité très faible) et pour la proglumide (seuil de significativité élevé). Par contre la significativité des résultats obtenus pour la fraction E<sub>1</sub> n'est pas vérifiée.

L'action positive cette fraction peut toutefois être vérifiée en la comparant avec celle de la G 17I et là, le test statistique confirme l'homologie (0,96 de seuil de significativité).

Les doses injectées sont là encore inégales (rapport de 1 à 9 entre la fraction E<sub>1</sub> et la G 17I) or l'accroissement de l'incorporation de Leucine tritiée dans les protéines cytosolubles est lui quasiment identique dans les deux cas. Il est donc aisé de supposer qu'à quantité égale, la fraction E<sub>1</sub> est beaucoup plus "active" que la G 17I et ceci en raison des disparités de structure moins importantes entre les peptides de langoustine et de crevette (plus grande proximité dans l'arbre évolutif), qu'entre ceux de crevette et ceux de vertébrés. En effet les récepteurs de l'hépatopancréas de crevette ont une faible affinité pour les peptides de vertébrés (Favrel 1988).

L'utilisation conjointe de la proglumide et de la gastrine annule l'action de cette dernière. Aucune variation d'incorporation de Leucine tritiée est notable dans ce cas. Malheureusement l'essai visant à injecter conjointement de la proglumide et la fraction E<sub>1</sub> n'a pas donné le résultat escompté (test de Fisher non probant). Ceci est dû au poids moyen des crevettes de ce lot qui est très supérieur à celui des autres essais. L'étude comparative complète n'est donc pas réalisée ce qui empêche la confirmation de l'appartenance de la fraction partiellement purifiée à la famille des G/CCK. En effet la proglumide est un inhibiteur spécifique de la famille des G/CCK, elle peut donc être utilisée pour prouver qu'une molécule étudiée est bien une G/CCK.

Aucune comparaison ne peut être effectuée entre les deux expériences. En effet les conditions expérimentales changent. Les stades d'intermue sont différents (D<sub>0</sub> et D<sub>1</sub>'') et suffisent à expliquer les fortes variations de radioactivité incorporée (rapport de 1 à 4). Le turn over est beaucoup plus important au stade D<sub>1</sub>'' pour Palaemon serratus (Van Worhmodt.A 1980) mais diffère selon les espèces (Favrel 1988).

## 2.5 CONCLUSION

Toutes les données expérimentales exposées confirment le fait que la G 17I humaine et les peptides de crustacés, qui lui sont immunologiquement apparentés, ont un rôle trophique (synthèse protéique) sur l'hépatopancréas. Cette action, des G/CCK partiellement purifiées à partir d'estomac de Nephrops norvegicus et du peptide synthétique de vertébrés qui leur est apparenté, sur l'hépatopancréas de Palaemon serratus, n'est toutefois pas identique. A dose équivalente, certains composants de langoustine sont beaucoup plus actifs, ceci grâce à leur moins grandes disparités structurales avec les G/CCK de crevette et à la spécificité des récepteurs à G/CCK de cette dernière.

Au cours du cycle d'intermue de Palaemon serratus, le taux d'incorporation de L-Leu <sup>3</sup>H est soumis à des variations. C'est pourquoi il convient de bien choisir un stade particulier lorsque l'on veut faire une étude comparative avec ce test *in vivo* (Favrel 1988).

Les facteurs endocrines étudiés doivent avoir des activités biologiques autres que leur rôle trophique sur l'hépatopancréas, notamment des actions en relation avec la digestion (Turrigiano G.G 1989, Van Worhmodt *et al* 1989, Favrel *et al* 1991). l'étude de ces activités sera grandement facilitée quand des quantités importantes de peptides purs seront disponibles.

## CONCLUSION GENERALE

Les peptides immunologiquement apparentés aux G/CCK de vertébrés, chez deux espèces de crustacés décapodes Palaemon serratus et Nephrops norvegicus, ont été partiellement purifiés, par tamisage moléculaire puis chromatographie liquide haute performance en phase inverse. Leur détection s'est faite à l'aide d'antiséras spécifiques de peptides biologiquement actifs de vertébrés.

Ces méthodes basées sur l'immunoréactivité croisée entre antigènes de vertébrés et d'invertébrés sont facile d'utilisation et leur exécution est rapide. Toutefois elles présentent quelques inconvénients. La spécificité de l'antisérum doit être suffisamment restreinte, pour permettre de détecter le ou les peptides immunologiquement apparentés, mais elle doit être relativement grande afin que toutes les molécules présentes dans l'extrait étudié ne soient pas immunoréactives (bruit de fond trop important).

Un dosage radioimmunologique homologue permettrait d'éviter ces problèmes de spécificité, les "pertes" de peptide seraient alors diminuées et les rendements de purification pourraient être améliorés. De plus une évaluation quantitative des composés étudiés pourrait être faite, ce qui est impossible en dosage hétérologue (uniquement approximation par défaut). L'élaboration d'un anticorps polyclonal, ayant comme épitope le composant D synthétique (Ser-Glu-Gly - Gly-Gln-Asp-Ile-Trp-Leu ) obtenu par séquençage de fractions purifiées à partir de Nephrops norvegicus (Favrel *et al* 1991), est en cours.

L'immunochimie est donc une méthode de choix pour étudier les relations évolutives qui lient les facteurs endocrines, en permettant de suivre la purification de ces substances et ainsi d'accéder à leur structure primaire.

La détermination d'un éventuel rôle trophique, des fractions partiellement purifiées, sur l'hépatopancréas constitue le deuxième problème de ce travail.

En se basant sur de précédentes expérimentations (Favrel 1988), l'activité biologique des peptides de Nephrops norvegicus, immunologiquement apparentés aux G/CCK de vertébrés, a été évaluée en les injectant dans la cavité générale de Palaemon serratus et, en mesurant les variations d'incorporation de Leucine tritiée dans l'hépatopancréas.

Certaines fractions partiellement purifiées ont une action positive sur la synthèse protéique car on observe une nette incorporation de Leucine tritiée dans les protéines cytosolubles de l'hépatopancréas. D'autre part, leur injection, à des doses proche des doses physiologiques, entraîne une stimulation de la synthèse protéique relativement identique à celle observée pour des doses extraphysiologiques de G 17 I (peptide synthétique de vertébré).

L'appartenance de ces fractions à la famille des G/CCK devra cependant être vérifiée, par exemple en couplant leur injection avec de la proglumide.

L'obtention de G/CCK purs de crustacés permettra non seulement d'éprouver ces résultats mais elle rendra aussi possible l'analyse des nombreuses actions des G/CCK sur le métabolisme. Une étude complète, comparative et évolutive avec leurs analogues de vertébrés, pourra alors être menée.



- ANASTASI, A., ESPARMER, V. and ENDEAN, R. (1968). Isolation and amino-acid sequence of caerulein, the active decapeptide of the skin of *Hyla caerulea*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 57-68.
- ANASTASI, A., BERTANICINI, G., C.E.I., J.M., DECARO, G., ERSPAMER, V. and IMPICCIATORE, M. (1969). Structure and pharmacological actions of phyllocaerulein, a caerulein-like nonapeptide. *Br. J. Pharmacol.*, **37**, 198-206.
- BARBAZ, B.S., AUTRY, L., AMBROSE, F.G., GERBER, R., LIEBMAN, J.M. (1985). Antagonism of cholecystokinin by naloxone and proglumide in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **448**, 573-574.
- BUNNEY, B.S., CHIODO, L.A., FREEMAN, A.S. (1985). Further studies on the specificities of proglumide as a selective cholecystokinin antagonist in the central nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **448**, 345-350.
- DELLA-FERRA, M.A., BAILE, C.A. (1980). CCK octapeptide injected in CSF decreases meal size and daily food intake in sheep. *Peptides*, **1**, 51-54.
- DOCKRAY, G.J. (1976). Immunochemical evidence of cholecystokinin-like peptides in brain. *Nature*, **264**, 568-570.
- DOCKRAY, G.J., DUVE, H. and THORPE, A. (1981). Immunochemical characterization of gastrin/cholecystokinin-like peptides in the brain of the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Gen. Comp. endocrinol.*, **45**, 491-496.
- DRACH, P.P. et TCHERNIGOVTZEFF, C. (1967). Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie et Milieu*, **18**, 595-617.
- FAVREL, P.A. (1988). Purification et caractérisation de peptides immunologiquement apparentés aux gastrines/cholecystokinines chez quelques crustacés décapodes: recherche d'un rôle biologique. *Thèse de l'université de Rennes*.
- FAVREL, P., KEGEL, G., SEDLENEIR, D., KELLER, R., VAN WORMHOUDT, A. (1991). Structure and biological activity of crustacean gastrointestinal peptides identified with antibodies to gastrin/cholecystokinin. *Biochimie (in press)*.
- FRITSCH, H.A.R., VAN NORDEN, S. and PEARSE, A.G.E. (1982). Gastrointestinal and neurohormonal peptides in the alimentary tract and cerebral complex of *Ciona intestinalis*: their relevance to the evolution of the diffuse neuroendocrine system. *Cell tissue Res.*, **223**, 369-402.
- GOLTERMANN, N.R., REHFELD, J.F. and ROIGAARD-PETERSEN, H. (1980). In vivo biosynthesis of cholecystokinin in rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6181-6185.
- HAHNE, W.F., JENSEN, R.T., LEMP, G.F., GARDENER, J.D. (1981). Proglumide and benzotript: members of a different class of CCK receptor antagonists. *P.N.A.S.*, **8**, 6304-6308.
- JOHNSON, L.R. (1981). Effect of gastrointestinal hormones on pancreatic growth. *Cancer*, **47**, 1640-1645.
- KUWAHARA, A., KAZUNORI, O., YANAIHARA, N. (1986). Effects of cholecystokinin-octapeptide on gastric mobility of anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.*, **251**, 678-681.
- LARSON, B.A. and VIGNA, S.R. (1983). Gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive peptides in the Dungeness crab *Cancer magister*. Immunochemical and biological characterization. *Regul. peptides*, **7**, 155-170.

- LE ROITH, D., SHILOACH, J., ROTH, J. and LESNIAK, H. (1980). Evolutionary origins of vertebrates hormones: substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eucaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6184-6188.
- LE ROITH, D., SHILOACH, J., ROTH, J. and LESNIAK, M. (1981). Insulin or a closely related molecule is native to *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **256**, 533-6536.
- LOTTI, V.J., CHANG, R.S.L., KLING, P.J., CERINO, D.J. (1986). Evidence that cholecystokinin-octapeptide acts as potent, full agonist on gastrin receptors for acid secretion in the isolated mouse stomach: lack of antagonism by the specific CCK antagonist aspercilin.
- LOWRY, O.M., ROSENBROUGH, N., FARR, A. and RANDALL, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-275.
- REHFELD, J.F. and UVNAS-WALLENSTEIN, K. (1978). Gastrin heterogeneity in cat and dog: evidence for a biosynthetic relationship between the large molecular forms of gastrin and heptadecapeptide gastrin. *J. Physiol.*, **283**, 379-396.
- REHFELD, J.F. (1981). Four basic characteristics of the gastrin-cholecystokinin system. *Amer. J. Physiol.*, **240**, 255-266.
- REHFELD, J.F. (1984). Neuronal cholecystokinin: one or multiple transmitters. *J. Neurochemistry*, **1-8**.
- RZASA, P., KALOUSTIAN, K.V and PROKOP, E.K. (1982). Immunochemical evidence for a gastrin-like peptide in the intestinal tissues of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. physiol.*, **71A**, 637-644.
- STRAUSS, E., YALOW, R.S and GAINER, H. (1975). Molluscan gastrin: concentration and molecular forms. *Science*, **190**, 687-689.
- TRACY, H.J. and GREGORY, R.A. (1964). Physiological properties of a series of synthetic peptides structurally related to gastrin. I. *Nature*, **204**, 395-398.
- TURRIGIANO, G.G. (1989). Modulatory control of a crustacean central pattern generator by a cholecystokinin-like peptide. *Thèse de l'université de Californie, San Diego*.
- VANDERHAEGEN, J.J, SIGNEAU, J.C and GEPS, W. (1975). New peptide in the vertebrate C.N.S reacting with antigastrin antibodies. *Histochemistry*, **62**, 61-68.
- VAN WORMHOUDT, A. (1980). Adaptation des activités digestives, de leur cycle et de leur contrôle, aux facteurs du milieu chez *Palaemon serratus* (Crustacea, Natantia). *Thèse d'état, Université de Marseille II*, 351p.
- VAN WORMHOUDT, A., FAVREL, P., GUILLAUME, J. (1989). Gastrin/cholecystokinin like post-pandrial variations: quantitative and qualitative changes in the haemolymph of penaeids. *J. Comp. physiol.*, **152**, 269-273.