

**Biochimie / Immunohistochimie**

**MISE EN ÉVIDENCE D'UNE MOLÉCULE APPARENTÉE  
AUX GRANULINES CHEZ UN INVERTÉBRÉ MARIN,  
*HEDISTE DIVERSICOLOR***

par

Laurence DELOFFRE<sup>1</sup>, Pierre-Éric SAUTIÈRE<sup>1</sup>, Pierre SAUTIÈRE<sup>2</sup>,

Claude COCQUERELLE<sup>1</sup> et Jean-Claude ANDRIES<sup>1</sup>

Les granulines constituent une famille peptidique caractérisée à la fois par la présence d'un motif conservé de 12 cystéines et par leur masse moléculaire de l'ordre de 6 kDa. Elles joueraient un rôle de régulateurs autocrines et paracrines de la prolifération des cellules épithéliales mammaliennes.

Nous avons isolé, chez un Annelide polychète, *Hediste diversicolor*, une molécule apparentée aux granulines mammaliennes et présentant une activité myotrope. De masse comparable à celle des granulines de Vertébrés, la molécule présente une séquence N-terminale homologue à 75% à la granuline B de cobaye. Sa localisation dans des cellules tégumentaires et nerveuses a été mise en évidence par voie immunohistochimique à l'aide d'un anticorps anti-granuline d'*Hediste*.

**Identification of granuline-related peptide  
in a marine invertebrate, *Hediste diversicolor***

Granulins are peptides with a molecular weight of approximately 6 kDa, characterized by a highly conserved pattern of 12 cysteines, which have been implicated as autocrine and paracrine regulators of mammalian epithelial cells proliferation. This study reports the isolation and tissue distribution (epithelial and nerve cells) of a granulin-related peptide from an annelid, *Hediste diversicolor*. This molecule present a myotropic activity and the N-terminal amino acid sequence exhibits 75% similarity with guinea pig granulin B.

### Introduction

Les granulines ont été purifiées pour la première fois chez l'homme à partir d'exsudats inflammatoires et chez le rat à partir de moelle osseuse (BATEMAN *et al.*, 1990). Quatre granulines, dénommées A, B, C et D, ont été ainsi isolées. Parallèlement, deux facteurs de croissance, les épithélines 1 et 2, ont été caractérisées à partir de rein de rat (SHOYAB *et al.*, 1990). La comparaison des séquences peptidiques a permis de conclure à l'identité, à un acide aminé près, de la granuline A et de l'épithéline 1, la granuline B étant apparentée à l'épithéline 2. Par la suite, diverses granulines ont été identifiées dans plusieurs types cellulaires de différents modèles : neutrophiles de cheval (e-NAP1) (COUTO *et al.*, 1992), cellules céphaliques de criquet (NAKAKURA *et al.*, 1992), tissus hématopoïétiques de carpe (BELCOURT *et al.*, 1993 ; 1995), cellules intestinales de poisson rouge (UESAKA *et al.*, 1995).

Chez divers mammifères (rat, souris, cobaye, homme), la séquence du précurseur a été déduite de l'ADN<sub>c</sub> (BHANDARI *et al.*, 1992 ; PLOWMAN *et al.*, 1992). Celui-ci comporte un même motif répété sept fois et demie. Le précurseur humain renferme sept granulines parmi lesquelles quatre correspondent à celles isolées par BATEMAN *et al.* en 1990. À celles-ci s'ajoutent les granulines E, F et G. À ce jour, seule la granuline F a été isolée biochimiquement (SPARRO *et al.*, 1997). L'organisation du précurseur, par ses motifs en tandem de cystéines, rappelle celle des facteurs de croissance épithéliaux (EGF), ce qui pourrait expliquer certaines similitudes dans leur structure tertiaire et leur activité biologique.

*In vitro*, les effets des différentes granulines sur la croissance cellulaire apparaissent spécifiques, voire opposés suivant la molécule et le tissu concernés. Ainsi, la granuline A/Épithéline 1 stimule la prolifération des kératinocytes murins alors que la granuline B/Épithéline 2 l'inhibe. Les deux molécules, par contre, inhibent la croissance des cellules d'un carcinome épidermique humain (A431) (SHOYAB *et al.*, 1990) ainsi que celle d'une lignée de cellules cancéreuses de sein humain (MDA-MB-468) (CULOUSCOU *et al.*, 1993). D'autres rôles ont été évoqués : une granuline du poisson rouge supprime les contractions spontanées des muscles circulaires de l'œsophage (UESAKA *et al.*, 1995) alors que le peptide e-NAP1 des neutrophiles équins possède une activité antibactérienne (COUTO *et al.*, 1992).

De façon plus surprenante, diverses fonctions sont également assurées par le précurseur. Ainsi, une glycoprotéine de 88kDa synthétisée dans la lignée cellulaire murine PC, précurseur potentiel de granulines, stimule la croissance des cellules PC et 3T3 (ZHOU *et al.*, 1993). L'acrogranine, une glycoprotéine du compartiment acrosomien des spermatozoïdes (ANAKWE et GERTON, 1990), subit une protéolyse partielle au cours de la spermiogenèse, lors de la migration des spermatozoïdes dans l'épididyme (BABA *et al.*, 1993). La fonction des fragments peptidiques reste cependant inconnue.

Le gène de la granuline s'exprime dans la plupart des types cellulaires de mammifères et plus particulièrement dans les cellules épithéliales (BHANDARI *et al.*, 1993), cellules sur lesquelles les granulines exercent leurs effets, ce qui laisse entrevoir un rôle autocrine.

## Molécule apparentée aux granulines

Notre travail concerne la caractérisation d'une molécule apparentée à la granuline mammalienne chez un Annelide Polychète, *Hediste diversicolor* et ce grâce à un test d'activité myotrope. Par ailleurs, grâce à la réalisation d'un anticorps dirigé contre cette molécule, nous avons été à même de localiser plusieurs de ses sites de synthèse.

## Matériel et méthodes

### Matériel biologique

Les animaux ont été récoltés dans l'estuaire de l'Aa (Petit-Fort-Philippe, Nord) et maintenus au laboratoire dans de l'eau de mer à 12°C. En vue de la purification biochimique de molécules à activité myotrope, les prostomiums ont été prélevés et conservés dans de l'azote liquide jusqu'à utilisation.

### Purification

5000 prostomiums ont été réduits en poudre au mortier dans de l'azote liquide. La poudre est ensuite traitée par de l'acide acétique (1%) bouillant pendant 10 min. puis homogénéisée au potter à 4°C. Après centrifugation (12000 g, 30 min., 4°C), le culot a été réextrait à l'acide acétique 1M à 4°C pendant une heure. Les surnageants ont été pré-purifiés sur cartouches Sep-Pak C<sub>18</sub> montées en série de trois conditionnées selon les instructions du fournisseur. Après lavage à l'acide acétique 1%, l'élution a été réalisée par 10 ml d'acétonitrile 50% contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Les éluats ont été concentrés au 1/3 par évaporation au SpeedVac Concentrator SVC 200H (Savant).

Une première chromatographie a été réalisée sur une colonne C<sub>18</sub> de phase inverse (4,6 x 250 mm ; Delta Pak, Waters) équilibrée par une solution d'acide trifluoroacétique à 0,1%. L'élution a été réalisée selon un gradient linéaire d'acétonitrile (0-60%) dans le TFA 0,1% à un débit de 1mL/min, l'effluent étant contrôlé simultanément grâce à une lecture d'absorbance à 214 et 280 nm. La présence de molécules à effet biologique a été recherchée dans des aliquotes de chaque fraction par un test d'activité myotrope, après évaporation à sec et reprise dans de l'eau. Les fractions actives ont été purifiées sur une colonne C<sub>18</sub> RP100 (4 x 125mm ; Merck) en utilisant des gradients linéaires d'acétonitrile dans le TFA 0,1% (Tableau 1). Toutes les purifications par HPLC ont été réalisées sur un système HPLC Gold Beckman équipé d'une barrette de diode (Beckman 168).

**Tableau 1**

Purification d'une molécule apparentée aux granulines dans les prostomiums de *Hediste diversicolor*.

|                            | Colonne                                   | Gradient d'acétonitrile (%) |
|----------------------------|---|-----------------------------|
| Prépurification            | Waters Sep-Pak C <sub>18</sub>            | 50                          |
| 1ère étape de purification | Delta Pak C <sub>18</sub> , 4,6 x 250 mm  | 0-60 (60 min)               |
| 2ème étape de purification | Merck C <sub>18</sub> , RP100, 4 x 125 mm | 0-45 (45 min)               |
| 3ème étape de purification | Merck C <sub>18</sub> , RP100, 4 x 125 mm | 5-35 (60 min)               |

**Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)****Test d'activité myotrope**

Les fractions ont été testées sur la trompe d'*Hediste diversicolor* maintenue en survie dans de l'eau de mer et fixée à un capteur de déplacement FT03 (Grass). L'acquisition des données se fait par une interface Bio 1000 (Nortek).

**Dosage en acides aminés**

La fraction peptidique a été hydrolysée dans de l'HCl 6M en présence de phénol pour éviter une dégradation importante de la tyrosine, en tubes scellés sous vide pendant 24 h à 110°C. Les hydrolysats ont ensuite été analysés sur l'analyseur d'acides aminés Beckman 6300.

**Microséquençage**

La dégradation automatique d'Edman de la molécule purifiée a été réalisée sur un microséquenceur de type 470A Applied Biosystems. La séparation et la détection des dérivés phenylthiohydantoïnes ont été effectuées sur un analyseur de PTH-amino-acides Applied Biosystems 120A.

**Antisérum**

Le protocole d'immunisation employé est celui décrit par VAITUKAITIS *et al.* en 1971. Un peptide de synthèse de 12 résidus, déterminé d'après la séquence N-terminale de la granuline annélide (les résidus de cystéine ayant été remplacés par des résidus de sérine) a été couplé à l'ovalbumine par l'intermédiaire de la Bis DiazoBenzidine (Neosystem). Un immunosérum polyclonal anti-granuline a ainsi été produit chez le lapin et sa spécificité a été testée par Dot Immunobinding Assay (SALZET *et al.*, 1993).

**Microscopie photonique**

Des parties antérieures comprenant le prostomium et les premiers métamères d'*Hediste diversicolor* ont été fixées dans du liquide de Bouin Hollande sublimé. L'incubation a été réalisée avec l'anticorps primaire dilué au 1/200<sup>ème</sup> puis avec un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase (Diagnostic Pasteur). La spécificité de l'antisérum a été vérifiée sur des lames successives par l'utilisation de l'anticorps anti-granuline saturé par son antigène (1 mg d'antigène/ml de sérum pur, une nuit en agitation à 4°C).

**Immunoempreinte**

Des métamères d'*Hediste diversicolor* ont été homogénéisés dans une solution de Laemmli (P/10V) et déposés sur gel d'acrylamide (gradient constant 10-20%) en présence de Sodium Dodécyl Sulfate. La séparation a été réalisée à 20 mA. Après migration, les protéines ont été transférées sur membrane d'immobilon P à 0,8 mA/cm<sup>2</sup> en milieu semi-sec. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire au 1/1000<sup>ème</sup>. La révélation des molécules immunomarquées a été réalisée par chimiluminescence (ECL Amersham).

## Molécule apparentée aux granulines

### Résultats

#### Isolement d'une molécule à activité myotrope

La fraction peptidique extraite des prostomiums d'*Hediste* par l'acide acétique à 1% a été purifiée en chromatographie de phase inverse par passages successifs sur colonne C<sub>18</sub> Delta Pak (Fig. 1a) et sur colonne C<sub>18</sub> RP100 (Fig. 1b et 1c). Une fraction éluée à une concentration d'acétonitrile comprise entre 27 et 30% révèle une activité myotrope.

#### Caractérisation d'un peptide apparenté aux granulines

La masse apparente du peptide, déterminée par immunoempreinte, est d'environ 6kDa. Le dosage en acides aminés permet d'estimer que cette molécule correspondrait à un peptide d'environ 58 acides aminés (Tableau 2). La séquence partielle N-terminale, réalisée par dégradation automatique d'Edman correspond aux 29 premiers acides aminés et présente une identité de 75% avec la granuline B de cobaye et de 68% avec la granuline B humaine. Le motif cystéine caractéristique de la famille des granulines est maintenu ainsi que les triplets CPD plus spécifiques aux granulines B (Fig. 2).

#### Localisation du peptide apparenté aux granulines

Un antisérum dirigé contre la séquence N-terminale (12 résidus) a été produit et caractérisé par Dot Immunobinding Assay. L'antisérum reconnaît le peptide de synthèse et est saturable par l'antigène contre lequel il est produit. L'anticorps reconnaît différentes cellules des ganglions nerveux (Fig. 3.1) ainsi que certaines cellules épidermiques (Fig. 3.3). Toutefois, c'est au sein des lobes parapodiaux que le marquage est particulièrement démonstratif. De nombreuses cellules immunoréactives y sont regroupées envoyant de longs prolongements vers la surface épithéliale (Fig. 3.2).

### Discussion

Comme nous venons de le voir, la molécule isolée chez *Hediste diversicolor* ressemble par sa structure et sa masse moléculaire à une granuline de vertébrés. Les 29 acides aminés correspondent au début de la séquence consensus définie par BATEMAN et BENNET (1998) (Fig. 4).

Les granulines, peptides de 6kDa environ riches en cystéine, ont un motif définissant structurellement une famille protéique. La mise en évidence d'une granuline annélide conçoit l'idée selon laquelle le motif granuline est très ancien puisque existant chez les invertébrés, que ce soient les insectes (NAKAKURA *et al.*, 1992) ou les nématodes (BERKS, 1995), voire chez les végétaux (SCHAFFER *et al.*, 1988). Leurs fonctions semblent globalement préservées d'une espèce à l'autre : elles seraient impliquées dans la cicatrisation des plaies et le remodelage des tissus en agissant comme facteurs de croissance. L'activité antibactérienne de l'e-NAP1 des neutrophiles de cheval ainsi que la présence de granules dans les macrophages de carpes (BELCOURT *et al.*, 1995) laissent envisager un rôle dans les contrôles immunitaires qui serait complémentaire des fonctions régénératrices de ces molécules.

## Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

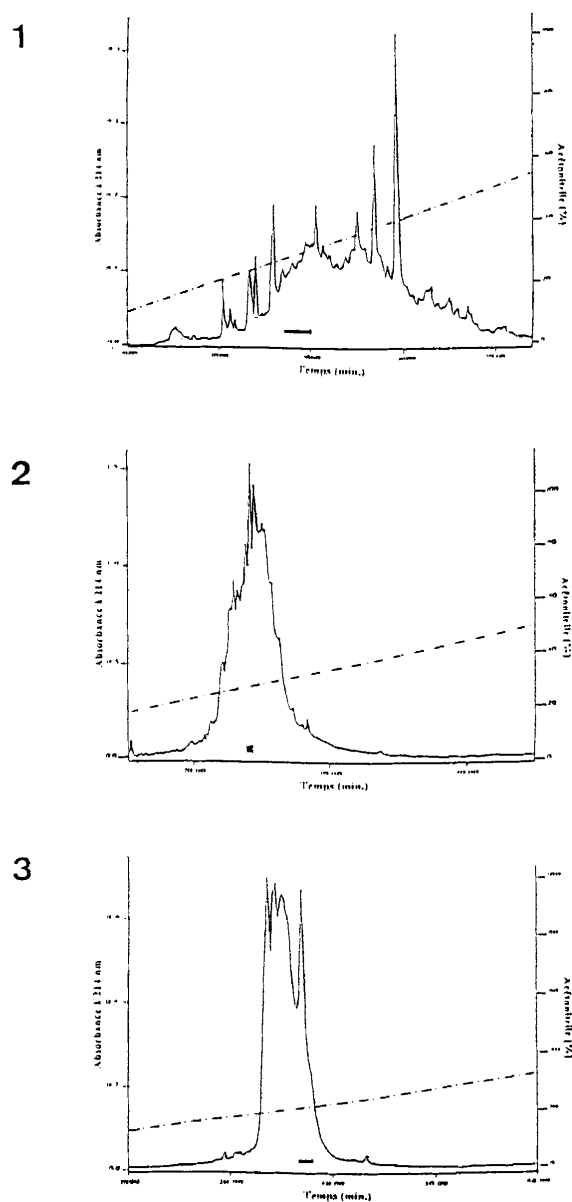


Figure 1

Séparation par HPLC sur colonne de phase inverse :

1.1 : Chromatographie sur colonne Delta Pak  $C_{18}$ . Après prépurification sur cartouche Sep Pak  $C_{18}$ , la fraction éluée par 50% d'acétonitrile est concentrée puis appliquée sur la colonne Delta Pak.

1.2 et 1.3 : Chromatographie sur colonne RP 100  $C_{18}$ . Les fractions biologiquement actives subissent deux étapes de séparation. Pourcentage d'augmentation d'acétonitrile : première étape : 1% par min. (1.2) ; seconde étape : 0,5% par min. (1.3).

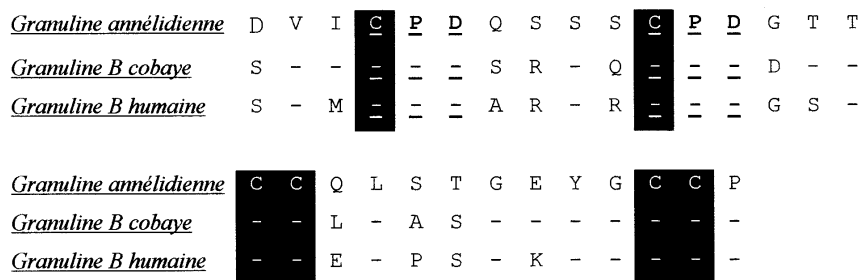
La barre noire sur les graphiques indique les fractions biologiquement actives.

### Molécule apparentée aux granulines

**Tableau 2**

Analyse en acides aminés de la granuline annélide.

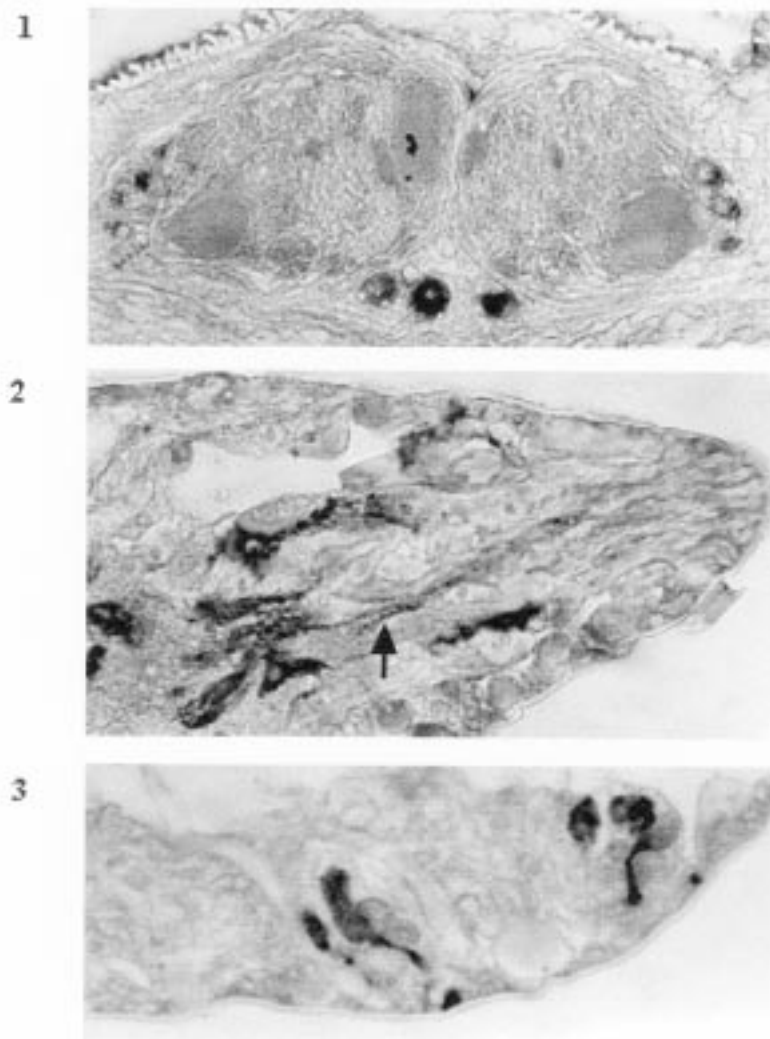
| Acide aminé                  | nMol en %     | nombre de résidus estimés |
|------------------------------|---------------|---------------------------|
| Acide aspartique/ Asparagine | 11,8          | 6                         |
| Acide glutamique/ Glutamine  | 13,7          | 7                         |
| Alanine                      | 6,8           | 3                         |
| Arginine                     | 2,8           | 1-2                       |
| Cystéine /2                  | 5,3           | >4                        |
| Glycine                      | 14,8          | 7                         |
| Histidine                    | 3,2           | 2                         |
| Isoleucine                   | 1,4           | 1                         |
| Leucine                      | 3,9           | 2                         |
| Lysine                       | 3,9           | 2                         |
| Méthionine                   | 1,3           | 1                         |
| Phénylalanine                | 1,5           | 1                         |
| Proline                      | 6,0           | 3                         |
| Sérine                       | 8,2           | 4                         |
| Thréonine                    | 6,7           | 4                         |
| Tryptophane                  | non déterminé | non déterminé             |
| Tyrosine                     | 3,3           | 2                         |
| Valine                       | 5,4           | 3                         |
| <b>TOTAL</b>                 | <b>100</b>    |                           |



**Figure 2**

Comparaison de séquence N-terminale de la granuline d'*Hediste diversicolor* avec celle de la granuline B de cobaye et de la granuline B humaine.

Les cystéines sont figurées sur fond noir ; le motif CPD caractéristique des granulines B est souligné.

**Figure 3**

- 3.1 Coupe transversale d'un ganglion de chaîne nerveuse. Plusieurs cellules immunoréactives entourent le neuropile. x 360  
3.2 Cellules immunoréactives au sein du lobe parapodial dorsal. La flèche souligne les prolongements cellulaires. x430  
3.3 Cellules épithéliales immunoréactives du lobe parapodial dorsal. x 430



### Molécule apparentée aux granulines

|                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |
|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|
| <i>Granuline néréidienne</i> | D | V | I | C | P | D | Q | S | S | S | C | P | D | G | T | T    |
| <u>Consensus</u>             | - | - | - | C | - | D | - | - | - | - | C | P | D | - | - | T    |
| <i>Granuline néréidienne</i> | C | C | Q | L | S | T | G | E | Y | G | C | C | P |   |   |      |
| <u>Consensus</u>             | C | C | - | - | - | - | G | - | - | G | C | C | P | - | - | .... |

**Figure 4**

Alignement de la séquence N-terminale de la granuline d'*Hediste* avec le début de la séquence consensus (Bateman et Bennett, 1998)

La granuline d'*Hediste* présente une activité myotrope activatrice sur la trompe. Cette activité diffère des rôles établis à ce jour pour les granulines et est même à l'inverse de celle observée chez le poisson rouge (UESAKA *et al.*, 1995).

Bien que le prostomium renferme essentiellement les ganglions cérébroïdes, nous n'avons aucune certitude quant à l'origine nerveuse de la molécule isolée, d'autant que les données immunohistochimiques démontrent que relativement peu de cellules nerveuses sont immunoréactives. Leur nombre est proportionnellement très faible par rapport au nombre total de cellules réagissant à l'anticorps.

Le fait que de nombreuses cellules tégumentaires soient immunoréactives concorde avec les données relatives aux granulines mammaliennes (BHANDARI *et al.*, 1993). Par ailleurs, la séquence de la molécule annélide est proche de celle de la granuline B/ Épithéline 2, laquelle agit en tant que facteur de croissance sur les cellules épithéliales. Des études de cicatrisation après amputation de parapodes sont en cours chez *Hediste* afin de tester cette éventuelle propriété.

1. Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, UPRES A 8017, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.
2. URA 1309 CNRS, Service Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex.

### RÉFÉRENCES

- ANAKWE, O. & GERTON, G. (1990).- Acrosome biosynthesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of the acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, **42**, 317-328.
- BABA, T., HOFF, H.B., NEMOTO, H., LEE, H., ORTH, J., ARAI, Y. & GERTON, G.L. (1993).- Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.*, **34**, 233-243.
- BATEMAN, A., BELCOURT, D., BENNETT, H., LAZURE, C. & SOLOMON, S. (1990).- Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **31**, 173, 1161-1168.

**Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)**

- BATEMAN, A. & BENNETT, H.P. (1998).- Granulin: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J. Endocrinol.*, **158**, 145-151.
- BELCOURT, D.R., LAZURE, C. & BENNETT, H.P. (1993).- Isolation and primary structure of the three major forms of granulin-like peptides from hematopoietic tissues of a teleost fish (*Cyprinus carpio*). *J. Biol. Chem.*, **5**, 268, 9230-9237.
- BELCOURT, D.R., OKAWARA, Y., FRYER, J.N. & BENNETT, H.P. (1995).- Immunocytochemical localization of granulin-1 to mononuclear phagocytic cells of the teleost fish *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*. *J. Leukoc. Biol.*, **57**, 94-100.
- BERKS, M. (1995).- The *C. elegans* genome sequencing project. *C. elegans* genome mapping and sequencing consortium. *Genome Research*, **5**, 99-104.
- BHANDARI, V., PALFREE, R.G. & BATEMAN, A. (1992).- Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1**, 89, 1715-1719.
- COUTO, M.A., HARWIG, S.S., CULLOR, J.S., HUGHES, J.P. & LEHRER, R.I. (1992).- Identification of eNAP-1, an antimicrobial peptide from equine neutrophils. *Infect. Immun.*, **60**, 3065-3071.
- CULOUSCOU, J.M., CARLTON, G.W. & SHOYAB, M. (1993).- Biochemical analysis of the epithelin receptor. *J. Biol. Chem.*, **15**, 268, 10458-10462.
- LAEMMLI, U.K. (1970).- Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- PLOWMAN, G.D., GREEN, J.M., NEUBAUER, M.G., BUCKLEY, S.D., MCDONALD, V.L., TODARO, G.J. & SHOYAB, M. (1992).- The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *J. Biol. Chem.*, **25**, 267, 13073-13078.
- NAKAKURA, N., HIETTER, H., VAN DORSSELAER, A. & LUU, B. (1992).- Isolation and structural determination of three peptides from the insect *Locusta migratoria*. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 147-153.
- SALZET, M., WATTEZ, C., SLOMIANNY, M.C., LEÜ, B. & SIEGERT, K.J. (1993).- Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdella leech, *Erpobdella octoculata*. *Eur. J. Biochem.*, **217**, 897-903.
- SCHAFFER, M.A. & FISCHER, R.L. (1988).- Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant physiol.*, **87**, 431-436.
- SHOYAB M., MCDONALD V.L., BYLES C., TODARO G.J. & PLOWMAN G.D. (1990).- Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7912-7916.
- SPARRO, G.M., GALDENZI, G., ELEUTERI, A.M., ANGELETTI, M., SCHROEDER, W. & FIORETTI, E. (1997).- Isolation and N-terminal sequence of multiple forms of granulins in human urine. *Prot. Exp. Purif.*, **10**, 169-174.
- UESAKA, T., YANO, K., YAMASAKI, M. & ANDO, M. (1995).- Somatostatin-, vasoactive intestinal peptide-, and granulin-like peptides isolated from intestinal extracts of goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **99**, 298-306.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, V. & ROSS, G.T. (1971).- A method for producing antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 988-991.
- ZHOU, J., GAO, G., CRABB, J.W. & SERRERO, G. (1993).- Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J. Biol. Chem.*, **25**, 268, 10863-10869.