

50376
1979
72

N° d'ordre : 449

50376
1979
72

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

MEMOIRE

présenté à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences Naturelles

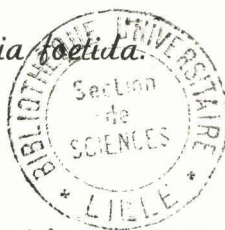
p a r

Claude CARDON

ETUDES BIOCHIMIQUES DE LA SEXUALISATION ET DE LA REGENERATION CHEZ LES ANNELIDES

I - Isolement des substances : inhibitrice (hormone cérébrale)
et régulatrice (feed-back) de la sexualisation chez deux annelides
polychetes : *Nereis diversicolor* et *Perinereis cultrifera*.

II - Isolement du facteur inhibiteur de la régénération chez
l'annelide oligochete *Eisenia foetida*.



Présenté le 29 mars

1979, devant la Commission d'examen

Professeur J. MONTREUIL, Université de Lille
Professeur M. DURCHON, Université de Lille
Professeur P. COHEN, Université de Paris
Professeur W. STREIFF, Université de Caen
Professeur G. SPIK, Université de Lille

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DÜEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mle LEGRAND Denise	Algèbre
Mle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

Mle SPIK Geneviève
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. WALLART Francis
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Informatique
Biologie
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Chimie
Algèbre

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de Chimie Biologique (Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217; Directeur : Professeur J.MONTREUIL), et dans le Laboratoire de Biologie Animale (Laboratoire associé au C.N.R.S. n°148; Directeur : Professeur M.DURCHON) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I.

Le sujet de cette thèse a fait l'objet d'un Diplôme d'Etudes Approfondies (Lille, 1968), d'une Thèse de 3° Cycle en Biochimie (Spécialité : Biologie Cellulaire) (Lille, 1970), de sept publications, de deux affiches, et a contribué à une revue générale.

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

- Recherche sur l'hormone cérébrale responsable de l'inhibition de la gamétogenèse et de l'épitoquie.
- Fractionnement des extraits de cerveaux de Néréidiens et localisation de l'activité biologique chez les Néréidiens.
- Résultats préliminaires de tentatives d'isolement de l'hormone.

THESE DE 3° CYCLE

Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de *Nereis diversicolor* O.F. Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation.

PUBLICATIONS

C. CARDON

Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de *Nereis diversicolor* O.F. Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation.

Bulletin de la Société Zoologique de France, Tome 95, n° 3, p. 543 (1970).

M. PORCHET et C. CARDON

Régulation de l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae* (Annélides Polychètes).

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 275 (20 nov. 1972), série D, p. 2375.

C. CARDON et M. PORCHET

Purification partielle d'une substance responsable de la rétroaction génitale sur l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae* (Annélides Polychètes).

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 277 (29 oct. 1973), série D, p. 1761.

M. PORCHET and C. CARDON

The inhibitory feed-back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in *Nereis* (polychaetes, annelids).

Gen. and Comp. Endoc., 30, 378-390 (1976) U.S.A.

R. MARCEL et C. CARDON

Essais de purification du facteur inhibiteur de la régénération céphalique chez *Eisenia foetida* Sav. f. *typica* (Annélide Oligochète).

C. R. Acad. Sc., 279 : 1545-1547 (1974).

C. CARDON et R. MARCEL

Démonstration de la nature peptidique du facteur inhibiteur de la régénération céphalique chez le Lombricien *Eisenia foetida* Sav. f. *typica* (Annélides Oligochètes).

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 282 (1976), série D, p. 657.

R. MARCEL et C. CARDON

Partial purification and characterization of the peptide which inhibits cephalic regeneration in *Eisenia foetida* Sav. (Oligochaeta, Annelida).

Comp. biochem. and physiol. (sous presse) (1979).

REVUE GENERALE

M. DURCHON

Les hormones chez les Vers et les Annélides.

Colloques internationaux C.N.R.S. n° 251

"Actualités sur les hormones d'Invertébrés (1975).

AFFICHES

Etude d'un mécanisme endocrine et de sa régulation par "feed-back" chez un Invertébré (*Nereis*, Annélide, Polychète, Ver marin).

C. CARDON et M. PORCHET

Le facteur inhibiteur de la régénération de la tête chez *Eisenia foetida* (Lombricidae).

R. MARCEL et C. CARDON

Journée Franco-belge de Biochimie

(Villeneuve-d'Ascq, juin 1976).

Centenaire de la Société de Zoologie Française

(Paris, 1977).

SOMMAIRE

INTRODUCTION

p.1

Première Partie

Isolement des substances : inhibitrice (hormone cérébrale) et régulatrice ("feed-back") de la sexualisation chez deux Annélides polychètes : *Nereis diversicolor* et *Perinereis cultrifera*

p.6

CHAPITRE I

Isolement de l'hormone cérébrale des néréidiens

p.7

I - Rappel du rôle du cerveau sur le soma et le germen

p.7

1° - Action sur le soma

p.7

2° - Action sur le germen

p.8

II - Extraction méthanolique et fractionnement sur résine échangeuses d'ions.

p.9

1° - Extraction méthanolique

p.9

2° - Premier fractionnement par chromatographie sur résine échangeuses d'ions.

p.11

3° - Deuxième fractionnement par chromatographie sur échangeurs d'ions de la fraction micromoléculaire.

p.13

4° - Conclusions

p.15

III - Extraction acétonique

p.15

1° - Matériel et méthode

p.15

2° - Essais biologiques

p.16

3° - Conclusion

p.16

IV - Extraction aqueuse, fractionnement par tamisage moléculaire et purification par chromatographie préparative

p.16

1° - Obtention d'une fraction micromoléculaire par dialyse

p.16

2° - Fractionnement par tamisage moléculaire

p.18

3° - Purification par chromatographie sur papier du pic 5 (P 5) et du pic 6 (P 6).

p.19

V - Choix de la méthode	p.24
VI - Essais de caractérisation de l'hormone cérébrale	p.24
1° - Stabilité à la chaleur	p.26
2° - Action des enzymes protéolytiques	p.26
3° - Conclusion	p.27
4° - Autres résultats	p.27
5° - Détermination de la masse moléculaire hormonale par tamisage moléculaire	p.27
6° - Conclusion générale	p.28
CHAPITRE II	
Premières étapes de l'analyse du métabolisme de l'hormone cérébrale	p.30
I - Matériel et méthode	p.30
II - Résultats préliminaires	p.31
III - Détermination d'une activité adenylyclasiq. au niveau des ovocytes	p.34
CHAPITRE III	
La rétroaction génitale : le phénomène "Feed-back"	p.35
I - Aspect biologique de la régulation de l'activité endocrine cérébrale chez les <i>Nereidae</i>	p.36
1° - La rétroaction génitale n'est pas un mécanisme réflexe	p.36
2° - Réaction biologique <i>in vitro</i>	p.36
3° - Réaction biologique <i>in vivo</i>	p.38
4° - Nature des cellules coelomiques responsables du phénomène "Feed-back"	p.38
5° - Conclusion	p.38
II - Analyse chimique de la rétroaction génitale	p.38
1° - Extractions du facteur "Feed-back"	p.38

2° - Purification partielle du précipité acétonique d'ovocytes submatures et résultats biologiques	p.44
3° - Purification par chromatographie et électro- phorèse sur papier	p.48
4° - Essais de caractérisation de la substance "Feed-back"	p.50
Discussion générale sur le phénomène de rétro-inhibition génitale	p.56
DEUXIEME PARTIE	
Isolement du facteur inhibiteur de la régénération chez l'Annélide polychète : <i>Eisenia foetida</i>	p.58
INTRODUCTION	p.59
CHAPITRE I	p.61
I - Caractérisation d'une fraction hydrosoluble active	p.61
1° - Méthodes et matériel	p.61
2° - Essais biologiques	p.61
3° - Conclusion	p.63
II - Isolement du facteur inhibiteur par précipitation à l'éthanol d'un homogénat de tête	p.63
1° - Méthode d'extraction	p.63
2° - Essai biologique de la fraction "micromoléculaire"	p.63
3° - Conclusion	p.65
III - Fractionnement par chromatographie de la fraction inhibitrice micromoléculaire	p.65
A - Chromatographie sur échangeurs d'ions	p.65
1° - Matériel et méthode	p.65
2° - Essai biologique	p.65
B - Fractionnement par tamisage moléculaire	p.65
1° - Matériel et méthode	p.65
2° - Résultats et conclusion	p.68

CONCLUSION GENERALE	p.87
II - Conclusion	p.83
1° - Premières données sur la recherche du site récepteur	p.82
2° - Résultats préliminaires	p.82
du P.I.R.C.	p.82
1° - Matériel et méthode	p.82
2° - Résultats et conclusions	p.82
CHAPITRE III	p.82
IV - CONCLUSION	p.79
III - Composition en acides aminés du facteur inhibiteur	p.78
1° - Matériel et méthode	p.78
2° Résultats	p.78
II - Détermination de la masse moléculaire par tamisage	p.78
1° - Matériel et méthode	p.78
2° - Résultats	p.78
3° - Conclusion	p.78
I - Démonstration de la nature peptidique du facteur inhibiteur	p.76
1° - Matériel et méthode	p.76
2° - Résultats biologiques	p.76
3° - Conclusion	p.76
CHAPITRE II	p.76
V - Conclusion	p.74
IV - Purification de la fraction B par électrophorèse préparative	p.68
1° - Matériel et méthode	p.68
2° - Essais biologiques	p.74

TECHNIQUES ET METHODOLOGIE	p.90
I - Le matériel biologique	p.92
1° - Chez les Annélides polychètes	p.92
2° - Chez les Annélides oligochètes	p.92
II - Les extractions	p.93
1° - Méthanolique	p.93
2° - Acétonique	p.93
3° - Aqueuse	p.94
III - Les fractionnements	p.94
1° - Les dialyses	p.94
2° - Les résines échangeuses d'ions	p.96
3° - Le tamisage moléculaire	p.98
4° - Chromatographie et électrophorèse sur papier	p.99
IV - Methodes analytiques	p.100
1° - Estimation des masses moléculaires	p.100
2° - Stabilité à la chaleur	
3° - Digestions protéolytiques	p.100
4° - Hydrolyses acides	p.101
5° - Recherche du tryptophane	p.101
6° - Essai de détermination chimique des pics actifs	p.102
7° - Recherche de l'AMP cyclique	p.102

BIBLIOGRAPHIE

ETUDES BIOCHIMIQUES DE LA SEXUALISATION ET DE LA RÉGÉNÉRATION
CHEZ LES ANNÉLIDES

I - ISOLEMENT DES SUBSTANCES INHIBITRICE (HORMONE CÉRÉBRALE)
ET RÉGULATRICE (FEED-BACK) DE LA SEXUALISATION CHEZ DEUX ANNÉLIDES
POLYCHÈTES : *Nereis diversicolor* O.F.Müller et *Perinereis cultrifera*

II - ISOLEMENT DU FACTEUR INHIBITEUR DE LA REGENERATION
CEPHALIQUE CHEZ L'ANNELIDE OLIGOCHÈTE : *Eisenia foetida*.

INTRODUCTION

Chez les Métazoaires, les systèmes nerveux et endocrine sont impliqués dans la coordination des activités des organes et des tissus. Ces deux systèmes peuvent être associés ou distincts selon le degré d'évolution des organismes. Ainsi chez les Invertébrés primitifs, les glandes endocrines épithéliales semblent être absentes (HIGHNAM et HILL, 1969) et l'intégration organique est sous l'influence de cellules neurosécrétrices.

Depuis les premières études de SCHARRER (SCHARRER et SCHARRER, 1937), un grand nombre de travaux ont été réalisés sur les systèmes neuroendocrines des Invertébrés.

De nombreuses revues sur ce sujet ont été récemment publiées : GERSCH, 1975; GOLDING, 1974; GOLDSWORTHY et MORDUE, 1974; TRUMAN et RIDDIFORD, 1974.

De ces travaux il ressort que le matériel biologiquement actif est en général peptidique. Par ailleurs l'étude biochimique de substances neurosécrétrices se heurte à de nombreuses difficultés. Les premières et non les moindres se présentent lors des essais d'isolement et de caractérisation, essais rendus extrêmement difficiles du fait de la petitesse du matériel biologique. SCHARRER et WEITZMAN ne déclaraient-ils pas en 1974 dans "Aspects of Neuroendocrinology" *... "a task that is rather tedious because of the smallness of the source ... "?

En effet, les substances neurosécrétrices, en général des neurohormones se trouvent dans des îlots cellulaires noyés au sein même de ganglions de très petites tailles, ce qui nécessite une très grande quantité de matériel de départ. C'est alors que se posent les problèmes de récolte, de transport et de conservation de milliers d'animaux.

Par exemple l'isolement de la "Gonad shedding substance" ou G.S.S. réalisé par KANATANI et Al., 1971, a demandé 7400 *Asterias amurensis* qui ont donné 70,3 g de nerfs radiaux lyophilisés et finalement 1,3 mg seulement d'hormone purifiée permettant les premiers essais de caractérisation.

Pour isoler l'hormone responsable de la diapause chez *Bombyx mori* (diapause - hormone B ou DH - B) il a fallu 2,4 millions (4,4 Kg) de têtes d'animaux adultes qui ont donné finalement 5,8 g d'extrait hormonal brut, (ISOBE, HASEGAWA, KUBOTA, 1976). A ces difficultés d'obtention de matériel viennent s'ajouter celles des essais biologiques qui permettent le contrôle de l'activité hormonale des substances isolées.

Certains ne sont pas possibles tout au long de l'année, mais seulement durant des périodes précises et en général très courtes, en raison des exigences biologiques.

* Une tâche, qui est plutôt un pensum, à cause de la petite taille des organes sources ... ?

D'autre part les facteurs climatiques peuvent aussi intervenir : par exemple des hivers trop froids ou trop doux peuvent provoquer une perturbation du système neurosécréteur ou même la disparition des animaux.

On ne peut négliger, enfin, le facteur "pollution", qui a les mêmes effets que les précédents.

Malgré cela, une endocrinologie biochimique des Invertébrés a pris naissance avec les travaux de BUTENANDT et KARLSON, 1954.

La biochimie des substances de la neurosécrétion est encore beaucoup plus récente, bien qu'elle apparaisse maintenant comme l'élément moteur de l'endocrinologie moderne, car les auteurs se sont longtemps cantonnés dans des méthodes purement histochimiques.

Du point de vue " constitution chimique" on peut distinguer deux grandes classes de neurosécrétions : les neurohormones et les neuro-médiateurs.

Les neurohormones sont, en général, des substances peptidiques produites par les neurones et libérées à leur extrémité, pour agir en qualité de message chimique, soit localement, soit à distance. Les neuromédiateurs sont des produits de neurosécrétion de type cholinergique ou monoaminergique qui interviennent dans la libération des neurohormones.

L'endocrinologie biochimique des substances de neurosécrétion, en particulier des neurohormones chez les Invertébrés a pris naissance vers 1950. De nouvelles méthodes biochimiques ont rendu possible la détermination de la structure chimique des principes actifs fournis par les centre neurosécréteurs des Invertébrés.

Parmi les plus efficaces on peut citer :

- l'emploi de la gel-filtration sur Sephadex (ISHIZAKI et ICHIKAWA, 1967; GERSCH et STURZEBECHER , 1968);

- la centrifugation par gradient de densité (BARTELL et al., 1968);

- les digestions enzymatiques (BROWN, 1965);

- l'utilisation des radio-isotopes tels que la $[^{35}\text{S}]$ cystéine (MORDUE et GOLDSWORTHY, 1969, ou la $[^3\text{H}]$ -uridine (NOLTE et KUHLMANN, 1966).

C'est ainsi que chez les Crustacés, EDMAN et al., 1958; JOSEFSSON et KLEINHOLZ, 1964; KLEINHOLZ et KIMBALL, 1965; FERNLUND et JOSEFSSON, 1968, 1972, isolent, caractérisent et déterminent la séquence ^{peptidique} de l'hormone responsable du changement de couleur : la R.P.C.H. ("Red-Pigment-concentration-Hormone").

KLEINHOLZ, 1975, détermine la composition en acides aminés de l'hormone hyperglycémiant chez *Cancer magister* : la HH.

Chez les Insectes, STARRAT et BROWN, 1975, caractérisent la proctoline, hormone responsable de la contraction musculaire du proctodeum et en réalisent la synthèse.

Chez les Echinodermes, CHAET, 1967 et KANATANI, 1967, 1971, isolent (le premier à partir de *Patiria miniata*., le second à partir d'*Asteria amurensis*) deux peptides des nerfs radiaux, responsables de la maturation des gamètes.

Chez les Coelentérés, SCHALLER, 1973, a isolé une hormone peptidique chez l'hydre d'eau douce, qui induit la formation de la tête et du bourgeon.

Chez les Annélides polychètes, le cerveau exerce une action prépondérante sur le soma et sur les phénomènes sexuels, par l'intermédiaire d'une hormone libérée au niveau des cellules neurosécrétrices (DURCHON, 1948 - 1967; HAUENSCHILD, 1956 - 1965; CLARK et RUSTON, 1963; SCHRÖDER, 1966).

Pour les espèces présentant naturellement une épitoquie, cette hormone inhibe chez les deux sexes les transformations morphologiques et anatomiques et empêche les animaux de devenir *Heteronereis*; sa suppression expérimentale provoque une épitoquie prématurée : *P. cultrifera* (DURCHON, 1948, 1952, 1956; *N. irrorata* (DURCHON, 1952); *P. marionii* (DURCHON, 1952); *N. pelagica* (CHOQUET, 1962); *P. dumerilii* (HAUENSCHILD, 1963) et *N. succinea* (MALECHA, 1967).

Pour tous les Néréidiens de sexe mâle, l'ablation du cerveau déclenche la spermatogenèse. Elle aboutit à la libération des spermatozoïdes (DURCHON, 1962).

L'hormone cérébrale est également susceptible d'agir sur des parasites de Néréidiens (DURCHON et VIVIER, 1961, 1964). Ces auteurs ont montré que l'hormone agissait sur la gamogonie de la Grégarine, *Diplauxis hatti*.

Chez les femelles, par contre, l'évolution des cellules sexuelles en l'absence d'hormone inhibitrice est plus nuancée et varie selon les espèces. (HAUENSCHILD, 1956; CLARK et RUSTON, 1963; CHOQUET, 1962).

Cette influence hormonale du cerveau n'est pas constante; elle diminue régulièrement tout au long de la vie de l'Annélide, pour finalement devenir nulle à l'approche de l'épitoquie (DURCHON, 1960 - 1962; HAUENSCHILD, 1963 - 1964; DURCHON et PORCHET, 1971).

Le fait que l'activité endocrine cérébrale diminue graduellement au cours de la vie des Néréidiens soulève la question du déterminisme de cette régulation. On sait déjà d'une part, que les facteurs externes interviennent : la photopériode (HAUENSCHILD, 1955, 1960, 1956) et la température (DURCHON et PORCHET, 1971).

D'autre part, les produits génitaux, et en particulier les ovocytes, exercent un effet rétroactif dit "phénomène "Feed-Back". Cet effet, dont DURCHON avait avancé l'existence en 1952, a fait l'objet d'études récentes de la part de PORCHET, 1967; PORCHET et CARDON, 1972; CARDON et PORCHET, 1973; PORCHET et CARDON, 1976.

A partir de ces résultats les problèmes de la nature chimique de l'hormone et du facteur régulateur ont été posés. Le problème de la nature chimique de l'hormone fut abordé par DURCHON, MONTREUIL et BOILLY-MARER, 1963, qui se sont inspirés du schéma de fractionnement décrit par BUTENANDT et KARLSON, 1954, pour isoler l'ecdysone.

Leurs expérimentations ont permis d'isoler, à partir d'un homogénat de cerveaux, une solution "micromoléculaire" qui possédait le même pouvoir inhibiteur que le cerveau.

La première partie de notre travail a donc été consacrée à l'isolement à la purification et aux essais de caractérisation de l'hormone inhibitrice. A partir de la fraction "micromoléculaire", un premier fractionnement fut envisagé sur des colonnes de résines à échange d'ions. Il fournit une solution effluente neutre qui possède une activité inhibitrice certaine mais cependant très inférieure à celle du cerveau.

Les résultats biologiques obtenus grâce à ce premier fractionnement n'étant pas entièrement satisfaisants ("temps de blocage trop faibles"), nous avons essayé une seconde méthode de fractionnement basée sur le tamisage moléculaire (gel filtration) et sur la chromatographie sur papier.

Ces procédés nous ont permis d'obtenir un produit parfaitement actif dont l'effet inhibiteur est semblable à celui du cerveau.

Les essais de caractérisation que nous avons entrepris, par ailleurs, n'ont pas encore abouti à un résultat net et définitif.

Dans un deuxième temps, nous avons abordé le problème de l'isolement, de la purification et de la caractérisation du facteur responsable de la régulation de l'activité cérébrale.

Nous avons extrait, par l'alcool et l'acétone, d'un homogénat d'ovocytes submatures, une fraction "micromoléculaire" capable d'inactiver, aussi bien "in vivo" que "in vitro", la production endocrine des cerveaux de *N. diversicolor* et *P. cultrifera*.

Cette fraction "micromoléculaire" est fractionnée sur gel de sephadex. La fraction issue de cette chromatographie et portant l'activité biologique est purifiée par électrophorèse.

Nous obtenons ainsi une substance chimique ayant toutes les propriétés biologiques du facteur "feed-back"; sa masse moléculaire est de l'ordre de 2 000 daltons.

Le deuxième problème posé fut celui de l'inhibition de la régénération chez les Annélides.

MARCEL, 1971, a montré, dans "Contribution à l'étude des facteurs intervenant dans la régénération chez le Lombricien *Eisenia foetida* Sav.F. *typica*", que la régénération céphalique était inhibée par une substance spéci-

fique, localisée dans le système nerveux central.

Dans ce mémoire nous exposerons les étapes de l'extraction, du fractionnement et de la purification de cet inhibiteur de la régénération céphalique; les réactions enzymatiques qui ont permis de déterminer sa nature peptidique; sa composition en acides aminés et sa masse moléculaire; nous exposerons enfin l'amorce de l'étude de son site récepteur par l'emploi de traceurs radioactifs et de l'autoradiographie.

PREMIERE PARTIE

ISOLEMENT DES SUBSTANCES : INHIBITRICE (HORMONE CÉRÉBRALE)
ET RÉGULATRICE (FEED-BACK) DE LA SEXUALISATION CHEZ DEUX
ANNÉLIDES POLYCHÈTES ; *Nereis diversicolor* et *Perinereis*
cultrifera.

CHAPITRE I

ISOLEMENT DE L'HORMONE CEREBRALE DES NEREIDIENS

Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de *Nereis diversicolor* O.F. Müller, en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation.

INTRODUCTION

Chez les Néréidiens, le cerveau exerce une action inhibitrice sur les processus de maturation sexuelle et sur les transformations somatiques de l'épitoquie, par l'intermédiaire d'une hormone, libérée au niveau des cellules neurosécrétrices.

Son mode d'action au niveau de la cellule et du métabolisme, a été précisé par une série d'expériences biologiques. Ces résultats nous ont amené à entreprendre son isolement et l'étude de sa structure chimique.

Trois techniques ont été employées :

- La première consiste en une extraction méthanolique et un fractionnement sur résines échangeuses d'ions.
- La seconde en une extraction acétonique
- La troisième en une extraction aqueuse et un fractionnement moléculaire.

Nous discuterons de l'efficacité de ces trois méthodes et par la suite nous justifierons notre choix.

Pour ces trois techniques, nous avons utilisé des cerveaux prélevés sur des *Nereis diversicolor*.

I - RAPPEL DU ROLE DU CERVEAU SUR LE SOMA ET LE GERME

1 - Action sur le soma

a) Les transformations hétéronéréidiennes

Les transformations de la *Nereis* en *Heteronereis* obéissent à un déterminisme endocrine simple : c'est l'absence totale d'hormone cérébrale qui permet le développement des muscles hétéronéréidiens, (WISSOCQ, 1971) des caractères sexuels secondaires (BOILLY-MARER, 1972), ainsi que des sporozoaires parasites du liquide coelomique (DURCHON et VIVIER, 1961, 1964; PORCHET-HENNERE, 1969). Dans tous les cas, aussi bien dans les conditions naturelles qu'expérimentales, la levée de l'inhibition hormonale engendre de très nombreuses mitoses, une synthèse importante de constituants glucidiques, notamment le glycogène dans les muscles et les cellules nerveuses, ou le paraglycogène chez les

Coccidies parasites, et enfin une intense activité des dictyosomes.

Toutes ces manifestations, caractéristiques d'un état an hormonal, sont synchrones dans presque tous les tissus du ver. DURCHON en, 1952, avait parlé d'une véritable "explosion mitotique" à ce stade de développement de l'animal. BOILLY-MARER, 1976, a montré, que l'évolution de certaines cellules hétéronéréidiennes est stoppée par la greffe de cerveaux inhibiteurs.

Pour cette dernière catégorie de cellules, l'hormone cérébrale est typiquement de nature inhibitrice.

b) La croissance somatique : la stimulation hormonale

L'influence du cerveau sur la régénération postérieure des Néréidiens a été démontrée expérimentalement par CASANOVA, 1955 et DURCHON, 1956, chez plusieurs espèces (*Platynereis massiliensis*, *Perinereis cultrifera* & *Nereis costae*). HAUENSCHILD, 1960; CLARK et Coll. 1959, ont retrouvé des résultats semblables chez *Platynereis dumerilii* et *Nereis diversicolor*. DURCHON et MARCEL, 1962, ont montré que le cerveau est indispensable à la régénération postérieure chez *Nereis diversicolor*. Le principe actif, de nature hormonale, est secrété dans les heures qui suivent une amputation postérieure; il est indispensable à l'activation des cellules de régénération.

2° - Action sur le germe

a) La spermatogenèse

Les spermatogonies apparaissent dans le coelome lorsque le niveau de l'activité endocrine du cerveau est réduit (inférieur à 2 unités *diversicolor*, selon la technique de DURCHON et PORCHET, 1970).

Les mitoses goniales se produisent sous ce conditionnement tandis que les figures des méioses n'apparaissent qu'en absence totale d'hormone. BERTOUT, 1976, a montré, que la disparition de l'inhibition cérébrale provoque, chez les spermatogonies de *Nereis diversicolor* cultivées *in vitro*, une importante synthèse d'ARN du 5° au 7° jour de culture (phase G 1) qui précède la synthèse d'ADN du 7° jour (phase S).

Pour ce deuxième type de cellules, l'hormone cérébrale est également de nature inhibitrice.

b) L'ovogenèse

L'ovogenèse s'étale sur la moitié de la vie de la *Nereis*, c'est à dire que la croissance de l'ovocyte s'échelonne, sous des conditionnements endocrines très différents. (Les *Nereis pelagica* et *diversicolor* vivent 2 ans, l'ovogenèse s'étend sur la dernière année, la *Perinereis cultrifera* vit 3 ans, l'ovogenèse a lieu lors des 2 dernières années).

Le jeune ovocyte (diamètre moyen inférieur à 120 μ) élabore du vitellus lorsque la production d'hormone est à son apogée.

A partir d'une taille cellulaire de 130 μ , le cytoplasme ovocytaire se charge d'alvéoles corticaux muqueux. Ce changement métabolique est lié à un ralentissement important de l'activité endocrine du cerveau (PORCHET, 1970).

Une analyse biochimique des glycoconjugués ovocytaires a montré que l'hormone qui contrôle la différenciation des cellules sexuelles femelles, semble agir au niveau des activités glycosyltransférasiques (PORCHET et SPIK, 1976).

Enfin, PORCHET et CARDON, 1972; CARDON et PORCHET, 1973; PORCHET et CARDON, 1976, ont montré qu'une substance chimique issue des ovocytes, était capable de réguler l'activité endocrine cérébrale.

II - EXTRACTION METHANOLIQUE ET FRACTIONNEMENT SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS

1° - Extraction méthanolique

a) Matériel et méthode

L'extraction méthanolique d'une substance active à partir d'un homogénat de cerveaux a suivi le protocole expérimental de DURCHON, MONTREUIL et BOILLY-MARER, 1963 * (Tableau I).

5.000 cerveaux sont homogénéisés dans un faible volume d'eau bidistillée. A l'homogénat est ajouté du méthanol refroidi à - 70°C. On obtient une précipitation des macromolécules.

Après centrifugation de l'homogénat à 3000 g on obtient un sédiment et un surnageant. L'opération est répétée 3 fois sur le sédiment. On récupère, à chaque fois, le surnageant.

En fin d'expérience on a :

- un insoluble
- une solution méthanolique constituée par l'ensemble des surnageants.

Le méthanol est éliminé. La fraction aqueuse résiduelle est alors délipidée par l'éther * dépourvu de peroxyde. D'où finalement deux phases :

- une phase étherée
- une phase aqueuse

La phase étherée nous fournit la fraction lipidique et la phase aqueuse la fraction micromoléculaire.

b) Essais biologiques

Ces trois composés ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*.

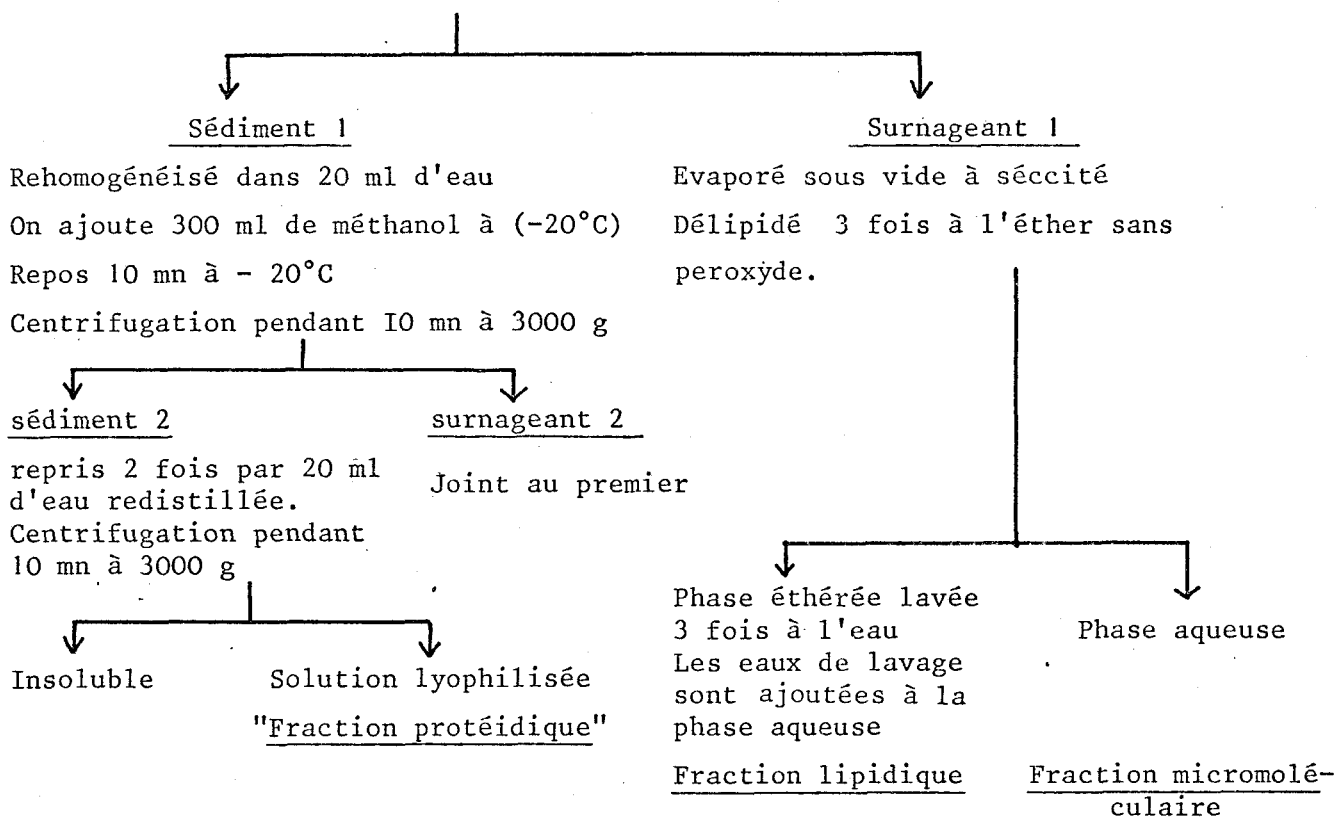
In vitro, le test utilisé est l'évolution des spermatogonies contenus dans les parapodes explantés sur des *Nereis diversicolor* mâles immatures et cultivés isolément (DURCHON et SCHÄLLER, 1963 et 1964 *).

* voir chapitre Matériel et méthodes

TABLEAU I

Schéma de fractionnement des cerveaux de *Nereis diversicolor*
d'après DURCHON, MONTREUIL, BOILLY-MARER

- 5000 cerveaux homogénéisés 5 mn dans 20 ml d'eau redistillée stérile.
- A l'homogénat sont ajoutés 300 ml de méthanol redistillé à (-20°C).
- repos 10 mn à - 20°C
- centrifugation pendant 15 mn à 3000 g



Lorsque la fraction micromoléculaire (équivalent de 15 cerveaux) est incorporée au milieu de culture, la spermatogenèse reste bloquée 11 jours par rapport aux témoins. Les autres fractions sont inactives.

In vivo, des animaux décérébrés (*Perinereis cultrifera*) reçoivent des injections de ces différentes fractions.. Seuls les individus ayant reçu des injections de la fraction micromoléculaire sont encore atoniques au bout de 50 jours, alors que tous les autres sont sub-épitoques.

D'après ces résultats, on peut considérer que l'hormone inhibitrice est présente dans la fraction micromoléculaire.

2° - Premier fractionnement par chromatographie sur résine échangeuses d'ions

a) Matériel et méthode

Nous avons réalisé un fractionnement par chromatographie sur résines échangeuses d'ions (Fig.1).

Une colonne d'échangeurs de cations : Dowex 50 x 8 est couplée à une colonne d'échangeurs d'anions Duolite A₄₀. On fait passer la solution micromoléculaire sur l'ensemble.

On récolte 3 fractions de constituants :

- 1 fraction "neutre" (retenue sur aucune des résines)
- 1 fraction "basique" (provenant de la Dowex 50 x 8 éluée par l'ammoniaque à 5 %).
- 1 fraction "acide" (obtenue par élution de la duolite A₄₀ par l'acide formique à 5 %).

b) Essais biologiques

Ces 3 fractions ont été soumises aux critères d'activité biologique, en culture organotypique * comme précédemment.

Les résultats ont été les suivants :

- La fraction "basique" ne présente aucune activité significative.
- La fraction "acide" montre quelquefois une action positive, mais dans tous les cas cette fraction s'est révélée toxique.
- La fraction "neutre", utilisée à faible concentration (15 cerveaux) détermine un retard de 3 jours de la spermatogenèse; à forte concentration (300 cerveaux) un retard de 7 jours.

c) Conclusions

Etant donné qu'il faut employer des concentrations très fortes de fraction "neutre" pour obtenir des résultats démonstratifs, alors que la fraction micromoléculaire est nettement plus active, nous nous sommes demandés si ce n'était pas dû à la rétention ou à la dégradation d'un agent actif, agissant en synergie avec la fraction neutre et pouvant être retenu ou dégradé sur l'une des deux résines.

* voir Matériel et Méthodes

FIGURE 1

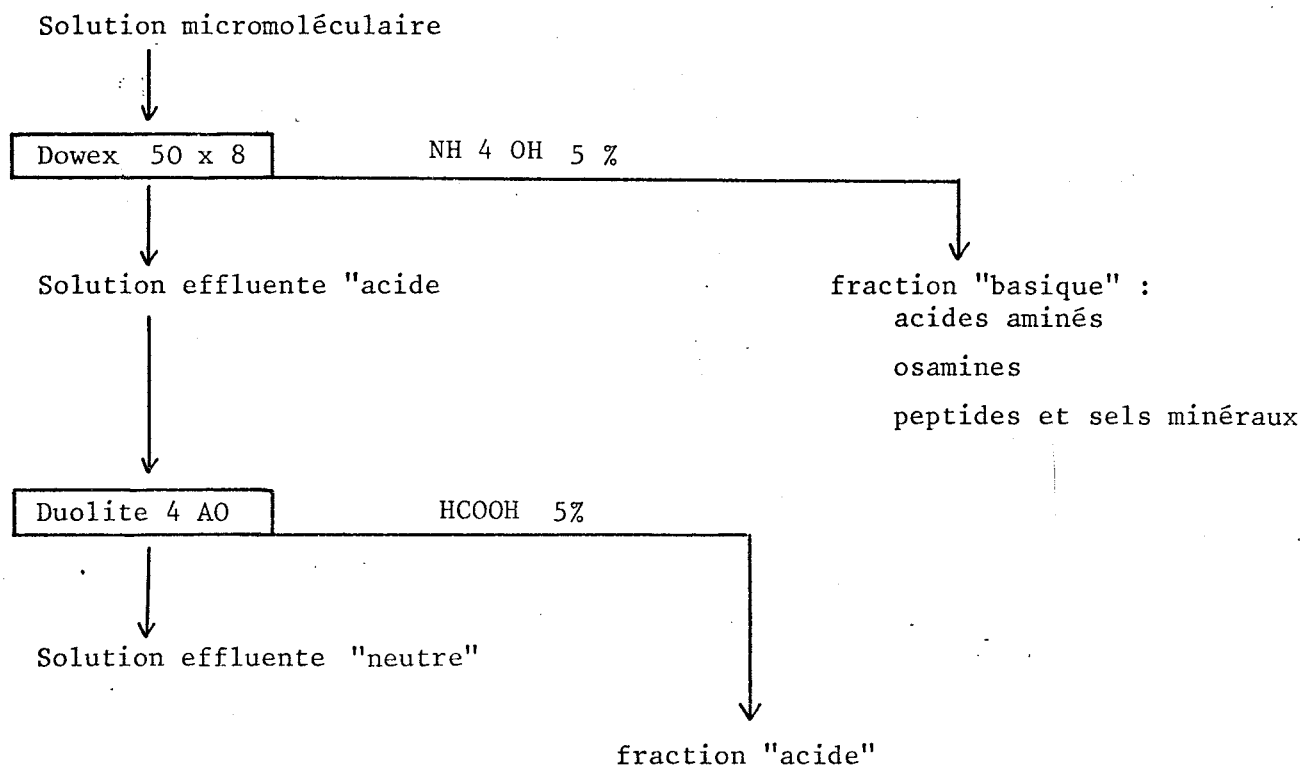


Schéma de fractionnement d'un liquide biologique sur des échangeurs d'ions

Nous avons alors entrepris de réaliser un sous-fractionnement séparé sur des résines échangeuses d'ions identiques aux précédentes. Puis nous avons effectué le contrôle biologique des sous-fractions obtenues.

3° - Deuxième fractionnement par chromatographie sur échangeurs d'ions de la fraction micromoléculaire.

a) Matériel et méthode

La solution "micromoléculaire" est séparée en 2 lots.

L'un des lots est fractionné sur une colonne de résine à échange de cations (Dowex 50x2, "200-400 mesh", forme acide, obtenue par le passage de HCl 3 N *).

La colonne de résine est lavée par de l'eau bidistillée; cette eau de lavage est ajoutée à la fraction non-retenue (acide+neutre) de la Dowex 50x2.

Un passage à blanc est effectué. On passe de l'eau bidistillée, que l'on réduit à l'évaporateur rotatif avant de lyophiliser. Cette fraction lyophilisée sera utilisée plus tard comme témoin blanc lors des essais biologiques.

La fraction "basique" est récoltée par le passage d'une solution d'ammoniaque à 5 %. (V:V) sur la Dowex 50x2. L'éluat basique est évaporé sous vide de façon à éliminer l'ammoniaque.

Le second lot est fractionné sur une résine à échange d'anions (Duolite A 40, "mesh 25-50", forme formiate, obtenue par le passage de Na OH 3N *). La colonne de résine est lavée par l'eau bidistillée; on joint cette eau de lavage à la fraction non-retenue (neutre+basique). La duolite A 40 est éluee par de l'acide formique à 5%. On arrête le passage de l'acide formique dès que se manifeste son odeur piquante.

La fraction acide subit le même traitement que la fraction ammoniacale de façon à éliminer l'acide formique.

Le protocole expérimental ci-dessus est schématisé sur la figure 2.

b) Essais biologiques

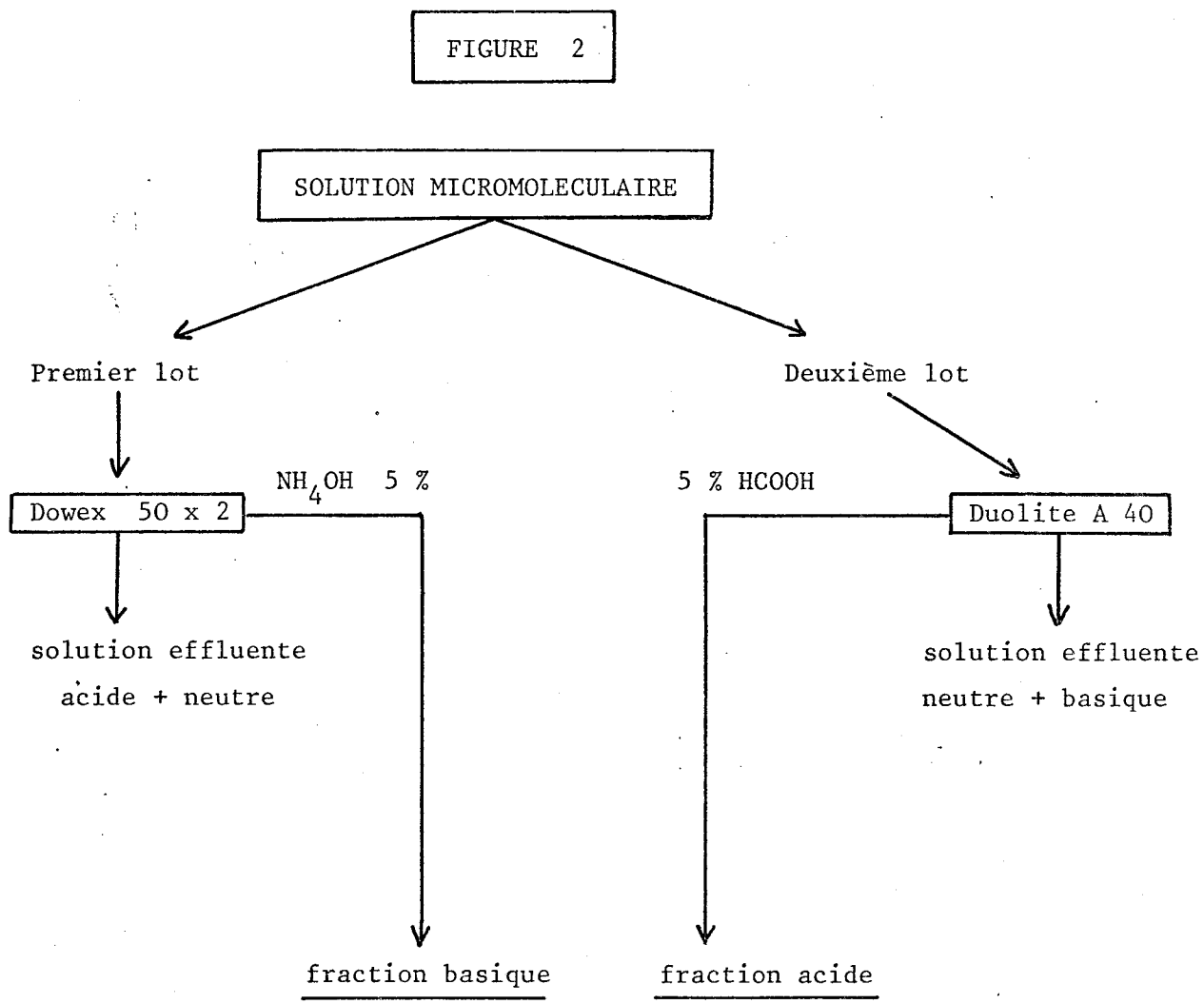
Ces différentes fractions ont été soumises aux critères d'activité biologique, en culture organotypique, comme précédemment.

. La fraction non-retenue sur la duolite A 40 (neutre+basique) présente une inhibition de la spermatogenèse de 24 heures par rapport aux témoins.

. La fraction acide présente, elle aussi, une inhibition de 24 heures par rapport aux témoins.

. La fraction "mélange", c'est à dire la réunion des fractions "acide" et "neutre-basique", présente un pouvoir inhibiteur de la spermatogenèse de

* voir Matériel et Méthodes



Deuxième fractionnement par chromatographie sur échangeurs d'ions de la fraction micromoléculaire



72 heures par rapport aux témoins.

La même expérimentation a été faite sur les fractions issues de la résine échangeuse de cations. Les retards observés par rapport aux témoins ont été ininterprétables.

Le seul résultat positif de cette mise en culture, a été la démonstration de la non-toxicité du témoin blanc.

4° - Conclusions

Devant de tels résultats, l'expérimentation *in vitro* ne fut pas poursuivie. En effet, des retards compris entre 24 et 72 heures pour de fortes concentrations en extrait de cerveaux, ne sont pas significatifs.

Cette méthode de fractionnement nous a néanmoins permis d'écarter l'hypothèse de l'existence d'une substance "activatrice", retenue ou dégradée sur l'une des résines, puisque les résultats sont nettement inférieurs à ceux obtenus lors du passage sur des colonnes couplées.

A ce stade de fractionnement et de sous-fractionnement, nos résultats permettent d'avancer les conclusions suivantes.

. L'extraction méthanolique fournit 3 fractions (macromoléculaire, lipidique et micromoléculaire). Seul, l'extrait micromoléculaire possède une activité biologique *in vivo* et *in vitro*.

Le passage de ce dernier extrait, sur des colonnes à échange de cations et d'anions, nous a conduit à localiser l'activité biologique dans la fraction dite "neutre", qui n'est pas fixée sur les 2 types de résine.

La nécessité d'employer des concentrations très fortes de "fraction neutre" pour obtenir des résultats démonstratifs repose le problème de l'isolement de l'hormone.

Ce sont ces différents résultats qui nous ont amenés à essayer d'améliorer le fractionnement et le sous-fractionnement des extraits de cerveaux, par l'emploi d'autres méthodes physico-chimiques.

III - EXTRACTION ACETONIQUE

Cette méthode s'identifie à celle de KANATANI et Coll., 1971, utilisée pour isoler la "gonad-stimulating substance" dite G.S.S., isolée à partir des nerfs radiaux de l'étoile de mer : *Asteria amurensis* et qui s'est révélée particulièrement efficace pour sa purification.

1° - Matériel et méthode

2000 cerveaux sont lyophilisés et broyés dans un mortier (*). La poudre de cerveaux sèche est homogénéisée dans l'acétone froide (rapport poids/volume, 1/20).

* Les animaux ont été récoltés à Wimereux

La suspension obtenue est filtrée sur papier. Le résidu restant sur le papier est lavé par de l'acétone froide (dans le rapport poids/volume 1/50). On récupère le résidu du filtre. L'acétone est alors éliminée à l'aide d'un évaporateur rotatif. On récupère finalement une poudre acétonique dénommée P.A.

Celle-ci est rehomogénéisée, dans le rapport 1/6, dans du Na Cl 0,01 M. On obtient une suspension que l'on centrifuge à 20 000 t, pendant 50 mn (Spinco rotor 40).

Ce procédé est schématisé sur la Figure 3.

2° - Essais biologiques

Les trois fractions, résidu sur filtre, précipité et surnageant, ont été soumises aux critères d'activité biologique, en culture organotypique (DURCHON et SCHALLER, 1964).

Les résultats n'ont pas été concluants.

3° - Conclusion

Devant ces résultats nous avons rejeté ce fractionnement par l'acétone, pour l'hormone cérébrale.

IV - EXTRACTION AQUEUSE. FRACTIONNEMENT PAR TAMISAGE MOLECULAIRE ET PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE

1° Obtention d'une fraction micromoléculaire par dialyse

Partant du fait que la fraction active était "micromoléculaire", hydrosoluble et que les autres fractions "protéique, lipidique et acétonique" étaient inertes, nous avons pensé extraire directement cette fraction active par l'emploi de la dialyse suivant le protocole expérimental exposé ci-après.

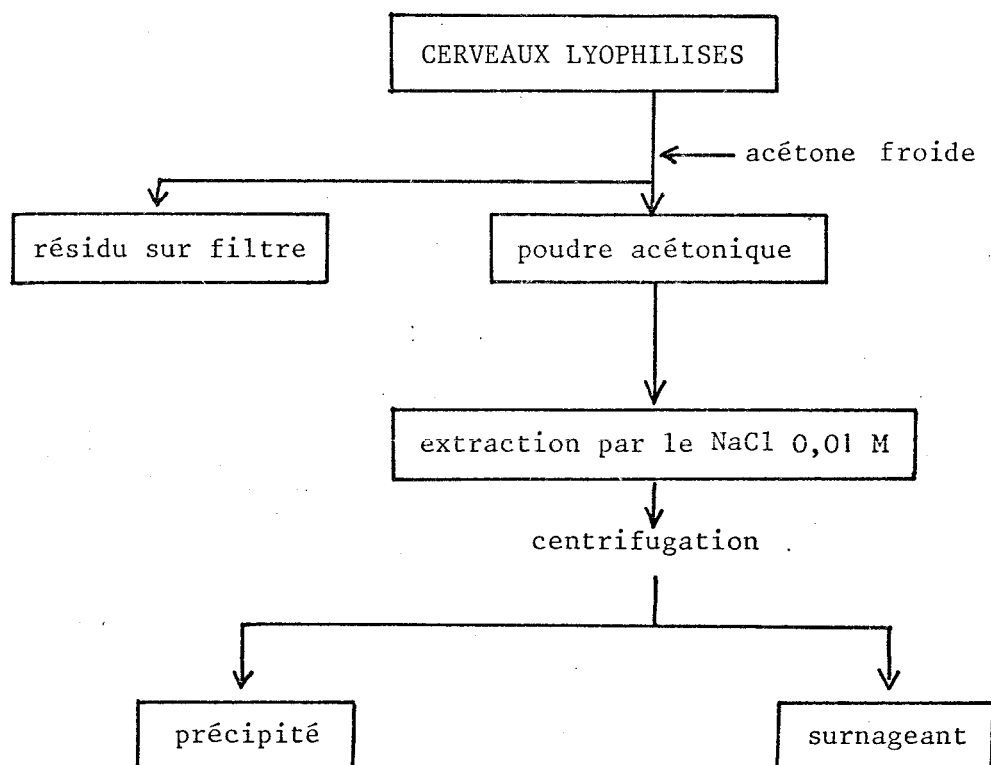
Cette méthode simple sera employée ultérieurement pour éliminer les enzymes protéolytiques lors des essais de caractérisation du facteur hormonal, du facteur "feed-back" et du facteur inhibiteur de la régénération.

a) Matériel et méthode

On réalise un homogénat de cerveaux (4000) dans l'eau bidistillée que l'on centrifuge à 15.000 g. On obtient un surnageant et un culot résiduel. Celui-ci est repris par l'eau, homogénéisé à nouveau puis centrifugé à 15000 g. Cette opération est répétée 3 fois.

Finalement, le surnageant obtenu est placé dans un tube de cellophane. La dialyse est effectuée pendant 6 à 10 jours contre de l'eau bidistillée que l'on renouvelle toutes les 24 heures. La solution, contenant les composés dialysables, est recueillie et concentrée à faible volume, à l'aide d'un

FIGURE 3



Extraction acétonique. (KANATANI et coll.1971).

évaporateur rotatif, puis finalement lyophilisée.

En fin de manipulation on obtient deux fractions:

- une fraction dialysable dont les composés ont une très faible masse moléculaire.

- une fraction adialysable dont les composés ont une masse moléculaire élevée.

b) Essais biologiques

Ces deux fractions obtenues ont été testées en culture organotypique.

La fraction dialysable bloque la spermatogénèse plus de 11 jours par rapport aux témoins, pour des concentrations très faibles (15 cerveaux).

La fraction adialysable est inactive.

On retrouve par ce procédé d'extraction, une fraction "micromoléculaire" analogue à celle décrite précédemment.

2° - Fractionnement par tamisage moléculaire.

Nous avons tenté de séparer les constituants de la fraction active "micromoléculaire" issue du fractionnement méthanolique, ou ceux de la fraction dialysable, par chromatographie en colonnes sur des supports tels que la Sephadex G.25 "normal" ou "médium" et G.25 "super-fine".

a) Fractionnement par G.25 "fine"

Que ce soit la fraction "micromoléculaire" ou "dialysable", le fractionnement est réalisé par chromatographie de tamisage moléculaire sur gel : Sephadex G.25 "médium" *.

L'élution se fait par de l'eau bidistillée, dégazée. Le pouvoir d'absorption de l'éluat est mesuré en continu, à l'aide d'un absorptiomètre, en lumière ultra-violette à 254 nm.

On obtient des diagrammes sur lesquels se dessinent de nombreux pics (Fig.4). Cette chromatographie est reproductible.

b) Résultats

Les différentes fractions qui absorbent la lumière ultraviolette et qui correspondent aux pics, sont isolées et incorporées au milieu de culture. Seule la fraction P 2 possède un pouvoir inhibiteur. Elle bloque la spermatogénèse 6 à 7 jours (à faible concentration, 15 cerveaux).

c) Sous-fractionnement de la fraction P 2 sur G.25 "super-fine"

La fraction P 2 est chromatographiée sur colonne de Sephadex G.25 "super-fine" dans les mêmes conditions que précédemment.

* (voir chapitre Matériel et méthode)

Le diagramme nous donne de nombreux pics (Fig.5).

Seuls les 2 derniers, parfaitement séparés, se sont montrés inhibiteurs de la spermatogenèse : ce sont les pics 5 et 6.

d) Résultats

La fraction P 5 a un effet inhibiteur pendant 6 à 7 jours; la fraction P 6 ne bloque que 5 à 6 jours, soit 24 heures de moins que la précédente.

Des mises en culture ont été pratiquées avec des fractions correspondant au maximum d'absorption des fractions P 5 et P 6 et avec la fraction intermédiaire (Fig.6). Nous avons alors constaté un maximum de retard pour la fraction intermédiaire. Celle-ci inhibe, en effet, la spermatogenèse 2 fois plus longtemps que les fractions P 5 ou P 6.

Les retards constatés, lors des précédentes mises en culture avec les fractions correspondant à P 5 et P 6 s'expliquent parfaitement.

Au moment de la séparation en fractions 5 et 6, chacune d'elles contenait une quantité plus ou moins grande de produit actif.

En effectuant un isolement des fractions tube par tube et en incorporant chacune d'elles au milieu de culture, nous avons obtenu des courbes (à l'enregistrement spectrophotométrique), qui, superposées, donnent une courbe d'activité biologique qui délimite exactement la "fraction hormonale" (Fig.7).

Ces différents résultats ont été réalisés à partir d'un lot de cerveaux isolés en hiver.

Un second lot de cerveaux prélevés sur des animaux en été, début automne, donne après fractionnement sur G-25 "normal" ("médium") le même diagramme que le précédent (Fig.4) et les mêmes résultats en culture *in vitro*.

Mais dès que le pic 2 est fractionné en G 25 "super-fine", on s'aperçoit que le Pic 6 disparaît (Fig.8). Pour le lot "été-début automne", nous avons réalisé quatre fractionnements et quatre sous-fractionnements

Dans tous les cas, les diagrammes obtenus étaient identiques.

Finalement ces différentes mises en culture nous ont montré que l'activité était groupée au niveau du "Pic 5" et principalement aux zones 6 et 7 (Fig.8).

Actuellement nous ne pouvons que constater le phénomène, mais il nous paraît difficile de l'interpréter.

3° - Purification par chromatographie sur papier du pic 5 (P5) et du pic 6 (P6)

Il a été montré précédemment, qu'après fractionnement sur gel de Sephadex G-25 "super-fine", la fraction hormonale se situait au niveau des pics P 5 et P 6.

Cette répartition se fait à 70 % dans le pic 5 et la zone intermédiaire 5-6 (Fig.7).

D.O.
254 nm

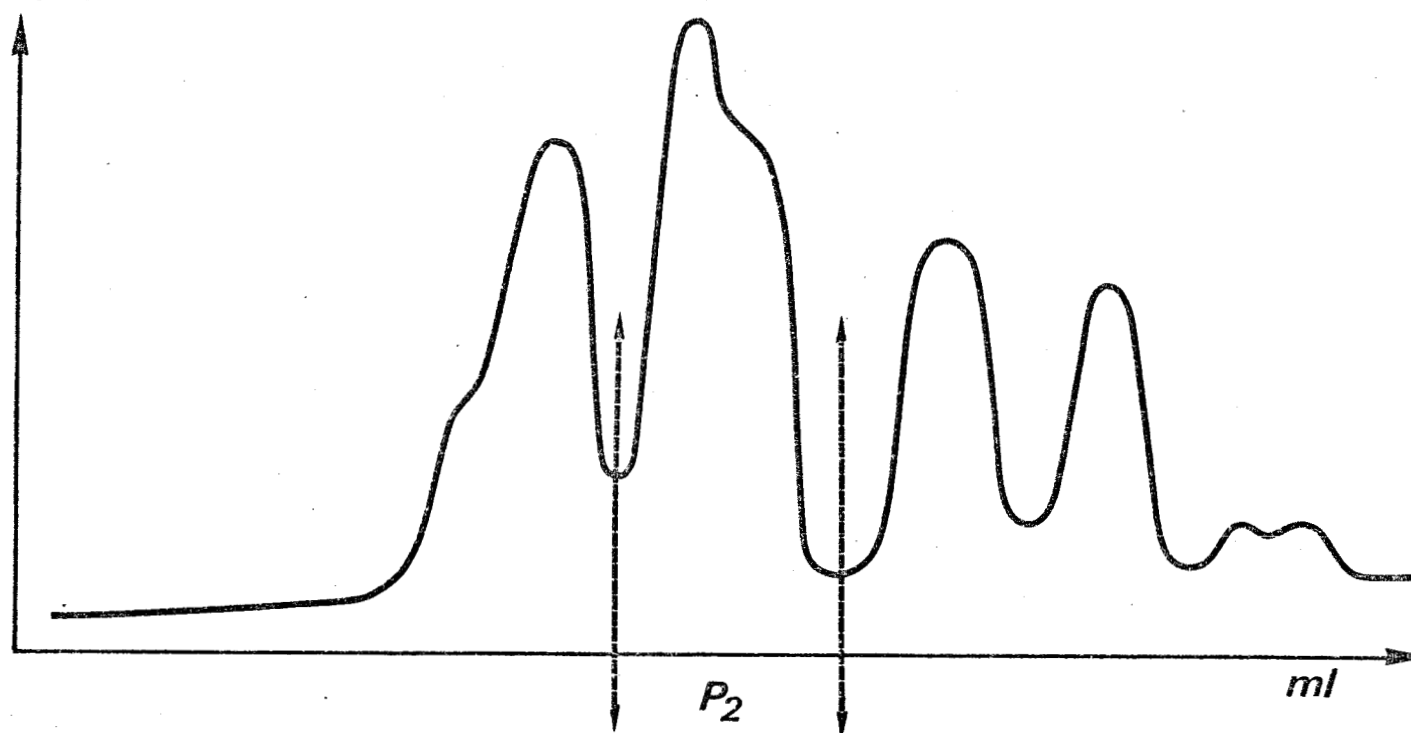


Figure 4 : Fractionnement de la fraction "micromoléculaire" du dialysat sur gel de séphadex G-25 "médium".

D.O.
254 nm

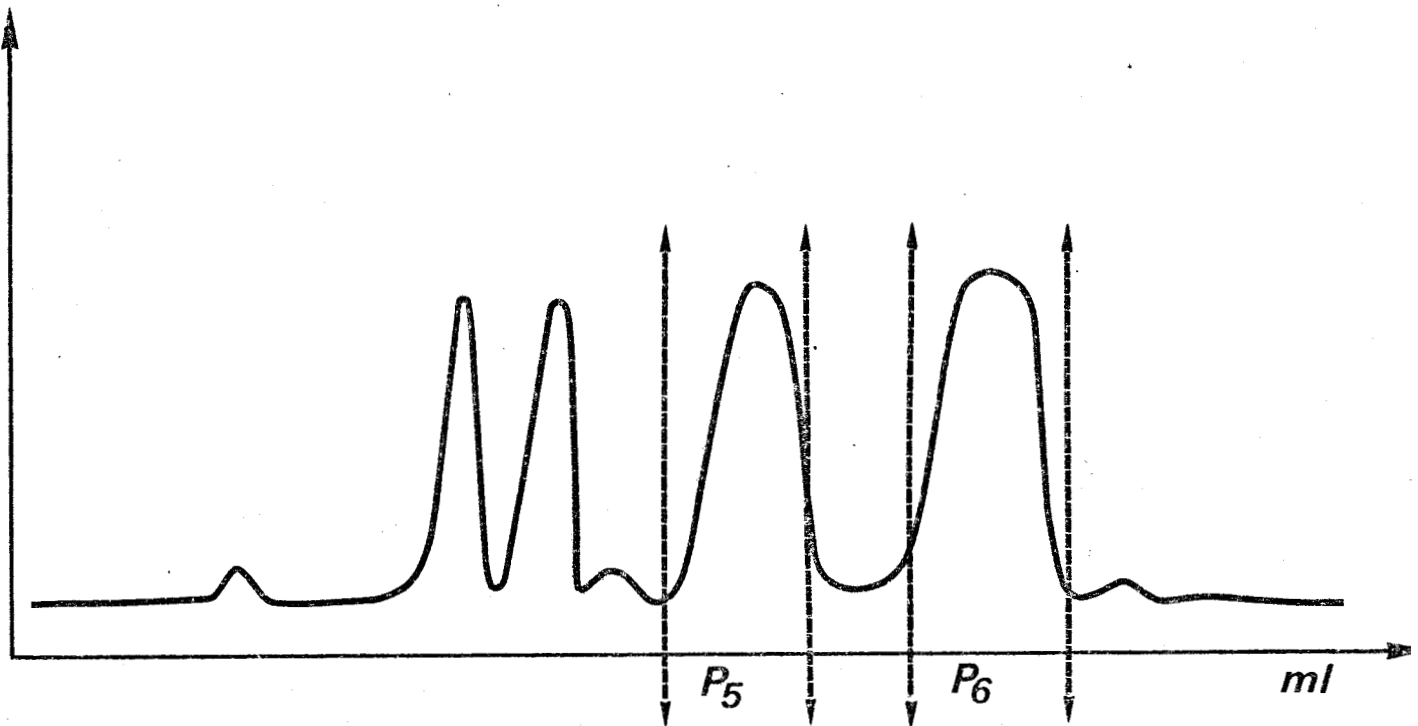


Figure 5 : Fractionnement de P 2 sur gel de sephadex G-25 "super-fine".



D.O.
254 nm

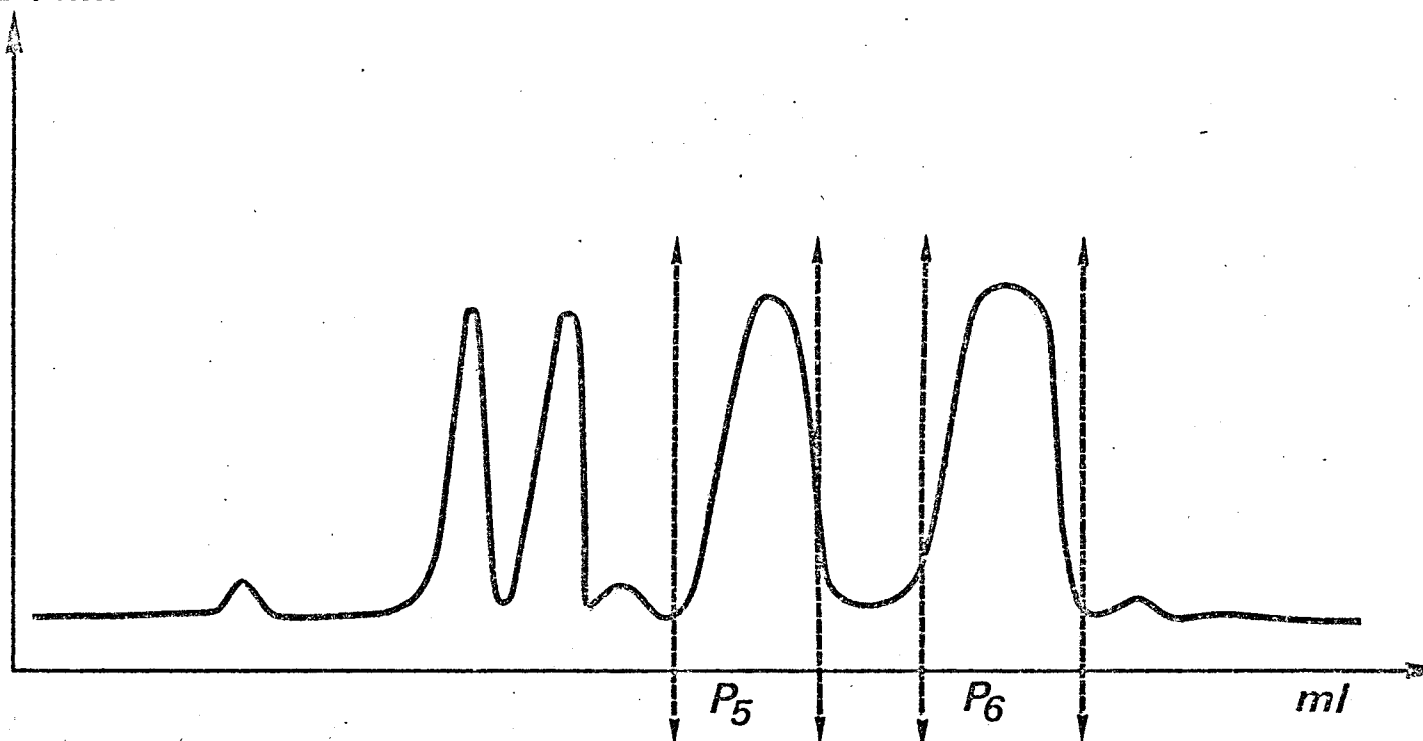


Figure 6 : Isolement d'une fraction intermédiaire entre P 5 et P 6.

D.O. 254 nm

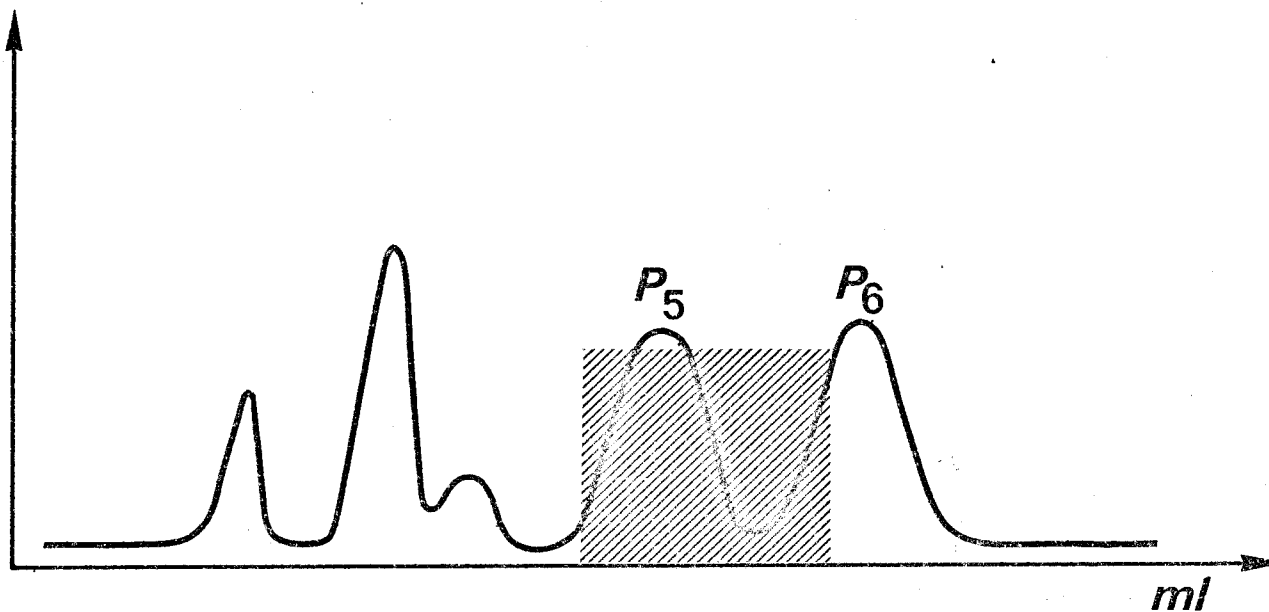


Figure 7 : Fractionnement de P 2 sur "séphadex G-25 super-fine"

- en trait continu : pouvoir d'absorption en lumière ultraviolette
- en trait hachuré : activité biologique.

Pour des cerveaux récoltés en été-début automne le pic 6 disparaît (Fig.8).

(Pour le moment nous ne pouvons que constater le phénomène. Il nous est encore difficile de l'interpréter).

La totalité de l'activité biologique est groupée au niveau du pic 5, à sa base externe, qui pourrait correspondre à la zone intermédiaire P 5 - P 6.

Avant d'aborder l'étude physico-chimique et biologique, il fallait améliorer le procédé d'extraction, de façon à obtenir une fraction hormonale enrichie et purifiée.

a) Purification du Pic 5 et résultats biologiques

Le pic 5 a été purifié par chromatographie sur papier W 3^{*}, dans le solvant (solvant de PARTRIDGE, S.M. 1948), n-but/Ac Ac/eau (4 : 1 : 5 par volume) pendant 39 heures à 20 °C.

Le chromatogramme (Fig.9), révélé par la ninhydrine à 1 %, donne 6 fortes taches "ninhydrine positive" et 2 faiblement révélées proches du trait de départ.

Au niveau du spot 4, on détecte en lumière ultra-violette à 254 et à 280 nm, deux taches très voisines : l'une fortement UV positive et l'autre fluorescente.

Les taches correspondant aux révélations par la ninhydrine et par la lumière UV, ainsi que les zones se situant entre elles sont éluées par l'eau et lyophilisées. Leur activité biologique est ensuite recherchée en culture organotypique.

Les résultats obtenus montrent que seule la bande située entre les taches UV fluorescentes et le spot 5 possède l'activité biologique (Fig.9), et que cette fraction correspondant à moins de 15 cerveaux bloque la spermatogénèse pendant 6 jours, *in vitro*.

b) Purification du Pic 6 et résultats biologiques

Le pic 6 a été purifié dans les mêmes conditions expérimentales (Fig. 9). Les différences n'apparaissent qu'au niveau du nombre de taches révélées par la ninhydrine (4 fortement révélées, numérotées de 1 à 4, dont les zones de migration se superposent exactement à celle du spot 5) et une seule tache faiblement positive en ninhydrine (décelable près du trait de départ).

Comme ^{pour} le pic 5, au niveau de la tache 4, on détecte 2 spots, l'un fortement positif et l'autre très voisin, fluorescent.

On remarque que l'intensité des spots UV positifs est sensiblement la même que dans les 2 pics. Ce résultat corrobore donc une constatation antérieure, faite lors du sous-fractionnement sur sephadex G-25 "super-fine".

* voir Matériel et Méthodes

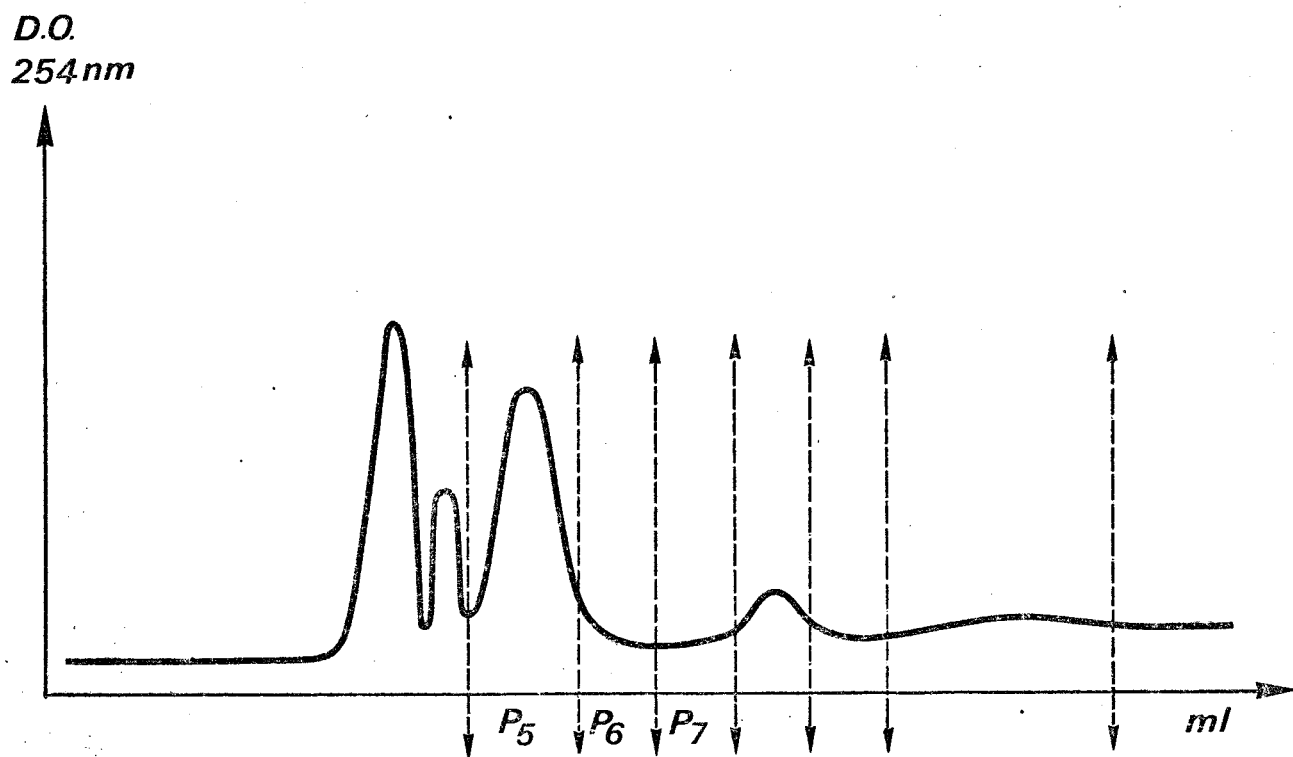


Figure 8 : Sous-fractionnement du pic 2 sur "G-25 super-fine" d'un lot de cerveaux récoltés en "été-début automne".

La fraction hormonale, située dans la bande s'étendant de la tache UV fluorescente à la tache 5 virtuelle, possède l'activité biologique, mais son action est moindre que celle de la fraction issue du pic 5 (Fig.9)

c) Conclusion

De tout ceci, on peut tirer la conclusion suivante : la fraction hormonale est enrichie et purifiée d'une manière satisfaisante, par chromatographie préparative sur papier Whatman 3, pour des études biologiques. Elles seront présentées dans la suite de ce mémoire. Quant aux études physico-chimiques, seuls les résultats nous diront si cet état de pureté est suffisant.

V - CHOIX DE LA METHODE

Trois méthodes d'extraction ont donc été employées pour isoler la fraction hormonale inhibitrice.

Deux méthodes (les extractions méthanolique et aqueuse) se sont montrées aptes à l'isolement d'un ensemble fortement actif sur le plan biologique: la fraction "méthanolique" ou la fraction aqueuse.

Par contre la méthode dite "acétonique" a été abandonnée, comme "non-rentable" sur le plan biologique, tout au moins en ce qui concerne l'hormone inhibitrice.

Finalement notre choix s'est porté sur l'extraction méthanolique pour plusieurs raisons :

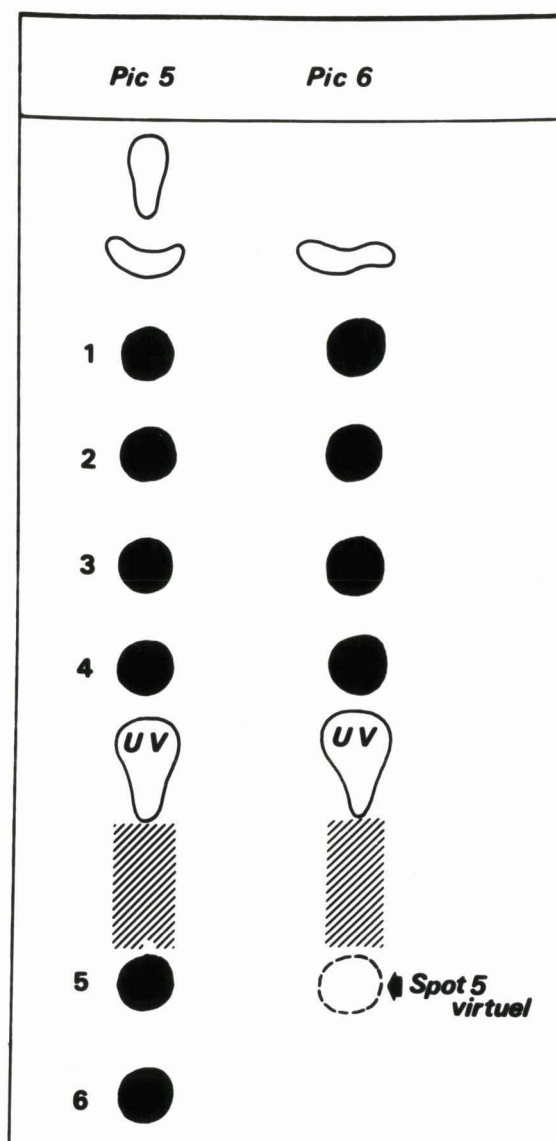
- . cette méthode élimine les risques de contamination bactérienne.
- . elle ne nécessite pas un volume important de dialysat.
- . l'extraction aqueuse n'est possible que si le substrat brut est de faible volume (cerveaux disséqués). Elle devient impossible lorsqu'il faut extraire la fraction hormonale, directement à partir des têtes et quelquefois même à partir des animaux entiers.

Le fractionnement de l'extrait micromoléculaire s'est imposé de lui-même.

La nécessité d'employer des concentrations très fortes de phase "neutre", (équivalence 300 cerveaux, au lieu de 15), pour obtenir une réponse biologique positive, lors du fractionnement sur résines échangeuses d'ions, nous a obligés à abandonner ce genre de fractionnement au profit du fractionnement par tamisage moléculaire et par chromatographie préparative sur papier.

VI - ESSAIS DE CARACTERISATION DE L'HORMONE CEREBRALE

E.SCHARRER, B.SCHARRER, 1937, et KNOWLES, 1974, ont supposé que les produits issus des cellules neurosécrétrices étaient de nature peptidique.



○ FAIBLEMENT NINHYDRINE POSITIF

Ⓢ REVELÉES PAR LA LUMIÈRE ULTRA
VIOLETTE

● FORTEMENT NINHYDRINE POSITIF

■ AIRE DE RÉPARTITION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

Figure 9 : Chromatographie sur papier des pics 5 et 6, système solvant n-buthanol, acide acétique, eau (4, 1, 5 par volume) - 39 h à 20°C.

En 1971, KANATANI et Coll., ont isolé et identifié à partir des nerfs radiaux d'*Asterias amurensis*, ce qu'ils ont appelé la G.S.S. (Gonad-stimulating -Substance). C'est un peptide de masse moléculaire voisine de 2100.

A la parution de ces travaux, nous nous sommes demandés si l'hormone inhibitrice, n'était pas, elle aussi, de type peptidique.

C'est pourquoi nous avons fait les expériences suivantes :

1° - Stabilité à la chaleur

a) Matériel et méthode

La fraction "micromoléculaire" hormonale active, est mise en suspension dans une solution de Na Cl 0,01M. Cette suspension est chauffée pendant 30 mn en bain marie (80-90°C) sous agitation puis refroidie très rapidement dans un bain de glace (KANATANI et Coll., 1971).

b) Résultats biologiques

La fraction "micromoléculaire"-témoin inhibe la spermatogenèse pendant 8 jours, tandis que la suspension chauffée la bloque une journée.

Cette expérience fut répétée une seconde fois. La fraction hormonale chauffée a présenté un effet inhibiteur d'environ 2 jours et la fraction-témoin non chauffée de 8 jours.

Après ces expériences il semblait possible que le facteur inhibiteur puisse être de nature peptidique; et dans ce cas les enzymes protéolytiques devaient détruire son activité biologique.

2° - Action des enzymes protéolytiques

a) Matériel et méthode

Les hydrolyses enzymatiques ont été effectuées sur la fraction "micromoléculaire" dialysable à 37°C, pendant 24 heures en présence de pronase ajustée à pH 7,8 - 8 (YAMASHINA et MAKINO, 1962) rapport enzyme/substrat : 1/50; de trypsine à pH 8,2 (même rapport) (HIRS, 1956) et de pepsine (SANGER et THOMPSON, 1953).

Dans chaque cas, 20 mg de fraction "micromoléculaire" dialysable ont été employés.

Après l'arrêt de la réaction, les solutions ont été dialysées, une nuit, contre de l'eau bidistillée, en vue d'éliminer l'enzyme.

L'activité biologique de chaque fraction dialysable et adialysable a été déterminée en culture organotypique, suivant le mode opératoire antérieurement utilisé.

b) Résultats biologiques

Les fractions adialysables contaminées par les enzymes protéolytiques n'ont aucune action sur la spermatogenèse, si ce n'est une dégradation plus ou moins poussée, des tissus mis en culture.

Les fractions dialysables, contenant la fraction "micromoléculaire", qui ont subi l'action des enzymes protéolytiques, ont gardé toute leur activité inhibitrice sur la gamétogenèse dans des proportions identiques au témoin "micromoléculaire" natif.

3° - Conclusions

Ces expériences (sur la stabilité à la chaleur et l'action des enzymes protéolytiques) amènent deux conclusions contradictoires.

Sous l'action de la chaleur, l'hormone perd 90% de son activité inhibitrice.

Par contre l'hormone n'est pas détruite par les enzymes protéolytiques ce qui semble indiquer qu'elle n'est pas de nature peptidique, du moins classique.

4° - Autres résultats

Nous avons vu que l'extraction méthalonique nous permettait d'obtenir une fraction lipidique. Cette fraction, en culture organotypique, ne donne aucun résultat.

Il semble donc que l'hormone inhibitrice ne soit pas lipidique ou un dérivé soluble dans les graisses.

Nous avons vu aussi que la fraction hormonale inhibitrice se situait entre les pics 5 et 6 ou à la base externe du pic 5.

Le fait que cette hormone n'absorbe pas la lumière ultraviolette semble indiquer qu'elle n'est pas de nature aromatique. Par conséquent qu'elle n'est pas un dérivé purique ou pyrimidique.

Enfin les techniques classiques de recherche des glycoconjugués n'ont donné aucun résultat (CARDON, 1970, Thèse de 3° cycle).

5° - Détermination de la masse moléculaire hormonale par tamisage moléculaire

Nous savons que la fraction hormonale est dialysable et micromoléculaire et que la méthode de tamisage moléculaire fournit une fraction hormonale très active et efficace.

Cela nous a poussé à estimer la masse moléculaire par tamisage moléculaire.

On a utilisé une colonne sephadex "G-25 fine", (1,3 x 100 cm), (ANDREWS, 1964), équilibrée par une solution de tampon acétate 0,05 M additionnée de 0,4 M de Na Cl à 20°C (KANATANI et Coll., 1971).

Le volume d'élution de la fraction active est comparé à celui de l'ocytocine (masse moléculaire = 1035), et à celui de la bacitracine (masse moléculaire = 2470). Les volumes d'élution sont déterminés par les courbes d'absorption en lumière ultra-violette à 254 nm et 280 nm, celui de l'ocytocine est repéré par essai biologique sur un utérus isolé de rate en proestrus. La masse moléculaire estimée par ce procédé, est comprise entre 2014 et 2280 daltons.

6° - Conclusion générale.

L'extraction méthanolique des cerveaux fournit 3 fractions (macromoléculaire, lipidique et micromoléculaire). Seul l'extrait "micromoléculaire" possède une activité biologique "*in vivo* et "*in vitro*".

L'extraction aqueuse nous fournit une fraction dialysable identique à la fraction "micromoléculaire" précédente.

Par contre, l'extraction acétonique s'est révélée parfaitement néfaste pour l'activité biologique de l'hormone. Nous n'avons donc pas retenu ce mode d'extraction.

Toutefois, la méthode de purification sur résines échangeuses d'ions nous a fait perdre une partie importante de l'activité de la fraction micromoléculaire, qu'elle soit d'origine méthanolique ou aqueuse.

Par conséquent nous avons abandonné le fractionnement sur résines échangeuses d'ions, au profit d'un fractionnement qui garde intacte l'activité biologique des cerveaux, c'est à dire le tamisage moléculaire.

Cette méthode de fractionnement et de sous-fractionnement par chromatographie de gel - filtration nous a fourni 2 pics d'activité P 5 et P 6.

Une étude plus poussée nous a montré que ces fractions obtenues ne possèdent qu'une partie de la substance active, qu'en réalité l'hormone se situe entre ses 2 pics et que " la substance active" de ces pics peut être extraite par chromatographie sur papier W3.

L'expérience, enfin, a révélé que la zone hormonale n'absorbe pas la lumière ultra-violette et que son activité n'est pas détruite par les enzymes protéolytiques (pronase, trypsine, pepsine).

Donc, actuellement, le problème de l'isolement de l'hormone inhibitrice cérébrale des Néréidiens semble être en partie résolu, par contre celui de sa nature chimique demeure posé.

La fraction hormonale, elle, est dans un état de pureté suffisante pour permettre d'aborder les premières étapes de l'analyse du métabolisme de l'hormone cérébrale (une légère ambiguïté subsiste néanmoins, due au fait que la substance hormonale n'est pas totalement purifiée).

CHAPITRE II

Premières étapes de l'analyse du métabolisme de l'hormone cérébrale.

L'hormone cérébrale n'étant pas totalement purifiée, nous avons essayé d'aborder l'étude de son métabolisme par des voies indirectes. *In vitro*, les cerveaux restent inhibiteurs, c'est donc que les cellules neurosecrétrices poursuivent leur synthèse hormonale.

Il nous a semblé possible de marquer cette hormone en fournissant au milieu de culture des précurseurs radioactifs élémentaires (acétate, leucine, glucose etc ...) n'ayant à la limite, aucune spécificité. En effet, si un tel précurseur était incorporé par le cerveau pour synthétiser de nombreux produits et, en particulier l'hormone, celle-ci se trouverait radioactive et il serait alors possible de la suivre dans son "devenir métabolique".

Celle-ci est isolée selon la technique traditionnelle et injectée, ensuite, dans la cavité coelomique de *Nereis*.

L'étude des récepteurs cellulaires, du transport (Binding proteins) et de l'élimination de la substance hormonale peut ainsi être abordée.

Les résultats encore préliminaires sont très prometteurs et laisse espérer des données intéressantes pour l'avenir.

L'intérêt réside, dans le fait qu'un lot de 1000 cerveaux donne suffisamment d'hormone marquée pour permettre l'analyse métabolique.

I - Matériel et méthode

L'étude du métabolisme de l'hormone cérébrale a été entreprise en collaboration avec PORCHET. Un millier de cerveaux (900 à 1000) de *Nereis diversicolor* possédant une forte activité hormonale, sont prélevés sur de jeunes individus. Ils sont placés en culture organotypique en présence de [14 C] d'acétate de sodium (100 μ ci) pendant 4 jours.

Les cerveaux sont alors récupérés et immédiatement traités suivant les méthodes précédemment décrites qui permettent d'extraire une fraction enrichie en hormone (fractionnement et sous-fractionnement en chromatographie sur gel de sephadex et sur papier W 3).

On isole finalement une fraction hormonale relativement purifiée, possédant 1,6 % du marquage initial des broyats de cerveaux. Pour 100 cerveaux, la quantité de [14 C] acétate incorporée correspond à environ 1000 000 de coups par minute (c.p.m). Par contre, celle contenue dans la fraction hormonale isolée, donne environ 16 000 à 17 000 c.p.m.

La fraction hormonale marquée est préalablement essayée *in vitro*, sur une culture organotypique de spermatogonies. Le blocage de ces cellules sexuelles dans leur état d'origine, prouve l'existence du principe hormonal inhibiteur de la fraction obtenue.

II - Résultats préliminaires

L'hormone étant la même chez tous les Néréidiens, le reste de la fraction hormonale marquée est injecté dans la cavité coelomique d'une *Perine-reis cultrifera* femelle, préalablement décérébrée et dont les ovocytes ont une taille moyenne de 160 μ .

Douze heures plus tard, l'animal est sacrifié. Toutes les parties du ver sont soigneusement recueillies ainsi que l'eau de mer dans laquelle il vivait.

Les ensemble cellulaires sont homogénéisés, précipités à l'ATCA 10 % refroidi et filtrés. Les filtres sont abondamment lavés à l'alcool à 96°, à l'acétone puis à l'éther éthylique.

Après séchage, ils sont soumis au compteur à scintillation. Les comptages nécessitent les plus grandes précautions et sont effectués plusieurs fois pendant 10 mn.

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 2.

D'autre part, le liquide coelomique est chromatographié sur gel de sephadex G-50, puis G-25 (Fig.10). Une aliquote de chaque fraction obtenue est comptée dans les mêmes conditions que précédemment. Une seule fraction coelomique présente une radioactivité nette c'est le pic C qui est toujours très réduit. Il pourrait jouer un rôle important dans le transport de l'hormone cérébrale.

Quelles conclusions peut-on tirer du tableau ?

- . On observe une perte importante de la radioactivité (près de 40%).
- . La majeure partie de la radioactivité se retrouve au niveau de l'eau de mer ambiante (25 %) et du tube digestif (15 %). Ceci révèle des processus de dégradation et de rejet très importants.

- . L'hormone se fixe préférentiellement d'abord sur le pic C du liquide coelomique (2450 c.p.m = 24 %), puis sur les muscles (11 %), enfin sur les éléments figurés du coelome (ovocytes et éléocytes : 7 %).

La radioactivité la plus nette est décelable au niveau des enveloppes ovocytaires isolées suivant la méthode mise au point par CANER et al., 1977; ceci permet l'amorce d'études sur les accepteurs de l'hormone.

Les "résultats" positifs actuels sont donc la mise en évidence de l'existence d'une fraction coelomique transportant l'hormone, et d'éventuels récepteurs ovocyttaire et musculaire de cette même hormone cérébrale.

TABLEAU II

Fractions étudiées	Radioactivité détectée en [14 C] (coups par minute)
eau de mer dans laquelle vivait l'animal	2 450
<u>Ovocytes</u>	
enveloppes ovocytaires	448
membranes internes	144
(dictyosomes	199
(vésicules	
muscles	1 160
tube digestif	1 531
éléocytes	215
liquide coelomique total	3 300
TOTAL	10 447

Mesure de la radioactivité hormonale dans les différentes parties de l'Annélide.



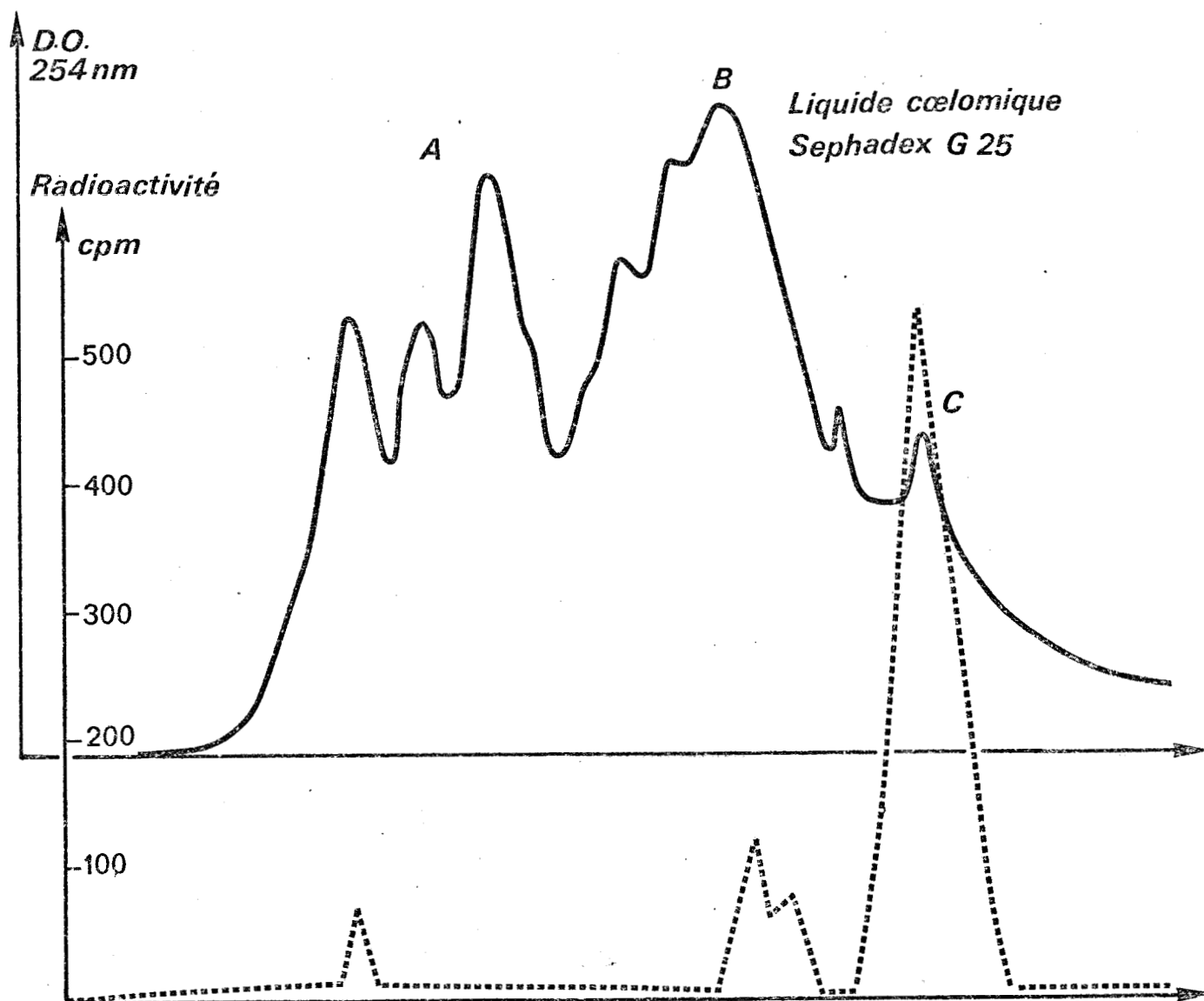


Figure 10 : Chromatographie sur gel de Sephadex G-25 "fine" du liquide coelomique de *Perinereis cultrifera*. Profil de radioactivité de l'hormone cérébrale en coups par minute (c.p.m). Seule la fraction coelomique C porte une radioactivité très nette.

III - Détermination d'une activité adényl-cyclasique au niveau des ovocytes.

Nous avons décelé une radioactivité liée à l'hormone dans les enveloppes ovocytaires.

Nous avons donc recherché dans les ovocytes l'existence d'une activité adényl-cyclasique qui serait liée à l'action hormonale.

Pour cela deux lots d'ovocytes sont utilisés :

- 1 lot de jeunes ovocytes ($70\ \mu$ de diamètre); donc des ovocytes subissant une forte action hormonale.

- 1 lot d'ovocytes âgés ($150\ \mu$ de diamètre); donc des ovocytes ne subissant pas, ou très peu d'action hormonale.

Nous avons recherché l'AMP cyclique dans ces deux lots d'ovocytes suivant la méthode de VERBERT et CACAN (1972).

Les conclusions sont les suivantes :

1) L'activité ATP-asiqique est très forte ce qui nécessite la présence d'un régénérateur d'ATP pour le dosage de l'activité adényl-cyclase.

Même en présence d'un tel régénérateur (Phospho-Enol-Pyruvate) (P.E.I) une part importante d'ATP est hydrolysée en ADP puis en AMP.

2) On ne décèle apparemment pas d'AMP cyclique aussi bien dans les ovocytes de $70\ \mu$ que dans ceux de $150\ \mu$

Si son activité adényl-cyclasique existe, elle est très faible, et non détectable par la méthode employée.

Si on se rapporte au rôle de messenger secondaire attribué à l'AMP cyclique dans la transmission d'un message hormonal, dans le cas qui nous intéresse le problème reste entier.

CHAPITRE III

LA RETROACTION GENITALE : LE PHENOMENE " FEED-BACK "

Isolement, purification et essai de caractérisation du facteur inhibiteur, responsable de la régulation de l'activité cérébrale inhibitrice chez les *Nereidae*.

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec M.PORCHET.

Nous pouvons tout d'abord distinguer 2 thèmes de recherche dans la rétroaction génitale :

- l'un biologique, étudié par M.PORCHET
- l'autre biochimique, dont je me suis personnellement occupé.

L'aspect biologique du phénomène "Feed-Back" comprend :

- 1° - La récolte du matériel biologique.
- 2° - La mise en évidence du phénomène biologique par implantation d'ovocytes submatures.
- 3° - Les cultures organotypiques de parapodes mâles de *Nereis diversicolor*, pour l'étude de l'influence des différents constituants obtenus par fractionnement au niveau de ces cultures.
- 4° - Les recherches histologiques lorsqu'elles étaient nécessaires pour affirmer ou infirmer tel ou tel résultat.

Mon travail, a consisté , à partir du liquide coelomique et d'ovocytes submatures de *Perinereis cultrifera*, à extraire, à purifier par fractionnement la substance responsable de la rétroinhibition hormonale et enfin à essayer d'en déterminer la nature chimique.

Nous allons dans un premier temps, résumer sous forme d'historique, la mise en évidence du phénomène de la rétroaction génitale.

Dès 1952, DURCHON prouvait que l'on pouvait induire une épitoquie expérimentale par injection de produits génitaux femelles de 3 ans à une femelle immature.

DURCHON, 1960 - 1962; HAUENSCHILD, 1963 - 1964; DURCHON et PORCHET en 1971 ont montré qu'à l'approche de la maturité génitale l'activité endocrine des ganglions cérébroïdes des *Nereidae* diminue pour cesser finalement lors de l'épitoquie.

Expérimentalement, il est possible de supprimer précocement le facteur inhibiteur cérébral, en injectant des ovocytes submatures dans la cavité générale de jeunes *Nereis*.

Les critères biologiques qui permettent alors de déceler la suppression de l'inhibition sont : la maturité génitale et l'épitoquie du

receveur, (PORCHET, 1967), ainsi que l'incapacité de régénérer les segments postérieurs amputés (PORCHET et DURCHON, 1968).

I - ASPECT BIOLOGIQUE DE LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENDOCRINE CEREBRALE CHEZ LES *Nereidae*.

Il importait de savoir si l'hormone cérébrale était contrôlée par un mécanisme comparable à la régulation de l'hormone cérébrale du tannage chez les Insectes (le bursicon, FRAENKEL et HSIAO, 1965) ou si la rétroaction génitale était de nature chimique comme chez *Musca domestica* (ADAMS,

HINTZ et POMONIS, 1968 et ADAMS et Coll., 1970). Je me suis chargé d'étudier cette dernière hypothèse qui sera détaillée ultérieurement dans cet exposé.

1° - La rétroaction génitale n'est pas un mécanisme réflexe

L'implantation d'ovocytes submatures (DURCHON, 1952; PORCHET, 1967; PORCHET et DURCHON, 1968), dans la cavité générale de jeunes *Nereis* entraîne une augmentation importante du volume des receveurs. L'hypothèse du mécanisme réflexe n'était pas à écarter. Une augmentation expérimentale du volume corporel des vers a donc été provoquée par des injections de gélose ou de microbilles de verre. 40 jours après ces injections, l'état génital ainsi que la capacité de régénération des individus opérés étaient très comparables à ceux des témoins (tableau III).

Les auteurs n'observaient jamais d'épitoquie expérimentale comme lors de l'implantation d'ovocytes submatures.

Ils pouvaient donc conclure que ce n'était pas un simple mécanisme-réflexe qui pouvait réduire l'activité endocrine des cerveaux de *Perinereis cultrifera*.

2° - Réaction biologique *in vitro*

Les différents constituants issus des fractionnements biochimiques que j'avais réalisés, ont été introduits dans des milieux de culture organotypique * sur lesquels étaient transplantées des associations de parapodes et de prostomiums de *Nereis diversicolor*. HAUENSCHILD, 1956 et BOILLY - MARER, 1962, ont en effet montré la non-spécificité du facteur hormonal chez les différentes espèces de Néréidiens.

L'introduction dans le milieu de culture d'un constituant issu du fractionnement d'ovocytes submatures détermine ou ne détermine pas un arrêt de l'activité inhibitrice des prostomiums. Cela se traduit par une maturation

* (voir chapitre matériels et méthodes)

TABLEAU III

Diamètre ovocytaire initial (nombre d'animaux)	état génital (E.G.) et nombre de segments régénérés (R) 40 jours après l'injection					
	Témoins (aucune injection)		Injection de gélose ou de microbilles de verre		injection d'ovocytes submatures (180 μ)	
	E.G.	R.	E.G.	R.	E.G.	R.
pas de produits génitaux (30)	pas de produits génitaux	15	pas de produits génitaux	14	sexualisation ♀ = 30 à 80 μ ♂ = spermatocytes	0
30- 40 μ (24)	+ 10	12	+ 18	12	+ 54	0
50- 60 μ (33)	+ 13	10	+ 23	8	+ 42	0
70- 90 μ (35)	+ 17	6	+ 15	7	+ 82	0
100-110 μ (27)	+ 8	3	+ 17	2	+ 85	0

Action comparée de l'injection de gélose à 0,5 % et d'ovocytes submatures (diamètre $> 180 \mu$) sur la croissance ovocytaire et la régénération postérieure de *Perinereis cultrifera*.

note : Les animaux sont sectionnés au 1/3 postérieur (35 à 40 segments amputés) 20 jours après l'injection. Le nombre de segments régénérés est noté 20 jours après l'amputation.



ou un non-développement des spermatogonies en spermatozoïdes.

3° - Réaction biologique *in vivo*

Les divers constituants issus du fractionnement, sont injectés dans la cavité coelomique de *Perinereis cultrifera* encore dépourvues de produits génitaux, afin d'observer leur influence éventuelle sur la régénération postérieure du receveur.

La substance susceptible d'être active est solubilisée dans de l'eau bidistillée et injectée en deux fois à l'aide d'une micro-seringue (Hamilton).

4° - Nature des cellules coelomiques responsables du phénomène "Feed-Back".

PORCHET, 1974 (Thèse de Doctorat ès Sciences) a précisé la nature des cellules coelomiques (ovocytes ou éléocytes*) à l'origine de la production de la substance responsable de cette rétroaction génitale.

Les *Perinereis cultrifera* ont été récoltées aux stations biologiques de Luc sur Mer (Calvados) et de Roscoff (Finistère); les *Nereis diversicolor* proviennent de Wimereux (Pas de Calais).

Ces animaux sont gardés dans l'obscurité et à la température de 12 à 14 °C.

Les contenus coelomiques des *Perinereis cultrifera* sont centrifugés à 1800 g pendant 5 minutes. Le liquide coelomique surnage. Dans le culot, les ovocytes sont séparés des coelomocytes par 3 lavages successifs à l'eau de mer alternant avec des centrifugations de 500 g pendant 3 minutes. Nous avons recherché la substance "feed-back" dans chacune de ces catégories cellulaires purifiées.

5° - Conclusions

DURCHON et PORCHET, 1971, ont montré que le métabolisme génital est réglé chez les *Nereidae* par la décroissance régulière du taux de l'activité endocrine cérébrale. Ces réductions successives sont la conséquence d'une rétroaction génitale de nature chimique capable d'inhiber la production hormonale du prostomium. Cette substance chimique trouverait son origine au niveau des ovocytes.

II - BIOCHIMIE DE LA RETROACTION GENITALE

1° - Extractions du facteur "Feed Back"

Les résultats biologiques obtenus par PORCHET démontrant que la rétro-inhibition est de nature chimique, nous nous sommes alors efforcés d'extraire et de purifier par fractionnements successifs la substance responsa-

* éléocyte : terme synonyme de coelomocyte.

ble de cette régulation hormonale. Nous avons enfin essayé de caractériser cette substance "Feed-Back".

a) Extraction à partir du contenu coelomique total.

20 ml de contenu coelomique d'individus submaturs (contenant 77% d'ovocytes de taille supérieure à 180 μ , 9 % d'éléocytes et 14 % de liquide coelomique) sont prélevés sur des animaux vivants, à l'aide d'une micro-pipette et congelés immédiatement à - 18 , - 20 °C. Après décongélation à 4°C, on homogénéise pendant 3 à 4 mn avec l'appareil de Potter-Elvehjem dans l'eau distillée à 4 °C de façon à obtenir une bouillie fluide.

A cet homogénat aqueux on ajoute 7 volumes d'éthanol refroidi à - 18, - 20 °C. Après un repos de 30 mn à + 4°C, l'homogénat éthanolique est placé en boudin de dialyse, pendant 6 jours en chambre froide à + 4°C, contre de l'eau distillée (*).

La fraction dialysable est recueillie chaque jour. Les fractions dialysables et la fraction adialysable sont réduites à l'évaporateur rotatif.

On obtient ainsi 2 fractions distinctes :

- une fraction adialysable
- une fraction dialysable que l'on nomme résidu aqueux

Ce résidu aqueux est traité par l'acétone froide dans le rapport de 1 volume aqueux pour 7 volumes d'acétone. On agite en ampoule à décanter et on laisse reposer 24 h à + 4 °C.

Il se forme un précipité acétonique flocculeux et un surnageant acétonique que l'on sépare par une centrifugation à 4000 g pendant 15 mn. On obtient 2 éléments bien distincts :

- un surnageant acétonique
- un précipité acétonique

Dans le cas du précipité acétonique, le peu d'acétone restant est éliminé sous vide. Ce précipité se montre particulièrement apte à se solubiliser dans l'eau.

Dans le cas du surnageant acétonique, on élimine l'acétone à l'évaporateur rotatif. On récupère un résidu aqueux immédiatement lyophilisé. Le protocole expérimental est schématisé dans la Fig.12.

b) Extraction à partir d'ovocytes de femelles submaturs et à partir d'autres éléments du vers.

Les ovocytes récoltés et isolés subissent les fractionnements à l'éthanol et à l'acétone décrits précédemment.

* (voir Matériel et méthodes)

FIGURE 12

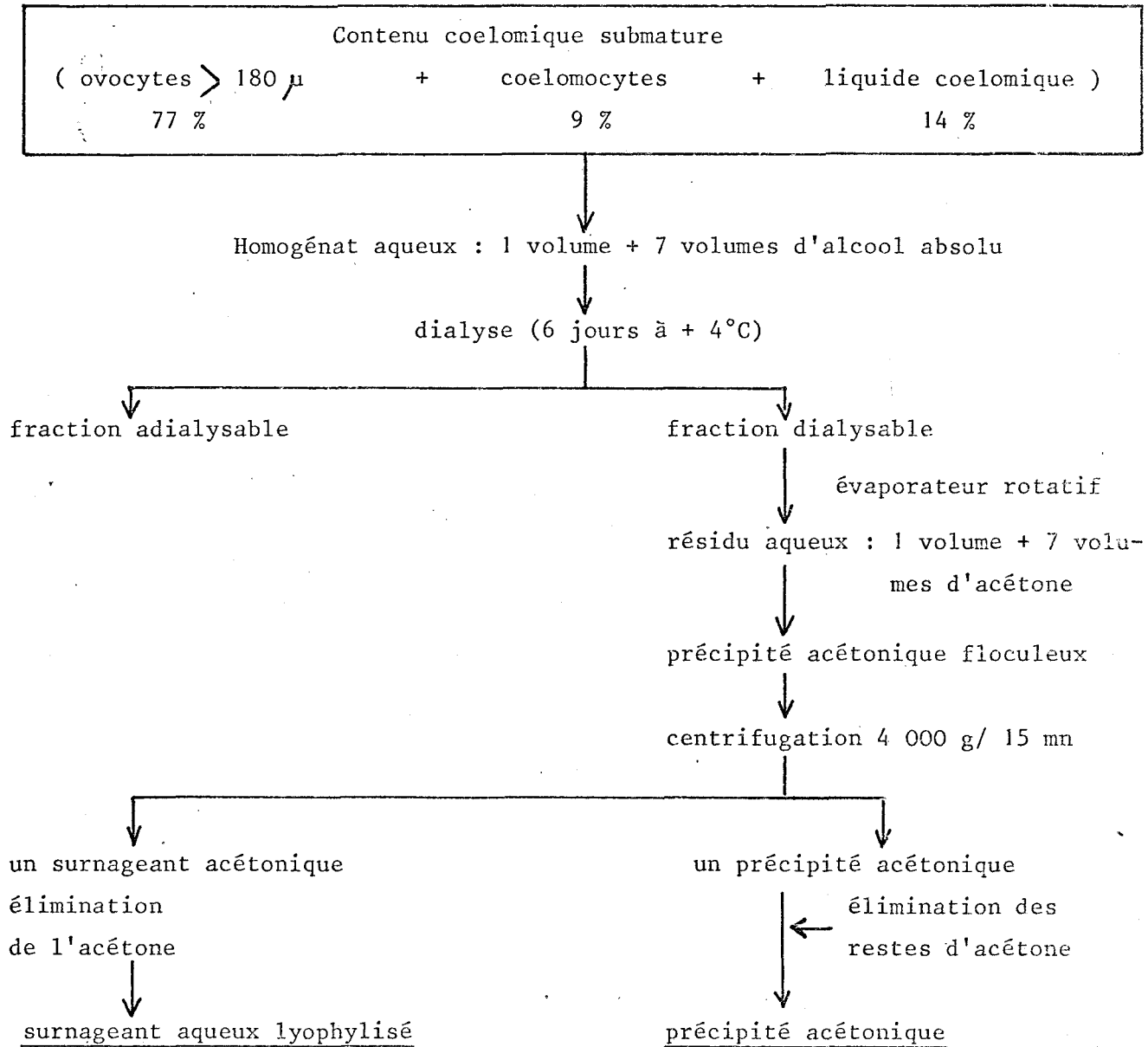


Schéma de fractionnement du contenu coelomique (ovocytes, éléocytes et liquide coelomique) de *Perinereis cultrifera* submature.



On obtient finalement un "précipité acétonique". A titre de contre-expérience, j'ai extrait des précipités acétoniques à partir d'autres éléments du vers : muscles débarassés de gamètes, spermatocytes et ovocytes de taille inférieure à 130 μ .

Tous les précipités acétoniques obtenus ont été essayés en culture organotypique .

c) Résultats

α) Réaction biologique in vitro

Les divers constituants issus de ce fractionnement ont été introduits dans des milieux de culture sur lesquels étaient transplantées des associations de parapodes et de prostomiums de *Nereis diversicolor*. L'introduction dans le milieu de culture, du précipité acétonique de femelle submature et de lui seul, détermine un arrêt de l'activité inhibitrice du prostomium qui se traduit par une maturation des spermatogonies en spermatozoïdes.

Ce résultat est identique à celui observé dans les cultures de parapodes mâles évoluant sans hormone cérébrale.

A titre de contre-expérience, on a incorporé dans les mêmes conditions des précipités acétoniques provenant des fractionnements que j'avais réalisés à partir d'autres éléments du vers, (muscles, spermatocytes, jeunes ovocytes). Ils se sont toujours révélés inactifs et incapables de provoquer la maturation précoce des spermatogonies en présence de cerveaux initialement inhibiteurs. Les résultats sont rassemblés dans le tableau IV.

β) Réaction biologique in vivo

L'injection du précipité acétonique actif dans la cavité coelomique de *Perinereis cultrifera* encore dépourvue de produits génitaux permet d'observer son influence au niveau de la régénération postérieure du receveur. Le précipité acétonique est solubilisé dans de l'eau bidistillée et injecté en deux fois à l'aide d'une micro-seringue (Hamilton).

15 jours après la deuxième injection du précipité acétonique, les animaux sont sectionnés au tiers postérieur. Le nombre de segments régénérés est noté 20 jours après l'amputation.

Comme l'indique le tableau V, l'injection du précipité acétonique actif réduit sensiblement les possibilités de régénération chez les opérés. A partir d'une certaine concentration (1,5 mg par animal), la régénération postérieure est totalement inhibée.

Le "précipité acétonique", obtenu par fractionnement des ovocytes submatures isolés, est capable d'inactiver les cerveaux inhibiteurs de *Nereis diversicolor* en culture organotypique, ils ne sont plus alors en mesure de bloquer la maturation des spermatogonies.

TABLEAU IV

culture organotypique de parapodes mâles de <i>Nereis diversicolor</i>		
	état génital	
	initial	après 7 jours de culture
A) <u>parapodes isolés</u>	spermatogonies	spermatozoïdes
B) <u>parapodes associés à un prostomium inhibiteur :</u>		
a-sur milieu ordinaire	spermatogonies	spermatogonies
b-adjonction des produits de fractionnement du contenu de ♀ submatures		
1. adialysat	spermatogonies	spermatogonies
2. solution acétonique	spermatogonies	spermatogonies
3. précipité acétonique	spermatogonies	<u>spermatozoïdes</u>
c-contrôle par adjonction de précipité acétonique d'autres parties du corps des vers		
1. muscles	spermatogonies	spermatogonies
2. spermatocytes	spermatogonies	spermatogonies
3. jeunes ovocytes (<130 µ)	spermatogonies	spermatogonies

Influence des différents constituants obtenus par fractionnement, chez les *Perinereis cultrifera*, sur l'inhibition de la maturation génitale exercée par les prostomiums de *Nereis diversicolor*.



TABLeAU V

quantité totale de précipité acétonique injecté par animal		nombre de segments régénérés 20 jours après l'amputation	état génital final
A) Précipité acétonique du contenu coelomique de femelles submatures	6,6 > quantité > 1,6 mg 28 animaux	0 (sur 28 opérés) 3 seulement ont régénéré 1 pygidium	100 % de sexués
	1,3 mg (6 animaux)	3	pas de produits génitaux
	0,6 mg (7 animaux)	7 à 8	
	0,3 mg (4 animaux)	12	
B) autres précipités acétoniques	1. de muscles (2 mg)	15	14 % de sexués
	2. de spermatocytes (2 mg)	13 à 16	
	3. de jeunes ovocytes (2 mg)	12 à 13	
C) témoins	11 animaux aucune injection	14 à 16	pas de produits génitaux

Influence des divers précipités acétoniques sur la régénération caudale de *Perinereis cultrifera*.

En injection intracoelomique, dans des *Perinereis cultrifera* jeunes, encore indifférenciées sexuellement, "ce précipité acétonique" provoque une épitoquie expérimentale complète et précoce dans 64 % des cas (tableau VI). Les receveurs, devenus épitoques, sont d'une taille très sensiblement inférieure à celle des témoins épitoques naturels (Fig.13). Ils ont subi l'épitoquie avec 2 ans d'avance. Les 3/4 des *Heteronereis* expérimentales sont des mâles présentant toutes les transformations morphologiques de ce sexe : cirres parapodiaux dorsaux crénelés, papilles pygidiales (Fig.14,15,16). Le reste est constitué d'individus sans produits génitaux différenciés. Il s'agit probablement de femelles dont les ovocytes ont dégénéré ainsi que l'a observé PORCHET lors des expériences de déprostomisation (PORCHET, 1969, thèse de 3^e cycle), c'est à dire lorsque les ovocytes évoluent sans conditionnement hormonal.

d) Conclusions

Tous ces résultats montrent que les femelles submatures possèdent dans leur cavité coelomique, notamment au niveau des ovocytes submatures, une substance chimique capable d'inhiber la production hormonale du prostomium comme l'attestent les résultats obtenus en culture organotypique.

L'injection *in vivo* de cet extrait chimique entraîne, à partir d'un certain seuil de concentration (1,5 mg environ par animal), une absence totale de régénération postérieure. Pour des doses supérieures et renouvelées chaque semaine, ce précipité acétonique provoque une épitoquie expérimentale chez des *P.cultrifera*, initialement asexuées. Cette hétéronéréidation est complète et précoce.

Ce dernier résultat nous permet d'admettre que la substance "Feed-Back" se retrouve non pas dans l'ensemble du liquide coelomique, mais au niveau d'une fraction bien particulière : la fraction ovocytaire submature.

2° - Purification partielle du "précipité acétonique" d'ovocytes submatures et résultats biologiques.

Nous avons obtenu de bonnes séparations avec la chromatographie sur colonne de Sephadex G-25 "super fine" (*). Les diagrammes montrent que le "précipité acétonique" ovocytaire donne 5 fractions principales (Fig.17). L'activité biologique de chacune d'elles a été contrôlée en culture organotypique.

Seule la fraction 4 présente une activité biologique très nette. Placée dans le milieu de culture (*Nereis diversicolor*) ou injectée dans le coelome (*Perinereis cultrifera* sexuellement ^{indifférenciées}), elle détermine l'absence d'inhibition endocrine cérébrale sur le déclenchement de la spermatogenèse et de l'épitoquie.

* (voir matériel et méthodes)

TABLEAU VI

	pourcentage d'épitoquie après					
	40 j	50 j	60 j	80 j	100 j	150 j
témoins (30 animaux) aucune injection	0	0	0	0	0	0
<i>Perinereis cultrifera</i> + injection hebdomadaire de 1 à 2 mg de précipité acétonique (40 animaux)	4	12	36	46	62	64
<i>Perinereis cultrifera</i> décérébrés (40 animaux)	83	100	100	100	100	100

Efficacité du "précipité acétonique" d'ovocytes isolés, à induire l'épitoquie expérimentale, chez des *Perinereis cultrifera* sexuellement indifférenciés.



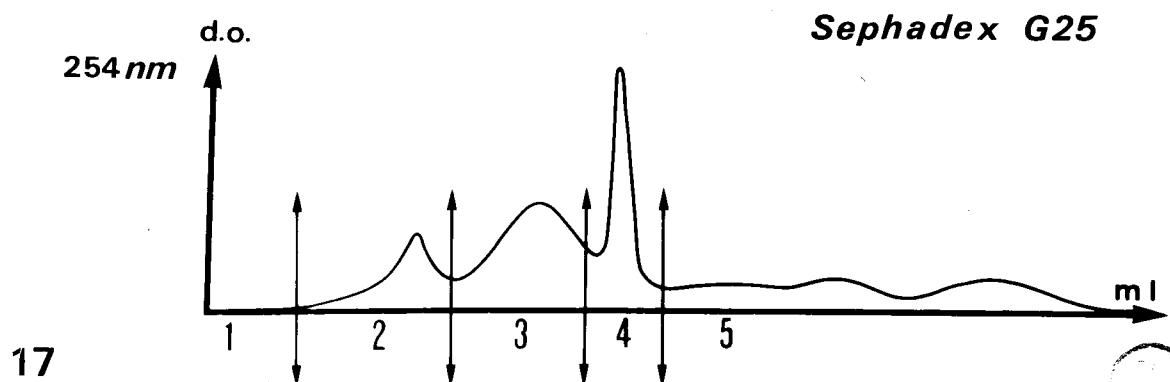
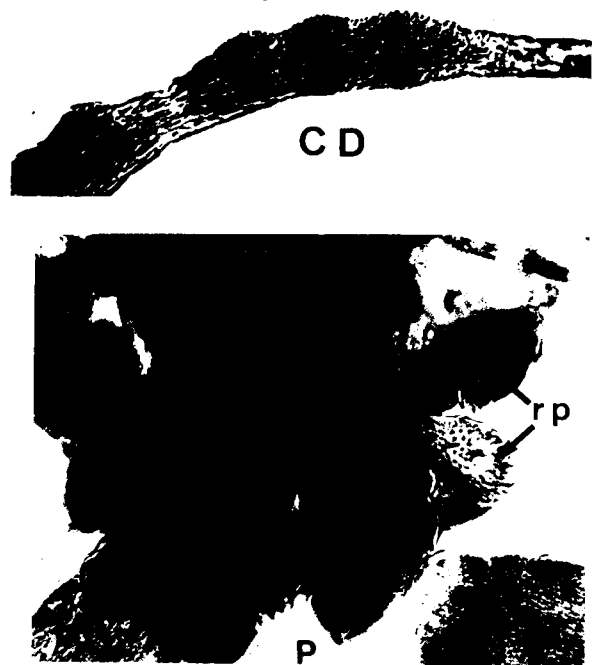
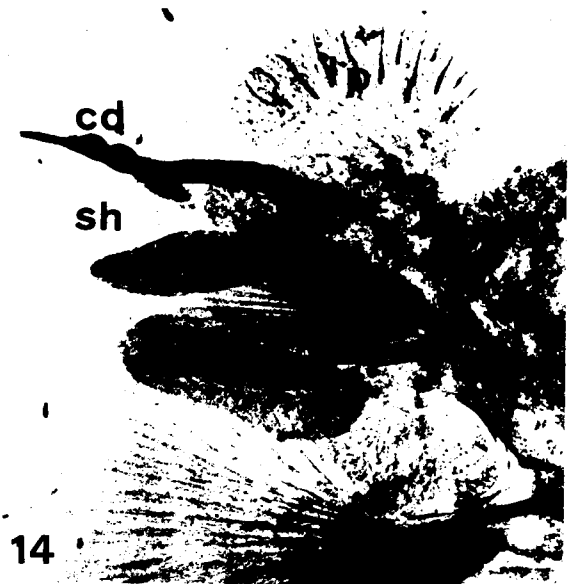
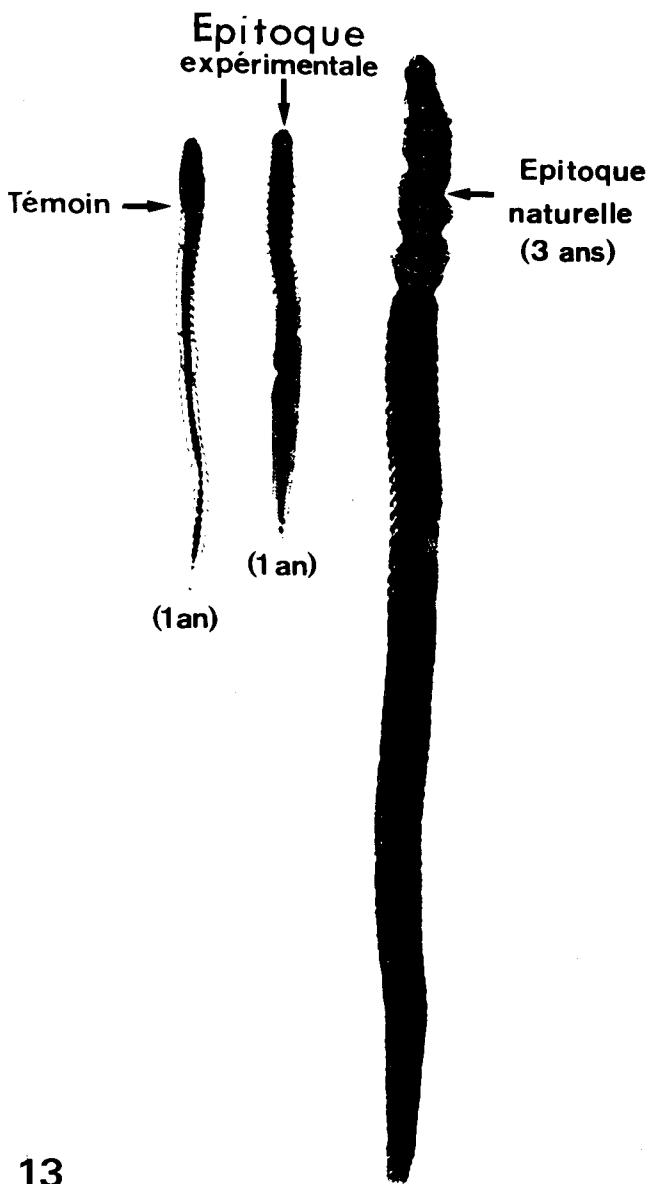
Figure 13 - Epitoquie précoce après injection de la substance "feed-back" dans le coelome de *P.cultrifera* sexuellement indifférenciées; T 1 : témoin sexuellement indifférencié (animal de 1 an); T 2 : témoin épitoque naturel (animal de 3 ans); Exp : épitoquie précoce (animal de 1 an).

Figures 14 et 15 : Parapode transformé après injection de la substance ovocytaire active. Chez les épitoques mâles ainsi obtenus présence de lamelles parapodiales (L.p.), de soies hétéronéréidiennes (S.h.) et du cirre dorsal avec crénelures (c.d.).

Figure 16 : Chez les mêmes opérés présence d'une rosette pygidiale (R.p.), caractère sexuel secondaire.

Figure 17 : Diagramme de la séparation du "précipité acétonique" d'ovocytes sub-matures après chromatographie sur gel de "séphadex G-25 super-fine". Le pic 4 présente une grande activité biologique de rétro-inhibition.





Comme l'injection du "précipité acétonique" total, celle de la fraction 4 détermine un blocage de la régénération caudale (tableau VII). Lors d'injections à des concentrations moyennes (0,4 à 0,6 mg par animal) PORCHET a observé dans I/3 des cas, la présence d'un régénérat hypomorphe dépourvu de parapodes et de cirres anaux.

BOILLY-MARER et COMBAZ, 1970, obtiennent de tels régénérats qu'ils qualifient d'"aneurogéniques", après ablation de la chaîne nerveuse ventrale, dans la zone de la section. L'injection de notre substance a les mêmes effets.

3° - Purification par chromatographie et par électrophorèse sur papier.

a) Matériel et méthode.

La fraction 4 est purifiée par chromatographie sur papier Whatman n° 1 * dans le système solvant n-butanol / acide acétique / eau (4 : 1 : 5 par volume) pendant 39 h à 20°C. Le chromatogramme est révélé par la ninhydrine à 1 % : on obtient 9 taches de t 1 à t 9.

Entre la tache 4 et la tache 5, il existe une tache détectée par la lumière ultra-violette à 254 nm et 280 nm. Dans la zone de la tache 2, un spot fluorescent est observé.

Les taches U.V. positive et fluorescente sont éluées par 0,01 et 0,1 N d'H Cl. En outre, chaque tache, qu'elle soit révélée par la ninhydrine ou par la lumière ultra-violette, est éluee par l'eau puis lyophilisée.

Nous avons réalisé l'analyse par électrophorèse sur papier Whatman n°2 à pH 3,9, en tampon pyridine/acide acétique/ eau (3 : 10 : 387 par volume) sous 12 v/cm pendant 4 heures.

L'électrophorégramme est révélé par la ninhydrine à 1 % dans l'acétone

Que ce soit pour l'une ou l'autre technique, les différentes taches sont récupérées après chromatographie et électrophorèse préparatives *.

b) Résultats et conclusions

α) Purification par chromatographie préparative sur papier

Nous avons vu que la fraction 4 s'était divisée en 9 taches numérotées de 1 à 9.

Seules les taches 3, 4 et 5, positives à la ninhydrine, bloquent l'activité endocrine des cerveaux. Cependant cette méthode ne donne pas une purification satisfaisante puisque l'activité biologique se répartit sur 3 zones d'élution (Fig.18).

β) Purification par électrophorèse préparative à pH 3,9

Après élution et lyophilisation des taches 3,4 et 5, celles-ci sont reprises par de l'eau distillée et subissent une électrophorèse à pH 3,9

* (voir matériel et méthodes)

TABLEAU VII

	quantité totale de fraction 4 injectée par animal (en mg)	nombre de segments régénérés 20 jours après l'amputation
témoins amputés sans injection (15 animaux)	0	13 à 16
expérimentés amputés + injection (30 animaux)	$\geq$ 1 mg 0,6 mg 0,4 mg 0,2 mg 0,1 mg	0 0 4 9 à 11 12 à 14

Efficacité de la fraction 4 obtenue par chromatographie sur colonne de sephadex G-25 "super-fine" du précipité acétonique ovocytaire, à bloquer la régénération caudale de *Perinereis cultrifera*.



pendant 4 h. Puis on révèle avec la ninhydrine à 1 %. On obtient les résultats suivants :

- la tache t 3 se subdivise en tache B et C
- La tache t 4 se divise en B et en une tache C à peine révélée.
- La tache t 5 se répartit en taches A et B (Fig 18)

On constate que les 3 taches t 3, t 4 et t 5 possèdent un composé apparemment commun : l'élément B obtenu par électrophorèse. 150 µg de B suffisent pour inhiber l'activité du cerveau. Ce qui permet d'expliquer le fait que les taches t 3, t 4 et t 5 possèdent chacune l'activité biologique.

c) Estimation de l'activité biologique

L'activité biologique de toutes les fractions obtenues a été estimée en prenant comme référence le temps nécessaire pour arrêter l'inhibition des cerveaux *in vitro* *. Si on donne la valeur 100 à l'activité biologique du précipité acétonique, on peut noter que 85 % de l'activité de la substance "Feed-Back" est retrouvée au niveau de la fraction 4 (fraction obtenue après chromatographie sur G-25 "super-fine").

La fraction 3, qui la précède, possède une légère activité biologique de l'ordre de 15 %, ce qui correspond à la perte d'activité constatée au niveau de la fraction 4 (Fig.19).

Après chromatographie préparative sur papier de la fraction 4 et essais en culture organotypique on constate que les activités des taches t 3 t 4 et t 5, responsables de l'inhibition des cerveaux sont respectivement de 30 %, 34 % et 36 %, donc sensiblement équivalentes.

Par ailleurs on constate, après purification par électrophorèse préparative de t 3, t 4 et t 5 et essais en culture organotypique que c'est la tache commune B qui possède la majeure partie de l'activité biologique, la tache A, une très légère et que C n'en possède aucune.

On peut conclure que la substance responsable de la rétro-inhibition (substance dite "Feed-back") se trouve essentiellement concentrée dans le composé B commun aux taches t 3, t 4 et t 5.

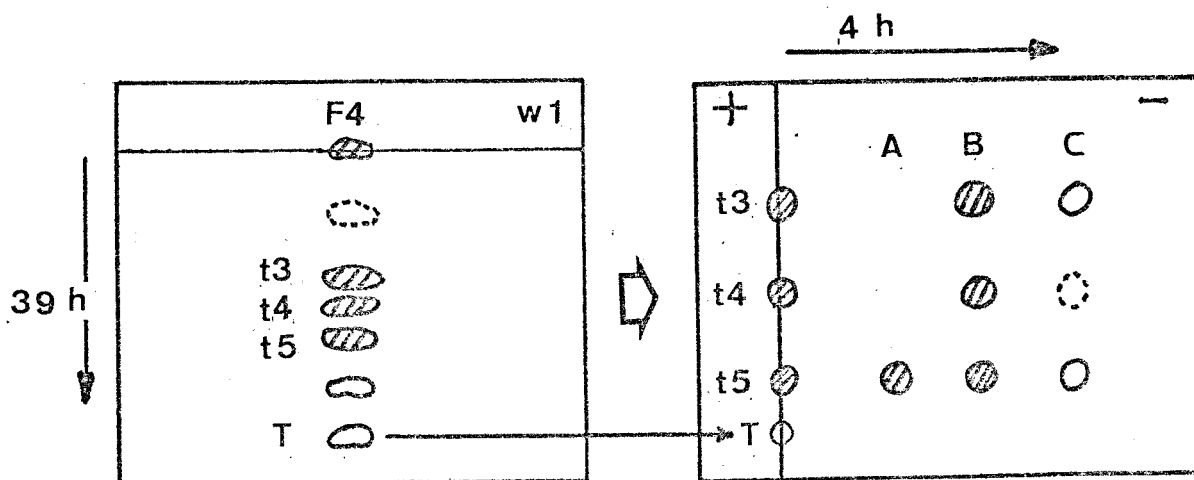
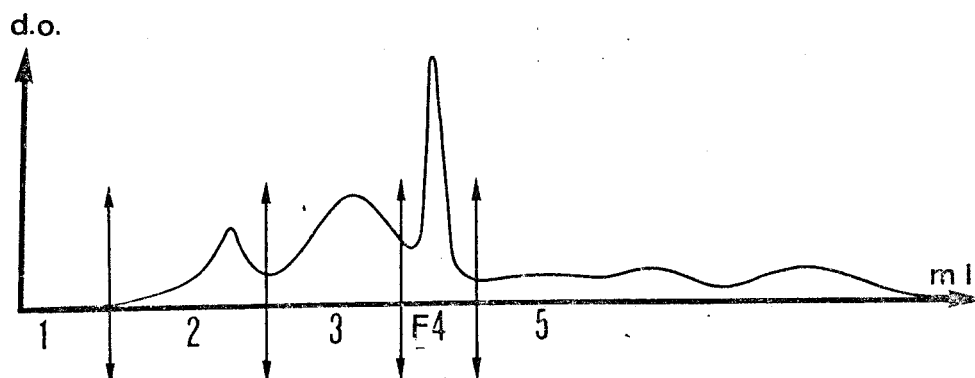
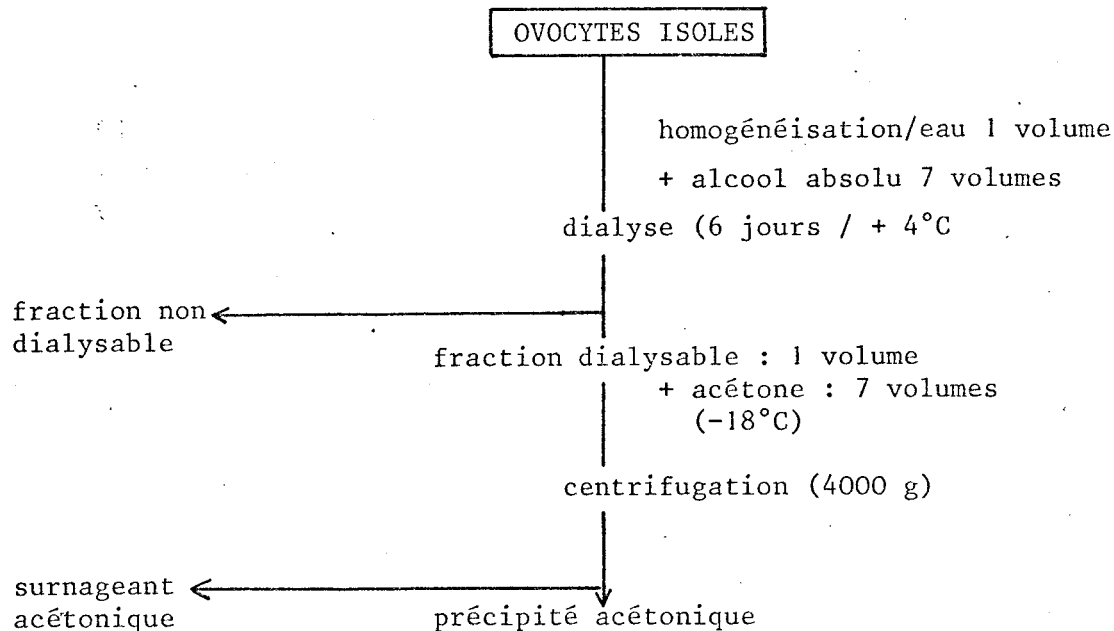
4° - Essais de caractérisation de la substance "Feed-back".

Les premiers renseignements que nous avons sur la substance rétro-inhibitrice sont les suivants :

- elle est dialysable
- elle est retardée par gel de sephadex G-25
- elle est fractionnée par chromatographie sur papier
- elle est révélable par la ninhydrine à 1 %

* (voir chapitre matériel et méthodes).

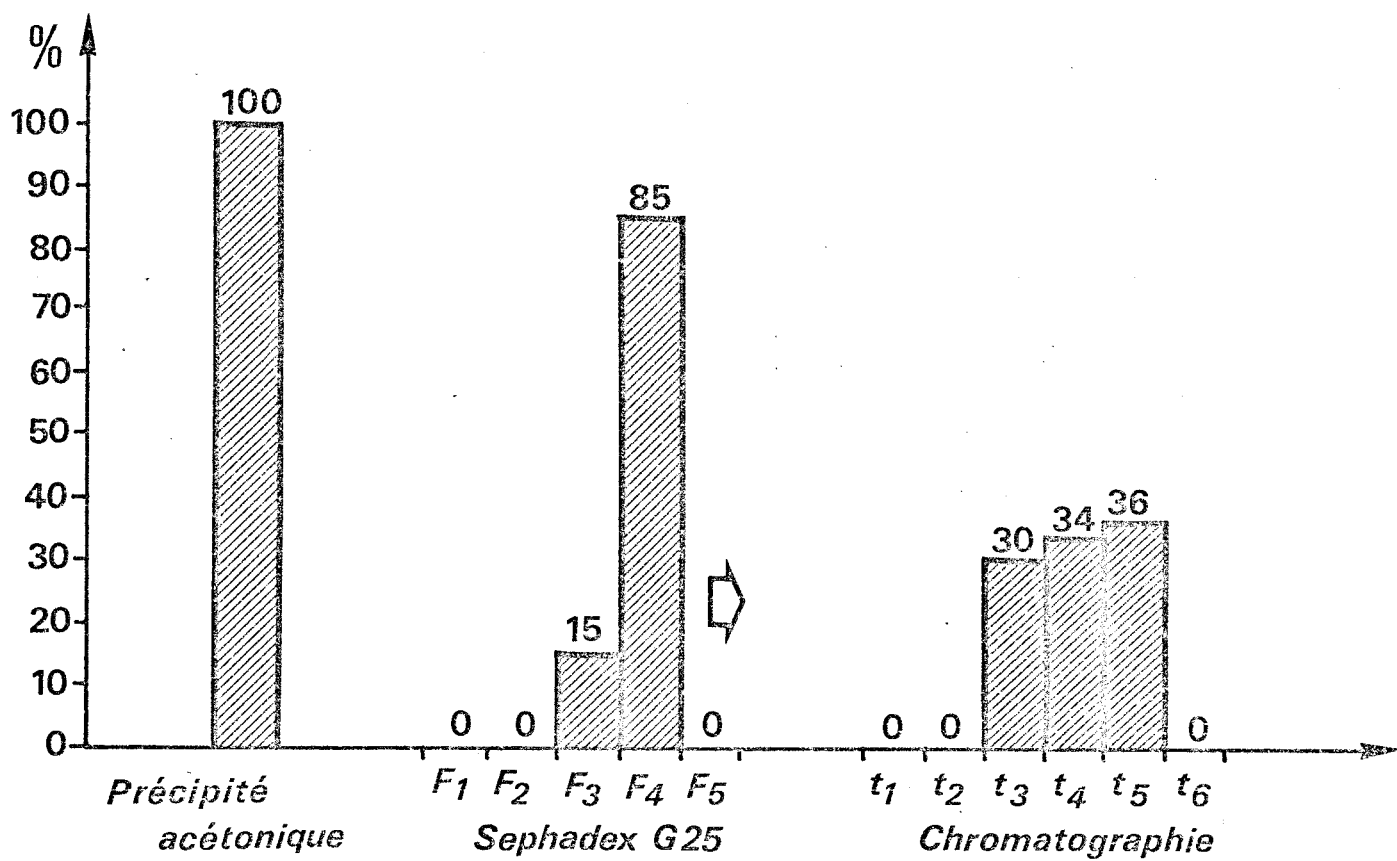
FIGURE 18



Protocole d'obtention de la substance "Feed-back" extraite des ovocytes purifiés de *P. cultrifera*.

En hâchure : zone d'activité biologique.

FIGURE 19



Purification de la substance "Feed-back" chez *Perinereis cultrifera* : mesure de son activité biologique en fonction des différentes fractions obtenues.

Par ailleurs, le traitement de la substance "Feed-Back" par les enzymes protéolytiques, ne supprime pas son activité biologique (Tableau VIII^{*}). On constate qu'après l'action de la pronase, son activité biologique sort renforcée comme si un système "restreignant" eut été détruit par ce traitement pronasique.

Par contre l'action de la trypsine ou de la pepsine amène une perte d'activité d'environ 20 %.

Le fait que les enzymes protéolytiques ne suppriment pas l'activité biologique du "Feed-Back", semblerait indiquer que l'on n'a pas affaire à un peptide classique, (qu'il n'est, en tous cas, sûrement pas linéaire), bien que cette substance soit révélée par la ninhydrine.

Après un traitement par la chaleur (*), (80-90°C), pendant 15 mn, la substance "Feed-Back" ne possède plus aucune activité (Tableau VIII). Ainsi, elle est labile à la chaleur, alors qu'elle était insensible aux protéases classiques. Serait-ce un glycopeptide ?

Des recherches de sucres au niveau de la tache B sont envisagées.

La masse moléculaire du facteur "Feed-back" a été estimée par gel-filtration sur colonne de Sephadex (ANDREW, 1964) et (CARNEGIE, 1965), équilibrée avec une solution de tampon acétate 0,05 M additionnée de 0,4 M de Na Cl à 20°C (KANATANI et Al., 1971).

La même expérience a été réalisée, sur la même colonne, avec comme tampon de l'eau bidistillée.

Dans chacun des cas, le volume d'élution de la fraction active a été comparé, à celui de l'ocytocine (masse moléculaire = 1035), et à celui de la bacitracine (masse moléculaire = 2470).

(Note : Le volume d'élution de l'ocytocine est repéré par essai biologique sur un utérus isolé de rate en proestrus; celui de la bacitracine par enregistrement à 280 nm).

Dans les deux cas la masse moléculaire s'est située entre 1650 et 2000

Que peut - on conclure de ces résultats ?

Ils apparaissent contradictoires mais possèdent néanmoins des points communs.

- La pepsine et la trypsine semblent diminuer l'activité de la substance "Feed-Back" d'environ 20 %.
- Par contre la pronase semble l'augmenter.
- A ce stade de purification la ninhydrine possède toujours une action positive.

* (voir Matériel et Méthodes).

TABLEAU VIII

Précipité acétonique (b) en provenance d'ovocytes submaturs	Temps nécessaire (a) pour arrêter l'activité endocrine du cerveau (en jours)
Témoins (sans traitement)	7 - 8
+ digestion par la pronase (c)	6 - 7
+ digestion par la trypsine (c)	10 - 11
+ digestion par la pepsine (c)	10 - 11
+ traitement par la chaleur	perte totale de l'activité Feed-Back

Effets des digestions enzymatiques et de la chaleur sur l'activité biologique de la substance "Feed-back".

a) après arrêt de l'activité endocrine du cerveau les spermatozoïdes apparaissent dans les cultures. (voir matériel et méthodes).

b) voir figure 18

c) Les enzymes protéolytiques sont éliminés de l'échantillon "Feed-back" par dialyse (voir matériel et méthodes).



Ils m'ont amené à réaliser une première détermination en acides aminés de la tache B. Après hydrolyse acide et analyse à l'auto-analyseur Beckmann , on obtient la composition suivante en acides aminés :

- 7 acides aminés majeurs : les rapports molaires sont alors les suivants (la valine étant prise comme unité) :

asp (2); thr (1); ser (4); glu (3); gly (6); ala (2); val (1).

- D'autres acides aminés existent mais à l'état de trace et n'ont pas été dosés.

A partir de cette première estimation, nous avons l'intention, lorsque le volume de "B" le permettra, d'en peser une quantité déterminée afin de définir avec précision le pourcentage des constituants aminés répartis dans cette fraction.

Discussion générale sur le phénomène de rétro-inhibition hormonale.

On pense généralement que les fonctions biologiques de la régulation présentent un aspect évolutionniste; que les mécanismes régulateurs de nature organique n'appartiennent qu'aux groupes zoologiques évolués (JENKIN, 1970).

En fait des groupes zoologiques primitifs (tels que celui des Annéli-
des) sont particulièrement intéressants car ils nous donnent la possibilité d'analyser un système endocrinien simple et une forme élémentaire de régulation. Et il s'avère de plus en plus probable que la plupart des fonctions biologiques possèdent un mécanisme régulateur.

Chez les Néréidiens, l'activité endocrine cérébrale n'est pas constante. DURCHON, 1952; DURCHON et PORCHET, 1971 ont montré que l'activité hormonale cérébrale décline durant la vie de l'animal.

Cette décroissance de l'inhibition peut être causée par des facteurs biologiques dus à son environnement: (HAUENSCHILD, 1955, 1956, a, b, 1959, 1960, 1963; CLARK, 1960, 1961; DHAINAUT-COURTOIS, 1965; DURCHON, 1967, 1971; ou par une évolution biochimique du milieu interne. L'isolement d'une substance chimique à partir d'ovocytes submatures a permis de montrer l'existence d'une régulation organique de la fonction endocrine cérébrale. Cette substance est capable, suivant sa concentration, d'amener une diminution progressive de l'activité hormonale cérébrale, ou même, de l'arrêter complètement.

Certains travaux expérimentaux renforcent fortement le concept d'un phénomène de rétro-inhibition (phénomène "Feed-Back") chez les Néréidiens.

Ainsi, HAUENSCHILD, 1963, a montré qu'un prostomium inactif, greffé dans la cavité coelomique de jeunes *Platynereis dumerilii*, redevient actif pendant quelques temps.

CLARK et BONNEY, 1960, ont observé que l'amputation des segments postérieurs chez les *Nereis diversicolor* prolonge l'activité endocrine cérébrale.

GOLDING, 1967, a montré qu'un jeune cerveau initialement actif, arrêté de produire son hormone, quand il est greffé dans la cavité coelomique d'un animal submature.

Finalement, HOFMANN, 1974, a redécouvert chez des *Platynereis dumerilii*, le rôle des ovocytes submatures dans la levée de l'inhibition cérébrale.

On pouvait encore se demander : le mécanisme de rétro-inhibition n'agit-il que sur le cerveau comme cela a été démontré précédemment ?

BOILLY-MARER et COMBAZ, 1970, et COMBAZ, 1976, ont montré qu'un animal avec son cerveau mais sans sa chaîne nerveuse ventrale, produit dans la zone d'amputation, un régénérat hypomorphe et non segmenté, désigné par ces auteurs

sous le terme "d'aneurogène". Le même résultat est obtenu lorsqu'on injecte la fraction 4 à de jeunes *Perinereis cultrifera* (à la concentration de 0,4 à 0,6 mg).

Le mécanisme de la rétro-inhibition dû à la substance "Feed-Back" influence toutes les fonctions hormonales du prostomium : (inhibition de l'épitoquie, stimulation de la régénération des segments postérieurs), ce qui nous amène à penser que l'hormone cérébrale est probablement unique.

Ainsi, il apparaît que chez les Néréidiens, deux processus contrôlent l'évolution de l'ovogenèse : une activité endocrine issue du cerveau et sa régulation par une rétro-inhibition qui trouve son origine au sein des ovocytes

Il se crée un "équilibre" entre les différents niveaux d'inhibition du cerveau et les différents stades de maturation des ovocytes. Ces deux facteurs se contrôlent l'un l'autre et nous permettent de mieux comprendre la gamétogenèse femelle.

DEUXIEME PARTIE

ISOLEMENT DU FACTEUR INHIBITEUR DE LA RÉGÉNÉRATION
CHEZ L'ANNÉLIDE OLIGOCHÈTE : *Eisenia foetida*.

INTRODUCTION

L'analyse expérimentale et histologique que MARCEL a exposée dans son mémoire " Contribution à l'étude de facteurs intervenant dans la régénération chez le lombricien *Eisenia foetida* Sav.f.*typica* " (1971), a montré que la régénération était gouvernée par un double mécanisme, trophique et inhibiteur.

Nous allons rapidement rappeler les principaux faits biologiques mis en évidence par cet auteur avant d'aborder les problèmes de l'isolement, de la détermination et de l'évolution de ce facteur inhibiteur.

L'étude expérimentale pratiquée sur des tronçons du corps d'*Eisenia* en culture organotypique, ou " *in vivo*" sur des vers entiers, a permis de montrer que la régénération céphalique ainsi que la régénération caudale sont inhibées par une substance spécifique. Celle-ci est localisée dans le système nerveux central de la région homologue.

MARCEL a montré aussi que la chaîne nerveuse située en arrière du front de section 7/8, jusqu'à la limite du territoire caudal, possède une influence inhibitrice vis à vis de la régénération antérieure à ce niveau. La distribution de l'inhibiteur céphalique se présente donc sous la forme d'un gradient antéro-postérieur dont l'étendue paraît coïncider avec celle du territoire "tête".

D'autre part, MARCEL a pu observer que l'effet trophique de la chaîne nerveuse s'exerce par l'intermédiaire d'une substance hydrosoluble. L'étude comparative de l'action de broyats de ganglions ventraux prélevés à différents niveaux du corps, indique que le facteur trophique est distribué uniformément le long de l'axe céphalo-caudal.

Pour essayer de comprendre le mode d'action des facteurs inhibiteur et trophique, MARCEL a recherché quelles étaient les phases de la morphogenèse céphalique sensibles à leur action.

Aussitôt après la résection de la région céphalique un bouchon cicatriciel se met en place pour disparaître au bout de cinq jours..

Par contre, en présence du facteur inhibiteur, il persiste pendant 3 semaines de culture. Dans ce cas il présente au microscope photonique une structure à peu près normale.

Par conséquent, en présence d'une telle substance, il est susceptible de se former mais non d'être détruit. La comparaison entre son évolution "*in vivo*", en présence des facteurs inhibiteur et trophique et celle au cours de la régénération normale permet de dire que la substance inhibitrice intervient au cours du stade d'histolyse du bouchon cicatriciel. Cette destruction, indispensable pour la suite des processus de régénération, n'a pas lieu, ou

tout au moins est fortement ralentie en présence d'inhibiteur.

Inversement, l'apport de substance trophique accélère l'histolyse du bouchon cicatriciel.

Il semble donc, par conséquent, que l'inhibition porte sur la substance trophique et non directement sur les tissus du blastème.

A partir de ces résultats, MARCEL et moi-même, avons essayé de résoudre les problèmes que posaient l'isolement et la caractérisation du facteur inhibiteur céphalique chez *Eisenia*. (MARCEL s'est principalement chargé des essais biologiques).

CARDON, 1970; MARCEL et CARDON, 1974; CARDON et MARCEL, 1976; MARCEL et CARDON, 1979.

Des études biochimiques analogues, réalisées sur les facteurs inhibiteurs intervenant dans la régénération des invertébrés ont donné, par ailleurs, des résultats divers.

TARDENT, 1960, 1963, montre que ce facteur chez le Coelentéré *Tubularia* est thermostable et de faible poids moléculaire car il est susceptible de dialyser.

Pour ROSE, 1963 a, b; 1966, au contraire, la substance inhibitrice serait constituée chez ce même Coelentéré par des histones.

SMITH, 1963 envisage chez le Polychète *Clymenella torquata*, la mobilité électrophorétique de l'inhibiteur de tête et de l'inhibiteur de queue: les extraits sont également chargés positivement.

LENICQUE et LUNDBLAD, 1966, reprenant ces recherches sur un hydraire *Clava squamata*, estiment que l'inhibition est due à des α et des β histones.

MULLER, 1969, observe que des protéines basiques extraites d' *Hydractinia* bloquent toute régénération.

DURANTE et PUCCIA, 1970; PUCCIA et DURANTE, 1973 chez l'Annélide polychète *Hydroide norvegica* ont pu identifier le facteur inhibiteur de l'opercule comme étant la 5'AMP.

STEELE et LANGE, 1977, caractérisent et purifient la substance inhibant la régénération du cerveau chez la planaire.

Il s'agit d'une substance protéique de poids moléculaire compris entre 2×10^5 et 4×10^5 daltons.

CHAPITRE I

I - CARACTERISATION D'UNE FRACTION DIALYSABLE HYDROSOLUBLE ACTIVE

1° - Méthodes et matériel

Les broyats sont préparés à partir de tronçons prélevés à l'avance, congelés et stockés à - 70 ° C. Les régions céphaliques (7 segments) sont ainsi conservées longtemps sans altération.

L'homogénat obtenu avec l'appareil de Potter, dans de l'eau distillée est centrifugé à 30.000 t/mn pendant 10 minutes (centrifugeuse Spinco, rotor 40).

Le sédiment est repris une seconde fois à l'homogénéiseur en présence d'eau bidistillée et, de nouveau, centrifugé à 30.000 t/mn pendant 10 minutes.

Les deux surnageants sont rassemblés et mis en dialyse à + 4°C pendant 6 jours contre de l'eau bidistillée, renouvelée chaque jour, dans des boudins de cellophane "Nojax 16". (Le boudin de cellophane est préalablement lavé à l'eau bouillante).

On obtient ainsi 2 fractions. L'une qui a filtré au travers de la cellophane, contient les constituants de faible masse moléculaire. Elle est dite fraction "dialysable" ou "micromoléculaire".

L'autre, retenue dans les boudins de dialyse, est constituée de substances de haut poids moléculaire; elle est appelée : fraction "non-dialysable" ou "adialysable".

Les 2 fractions sont réduites de volume, à basse pression, dans l'évaporateur rotatif, dont le bain-marie est réglé à 35°C, puis lyophilisées. Les produits obtenus sont dissous dans de l'eau bidistillée et incorporés au milieu de culture, à la concentration de 2 "équivalents-têtes" par salière.

2° - Essai biologique

Trois lots de culture * sont préparés. Après stérilisation par passage sur filtre "millipore" 0,45 μ , la phase "dialysable" est ajoutée au premier, la phase "non-dialysable" au second.

Le troisième lot, sur milieu standard, sert de témoin. Après trois semaines de culture à 20°C, les résultats sont les suivants : (tableau I).

. La fraction "adialysable" n'a pas présenté d'action : 76% des explants régénèrent une tête.

. Les témoins de leur côté, ont reformé une tête dans 83 % des cas. Morphologiquement ces prestations sont tout à fait normales.

. La fraction "dialysable" par contre, s'est montrée très active. Sur 20 explants, aucune tête n'a régénéré. Nous avons toutefois, au bout de 15 jours, retrouvé 3 vers qui présentaient un petit blastème.

* (voir Matériel et Méthodes)

TABLEAU I

fractions	nombre d'explants	nombre de régénérats	% de régénération	observation
dialysable	20	0	0	3 blastèmes
non-dialysable	21	16	76	
témoins	18	15	83	

Influence des fractions "dialysable" et "non-dialysable" de l'homogénat de têtes sur la régénération céphalique *in vitro* (trois semaines de culture).



Les autres tronçons ne possédaient qu'un bouchon cicatriciel.

3° - Conclusion

Devant ces résultats, particulièrement nets, nous pouvons conclure que le facteur inhibiteur de la régénération céphalique est hydrosoluble et qu'il se trouve dans la fraction "dialysable" de l'homogénat de têtes.

Il est donc constitué par une substance de faible masse moléculaire.

II - ISOLEMENT DU FACTEUR INHIBITEUR PAR PRECIPITATION A L'ETHANOL D'UN HOMOGENAT DE TETES

Tenant compte des résultats préliminaires, nous avons préféré isoler le facteur inhibiteur (par précipitation à l'éthanol), de l'homogénat de têtes, de façon à éviter les inconvénients de l'emploi de la dialyse..

.(Risques de dégradation de la substance active durant le temps de la dialyse et de contaminations bactériennes.

. Manutention de grands volumes pour de faibles quantités de départ).

1° - Méthode d'extraction

2 000 têtes d'*Eisenia foetida* sont prélevées et traitées comme cela a été décrit précédemment : (homogénéisation dans l'eau, centrifugation à 30 000 t/mn, récupération du surnageant aqueux).

Le surnageant obtenu est traité par 7 fois son volume d'éthanol refroidi à - 20°C. Après un repos de 10 à 15 minutes en chambre froide à - 20°C, on centrifuge pendant 15 minutes à 4 000 g.

La solution éthanolique est recueillie et le sédiment est de nouveau travaillé comme précédemment par un volume d'eau distillée et par 7 volumes d'éthanol. Ce deuxième surnageant éthanolique est joint au premier (Tableau II)

On obtient ainsi une solution eau/éthanol.

L'éthanol est éliminé à l'évaporateur rotatif sous vide, à froid.

Le résidu aqueux est lyophilisé et donne la fraction "micromoléculaire".

2° - Essai biologique de la fraction "micromoléculaire".

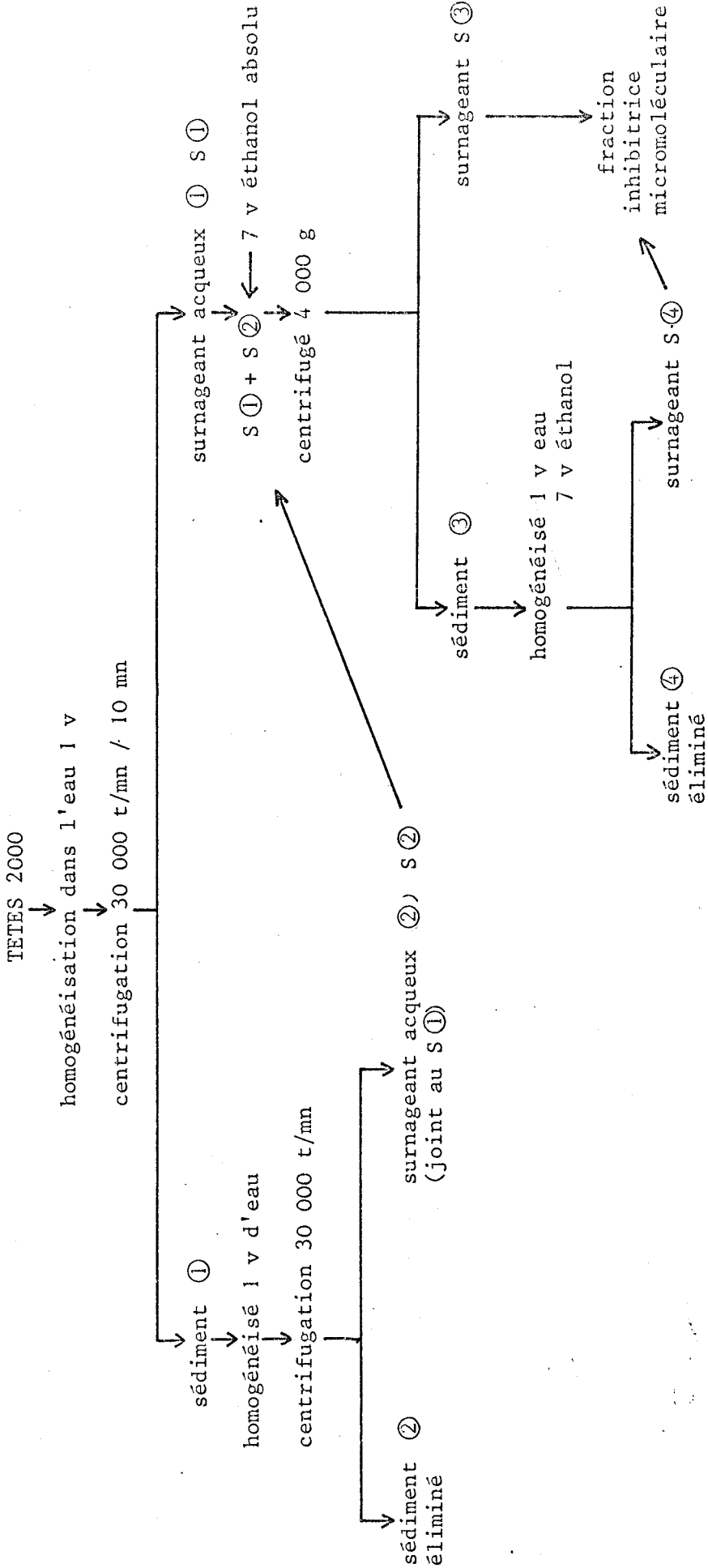
La fraction "micromoléculaire" est dissoute dans de l'eau bidistillée et incorporée au milieu de culture à la concentration de "2 équivalents-têtes " par salière * .

Cette fraction "micromoléculaire" possède la même activité inhibitrice que la fraction "dialysable" essayée précédemment.

* (voir matériel et méthodes).

TABLEAU II

Isolement de la fraction micromoléculaire



3° - Conclusion

L'obtention rapide d'une fraction "micromoléculaire" possédant une activité biologique identique et un état de pureté équivalent à la fraction "dialysable" nous a incité à choisir ce mode opératoire pour isoler le matériau brut responsable de l'activité inhibitrice.

III - FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION INHIBITRICE MICROMOLÉCULAIRE.

Deux essais de purification du facteur inhibiteur ont été réalisés :

- par fractionnement sur résine échangeuses d'ions
- par tamisage moléculaire sur gel de sephadex

A - Chromatographie sur échangeurs d'ions

1°) matériel et méthode

La solution micromoléculaire (30 mg de lyophilisat dans 50 ml d'eau bidistillée) est passée successivement sur une colonne d'échangeur de cations ("Dowex 50x8", mesh 25-30, forme acide, 1,9 x 35cm) puis sur une colonne d'échangeur d'anions ("Duolite A 102 D, mesh 25-50, forme formiate, 1,9 x 35 cm) (Tableau III).

Ce mode opératoire permet de fractionner les constituants organiques en composés "neutre ", "basique " et "acide".

Les eaux de lavage ajoutées au premier liquide effluent représentent la fraction "neutre".

La fraction "basique" est éluée de l'échangeur de cations par l'ammoniaque à 5 %.

La fraction "acide" est obtenue par passage d'acide formique à 5 % sur l'échangeur d'anions.

2°) essai biologique

Les résultats sont indiqués sur le tableau IV. Le mélange des 3 fractions possède une activité inhibitrice tout à fait normale.

La fraction "acide" est biologiquement inactive.

Le facteur inhibiteur est essentiellement localisé dans la fraction "neutre".

La fraction "basique" présente, elle aussi, une activité inhibitrice, plus faible néanmoins que celle de la fraction "neutre".

B - Fractionnement par tamisage moléculaire

1°) matériel et méthode

On utilise successivement une colonne de sephadex G-25 "fine" (1,3 x 100 cm) et une colonne de G-50 "médium" (2,3 x 50 cm).

TABLEAU III

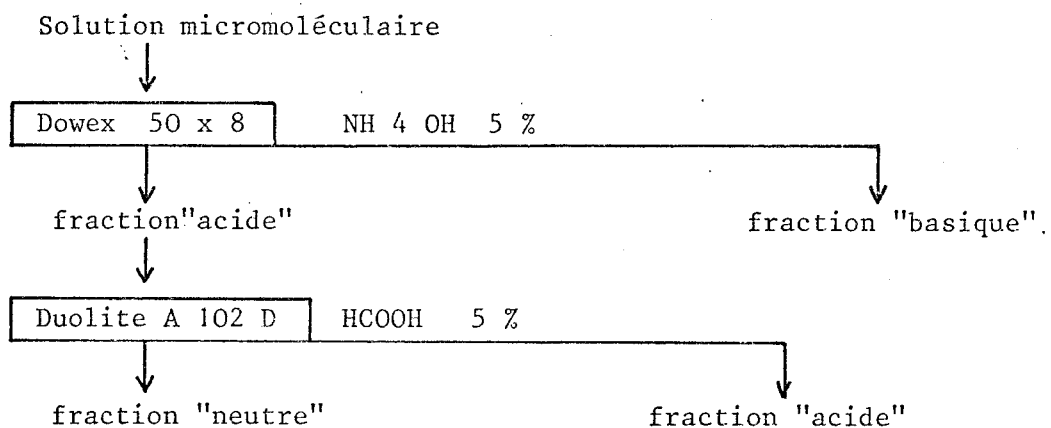


Schéma de fractionnement de la solution micromoléculaire sur des échangeurs d'ions.



TABLEAU IV

fractions	nombre d'explants	Régénérats	% de régénération
neutre	19	3	16
acide	19	13	68
basique	18	8	44
acide+basique + neutre	15	4	26
témoins	20	15	75

Fractionnement sur "échangeurs d'ions".



La vitesse d'élution est de 6 ml/heure. Dans chaque cas, la courbe d'absorption à 280 nm est enregistrée.

2°) résultats et conclusions

a) Chromatographie sur G-25 "fine"

Les différentes étapes de la purification sont schématisées sur la Fig.1. La fraction micromoléculaire est chromatographiée sur G-25 "fine". Le tampon d'élution est une solution 0,1 M de Na Cl.

On obtient 6 fractions (Fig.2)

Après dessalage par précipitation à l'éthanol et élimination de ce dernier, chaque fraction est lyophilisée pour être essayée en culture.

b) Résultats biologiques

Seule la fraction 5 (dénommée A) possède une intense activité biologique (Tableau V).

c) Chromatographie sur G-50 "médium"

Après lyophilisation, la fraction A est dissoute dans de l'eau bidistillée et chromatographiée sur sephadex G-50 médium (Fig.3).

L'élution par l'eau permet d'obtenir 6 fractions.

d) Résultats biologiques

L'essai en culture de chaque fraction, après lyophilisation donne les résultats groupés dans le tableau VI .

La fraction 4 (dénommée B) renferme toute l'activité inhibitrice.

IV - PURIFICATION DE LA FRACTION B PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE

1°) Matériel et méthode

La fraction B inhibitrice, est hétérogène en électrophorèse sur papier à pH 3,9 dans le tampon de MICHL, 1951. En effet, après migration électrophorétique et révélation par la ninhydrine à 1 %, elle se sépare en 4 composés numérotés 1 - 2 - 3 - 4 - (Fig.4).

La tache "3" est parfaitement révélée par la ninhydrine à 1 %. Les 3 autres 1, 2 et 4, le sont par la lumière ultraviolette à 260 nm.

Une zone dénommée C (comprise entre les taches 3 et 4) est révélée faiblement par la ninhydrine à 1 % sur l'électrophorégramme.

Partant de ces résultats, nous avons séparé ces 4 composés par électrophorèse préparative sur papier (pH 3,9, tampon de MICHL, 1951).

Les zones 1 - 2 - 3 - 4 et C ont été éluées par l'eau puis lyophilisées.

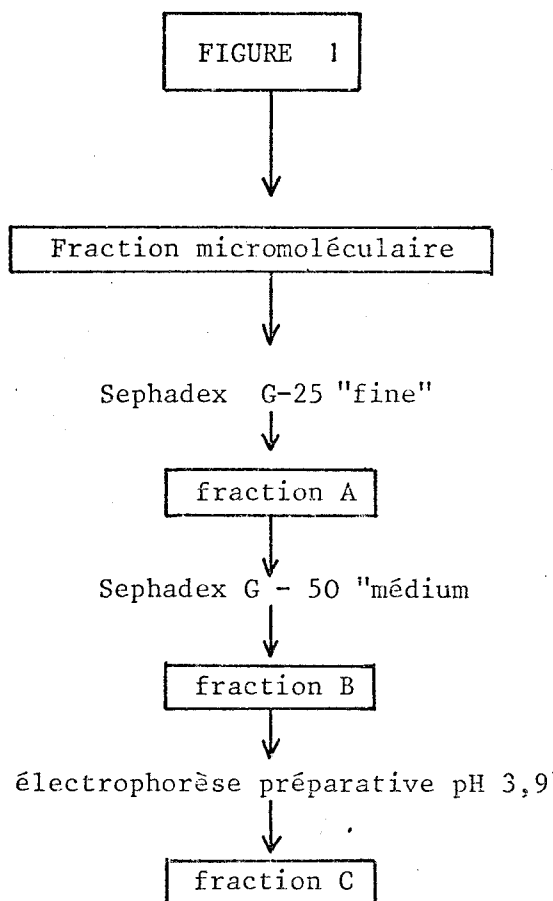


Schéma de fractionnement de la fraction "micromoléculaire" par tamisage moléculaire et électrophorèse préparative.



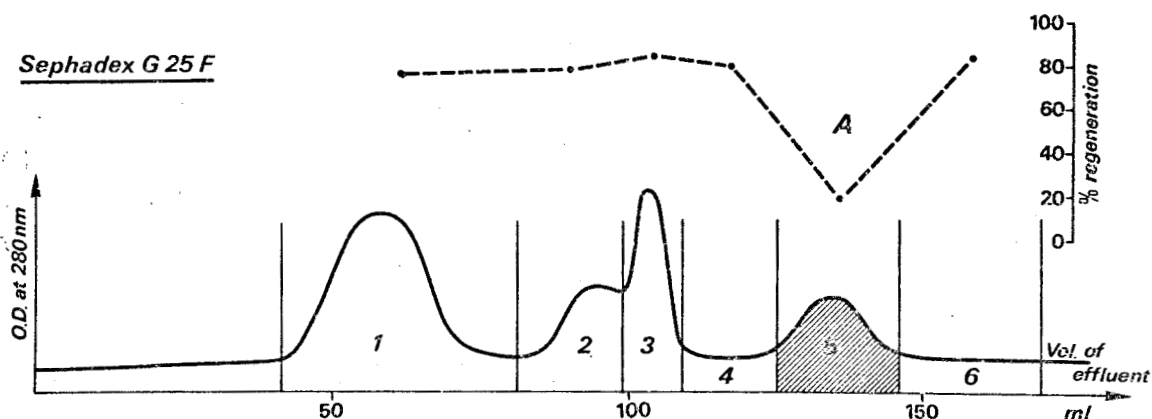


FIGURE 2 : Diagramme d'élution après passage sur G-25 "fine" de la fraction "micromoléculaire".
 Condition expérimentale : 15 mg de fraction "micromoléculaire" en solution dans 0,5 ml de Na Cl 0,1 M; colonne de 1,3 x 100 cm, solution d'élution : Na Cl 0,1M; vitesse d'élution 6 ml/heure; volume des fractions 1,5 ml.

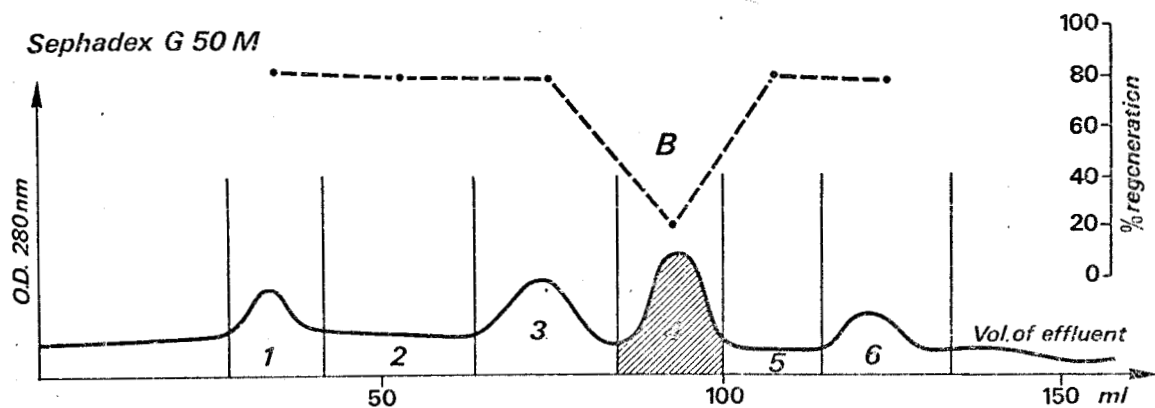


FIGURE 3 : Diagramme d'élution par l'eau après passage sur G-50 "médium" de la fraction A.
 Condition expérimentale : 15 mg de fraction A en solution dans 1 ml d'eau distillée; colonne de 2,3 x 50 cm; vitesse d'élution 6 ml/heure; solution d'élution : eau distillée; volume des fractions 1,5 ml.

TABLEAU V

fractions	nombre de survivants	nombre de régénérats	% de régénérats
1	19	14	73
2	20	15	75
3	18	15	83
4	19	15	79
5	17	3	17
6	17	13	76
témoins	18	15	83

Essai des fractions éluées après chromatographie sur Sephadex G -25 "fine"



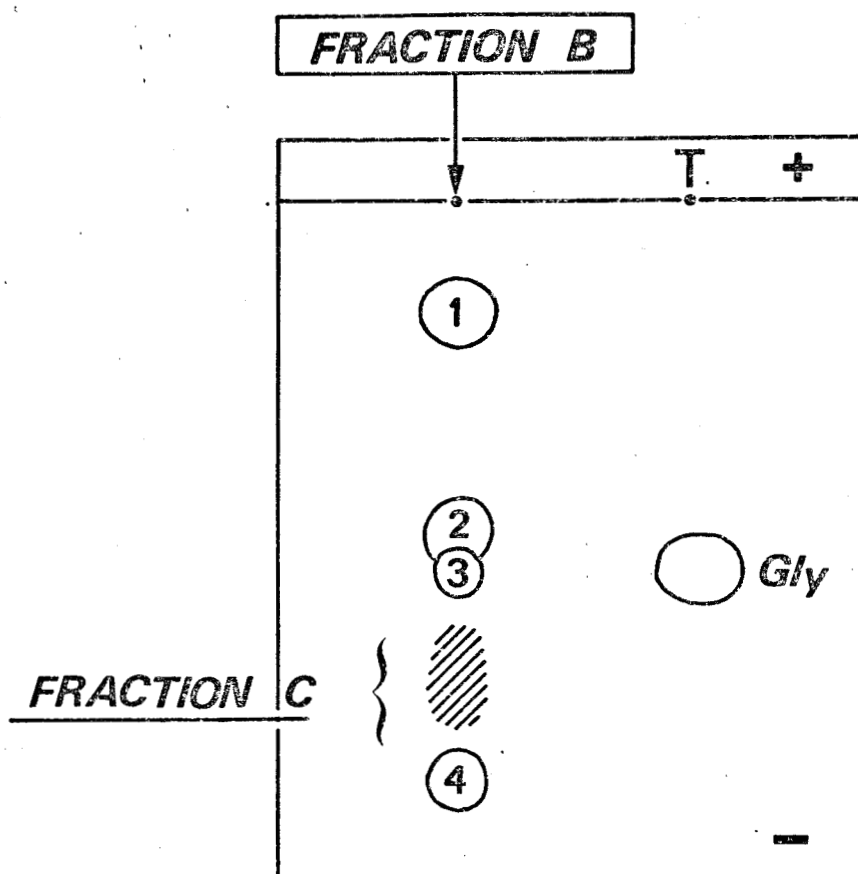
TABLEAU VI

fractions	nombre de survivants	nombre de régénérats	% de régénérats
1	19	15	79
2	17	13	77
3	22	17	77
4	19	4	21
5	20	16	80
6	18	14	78
témoins	15	12	80

Essai des fractions éluées après chromatographie sur Sephadex G -50 "médium".



FIGURE 4



Electrophorèse à pH 3,9 de la fraction B.

Conditions expérimentales 12 v/cm (pendant 4 heures); papier W 1 (28 x 40 cm);
tampon de MICHL, 1951.

2°) Essais biologiques

Les résultats sont répertoriés sur le tableau VII. Les substances ayant migré au niveau des taches 1, 2, 3 et 4 apparaissent biologiquement inactives. Par contre la Zone C renferme, à elle seule, tout le principe inhibiteur (19 % de régénérats).

V - CONCLUSION

Finalement nous avons opté pour la technique de fractionnement par tamisage moléculaire qui permet d'obtenir une activité biologique homogène. La purification par électrophorèse nous fournit une fraction C dans un état de pureté suffisant pour en permettre l'étude chimique et pour jeter les premières bases d'une étude autoradiographique.

TABLEAU VII

fractions	nombre de survivants	nombre de régénérats	% de régénérats
1	24	18	75
2	18	13	72
3	19	14	74
C	21	4	19
4	20	15	
témoins	16	12	75

Essai en culture des fractions éluées après électrophorèse à pH 3,9.



CHAPITRE II

I - DEMONSTRATION DE LA NATURE PEPTIDIQUE DU FACTEUR INHIBITEUR

1° - Matériel et méthode

En vue de préciser la nature chimique du facteur inhibiteur, nous avons soumis la fraction "neutre" isolée sur les résines échangeuses d'ions et qui possède l'essentiel de l'activité inhibitrice de la régénération céphalique, à l'action des enzymes protéolytiques.

Les hydrolyses enzymatiques * ont été effectuées à 37 °C pendant 24 heures, en présence de pronase YAMASHINA et MAKINO, 1962 (rapport enzyme/substrat, 1/50) ajustée à pH 7,8 - 8, de trypsine HIRS et Coll (même rapport) à pH 8,2 et de pepsine SANGER et THOMPSON, 1953 (rapport 1/20) à pH 2.

Dans chaque cas, 20 mg de fraction active ont été utilisés. Après l'arrêt de la réaction, les solutions ont été dialysées 1 nuit, contre de l'eau bidistillée, en vue de séparer l'enzyme du substrat micromoléculaire.

L'activité de chaque fraction, dialysable et adialysable, a été déterminée en culture organotypique, suivant le mode opératoire antérieurement utilisé *.

2° - Résultats biologiques

Les résultats obtenus, après 4 semaines de culture, sont rassemblés dans le tableau VIII.

Les fractions adialysables 2,4 et 6, contaminées par les enzymes, n'ont aucune activité inhibitrice.

On peut noter en outre, que la survie des explants est, dans ce cas, moins bonne que dans les autres séries, vraisemblablement à cause de l'attaque des tissus par les enzymes (environ 40% des cas).

Cependant les taux de régénération sont très comparables à ceux que l'on observe chez les témoins cultivés sans inhibiteur (tableau VIII fraction 7)

Les fractions dialysables qui ont subi l'action de la trypsine (fraction 1) ou de la pronase (fraction 3) ont perdu l'activité inhibitrice qu'elles possédaient à l'état natif. Les pourcentages de régénération (respectivement 79 et 78 %) sont, en effet, du même ordre de grandeur que ceux, relevés chez les témoins (82 %).

Par contre, les explants cultivés sur milieu additionné de la fraction traitée par la pepsine (fraction 5), ne régénèrent que dans 22 % des cas, comme les témoins soumis au produit actif (fraction 8 :21 %).

* (voir chapitre matériel et méthodes)

TABLEAU VIII

fractions	protéinase	nombre d'exp- lants survivants sur 20 mis en culture	nombre de régénérats	% de régénérats par rapport aux survivants
1 dialysat	trypsine	19	15	79
2 adialysat		14	11	79
3 dialysat	pronase	18	14	78
4 adialysat		12	9	75
5 dialysat	pepsine	18	4	22
6 adialysat		12	10	83
7 témoin sans inhibiteur	néant	17	14	82
8 témoin actif	néant	19	4	21

Activité de la fraction inhibitrice de la régénération céphalique après hydrolyses enzymatiques.

Essai en culture organotypique.



3° - Conclusion

On peut conclure de cet essai, que le facteur inhibiteur dont l'activité est détruite par la pronase et par la trypsine, est une substance peptidique, même si la pepsine reste sans action. En effet, le peptide ne renferme peut-être pas les amino-acides dont les liaisons sont coupées par cette dernière enzyme.

II - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR TAMISAGE MOLECULAIRE

1° - Matériel et méthode

La masse moléculaire du facteur inhibiteur a été estimée par gel-filtration sur des colonnes de sephadex (ANDREWS, 1964) équilibrées avec une solution de tampon acétate 0,05 M additionnée de 0,4 M de Na Cl à 20°C (KANATA-NI et al., 1971).

Deux séries d'analyses sont effectuées, respectivement sur sephadex G-25 "fine" (1,3 x 100 cm) et sur sephadex G-50 "médium" (2,3 x 50 cm).

Pour chaque colonne, le volume d'élution de la fraction active est comparé à celui de l'ocytocine* (masse moléculaire = 1035) et à celui de la bacitracine* (masse moléculaire = 2 470).

Les volumes d'élution sont déterminés d'après les courbes d'absorption en lumière ultraviolette (254 et 280 nm). Celui de l'ocytocine est repéré par essai biologique sur un utérus isolé de rate en proestrus.

2° - Résultats

Sur Sephadex G-25 on détermine ainsi une masse moléculaire de 1 950 et sur sephadex G-50 une masse moléculaire de 2 100.

Dans ces conditions, la masse moléculaire du facteur inhibiteur est comprise entre 1 950 et 2 100.

III - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DU FACTEUR INHIBITEUR

1° - Matériel et méthodes

La composition en acides aminés du peptide inhibiteur de la régénération céphalique (P.I.R.C.) a été déterminée à l'auto-analyseur Beckman multichrom.

Pour cela 130 µg de fraction C ont été hydrolysés par l'acide chlorhydrique 5,6 N pendant 24 heures et 48 heures à 105 °C, en présence de témoin norleucine.

* Sigma chemical C°

D'autre part, la méthode de KARKHANIS et al., 1975, appliquée à la fraction C, n'a pas révélé la présence de tryptophane.

2° - Résultats et conclusion

Les diagrammes d'élution obtenus après 24 h et 48 h d'hydrolyse ne montrent pas de différences notables.

En effet, dans les deux cas, dix-huit résidus d'acides aminés sont parfaitement identifiables à côté de 4 autres incertains.

On observe en outre un pic indéterminé de caractère acide élué aussitôt après l'acide cystéique.

A partir de ces résultats nous pouvons déduire la composition suivante, la plus probable, en acides aminés du P I R C (tableau IX) :
acide cystéique⁽¹⁾, acide aspartique (1), thréonine (1), sérine (3), acide glutamique (3), glycocolle (4), alanine (2), valine (1), leucine (1) et histidine (1).

La masse moléculaire de P I R C, calculée d'après cette composition serait donc de 1 757 daltons.

D'autre part, les calculs effectués sur les résultats obtenus par tamisage moléculaire donne une masse d'environ 2 000 daltons.

IV - CONCLUSION

Le P I R C isolé chez *Eisenia foetida* possède une originalité assez grande, par rapport aux différents inhibiteurs isolés actuellement.

Il est de nature peptidique comme les inhibiteurs des hydrires ou des planaires; il migre à pH 3,9, au niveau des acides aminés neutres.

De plus, il est constitué par une petite molécule (M M = 2 000 daltons).

Enfin, bien qu'il ait un comportement comparable à celui de l'inhibiteur d'Hydroïdes, ce n'est pas un nucléotide, mais un peptide.

Par ailleurs, compte tenu de la présence d'un seul résidu de cystéine ce peptide n'est vraisemblablement pas cyclique. Car s'il l'était, son volume d'élution sur gel de sephadex serait tel, qu'il correspondrait à celui d'une molécule dont la masse moléculaire serait anormalement faible (CARNEGIE, 1965) par rapport à celle déterminée par le calcul d'après la composition en acides aminés.

La détermination de la composition en acides aminés n'a pas résolu tous les problèmes.

Le pic inconnu résistant 48 h à l'hydrolyse acide est une impureté éluee en même temps que la fraction active. En effet, la fraction C chromatographiée avant hydrolyse, à l'autoanalyseur, montre la présence de ce même pic.

TABLEAU IX

acides aminés	molarité relative * quantité d'acides aminés	rapports molaires possibles
cy SO 3 H	1,32	1
asp	1,34	1
thr	0,90	1
ser	3,22	3
glu	2,81	3
gly	4,31	4
ala	2,10	2
val	0,58	1
isoleu	0,34	0
leu	0,60	1
tyr	0,16	0
phe	0,35	0
his	0,58	1
arg	0,47	0

Composition en acides aminés du facteur inhibiteur.

* Par rapport à la norleucine (témoin interne), prise pour unité.



De toute façon la substance inconnue doit avoir une très faible masse moléculaire, car les deux méthodes d'évaluation de la masse moléculaire du P.I.R.C. aboutissent à des résultats très proches.

CHAPITRE III

I - PREMIERES DONNEES SUR LA RECHERCHE DU SITE RECEPTEUR DU P.I.R.C

1° - Matériel et méthodes

Pour rechercher le site récepteur du P.I.R.C., de la $[3\text{ H}]$ -leucine et de la $[3\text{ H}]$ -glycine en solution aqueuse à 5 % sont incorporées à 175 vers. (La radioactivité spécifique de ces deux acides aminés est respectivement de 26 et 50 Ci/mM).

Pour cela, les *Eisenia* sont placés dans un cristallisateur contenant 50 ml de la solution $[3\text{H}]$ -glycine et $[3\text{ H}]$ - leucine.

Les animaux sont immergés dans cette solution pendant 24 heures.

La radioactivité totale de la solution est mesurée au compteur à scintillation *, elle est de 720.10^6 c.p.m. Au bout de 24 heures, les vers sont amputés des 7 premiers segments, tandis que les témoins sont sacrifiés pour y vérifier l'incorporation.

Dans ces conditions, on compte $1,5.10^6$ C.p.m. par ver.

Simultanément, la technique autoradiographique (coupes à la paraffine de 5μ , recouvertes d'émulsion Ilford K 5, durée de l'exposition : 6 mois permet l'observation d'un marquage important dans l'épiderme, dans l'épithélium digestif et dans le système nerveux: cerveau (Fig.5) et chaîne ventrale (Fig.6) avec en particulier une grande densité de grains d'argent au niveau de certains péricaryons (flèches sur la Fig.6).

Les acides aminés tritiés ont été incorporés, tout particulièrement dans le système nerveux des vers.

A partir de ces animaux "marqués" on extrait le facteur inhibiteur qui se trouve ainsi marqué, lui aussi. Finalement on isole la fraction C qui possède une radioactivité de 1340 c.p.m.

Elle est alors injectée dans la cavité coelomique de la région antérieure d'une série de vers. Après 24 heures, ces *Eisenia* sont sacrifiés.

Les uns sont disséqués pour prélever le système nerveux (cerveaux + chaîne). Après avoir subi l'action de l'acide trichloracétique à 10 % (24 h à + 4°C), les échantillons sont lavés à l'alcool à 96°, à l'acétone et à l'éther. La radioactivité des résidus séchés est mesurée : on compte 300 c.p.m. par individu.

Les autres vers sont fixés pour être étudiés en autoradiographie.

2° - Résultats préliminaires

Après 6 mois d'exposition, les préparations sont révélées. On observe des grains d'argent uniquement au niveau de certaines cellules, aux artefacts

* Spectrophotomètre à scintillation liquide intertechnique SL 30

et bruits de fond près, situées de part et d'autre de la région antérieure de chaque ganglion ventral (Fig.7).

La disposition et le nombre de ces grains d'argent laissent penser qu'ils indiquent la présence de zones radioactives. Ils semblent en particulier être situés à la périphérie de certains de ces neurones (Fig.8).

Ces premiers résultats permettent donc de dire que certaines cellules sécrétrices de la chaîne nerveuse sont probablement les cellules cibles du P.I.R.C.

II - CONCLUSION

Le problème du site récepteur du P.I.R.C. est posé. Il est possible que la substance marquée soit l'objet d'une capture de la part des cellules nerveuses qui élaborent ou contiennent l'inhibiteur. Cette interprétation ne semble pas devoir être retenue. En effet, les images microscopiques montrent que le marquage est souvent situé à la périphérie des cellules, ce qui peut laisser supposer que la substance inhibitrice se fixe sur la membrane cellulaire.

D'autre part, le ganglion cérébroïde est la source la plus importante du P.I.R.C. Or aucune radioactivité n'y est décelée, contrairement à ce qui devrait se produire si l'inhibiteur marqué, était capturé.

Enfin, le traitement à l'ACTA précipite les grosses molécules, tandis que les micro-molécules sont éliminées par les différents lavages. Simplement capturé le $[3\text{ H}]$ -P.I.R.C., petite molécule soluble devrait disparaître. Or on retrouve l'essentiel de la radioactivité malgré ce traitement. On peut donc admettre que c'est bien le site récepteur qui est ainsi mis en évidence.

Figure 5 : Incorporation d' $[^3\text{H}]$ - Leucine et d' $[^3\text{H}]$ -glycine dans le ganglion cérébroïde (cerveau).

Figure 6 : Incorporation d' $[^3\text{H}]$ - leucine et $[^3\text{H}]$ -glycine dans la chaîne nerveuse. Accumulation de particules d'argent dans quelques neurones (flèches).

Figure 7 : Injection du peptide inhibiteur marqué. Radioactivité au niveau de quelques neurones de la chaîne nerveuse (cercle).

Figure 8 : Injection du peptide inhibiteur marqué. Particules d'argent autour des cellules de la chaîne nerveuse (cercle).



CONCLUSIONS

Le P.I.R.C. de *Eisenia foetida* a donc pu être identifié.

Il s'agit d'un peptide vraisemblablement linéaire, (MM : 2000 daltons environ), dont la composition probable en acides aminés est de 18 résidus.

Des analyses ultérieures tendront à vérifier l'état de pureté de la fraction C, par électrophorèse de haut voltage et à pH très acide, ainsi qu'à pH basique.

Néanmoins le degré de pureté atteint a déjà été suffisant pour montrer que le site-récepteur du P.I.R.C. semble se trouver sur la membrane plasmique de certains neurones sécréteurs de la chaîne nerveuse.

Or, on sait que de tels neurones présentent un cycle sécrétoire en liaison avec la régénération (MARCEL, 1973). Le P.I.R.C. synthétisé au cours de la régénération de la tête par le système nerveux, pourrait agir par rétroaction sur ces neurones sécréteurs.

Enfin des recherches d'autoradiographie à haute résolution, permettront de préciser ce site récepteur.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les recherches que nous avons poursuivies dans les laboratoires de chimie biologique et de biologie animale, ont abouti à l'isolement :

Chez les Néréidiens, Annélides polychètes

- d'une fraction hormonale, active, inhibitrice de la gamétogenèse mâle,
- du facteur "Feed-back" responsable de la régulation de cette hormone inhibitrice

Chez les Annélides oligochètes (*Eisenia foetida*)

- du principe actif inhibiteur de la régénération céphalique.

L'isolement de la fraction hormonale inhibitrice a été réalisé à partir de lots de cerveaux prélevés sur des *Nereis diversicolor* immatures, en utilisant différents procédés d'extraction et de fractionnement qui se sont avérés plus ou moins efficaces.

- Le premier consiste en une extraction méthanolique suivie d'un fractionnement sur résines échangeuses d'ions.
- Le second, en une extraction aqueuse suivie d'un fractionnement par tamisage moléculaire,
- Le dernier, en une extraction acétonique.

Nos résultats permettent d'avancer les conclusions suivantes :

L'extraction acétonique ne peut être retenue, du moins pour l'hormone inhibitrice, car elle conduit à une perte totale de l'activité biologique.

L'extraction méthanolique des cerveaux fournit trois fractions (macromoléculaire, lipidique et micromoléculaire) et seule la fraction micromoléculaire possède une activité biologique *in vivo* et *in vitro*.

L'extraction aqueuse fournit une fraction micromoléculaire analogue à la précédente. Cependant cette méthode comporte des limites d'utilisation dans la mesure où elle n'est applicable qu'à des prostomiums isolés.

Le passage de l'extrait micromoléculaire, sur des colonnes de résines échangeuses de cations et d'anions, nous a conduit à localiser l'activité biologique dans la fraction dite "neutre" qui n'est pas fixée sur les deux types de résines. Toutefois la méthode de purification sur résines échangeuses d'ions provoquant une perte d'activité importante de la fraction micromoléculaire, nous l'avons abandonnée au profit d'un fractionnement plus doux : le tamisage moléculaire.

Ce procédé de fractionnement et de sous-fractionnement par chromatographie de gel - filtration nous a donné deux fractions "5 et 6" très actives. Une étude plus poussée nous a révélé d'une part, qu'elles ne renfermaient qu'une

partie du principe actif car en réalité l'activité biologique se situait entre ces deux pics et que d'autre part l'hormone n'absorbait pas en lumière ultraviolette.

La fraction hormonale, annexée aux pics "5 et 6", est extraite, d'une manière très satisfaisante, par chromatographie préparative sur papier.

Cette hormone inhibitrice possède une faible masse moléculaire (2100 à 2300 daltons).

Bien qu'elle soit issue de cellules neurosécrétrices caractérisées par la sécrétion d'un matériel peptidique, (FRONTALI et GAINER, 1977), son activité biologique n'est pas détruite par les enzymes protéolytiques, ce qui semblerait indiquer qu'elle n'est pas de nature peptidique classique. Le fait que cette hormone n'absorbe pas la lumière ultraviolette permet de penser qu'elle n'est pas de nature aromatique.

Actuellement une purification par chromatographie en phase liquide est en cours d'étude.

En 1952, DURCHON déclarait ... "quelle est, dans les conditions naturelles, la cause de l'arrêt de la sécrétion encéphalique et donc indirectement de l'épitoquie ? L'injection, à des femelles immatures, de produits génitaux femelles voisins de la maturité, déclenche une épitoquie précoce et fait donc cesser la sécrétion inhibitrice de l'encéphale. Que faut-il entendre par "état de maturation génitale : le facteur prédominant est-il l'accroissement de la masse des produits génitaux ou le changement de composition chimique assez considérable qui correspond à la maturation des gamètes ? ... "

Ainsi dès 1952, le processus de régulation de la production neurohormonal était posé. La réponse à ces questions supposait l'isolement " d'une substance chimique".

PORCHET en 1967, 1969, 1970, 1972, démontrait le rôle joué par les ovocytes submatures dans l'arrêt de l'inhibition cérébrale chez *P.cultrifera*.

A partir du même matériel, nous sommes arrivés ensuite à isoler et à purifier la substance chimique responsable de cette régulation.

Un fractionnement d'ovocytes submatures par l'éthanol, suivi d'une extraction à l'acétone, fournit un "précipité acétonique" capable d'inactiver *in vitro* et *in vivo* les propriétés hormonales inhibitrices d'un cerveau de *N.diversicolor* et *P.cultrifera*

Si on purifie ce "précipité acétonique" par tamisage moléculaire, on retrouve la totalité de l'activité biologique au niveau d'une fraction unique : "la fraction IV". Celle-ci est chromatographiée sur papier W 3 et fournit 3 taches actives à 30 % chacune; purifiées par électrophorèse elles donnent une tache commune qui, isolée, possède l'activité biologique du départ.

En effet, cette substance, dite "Feed-Back", est capable, selon sa concentration, de ralentir l'activité hormonale du cerveau ou de l'arrêter complètement. Dans ce dernier cas, il est possible d'induire l'épitoquie complète chez de jeunes animaux, initialement dépourvus de produits génitaux mais possédant leur cerveau donc leur centre endocrine.

Chez les femelles, la simple injection intracoelomique (PORCHET, 1972) de la substance "Feed-back" permet d'obtenir les mêmes effets qu'une décérébration : maturation ou dégénérescence ovocytaire, selon la taille des ovocytes.

Cette substance est absente (ou inactive) dans les cellules germinales jeunes; elle se trouve essentiellement dans les ovocytes submatures ou matures elle possède une masse moléculaire située entre 1650 et 2000 daltons; enfin labile à la chaleur, elle réagit à la ninhydrine mais est insensible aux protéases classiques.

En 1967, DURCHON écrivait à propos du rôle du système nerveux dans la régénération chez les Annélides ... "le but à atteindre est triple : isoler les principes actifs responsables, localiser l'origine, en étudier les effets à l'échelle cellulaire".

Nous avons essayé en étroite collaboration avec MARCEL de suivre ces directives.

Tout d'abord nous avons résolu les problèmes de l'isolement, de la purification et de la détermination du principe inhibiteur, responsable de la régulation de la régénération de la tête chez l'Oligochète lombricien *E. foetida*.

Nous avons pu montrer que chez cet annélide oligochète, le facteur inhibiteur était un peptide dont la masse moléculaire était de l'ordre de 1950 à 2100 daltons et dont la composition probable était de 18 résidus d'acides-amino.

L'utilisation des radio-isotopes a permis le marquage du peptide inhibiteur dont nous espérons pouvoir suivre le cheminement dans le "tourbillon" métabolique.

Quelles sont les perspectives d'avenir ?

Elles nous avaient été données dès 1967 par DURCHON lorsqu'il déclarait: ... " Il est cependant certain, que dans l'état actuel de nos connaissances, de nouvelles recherches s'avèrent nécessaires. Les techniques employées ont fait leurs preuves, atteint leur but; elles devront être revues et adaptées pour franchir une nouvelle étape "...

Il est indispensable que la neuroendocrinologie des invertébrés, et en particulier des Annélides, cesse d'être purement descriptive, pour devenir biochimique. Il faut maintenant essayer d'obtenir une analyse moléculaire de la fonction neurohormonale.

Nous espérons, avec ce mémoire, avoir jeté les prémices d'une telle endocrinologie.

TECHNIQUES ET METHODOLOGIE

Nous avons rassemblé dans ce chapitre les détails techniques et méthodologiques se rapportant, aux "Matériel et méthodes" décrits dans ce mémoire de façon à ne pas surcharger le texte.

PLAN

I - Le matériel biologique

- 1° chez les Annélides polychètes
- 2° chez les Annélides oligochètes

II - Les extractions

- 1° méthanolique
- 2° acétonique
- 3° aqueuse

III - Les fractionnements

- 1° les dialyses
- 2° les résines échangeuses d'ions
- 3° le tamisage moléculaire
- 4° chromatographie et électrophorèse sur papier

IV - Méthodes analytiques

- 1° estimation des masses moléculaires
- 2° stabilité à la chaleur
- 3° digestions protéolytiques
- 4° hydrolyses acides
- 5° recherche du tryptophane
- 6° essai de détermination chimique des pics actifs
- 7° recherche de l'AMP cyclique

I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE

1° - Annélides polychètes

Les essais biologiques sont réalisés par M.DURCHON en ce qui concerne l'hormone inhibitrice et par M.PORCHET en ce qui concerne le phénomène de rétro-inhibition hormonale (substance "Feed-Back"). Les cultures organotypiques sont réalisées *in vitro* selon le procédé de DURCHON et SCHALLER, 1964. Le principe en est le suivant : des parapodes sont prélevés sur des individus mâles au stade spermatogonies. Cultivés isolément, sans inhibition hormonale, les spermatogonies subissent la spermatogenèse et se transforment en spermatozoïdes. Si on réalise une association parapode-prostomium, c'est à dire si on rétablit le conditionnement hormonal inhibiteur, les produits génitaux mâles n'évoluent pas..

La spermatogenèse s'effectue en 6 jours à 20°C pour les parapodes cultivés isolément. Ce chiffre indique le nombre de jours nécessaires au déclenchement de la maturation génitale en l'absence d'hormone. Ainsi lorsque l'on parle de retard ou d'inhibition de la spermatogenèse pendant X jours par rapport au témoin, cela sous-entend 6 + X jours.

In vivo, par ablation du prostomium et par conséquent des ganglions cérébroïdes, on déclenche la maturation génitale chez le mâle, comme chez la femelle. En outre, tous les caractères morphologiques et anatomiques de l'épitoquie naturelle se manifestent chez des individus jeunes qui ont subi cette ablation.

2° - Annélides oligochètes

Les essais biologiques sont réalisés par R.MARCEL suivant la technique opératoire mise au point dans son mémoire " Contribution à l'étude des facteurs intervenant dans la régénération chez le lombricien *Eisenia foetida* Sav.F. *typica* (Annélide oligochète), 1971".

Les explants sont cultivés sur milieu gélosé dont la composition est la suivante :

- gélose à 1% dans la solution de Holtfreter : 8 gouttes
- solution de Holtfreter+glucose à 1 % : 4 gouttes
- extrait d'embryon de poulet dilué à 50 % dans le Holtfreter glucosé à 1 % : 3 gouttes
- pénicilline G : 500 UI
- streptomycine : 0,01mg

Les *Eisenia*, âgés de un mois, fournissent les explants. Ceux-ci sont constitués par des tronçons de 5 segments de long. Les sections sont effectuées, sous anesthésie préalable, au moyen d'un microscalpel. Les explants, après lavage dans la solution de Holtfreter et essorage sont déposés à la surface du milieu gélosé.

Dans le cas qui nous intéresse, ce sont les segments antérieurs 8 à 13 qui sont employés comme explants et qui recevront les différents extraits biologiques.

Signification de l'expression "équivalent X têtes" :

Il correspond à l'équivalent biologique actif issu du broyat de X têtes.

II - LES EXTRACTIONS

1° - méthanolique

Protocole expérimental de DURCHON, MONTREUIL et BOILLY-MARER, 1963.

5 000 cerveaux de *Nereis diversicolor* sont prélevés sur des animaux vivants et congelés immédiatement à - 70°C. Après décongélation à 4°C, on homogénéise avec l'appareil de Potter Elvehjem dans l'eau distillée apyrogène à 4°C. A l'homogénat obtenu, on ajoute 300 ml de méthanol redistillé et refroidi à - 20°C (rapport 1/15 v:v). Après un repos compris entre 10 et 20 mn, à - 18, - 20°C, on centrifuge pendant 10 mn à 3 000 g.

La solution méthanolique est recueillie et le sédiment est de nouveau traité comme précédemment. Il est ensuite extrait 2 fois par 20 ml d'eau redistillée stérile. Le résidu insoluble est éliminé et les 2 solutions aqueuses sont rassemblées et lyophilisées. Le résidu sec représente la fraction protéidique. Les deux solutions méthanoliques sont réunies et évaporées sous vide à secité. Le résidu huileux est mis en suspension dans 20 ml d'eau distillée stérile et soumis à 3 extractions successives par 100 ml d'éther sans peroxyde (rapport v/v :1/5). La solution aqueuse délipidée et lyophilisée fournit la fraction micromoléculaire hydrosoluble. Les 3 solutions étherées sont rassemblées et lavées à l'eau distillée.

Les fractions obtenues sont reprises par de l'eau de mer stérile (fraction protéidique et fraction micromoléculaire hydrosoluble) ou par de l'huile d'olive (fraction lipidique) de façon à obtenir une concentration correspondant à 1000 cerveaux pour 0,75 ml.

Note : Préparation de l'éther sans peroxyde BISERTE et Coll., 1960.

L'éther est distillé sur du chlorure stanneux puis lavé avec une solution de carbonate de sodium à 20% et avec de l'eau. Il est conservé sur du sulfate ferreux pulvérisé, à l'abri de la lumière. On utilise aussi l'éther dépourvu de peroxyde de la maison MERCK réf.923.

2° - acétonique

Protocole expérimental de KANATANI et Coll., 1971, adapté à l'extraction de l'hormone cérébrale. Environ 2000 cerveaux sont lyophilisés. On pèse le résidu sec. On obtient 0,329 g.

On reprend ces 0,329 g par 7 à 10 ml d'acétone froide. L'homogénéat de poudre de cerveaux et d'acétone est réalisé à + 4°C à l'aide d'un homogénéiseur "Potter" pendant 3 minutes. On le filtre sur papier Whatman W2. Le résidu restant sur le papier est lavé par 20 ml d'acétone froide (dans le rapport poids/volume : 1/50). Le filtre est séché en exsiccateur, sous vide. Le résidu, déposé sur ce filtre est récupéré sous le nom de : résidu sur filtre.

La solution acétonique en provenance de l'homogénéat et de l'acétone de lavage est d'environ 27 ml.

L'acétone est éliminée à l'aide d'un évaporateur rotatif. On récupère finalement une poudre acétonique dénommée P.A. La poudre acétonique est homogénéisée à nouveau dans 3 ml de Na Cl 0,01M pendant 3 mn.

On obtient une suspension que l'on centrifuge à 20 000 t pendant 50 mn en "rotor 40 spinco". On récupère finalement un surnageant et un précipité. Ils seront lyophilisés avant d'être utilisés en culture organotypique.

Pour les essais biologiques, le résidu sur filtre et le précipité sont remis en suspension dans 0,5 ml d'eau bidistillée. Le surnageant est dissous dans la même quantité.

3° - aqueuse

Le premier essai d'extraction a été fait à partir de 3 400 cerveaux de *Nereis diversicolor* prélevés sur des animaux vivants et congelés immédiatement à - 70°C.

Après décongélation à + 4°C on homogénéise 3 à 4 mn avec l'appareil de Potter Elvehjem dans 10 ml d'eau bidistillée. L'homogénéat est centrifugé à 15 000 t/mn dans le rotor 40 de la centrifugeuse spinco modèle L ou L 65 B pendant 30 mn à + 4°C. On obtient un premier sédiment et un surnageant que l'on recueille. Le sédiment est repris par 10 à 15 ml d'eau, homogénéisé de nouveau et centrifugé de la même manière. Le surnageant 2 est recueilli et joint au premier.

Le sédiment (2) est repris de nouveau et traité comme précédemment.

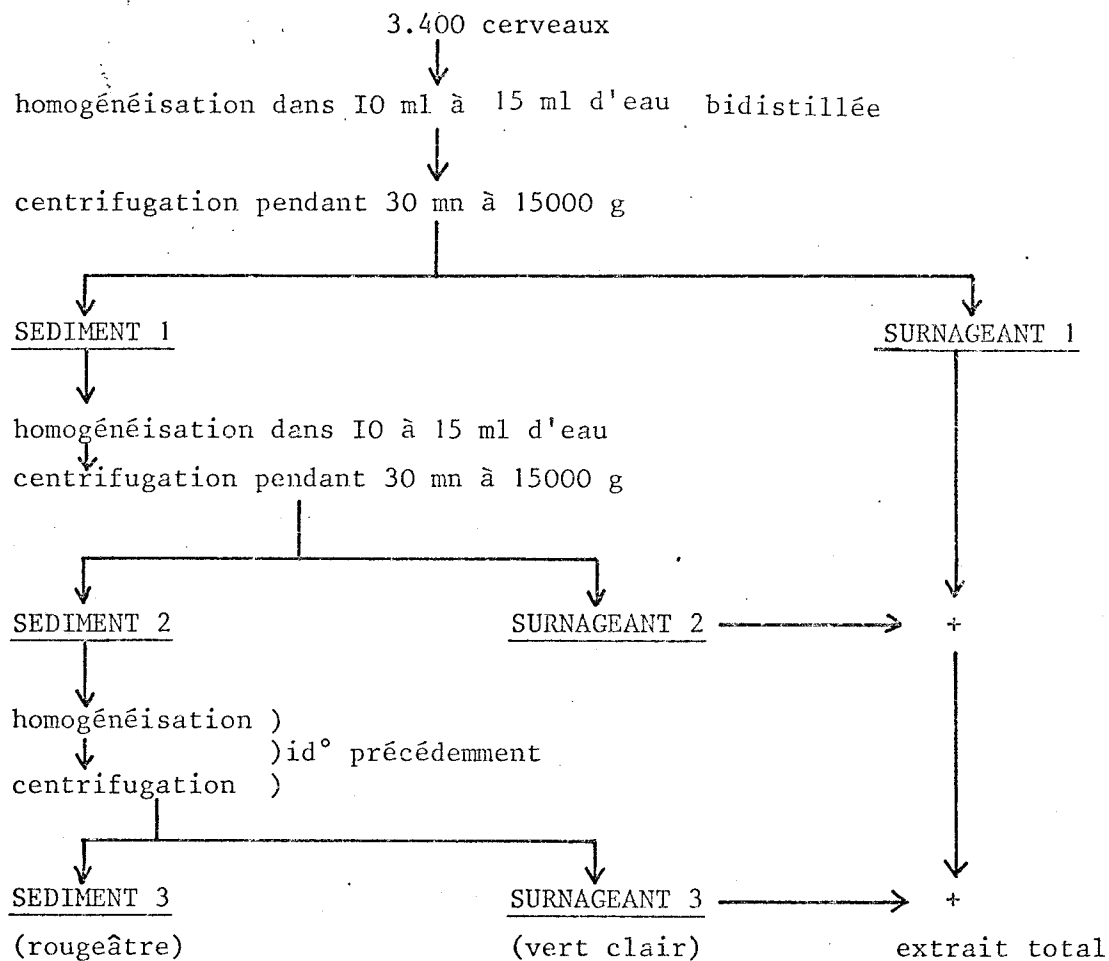
En fin de manipulation on possède alors : un sédiment (3) rougeâtre et un surnageant (3) vert clair. Le sédiment est lyophilisé et conservé en chambre froide (-20°C).

III - LES FRACTIONNEMENTS

1° - Les dialyses

Le surnageant est mis en dialyse, 6 à 10 jours, à + 4°C, contre de l'eau bidistillée (dans le rapport v/v : 1/10), qui est changée chaque jour, (pour prévenir toute fermentation, on ajoute à l'eau du dialysat, quelques gouttes de chloroforme) dans des boudins de cellophane "Nojax 16" bouillis

EXTRACTION AQUEUSE DE CERVEAUX DE *Nereis diversicolor*



20 mn dans de l'eau bidistillée. Ce procédé rend les boudins stériles et élimine les polysides adialysables solubles, constitués de glucose, de xylose et de glycérol ainsi que les protides présents dans la membrane de cellophane.

On obtient deux fractions :

- une fraction adialysable retenue dans les boudins de dialyse et renfermant les substances de grandes masses moléculaires.

- une fraction dialysable de surnageant, c'est à dire filtrable à travers des boudins de dialyse et qui contient des composants de faibles masses moléculaires.

Ces deux fractions sont réduites de volume à l'évaporateur rotatif, sous vide, à 35-37°C, puis lyophilisées. On obtient finalement 2 fractions avec lesquelles vont avoir lieu les essais biologiques.

On élimine les enzymes des différentes solutions biologiques par micro-dialyse.

On emploie des boudins de cellophane (Société Sophyc boyau cellulosique "Nojax") de 1 cm de diamètre sur 15 cm de long préalablement bouillis pendant 20 mn de façon à éliminer tous les éléments solubles du cellophane.

La solution enzyme-substrat enfermée dans le boudin dialyse contre de l'eau bidistillée dans le rapport v/v : 1/10 et sous agitation à + 4°C pendant 12 heures. Les fractions biologiques sont retrouvées dans le dialysat. Les enzymes restent dans la fraction adialysable.

2° - Les résines échangeuses d'ions

Premier fractionnement par chromatographie sur résines échangeuses d'ions adapté au cas de l'hormone inhibitrice

A) Matériel

Le fractionnement de la solution micromoléculaire est réalisé par un passage, sur des colonnes de résines à échange de cations (Dowex 50 x 8 "mesh 25-50", forme acide) puis d'anions (Duolite A40, "mesh 25-50", forme formiate).

On emploie 14 ml de résines contenues dans les colonnes en verre Pyrex de 1,2 cm de diamètre sur une hauteur de 11,5 cm. La forme acide de l'échangeur de cations (Dowex 50x8) est obtenue par le passage de 70 ml d'acide chlorhydrique 3 N, suivi d'un lavage à l'eau bidistillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent, atteigne 5,5 - 6 (pH de l'eau bidistillée). La forme formiate de l'échangeur d'anions (Duolite A40) est obtenue par le passage de 140 ml de soude 3N, suivi d'un lavage à l'eau bidistillée jusqu'à ce que le liquide effluent soit neutre; puis d'un passage d'acide formique concentré (3 fois le volume de la résine) suivi d'un lavage à l'eau bidistillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent atteigne 4,5-5.

B) Fractionnement de la solution micromoléculaire

10 ml de la solution micromoléculaire correspondant à 1000 cerveaux environ sont passés sur l'échangeur de cations puis sur celui d'anions contenus respectivement dans deux micro-colonnes distinctes mais raccordées à l'aide d'un tube en caoutchouc de manière à ce que la purification s'effectue en une seule opération. Les colonnes sont ensuite lavées avec 200 à 500 ml d'eau bidistillée apyrogène. Ces eaux de lavage sont ajoutées au premier liquide effluent représentant la fraction neutre totalement dépourvue de sels minéraux et renfermant tous les composés organiques "neutres".

Ce mode opératoire réalise le dessalage des solutions mais il possède, en outre, l'avantage de fractionner les composés organiques. En effet, les résines échangeuses d'ions peuvent être séparément traitées par des solutions qui déplaceront les composés acides retenus par l'échangeur d'anions et les composés basiques retenus par l'échangeur de cations. La fraction acide : (éluat de Duolite A40) acides organiques, acide aspartique, éthers phosphoriques etc... sera obtenue par le passage de 100 ml d'une solution aqueuse d'acide formique à 5 % (v:v) et la fraction basique (éluat de Dowex 50 x 8) osamines, acides aminés ... par le passage de 100 ml d'une solution aqueuse d'ammoniaque à 5 % (v:v).

La fraction basique est évaporée, sous vide, à 37°C, de façon à éliminer l'ammoniaque. On concentre ainsi jusqu'à 10 ml de solution puis on reprend par environ 100 ml d'eau bidistillée et on évapore de nouveau. Cette opération est répétée 2 ou 3 fois de façon à éliminer complètement l'ammoniaque avant de lyophiliser.

La fraction acide subit le même traitement de façon à éliminer l'acide formique.

L'effluent neutre de la colonne est lyophilisé directement. Les 3 résidus de lyophilisation sont repris par de l'eau de mer pour les critères d'activité biologique.

Deuxième fractionnement, par chromatographie sur échangeur d'ions adapté au cas de l'hormone inhibitrice.

A) Matériel

La solution micromoléculaire est séparée en 2 lots :

L'un des lots est fractionné sur une colonne de résines à échange de cations (Dowex 50x2, "200-400 mesh", forme acide).

Le second l'est sur une résine à échange d'anions (Duolite A40, "mesh25-50", forme formiate). On emploie 20 à 22 ml de résines. Elles sont contenues dans des colonnes en verre pyrex de 1 cm de diamètre sur une hauteur de 27 cm.

La "forme acide" est obtenue par le passage de H Cl 3N.

La "forme formiate" est obtenue par le passage de soude 3 N.

B) Fractionnement de la solution micromoléculaire

20 ml de solution micromoléculaire, correspondant à environ 2500 cerveaux, sont séparés en 2 lots de 10 ml (soit 1250 cerveaux par lot).

Le 1er lot est passé sur l'échangeur de cations. La colonne de résines est lavée par 450 ml d'eau bidistillée. Cette eau de lavage est ajoutée à la fraction "non retenue" (acide + neutre) de la Dowex 50 x 2. L'effluent ainsi obtenu est réduit à l'évaporateur rotatif, sous vide, à 37°C puis directement lyophilisé lorsqu'on atteint un volume d'environ 100 ml.

Un passage à blanc est effectué. On passe 500 ml d'eau bidistillée que l'on réduit à l'évaporateur rotatif avant de lyophiliser. Cette fraction lyophilisée sera utilisée plus tard comme témoin lors des essais biologiques.

La "fraction basique" est récoltée par le passage de 150 ml d'une solution d'ammoniaque à 5 % (v:v) sur la Dowex 50 x 2. L'éluat basique est évaporé sous vide à 37°C de façon à éliminer l'ammoniaque. La solution finale est ensuite lyophilisée.

Le second lot est passé sur l'échangeur d'anions (Duolite A40). La colonne de résines est lavée par 250 ml d'eau bidistillée. On joint ces eaux de lavage à la fraction non retenue (neutre + basique). On réduit le volume obtenu à l'évaporateur rotatif à 37°C avant de lyophiliser. La duolite A 40 est éluee par 150 ml d'acide formique à 5 %. On cesse le passage de l'acide formique dès qu'apparaît l'odeur piquante de l'acide.

La fraction acide subit le même traitement que la fraction ammoniacale de façon à éliminer l'acide formique.

3° - Tamissage moléculaire

Fractionnement par "G-25 fine"

Une quantité de fraction "micromoléculaire" correspondant à 1500 cerveaux est dissoute dans 1 ml d'eau bidistillée. Cette solution est chromatographiée sur une colonne de gel de sephadex (G-25 "fine", (1 x 120 cm), gonflé 24 heures dans de l'eau bidistillée dégazée) stabilisée à la température ambiante.

Le déplacement des composés est effectué par passage d'eau bidistillée préalablement dégazée. Le débit est réglé par une pompe péristaltique et des fractions de 1,5 ml sont recueillies tous les quarts d'heure, avec enregistrement automatique de l'absorbance de chaque fraction à l'aide d'un absorptiomètre en lumière ultra-violette à 254 nm et 280 nm.

Fractionnement par G-25 "super fine".

Une quantité de P 2 équivalent au fractionnement de 1500 cerveau est dissoute dans 1 ml d'eau bidistillée et chromatographiée sur une colonne de 1 x 120 cm de gel de sephadex G-25 "super fine". Le déplacement des composés de P 2 est effectué par de l'eau bidistillée dégazée. Le débit est réglé par une pompe péristaltique et des fractions de 1,5 ml par quart d'heure sont recueillies, avec enregistrement automatique de l'absorbance de chaque fraction en UV à 254 et 280 nm.

Dans le cas de la rétro-inhibition cérébrale (phénomène "Feed-Back") une quantité de 15 mg de fraction micromoléculaire est dissoute dans 1 ml d'eau bidistillée et chromatographiée dans les mêmes conditions que précédemment.

Dans le cas du facteur inhibiteur céphalique une quantité de 15 mg est dissoute dans 0,5 ml d'une solution de Na Cl 0,1M. Le tampon d'élution est de même molarité. La vitesse d'élution et les enregistrements sont les mêmes que précédemment..

Fractionnement par G-50 "médium"

30 mg de fraction A dissous dans 1 ml d'eau sont chromatographiés sur une colonne de G-50 "médium" (2,3 x 50 cm). Le déplacement des composés, la vitesse d'élution et l'enregistrement sont toujours identiques à ceux des fractionnements précédents.

4° - Chromatographie et électrophorèse sur papier



Purification des pics 5 et 6 et de la fraction 4 par chromatographie sur papier.

Les pics 5 et 6 et la fraction 4 sont purifiés, par chromatographie sur papier Whatman n° 3 et n° 1, dans le système solvant de PARTRIDGE, 1948 n-butanol, acide acétique, eau (4 : 1 : 5), à 20°C. Après 39 heures de migration, le chromatogramme est séché. Il est découpé en bandes longitudinales (chaque bande correspond à la migration d'un spot de 5, de 6 ou de fraction 4).

On détecte les taches UV positives ou fluorescentes à 260 nm à l'aide d'une lampe Mineralight. On révèle par la ninhydrine à 1 % dans l'acétone (1 g de ninhydrine dans 94 ml d'acétone et 6 ml d'acide acétique). Les bandes extérieures sont utilisées comme témoins.

Les bandes non révélées sont découpées en fonction des taches révélées et des "entre-tâches".

Ensuite les taches non révélées sont éluées par de l'eau bidistillée durant une vingtaine d'heures et essayées en culture organotypique après lyophilisation.

Purification de la fraction B et des taches 3,4 et 5 par électrophorèse sur papier.

Après que l'électrophorégramme est été séché, il est découpé en bandes longitudinales. On opère exactement de la manière décrite précédemment.

IV - METHODES ANALYTIQUES

1° - Estimation des masses moléculaires

Application du tamisage moléculaire (voir revue générale de ANDREW, 1964; KANATANI et Al., 1971; CARNEGIE, 1965).

Nous avons utilisé soit une colonne (1,3 x 100 cm) de sephadex G-25 "fine", soit une colonne de G-50 "médium" (2,3 x 50 cm) (pour les fractions micromoléculaires possédant l'activité biologique maximale).

Ces colonnes sont stabilisées dans une solution de tampon acétate 0,05 M additionnée de 0,4 M de Na Cl à 20°C. Elles sont étalonnées avec de la bacitracine et de l'ocytocine.

Les volumes d'élution sont déterminés par les courbes d'absorption en lumière UV (254 et 280 nm). Celui de l'ocytocine est repéré par essai biologique sur un utérus isolé de rate en proestrus.

2° - Stabilité à la chaleur

20 mg de fraction biologique active sont homogénéisés dans un tube avec 5 ml de Na Cl 0,01M.

La solution est chauffée, pendant 30 minutes, en bain-marie, sous agitation (80 - 90°C pendant 15 minutes), puis refroidie très rapidement en plongeant le tube dans un bain de glace (KANATANI et al., 1971).

On emploie :

- de la fraction "micromoléculaire" dans le cas de l'hormone inhibitrice.
- du "précipité acétonique" dans le cas de la rétro-action génitale (Feed-Back).

3° - Digestions protéolytiques

Hydrolyse par la pronase.

Les digestions enzymatiques ont été réalisées suivant le procédé de YAMASHINA et MAKINO, 1962; 20 mg de fraction biologique active sont dissous dans 5 ml d'acétate de calcium (0,01 M) (dans les proportions 1/50, enzyme / substrat).

La solution est ajustée à pH 7,8 - 8,0 et gardée à 37°C pendant 24 heures (très vite le pH reste constant).

Hydrolyse par la trypsine.

20 mg de fraction biologique active sont dissous dans un tampon tris/HCl 0,1M contenant la trypsine dans le rapport enzyme/substrat : 1/50. Le pH est ajusté à 8,2. après 2 fois 4 heures de digestion on ajoute de la trypsine dans le rapport 1/50 : enzyme/substrat. Finalement la 3^e et dernière addition est dans le rapport 1/25. L'hydrolyse est effectuée 24 h, à 37°C. (Méthode de HIRS, 1956).

Hydrolyse par la pepsine

Suivant la méthode de SANGER et THOMPSON, 1953, 1 mg de pepsine est additionné à une solution de 20 mg de fraction biologique active dans 5 ml d'HCl, 0,01 N, à 37 °C pendant 24 heures à pH 2,0.

On entend par "fraction biologique active" :

- soit 20 mg de fraction micromoléculaire hormonale
- soit 20 mg de précipité acétonique dans le cas du processus "Feed-Back"
- soit 20 mg de fraction neutre dans le cas du facteur inhibiteur de la régénération céphalique.

4° - Les hydrolyses acides.

Composition en acide aminés après hydrolyse acide .

Un résidu de lyophilisation de l'ordre de 130 à 200 µg de fraction biologique active, est hydrolysé dans un tube pyrex, en présence de 0,5 ml d'HCl 5,6 N. On introduit dans la solution à hydrolyser 50 nano-Moles de témoin Norleucine.

L'hydrolyse est effectuée, sous vide, pendant 24 heures et 48 heures à 105°C.

Après refroidissement, les tubes sont ouverts et l'hydrolysate acide est desséché dans une capsule en exsiccateur, sous pression réduite. Le résidu est alors chromatographié à l'autoanalyseur Beckman multichrom.

5° - Recherche du tryptophane

Nous avons employé la méthode de KARKHANIS et Coll., 1975, qui consiste à déterminer les résidus de tryptophane d'une protéine ou d'un peptide, par l'utilisation d'un réactif spécifique : le 5 hydroxy- 5 nitrobenzyl - bromide, dans des conditions précises.

La totalité du tryptophane de la protéine ou du peptide est déterminée par densité optique à partir de la protéine marquée par le réactif. Les mesures sont faites à 280 et 510 nm.

Le témoin interne est la chymotrypsine

La recherche du tryptophane a été réalisée sur la fraction B dans les mêmes conditions que pour le témoin " chymotrypsine".

6° - Essai d'une première détermination chimique des fractions actives porteuses de l'activité hormonale inhibitrice

Thèse de 3° cycle : C.CARDON.

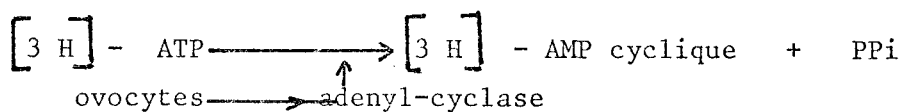
" Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de *Nereis diversicolor* O.F.Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation, 1970, p.88 à 91.

7° - Détermination de l'activité adényl-cyclasique

a) Principe de la méthode

La méthode employée est celle décrite par VERBERT et CACAN (1972) dans laquelle la séparation de tous les métabolites de l'ATP est obtenue par chromatographie sur papier dans le système acide isobutyrique - ammoniac 1 N - eau (modification proposée par les auteurs, au lieu d'une électrophorèse).

La méthode consiste à mesurer la quantité de $[3\text{ H}]$ -AMP cyclique formé à partir de $[3\text{ H}]$ -ATP initialement ajouté au milieu



L'originalité de la méthode consiste à séparer tous les métabolites de l'ATP qui ont pu se former au cours de la réaction. Cette méthode est particulièrement précieuse lorsque l'on veut mesurer l'activité adényl-cyclasique dans les fractions cellulaires, qui contiennent bien d'autres enzymes pouvant métaboliser l'ATP ou ses dérivées tels que : ATPase, ADPase, 5'nucleotidase, phosphodiesterase cyclique etc... , et par conséquent fausser la mesure propre de l'activité adényl-cyclasique.

b) Milieu employé

tris/HCl pH 7,4	0,1 M
MgCl 2	2mM
Caféine	5mM
AMPc	2mM
$[3\text{ H}]$ -ATP	1 μCi
ATP	1mM
PEP	50 mM
Pyruvate Kinase (PK)	5 μl d'une solution à 100 μg /mg
de protéine (maison Sigma), plus H ₂ O q.s.p. 50 ml.	

Homogénat d'ovocyte 50 μl

c) séparation des métabolites de l'ATP

Les séparations des métabolites de l'ATP sont réalisées par chromatographie sur W 3 MM (46 x 57 cm) dans le système solvant acide isobutyrique - ammoniacque 1 N - eau (66 - 1 - 33; V - V - V)

La migration s'effectue dans l'ordre suivant :

						
	ATP	ADP	AMP	AMP _c	Ado	Ade
R _f =0,25		0,37	0,52	0,60	0,72	0,90

d) préparation des ovocytes

On récolte le liquide coelomique (environ 0,5 ml par animal) duquel on sépare les ovocytes par une centrifugation de 1800 g pendant 5 mn. Le liquide coelomique surnage.

Dans le culot, les ovocytes sont séparés des éléocytes par 3 lavages successifs à l'eau de mer alternant avec des centrifugations de 500 g pendant 3 minutes.

On récolte les ovocytes qui sont homogénéisés dans l'eau. 50 µl d'homogénat sont ajoutés au milieu. Après incubation, l'incubat est centrifugé et une fraction aliquote du surnageant est déposé sur papier W 3 MM.

e) détermination de l'activité enzymatique

La chromatographie est menée jusqu'à ce que le front atteigne 1 cm du bord de la feuille. Après séchage de la feuille les dérivés de l'ATP (ATP, ADP, AMP, AMP_c, Ado, Adé), ajoutés comme témoin interne à la fin de la réaction, sont repérés en lumière ultraviolette. Le papier est découpé en bande de 5 x 1 cm le long du trajet de migration. Chaque bande est placée en piluliers de comptage contenant 5 cm³ de liquide scintillant (Lipoluma) et la détermination de la radioactivité est effectuée dans un compteur à scintillation (Intertechnique SL 30). Les résultats sont exprimés en coups par minute.

BIBLIOGRAPHIE

A

- ADAMS, T.S., HINTZ, A.M., POMANIS, J.G., 1968, Oöstatic hormone production in house flies *Musca domestica* with developing ovaries. J. Insect Physiol. 14 : 983-993 (p. 36).
- ADAMS, T.S., JOHNSON, J.D., FATLAND, C.L., OLSTAD, G., 1970, Preparation of a Semipurified Extract of the oöstatic hormone and its Effect on Egg Maturation in the House Fly. Ann. Entomol. Soc. Am. 63 : n°6, 1565-1569 (p. 36).
- ANDREWS, P., 1964, Estimation of the Molecular Weights of Proteins by Sephadex Gel-filtration. Biochem. J. 91 : 222-233 (p. 28, 53, 78, 100).

B

- BARTELL, C.K., MAY, K., FINGERMAN, M., 1968, Electron microscopic examination of subcellular components containing melanophorotropic activity, separated by density gradient centrifugation, from neurosecretory cells in the eyestalks of the fiddler crab, *Uca fugilator*. Biol. Bull. 135 : 414 (p. 2).
- BERTOUT, M., 1976, Action de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur les synthèses d'acides nucléiques au cours de la spermatogenèse. C. R. Acad. Sc. 282 : 1613-1616 (p. 8).
- BISERTE, G., PLAQUET-SHOONAERT, T., BOULANGER, P., PAYSANT, P., 1960, Séparation des acides aminés des milieux biologiques complexes. V. Description d'un couplage de méthodes chromatographiques et électrophorétiques. J. Chromatogr. Nederl. 3, n°1, 25-47 (p. 93).
- BOILLY-MARER, Y., 1962, Inhibition des transformations hétéronéréidiennes par le cerveau d'espèces sans épitoque (Néréidiens). C. R. Acad. Sc. 254 : 2830-2832 (p. 36).
- BOILLY-MARER, Y., 1972, Etude morphologique et histologique des cirres parapodiaux atôques et épitoques de *Nereidae* (Annélides Polychètes). Arch. Biol. Belg. 83 : n°2, 179-205 (p. 7).
- BOILLY-MARER, Y., 1976, Différenciation et nécrose épidermiques au cours de la mise en place des caractères sexuels somatiques chez *N. pelagica* L. (Annélide Polychète). Bull. Soc. Zool. Fr. 101, n°1, 83-88 (p. 8).
- BOILLY-MARER, Y., COMBAZ, A., 1970, Influence de la chaîne nerveuse sur la régénération caudale de *Nereis diversicolor*. C. R. Acad. Sc. 271 : 92-95 (p. 48, 56).
- BROWN, B.E., 1965, Pharmacologically active constituents of the cockroach *Corpus cardiacum* : resolution and some characteristics. Gen. comp. Endoc. 5 : 587-401 (p. 2).
- BUTENANDT, A., KARLSON, P., 1954, Ueber die Isolierung eines Metamorphose-hormons der Insekten, in kristallisierter Form. Z. Naturforsch. B. Dtsch 9b, n°6, 389-391 (p. 2, 4).

C

- CANER, F., PORCHET, M., DHAINAUT A., DISSOUS, C., 1977, Isolement et purification de fractions membranaires chez les ovocytes de *Perinereis cultrifera* Grube (Annélide Polychète). C. R. Acad. Sc. Paris, 284 : 2019-2022 (p. 31).
- CARDON, C., 1970, Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de *Nereis diversicolor* O.F. Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation. Bull. Soc. Zool. Fr. 95 : n°3, 543-549 (p. 60).
- CARDON, C., MARCEL, R., 1976, Démonstration de la nature peptidique du facteur inhibiteur de la régénération céphalique chez le lombricien *Eisenia foetida* Sav. f. *typica* (Annélide Oligochète). C. R. Acad. Sc. 282 : 657-658 (p. 76).
- CARDON, C., PORCHET, M., 1973, Purification partielle d'une substance responsable de la rétroaction génitale sur l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae* (Annélides Polychètes). C. R. Acad. Sc. 277 : 1761-1763 (p. 39).
- CARNEGIE, P.R., 1965, Estimation of Molecular Size of Peptides by Gel Filtration. Biochem. J. 95 : n°1, 9 p. (p. 53, 79, 100).
- CASANOVA, R., 1955, Influence du Prostomium sur la régénération Caudale chez *Platynereis massiliensis*. C. R. Acad. Sc. 24 : 1814-1816 (p. 8).
- CHAET, A.B., 1967, Gamete release and shedding substance of sea stars. Symp. Zool. Soc. London 20 : 13-24 (p. 3).
- CHOQUET, M., 1962, Effet inhibiteur de l'hormone cérébrale sur l'évolution des cellules sexuelles chez *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète). C. R. Soc. Biol. 156 : 1112-1114 (p. 3).
- CLARK, R.B., 1960, Habituation of the polychaete *Nereis* to sudden stimuli. II. Biological significance of habituation. Anim. Behav. 8 : 92-103 (p. 56).
- CLARK, R.B., 1961, The origin and formation of the *Heteronereis*. Biol. Rev. 36 : 199-236 (p. 56).

CLARK, R.B., BONNEY, D.G., 1960, Influence of the supraoesophageal ganglia on posterior regeneration in *Nereis diversicolor*. J. Embryol. Exp. Morph. 8 : 112-118 (p. 56).

CLARK, R.B., CLARK, M.E., 1959, Role of the supraoesophageal ganglia during the early stages of caudal regeneration in some errant polychaetes. Nature, 183 : 1834 (p. 8).

CLARK, R.B., RUSTON, R.J.G., 1963, The influence of brain extirpation on oogenesis in the polychaete *Nereis diversicolor*. Gen. comp. Endoc. 5 : 529-541 (p. 3).

COMBAZ, A., 1976, Contrôle de la polarité transversale par la chaîne nerveuse au cours de la régénération chez *Nereis*. Bull. Soc. Zool. Fr., 101 935 (p. 56).

D

- DHAINAUT-COURTOIS, N., 1965, Sur la présence d'un organe photorécepteur dans le cerveau de *Nereis pelagica* L. (A. P.) C. R. Acad. Sc. 261 : 1085-1088 (p. 56).
- DURANTE, M., PUCCIA, E., 1970, Recherche preliminari sulla natura chimica della sustanza inhibitrice dell' opercolo funzionale di *Hydroïdes norvegica*. Atti. acc. Naz. Lincei R. C., Cl. Sc. fis., mat. e. nat. 48 : n°6, 683-689 (p. 60).
- DURCHON, M., 1948, Epitoquie expérimentale chez deux polychètes : *Perinereis cultrifera* Grube et *Nereis irrorata* Malmgren. C. R. Acad. Sci. 227 : 157-158 (p. 3).
- DURCHON, M., 1952, Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. Ann. Sc. Nat. 11ème Série, 14, 119-206 (p. 3,8,35,36,56,88).
- DURCHON, M., 1956, Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoquie chez les Néréidiens. Ann. sc. nat. Zool. Biol. animale 18 : 269-273 (p. 3, 8).
- DURCHON, M., 1960, L'endocrinologie chez les Annélides Polychètes. Bull. Soc. Zool. Fr. 85 : 275-301 (p. 3, 35).
- DURCHON, M., 1962, Induction et inhibition expérimentale de l'épitoquie par homogreffes chez les Néréidiens. Bull. Soc. Zool. Fr. 87 : 575-582 (p. 3, 35).
- DURCHON, M., 1967, L'endocrinologie des Vers et des Mollusques ; Masson et Cie, éditeur ; 120 Bd St-Germain, Paris VIe (p. 3, 56, 89).
- DURCHON, M., MARCEL, R., 1962, Influence du cerveau sur la régénération postérieure chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). C. R. Soc. Biol. 156 : 661-663 (p. 8).
- DURCHON, M., MONTREUIL, J., BOILLY-MARER, Y., 1963, Résultats préliminaires sur la nature chimique de l'hormone inhibitrice du cerveau des Néréidiens (Annélides Polychètes). C. R. Acad. Sc. 257 : 1807-1808 (p. 4, 9, 10, 93).

- DURCHON, M., PORCHET, M., 1970, Dosage de l'activité endocrine cérébrale au cours du cycle génital femelle chez *Nereis diversicolor*. C. R. Acad. Sc. 170 : 1689-1691 (p. 8).
- DURCHON, M., PORCHET, M., 1971, Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. Gen. comp. Endoc. 16 : 555-565 (p. 3, 35, 38, 56).
- DURCHON, M., SCHALLER, F., 1963, Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. C. R. Acad. Sc. 256 : 5615-5617 (p. 9).
- DURCHON, M., SCHALLER, F., 1964, Recherches endocrinologiques en culture organotypique chez les Annélides Polychètes. Gen. Comp. Endoc. 4 : 427-432 (p. 9, 16, 92).
- DURCHON, M., VIVIER, E., 1961, Déterminisme de la gamogonie chez une grégarine parasite de *P. cultrifera* Gr. (Annélide Polychète). C. R. Acad. Sc. 253 : 318-320 (p. 3, 7).
- DURCHON, M., VIVIER, E., 1964, Influence des sécrétions endocrines sur le cycle des grégarines chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). Ann. Endoc. Paris, 25 : 43-48 (p. 3, 7).

E

EDMAN, P., FÄNGE, R., ÖSTLUND, E., 1958, Isolation of the red pigment concentration hormone of the crustacean eyestalk, in : Zweites Internationales Symposium über Neurosekretion (W. Bargmann, E. Hanström, and B. Scharrer, eds), pp. 119-123, Springer-Verlag, Berlin and New-York (p. 2).

F

- FERLUND, P., JOSEFSSON, L.H., 1968, Chromactivating hormones of *Pandalus borealis*. Isolation and purification. Biochim. Biophys. Acta 158 : 262-273 (p. 2).
- FERLUND, P., JOSEFSSON, L.H., 1972, Crustacean-color change hormone : amino-acid sequence and chemical synthesis. Science 177 : 173-175 (p. 2).
- FRAENKEL, G., HSIAO, C., 1965, Bursicon, a hormone which mediates tanning of the cuticle in the adult fly and other insects. J. insects Physiol. 11 : 513-556 (p. 36).
- FRONTALI, N., GAINER, H., 1977, Peptide in Invertebrate Nervous Systems. In : "Peptides in Neurobiology" Edited by Harold Gainer (Plenum Press, 1977) (p. 88).

G

- GERSCH, M., 1975, Prinzipien neurohormonaler und neurohumoraler Steuerung physiologischer Prozesse, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, 151pp. (p. 1).
- GERSCH, M., STÜRZEBECKER, J., 1968, Weitere Untersuchungen zur Kennzeichnung des Aktivationshormons der Insektenhäutung. J. Insect Physiol. 14 : 87-96 (p. 2).
- GOLDING, D.W., 1967, Endocrinology, regeneration and maturation in *Nereis*. Biol. Bull. 133 : 567-577 (p. 56).
- GOLDING, D.W., 1974, A survey of neuroendocrine phenomena in non-arthropod invertebrates. Biol. Rev. 49 : 161-224 (p. 1).
- GOLDSWORTHY, G.J., MORDUE, W., 1974, Neurosecretory hormones in insects. J. Endocrinol. 60 : 529-558 (p. 1).

H

- HAUENSCHILD, C., 1955, Photoperiodizität als Ursache des von der Mondphase abhängigen Metamorphose. Rythmus bei dem Polychaeten *Pl. dumerilii*. Z. Naturforsch. 10b : 658-666 (p. 3, 56).
- HAUENSCHILD, C., 1956, Hormonalhemmung der Geschlechtsreife und metamorphose bei dem Polychaeten *Pl. dumerilii*. Z. Naturforsch. 11b : 125-132 (p. 3, 36, 56).
- HAUENSCHILD, C., 1956, Neue experimentelle Untersuchungen zum Problem der Lunarperiodizität. Photoperiodizität als Ursache der lunaren Schwärmerhythmus bei dem Polychaeten *Pl. dumerilii*. Naturwiss. 16 : 361-363 (p. 3, 56).
- HAUENSCHILD, C., 1959, Zyklische Veränderungen an den inkretorischen Drüsenzellen im Prostomium der Polychaeten *Pl. dumerilii* als Grundlage der Schwärmerperiodizität. Z. Naturforsch. 14 : 81-87 (p. 3, 56).
- HAUENSCHILD, C., 1959, Hemmender Einfluß der Proventrikebregion auf Stoloni-sation und oocyten Entwicklung bei dem Polychaeten *Autolytus proli-fer*. Z. Naturforsch. 14b : 87-89 (p. 3).
- HAUENSCHILD, C., 1960, Lunar periodicity. Cold Spring Symposia, Quant. Biol. 25 : 491-497 (p. 3, 56).
- HAUENSCHILD, C., 1960, Abhängigkeit der Regenerationsleitung von der inneren Sekretion im Prostomium bei *Pl. dumerilii*. Z. Naturforsch. 15b : 52-55 (p. 3, 8).
- HAUENSCHILD, C., 1963, Postembryonale Entwicklung Stenerung durch ein Gehirn-hormon bei *Pl. dumerilii*. Vanhandl. Dtsch. Zool. Gesellsch. (München) 3-120 (p. 3, 35, 56).
- HAUENSCHILD, C., 1964, L'influence de l'hormone du cerveau sur le développe-ment postembryonnaire de *Platynereis dumerilii*. Ann. Endoc. 25, n°5 : 49-56 (p. 3, 35).
- HAUENSCHILD, C., 1965, Hormon bei Nereiden und anderen niederen Wirbellosen. Zool. Jb., Abt. allg. Zoo. Physiol. Tiere, Stsch., 71, n°4 : 511-544 (p. 3).

- HIGHNAM, K.C., HILL, L., 1969, The comparative endocrinology of the invertebrates. American Elsevier Publishing Co., New-York, 270 pp. (p. 1).
- HIRS, C.H.W., MOORE, S., STEIN, W.A., 1956, Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic-acid-oxidized ribonuclease. J. Biol. chem. U.S.A., 219 : n°2, 623-642. (p. 26, 76, 101).
- HOFMANN, D.K., 1974, Analyse der Beziehungen zwischen Regenerationsleitung, Geschlechtsreife und endokrines System bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Verhandl. Deut. Zool. Ges. 314-319. (p. 56).

I

ISHIZAKI, H., ICHIKAWA, M., 1967, Purification of the brain hormone of the silkworm *Bombyx mori*. Biol. Bull. 133 : 355-368 (p. 2).

ISOBE, M., HASEGAWA, K., KUBOTA, I., GOTO, T., 1976, Diapause Hormone B : Its Selective Extraction and Isolation from the silkworm *Bombyx mori*. Agro. Biol. Chem. 40 : (6), 1189-1199 (p. 1).

J

JENKIN, P.M., 1970, Control of Growth and Metamorphosis. II. Animal Hormones
383 pp. Pergamon Press, Oxford (p. 56).

JOSEFSSON, L., KLEINHOLZ, L.H., 1964, Isolation and purification of hormones
of the crustacean eyestalk. Nature London 201 : 301-302 (p. 2).

K

- KANATANI, H., 1967, Mechanism of starfish spawning with special reference to gonad-stimulating substance (G.S.S.) of nerve and meiosis inducing substance (M.I.S.) of gonad. Jpn. J. exp. Morphol. 21 : 61-78 (p. 3).
- KANATANI, H., IKEGAMI, S., SHIRAI, H., OIDE, H., TAMURA, S., 1971, Purification of gonad stimulating substance obtained from radial nerves of the starfish, *Asterias amurensis*. Dev. Growth Differ. 13 : 151-164 (p. 1, 3, 15, 17, 26, 28, 53, 78, 93, 100).
- KARKHANIS, D.Y., CARLO, D.J., ZELTNER, J., 1975, A simplified procedure to Determine Tryptophan Residues in Proteins. Anal. Biochem. 69 : n°1, 55-60 (p. 79, 101).
- KLEINHOLZ, L.H., 1975, Purified hormones from the crustacean eyestalk and their physiological specificity. Nature London 258 : 256-257 (p. 2).
- KLEINHOLZ, L.H., KIMBALL, F., 1965, Separation of neurosecretory pigmentary-effector hormones of the crustacean eyestalk. Gen. Comp. Endoc. 5 : 336-341 (p. 2).
- KNOWLES, F., 1974, Twenty years of neurosecretion, in : Neurosecretion - The final Endocrine Pathway (F. Knowles and L. Vollrath, eds.), pp. 3-14, Springer-Verlag, Berlin (p. 24).

L

LENICQUE, P.M., LUNDBLAD, M., 1966, Promoters and inhibitors of-development during regeneration of the hypostome and tentacles of *Clava squamata*. Acta Zool. 47 : 185-195 (p. 60).

M

- MALECHA, J., 1967, Transformation hétéronéréidienne et gamétogenèse chez *Nereis succinae* Leuckart (Annélide Polychète) en culture organo-typique. C. R. Acad. Sci. 265 : 613-615 (p. 3).
- MARCEL, R., 1971, Contribution à l'étude des facteurs intervenant dans la régénération chez le Lombricien *Eisenia foetida* Sav. f. *typica*. Thèse de Doctorat, Lille (p. 4, 59, 89).
- MARCEL, R., 1973, Action des substances inhibitrice et trophique sur les cycles sécrétoires des neurones de la chaîne nerveuse ventrale au cours de la régénération chez *Eisenia foetida* Sav. f. *typica* (Annélide, Oligochète). Gen. comp. Endoc. 21 : 45-59 (p. 59, 86).
- MARCEL, R., CARDON, C., 1974, Essais de purification du facteur inhibiteur de la régénération céphalique chez *Eisenia foetida* Sav. f. *typica* (Annélide Oligochète). C. R. Acad. Sc. 279 : 1545-1547 (p. 60).
- MICHL, H., 1951, Über Papieronophorese bei Spannungsgefüllen von 50 Volt/cm Monatsch Chem. 82 : 489-493 (p. 68, 73).
- MORDUE, W., GOLDSWORTHY, G.J., 1969, The physiological effects of *Corpus cardiacum* extracts in locusts. Gen. comp. Endoc. 12 : 360-369 (p. 2).
- MÜLLER, W.A., 1969, Die Steuerung des morphogenetischen Fließgleichgewichts in den Polypen von *Hydractinia echinata*. II. Chemisch-analytische Untersuchungen. Arch. Entwmech. Org. 163 : n°4, 357-374 (p. 60).

N

NOLTE, A., KUHLMANN D., 1966, Einbau von [^3H]uridin in den Schlundring von *Helix pomatia* L. Naturwissenschaften 53 : 281-282 (p. 2).

- PARTRIDGE, S.M., 1948, Filter paper partition chromatography of sugar. I. General description and application to the qualitative analysis in apple juice, egg white, and foetal blood of sheep. *Biochem. J. G.B.*, 42, n°2, 238-248 (p. 22, 99).
- PORCHET, M., 1967, Rôle des ovocytes submaturs dans l'arrêt de l'inhibition cérébrale chez *P. cultrifera*. *C. R. Acad. Sci.* 265 : 1394-1396 (p. 3, 36, 88).
- PORCHET, M., 1970, Relation entre le cycle hormonal cérébral et l'évolution ovocytaire chez *P. cultrifera*. *Gen. comp. Endoc.* 15 : 220-231 (p. 9, 88).
- PORCHET, M., 1974, Activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. Thèse de Doctorat, Lille (p. 38).
- PORCHET, M., CARDON, C., 1972, Régulation de l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae* (Annélides Polychètes). *C. R. Acad. Sci.* 275 : 2375-2378 (p. 3, 9, 88, 89).
- PORCHET, M., CARDON, C., 1976, The Inhibitory Feed-back Mechanism Coming from Oocytes and Acting on Brain Endocrine Activity in *Nereis* (Polychaetes, Annelids). *Gen. comp. Endoc.* 30 : 378-390 (p. 3, 9).
- PORCHET, M., DURCHON, M., 1968, Influence de la maturité génitale sur la régénération postérieure chez *P. cultrifera*. *C. R. Acad. Sc.* 267 : 194-196 (p. 36).
- PORCHET-HENNERE, E., 1969, Corrélation entre le cycle biologique d'une coccidie : *Coelotropha durchoni* et celui de son hôte : *Nereis diversicolor*. *Z. Parasitenk.* 31 : 299-314 (p. 7).
- PORCHET, P., SPIK, G., 1976, Contrôle hormonal de la biosynthèse des glycoconjugués chez les ovocytes de *P. cultrifera* Grube (Annélide Polychète). I. Aspects biochimiques. *Colloques Internationaux C.N.R.S.* n°251. Actualités sur les hormones d'Invertébrés (p. 9).

PUCCIA, E., DURANTE, M., 1973, The compensatory regeneration of the operculum of *Hydroides norvegica* : identification of the inhibiting substance. J. exp. Zool. 184 : 1-6 (p. 60).

R

ROSE, S.M., 1963a, Polarized control of regional structure in *Tubularia*.
Develop. Biol. 7 : 488-501 (p. 60).

ROSE, S.M., 1963b, Inhibition in Polarized Systems. In Proc. XVI Int. Congr.
Zool. Vol. 3 : Washington, 185-188 (p. 60).

ROSE, S.M., 1966, Polarized inhibitory control of regional differentiation
during regeneration in *Tubularia*. II. Separation of active materials by electrophoresis. Growth 30 : n°4, 429-448 (p. 60).

S

- SANGER, F., THOMPSON E.O.P., 1953, The amino acid sequence in the glycyl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymatic hydrolysates. Biochem. J. 53 : 366-374 (p. 26, 76, 101).
- SCHALLER, H.C., 1973, Isolation and characterization of a low molecular weight substance activating head and bud formation in *Hydra*: J. Embryol. Exp. Morphol. 29 : 27-38 (p. 3).
- SCHARRER, B., WEITZMAN, M., 1969, Aspects of Neuroendocrinology. V International Symposium on Neurosecretion. Edited by W. Bargmann and B. Scharrer, by Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 1970 (p. 1).
- SCHARRER, E., SCHARRER, B., 1937, Über Drüsen-Nervenzellen und neurosekretorische Organe bei Wirbellosen und Wirbeltieren. Biol. Rev. 12 : 185-216 (p. 1, 24).
- SCHRÖDER, P.C., 1966, Doctoral dissertation, Stanford University (p. 3).
- SMITH, S.D., 1963, Specific inhibition of regeneration in *Clymenella torquata*. Biol. Bull. 125 : 542-555 (p. 60).
- STARRAT, A.N., BROWN, B.E., 1975, Structure of the pentapeptide proctolin. A proposed neurotransmitter in insects. Life Sci. 17 : 1253-1256 (p. 2).
- STEELE, V.E., LANGE, C.S., 1977, Characterization of an organ specific differentiator substance in the Planarian *Dugesia etrusca*. J. Embryol. exp. Morph. 37 : 152-172 (p. 60).

T

- TARDENT, P., 1960, Principles governing the process of regeneration in hydroïds. In "Developing Cell System" (Rudnick ed.) 21-43, The Ronald Press, New-York (p. 60).
- TARDENT, P., 1963, Regeneration in the hydrozoa. Biol. Rev. 38 : 293-333 (p. 60).
- TRUMAN, J.W., RIDDIFORD, L.M., 1974a, Hormonal mechanisms underlying insect behaviour. Adv. Insect Physiol. 10 : 297-352 (p. 1).
- TRUMAN, J.W., RIDDIFORD, L.M., 1974b, Physiology of insect rhythms. III. The temporal organization of the endocrine events underlying pupation of the tobacco hornworm. J. Exp. Biol. 60 : 371-382 (p. 1).

VERBERT, A., CACAN, R., 1972, Description d'un procédé électrophorétique de séparation de l'AMP cyclique de ses métabolites. Application à la détermination de l'activité adénylcyclasique. Biochimie 54 : 1491-1492 (p. 34, 102).

WISSOCQ, J.C., 1971, Contribution à l'étude de la musculature et de son évolution au cours de la stolonisation des Syllidiens et de l'épitoquie des Néréidiens. Thèse de Doctorat, Lille (p. 7).

Y

YAMASHINA, I., MAKINO, M., 1962, The properties of a carbohydrate amino-acid complex form ovalbumin. J. Biochem. (Tokyo) 51 : 359-364 (p. 26, 76, 100).

