

PURIFICATION DE PEPTIDES APPARENTES A LA CALCITONINE DE SAUMON CHEZ LES CRUSTACES - RESULTATS PRELIMINAIRES.

A. VAN WORMHOUDT⁽¹⁾

RESUME - Des peptides réagissant avec un anticorps anti-calcitonine de saumon ont été mis en évidence par immunocytochimie dans le pédoncule oculaire et par radioimmunoessai dans l'hémolymphe et le tube digestif.

2 types de molécules ont été purifiées : des molécules de masse moléculaire comprises entre 3 et 5 kDa et des molécules de masse moléculaire 22 kDa pouvant correspondre à des précurseurs. Leur caractérisation est en cours.

Mots clés . peptides hormonaux, calcitonine, crustacés.

ABSTRACT - In Crustacean, immunoreactive peptides were detected with salmon-calcitonin antibodies by immunocytochemistry in its eyestalks and by radioimmunoassay in the haemolymph and the digestive tract.

Two different molecules were purified : the first with their molecular weight comprised between 3-5 kDa, the second having a molecular weight of 22 kDa which could correspond to a precursor of the first one. Their characterization is on progress.

Key-words . hormonal peptides, calcitonin, crustaceans.

L'utilisation de sondes immunologiques a permis, ces dernières années, la mise en évidence de nombreux peptides apparentés aux hormones de vertébrés chez les invertébrés et plus particulièrement chez les Crustacés (Van-Deynen et al. , 1985). Nous nous sommes intéressés à la calcitonine-like étant donné l'importance du métabolisme du calcium chez les Crustacés. Chez les vertébrés la calcitonine est un petit peptide de 3500 Da, purifié initialement à partir de glandes thyroïdes de rat en 1963 (Coop, 1979), puis chez les poissons à partir de glandes ultimobranchiales. Son action principale chez les vertébrés supérieurs est hypocalcémiant mais elle peut agir également sur les sécrétions du tube digestif (Holz et al. , 1973 ; Drack et al. , 1976). Chez le poisson son rôle est moins certain. Son existence a été démontrée dans le tube digestif de la Cione (Fritsch et al. , 1980).

1. LOCALISATION IMMUNOCYTOCHIMIQUE CHEZ LES CRUSTACES

Dès 1984, en collaboration avec C. Bellon et F. Van-Herp des molécules apparentées à la calcitonine de saumon ont été mises en évidence dans les cellules neurosecrétrices du pédoncule oculaire et la glande du sinus de Palaemon serratus . Ces résultats ont été confirmés par la suite chez Homarus americanus (voir photo) avec le même anticorps spécifique de la calcitonine de saumon, et ne reconnaît pas la partie N-terminal commune à toutes les calcitonines, situées au niveau du site actif de la molécule.

(1) Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France, 29110 CONCARNEAU, France.

Planche

Localisation immunocytochimique des cellules apparentées à la calcitonine de saumon chez Palaemon serratus (A-B-C) et Homarus americanus (D.E.F.).

L'anticorps contre la calcitonine de saumon est dilué au 1/500.

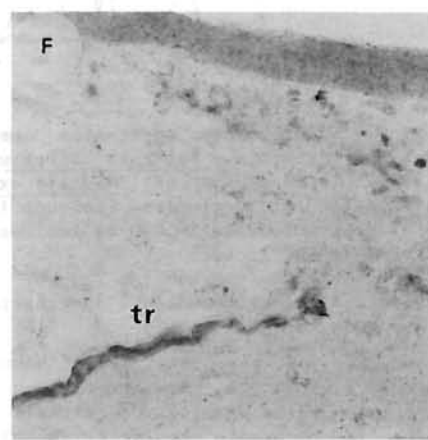
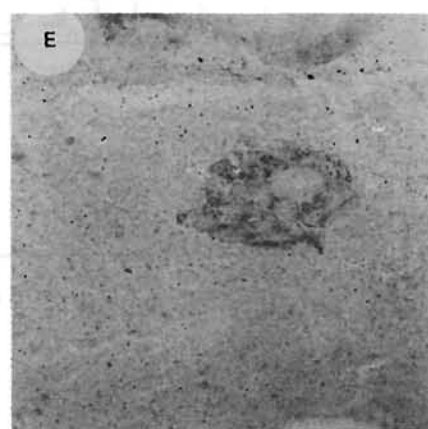
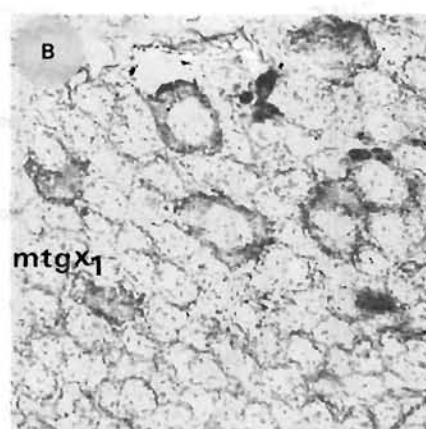
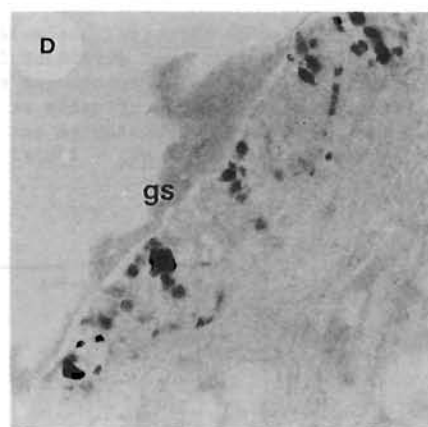
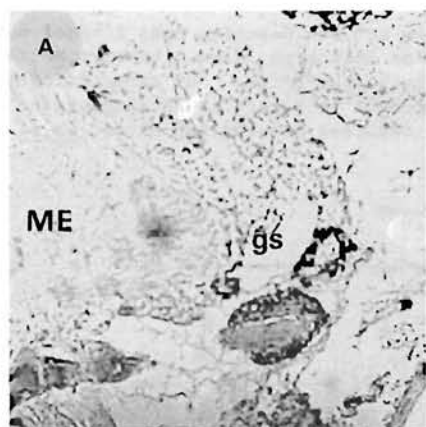
A - partie supérieure de la glande du sinus (G.S) immunoréactive contre la Medulla externa (M.E).

B - quelques cellules de la Medulla terminalis (organe XI)

C - cellules de la Medulla externa

D - quelques axones terminaux disséminés dans toute la glande du sinus.

E - F - Cellules et son tractus localisés dans la Medulla terminalis: notez la longueur du tractus qui rejoint la glande du sinus.



2. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE

Chez Palaemon serratus les molécules ont été mesurées dans l'hémolymphe par radioimmunoessai en utilisant le même anticorps, dans l'hémolymphe en collaboration avec Arlot-Bonnemains et Fouchereau-Péron. Leur caractérisation a été poursuivie chez la crevette et également le homard et la langoustine où des quantités très importantes ont été mesurées (Fouchereau-Péron et al. , 1985 , Van-Wormhoudt et al. , 1987).

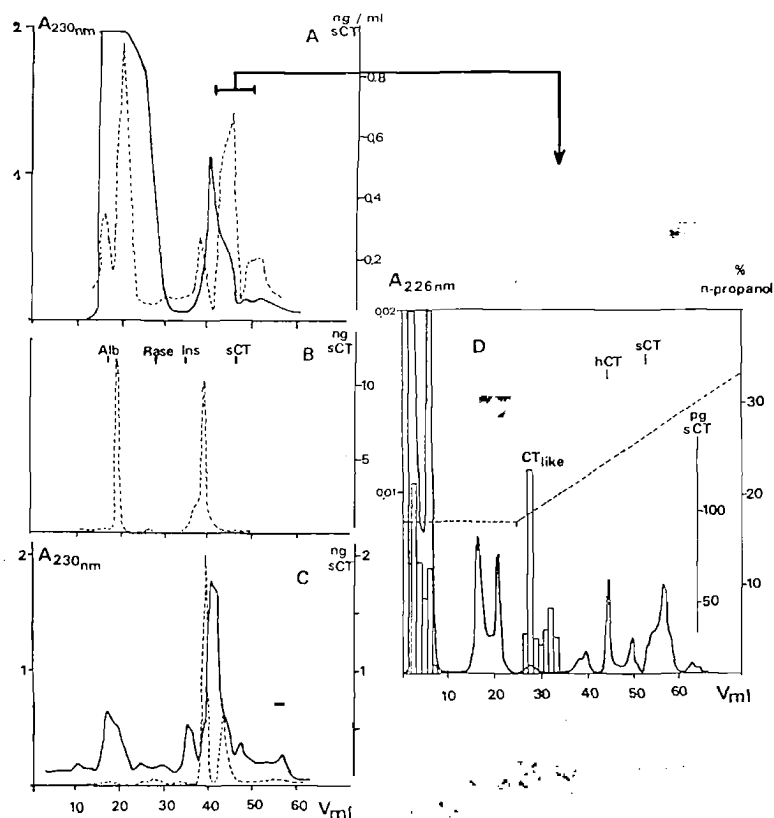


Fig. 1 : Peptides apparentés immunologiquement à la calcitonine de saumon chez la crevette Palaemon serratus - Filtration : A) G 50 SF hémolymphe : 0,5 ml ; B) G 50 SF Medulla externa : 50 glandes ; C) G 50 SF Medulla terminalis : 50 glandes. (colonne 140 x 7 cm : acétate MH, 10 mM pH 8.6) ; D) HPLC molécules 3-5000 Da isolées par filtration de l'hémolymphe. (Colonne ultraspère ODS Beckman).
hCT : Calcitonine humaine ; sCT = calcitonine de saumon ; Alb = albumine bovine ; Rase = Ribonucléase pancréatique ; Ins : insuline.

Chez P. serratus , dans l'hémolymphe, séparée sur G 50 SF des molécules de 3 à 5000 Da coexistent avec des molécules plus grosses traduisant une certaine hétérogénéité. On retrouve les molécules de petite masse moléculaire dans le pédoncule oculaire au niveau de la Medulla terminalis et de la Medulla externa (Fig. 1 A-B-C). C'est cependant dans l'hépatopancréas que

les quantités les plus importantes ont été mesurées (130 ± 40 ng/g PF). Par HPLC, en phase reverse (ODS), les petites molécules de l'hépatopancréas sont éluées par 18 % de n-propanol, à un niveau différent de la calcitonine de saumon traduisant une moins grande hydrophobicité et des différences de structure (Fig. 1D).

Chez *Homarus americanus* des quantités de 3,9 ± 1,5 µg/g PF ont été mesurées dans le pédoncule oculaire. Cependant, une filtration d'extraits acide acétique 0,1 M montre que 90 % des molécules sont de grosses molécules de taille voisine de 20 kDa (Fig. 2A). Par HPLC des molécules migrant au même niveau que la calcitonine de crevette ont été retrouvées en quantités très faibles et correspondent sans doute aux petites molécules (Fig. 2B).

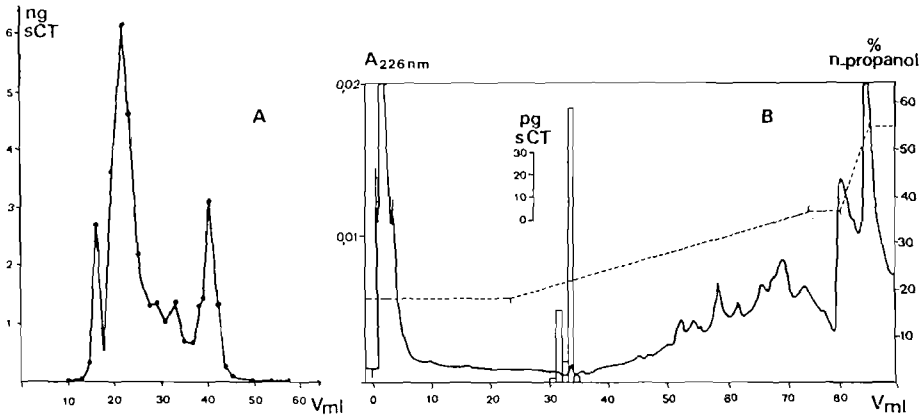


Fig. 2 : Peptides apparentés immunologiquement à la calcitonine de saumon chez le Homard. A) filtration sur colonne G 50 SF d'un extrait de pédoncule oculaire (1 g. PF) ; B) HPLC d'un extrait de glande du sinus repris dans du n-propanol 16 %, centrifugé puis passé sur colonne ODS (Beckman). Les valeurs de CT correspondent à 1 équivalent de glande du sinus.

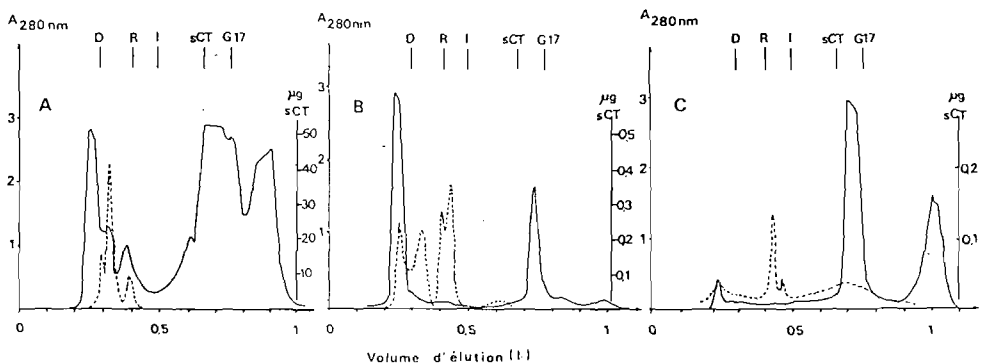


Fig. 3 : Peptides apparentés immunologiquement à la calcitonine de saumon chez la langoustine. Filtration - A) G 50 F Hépatopancréas (23 g) ; B) G 50 F hémolymphe (50 ml équivalent) ; C) G 50 F estomac (10 g) (colonne 140 x 2,5 cm acétate NH₄ 10 mM, pH 8.6) : D) Desoxyribonucléase ; R = ribonucléase ; I = Insuline ; sCT = calcitonine de saumon ; G 17 = gastrine 17.

Chez Nephrops norvegicus (Fig. 3), des quantités importantes sont extraites en milieu acide acétique 0.1 M et correspondent essentiellement à de grosses molécules dans les différents tissus étudiés, hémolymphe (1 ug/ml), hépatopancréas (44,6 +- 10,7 ug/g PF) et estomac (4,5 +- 2,1 ug/g PF).

Dans le cas de l'hépatopancréas et de l'hémolymphe, les molécules de masse moléculaire comprises entre 22 et 24 kDa, ont été purifiées et caractérisées par leur composition en acides aminés (Van Wormhoudt et Fouchereau-Péron, 1987). Un anticorps a pu être obtenu qui permettra peut être de mieux déterminer l'origine de ces molécules.

DISCUSSION

La nature hormonale de certaines molécules apparentées à la calcitonine est mise en évidence dans le cas des molécules de petite masse moléculaire localisées dans les cellules neurosecrétrices du pédoncule oculaire. Ces petites molécules extraites à partir d'un extrait HCl de langoustine (Fouchereau-Péron et al ., 1987) réagissent compétitivement au niveau des membranes de foie de rat avec la calcitonine de saumon.

La nature hormonale des grosses molécules (22-24 kDa), isolées à partir du tube digestif de langoustine, en milieu acide acétique 0.1 M, reste à préciser même si des molécules identiques sont retrouvées dans l'hémolymphe. Dans ce cas, en effet, en tenant compte des résultats de la composition en acides aminés il faudrait admettre des concentrations circulantes d'hormone-like de 50 ug/ml jamais trouvées chez les vertébrés, même si, dans le cas de malades atteints de tumeurs épidermo-bronchique, le taux de calcitonine augmente fortement et en particulier celui des grosses molécules de prohormone de 12 à 25 kDa. Chez les crustacés, l'hypothèse d'une prohormone circulante peut être faite dans la mesure où des expériences réalisées au laboratoire par Y. Arlot-Bonnemains montrent que la précipitation par un anticorps contre la calcitonine de saumon des produits de la traduction in vitro des ARNm extraits de l'oesophage de langoustine donne essentiellement des molécules de 24 kDa. L'hypothèse de l'autoaggrégation de petites molécules où de leur liaison à des grosses molécules de transport peut être écartée ; aucune dissociation n'étant possible par électrophorèse SDS.

-
- ARLOT-BONNEMAINS Y., VAN-WORMHOUDT A., FAVREL P. et M. FOUCHEREAU-PERON, 1986. Calcitonin-like peptide in the shrimp *Palaemon serratus*, during the intermolt cycle. *Experientia*, 42, 419-420.
- ARLOT-BONNEMAINS Y., PERON M., FAVREL P. et A. VAN-WORMHOUDT, 1985. Caractérisation d'un peptide apparenté à la calcitonine chez *Palaemon serratus* : Variation au cours du cycle de mue et analyse chromatographique. *Cah. Biol. Marine*. (sous presse).
- BELLON C., VAN-HERP F. et A. VAN-WORMHOUDT, 1984. Localisation immunocytochimique de neuropeptides et d'amines biogènes dans le pédoncule oculaire de la crevette *Palaemon serratus*. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 114, suppl. 1, P. 164.
- COOP D.H., 1979. Calcitonin comparative endocrinology in *Endocrinology* V. 2 ed. L. de Groet Grune et Stratton Inc. N.Y., 130 p. 637-651.
- DRACH G.I., KOELZ H.R. and A.L. BLUM, 1976. Human calcitonin stimulates salivary amylase output in man. *Gut*, 7, 620-623.

- FOUCHEREAU-PERON M., ARLOT-BONNEMAINS T., MILHAUD G. et M.S. MOUKHTAR, 1987. Immunoreactive salmon calcitonin-like molecule in Crustacean : high concentrations in *Nephrops norvegicus*. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, 65, 179-183.
- FRITSCH M.A.R., VAN NOORDEN S. and A.G.E. PEARSE, 1980. Calcitonin-like immunochemical staining in the alimentary tract of *Ciona intestinalis* : *Cell & Tissue Res.* 205, 439-444.
- HOLZ J., MINNE H. and R. ZIEGLER, 1973. The influences of acute hyper and hypocalcemia and of calcitonin on exocrine pancreatic function in man. *Research in Exp. Med.*, 160, 152-165.
- VAN-DEYNEN J.-E., VEK F. and P. VAN-HERP, 1985. An immunocytochemical study of the optic ganglia of the crayfish *Astacus leptodactylus* with antisera against biologically active peptides of vertebrates and invertebrates. *Cell. Tissue Res.*, 240, 175-183.
- VAN-WORMHOUDT A. et M. FOUCHEREAU-PERON, 1987. Partial characterization and amino acid composition of a high molecular weight peptide with salmon calcitonin immunoreactivity in a crustacean. *Nephrops norvegicus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 148 (1) 463-470.

Ce travail a bénéficié d'une subvention CNRS CR L 72