

50376  
1986  
101

50376  
1986  
101

N° d'ordre : 1350

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

FLANDRES ARTOIS

THESE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille  
Flandres Artois  
pour obtenir le grade de Docteur de 3ème cycle  
en Biologie et Physiologie Animales

par

**Gourounga Raymond BELEMTOUGRI**

DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE MOLECULES  
PEPTIDIQUES ET D'AMINES . LEUR COEXISTENCE  
DANS LE SYSTEME NERVEUX D'AESHNA  
CYANEA ( INSECTE, ODONATE)



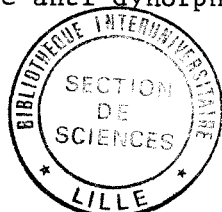
Soutenu le 5 juillet 1986 devant la Commission d'Examen

Président : M. PORCHET  
Rapporteur : J.C. ANDRIES  
Examineurs : N. DHAINAUT-COURTOIS  
G. TRAMU

*Que ce travail soit aussi le témoignage de ma reconnaissance à tous ceux qui, par leurs conseils, aides et encouragements, ont permis sa réalisation.*

# SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	5
Matériel	5
Méthodes	5
I - Préparation des tissus	5
1) En vue de l'obtention des coupes à la paraffine	5
2) En vue de l'obtention des coupes au cryostat	5
II - Techniques immunohistochimiques	6
1) Principe des réactions	6
2) Sérums utilisés	6
3) Procédure employée	7
a) Incubation du sérum spécifique	7
b) Incubation du sérum marqué	7
c) Révélation	7
d) Spécificité de l'immunsérum	7
III - Technique de transport rétrograde	8
CHAPITRE I : Détection de substances apparentées à des neuropeptides et à des hormones peptidiques de Mammifères	9
I - Localisation de cellules renfermant un matériel apparenté à des peptides du système entéro-gastro- pancréatique de Mammifères	10
1) Immunoréactivité anti-cholécystokinine/gastrine	10
2) Immunoréactivité anti-insuline	17
3) Immunoréactivité anti-motiline	19
4) Immunoréactivité anti-polypeptide intestinal vasoactif	20
5) Immunoréactivité anti-somatolibérine	22
6) Immunoréactivité anti-gastrolibérine	23
7) Immunoréactivité anti-substance P	24
II - Localisation de cellules renfermant un matériel apparenté à des opioïdes	25
1) Immunoréactivité anti-leucine-enképhaline	26
2) Immunoréactivité anti-méthionine-enképhaline	29
3) Immunoréactivité anti- $\alpha$ -néo-endorphine	31
4) Immunoréactivité anti-dynorphine	33



CHAPITRE II : Détection d'un peptide propre aux Insectes : la proctoline	39
Immunoréactivité anti-proctoline	39
CHAPITRE III : Détection d'une amine : la sérotonine	41
CHAPITRE IV : Détection d'un même neurone par plusieurs anticorps	46
I - Détection d'un même neurone par des anticorps dirigés contre divers peptides mammaliens	47
1) Par anticorps dirigés contre des peptides mammaliens apparentés : le VIP et l'hpGRF	47
2) Par anticorps dirigés contre des peptides mammaliens non apparentés	48
a) Neurones détectés par les anticorps anti-VIP et -hpGRF	48
$\alpha$ ) Présentant une immunoréactivité anti-CCK 8	48
$\beta$ ) Présentant une immunoréactivité anti-motiline	49
b) Neurones détectés par des anticorps anti-opioides	49
$\alpha$ ) Présentant une immunoréactivité anti-CCK 8	49
$\beta$ ) Présentant une immunoréactivité anti-motiline	51
c) Neurones détectés par les anticorps anti-CCK 8 et -GRF	51
II - Détection d'un même neurone par deux anticorps dirigés, l'un contre un peptide mammalien (CCK), l'autre, contre un peptide d'Insecte (proctoline)	53
III - Coexistence d'une amine : la sérotonine et d'un peptide apparenté à la cholécystokinine	53
CHAPITRE IV : Analyse des relations cerveau-corps cardiaque	56
CONCLUSION GÉNÉRALE	58

Chez les Insectes, de nombreuses fonctions hormonales ont été attribuées à des peptides. Schématiquement, ceux-ci contrôlent : (1) l'activité musculaire intestinale (Brown, 1975 ; Cook et Holman, 1979 ; Shukle et Judson, 1984), cardiaque (Mordue et Goldsworthy, 1969 ; Miller, 1979 ; S-Rozsa et Miller, 1981), oviductaire (Cook et Meola, 1978) ou squelettique (Piek et Mantel, 1977 ; May et Coll., 1979 ; Witten et O'Shea, 1985) ; (2) l'utilisation des lipides (Mayer et Candy, 1969) ; (3) la glycémie (Mordue et Goldsworthy, 1969 ; Migliori-Natalizi, 1970 ; Tager et Coll., 1975, 1976 ; Jones, 1978 ; Witten et Coll., 1983, 1984 ; O'Shea et Coll., 1984 ; Scarborough et Coll., 1984) ; (4) la diurèse (Maddrell, 1963 ; Mordue et Goldsworthy, 1969 ; Maddrell et Gee, 1974 ; Hughes, 1979) ; (5) la diapause (Isobe et Coll., 1973, 1975) ; (6) le tannage de la cuticule (Fraenckel et coll., 1966 ; Fogal et Fraenckel, 1969) ; (7) la mue (Nagasawa et Coll., 1985) ; (8) la métamorphose (Granger et Coll., 1984 ; Rembold et Coll., 1986).

La localisation précise d'une molécule peptidique dans le cerveau, le ganglion sous-oesophagien ou les corps cardiaques nécessite la connaissance de la séquence en acides aminés, laquelle est indispensable à la synthèse du peptide, ce qui constitue un préalable à la confection d'un anticorps spécifique. A ce jour, seules les séquences de la proctoline (Brown, 1975), de l'hormone adipocinétique (AKH) (Stone et Coll., 1976) et celle de l'hormone prothoracotrope (Nagasawa et Coll., 1985) sont connues.

Les difficultés d'isolement de ces molécules expliquent que nous n'ayons à "notre" disposition que les seuls anticorps anti-AKH et anti-proctoline. Par contre, de nombreux peptides ont été identifiés dans le système nerveux et le système gastro-entéro-pancréatique des Mammifères. L'opinion, selon laquelle les hormones peptidiques et neuropeptides sont apparus très tôt au cours de l'évolution, sans que leur séquence en acides aminés n'ait subi de modifications profondes, nous a amené à rechercher, dans le système nerveux d'un insecte, des molécules apparentées à des peptides de Mammifères. Si de nombreuses substances apparentées à des peptides de Mammifères ont été identifiées dans le système nerveux des Insectes (cholécystokinine (CCK)/gastrine, glucagon, insuline, polypeptide pancréatique (PP), somatostatine, enképhalines, endorphines, polypeptide intestinal vasoactif (VIP), vasopressine, ocytocine, sécrétine, calcitonine, somatolibérine, gonadolibérine, ACTH, motiline, ...), rares sont, cependant à ce jour, les cas où des recherches systématiques ont été entreprises et où plusieurs substances ont été identifiées chez un même insecte. C'est le

cas d'un Orthoptère, *Locusta migratoria* (Rémy et Coll., 1977 ; Doerr-Schott et Coll., 1978 ; Rémy et Dubois, 1981 ; Romeuf et Rémy, 1984), de deux Lépidoptères, *Manduca sexta* (El-Salhy et Coll., 1983) et *Bombyx mori* (Yui et Coll., 1980), de deux Diptères, *Eristalis aenus* (El-Salhy et Coll., 1980) et *Calliphora erythrocephala* (Duve et Thorpe, 1979, 1980, 1981, 1982 et 1983), d'un Dictyoptère, *Periplaneta americana* (Fujita et Coll., 1981), d'un Coléoptère, *Leptinotarsa decemlineata* (Veenstra et Schooneveld, 1984 ; Veenstra et Coll., 1984 ; Veenstra et Yanaihara, 1984 ; Veenstra et Coll., 1985a et b).

Plus rares encore, sont les cas où plusieurs peptides ont été identifiés dans une même cellule du système nerveux d'un insecte. A ce jour, seules des substances apparentées au FMRF amide et à la vasopressine (VP1) (Veenstra et Coll., 1984), au FMRF amide et à la proctoline (Veenstra et Coll., 1985a), à la vasopressine (VP4) et au polypeptide pancréatique (Veenstra et Coll., 1984), à la motiline et à la prolactine, à la vasopressine et à la prolactine, à l'ocytocine, la prolactine et la  $\beta$ -endorphine, au FMRF amide, au polypeptide pancréatique, au MSH et à la gastrine (Veenstra et Coll., 1985b) ont été colocalisées dans le système nerveux d'un insecte, le doryphore *Leptinotarsa decemlineata*.

La démonstration de la coexistence d'un peptide et d'une amine constitue une exception chez les Insectes. A notre connaissance, seuls Vieillemaringe et Coll. (1982) d'une part, Takeda et Coll. (1986) d'autre part ont conclu respectivement à la colocalisation de catécholamines et de peptides dans la *pars intercerebralis* de *Locusta migratoria*, de dopamine et d' $\alpha$ -endorphine dans le ganglion sous-oesophagien de *Bombyx mori*.

Une recherche approfondie de substances apparentées à des hormones peptidiques ou des neuropeptides de Mammifères et la démonstration de nombreux cas de colocalisation dans le cerveau et le ganglion sous-oesophagien d'*Aeshna cyanea* font l'objet de notre travail. Ainsi, des substances apparentées à différentes familles de peptides de Vertébrés ont été étudiées qu'il s'agisse de neurohormones hypothalamiques (corticolibérine, somatostatine, gonadolibérine), d'opioïdes (leucine-enképhaline, méthionine-enképhaline, dynorphine,  $\alpha$ -néo-endorphine,  $\gamma$ -MSH) ou de peptides du système gastro-entéro-pancréatique (peptide intestinal vasoactif, cholécystokinine, substance P, insuline, somatolibérine, motiline, gastrolibérine). Nous avons également étudié la localisation de la proctoline et celle d'une amine biogène : la 5-hydroxytryptamine (5 HT) ou sérotonine.

Le cerveau des Insectes résulte de la fusion, au-dessus de l'oesophage, de la masse nerveuse de l'acron et des neuromères des ganglions

correspondant aux deux premiers métamères céphaliques. Ainsi le cerveau se compose de trois parties : 1) le protocérébron ou cerveau antérieur bilobé qui, par les lobes optiques, est en relation avec les yeux composés. La *pars intercerebralis* en position dorsale regroupe la plupart des cellules neurosécrétrices telles que les ont mises en évidence les colorations classiques (Clark, Azan ...). 2) Le deutocérébron ou cerveau moyen correspond aux lobes antennaires réunis par une commissure sus-oesophagienne. 3). Le tritocérébron ou cerveau postérieur comprend deux masses nerveuses séparées par l'oesophage. Par le collier périoesophagien, il communique avec le ganglion sous-oesophagien.

La morphologie du cerveau d'*Aeshna cyanea* (Fig. 1) est conforme à celle exposée ci-dessus.

Situé ventralement, le ganglion sous-oesophagien résulte de la fusion des neuromères correspondant aux métamères mandibulaire, maxillaire et labial.

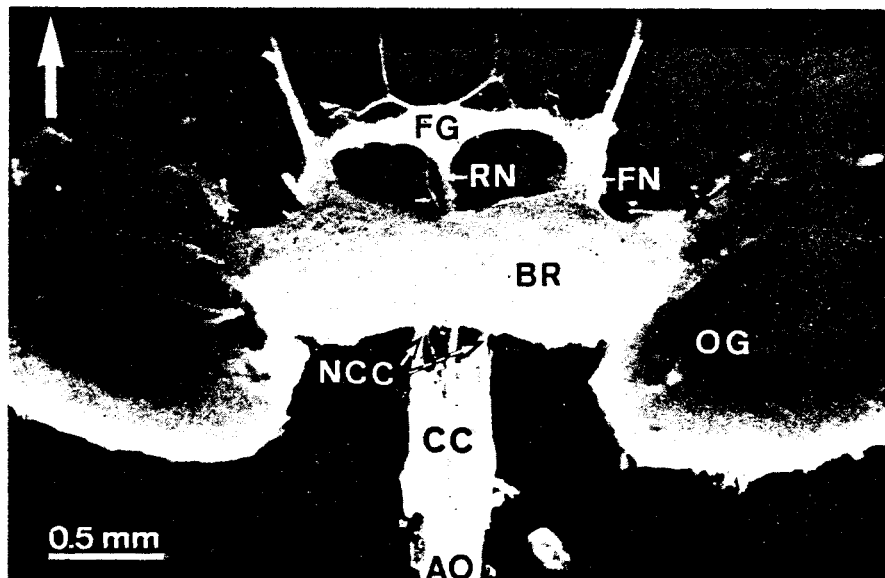


Fig. 1 : Vue dorsale du complexe cerveau-corps cardiaques de la larve du dernier stade d'*Aeshna cyanea* (AO : aorte ; BR : cerveau ; CC : corps cardiaque ; FG : ganglion frontal ; FN : nerfs frontaux ; NCC : nerfs cardiaques internes ; OG : ganglions optiques ; R/N : nerf récurrent ; la flèche indique la région antérieure) (photo F. Schaller et M. Charlet In : Neurohemal organs of Arthropods. Their development, evolution, structure, and functions. A.P. Gupta ed.).



Chez les Insectes, les corps cardiaques (*corpora cardiaca*) sont des organes neurohémaux qui reçoivent les produits de sécrétion de cellules nerveuses du protocérébron par l'intermédiaire de deux nerfs pairs, les

nerfs cardiaques internes (nccI) issus de deux groupes médians de cellules appartenant à la *pars intercerebralis* et les nerfs cardiaques externes (nccII) originaires de deux groupes cellulaires latéraux. Seule l'existence des nccI et des cellules de la *pars intercerebralis* dont ils proviennent, a pu être démontrée avec certitude chez les Odonates (Schaller et Meunier, 1968 ; Charlet, 1972 ; Schaller et Charlet, 1983) bien que Gabe et Arvy (1952) aient préalablement mentionné l'existence des nccII.

Une technique basée sur le transport rétrograde de molécules telles que la péroxydase de Raifort ou le chlorure de cobalt nous a permis en les injectant dans le corps cardiaque, de localiser certains groupes cellulaires dont les terminaisons nerveuses y sont situées.



## MATÉRIEL ET MÉTHODES

## Matériel

La plupart des larves d'*Aeshna cyanea* utilisées ont été capturées en automne en période de prédiapause. Elles ont été maintenues en diapause à une température comprise entre 0° et 10° C sous une photopériode hivernale naturelle. La diapause est rompue en plaçant les larves à 20° C sous une photopériode de jours longs : 16 h. de lumière et 8 h. d'obscurité. Leur nourriture quotidienne est constituée de larves de chironome.

Les larves sont sacrifiées à l'avant dernier stade (ADS), cinq à six jours après la mue ; la durée moyenne de l'avant dernier stade étant dans ces conditions de quatorze jours.

## Méthodes

### I - Préparation des tissus

Quelque que soit la procédure employée, les larves sont décapitées et les têtes plongées dans le fixateur.

#### 1) En vue de l'obtention des coupes à la paraffine

Les têtes sont immergées dans le liquide de Bouin hollandaise sublimé sans acide acétique puis, après déshydratation, incluses dans la paraffine et débitées en coupes sériées de 6 µm d'épaisseur.

#### 2) En vue de l'obtention des coupes au cryostat

Les têtes sont placées dans une solution d'acide picrique-formaldéhyde (PAF) (Stéfanini et Coll., 1967) pendant 24 h. puis lavées à 4° C pendant 24 h. dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,6 contenant 5 % de sucrose.

L'enrobage est réalisé par immersion des têtes dans du Tissue-Tek ou du cryoform. L'ensemble est plongé dans du méthyl-2-butane refroidi par l'azote liquide et les coupes réalisées à -20° C au cryostat.

Les coupes transversales de 12 µm sont recueillies une à une et collées sur des lames traitées à la gélatine-alun de chrome. En vue d'une comparaison de réactions obtenues après incubation avec des sérums différents, les coupes sont recueillies individuellement et placées alternativement sur deux lames différentes.

## II - Techniques immunohistochimiques

### 1) Principe des réactions

Nous avons utilisé des réactions de type indirect (Coons, 1978) qui se déroulent en deux temps.

- a) l'immunsérum spécifique de l'antigène recherché est produit chez le lapin.
- b) le sérum utilisé comme révélateur est produit par immunisation d'un mouton ou d'une chèvre contre les immunoglobulines de lapin. Ce deuxième sérum est couplé au marqueur, la peroxydase de Raifort.

Cette méthode de type indirect présente deux avantages majeurs :

- 1) le marqueur (peroxydase) n'est pas couplé directement à l'immunoglobuline spécifique, ce qui évite une dénaturation plus ou moins importante de celle-ci.
- 2) l'emploi d'une deuxième immunoglobuline permet d'augmenter le nombre des unités de marqueur par site antigénique donc la sensibilité de la réaction.

### 2) Sérums utilisés

Les immunsérums anti-cholécystokinine 8 non sulfatée (CCK8NS), - cholécystokinine 8 sulfatée (CCK-8S), - somatolibérine (hp GRF) (antigène isolé d'une tumeur pancréatique humaine), - polypeptide intestinal vasoactif (VIP), - vasopressine, - corticolibérine (CRF), - substance P, - sérotonine, - méthionine-enképhaline (Met-Enképhaline), - leucine-enképhaline (Leu-Enképhaline), - gonadolibérine (LHRH), -  $\alpha$ -néoendorphine, -  $\beta$ -endorphine, - proctoline, - Neuropeptide Y (NPY), - motiline, - somatostatine (SRIF), - gastrolibérine (GRP), -  $\gamma$ -MSH ont été utilisés. Tous sauf l'immunsérum anti-insuline (n° PP 1246L, Cambridge Medical Diagnostics Inc) ont été fournis par G. TRAMU (U. 156 INSERM).

Le sérum anti-immunoglobuline de lapin marqué à la peroxydase est commercialisé par l'Institut Pasteur ou par Biosys.

### 3) Procédure employée

#### a) incubation du sérum spécifique

Après déparaffinage (coupes à la paraffine) ou séchage pendant un minimum de temps à la température ambiante (coupes au cryostat), les coupes sont placées pendant un minimum de quinze minutes dans du tampon de Coons pH 7,2.

L'incubation des coupes en présence du sérum spécifique est réalisée pendant 12 h. à 4° C et en chambre humide afin d'éviter tout risque de dessèchement. L'immunsérum est dilué au 1/200 dans du tampon de Coons pH 7,2 contenant 0,25 % de triton X 100.

#### b) incubation du sérum marqué

Après incubation par l'anticorps spécifique, les coupes sont rincées dans deux bains de tampon de Coons puis incubées 45 mn. à 4° C en chambre humide avec le sérum marqué à la peroxydase, dilué au 1/40 dans du tampon de Coons sans azide.

Ce sérum marqué est constitué d'immunoglobulines de Mouton anti-lapin entières ou d'immunoglobulines de Mouton anti-lapin fraction Fab couplées à la peroxydase de Raifort.

#### c) révélation

Après rinçage dans du tampon de Coons puis dans l'eau distillée, l'activité peroxydasique est révélée par une réaction enzymatique colorée ; le chromogène utilisé étant le 4-chloro-1-naphtol et le substrat l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le précipité bleu-violet apparu étant soluble dans le toluène et le benzène, le montage se fait dans la glycérine diluée (glycérine 9 vol/tampon de Coons 1 vol.). Les lames ainsi montées sont examinées au microscope photonique.

#### d) spécificité de l'immunsérum

Elle est réalisée par des réactions d'absorption d'un anticorps spécifique par l'antigène correspondant ou par divers antigènes susceptibles de se complexer aux immunoglobulines de lapin. L'immunsérum ainsi saturé est appliqué en alternance avec l'immunsérum non absorbé sur des coupes sériées. L'absorption de l'immunsérum par l'antigène correspondant doit provoquer l'inhibition du marquage enzymatique.

### III - Technique de transport rétrograde

Des larves du dernier stade (DS) âgées de cinq à six jours ont été utilisées.

Après avoir fait un volet dans la partie dorsale de la tête, le cerveau est déplacé vers l'avant de façon à mettre en évidence le corps cardiaque . Celui-ci est alors injecté pendant 2 à 3 h. par une solution de peroxydase de Raifort (Horseradish peroxydase (HRP) type VI Sigma) à l'aide d'une microélectrode reliée à un stimulateur électrique.

Afin d'éviter toute dessiccation, l'animal, fixé sur une plaque de liège, est immergé dans une solution de Ringer. Après décapitation, la tête est plongée dans une solution de tampon phosphate 0,1 M contenant du glutaraldéhyde à 2 % pendant 2 h. à 4° C puis dans du tampon phosphate 0,1 M contenant 5 % de sucrose pendant une nuit à 4° C.

La coloration *in toto* est réalisée en deux temps : (1) 3 h. à 4° C dans une solution de diaminobenzidine (DAB) dans du tampon phosphate 0,1 M (2) 3 h. à température ambiante dans la solution de DAB additionnée de 10 % d' $H_2O_2$  à 0,3 %. Un lavage rapide (1 mn) dans le tampon phosphate 0,1 M précède la déshydratation et l'inclusion dans la paraffine.

## CHAPITRE I

DETECTION DE SUBSTANCES APPARENTEES  
A DES NEUROPEPTIDES ET A DES  
HORMONES PEPTIDIQUES DE MAMMIFERES

Des immunsérums dirigés contre des peptides du système entéro-gastro-pancréatique ou du système nerveux de Mammifères ont été utilisés sur des coupes au cryostat et dans la majorité des cas sur coupes à la paraffine. Si certains d'entre eux (sérums anti-LHRH, -CRF, -MSH, -angiotensine, -vasopressine) n'ont donné aucune réponse que ce soit au niveau des cellules ou des fibres nerveuses, d'autres sérums ont permis de caractériser de façon précise de nombreux groupes cellulaires du cerveau et du ganglion sous-oesophagien. Toutefois, en immunohistochimie, l'intensité du marquage et le nombre de cellules immunoréactives varient assez fréquemment d'un individu à un autre, peut-être en fonction du stade physiologique, voire du moment du cycle nycthéral auquel l'animal a été sacrifié. Les descriptions qui suivent concernent l'ensemble des cellules qui réagissent avec une intensité satisfaisante bien que parfois modérée et font état de certains groupes cellulaires qui ne sont pas détectés de façon systématique.

## I - LOCALISATION DE CELLULES RENFERMANT UN MATÉRIEL APPARENTÉ À DES PEPTIDES DU SYSTÈME ENTÉRO-GASTRO-PANCRÉATIQUE DE MAMMIFÈRES

Nous considérons sous le vocable de peptides du système entéro-gastro-pancréatique, les peptides primitivement mis en évidence au niveau du tube digestif et/ou de ses glandes annexes. Ce sont la gastrine/cholécystokinine, l'insuline, la motiline, le polypeptide intestinal vaso actif, la somatolibérine.

### 1) Immunoréactivité anti-cholécystokinine/gastrine

*La CCK fut primitivement isolée en tant que triacontatriapeptide (CCK-33) de l'intestin grêle du porc (Mutt et Jorpes, 1968, 1971). Son action principale s'exerce sur la contraction de la vésicule biliaire. Comme la CCK possède le même pentapeptide carboxy-terminal que la gastrine, les sérums spécifiques détectent à la fois la CCK et la gastrine d'où la dénomination d'immunoréactivité anti-CCK/gastrine.*

*Initialement mise en évidence dans le tube digestif, la CCK fut également détectée dans le cerveau (Vanderhaeghen et Coll., 1975) sous forme d'une molécule plus petite (CCK-8) ne renfermant que les 8 acides aminés C-terminal de la précédente.*

Nous avons utilisé deux immunsérums, l'un dirigé contre l'octapeptide C-terminal sulfaté de la cholécystokinine (CCK-8S), l'autre contre le même octapeptide dont le résidu tyrosine n'est pas sulfaté (CCK-8NS).

### Observations sur coupes à congélation

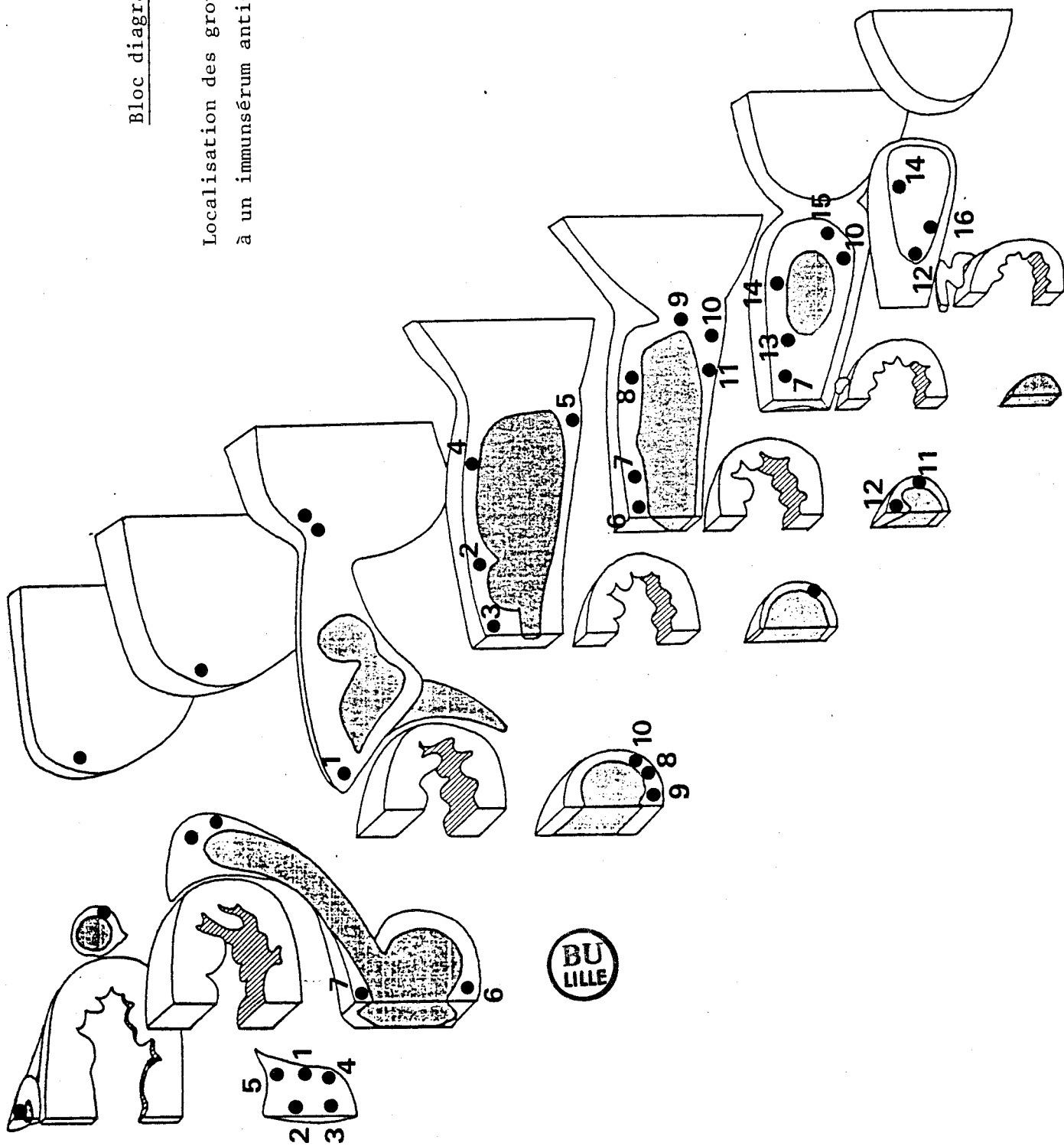
#### Au niveau des lobes optiques

Dans la médulla, une dizaine de strates de fibres variqueuses parallèles réagissent au sérum anti-CCK-8NS alors qu'une seule d'entre elles est intensément marquée après incubation avec le sérum anti-CCK-8S (Pl I, figs. b-d). Plusieurs groupes de cellules sont observés au voisinage de la médulla. Deux d'entre eux sont particulièrement importants soit par le nombre, soit par la taille des cellules immunoréactives : (1) Le premier concerne plus d'une cinquantaine de petites cellules réagissant intensément à l'immunsérum anti-CCK-8NS (Pl I, fig. c) de façon nettement moins importante voire nulle au sérum anti-CCK-8S (Pl I, fig. d). (2) Le second groupe comprend



Bloc diagramme 1

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti-CCK-8NS.



dix à douze cellules de grande taille (20-25  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Pl I, fig. b) fortement réactives aux deux immunsérums. Dans la partie plus postérieure, quelques quinze à vingt cellules très faiblement immunoréactives (7-10  $\mu\text{m}$  de diamètre) et quelques rares cellules de taille moyenne, modérément marquées envoient leurs trajets axonaux vers le neuropile de la médulla.

Dans la lobula, les couches concentriques de fibres immunoréactives sont moins régulières et prononcées que dans la médulla. La plupart d'entre elles semblent avoir une origine protocérébrale bien que quelques rares cellules puissent être observées au voisinage de la lobula (Pl I, fig. e).

Enfin deux couches de fibres immunoréactives s'observent dans la lamina.

#### Au niveau du protocérébron

Les groupes de cellules immunoréactives ont été numérotés de la partie antérieure à la partie postérieure du cerveau comme l'indique le tableau 1 et le bloc diagramme 1. Certains des groupes que nous avons définis sont composites et regroupent plusieurs populations neuronales. Ainsi les groupes latéro-dorsal (groupe 14) et latéral (groupe 9) qui occupent une aire relativement importante contiennent, en plus de petits neurones, des corps cellulaires de taille moyenne et de grande taille.

Dans un même groupe, quelques cellules peuvent apparaître fortement marquées alors que d'autres ne réagissent que faiblement à l'immunsérum (par exemple dans le groupe 1, seules les cellules de petite taille sont intensément colorées). Le marquage de certaines cellules (par exemple des groupes 6, 7, 10 et 16) est aussi intense après incubation avec l'immunsérum anti-CCK-8S qu'avec l'immunsérum anti-CCK-8NS. Au contraire, les grosses cellules piriformes du groupe 13 comme la plupart des petites cellules des groupes 8, 9, 12, 14 et 15 ne réagissent pas ou très faiblement à l'immunsérum anti-CCK-8S.

#### Au niveau du tritocérébron

Plusieurs groupes comportant au total 12 à 15 cellules immunoréactives sont situés antérieurement en position latéro-ventrale ou dorsale, à proximité du neuropile tritocérébral. Plus postérieurement, 3 à 4 cellules de taille moyenne, faiblement marquées sont localisées latéro-dorsalement et autant sont présentes en position plus dorsale. Le marquage diffère quelque peu

groupe cellulaire	nombre de cellules	taille	Intensité du marquage		localisation	figures
			CCK-8NS	CCK-8S		
1	10	4-6 grandes 4 petites	+ à ++ +++	+ à + +++	paramédiane	Pl. I, figs. g et
2	15-20	très petite	++	+	paramédiane dorsale	Pl. I, fig. f
3	2	très grande	+ à +++	+ à +	sagittale dorsale	Pl. I, fig. f Pl. II, figs. a et
4	3-4	petite	+	+	dorsale	
5	10	petite à moyenne	+ à ++	0 à +	latéro-ventrale	
6	2	moyenne	+++	+++	dorsale parasagittale	
7	4-5	grande	+++	++	dorsale paramédiane	Pl. II, figs. c et
8	10	petite	+ à +	0 à +	latéro-dorsale	Pl. II, figs. c et
9	16	12 petites 4 grandes	+ à + ++	0 à + ++	latérale	Pl. II, figs. c et
10	3	grande	+++	+++	latéro-ventrale	Pl II figs. c et
11	1	grande	+	+	ventrale	Pl. II, fig. c
12	10	petite	+ à ++	0 à +	centrale à ventrale	Pl. II, figs. e et
13	4-5	grande	+++	0 à +	dorsale	Pl. II, figs. e et f
14	10	5 petites 5 moyennes à grandes	+ + à ++	0 à + + à ++	latéro-dorsale	Pl. II, figs. e et
15	12	petite	+	0 à +	latérale	Pl. II, figs. e et
16	2	grande	+++	+++	centrale	Pl II, figs. e et

Tableau 1 : Localisation des groupes cellulaires du protocerebron (tous les groupes ont une disposition symétrique).



selon les types cellulaires (les cellules latéro-ventrales sont les plus intensément marquées) et l'immunsérum utilisé ; les réactions sont toujours moins nettes après incubation avec l'immunsérum anti-CCK-8S.

#### Au niveau du corps cardiaque

Une immunoréactivité s'observe d'une part dans certaines cellules du corps cardiaque et d'autre part dans les fibres nerveuses et terminaisons axonales issues probablement de cellules protocérébrales, via les *nervi corporis cardiaci* (nccI). Ainsi du matériel apparenté à la cholécystokinine existe en tant que peptide extrinsèque (protocérébral) et intrinsèque, contrairement à ce qui a été décrit chez la blatte *Leucophaea maderae* (Hansen et Coll., 1982), chez laquelle une même molécule peptidique ne semble pas être à la fois d'origine extrinsèque et intrinsèque.

#### Au niveau du système nerveux stomatogastrique

Plus d'une dizaine de cellules de grande taille (25 µm de diamètre) (Pl. III, figs. a et b) sont marquées dans la partie antérieure du ganglion frontal après incubation avec les sérums anti-CCK-8S ou anti-CCK-8NS. De plus, 15 à 20 cellules de taille moyenne situées dans la partie postérieure du ganglion réagissent uniquement à l'immunsérum anti-CCK-8NS.

#### Au niveau du ganglion sous-oesophagien

Une douzaine de groupes cellulaires symétriques renfermant une ou plusieurs cellules réagissent à l'immunsérum anti-CCK-8NS. La distribution de ces neurones est résumée dans le bloc diagramme 1. Quand l'immunsérum anti-CCK-8S est utilisé au lieu de l'immunsérum anti-CCK-8NS, les dépôts immunoréactifs sont fréquemment moins intenses. Ainsi, la plupart des cellules CCK-8NS positives sont faiblement marquées par l'immunsérum anti-CCK-8S (par exemple les groupes 2, 3 et 5, les petites cellules du groupe 10). Seules, les grosses cellules des groupes 8 et 9 et quelques cellules de taille moyenne du groupe 12 apparaissent intensément marquées par les deux immunsérums.

#### Observations sur coupes à la paraffine

Seul, le sérum anti-CCK-8NS a été testé. De nombreux groupes cellulaires détectés sur coupes au cryostat ne sont pas marqués (ex. cellules paramédianes de la partie antérieure du protocérébron, cellules

groupe cellulaire	nombre de cellules	taille	Intensité du marquage		localisation	figures
			CCK-8NS	CCK-8S		
1	6-8	grande	0 à +	0	latéro-dorsale	
2	3	petite	++	+	parasagittale centro-dorsale	Pl. III, fig. e
3	3	petite	++	+	parasagittale centro-ventrale	Pl. III, figs. c-e
4	2-3	petite	+ à +	+	latéro-ventrale	
5	3	grande	+++	+	latéro-dorsale	Pl. III, figs. c-e
6	2	moyenne	+ à +++	?	médio-ventrale	
7	4-5	2 grandes 2-3 moyennes	++ à +++	+ à ++	médio-dorsale	
8	1	grande	+++	+++	ventrale	Pl. III, fig. h
9	1	grande	+++	+++	médio-ventrale	Pl. III, figs f-h
10	12	10 grandes 3-4 moyennes	+ à ++ ++ à +++	0 à + +	latéro-ventrale	Pl. III, figs. i-k
11	1	grande	+++	0 à +	latérale	Pl. III, figs. l-n
12	15	6-8 moyennes 3-10 très grandes	+ à +++ + à +++	+ à ++ + à ++	médio-dorsale	Pl. III, figs. i-p



Tableau 2 : Localisation des groupes cellulaires du ganglion sous-oesophagien (tous les groupes ont une disposition symétrique sauf les groupes 7 et 12).

médio-dorsales de la partie postérieure du ganglion sous-oesophagien...)). Toutefois, en cas de réponse positive, l'intensité de la réaction est aussi forte que sur coupes au cryostat .

### Discussion

Chez les Mammifères, l'hormone intestinale, la cholécystokinine est présente en grande quantité dans les systèmes nerveux périphérique et central, plus particulièrement dans le système nerveux central qui apparaît comme le site principal de production de la cholécystokinine. Chez les Insectes, peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent. Trois groupes symétriques de 3 à 4 cellules réagissant au pentapeptide C-terminal de la gastrine sont présents dans le cerveau de la mouche *Eristalis aenus* (El-Salhy et Coll., 1980).

Cinq groupes de neurones immunoréactifs ont été décrits chez la mouche bleue *Calliphora vomitoria* (Duve et Thorpe, 1981). Un groupe unique de 3 à 4 cellules immunoréactives s'observe dans chaque moitié du protocérébron de *Manduca sexta* (El-Salhy et Coll., 1983). Ainsi chez toutes ces espèces, le nombre de cellules CCK/gastrine positives reste toujours modéré.

Chez *Aeshna cyanea* le nombre de cellules immunoréactives est nettement plus important que dans les espèces étudiées jusqu'à présent. En effet, plus d'une centaine de cellules réagissent à l'immunsérum anti-CCK-8NS dans chaque moitié du cerveau. Elles constituent 16 groupes dans le seul protocérébron et 12 dans le ganglion sous-oesophagien. Ces divergences peuvent correspondre, soit à de vraies différences spécifiques, soit à des variations liées à la sensibilité des immunsérums utilisés par les différents auteurs.

Deux problèmes inhérents aux études immunohistochimiques concernent en effet, l'un la spécificité, l'autre la sensibilité des anticorps. Dans nos contrôles, l'immunoréactivité disparaît après absorption de l'immunsérum par un excès de l'antigène correspondant. De plus, par RIA,\* il a été démontré que l'immunsérum anti-CCK-8NS donne de fortes réactions croisées avec la cholécystokinine-8NS, -8S et la gastrine (1-17), mais pas avec la substance P, la somatostatine, les leu- et met-enképhalines, la  $\beta$ -endorphine, le peptide FMRF-amide (Studler et Coll., 1984). En conclusion, si nos immunsérums apparaissent hautement spécifiques, ils ne permettent pas de dissocier une immunoréactivité anti-gastrine d'une immunoréactivité anti-CCK.

\* radioimmunoassay

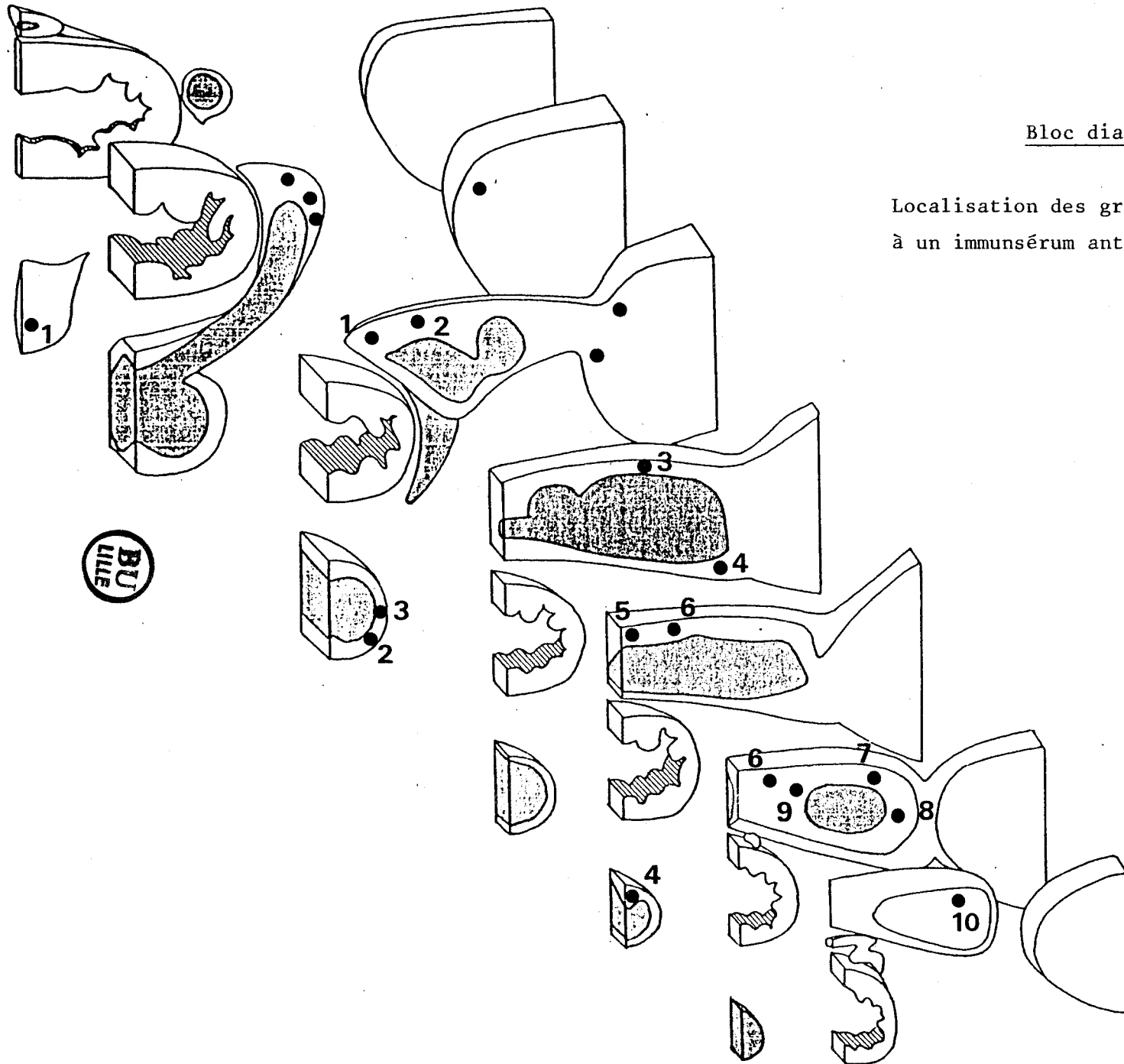
En règle générale, la réaction est toujours beaucoup plus importante quand l'immunsérum anti-CCK-8NS est employé au lieu de l'immunsérum anti-CCK-8S. Seules, les cellules CCK-8NS très intensément (+++) ou intensément (++) marquées présentent une forte réaction avec l'immunsérum anti-CCK-8S. Les cellules plus faiblement réactives (+) sont difficilement reconnaissables lorsque l'immunsérum anti-CCK-8S est employé. Il semble donc logique de penser que la localisation immunohistochimique du matériel apparenté à la cholécystokinine est quelque peu entravée par une sensibilité trop faible de l'immunsérum anti-CCK-8S. Cependant, un tel argument ne permet pas d'expliquer pourquoi certains corps cellulaires de grande taille comme ceux du groupe 13 du protocérébron qui sont fortement marqués par l'immunsérum anti-CCK-8NS ne sont pas ou très difficilement détectés après incubation avec l'immunsérum anti-CCK-8S. Le fait que, quelques neurones peuvent réagir avec des anticorps dirigés contre d'autres peptides, comme c'est le cas des neurones du groupe 13 qui montrent une immunoréactivité avec l'immunsérum anti-hp GRF (cf chapitre IV), ne permet pas de répondre à cette question.

Des différences de marquage des neurones d'un même groupe, comme c'est le cas des gros neurones du septième groupe du ganglion sous-oesophagien, reflètent probablement les variations de quantité d'antigène présent, plutôt que des différences dans l'immunoréactivité du peptide. Bien que nous n'ayons pas chez les Insectes d'informations relatives à la structure de la molécule ou des molécules apparentées à la cholécystokinine, il est probable que, comme chez les Mammifères, différentes formes moléculaires soient présentes dans le système nerveux et soient, par conséquent, plus ou moins bien reconnues par nos immunsérums.

De nombreux peptides apparentés à ceux de Mammifères ont été décrits dans les corps cardiaques de *Leucophaea maderae* (Hansen et Coll., 1982), mais, jusqu'à présent, une substance apparentée à la cholécystokinine a été uniquement mise en évidence dans les corps cardiaques de *Calliphora vomitoria* (Duve et Thorpe, 1984). Nos résultats concordent avec ceux de Duve et Thorpe chez *Calliphora* : le marquage concerne à la fois les terminaisons axonales et les cellules glandulaires. Ainsi, comme c'est souvent le cas dans un organe neurohémal, en plus du rôle neurotransmetteur ou neuromodulateur (non démontrés mais fort probables dans les centres nerveux), la substance apparentée à la cholécystokinine pourrait jouer un rôle neurohormonal.

Bloc diagramme 2

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunsérum anti-insuline.





## 2) Immunoréactivité anti-insuline

L'insuline est une molécule peptidique de 51 acides aminés, constituée de 2 chaînes comprenant respectivement 21 (chaîne A) et 30 acides aminés (chaîne B), dont l'action hypoglycémisante a été particulièrement bien établie chez les Mammifères. Le polypeptide à son origine, la préproinsuline, comporte 110 acides aminés (Bell et coll., 1979). L'excision de son extrémité N terminale (25 acides aminés) fournit la proinsuline, laquelle comprend, en plus des 2 chaînes A et B, un peptide les connectant. Ce peptide, dont la séquence est variable suivant les espèces, est formé, dans le cas de l'insuline humaine, de 34 acides aminés.

De nombreux péricaryons sont révélés dans le système nerveux central après fixation au Bouin hollandaise sublimé (bloc diagramme 2). Au niveau des lobes optiques, deux groupes de cellules immunoréactives sont détectés : (1) le premier comprend quinze à vingt cellules dorsales de taille moyenne qui envoient leurs axones vers la médulla (Pl. IV, figs. b, e et f) ; (2) le second est constitué de deux cellules de taille moyenne et d'une dizaine de très petites cellules situées ventralement au voisinage de la lobula (Pl. IV, fig. b).

Dix groupes de cellules immunoréactives s'observent dans chaque moitié du protocérébron (tableau 3). La numérotation est faite de la région antérieure vers la région postérieure.

Groupe cellulaire	Nombre de cellules	Taille	Localisation	Figures
1	1	moyenne	centrale	Pl. IV, fig. e
2	4-5	petite	paramédiane, dorsale	Pl. IV, fig. e
3	2-3	petite	dorsale	
4	≈20	petite	latéro-ventrale	Pl. IV, fig. g
5	2-3	petite	parasagittale (pars intercerebralis)	
6	3	moyenne	paramédiane (pars intercerebralis)	Pl. IV, fig. h
7	5-6	petite	latéro-dorsale	
8	5-6	petite	latérale	
9	4	grande	dorsale	Pl. IV, fig. j
10	4-5	petite	latéro-dorsale	

Trois groupes de quatre à six petites cellules sont situés autour du neuropile tritocérébral, respectivement en position latéro-ventrale (Pl. IV, figs. c et d), latérale et dorsale (Pl. IV, fig. f).

Trois groupes symétriques de quelques cellules immunoréactives (une ou deux) sont présents dans le ganglion sous-oesophagien : (1) une petite cellule médio-ventrale antérieure ; (2) deux petites cellules latéro-ventrales ; (3) une cellule latérale de taille moyenne. Par ailleurs, une grande cellule dorsale réagit à l'immunsérum dans la partie postérieure du ganglion. Aucun corps cellulaire n'est détecté dans le ganglion frontal bien que de nombreuses fibres soient intensément marquées (Pl. IV, fig. a) Des terminaisons axonales présentes dans le corps cardiaque sont également marquées.

Seules les cellules protocérébrales du groupe 9 sont détectées sur coupes au cryostat (Pl. IV, fig. i).

### Discussion

Des substances apparentées à l'insuline ont été détectées par radioimmunoassay ou par immunohistochimie dans le système nerveux de nombreux Insectes : *Calliphora vomitoria* (Duve et Thorpe, 1979), *Bombyx mori* (Yui et coll., 1980), *Eristalis aenus* (El-Salhy et coll., 1980), *Manduca sexta* (El-Salhy et coll., 1983), *Ostrinia nubilalis* (Lavenseau et coll., 1984), *Leptinotarsa decemlineata* (Veenstra et coll., 1985b). Par ailleurs des peptides apparentés à l'insuline ont été décrits dans les corps cardiaques (Tager et coll., 1976 ; Orchard et Loughton, 1980) et dans l'intestin moyen (Ishay et coll., 1976 ; Moreau et coll., 1981 ; Lequellec et coll., 1982).

Des études récentes (Kramer et coll., 1982 ; Duve et Thorpe, 1984 ; O'Connor et Baxter, 1985) ont démontré que la séquence peptidique de l'insuline des Insectes est très proche de celle de l'insuline mammalienne. Ses fonctions seraient de même analogues à celles exercées par l'insuline de Mammifères. Ainsi, elle joue le rôle de facteur hypoglycémiant et favorise la pénétration du glucose dans les cellules adipeuses du rat (O'Connor et Baxter, 1985).

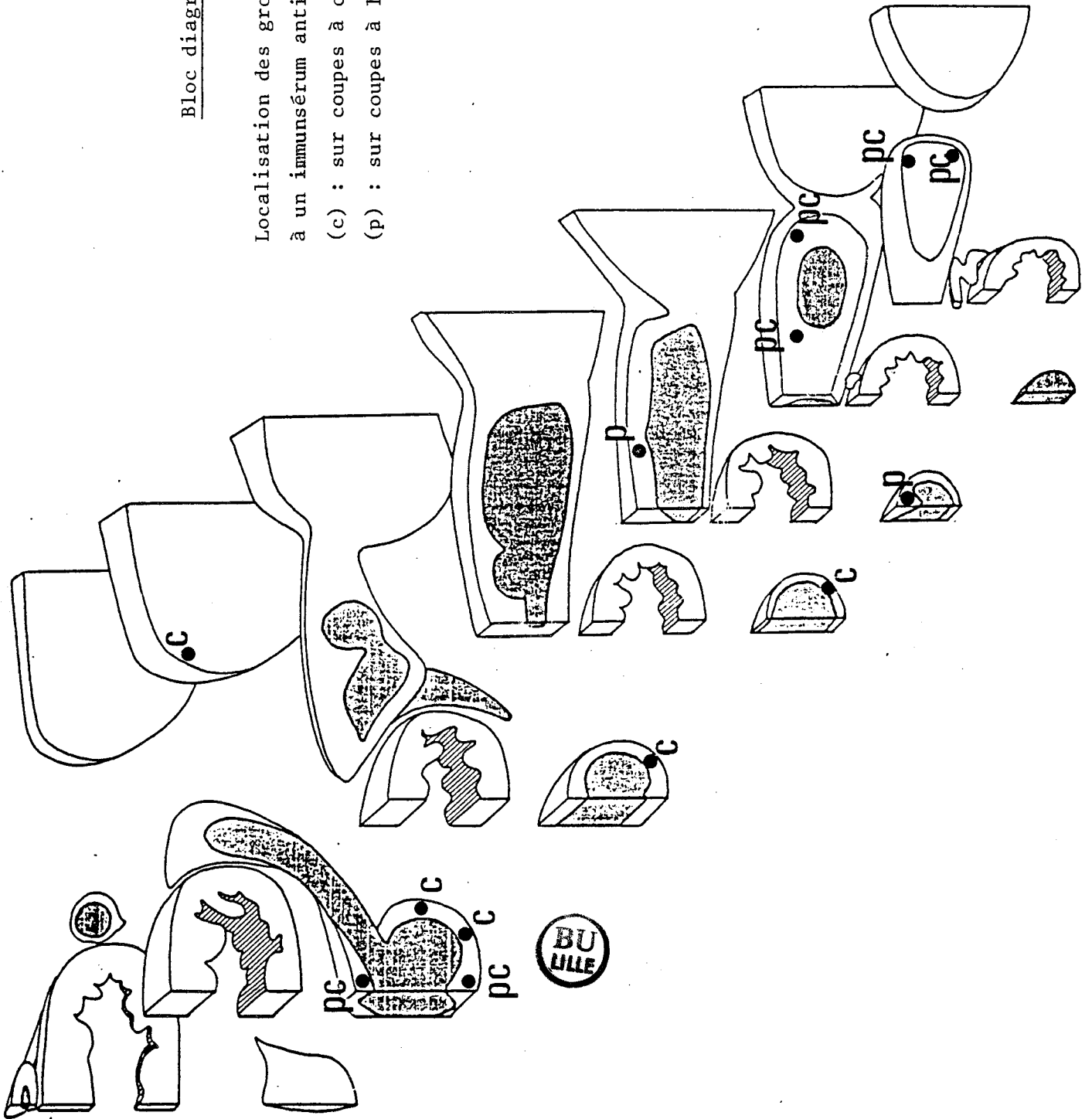
La séquence peptidique de l'hormone prothoracotrope (PTTH) de *Bombyx mori* montre de grandes homologues avec celle de la chaîne A de

Bloc diagramme 3

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti-motiline

(c) : sur coupes à congélation

(p) : sur coupes à la paraffine



l'insuline (Nagasawa et coll., 1985). Quoique la PTH de *Bombyx mori* ne reconnaisse pas l'anticorps anti-cobaye dirigé contre l'insuline porcine (Nagasawa et coll., 1985), il n'est pas exclu qu'un immunosérum anti-insuline ne puisse, chez d'autres Insectes, révéler des cellules de la *pars intercerebralis* sécrétant la PTH. Chez *Aeshna cyanea*, nous avons pu observer, dans cette partie du cerveau, deux types cellulaires qui réagissent à l'immunosérum anti-insuline : de petites cellules parasagittales et de grandes cellules latérales. Ainsi, l'un ou l'autre de ces groupes cellulaires pourrait-il intervenir dans le contrôle de la sécrétion des glandes ventrales, sources de la PTH.

### 3) Immunoréactivité anti-motiline

La motiline est un polypeptide de 22 acides aminés qui, à l'origine, fut isolé de l'intestin de porc (Brown et coll., 1972). Elle doit son nom au fait qu'elle provoque des contractions de la paroi stomacale. Une substance apparentée à la motiline, quoique différente (Beinfeld et Korchak, 1985) a été également détectée dans le cerveau des Mammifères.

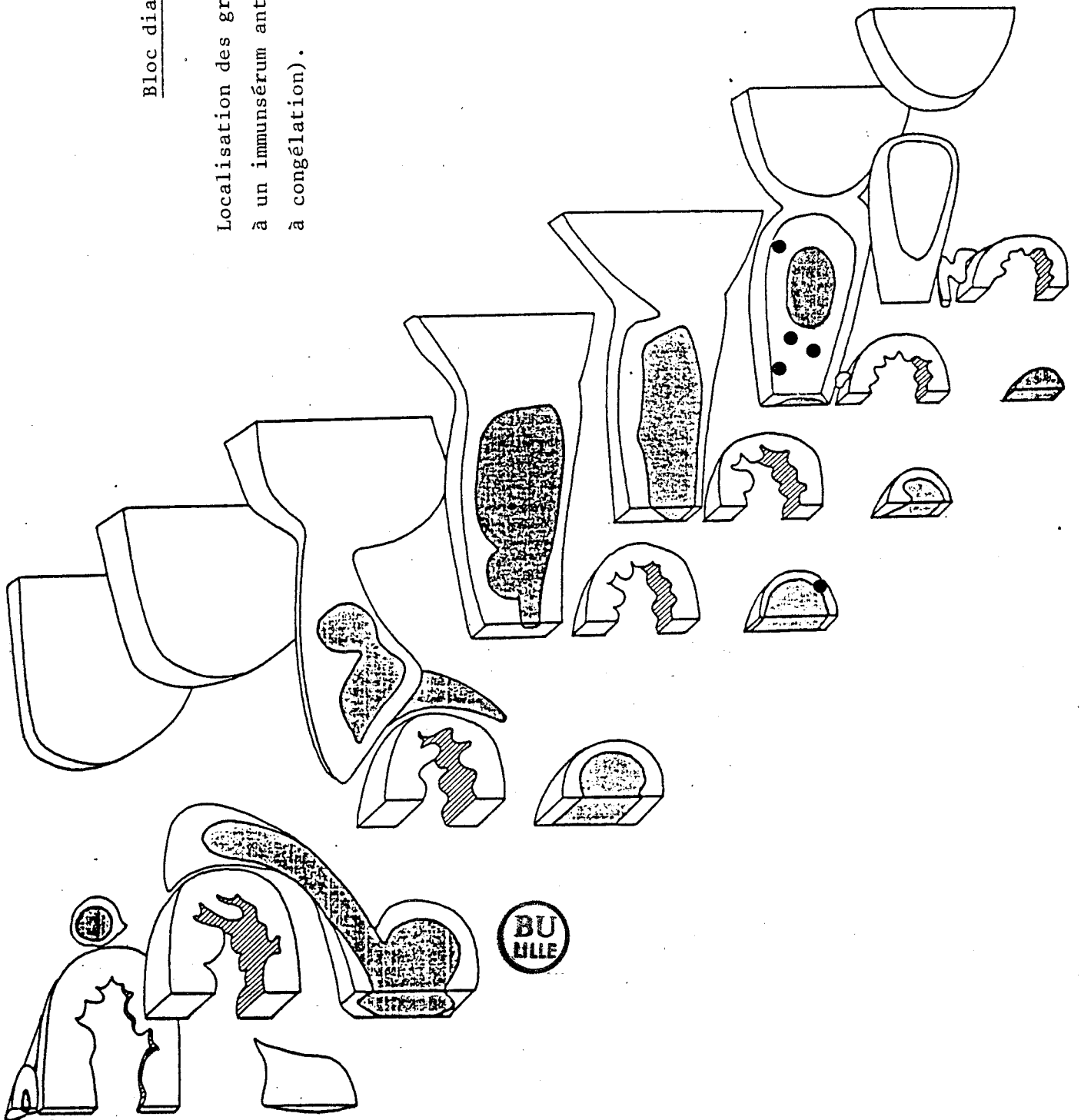
#### Observations sur coupes à congélation

De nombreuses fibres nerveuses immunoréactives s'observent dans le cerveau (Pl. V, fig. f) et le ganglion sous-oesophagien (Pl. V fig. d). Elles sont aussi présentes dans le ganglion frontal (Pl. V fig. a) et dans les lobes optiques, quoique moins abondantes. Des cellules immunoréactives s'observent au voisinage des lobes optiques, dans la partie postérieure du protocérébron et dans le ganglion sous-oesophagien (bloc diagramme 3).

Quelques cellules de taille moyenne, faiblement réactives existent antérieurement au voisinage de la médulla. Dans le protocérébron, les cellules immunoréactives sont uniquement localisées dans la partie postérieure et constituent trois groupes symétriques : (1) trois à quatre grandes cellules dorsales (Pl. V, fig. c), (2) quelques rares petites cellules latéro-dorsales, (3) une cellule latéro-ventrale de taille moyenne. Dans le ganglion sous-oesophagien, les cellules immunoréactives apparaissent toujours de façon isolée. Des cellules de taille moyenne à très grande, situées respectivement en position latéro-dorsale et latéro-ventrale (Pl. V, figs. d et e) dans la partie

Bloc diagramme 4

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti-VIP (observation sur coupes  
à congélation).



antérieure de chaque moitié du ganglion. De plus, deux cellules médio-dorsales de taille moyenne et une cellule ventrale sont situées en position sagittale (Pl. V, fig. e). Postérieurement, on observe une cellule latéro-ventrale de taille moyenne et une cellule médio-dorsale. Seules, quelques terminaisons axonales sont révélées par l'immunsérum anti-motiline dans le corps cardiaque .

#### Observations sur coupes à la paraffine

Quelques cellules non visibles sur coupes au cryostat s'observent sur coupes à la paraffine. Dans le protocérébron, il s'agit de deux grandes cellules paramédianes dorsales (Pl. V, fig. b), auxquelles s'ajoutent, de façon inconstante, deux grandes cellules centrales. Par contre, certains types cellulaires ne sont plus détectés ; ainsi les cellules latéro-dorsales protocérébrales et les grandes cellules latérales du ganglion sous-oesophagien.

#### Discussion

Chez les Insectes, seuls, à ce jour Veenstra et coll. (1985b) ont décrit une immunoréactivité anti-motiline chez le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* ; la recherche d'une substance apparentée à la motiline ayant, préalablement, été tentée, sans succès, chez *Manduca sexta* (El-Salhy et coll., 1983).

#### 4) Immunoréactivité anti-polypeptide intestinal vasoactif (VIP)

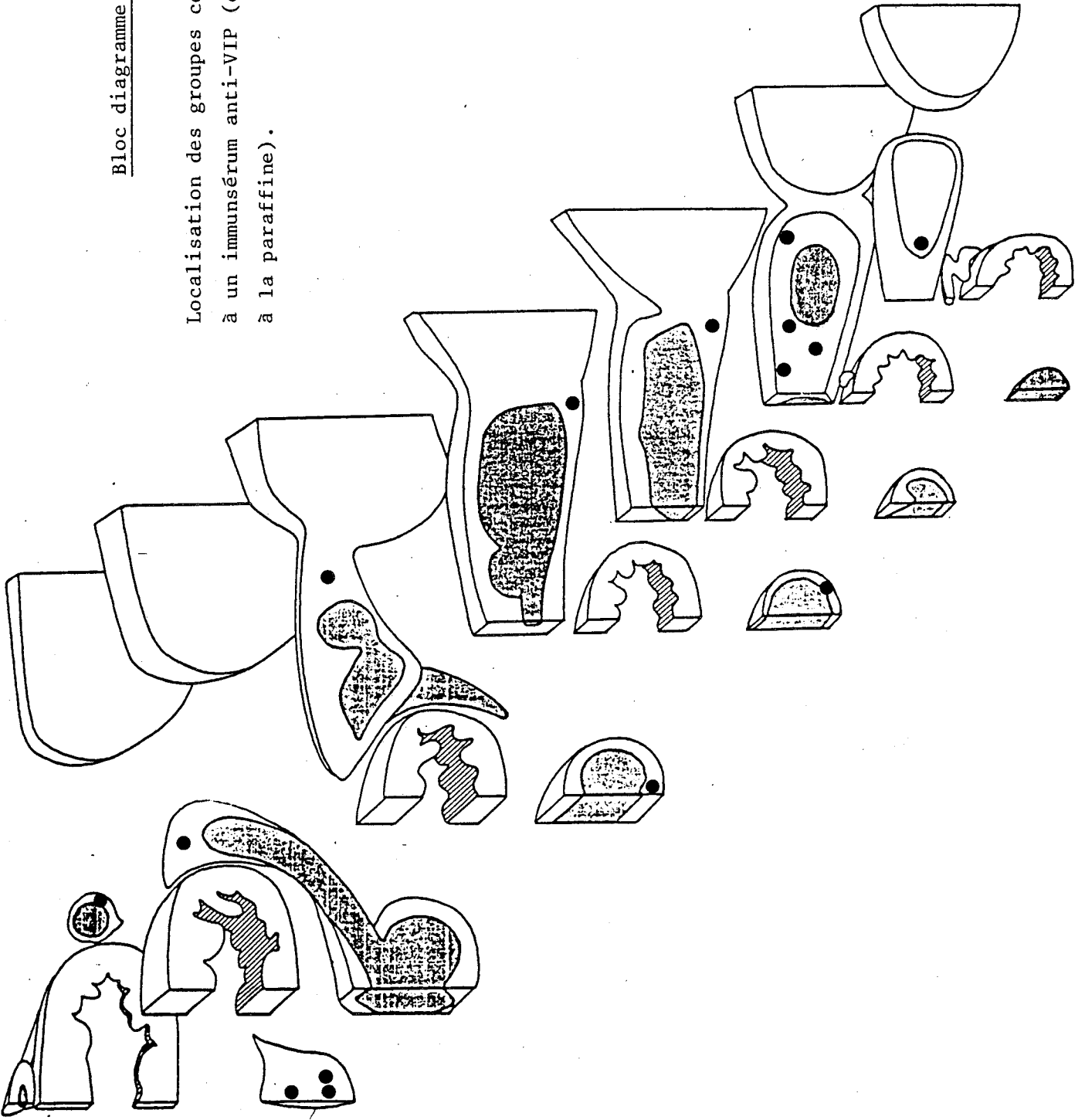
Le VIP est une molécule peptidique de 28 acides aminés qui fut isolée de l'intestin grêle de porc (Said et Mutt, 1970, 1972) et, secondairement, mise en évidence dans le cerveau (Carlquist et coll., 1982). Chez les Mammifères, le VIP exerce une action stimulante sur la sécrétion d'eau et d'électrolytes par les cellules intestinales.

#### Observations sur coupes à congélation

Trois groupes symétriques de cellules protocérébrales réagissent à l'immunsérum anti-VIP (bloc diagramme 4) : (1) deux grandes cellules rondes paramédianes (Pl. V, fig. 1), (2) cinq à six petites cellules latéro-dorsales (Pl. V, fig. 1), (3) deux à trois petites cellules centrales parasagittales (Pl. V, fig. 1). Dans le tritocérébron, quatre à cinq petites cellules

Bloc diagramme 5

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti-VIP (observation sur coupes  
à la paraffine).



ainsi que 2 cellules latéro-dorsales de taille moyenne. Par ailleurs, 3-4 grandes cellules protocérébrales dorsales réagissent de façon inconstante et leur marquage, lorsqu'il est présent reste toujours très faible.

Seules, deux à trois cellules VIP-positives s'observent de façon bilatérale dans la partie postérieure du ganglion sous-oesophagien. Aucun corps cellulaire n'est détecté dans le ganglion frontal bien que des fibres nerveuses soient marquées (Pl. V, fig. g). Du matériel immunoréactif est également présent dans le corps cardiaque et des fibres nerveuses apparaissent marquées dans la médulla et la lobula (Pl. V, fig. i).

#### Observations sur coupes à la paraffine.

A la suite d'une fixation au Bouin hollandaise sublimé, plusieurs groupes supplémentaires de cellules réagissent au sérum anti-VIP (bloc diagramme 5).

Dans le protocérébron, quatre groupes symétriques de cellules immunoréactives s'ajoutent à ceux précédemment décrits : (1) deux cellules latéro-dorsales antérieures (Pl. V, fig. h). (2) une dizaine de petites cellules latéro-ventrales antérieures, (3) trois à quatre petites cellules paramédianes postérieures, (4) une ou deux grandes cellules centrales.

Dans le tritocérébron, en plus des cellules latéro-ventrales (Pl. V, fig. j), trois à quatre petites cellules dorsales (Pl. V, fig. k) ainsi qu'une cellule de taille moyenne sont mises en évidence.

Dans le ganglion sous-oesophagien, trois paires de petites cellules médio-dorsales, deux paires de petites cellules médio-ventrales et une paire de cellules médio-ventrales de taille moyenne sont situées antérieurement. Une seule cellule ventrale de taille moyenne et une paire de cellules latéro-ventrales s'observent plus postérieurement.

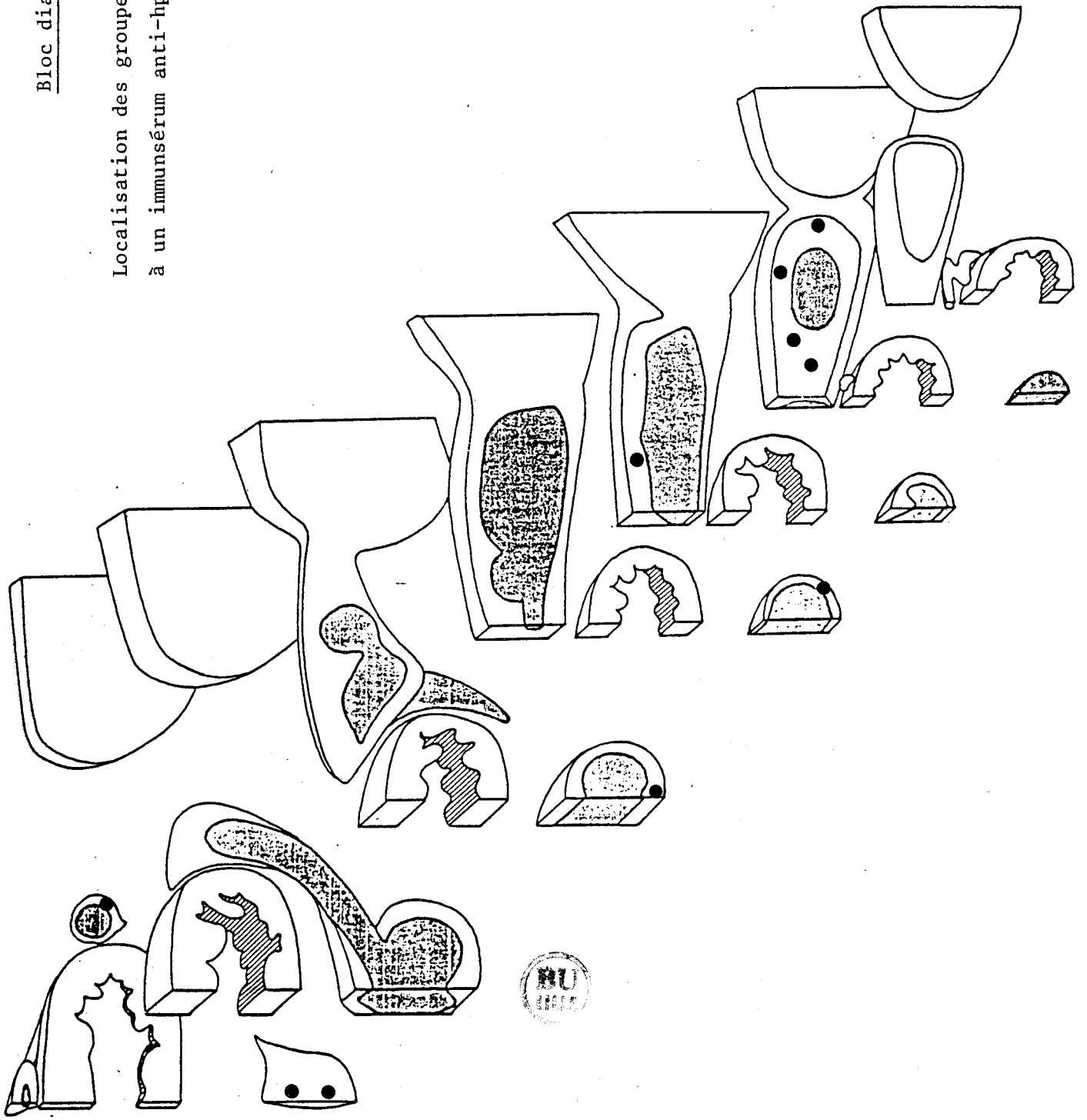
#### Discussion

Comme chez les Mammifères, du matériel apparenté au VIP est présent à la fois dans l'intestin moyen (Andries et Tramu, 1984) et dans le système nerveux d'*Aeshna cyanea*. Du matériel apparenté au VIP a été précédemment décrit dans le système nerveux de *Periplaneta americana* (Fujita et coll., 1981) et dans celui de *Manduca sexta* (El-Sahly et coll., 1983). Par contre, Veenstra et coll. (1985b) n'ont pas décelé d'immunoréactivité anti-VIP chez *Leptinotarsa decemlineata*. Bien que des différences puissent exister entre insectes d'espèces différentes, il semble vraisemblable que celles-ci soient, comme cela est le cas chez l'aeshne, dues à l'utilisation de fixateurs différents et/ou à la sensibilité de l'immunsérum utilisé.



Bloc diagramme 6

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti-hpGRF.



### 5) Immunoréactivité anti-somatolibérine

Les somatolibérines (GRF) ou facteurs de libération de l'hormone de croissance hypophysaire ont été isolées récemment de tumeurs pancréatiques de patients atteints d'acromégalie (Guillemin et coll., 1982 ; Rivier et coll., 1982). Il s'agit de deux peptides très voisins comportant respectivement 40 et 44 acides aminés. Plus récemment encore, Spiess et coll. (1983) ont isolé une somatolibérine hypothalamique (rh GRF).

L'immunsérum que nous avons utilisé est dirigé contre le hp (1-44) GRF. Les résultats sont identiques sur coupes au cryostat et sur coupes à la paraffine (bloc diagramme 6).

Plusieurs groupes de cellules immunoréactives sont localisés dans le cerveau d'*Aeshna cyanea*. Plus d'une cinquantaine de petites cellules (12-15  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont situées en position latérale, dans la partie antérieure, au voisinage des lobes optiques. Des fibres nerveuses issues de ces péricaryons pénètrent dans la lamina (Pl. VI, fig. a). Des groupes symétriques de cellules immunoréactives sont situés dans la partie postérieure du protocérébron. Le premier d'entre eux est situé latéro-dorsalement, à proximité des lobes optiques et comprend quatre à cinq petites cellules (12-15  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Pl. VI, figs. d et f). Quatre à cinq grandes cellules piriformes (25-30  $\mu\text{m}$  de diamètre), situées en position plus médiane, constituent le second groupe (Pl. VI, figs. d, f et h). Le troisième groupe est composé de deux petites cellules médio-centrales (15  $\mu\text{m}$  de diamètre). Par ailleurs, une ou deux petites cellules latérales (Pl. VI, fig. f) et autant de cellules de grande taille (Pl. VI, fig. h) paramédianes réagissent faiblement et de façon inconstante à l'immunsérum.

De nombreuses fibres intensément marquées s'observent dans les *nervi corporis cardiaci* (nccI) (Pl. VI, fig. b) de même que leurs terminaisons dans le corps cardiaque. Dans le tritocérébron, quatre paires de petites cellules immunoréactives (15  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont observées en position latéro-ventrale, à proximité du neuropile tritocérébral (Pl. VI, fig. c).

Des cellules hp GRF positives sont également présentes dans le ganglion sous-oesophagien. Deux groupes de petites cellules (15  $\mu\text{m}$  de diamètre) (deux à trois paires de cellules dorsales et autant de ventrales) sont localisés dans la partie antérieure, en position sagittale (Pl. VI, fig. e). Une grande cellule (30  $\mu\text{m}$  de diamètre) est située ventralement dans la partie postérieure (Pl. VI, fig. g) tandis que deux grandes cellules situées plus

postérieurement, en position latérale ou latéro-ventrale sont faiblement marquées. Aucun corps cellulaire n'est détecté lorsque l'anticorps anti-hp GRF est saturé par l'antigène correspondant.

### Discussion

Une immunoréactivité anti-hp GRF a également été décelée dans le tube digestif d'*Aeshna cyanea* (Andries et Tramu, 1984, 1985a) et de *Blaberus craniifer* (Andries et Tramu 1985b). Elle est également détectée dans le cerveau des Annélides (Dhainaut-Courtois et coll., 1986). Jusqu'à présent, elle n'a pas été mentionnée dans le système nerveux des Insectes, très probablement en raison de la découverte toute récente de ce peptide.

Par sa séquence peptidique, le GRF s'apparente aux peptides de la famille de la sécrétine et du VIP. Entre les positions 1 et 7 de son extrémité N-terminale, le GRF possède en effet 4 résidus identiques avec le VIP, 3 avec la sécrétine et 2 avec le glucagon. Il est de ce fait envisageable que le sérum anti-hp GRF puisse reconnaître un peptide de cette famille. Nous avons mentionné, préalablement, l'existence d'une immunoréactivité anti-VIP chez les Insectes. De même des substances apparentées respectivement à la sécrétine (El-Salhy et coll., 1980, 1983) et au glucagon (Tager et coll., 1976 ; El-Salhy et coll., 1983 ; Raabe, 1985) ont été mises en évidence dans leur système nerveux.

### 6) Immunoréactivité anti-gastrolibérine (GRP)

Le GRP est un heptacosapeptide (27 acides aminés) qui fut isolé en 1979 par Mc Donald et coll. à partir de l'estomac de porc. La séquence des 10 acides aminés de son extrémité C-terminale est identique, à un acide aminé près, à celle de la bombésine, un tétradécapeptide isolé de la peau d'Amphibien (Anastasi et coll., 1971).

Peu de cellules réagissent à l'immunsérum anti-GRP. Elles se limitent à 4 grandes cellules sagittales (Pl. VII, fig. a) de la partie antérieure du protocérébron et à une ou deux petites cellules latéro-dorsales (Pl. VII, fig. b), lesquelles sont faiblement réactives alors que les fibres nerveuses apparaissent toujours très nettement marquées (Pl. VII fig. c).

Au niveau du tritocérébron, l'immunoréactivité reste exclusivement localisée dans les fibres nerveuses du neuropile (Pl. VII, fig. d) ; aucun corps cellulaire n'apparaissant marqué. Il en est de même pour les ganglions sous-oesophagien (Pl. VII fig. e) et frontal.

### Discussion

La séquence des acides aminés du GRP est voisine de celle de la bombésine et le marquage anti-GRP disparaît après absorption de l'immunsérum par la bombésine (du moins chez les Insectes) (Veenstra et Yanaihara, 1984). Pour ces raisons, nous parlerons d'immunoréactivité anti-GRP/bombésine.

Une réaction anti-GRP/bombésine a été observée dans le système nerveux de nombreux insectes (Veenstra et Yanaihara, 1984) quoiqu'elle n'ait pu être démontrée chez tous les Insectes étudiés (El-Salhy et coll., 1980, 1983 ; Veenstra et Yanaihara, 1984). Si, dans quelques espèces, des neurones immunoréactifs sont observés dans les mêmes régions du cerveau en nombre sensiblement constant, dans d'autres, leur nombre diffère nettement, allant d'un seul groupe de 4 cellules (*Musca domestica*) à plusieurs centaines de cellules (*Locusta migratoria*), du moins si l'on inclut les lobes optiques. Rappelons que chez l'aeshne, le nombre de cellules réagissant à l'immunsérum reste toujours très faible.

Le dipeptide de l'extrémité C-terminale du GRP est identique à celui de la substance P, ce qui rend envisageable une possible réaction croisée entre le GRP et la substance P (Roth et coll., 1982). Comme nous le verrons, bien que nous ayons mis en évidence des fibres nerveuses par l'immunsérum anti-substance P, nous n'avons pas réussi à détecter de corps cellulaire. Comme, par ailleurs, la disposition des fibres nerveuses immunoréactives à l'un et à l'autre des immunsérums diffère, il ne semble donc pas que l'éventualité d'une réaction croisée puisse être retenue.

### 7) Immunoréactivité anti-substance P

Contrairement aux autres peptides du système entéro-gastro-pancréatique, la substance P fut d'abord isolée de l'hypothalamus (Chang et Leeman, 1970 ; Chang et coll., 1971) avant de l'être de l'intestin (Studer et coll., 1973). Il s'agit d'un peptide de 11 acides aminés dont les fonctions, encore mal définies à ce jour, apparaissent multiples : modulation de la motilité intestinale, transmission de l'information nociceptive ...

Bien qu'une réaction modérée soit observable au niveau de certaines fibres nerveuses protocérébrales (Pl. VII, fig. f) aucun corps cellulaire n'a été détecté avec certitude que ce soit dans le cerveau, le ganglion sous-oesophagien ou le ganglion frontal. Une réaction plus nette s'observe par contre au niveau des terminaisons nerveuses présentes dans le corps cardiaque (Pl. VII, fig. g).

### Discussion

Préalablement à notre étude, une immunoréactivité anti-substance P a été démontrée dans le cerveau (El-Salhy et coll., 1980, 1983 ; Benedeczyk et coll., 1982) et les corps cardiaques (Hansen et coll., 1982) d'Insectes. Elle est également présente dans les cellules endocrines du tube digestif (Andries et Tramu, 1984, 1985a et b).

## II - LOCALISATION DE CELLULES RENFERMANT UN MATÉRIEL APPARENTÉ À DES OPIOIDES

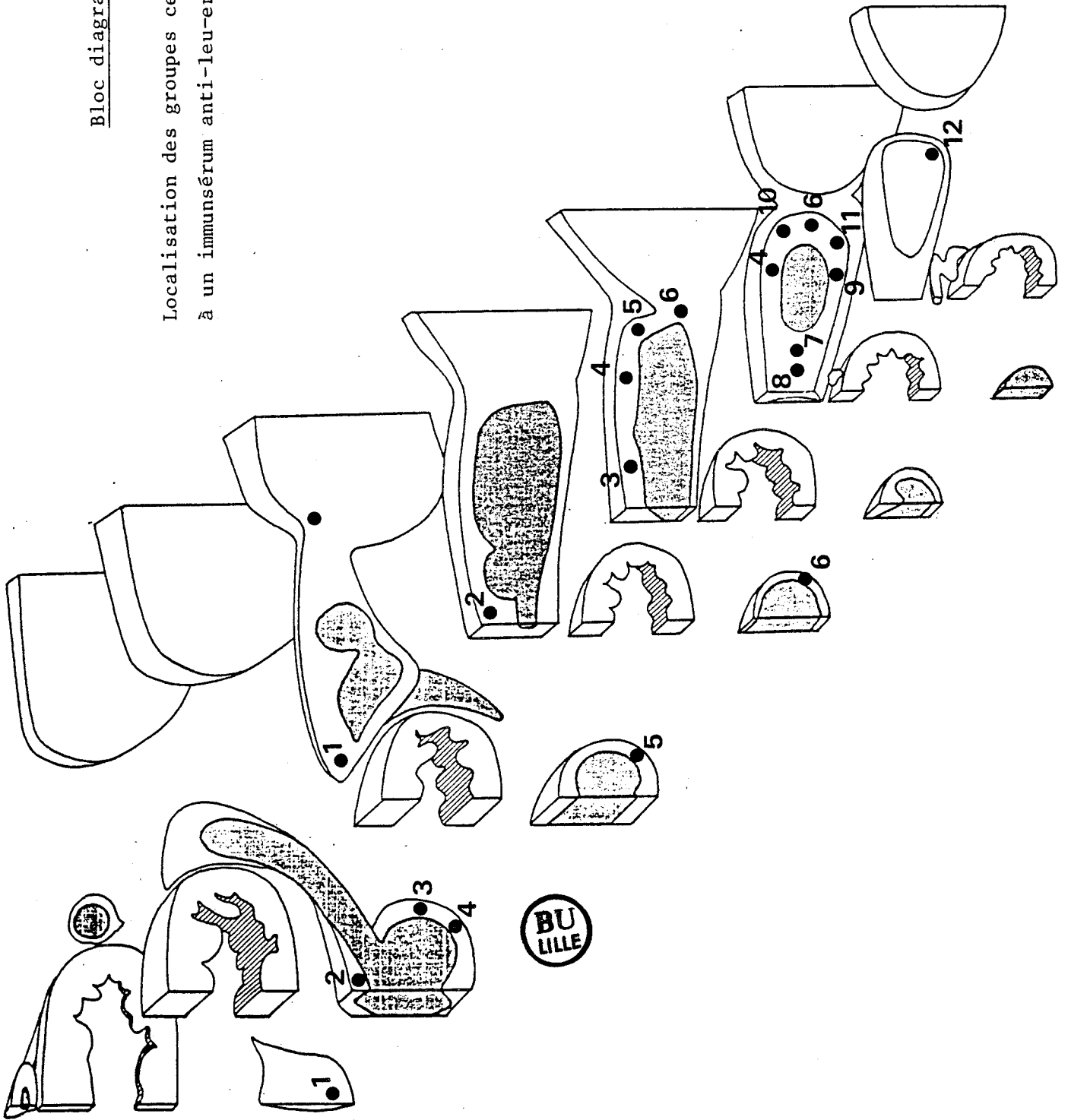
Au cours de la dernière décennie, plusieurs peptides ayant des activités biologiques de type morphinique ont été isolés chez les Mammifères et regroupés dans la famille des opioïdes. Ils comprennent deux pentapeptides, la leucine et la méthionine enképhalines, isolés dès 1975 dans le cerveau (Hughes et coll.) et des molécules de plus grande taille contenant la séquence peptidique des enképhalines comme l' $\alpha$ -néo-endorphine (Kangawa et coll., 1979) et la dynorphine (Goldstein et coll., 1979) qui comprennent respectivement 9 et 17 acides aminés.

Chez les Mammifères, trois précurseurs potentiels des enképhalines sont connus : la proopiomelanocortine (Nakanishi et coll., 1979), la proenképhaline (Comb et coll., 1982, Noda et coll., 1982, Gubler et coll., 1982) et la prodynorphine. (Kakidani et coll., 1982). La proenképhaline mammalienne renferme 6 copies de met-enképhaline et une de leu-enképhaline, la proopiomelanocortine une seule met-enképhaline et la prodynorphine, qui est le précurseur de la dynorphine et de l' $\alpha$ -néo-endorphine, 3 copies de leu-enképhaline.

Ayant à notre disposition 4 antisérums : anti-met-enképhaline, -leu-enképhaline, - $\alpha$ -néo-endorphine, -dynorphine, nous avons réalisé une étude comparative en incubant de façon alternée des coupes sériées avec l'un ou l'autre de ces anticorps.

Bloc diagramme 7

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti-leu-enképhaline.



Comme pour un même anticorps, la réactivité observée sur coupes au cryostat et à la paraffine n'est pas forcément identique, nous avons tenu à comparer les résultats obtenus avec des procédures de fixation différentes. Cela est réalisable lorsque les groupes de cellules immunoréactives sont relativement importants et suffisamment isolés les uns des autres.

### 1) Immunoréactivité anti-leucine-enképhaline

#### Observations sur coupes à congélation

Une seule cellule réactive de taille moyenne est détectée au voisinage des lobes optiques (Pl. VIII, figs. a et b) bien que de nombreuses fibres immunoréactives soient observées dans la médulla et la lobula. A noter cependant deux cellules situées non loin de la médulla, réagissant l'une faiblement, l'autre modérément à l'immunsérum anti-leucine-enképhaline (Pl. VIII, fig. a).

De nombreux groupes symétriques de cellules leu-enképhaline positives sont observés dans le protocérébron (tableau 4, bloc diagramme 7). Dans la partie antérieure, un premier groupe est constitué de deux à trois cellules paramédianes de taille moyenne (Pl. VIII, fig. b). Deux paires de très grandes cellules sagittales (40  $\mu$ m de diamètre) forment le second groupe (Pl. VIII, fig. c). Plus postérieurement, deux grandes cellules paramédianes sont très faiblement, voire non immunoréactives (groupe 3) (Pl. VIII, fig. e) tandis que quatre à six cellules (Pl. VIII, fig. d), intensément marquées, sont situées dorsalement (groupe 4). Quatre groupes composés de deux à quatre ou cinq petites cellules sont, respectivement, situés en position latéro-dorsale (groupe 5) (Pl. VIII, fig. e), latérale (groupe 6) (Pl. VIII, fig. e) centrale (groupes 7 et 8) (Pl. VIII, fig. d) et ventrale (groupe 9). Trois grandes cellules, modérément à intensément immunoréactives, s'observent respectivement en position latéro-dorsale (groupe 10), latéro-ventrale (groupe 11) (Pl. VIII, fig. e) et latérale (groupe 12). Des fibres nerveuses des *nervi corporis cardiaci* (nccI) et leurs terminaisons axonales dans le corps cardiaque apparaissent marquées. Quelques rares petites cellules immunoréactives sont présentes, certaines ventralement, d'autres dorsalement par rapport au neuropile tritocérébral. Seules des fibres nerveuses sont observées dans le ganglion frontal.

De la partie antérieure à la partie postérieure du ganglion sous-oesophagien, six groupes symétriques de cellules réagissent à l'immunsérum anti-leu-enképhaline (tableau 5). Le premier d'entre eux est constitué de deux paires de petites cellules médio-ventrales, (Pl. IX, fig. a), le second

Etude comparative après incubation avec les sérums anti-met-enképhaline, - $\alpha$ -néo-endorphine, -dynorphine.  
 Intensités : (-) très faible, inconstante; (+) faible; (++) forte

Groupe cellulaire	Nombre de cellules	faulle	Localisation	Intensité du marquage sur coupes à congélation				Réactivité sur coupes à la paraffine					
				leu-enképhaline	met-enképhaline	$\alpha$ -néo-endorphine	dynorphine	leu-enképhaline	met-enképhaline	$\alpha$ -néo-endorphine	dynorphine		
1	2-3	moyenne	paramédiane	++								+	
2	2	très grande	sagittale	+								+	
3	2-3	grande	paramédiane dorsale	0 à -	+	+	+					+	+
4	4-6	petite	dorsale	+		-	-				+		+
5	3-4	petite	latérodorsale	+		-							
6	2-3	petite	latérale	- à +							+		+
7	2	petite	centrale	++		++					+		+
8	2	petite	centrale	-		-							
9	4-5	petite	ventrale	- à +									
10	1	grande	latérodorsale	++							+		+
11	1	grande	latéroventrale	+		-					+		+
12	1	grande	latérale	++							+		



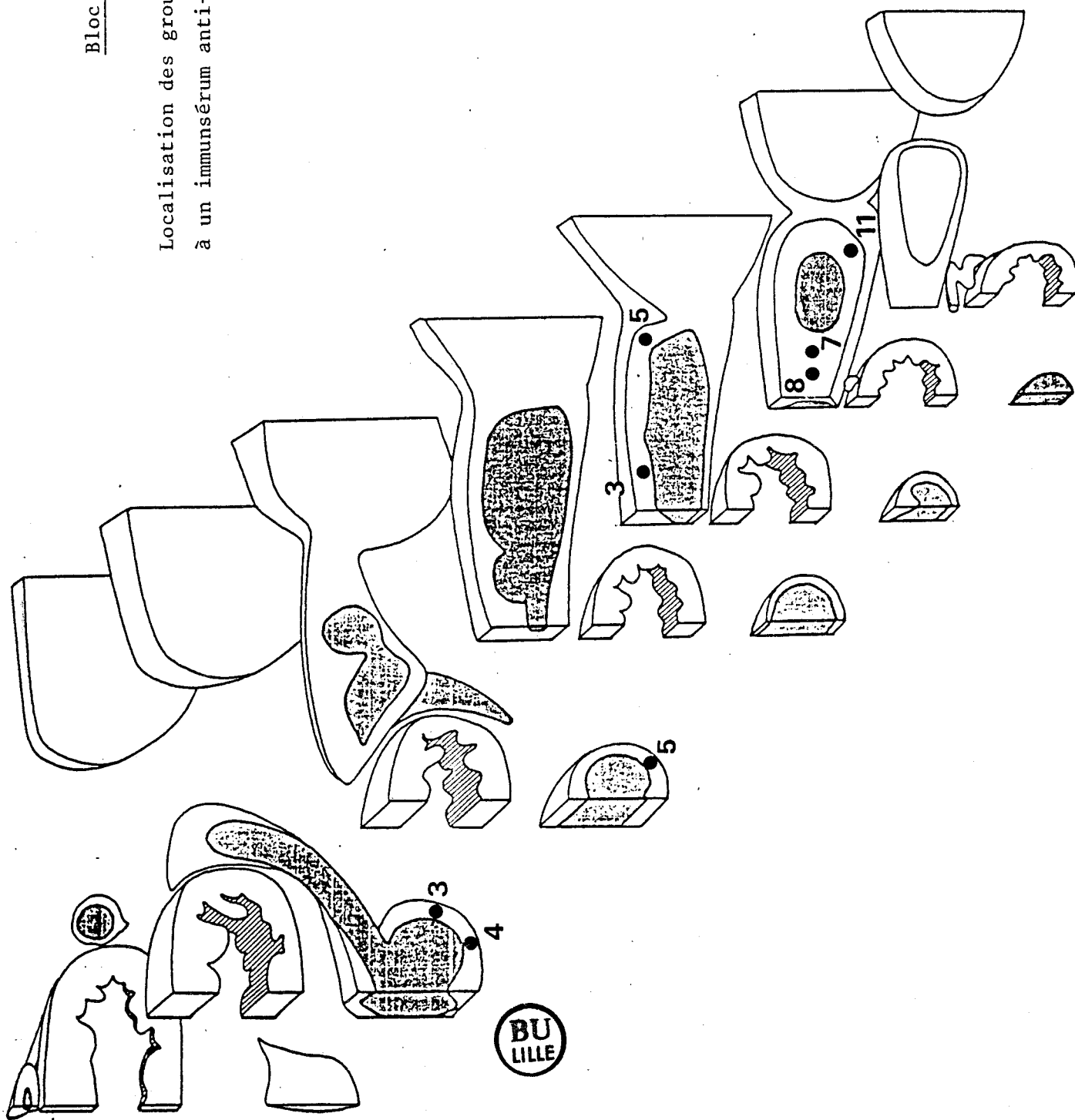


Tableau 5 : Localisation des cellules du ganglion sous-oesophagien réagissant au sérum anti-leu-enképhaline. Etude comparative après incubation avec les sérums anti-met-enképhaline,  $\alpha$ -neo-endorphine, -dynamorphine, Intensités : (-) très faible, inconstante; (+) faible; (++) forte

Groupe cellulaire	Nombre de cellules	Taille	localisation	Intensité du marquage						Réactivité sur coupes à la paraffine
				leu-enké-phaline	met-enké-phaline	$\alpha$ -neo-endorphine	dynorphine	leu-enké-phaline	met-enké-phaline	
1	2	petite	medioventrale	+	+	+	+	+	+	+
2	2-3	moyenne à grande	mediodorsale	+	-	+	+	+	+	+
3	1	très grande	latérodorsale	+	+	+	+	+	+	+
4	1	moyenne	latéroventrale	+	+	-	+	+	+	+
5	1	très grande	latéroventrale	+	+	+	+	-	+	+
6	1	moyenne	latéroventrale	+	+	+	+	+	+	+

Bloc diagramme 8

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immun sérum anti-met-enképhaline.



regroupe deux à trois cellules dorsales de taille moyenne. Chacun des quatre autres groupes ne comporte qu'une seule grande, voire très grande, cellule localisée respectivement en position latéro-dorsale (Pl. IX, fig. c), latéro-ventrale (Pl. IX, fig. e) ou latérale (Pl. IX, fig. f).

A l'exception des grandes cellules sagittales situées dans la partie antérieure du protocérébron, l'immunoréactivité est supprimée lorsque l'immunsérum anti-leu-enképhaline est saturé par l'antigène correspondant (5 mg/ml de sérum non dilué).

#### Observations sur coupes à la paraffine

Les résultats obtenus sur coupes à la paraffine après fixation au Bouin hollandaise sublimé ne sont pas complètement superposables à ceux obtenus sur coupes au cryostat après fixation au PAF (tableaux 4 et 5). Les résultats observés sur coupes à la paraffine sont inconstants ; parfois aucune cellule protocérébrale n'est détectée (seulement quelques rares cellules du ganglion sous-oesophagien le sont), parfois la plupart des cellules réactives observées sur coupes au cryostat apparaissent marquées (cf. tableaux 4 et 5 et bloc diagramme 7). Dans ces cas cependant, certaines cellules ne sont pas marquées (groupes 1, 2, 3, 5 et 9 du protocérébron) alors que d'autres cellules, non détectées précédemment, apparaissent faiblement marquées (c'est le cas de trois à quatre grandes cellules dorsales et de deux grandes cellules centrales de la partie postérieure du protocérébron ainsi que de petites cellules parasagittales de la partie antérieure du ganglion sous-oesophagien).

#### 2) Immunoréactivité anti-méthionine-enképhaline

Le nombre de cellules réagissant, sur coupes au cryostat à l'immunsérum anti-méthionine-enképhaline est moins important que celui des cellules leu-enképhaline positives (tableaux 4 et 5, bloc diagramme 8). Ainsi, seules les cellules des groupes 3, 5, 7, 8 et 11 du protocérébron (Pl. VIII, fig. f) et des groupes 3, 4 et 5 du ganglion sous-oesophagien (Pl. IX, figs. b et d) présentent une immunoréactivité anti-met-enképhaline. De façon générale, les dépôts immunoréactifs sont moins intenses quand l'immunsérum anti-met-enképhaline est utilisé au lieu de l'immunsérum anti-leu-enképhaline, exception faite des cellules du groupe 7 et surtout de celles du groupe 3 (Pl. VIII, fig. f) qui présentent un marquage plus net. Par ailleurs, six à huit petites cellules de la *pars intercerebralis* sont observées de façon inconstante et leur marquage, lorsqu'il existe, est particulièrement faible. Les fibres des *nervi corporis cardiaci* (nccI) apparaissent fortement

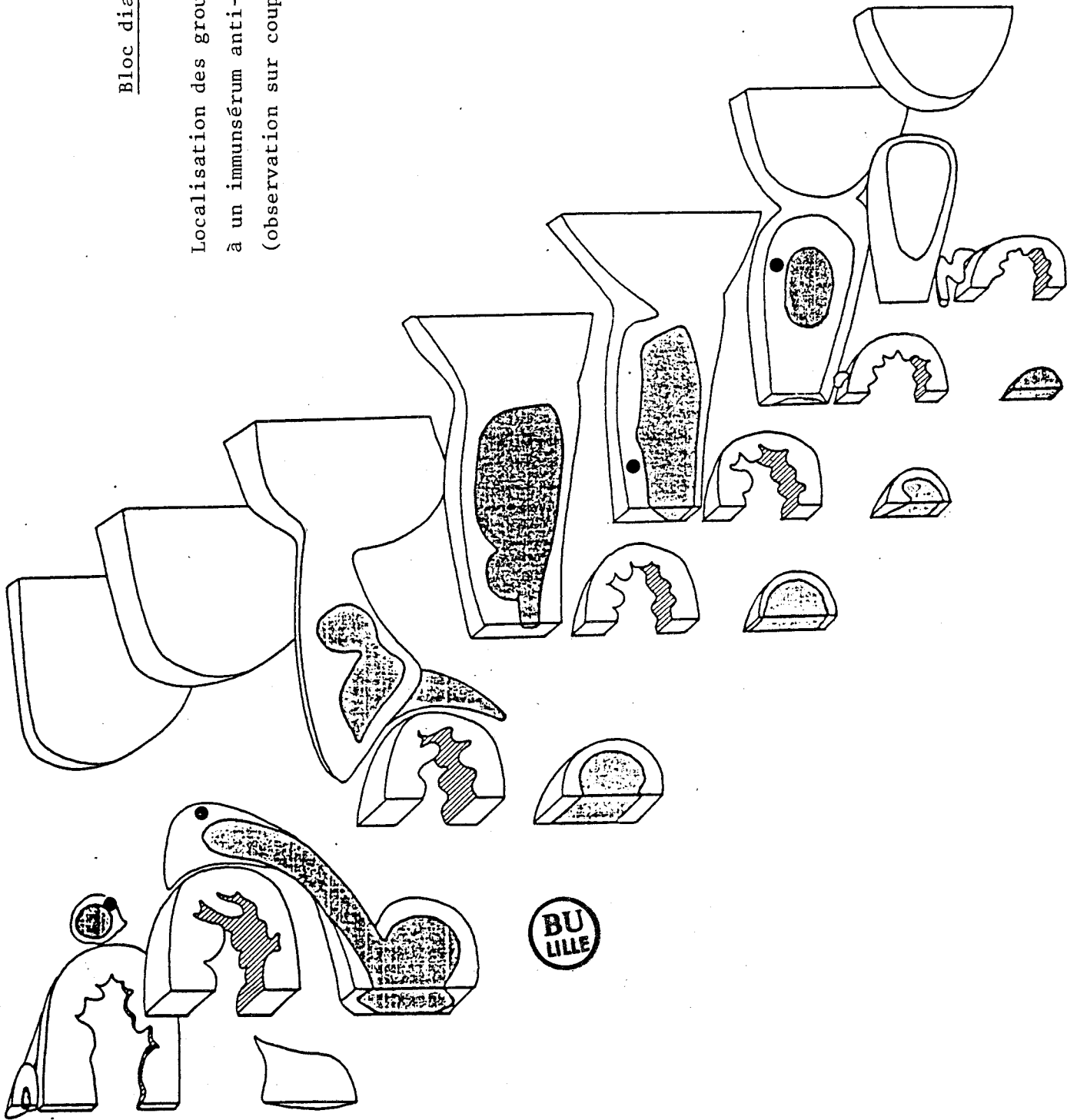
Tableau 6 : Localisation des groupes cellulaires protocérébraux réagissant, après fixation au Bouin hollandaise sublimé, au sérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine.

Intensités : (+) faible, (++) forte, (+++) très forte

Groupe cellulaire	Nombre de cellules	Taille	Localisation	intensité du marquage	figures
1	5-6 5-6	grande petite	paramédiane	+ +++	
2	≈ 10	moyenne	paramédiane	+	Pl X, fig. b
3	≈ 20	petite	dorsale	++	Pl X, fig. b
4	1	grande	paramédiane dorsale	++	
5	5	petite	dorsale	+	
6	12	petite	latéroventrale	+	
7	nombreux	petite	paramédiane dorsale	+	
8	3	grande	paramédiane	++	Pl X, figs. e et g
9	1	grande	latérodorsale	++	
10	6-8	petite	latérodorsale	+	Pl X, fig. e
11	1	grande	latérale	++	
12	3-4	petite	latérale	+	Pl X, fig. e
13	3	grande	latéroventrale	++	
14	4	grande	dorsale	+++	Pl X, figs. e, g, et i
15	4	grande	centrale	++	
16	5-6	petite	latérodorsale	++	
17	2	grande	ventrale	+++	Pl X, fig. i

Bloc diagramme 9

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine  
(observation sur coupes à congélation).



marquées ainsi que leurs terminaisons dans le corps cardiaque . Quelques rares fibres s'observent dans le ganglion frontal.

Sur coupes à la paraffine, après fixation au Bouin hollandaise sublimé, la principale différence concerne les grandes cellules sagittales (groupe 2) de la partie antérieure du protocérébron qui apparaissent marquées par l'immunsérum anti-met-enképhaline.

Lorsque l'immunsérum anti-met-enképhaline est saturé par un excès de leu-enképhaline (5 mg/ml de sérum non dilué) le marquage persiste, particulièrement dans le corps cardiaque (Pl. VIII, figs. i et j) et les très grandes cellules symétriques latéro-dorsales et latéro-ventrales (Pl. VIII, figs. g et h) du ganglion sous-oesophagien.

### 3) Immunoréactivité anti- $\alpha$ -néo-endorphine

#### Observations sur coupes à congélation (bloc diagramme 9)

Quelques rares petites cellules latéro-dorsales et deux grandes cellules dorsales paramédianes s'observent de façon symétrique dans la partie postérieure du protocérébron. Dans le tritocérébron, deux à trois cellules faiblement marquées sont situées ventralement, tandis que deux cellules de taille moyenne s'observent latéro-dorsalement (Pl. IX, fig. h). Ces dernières (Pl. IX, fig. i) ainsi que les nombreuses fibres nerveuses protocérébrales restent marquées lorsque l'immunsérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine est saturé par un excès de leu-enképhaline (5 mg/ml de sérum non dilué). Seules des fibres nerveuses apparaissent marquées dans le ganglion frontal. Bien qu'aucun corps cellulaire ne soit détecté avec certitude, sauf une paire de petites cellules sagittales très antérieures, quelques fibres nerveuses, modérément à fortement marquées, sont visibles dans le neuropile du ganglion sous-oesophagien. Certaines terminaisons nerveuses, présentes dans le corps cardiaque, sont également marquées.

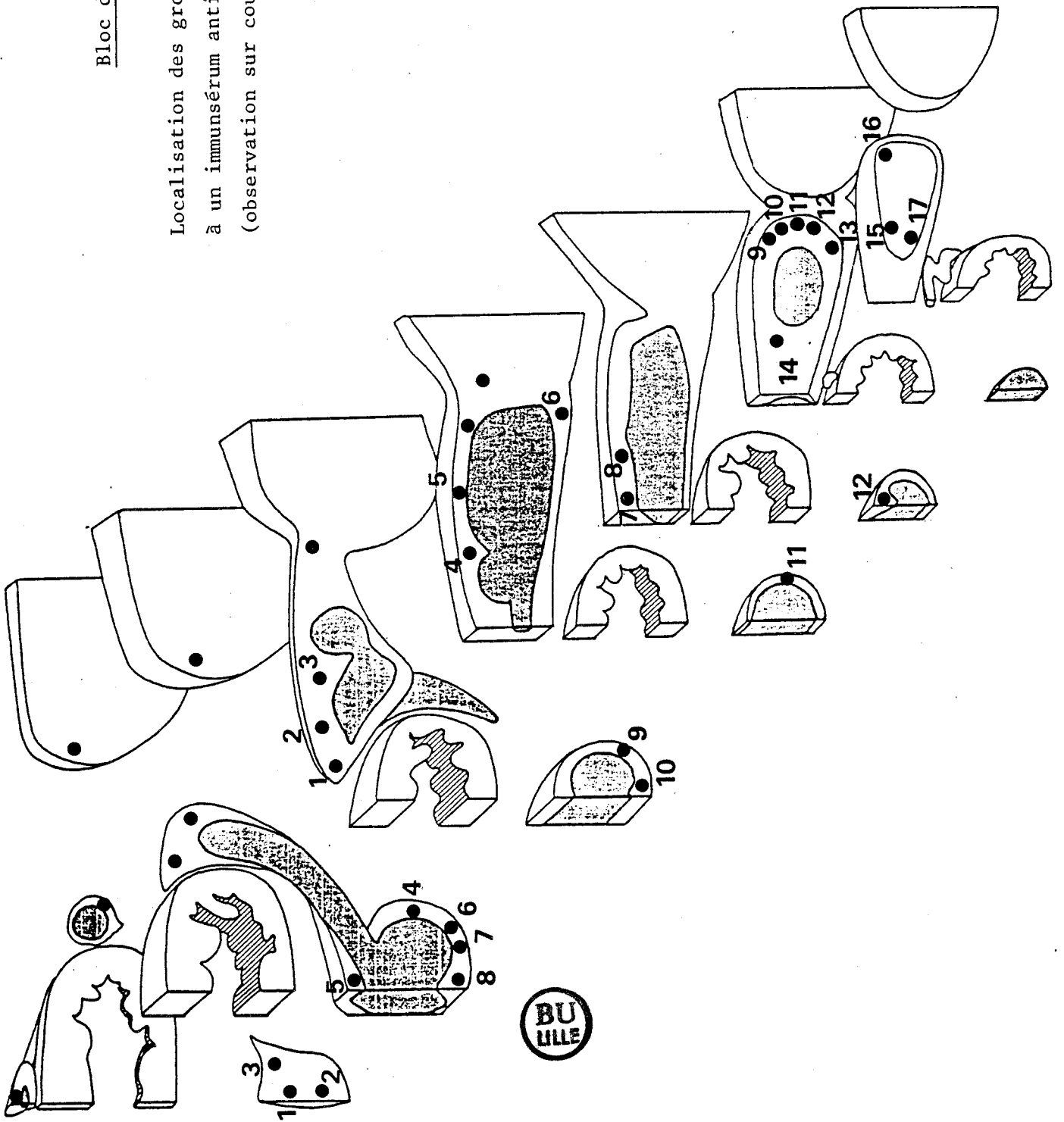
#### Observations sur coupes à la paraffine (bloc diagramme 10)

De nombreuses cellules immunoréactives apparaissent à la fois dans le cerveau et les ganglions sous-oesophagien et frontal.

Dans le ganglion frontal, une dizaine de grandes cellules (Pl. X, fig. a) et un soixantaine de petites cellules sont marquées (Pl. X, fig. c). Deux populations de neurones envoient leurs axones vers les lobes optiques : (1) antérieurement plus d'une centaine de petites cellules sont faiblement marquées ; (2) cinq à six cellules de taille moyenne, fortement immunoréactives sont situées plus postérieurement (Pl. X, fig. d). Une troisième population d'une vingtaine de cellules de taille moyenne est située dans la partie latéro-dorsale du

Bloc diagramme 10

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine  
(observation sur coupes à la paraffine).



Groupe cellulaire	Nombre de cellules	Taille	Localisation	Figures
1	2-3	petite	médiadorsale	Pl X fig. f
2	4	petite	médioventrale	Pl X figs. f et h
3	4-5	grande	dorsale à latérodorsale	Pl X figs. f, h, j
4	1	très grande	latérodorsale	Pl X fig. j
5	2	moyenne	médiadorsale	
6	1	grande	latéroventrale	
7	2-3	petite	ventrale	
8	1	moyenne	médioventrale	
9	3-4	petite	latéroventrale	
10	1	moyenne	médioventrale	
11	5-6	moyenne	médiadorsale	
12	1	moyenne	latérale	



Tableau 7 : Localisation des groupes cellulaires du ganglion sous-oesophagien réagissant, après fixation au Bouin hollandaise sublimé, au sérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine.



protocérébron au voisinage de la médulla sans qu'on puisse affirmer que ses cellules innervent les lobes optiques.

De la partie antérieure à la partie postérieure du protocérébron sont distingués dix sept groupes symétriques de cellules immunoréactives (tableau 6).

Dans le ganglion sous-oesophagien, douze groupes de cellules réagissant à l'immunsérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine sont mis en évidence (tableau 7).

#### 4) Immunoréactivité anti-dynorphine

Seules, quelques cellules réagissent à l'immunsérum anti-dynorphine et la réaction reste toujours très modérée.

L'immunoréactivité concerne essentiellement deux cellules symétriques dorsales paramédianes (Pl. IX, fig. g) et autant de petites cellules latéro-dorsales de la partie postérieure du protocérébron. Parfois, les grandes cellules du ganglion sous-oesophagien qui réagissent aux immunsérums anti-met- et -leu-enképhalines apparaissent faiblement marquées, de même que quelques rares petites cellules situées dans la partie antérieure de façon sagittale. Enfin, une cellule faiblement immunoréactive s'observe au voisinage de la médulla. Le corps cardiaque ainsi que les *nervi corporis cardiaci* (nccI) apparaissent faiblement marqués et la réaction persiste lorsque l'immunsérum anti-dynorphine est saturé par un excès de leu-enképhaline (5 mg/ml de sérum non dilué).

Aucun marquage n'est observé après fixation au Bouin hollandaise sublimé.

#### Discussion

Dans une mise au point récente, Udenfriend (1984) affirmait que les substances apparentées aux enképhalines mises en évidence chez les Invertébrés se comportent, en HPLC, différemment des opioïdes mammaliens. Il en concluait qu'elles ne peuvent dériver de la proenképhaline ou de la prodynorphine.

Cependant, l'existence, dans le cerveau de la blatte, de sites de liaison ayant une grande affinité pour un analogue de la met-enképhaline (Stéfano et Scharrer, 1981) plaide en faveur d'un rôle des opiacés dans le système nerveux des insectes. Par ailleurs, depuis la mise au point d'Udenfriend, Leung et Stéfano (1983) ont déterminé la séquence peptidique d'opioïdes présents chez la moule *Mytilus edulis* et démontré qu'il s'agit des "véritables" leu- et met-enképhalines. De même, dans la glande du sinus de

*Carcinus maenas*, Jaros et coll. (1985) ont mis en évidence des substances radioimmunoactives ayant des temps de rétention identiques à ceux des met- et leu-enképhalines de synthèse.

Chez les Insectes, seules les substances apparentées aux enképhalines (Gros et coll., 1978 ; El-Salhy et coll., 1980, 1983 ; Rémy et Dubois, 1981 ; Hansen et coll., 1982 ; Pages et coll., 1983 ; Romeuf et Rémy, 1984 ; Verhaert et De Loof, 1985) et aux endorphines (Rémy et coll., 1978, 1979 ; El-Salhy et coll., 1980, 1983 ; Hansen et coll., 1982 ; Duve et Thorpe, 1983 ; Veenstra et coll., 1985b) ont été démontrées, soit dans le système nerveux central, soit dans les corps cardiaques.

Une comparaison, cellule à cellule, entre différentes réactions s'avère souvent difficile à cause des variations enregistrées dans l'intensité du marquage, et parfois même dans le nombre de cellules réactionnelles, probablement en relation avec l'état physiologique, à moins que ce ne soit avec un éventuel cycle nycthémeral. De plus, les résultats obtenus diffèrent souvent selon les fixateurs, et éventuellement, les méthodes d'inclusion utilisés. Enfin, certains groupes ne contiennent qu'une ou quelques rares petites cellules, qui ne se retrouvent pas forcément sur deux coupes sériées. C'est pourquoi nous nous sommes intéressé, dans notre étude comparative, aux seuls groupes cellulaires suffisamment aisés à reconnaître d'une préparation à l'autre, et dont la réactivité aux différents anticorps était reproductible.

Suivant leur immunoréactivité aux différents sérums testés, les cellules peuvent être classées en quatre groupes : (1) cellules réactives aux immunosérums anti-leu, -met-enképhalines et - $\alpha$ -néo-endorphine. Ce sont les grandes cellules du ganglion sous-oesophagien et trois groupes de cellules protocébrales : les grandes cellules paramédianes, les petites cellules latéro-dorsales et une grande cellule latéro-ventrale. La plupart d'entre elles réagissent également à l'immunosérum anti-dynorphine. Les grandes cellules du ganglion sous-oesophagien restent toujours marquées après saturation de l'immunosérum anti-met-enképhaline par un excès de leu-enképhaline. (2) cellules réagissant aux immunosérums anti-leu-enképhaline et - $\alpha$ -néo-endorphine : c'est le cas des petites cellules paramédianes de la partie antérieure du protocérébron et de deux paires de grandes cellules centrales de la partie postérieure du protocérébron, ainsi que d'une paire de cellules dorsales antérieures de taille moyenne du ganglion sous-oesophagien. (3) cellules réagissant uniquement à l'immunosérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine : il s'agit des cellules du ganglion frontal,

des cellules latéro-dorsales du tritocérébron et, dans le ganglion sous-oesophagien, de cellules dorsales à latéro-dorsales antérieures, ainsi que de petites cellules latéro-ventrales postérieures. Le marquage persiste lorsque l'immunsérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine est saturé par un excès de leu-enképhaline. (4) Cellules réagissant uniquement à l'immunsérum anti-leu-enképhaline. Nous avons observé d'autre part, sur coupes à la paraffine, un groupe de quatre à cinq grandes cellules piriformes dans la partie postérieure du protocérébron, et, d'autre part, sur coupes au cryostat (fixation faite au PAF), un groupe de petites cellules ventrales protocérébrales.

Les grandes cellules sagittales, présentes dans la partie antérieure du protocérébron, réagissent aux immunsérums anti-leu et -met-enképhalines. Cependant, le marquage n'est pas spécifique puisque la réaction persiste lorsque l'immunsérum anti-leu-enképhaline est saturé par l'antigène correspondant.

L' $\alpha$ -néo-endorphine et la dynorphine 17 correspondent à une molécule de leu-enképhaline pourvue d'une extension C-terminale comportant respectivement 4 et 12 acides aminés. Il est, de ce fait, vraisemblable qu'elles puissent être les précurseurs de la leu-enképhaline. C'est pourquoi il était intéressant de vérifier si l'immunsérum anti-leu-enképhaline révèle également les cellules détectées par les immunsérums anti- $\alpha$ -néo-endorphine et -dynorphine et vice versa. Bien que les réactions soient toujours très faibles, sur coupes au cryostat, particulièrement avec les immunsérums anti-dynorphine et - $\alpha$ -néo-endorphine, il est évident que certaines cellules réagissent à la fois aux immunsérums anti-leu-enképhaline, -dynorphine et - $\alpha$ -néo-endorphine. Ainsi, il est tentant de penser que les réactions obtenues avec les immunsérums anti- $\alpha$ -néo-endorphine et -leu-enképhaline (et quelquefois avec l'immunsérum anti-dynorphine) détectent la présence d'un peptide apparenté à la famille de la prodynorphine.

Bien que l' $\alpha$ -néo-endorphine contienne la séquence de la leu-enképhaline, plusieurs groupes cellulaires marqués par l'immunsérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine ne le sont pas par l'immunsérum anti-leu-enképhaline. Ce résultat est renforcé par le fait que certaines cellules et fibres nerveuses qui réagissent à l'immunsérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine restent marquées lorsque l'immunsérum est saturé par un excès de leu-enképhaline. Ainsi, l'immunsérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine semblerait plutôt dirigé contre l'extension C terminale de la molécule que vers la séquence leu-enképhaline. Il est non moins remarquable que certaines cellules, qui réagissent à l'immunsérum anti-leu-enképhaline, ne sont pas marquées par l'immunsérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine. Cependant, leur nombre réduit, et plus particulièrement l'inconstance et la faiblesse de leur marquage

ne permettent pas de tirer de conclusions définitives, si ce n'est qu'elles constituent une preuve supplémentaire de la spécificité de nos sérums.

La détection d'immunoréactivités anti-leu-enképhaline et -met-enképhaline dans une même cellule peut s'expliquer par la présence d'un précurseur commun à la met- et à la leu-enképhaline et de ce fait apparenté à la proenképhaline.

Les tests de spécificité concernant les immunsérums anti-leu et anti-met-enképhalines ont été précédemment décrits (Tramu et coll., 1981). Par RIA, il a été démontré que la met-enképhaline ne se fixait pas à l'immunsérum anti-leu-enképhaline, et qu'un excès 250 fois molaire de leu-enképhaline était nécessaire pour inhiber la fixation de met-enképhaline. Par ailleurs, la méthode d'immunohémolyse passive indirecte a permis de montrer que l'immunsérum anti-leu-enképhaline montre deux fois plus d'affinité pour la leu- que pour la met-enképhaline, alors que l'immunsérum anti-met-enképhaline se fixe 10 fois plus facilement à la met- qu'à la leu-enképhaline.

La grande spécificité de l'immunsérum anti-met-enképhaline peut ainsi expliquer que, dans notre matériel, particulièrement dans les grandes cellules du ganglion sous-oesophagien, aucune réaction croisée ne soit détectée entre les sérums anti-met et -leu-enképhalines. Ces cellules apparaissent parfois faiblement marquées sur coupes au cryostat par l'immunsérum anti-dynorphine, alors que la réaction est plus importante sur coupes à la paraffine avec l'immunsérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine. Ces résultats se comprennent, si l'on admet que, dans certaines conditions de fixation et d'inclusion, les immunsérums anti-dynorphine et - $\alpha$ -néo-dynorphine sont susceptibles de reconnaître des sites antigéniques de la leu-enképhaline.

L'extension de la réaction anti- $\alpha$ -néo-endorphine, observée sur coupes à la paraffine après fixation au Bouin hollande sublimé, pourrait suggérer que l'épitope est peu accessible dans les conditions de fixation et d'inclusion moins drastiques, qui sont celles réalisées lors de la confection de coupes à congélation. Il semblerait, en fait, que ce soit l'étape de la fixation qui soit la plus critique, dans la mesure où des résultats comparables sont obtenus sur coupes à la paraffine, et à congélation, après utilisation du même fixateur, le Bouin hollande sublimé.

Bien que la structure du (des) peptide(s) qui lie(nt) nos anticorps (anti-leu-enképhaline, -met-enkephaline, - $\alpha$ -néo-endorphine, -dynorphine) reste inconnue, nous pouvons conclure que deux substances différentes sont reconnues, la première par les immunsérums anti-leu-enképhaline et - $\alpha$ -néo-endorphine, éventuellement par l'immunsérum anti-dynorphine ; la deuxième par les immunsérums anti-leu et -met-enképhalines.

### Conclusion

Nous avons testé sur le système nerveux d'un insecte, la larve d'*Aeshna cyanea*, divers immunsérums dirigés contre des peptides de Mammifères. Une réaction positive a été détectée après utilisation d'11 d'entre eux, 7 étaient dirigés contre des peptides du système entéro-gastro-pancréatique, 4 contre des opioïdes.

Les contrôles effectués, en particulier la saturation des sérums par l'antigène correspondant ou par un antigène hétérologue, permettent de conclure à la spécificité des immunsérums utilisés. Cependant, comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises, certains résultats sont susceptibles de varier d'une préparation à l'autre, peut-être en relation avec un état physiologique donné, ou de différer suivant les procédures de fixation et d'inclusion utilisées. Il n'empêche que certains groupes cellulaires, pour un immunsérum donné, présentent de façon régulière une immunoréactivité et ce, quels que soient les modes de fixation et d'inclusion. Le fait que des réactions ne soient pas observées avec l'une ou l'autre des méthodes de fixation n'a cependant rien de bien surprenant. Ainsi, chez le doryphore, *Leptinotarsa decemlineata*, Veenstra et coll. (1985b) ont signalé que le marquage anti- $\alpha$ -néo-endorphine n'est décelable qu'après fixation au Bouin hollandaise sublimé. De telles variations, même si elles sont souvent moins spectaculaires, existent également chez les Mammifères (Tramu, 1980).

L'obtention d'une réponse positive ne signifie pas que nous soyons en présence de la molécule peptidique contre laquelle l'anticorps a été élaboré ; tout au plus, cela signifie-t'il que le peptide réactionnel possède un ou plusieurs sites antigéniques (de quelques acides aminés) en commun avec le peptide originel. Il semblerait, cependant, que la majorité des molécules peptidiques ait relativement, peu changé au cours de l'évolution. Ainsi, comme nous l'avons noté, la leu et la met-enképhalines ont été mises en évidence chez la moule (Leung et Stéfano, 1983). On peut donc raisonnablement penser que certaines des substances apparentées aux peptides

mammaliens mises en évidence dans notre étude puissent être, structurellement, très proches de ceux-ci.

Le rôle de ces substances reste énigmatique ; trois rôles potentiels peuvent être envisagés : ceux de neurotransmetteur, de neuromodulateur et de neurohormone. A l'appui des deux premiers rôles, la mise en évidence par Stéfano et Scharrer (1981) dans le cerveau de la blatte, *Leucophaea maderae* de sites de liaison pour un analogue de la met-enképhaline. A l'appui du troisième rôle, la présence de matériel immunoréactif CCK +, hp GRF +, VIP +, met-enképhaline +, insuline +, etc... dans certaines fibres nerveuses des nerfs cardiaques internes (nccI) et dans leurs terminaisons dans le corps cardiaque. Il est logique de penser que divers peptides transitent des cellules protocérébrales, via les nccI, jusqu'au corps cardiaque où ils seront libérés dans l'hémolymphe. Il est plus surprenant de constater que relativement peu de cellules de la *pars intercerebralis* sont marquées alors que de nombreuses fibres des nccI et de nombreuses terminaisons nerveuses présentes dans le corps cardiaque le sont. Deux explications sont possibles : (1) la plupart des cellules de la *pars intercerebralis* sont de petite taille ; leur cytoplasme peu abondant expliquerait que peu de matériel antigénique existe dans le corps cellulaire, lequel deviendrait, de ce fait, difficilement détectable. Ainsi, seules, les cellules de grande taille, paramédianes, dénommées de type C par Charlet (1972) en raison de leurs affinités tinctoriales pour l'azocarmin, sont observables (ex. immunoréactivité anti-VIP, -met-enképhaline, -insuline, -motiline ...) (2) en plus des nccI, il existerait, en provenance de groupes cellulaires plus latéraux, une seconde voie de cheminement des produits de sécrétion du protocérébron (cf. chapitre V). Ainsi, de nombreuses terminaisons nerveuses pourraient être marquées dans le corps cardiaque alors que seul l'est un nombre restreint de fibres des nccI.

## CHAPITRE II

DETECTION D'UN PEPTIDE PROPRE AUX INSECTES :

LA PROCTOLINE

Ainsi que nous l'avons souligné en introduction, à ce jour, seules, ont été établies, les séquences de 3 peptides : la proctoline, l'hormone adipocinétique (AKH) et l'hormone prothoracotrope (PTTH), laquelle n'est, cependant, pas commercialisée. Comme nous n'avions pas à notre disposition d'immunsérum anti-AKH, notre étude se limite à la démonstration de cellules réagissant au sérum anti-proctoline.

#### Immunoréactivité anti-proctoline

La proctoline est un pentapeptide (Arg - Tyr - Leu - Pro - Thr) qui, à l'origine fut isolé chez la blatte Periplaneta americana (Brown, 1975; Brown et Starratt, 1975 ; Starratt et Brown, 1975). Chez les Insectes, la proctoline contrôle l'activité musculaire intestinale (Brown, 1975 ; Cook et Holman, 1979), cardiaque (Miller, 1979 ; S-Rozsa et Miller, 1981), oviductaire (Cook et Meola, 1978) et squelettique (Piek et Mantel, 1977 ; May et coll., 1979). En plus de ses fonctions périphériques, elle agit comme neurotransmetteur ou neuromodulateur dans le système nerveux central. (Agricola et coll., 1985).

Des cellules proctoline positives s'observent à la fois dans la partie postérieure du protocérébron et dans le tritocérébron (bloc diagramme 11). Trois à quatre petites cellules latéro-dorsales tritocérébrales (Pl XI, fig. a), deux grandes cellules paramédianes (Pl XI, fig. c) et deux cellules dorsales protocérébrales de taille moyenne (Pl XI, fig. d) sont situées dans chaque moitié du cerveau . Quelques fibres immunoréactives sont détectées dans le ganglion frontal de même que le sont certaines terminaisons axonales présentes dans le corps cardiaque (Pl XI, fig. e). Aucun corps cellulaire n'est détecté dans le ganglion sous-oesophagien et quelques très rares fibres nerveuses sont seulement observées dans le neuropile (Pl XI, fig. f).

Sur coupes à la paraffine, en plus des cellules décrites, quelques cellules de taille moyenne situées au voisinage de la médulla réagissent à l'anticorps anti-proctoline (Pl XI, fig. b).

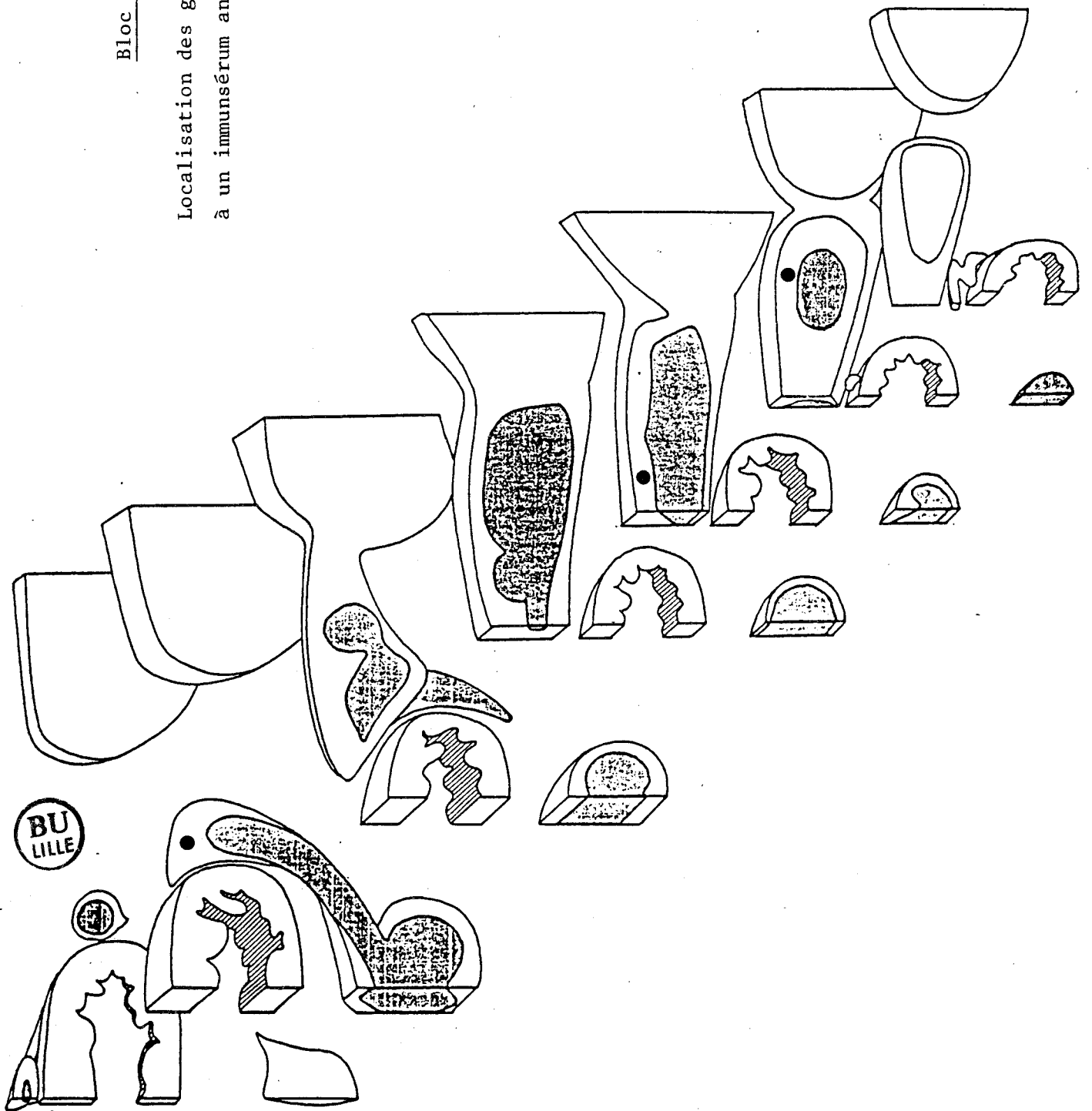
#### Discussion

Des études récentes ont détecté une immunoréactivité anti-proctoline dans le système nerveux central de la blatte, Periplaneta americana (Eckert et coll., 1981 ; Bishop et O'Shea, 1982), du doryphore Leptinotarsa



Bloc diagramme 11

Localisation des groupes cellulaires réagissant  
à un immunosérum anti-proctoline.



*decemlineata* (Veenstra et coll., 1985a) et de la sauterelle, *Schistocerca nitens* (Keshishian et O'Shea, 1985).

Une immunoréactivité anti-proctoline est également observable dans le cerveau d'*Aeshna cyanea*, mais seuls quelques neurones sont marqués. Ainsi, nos résultats s'accordent avec les observations de Veenstra et coll. (1985a), selon lesquelles quelques très rares neurones renfermant une substance apparentée à la proctoline, si ce n'est aucun, sont présents dans le cerveau des Insectes ; l'immunoréactivité anti-proctoline étant surtout détectée dans la chaîne nerveuse et plus particulièrement dans le dernier segment abdominal innervant l'intestin postérieur (Agricola et coll., 1985).

## CHAPITRE III

DETECTION D'UNE AMINE :

LA SEROTONINE

Les amines biogènes, telles la dopamine, l'octopamine, la noradrénaline, la sérotonine, sont présentes en quantité importante dans le système nerveux des Insectes (réf. dans Evans, 1980).

Plusieurs méthodes ont été employées pour les localiser. La plus ancienne, la méthode d'histofluorescence de Falck-Hillarp permet de différencier les structures renfermant des catécholamines de celles contenant de la sérotonine. Une seconde voie d'approche consiste en un marquage par voie autoradiographique. Une troisième méthode, quant à elle, est basée sur l'obtention d'anticorps dirigés contre certaines des enzymes nécessaires à la synthèse de l'amine. Ainsi, des anticorps anti-tryptophane hydroxylase permettent de détecter les cellules sérotoninergiques.

Ces méthodes, cependant, manquent pour une grande part de sensibilité et parfois même de spécificité (cf. Steinbusch et coll., 1982). Elles sont remplacées désormais par des techniques immunohistochimiques faisant appel à la réalisation d'anticorps dirigés contre les amines mêmes. Ces anticorps ont ainsi permis de détecter chez les Insectes la dopamine (Vieillemaringe et coll., 1984 ; Takeda et coll., 1986) et la sérotonine (Bishop et O'Shea, 1983 ; Klemm, 1983 ; Klemm et Sundler, 1983 ; Nässel et Klemm, 1983 ; Nässel et coll., 1983 ; Klemm et coll., 1984 ; Nishiit-sutsuji-Uwo et coll., 1984 ; Schürmann et Klemm, 1984 ; Taghert et Goodman, 1984 ; Tyrer et coll., 1984 ; Nässel et Cantera, 1985 ; Davis, 1985).

Notre étude concerne la détection de l'immunoréactivité anti-sérotonine, laquelle ne s'observe que sur coupes au cryostat.

#### Au niveau des lobes optiques

Un marquage anti-5 HT fort à modéré est décelable au niveau des lobes optiques. Six fines strates parallèles de fibres immunoréactives présentant des varicosités entrent dans la constitution de la médulla, (Pl. XII, figs. a et c) ; le marquage apparaissant plus intense au niveau des trois couches les plus externes. Dans la lobula (Pl. XII, figs. a et c), les cercles concentriques de fibres immunoréactives sont plus lâches et moins ordonnés que dans la médulla. La disposition des fibres sérotoninergiques de la lamina rappelle celle des fibres aminergiques observées après utilisation de la méthode de Falck-Hillarp (Klemm, 1976).

Même si certaines fibres immunoréactives présentes dans le neuropile des ganglions optiques, notamment celles de la lobula, semblent avoir une origine protocérébrale extrinsèque (la localisation de leurs péricaryons reste inconnue), de nombreuses fibres sont issues des péricaryons situés au voisinage des médulla et lobula. Selon leur taille et leur localisation,

quatre groupes de cellules peuvent être distingués : (1) Antérieurement 30 à 40 cellules de taille moyenne (15-20  $\mu\text{m}$  de diamètre), fortement immunoréactives envoient leurs axones vers le neuropile de la médulla (Pl. XII, fig. a). (2) De telles cellules se retrouvent également en position postérieure à proximité de la médulla. (3) Dans la partie postérieure, plus d'une centaine de très petites cellules (Pl. XII, fig. c) (7-10  $\mu\text{m}$  de diamètre) faiblement à modérément immunoréactives, sont mêlées à des cellules de même taille non réactives. Leurs très fins axones pénètrent dans le neuropile de la médulla. (4) Dix à douze grandes cellules dorsales (25-30  $\mu\text{m}$  de diamètre), intensément marquées, constituent le quatrième groupe ; leurs trajets axonaux forment certaines des fibres immunoréactives du neuropile.

#### Au niveau du protocérébron

Bien que des fibres immunoréactives existent dans tout le protocérébron, peu de cellules y sont détectées excepté dans sa partie postérieure. Dans la *pars intercerebralis*, deux à trois paires de cellules parasagittales de taille moyenne (15  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Pl. XII, fig. d) sont situées dans la partie antérieure, alors que trois groupes symétriques, contenant une à trois cellules de taille moyenne, sont localisés dans une position plus postérieure. Comme le marquage reste toujours modéré voire inexistant, nous ne pouvons pas confirmer sa spécificité par notre test de saturation. Une réaction s'observe dans quelques fibres des *nervi corporis cardiaci* (nccI) ; elle est plus nette dans le corps cardiaque même. Cependant, l'immunoréactivité du corps cardiaque n'est pas complètement supprimée après saturation de l'immunsérum anti-5 HT par l'antigène correspondant.

Dans la partie postérieure du protocérébron, plusieurs groupes symétriques de cellules immunoréactives entourent le neuropile. Dorsalement, on distingue trois groupes de cellules immunoréactives : (1) une très grande cellule allongée (30  $\mu\text{m}$  de diamètre) fortement immunoréactive se trouve en position latérale. (2) Deux petites cellules (15  $\mu\text{m}$  de diamètre) modérément marquées s'observent en position plus médiane. (3) Deux grandes cellules dorsales (30  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Pl. XII, fig. f), intensément marquées, constituent le troisième groupe. Plus d'une dizaine de cellules de petite taille et une très grande cellule (30  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont situées très postérieurement en position centrale. Enfin, quelques rares petites cellules latéro-ventrales (souvent une) sont parfois observées.

#### Au niveau du deutocérébron et tritocérébron

Des fibres nerveuses sont toujours présentes dans leur neuropile. Le nombre de cellules 5-HT positives situées au voisinage du neuropile reste toujours modeste. Seules, quelques petites cellules sont localisées dans la partie dorsale, à proximité des neuropiles tritocérébral et deutocérébral.

#### Au niveau du ganglion frontal

Quinze à vingt cellules de grande taille (20-25  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Pl. XII, fig. b) réagissent de façon modérée, voire intense, à l'immunsérum anti-5 HT. Certaines cellules en forme de T présentent une répartition axonale symétrique bilatérale.

#### Au niveau du ganglion sous-oesophagien

Antérieurement, trois à quatre grandes cellules symétriques (30  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Pl. XII, fig. e) sont situées latéro-dorsalement, tandis que plusieurs petites cellules sont présentes latéro-ventralement. Plus postérieurement deux groupes de deux à trois paires de petites cellules paramédianes sont localisés, l'un en position dorsale, l'autre ventralement (Pl XII, fig. g). Enfin, quatre à six cellules ventrales à latéro-ventrales, s'observent postérieurement de chaque côté du ganglion sous-oesophagien. De nombreuses fibres immunoréactives, dont certaines de très grande taille, traversent le neuropile et le connectif périoésophagien.

#### Contrôles

A l'exception du corps cardiaque, où elle se maintient quoique affaiblie, l'immunoréactivité disparaît lorsque l'immunsérum est absorbé par un excès de l'antigène correspondant (4 mg/ml). Elle persiste lorsqu'on ajoute un excès de dopamine (4 mg/ml) à l'immunsérum anti-5 HT.

#### Discussion

Selon des études récentes, il apparaît que l'immunohistochimie est une méthode plus sensible et plus fiable que ne l'est l'histofluorescence utilisée, jusqu'à présent, dans la localisation des amines biogènes (Steinbusch et coll., 1982). Ainsi, le nombre de cellules 5-HT positives détectées chez les Insectes est supérieur à celui détecté selon la méthode

de Falck-Hillarp (Klemm et coll., 1984).

Relativement peu d'études, ayant trait à la localisation de 5-HT dans le système nerveux d'Insectes, ont été réalisées jusqu'à présent (cf. Introduction). La plupart d'entre elles concerne la blatte *Periplaneta americana* (Bishop et O'Shea, 1983 ; Klemm et coll., 1984 ; Nishiitsutsuji-Uwo et coll., 1984 ; Davis, 1985). Les résultats peu concordants enregistrés par différents auteurs étudiant la localisation des cellules sérotoninergiques chez cet insecte, (Bishop et O'Shea, Klemm et coll. d'une part, Nishiitsutsuji-Uwo et coll. d'autre part) posent le problème de la spécificité des anticorps utilisés. Les structures qui réagissent à notre immunosérum ne sont plus marquées quand celui-ci est saturé par un excès d'antigène. Cependant, notre immunosérum présente de réactions croisées avec la tryptamine et la 5-méthoxytryptamine (5 MT), ce qui laisse supposer que l'immunosérum reconnaît la 5 HT, ou un composé apparenté à la 5 MT (Tramu et coll., 1984). L'immunosérum anti-5 HT utilisé ne marque aucun corps cellulaire dopaminergique dans le système nerveux de Mammifères (Tramu, communication personnelle) et la réaction persiste dans notre matériel quand l'immunosérum est saturé par un excès de dopamine. Ainsi, le risque que l'immunosérum anti-5 HT marque les structures dopaminergiques est nul.

Elofsson et Klemm (1972) ont, préalablement à notre étude, mis en évidence des neurones mono aminergiques chez les Odonates par la méthode de fluorescence de Falck - Hillarp. Selon ces auteurs, quatre couches de fluorescence verte et deux couches de fluorescence jaune, correspondant probablement aux fibres sérotoninergiques, s'observent dans la médulla. Les fibres de fluorescence jaune peuvent être également détectées dans la lobula, alors qu'elles sont absentes dans la lamina. Un groupe unique de péricaryons de fluorescence jaune se situe à proximité de la médulla.

Nos résultats montrent que la réaction sérotoninergique est beaucoup plus importante que celle décrite précédemment. Six couches de fibres et quatre groupes cellulaires immunoréactifs, dont un de très grande taille, existent dans la médulla. Probablement, lors de l'étude d'Elofsson et Klemm (1972), l'intense fluorescence verte due aux catécholamines recouvrait et masquait rapidement la faible fluorescence jaune qui correspondait à la sérotonine, ce qui expliquerait les résultats par "défaut" observés par ces auteurs. Un tel argument, s'il a, par ailleurs, été évoqué par Nässel

et Klemm (1983) dans leur étude relative à la localisation des fibres sérotoninergiques au niveau des lobes optiques de *Schistocerca gregaria*, *Periplaneta americana* et *Calliphora erythrocephala*, ne permet cependant pas d'expliquer pourquoi des corps cellulaires (particulièrement ceux de grande taille) ne sont pas détectés par la méthode de Falck-Hillarp.

Des corps cellulaires sérotoninergiques de grande taille s'observent dans le ganglion frontal. Ils apparaissent marqués de façon spécifique dans la mesure où ils ne s'observent pas après absorption de l'immunsérum par l'antigène correspondant, contrairement à ce qui a été décrit chez *Periplaneta americana* (Nishiitsutsuji-Uwo et coll., 1984). Cependant, Davis (1985) a observé une soixantaine de corps cellulaires sérotoninergiques dans le ganglion frontal de cet insecte. Selon cet auteur, les fibres sérotoninergiques présentes dans le système nerveux stomatogastrique innerveraient les glandes salivaires et les muscles des intestins antérieur et moyen. De même, chez *Aeshna cyanea* (Andries et Tramu, 1984, 1985a), la musculature circulaire du gésier et de la tunique conjonctivo-musculaire, entourant l'épithélium de l'intestin moyen, renferment une très intense innervation sérotoninergique.

Dans le système nerveux, la plupart des cellules réagissant à l'immunsérum anti-5 HT est localisée dans la partie postérieure du protocérébron. Il en est de même, comme nous l'avons vu (cf. chapitres I, II, III), pour les cellules réagissant à des immunsérums anti-peptidiques tels que les sérums anti-cholécystokinine, anti-hp GRF ou anti-VIP ...



## CHAPITRE IV

### DETECTION D'UN MEME NEURONE PAR PLUSIEURS ANTICORPS

Le principe de DALE, formulé dans les années 50, stipule qu'un unique transmetteur caractérise chaque population neuronale. Cependant, depuis la dernière décennie, la démonstration, souvent renouvelée, du moins chez les Mammifères, de la présence de plusieurs transmetteurs dans un même neurone, a modifié nos conceptions relatives à ce postulat. Trois grandes catégories de co-localisations ont été détectées :

(1) présence conjointe de 2 neurotransmetteurs classiques. Les premières démonstrations remontent en 1974 et ont été effectuées dans le système nerveux de gastéropodes, l'aplysie (Brownstein et coll., 1974) et l'escargot (Hanley et coll., 1974). Quoique ces travaux initiaux furent critiqués, l'existence de telles co-localisations fut confirmée par la suite. Ainsi des associations entre acide gamma-butyrique (GABA) et sérotonine (Belin et coll., 1981 ; Pujol, 1984) , GABA et dopamine (Everitt et coll., 1984) ont été décrites dans le système nerveux des Mammifères.

(2) présence conjointe d'un neurotransmetteur classique et d'un peptide. La démonstration en a été, maintes fois, renouvelée chez les Vertébrés : sérotonine/substance P (Chan-Palay, 1979 ; Chan-Palay et coll., 1978 ; Hökfelt et coll., 1978 ; Singer et coll., 1979 ; Pelletier et coll., 1981 ; Johansson et coll., 1981 ; Lovick et Hunt, 1983 ; Hancock, 1984), CCK/dopamine (Hökfelt et coll., 1980), acétylcholine/polypeptide pancréatique (Lundberg et coll., 1979 ; Johansson et Lundberg, 1981); sérotonine/enképhaline (Galzer et coll., 1981) ; noradrénaline/enképhaline (Klein et coll., 1982), adrénaline/CCK (Hökfelt et coll., 1984), GABA/CCK (Somogyi et coll., 1984) dopamine/GRF (Okamura et coll., 1985).

Chez les Invertébrés, seule démonstration, celle d'une molécule apparentée au CCK, mise en évidence dans des neurones d'*Helix* (Osborne et coll., 1982).

(3) présence conjointe de 2 peptides. Ici encore, les exemples sont innombrables chez les Mammifères. Un seul d'entre eux, celui concernant les différents peptides décelés en même temps que des enképhalines, suffira à rendre compte de la diversité des associations rencontrées : enképhalines/ocytocine (Martin et Voigt, 1981 ; Martin et coll., 1983 ; Vanderhaeghen et coll., 1983), /vasopressine (Martin et Voigt, 1981 ; Martin et coll., 1983), /neurophysine (Coulter et coll., 1981), /substance P (Erichsen et coll., 1982), /polypeptide pancréatique (Hunt et coll., 1981), /somatostatine (Tramu et coll., 1981, Beauvillain et coll., 1984), /VIP (Leboulenger et coll., 1983), /corticolibérine (CRF) (Hökfelt et coll., 1983). Dans les cas reportés ci-dessus, les deux peptides ne tirent pas leur origine d'un même précurseur. Il n'en est pas

de même des associations met-enképhaline,  $\beta$ -endorphine, ACTH, MSH, les 4 peptides dérivant d'un même précurseur, la proopiomélanocortine ou des associations leu-enképhaline,  $\alpha$ -néo-endorphine, dynorphine qui, elles, sont rendues possibles par le clivage de la prodynorphine.

Chez l'aeshne, nous avons utilisé la technique des coupes sériées, incubées alternativement avec des immunsérums différents, afin de démontrer la coexistence peptide-amine (en l'occurrence, la sérotonine) et l'association de peptides différents entre eux, qu'ils soient apparentés ou non.

#### I - Détection d'un même neurone par des anticorps dirigés contre divers peptides mammaliens

Deux cas sont à envisager, suivant que les peptides contre lesquels ont été synthétisés les anticorps sont apparentés ou non.

##### 1) Par anticorps dirigés contre des peptides mammaliens apparentés : le VIP et l'hpGRF

Le VIP et l'hpGRF présentent, au point de vue structure, de grandes homologies ; 4 des 8 résidus aminés de la partie N terminale sont en effet communs aux deux peptides. Une homologie, plus nette encore, existe, par ailleurs entre l'hpGRF et le PHM, un peptide de 27 acides aminés provenant du même précurseur que le VIP (Itoh et coll., 1983).

Les observations réalisées sur coupes au cryostat révèlent que les cellules intensément marquées par le sérum anti-VIP ne le sont pas ou le sont très faiblement par l'immunsérum anti-hpGRF. C'est le cas, par exemple, des cellules paramédianes, dorsales de la partie postérieure du protocérébron (Pl. XIII, figs. a et b). De même, les cellules réagissant fortement au sérum anti-hpGRF sont peu ou prou immunoréactives au sérum anti-VIP. Ainsi les cellules dorsales piriformes de la partie postérieure du protocérébron sont difficilement observables, après incubation avec le sérum anti-VIP (Pl. XIII figs. c et d).

Les différences de réactions, même si elles subsistent, sont bien moins apparentes sur coupes à la paraffine que sur coupes à congélation (Pl. XIII, figs. e-g). On ne peut cependant affirmer que toutes les cellules VIP positives réagissent au sérum anti-hpGRF et vice versa. C'est le cas en particulier de certaines cellules de petite taille (ex. : petites cellules protocérébrales latéro-dorsales, VIP positives). Il est possible, sinon probable, que dans ce cas, l'immunoréactivité n'est pas détectée en raison du peu de matériel antigénique que renferment ces cellules.

De l'ensemble de ces observations, il ressort que, sous certaines conditions de fixation, certaines cellules sont révélées à la fois par les sérums anti-VIP et anti-hpGRF. Faut-il en conclure qu'il s'agit du même peptide révélé par les 2 antisérums ? La très nette différence de marquage observée entre les 2 populations cellulaires, l'une GRF (+++)/VIP (+), l'autre GRF (+)/VIP (+++) ne plaide pas en faveur de la détection d'une molécule unique. Il est, en effet, difficile d'admettre qu'une même molécule peptidique, susceptible d'être mise en évidence par deux anticorps différents puisse, suivant le type cellulaire dans lequel elle se trouve, être plus facilement décelée par l'un ou l'autre anticorps. Par ailleurs, comme la saturation du sérum anti-hpGRF par un excès de VIP ou, inversement, celle du sérum anti-VIP par du GRF, n'inhibe pas la réaction, on peut conclure à l'existence de sites antigéniques différents réactifs à l'un ou à l'autre anticorps.

Il est donc vraisemblable que nous nous trouvons en présence de 2 peptides différents, probablement apparentés comme le sont le VIP et le GRF mammaliens, ayant en commun un ou quelques (peu) épitopes, lesquels, sous certaines conditions de fixation, seraient révélés par le sérum hétérologue. On ne peut, non plus, exclure que ces peptides puissent dériver d'un même précurseur comme le PHM et le VIP mammaliens dans la mesure où leurs synthèses seraient régulées à un niveau post-translational comme cela semble être le cas pour le VIP et le PHI (peptide, à 2 acides aminés près, identique au PHM) dans certains neurones hypothalamiques du rat (Itoh et coll., 1983).

## 2) Par anticorps dirigés contre des peptides mammaliens non apparentés

### a) Neurones détectés par les anticorps anti-VIP et -hpGRF

Certains des neurones détectés par les anticorps anti-VIP et -hpGRF présentent également une immunoréactivité anti-CCK 8 et/ou -motiline.

#### α) Présentant une immunoréactivité anti-CCK 8 + immunoréactivités anti-hpGRF/-CCK 8

Tous les groupes cellulaires qui réagissent au sérum hpGRF réagissent fortement au sérum anti-CCK 8 NS, que ce soit au niveau du ganglion sous-oesophagique (Pl.XIV figs a et b) ou du protocérébron (Pl.XIV figs e et f).

Aucune réaction croisée n'a été décelée, la saturation du sérum anti-hpGRF par un excès de CCK 8 NS (Pl.XIV figs c et d) n'inhibe pas la réaction pas plus que ne le fait la saturation du sérum anti-CCK par un excès d'hpGRF.

+ immunoréactivités anti-VIP/-CCK 8

Notre étude a été réalisée sur coupes à congélation et concerne donc exclusivement les groupes cellulaires réagissant au VIP après fixation au PAF. Ce sont de petites cellules latéro-ventrales tritocérébrales (Pl.XIV figs.i et j), de grandes cellules paramédianes et dorsales et de petites cellules latéro-dorsales protocérébrales (Pl.XIV figs.g et h). Toutes sont également marquées par le sérum anti-CCK 8. La préincubation du sérum anti-VIP par un excès de CCK 8 NS n'inhibe pas la réaction.

Une immunoréactivité anti-CCK 8 s'observe dans des cellules réagissant aux sérums anti-hpGRF et-VIP et parfois, sous certaines conditions de fixation, aux 2 antisérums. L'absence de réaction croisée permet d'affirmer que ce sont des sites antigéniques différents qui sont détectés par les anticorps anti-CCK 8 ou par les anticorps dirigés contre le VIP ou l'hpGRF. La réaction toujours nette, voire très nette, obtenue après incubation avec le sérum anti-CCK 8 traduit le grand nombre de sites antigéniques auxquels se lient les anticorps anti-CCK 8.

β) Présentant une immunoréactivité anti-motiline

Certaines cellules hpGRF positives sont révélées par un sérum anti-motiline, qu'il s'agisse des cellules latéro-ventrales (Pl.XV figs.f et g) et de la cellule médio-ventrale (Pl.XV figs.c et d) du ganglion sous-oesophagien ou des grandes cellules dorsales piriformes (Pl.XV figs.a et b).

Contrairement au marquage anti-CCK qui est très intense, l'immunoréactivité anti-motiline reste toujours modérée.

b) Neurones détectés par des anticorps anti-opioides

Des neurones détectés par l'un des anticorps anti-opioides utilisés (anti-leu-enképhaline, -met-enképhaline, - $\alpha$ -néo-endorphine et -dynorphine) le sont également par les anticorps anti-CCK 8 et/ou motiline.

α) Présentant une immunoréactivité anti-CCK 8

+ immunoréactivités anti-leu-enképhaline/-CCK 8

La plupart des cellules leu-enképhaline positives réagit au sérum anti-CCK 8 NS. Il s'agit dans le ganglion sous-oesophagien de deux cellules parasagittales dorsales antérieures (Pl.XVI figs.g et j) et de deux cellules latéro-ventrales postérieures (Pl.XVI figs.f et i). Il faut cependant noter l'absence de réaction anti-CCK 8 au niveau des grandes cellules latéro-dorsales et latéro-ventrales du ganglion sous-oesophagien. Dans la partie antérieure du protocérébron, 4 grandes cellules sagittales et quelques cellules paramédianes plus petites (Pl.XVI figs.a et c) sont marquées par les deux immunsérums.

Dans la partie postérieure du protocérébron, le double marquage intéresse de grandes cellules latérales et latéro-ventrales (Pl.XVI figs.e et h) et de petites cellules latéro-dorsales et centrales. Enfin, l'unique cellule leu-enképhaline positive innervant les lobes optiques, réagit aux sérums anti-CCK 8 (Pl.XVI figs.b et d). Elle est incluse dans un groupe d'une dizaine de cellules CCK 8 NS positives.

Par suite de l'absence de séquences peptidiques communes à la leu-enképhaline et au CCK 8 NS, nous n'avons pas saturé les sérums par l'antigène hétérologue. Par contre, la saturation a été faite par l'antigène correspondant. Rappelons que ces contrôles nous ont permis de vérifier la spécificité de nos réactions (sauf celle qui concerne les grandes cellules sagittales du protocérébron, lesquelles restent marquées après incubation avec le sérum anti-leu-enképhaline saturé) .

+ immunoréactivités anti-dynorphine 1-17/CCK 8

Les rares cellules qui, sur coupes au cryostat, réagissent faiblement au sérum anti-dynorphine le font très intensément au sérum anti-CCK 8 NS. La double réaction concerne quelques petites cellules parasagittales de la partie antérieure du ganglion sous-oesophagien et, dans chaque moitié du protocérébron, deux groupes symétriques constitués, l'un de deux grandes cellules paramédianes (Pl.XVI figs.k et l), l'autre de quelques petites cellules latéro-dorsales.

+ immunoréactivités anti- $\alpha$ -néo-endorphine/-CCK 8

La comparaison a été effectuée sur coupes à la paraffine et sur coupes à congélation. Les rares cellules réagissant au sérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine sur coupes au cryostat sont marquées par le sérum anti-CCK 8.

Sur coupes à la paraffine, de nombreuses cellules du protocérébron sont à la fois détectées par les sérums anti-CCK 8 NS et anti- $\alpha$ -néo-endorphine, en particulier dans la région postérieure, qu'il s'agisse de cellules latérales (Pl.XVII figs.b et d), latéro-dorsales (Pl.XVII figs.b et d), dorsales (Pl.XVII figs.i-k) ou ventrales (Pl.XVII figs.j et k). Au niveau de la *pars intercerebralis*, 2 paires de grandes cellules paramédianes sont marquées par les 2 sérums (Pl.XVII figs.e et g) ; le sérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine détectant de plus quelques petites cellules.

De nombreuses cellules du ganglion frontal et une dizaine de cellules innervant les lobes optiques sont révélées par les deux sérums (Pl.XVII figs.a et c)

Nombre de cellules du ganglion sous-oesophagien sont, également, doublement marquées. Cependant, les grandes cellules latéro-dorsales et latéro-ventrales (Pl.XVII figs.f et h) qui réagissent au sérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine

ainsi qu'aux sérums anti-leu et -met-enképhalines ne réagissent pas au sérum anti-CCK 8.

Comme nous l'avons noté chapitre I, il est probable que 2 peptides, l'un dérivant d'une molécule "apparentée" à la proenképhaline, l'autre d'une molécule "voisine" de la prodynorphine, soient présents dans le système nerveux de l'aeshne.

Les cellules réagissant uniquement aux immunosérums anti-leu-enképhaline et - $\alpha$ -néo-endorphine (ex. petites cellules paramédianes de la partie antérieure du protocérébron, cellules centrales de la partie postérieure du protocérébron) réagissent au sérum anti-CCK 8 NS. Un tel résultat constitue un argument en faveur du marquage, par le sérum anti-CCK 8 NS, d'un peptide issu d'une molécule voisine de la prodynorphine. Nous ne pouvons cependant exclure l'hypothèse selon laquelle un peptide "CCK-like" différent de la molécule opioïde serait présent dans ces cellules.

Inversement, comme le sérum anti-CCK 8 ne met pas en évidence les grandes cellules latéro-dorsales et latéro-ventrales du ganglion sous-oesophagien, lesquelles sont détectées à la fois par les sérums anti-met, -leu-enképhalines, - $\alpha$ -néo-endorphine, -dynorphine, il est logique de penser que le sérum anti-CCK 8 ne réagit pas avec le peptide dérivant d'une molécule apparentée à la proenképhaline.

Une telle interprétation ne vaut que pour les types cellulaires les plus aisément identifiables. Elle demande confirmation avant que nous ne puissions l'étendre à l'ensemble des cellules réagissant aux différents sérums anti-opioides.

#### $\beta$ ) Présentant une immunoréactivité anti-motiline

Les grandes cellules latéro-dorsales et latéro-ventrales de la partie antérieure du ganglion sous-oesophagien réagissent faiblement au sérum anti-motiline (Pl.XV figs e et h). Rappelons que ces dernières sont également marquées par les sérums anti-met, -leu-enképhalines, - $\alpha$ -néo-endorphine et -dynorphine. En cas de saturation du sérum anti-motiline par un excès de leu-enképhaline, il n'y a pas inhibition du marquage. Ainsi la molécule peptidique apparentée à la motiline, semble associée ou faire partie de la molécule opiacée dérivant d'un précurseur de type proenképhaline.

#### c) Neurones détectés par les anticorps anti-CCK 8 et -GRP

Les grandes cellules sagittales de la partie antérieure du protocérébron sont marquées, à la fois par les sérums anti-CCK 8 et anti-GRP (Pl.XV figs.i et j).

### Conclusion

Il est possible de distinguer, les uns des autres, des groupes cellulaires suivant l'immunoréactivité qu'ils présentent à divers sérums dirigés contre des peptides mammaliens non apparentés. Malgré la difficulté résultant entre autres du fait que les comparaisons ont été effectuées, les unes sur coupes au cryostat, les autres sur coupes à la paraffine, plusieurs types de réponse ont été obtenus :

- (VIP + GRF)/CCK : cellules paramédianes dorsales et cellules piriformes dorsales de la partie postérieure du protocérébron. Les cellules piriformes sont également détectées par un sérum anti-motiline.
- (leu-enképhaline +  $\alpha$ -néo-endorphine)/CCK : petites cellules paramédianes antérieures et petites cellules centrales postérieures du protocérébron.
- $\alpha$ -néo-endorphine/CCK : ex. cellules du ganglion frontal, grandes cellules paramédianes antérieures du protocérébron.
- (met-enképhaline + leu-enképhaline +  $\alpha$ -néo-endorphine)/motiline : grandes cellules latéro-dorsales et latéro-ventrales de la partie antérieure du ganglion sous-oesophagien.
- CCK/GRP : cellules sagittales de la partie antérieure du protocérébron.

Notre étude n'est pas exhaustive, il est probable que d'autres associations existent ; ainsi le sérum anti-insuline révèle des cellules paramédianes de la *pars intercerebralis* (cf. Pl.IV fig. h) et de grandes cellules dorsales de la partie postérieure du protocérébron (cf. Pl.IV fig. j) dont la position est identique à celle des cellules révélées par les sérums anti-hpGRF et anti-VIP ...

Par ailleurs, il faut noter que nombre de cellules ne sont mises en évidence que par un seul sérum. Ainsi de nombreuses cellules le sont uniquement par le sérum anti-CCK 8.

Dans le cas d'une immunoréactivité à 2 ou plusieurs sérums dirigés contre des peptides mammaliens non apparentés, deux explications peuvent être envisagées : la première stipule que la molécule peptidique d'insecte, différente des deux peptides mammaliens contre lesquels ont été élaborés les anticorps, possède des sites antigéniques révélés par les deux sérums ; la seconde, que chaque sérum révèle un peptide particulier.

Il est certain que nous n'avons pas d'élément de réponse irréfutable en faveur de l'une ou l'autre interprétation. Le seul, qui soit intéressant à noter, concerne l'existence d'une immunoréactivité à un anticorps donné (en l'occurrence l'anti-motiline) dans certaines et non dans toutes les cellules



réagissant à d'autres anticorps (anti-VIP, -hpGRF, -CCK). Dans ce cas, il y a toutes chances pour que l'anticorps anti-motiline détecte un peptide différent de celui mis en évidence par les anticorps anti-VIP, -hpGRF et -CCK.

## II - DÉTECTION D'UN MÊME NEURONE PAR DEUX ANTICORPS DIRIGÉS, L'UN, CONTRE UN PEPTIDE MAMMALIEN (CCK), L'AUTRE, CONTRE UN PEPTIDE D'INSECTE (PROCTOLINE)

Les cellules dorsales paramédianes (Pl.XVIII figs a et b) et latéro-dorsales (Pl.XVIII figs c et d) protocérébrales qui réagissent au sérum anti-proctoline, présentent également une immunoréactivité anti-CCK 8. Il est remarquable de constater que les rares cellules à proctoline font partie de 2 groupes comprenant de nombreuses cellules réagissant au sérum anti-CCK 8. Nous confirmons ainsi l'hétérogénéité des groupes cellulaires tels que nous les définissons sur critères morphologiques et/ou immunohistochimiques.

Comme il n'existe aucune séquence peptidique commune entre la proctoline et l'octapeptide C terminal de la cholecystokinine, nous pouvons conclure à l'existence de sites antigéniques différents révélés par les deux antisérums. Ces épitopes appartiennent probablement à deux peptides différents puisqu'il est en effet vraisemblable que le sérum anti-proctoline révèle la proctoline et non une molécule apparentée. Nous ne pouvons, toutefois, totalement exclure l'idée selon laquelle l'anticorps anti-CCK détecte des sites antigéniques d'un éventuel précurseur de la proctoline (lequel reste encore à démontrer ...).

## III - COEXISTENCE D'UNE AMINE : LA SÉROTONINE ET D'UN PEPTIDE APPARENTÉ À LA CHOLECYSTOKININE

Pour mettre en évidence une éventuelle colocalisation de la sérotonine et de peptides dans le système nerveux et le ganglion sous-oesophagien d'*Aeshna cyanea*, des coupes sériées ont été incubées alternativement avec un sérum anti-5 HT ou avec l'un des sérums respectivement dirigés contre le CCK-8 NS, la substance P, les leu- et met-enképhalines, le VIP présent dans les neurones sérotoninergiques.

Des neurones réagissant aux immunsérums anti-CCK-8 NS et anti-5 HT ont été observés aussi bien, dans le système nerveux central, que dans le système nerveux stomatogastrique d'*Aeshna cyanea*. Quatre groupes cellulaires réagissent à l'immunsérum anti-5 HT au voisinage des lobes optiques. Seules, les grandes cellules (20-25  $\mu\text{m}$  de diamètre) immunoréactives à l'immunsérum anti-5 HT renferment également du matériel réagissant au sérum anti-CCK-8 NS (Pl.XIX figs. d et e). Dans le ganglion sous-oesophagien, trois à quatre paires de grandes cellules antéro-dorsales (20-25  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont fortement marquées par les deux immunsérums (Pl.XIX figs. f-h). Enfin, des cellules de grande taille (20-25  $\mu\text{m}$  de diamètre) du ganglion frontal (Pl.XIX figs. a-c) qui réagissent fortement à l'immunsérum anti-5 HT, présentent une faible immunoréactivité à l'immunsérum anti-CCK-8 NS.

Comme nous l'avons indiqué chapitre III, l'immunoréactivité disparaît lorsque les anticorps spécifiques anti-CCK-8 NS et anti-5 HT sont saturés par leur antigène correspondant, tandis que le marquage persiste quand l'immunsérum anti-5 HT est saturé par la dopamine.

#### Discussion - Conclusion

Nos résultats démontrent, pour la première fois, la coexistence d'un matériel apparenté au CCK-8 NS et à la sérotonine dans les systèmes nerveux central et stomatogastrique d'un insecte.

Certains neurones, réagissant à la fois aux immunsérums anti-CCK-8 NS et anti-5 HT, apparaissent marqués avec la même intensité (c'est le cas des cellules innervant les lobes optiques ou des cellules antéro-dorsales du ganglion sous-oesophagien), tandis que d'autres présentent une forte immunoréactivité avec l'immunsérum anti-5 HT et une réaction faible ou modérée avec l'immunsérum anti-CCK-8 NS (c'est le cas des cellules du ganglion frontal). En nous fondant sur les différences de marquage immunohistochimique observées, il semble logique de suggérer que le peptide et l'amine sont localisés dans des vésicules différentes, même si nous ne pouvons exclure l'éventualité qu'ils puissent coexister dans les mêmes vésicules, comme c'est le cas pour la sérotonine et la substance P chez le rat (Pelletier et coll., 1981).

Nous ne pouvons que spéculer sur l'importance de la coexistence d'un peptide avec une molécule neurotransmettrice classique. Chez les Insectes, comme chez les Vertébrés, la présence de grande quantité de matériel apparenté à la cholécystokinine/gastrine suppose une activité neurotransmettrice ou neuromodulatrice même si une partie non négligeable du matériel protocérébral est acheminé jusqu'au corps cardiaque où il sera libéré dans l'hémolymphe pour y jouer un rôle hormonal. Dans le neurone géant d'*Helix aspersa*, la cholécystokinine diminue

l'effet excitateur de la sérotonine et augmente son effet inhibiteur (Bokisch et coll., 1983). Dans ce cas, la cholécystokinine, en plus de son action directe sur le potentiel membranaire, module l'action de la sérotonine. Ces observations suggèrent l'un des éventuels rôles physiologiques de la cholécystokinine chez les Invertébrés, à savoir moduler l'action de neurotransmetteurs classiques comme cela semble être par ailleurs le cas pour la substance P chez les Vertébrés (Pernow, 1983).

## CHAPITRE V

### ANALYSE DES RELATIONS CERVEAU-CORPS CARDIAQUE

Depuis l'observation princeps de La Vail et La Vail (1972), la peroxydase de Raifort a été maintes fois utilisée, ne serait-ce que chez les Insectes (Sivasubramanian et Nässel, 1985 ; Watson et Burrows, 1985 ; Watson et coll., 1985 ...), pour localiser des massifs neuronaux ou déterminer des trajets axonaux. Le principe de la réaction est basé, d'une part, sur le transfert rétrograde de la protéine des terminaisons axonales vers le corps cellulaire et, d'autre part, sur la détection de l'enzyme par une solution de diamino-benzidine en présence d'eau oxygénée.

Comme nous l'avons noté, chez *Aeshna cyanea*, de nombreuses terminaisons axonales sont marquées, au niveau du corps cardiaque, après incubation avec des immunosérums dirigés contre des peptides mammaliens (anti-CCK, -VIP, -hpGRF, -leu-enképhaline, -met-enképhaline, - $\alpha$ -néo-endorphine, -dynorphine) ou d'insecte (anti-proctoline). Les fibres des nerfs cardiaques internes (nccI) dans lesquelles cheminent les produits de sécrétion originaires de cellules de la *pars intercerebralis* apparaissent également immunoréactives à la majorité des antisérums, bien que leur nombre soit parfois relativement faible, comparé à celui des terminaisons nerveuses présentes dans le corps cardiaque.

Chez les Insectes, il est classiquement admis que les produits de sécrétion des deux massifs pairs de cellules protocérébrales sont acheminés jusqu'aux corps cardiaques par l'intermédiaire de deux nerfs, les nerfs cardiaques internes (nccI) et les nerfs cardiaques externes (nccII). Chez les Odonates, bien qu'Arvy et Gabe (1952) les aient mentionnés, aucune preuve tangible de l'existence des nccII n'a été fournie jusqu'à ce jour.

Nous avons tenté de les démontrer en injectant de la peroxydase de Raifort dans le corps cardiaque, grâce à une microélectrode reliée à un stimulateur électrique. Bien que la révélation de l'activité peroxydasique ne nous ait pas permis d'observer ni les nccI, ni les cellules de la *pars intercerebralis*, elle a rendu possible la détection, dans la partie postérieure du protocérébron, de deux groupes symétriques d'une vingtaine de petites cellules latéfo-dorsales (Pl.XX, figs.b-e) dont les fibres nerveuses gagnent le corps cardiaque (Pl.XX, figs.a et b). Il est très probable que ces fibres constituent les nccII, tels qu'ils ont été démontrés dans les autres ordres d'insectes.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux que nous avons obtenus en immunohistochimie. Des cellules de petite taille de la partie postérieure du protocérébron, situées en position latéro-dorsale, réagissent à divers immunsérums, anti-CCK 8 (Pl.II, fig.e), -hpGRF, -VIP (Pl.V fig. 1), -leu-enképhaline (Pl.VII fig. d), - $\alpha$ -néo-endorphine (Pl.X fig. e), -insuline, -proctoline (Pl.XI fig. d), -motiline. Il est raisonnable de penser que ce sont certaines de ces cellules dont les fibres constituent les nccII.

CONCLUSION GENERALE

Chez les Insectes, les peptides possèdent trois rôles potentiels, ceux de neurotransmetteur, de neuromodulateur et de neurohormone. Ce sont, pour la plupart, des peptides issus des corps cardiaques qui contrôlent les fonctions physiologiques de l'insecte. Toutefois, beaucoup d'entre eux sont, en fait, originaires du cerveau d'où ils transitent jusqu'aux organes neuro-hémaux, via les nerfs cardiaques.

L'obtention d'immunsérums, dirigés contre de tels peptides, permettrait de localiser aisément leur lieu de synthèse. Les difficultés d'isolement de ces molécules peptidiques font, cependant, que nos connaissances restent très fragmentaires, quant à la localisation des cellules peptidergiques. Par contre, de nombreux peptides ont été identifiés dans le système nerveux et le système gastro-entéro-pancréatique des Mammifères et autant d'immunsérums réalisés. En utilisant les immunsérums dirigés contre ces peptides mammaliens nous avons tenté de répondre à plusieurs questions :

(1) les molécules peptidiques présentes chez les Mammifères, existent-elles chez les Insectes ?

(2) plusieurs molécules peptidiques peuvent-elles coexister dans un même neurone ?

(3) une molécule peptidique peut-elle exister conjointement avec un neurotransmetteur classique aminergique ?

Par ailleurs, comme seule l'existence des nerfs cardiaques internes avait été démontrée, avec certitude, chez les Odonates, il était intéressant de préciser les relations entre le cerveau et le corps cardiaque .

Les réponses suivantes ont été fournies :

(1) De nombreuses cellules du cerveau et du ganglion sous-oesophagien, parfois du système stomatogastrique, réagissent de façon spécifique à des anticorps dirigés contre des peptides mammaliens (CCK 8, insuline, motiline, VIP, hpGRF, leucine-enképhaline, méthionine-enképhaline,  $\alpha$ -néo-endorphine...).

Les réponses obtenues varient avec les immunsérums utilisés. Ainsi, si certains d'entre eux ne mettent en évidence que peu de cellules (ex. sérum anti-GRP), d'autres, en particulier les sérums anti-CCK-8 NS et  $\alpha$ -néo-endorphine en détectent plusieurs centaines.

Trois problèmes inhérents aux études immunohistochimiques concernent la spécificité, la sensibilité des immunsérums et le mode de fixation. Nous avons plusieurs fois mentionné la spécificité de nos immunsérums et les contrôles que



nous avons effectués. De même, nous avons discuté leur sensibilité, en particulier celle des sérums anti-CCK-8 NS et -CCK-8 S. La réponse est souvent fonction du fixateur utilisé, éventuellement du mode d'inclusion. Ainsi, l'immunoréactivité anti- $\alpha$ -néo-endorphine est décelée essentiellement après fixation au Bouin hollandaise sublimé alors que la réactivité aux sérums anti-CCK-8 (S et NS) est plus nette après fixation au PAF et confection des coupes à congélation.

Des terminaisons axonales présentes dans le corps cardiaque et des fibres des nerfs cardiaques internes sont marquées après incubation avec de nombreux immunsérums : -anti-CCK, -hpGRF, -VIP, -méthionine-enképhaline, ... ce qui laisse supposer que les peptides ainsi mis en évidence possèdent bien une fonction hormonale. Il faut également noter que les sérums -CCK-8 détectent non seulement, les terminaisons axonales mais également certaines cellules glandulaires du corps cardiaque.

Dans le cadre d'une réaction positive, il n'est possible de conclure qu'à l'existence de substances peptidiques ayant un ou plusieurs sites antigéniques communs avec la molécule peptidique originelle de Mammifères. Néanmoins, il est vraisemblable qu'il existe, chez les Insectes, des précurseurs peptidiques qui s'apparentent aux précurseurs des peptides mammaliens. Ainsi, certains neurones réagissent aux sérums anti-leucine et -méthionine enképhalines, d'autres aux sérums anti-leucine-enképhaline et - $\alpha$ -néo-endorphine comme le font, respectivement, chez les Mammifères, les cellules renfermant les dérivés de la proenképhaline et de la prodynorphine.

(2) Un même neurone peut être détecté par plusieurs immunsérums dirigés contre des peptides non apparentés (ex. CCK/leucine-enképhaline ; CCK/VIP ; CCK/proctoline ...). Bien qu'il soit possible, sinon vraisemblable, que deux peptides différents soient ainsi mis en évidence, on ne peut, toutefois, totalement exclure l'idée selon laquelle un même peptide d'insecte ne puisse posséder des épitopes qui seraient révélés par deux anticorps dirigés contre deux peptides mammaliens non apparentés.

(3) Un peptide peut coexister avec un neurotransmetteur classique. Ainsi, une substance apparentée à la cholécystokinine est présente dans certaines cellules sérotoninergiques des systèmes nerveux stomatogastrique et central. Il est probable, que, chez les Invertébrés comme chez les Vertébrés, l'un des rôles possibles du peptide coexistant avec un neurotransmetteur aminergique est d'en moduler l'action.

(4) Chez les Odonates, comme chez les autres Insectes, les produits de sécrétion du protocérébron sont véhiculés jusqu'au corps cardiaque par deux nerfs pairs : les nerfs cardiaques internes et externes. Les axones constituant ces derniers sont issus de deux massifs cellulaires localisés dans la partie postérieure du cerveau, en position latéro-dorsale.

## BIBLIOGRAPHIE.

- Agricola H, Eckert M, Ude J, Birkenbeil H, Penzlin H (1985) The distribution of a proctolin-like immunoreactive material in the terminal ganglion of the cockroach, *Periplaneta americana* L. Cell Tissue Res 239:203-209.
- Anastasi A, Erspammer V, Bucci M (1971) Isolation and structure of bombesin and alytensin, two analogous active peptides from the skin of the european amphibians *Bombina* and *Alytes*. Experientia 26:166-167.
- Andries JC, Tramu G (1984) Détection immunohistochimique de substances apparentées à des hormones peptidiques de Mammifères dans le mésentéron d'*Aeshna cyanea* (Insecte, Odonate). CR Acad Sc Paris 299:181-184.
- Andries JC, Tramu G (1985a) Distribution patterns of mammalian-like peptide immunoreactive cells in the midgut of *Aeshna cyanea* (Insecta, Odonata). Experientia 41:500-503.
- Andries JC, Tramu G (1985b) Ultrastructural and immunohistochemical study of endocrine cells in the midgut of the cockroach *Blaberus craniifer* (Insecta, Dictyoptera). Cell Tissue Res 240:323-332.
- Beauvillain JC, Tramu G, Garaud JC (1984) Coexistence of substances related to enkephalin and somatostatin in granules of the guinea-pig median eminence : demonstration by use of colloidal gold immunocytochemical methods. Brain Res 301:389-393.
- Beinfeld MC, Korčák DM (1985) The regional distribution and the chemical, chromatographic and immunologic characterization of motilin brain peptides : the evidence for a difference between brain and intestinal motilin-immunoreactive peptides. J Neurosci 9:2502-2509.
- Bell GI, Swain WF, Pictet R, Cardell B, Goodman HM, Rutter WJ (1979) Nucleotide sequence of cDNA clone encoding human preproinsulin. Nature 282:525-527.
- Benedeczky I, Kiss JZ, Somogyi P (1982) Light and electron microscopic localization of substance P-like immunoreactivity in the cerebral ganglion of locust with a monoclonal antibody. Histochem 75:123-131.
- Belin MJ, Weisman-Nanopoulous D, Steinbusch H, Verhofstad A, Maître A, Jouvét M, Pujol JF (1981) Mise en évidence de glutamate et de sérotonine dans un même neurone au niveau du raphé dorsalis par des méthodes de double marquage immunocytochimique. CR Acad Sci Paris 293:337-341.

- Bishop CA, O'Shea M (1982) Neuropeptide proctolin (H-Arg-<sup>Tyr</sup>Thr<sup>Thi</sup>-Leu-Pro-OH) : immunocytochemical mapping of neurons in the central nervous system of the cockroach. J Comp Neurol 207:223-238.
- Bishop CA, O'Shea M (1983) Serotonin immunoreactive neurons in the central nervous system of an insect (*Periplaneta americana*). J Neurobiol 14:251-269.
- Bokisch AJ, Osborne NN, Walker RJ (1983) Actions of cholecystokinin on neurones in the central nervous system of the snail *Helix aspersa*. Comp Biochem Physiol 75C:171-177.
- Brown BE (1975) Proctolin : a peptide transmitter candidate in insects. Life Sci 17:1241-1252.
- Brown BE, Starratt AN (1975) Isolation of proctolin : a myotropic peptide from *Periplaneta americana*. J Insect Physiol 21:1879-1881.
- Brown J, Cook M, Dryburgh J (1972) Motilin, a gastric motor activity - stimulating polypeptide : final purification, amino-acid composition and C-terminal residues. Gastroenterology 62:401-404.
- Brownstein MJ, Saavedra JM, Axelrod J, Zeman GH, Carpenter DO (1974) Coexistence of several putative neurotransmitters in single identified neurons of *Aplysia*. Proc Natl Acad Sci USA 71:4662-4665.
- Carlquist M, Jornvall H, Tatemoto K, Mutt V (1982) A porcine brain polypeptide is identical to the vasoactive intestinal polypeptide. Gastroenterology 83:245-249.
- Chan-Palay V (1979) Combined immunocytochemistry and autoradiography after *in vivo* injections of monoclonal antibody to substance P and <sup>3</sup>H-serotonin : coexistence of two putative transmitters in single raphe cells and fibers plexuses. Anat Embryol 156:241-254.
- Chan-Palay V, Jonsson G, Palay SL (1978) Serotonin and substance P coexist in neurons in the rat's central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 75:1582-1586.
- Chang MM, Leeman SE (1970) Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. Biol Chem 245:4784-4790.
- Chang MM, Leeman SE, Niall HD (1971) Amino-acid sequence of substance P. Nature 232:86-87.
- Charlet M (1972) Etude du système neurosécréteur d'*Aeshna cyanea* Müll (Insecte, Odonate). Thèse 3<sup>e</sup> Cycle, Strasbourg.

- Comb H, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L, Herbert E (1982) Primary structure of the human met- and leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295:663-666.
- Cook BJ, Holman GM (1979) The action of proctolin and L-glutamic acid on the visceral muscles of the hindgut of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Comp Biochem Physiol* 64C:21-28.
- Cook BJ, Meola S (1978) The oviduct musculature of the horsefly *Tabanus sulcifrons* and its response to 5-hydroxytryptamine and proctolin. *Physiol Entomol* 3:273-278.
- Coons AH (1978) Fluorescent antibody methods, In "General Cytochemical Methods" (ed. Danielli JF) Acad New York pp 399-422.
- Coulter HD, Elde RP, Unverzagt SL (1981) Co-localization of neurophysin and enkephalin-like immunoreactivity in cat pituitary. *Peptides* 2:51-55.
- Davis NT (1985) Serotonin-immunoreactive visceral nerves and neurohemal system in the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res* 240:593-600.
- Dhainaut-Courtois N, Tramu G, Beauvillain JC, Masson M (1986) A qualitative approach of the *Nereis* neuropeptides by use of antibodies to several vertebrates peptides. *Neurochem Int* (in press).
- Doerr-Schott J, Joly L, Dubois MP (1978) Sur l'existence dans la *pars intercerebralis* d'un insecte (*Locusta migratoria* R. et F.) de cellules neurosécrétrices fixant un antisérum anti-somatostatine. *CR Acad Sci Paris* 286 :93-95.
- Duve H, Thorpe A (1979) Immunofluorescent localization of insulin-like material in the median neurosecretory cells of the blowfly, *Calliphora vomitoria* (Diptera). *Cell Tissue Res* 200:187-191.
- Duve H, Thorpe A (1980) Localization of pancreatic polypeptide (PP)-like immunoreactive material in neurones of the brain of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Diptera). *Cell Tissue Res* 210:101-109.
- Duve H, Thorpe A (1981) Gastrin/cholecystokinin (CCK)-like immunoreactive neurones in the brain of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Diptera). *Gen Comp Endocrinol* 43:381-391.
- Duve H, Thorpe A (1982) The distribution of pancreatic polypeptide in the nervous system of the blowfly, *Calliphora vomitoria* (Diptera). *Cell Tissue Res* 227:67-77.

- Duve H, Thorpe A (1983) Immunocytochemical identification of  $\alpha$ -endorphin-like material in neurones of the brain and corpus cardiacum of the blowfly, *Calliphora vomitoria* (Diptera). Cell Tissue Res 233:415-426.
- Duve H, Thorpe A (1984) Immunocytochemical mapping of gastrin/CCK-like peptides in the neuroendocrine system of the blowfly *Calliphora vomitoria* (Diptera). Cell Tissue Res 237:309-320.
- Eckert M, Agricola H, Penzlin H (1981) Immunocytochemical identification of proctolin-like immunoreactivity in the terminal ganglion and hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. Cell Tissue Res 217:633-645.
- Elofsson R, Klemm N (1972) Monoamine-containing neurons in the optic ganglia of crustaceans and insects. Z Zellforsch mikrosk Anat 133:475-499.
- El-Salhy M, Abou-El-Ela R, Falkmer S, Grimelius L, Wilander E (1980) Immunohistochemical evidence of gastro-entero-pancreatic neurohormonal peptides of vertebrate type in the nervous system of the larva of a dipteran insect, the hoverfly, *Eristalis aenus*. Regul Peptides 1:187-204.
- El-Salhy M, Falkmer S, Kramer KJ, Speirs RD (1983) Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca, and corpora allata of an adult lepidopteran insect, *Manduca sexta* (L.). Cell Tissue Res 232:295-317.
- Erichsen JT, Reiner A, Karten HJ (1982) Co-occurrence of substance P-like and Leu-enkephalin-like immunoreactivities in neurones and fibres of avian nervous system. Nature 295:407-410.
- Evans PD (1980) Biogenic amines in the insect nervous system. Adv Insect Physiol 15:317-473.
- Everitt BJ, Hökfelt T, Wu JY, Goldstein M (1984) Coexistence of tyrosine hydroxylase-like and gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivities in neurons of the arcuate nucleus. Neuroendocrinol 39:189-191.
- Fogal W, Fraenckel G (1969) The role of bursicon in the melanization and endocuticle formation in the adult fleshfly, *Sarcophaga bullata*. J Insect Physiol 15:1235-1247.
- Fraenckel G, Hsiao C, Seligman M (1966) Properties of bursicon: an insect protein hormone that controls cuticular tanning. Science 151:91-93.

- Fujita T, Yui R, Iwanaga T, Nishiitsutsuji-Uwo J, Endo Y, Yanaihara N (1981) Evolutionary aspects of "brain-gut-peptides" : an immunohistochemical study. *Peptides* 2 Suppl 2:123-131.
- Gabe M, Arvy L (1952) Données histophysiologiques sur les formations endocrines rétro-cérébrales de quelques Odonates. *Ann Sc Nat Zool* 14:345-374.
- Galzer EJ, Steinbusch H, Verhofstad A, Basbaum AI (1981) Serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis and paragigantocellularis of the cat contain enkephalin. *J Physiol (Paris)* 77:241-245.
- Goldstein A, Tachibana AS, Lowney LI, Hunkapiller RM, Hood L (1979) Dynorphin (1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6666-6670.
- Granger NA, Mitchell LJ, Janzen WP, Bollenbacher WE (1984) Activation of *Manduca sexta* corpora allata *in vitro* by a cerebral neuropeptide. *Mol Cell Endocrinol* 37:349-358.
- Gros C, Lafon-Cazal M, Dray F (1978) Présence de substances immunoréactivement apparentées aux enképhalines chez un insecte, *Locusta migratoria*, *CR Acad Sci Paris* 287:647-650.
- Gubler U, Seeburg P, Hoffman BJ, Gage LP, Udenfriend S (1982) Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295:206-208.
- Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB. (1982) Growth hormone-releasing factor from a pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218:585-587.
- Hancock MB (1984) Substance P-immunoreactive processes on 5 HT/SP-immunoreactive medullary cells. *Brain Res Bull* 13:559-563.
- Hanley MR, Cottrell GA, Emson PC, Fonnum F (1974) Enzymatic synthesis of acetylcholine by a serotonin-containing neurone from *Helix*. *Nature* 251:631-633.
- Hansen BL, Hansen GN, Scharrer B (1982) Immunoreactive material resembling vertebrate neuropeptides in the corpus cardiacum and corpus allatum of the insect *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res* 225:319-329.
- Hökfelt T, Skirboll L, Everitt B, Meister B, Brownstein M, Jacobs T, Faden A, Kuga S, Goldstein M, Markstein R, Dockray G, Rehfeld J (1984) Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the nervous system. Coexistence with classical neurotransmitters and other neuropeptides. *Ann NY Acad Sci* 448:255-274.



- Hökfelt T, Ljungdahl A, Steinbusch H, Verhofstad A, Nilsson G, Brodin E, Pernow B, Goldstein M (1978) Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neurosci* 3:517-538.
- Hökfelt T, Rehfeld J, Skirboll L, Ivemark B, Goldstein M, Markey K (1980) Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurones. *Nature* 285:476-478.
- Hökfelt T, Fahrenkrug J, Tatemoto K, Mutt V, Werner S, Hulting AL, Terenius L, Chang KJ (1983) The PHI (PHI-27)/corticotropin-releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron : possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin and growth hormone secretion *Proc Natl Acad Sci USA* 80:895-897.
- Hughes L (1979) Further investigation on the isolation of diuretic hormone from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem* 9:247-255.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-579.
- Hunt SP, Emson PC, Gilbert R, Goldstein M, Kimmel J (1981) Presence of avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in catecholamine and methionine-enkephalin containing neurones within the central nervous system. *Neurosci Lett* 21:125-130.
- Ishay J, Gitter S, Galun R, Doron M, Laron Z (1976) The presence of insulin in and some effects of exogenous insulin on Hymenoptera tissues and body fluids. *Comp Biochem Physiol* 54A:203-206.
- Isobe M, Hasegawa K, Goto T (1973) Isolation of the diapause hormone from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* 19:1221-1239.
- Isobe M, Hasegawa K, Goto T (1975) Further characterization of the silkworm diapause hormone A. *J Insect Physiol* 21:1917-1920.
- Itoh N, Obata K, Yanaihara N, Okamoto H (1983) Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature* 304:547-549.
- Jaros PP, Dircksen H, Keller R (1985) Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab, *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res* 241:111-117.

- Johansson O, Lundberg JM (1981) Ultrastructural localization of VIP-like immunoreactivity in large dense-core vesicles of "cholinergic-type" nerve terminals in cat exocrine glands. *Neurosci* 6:847-862.
- Johansson O, Hökfelt T, Pernow B, Jeffcoate SL, White N, Steinbusch HWM, Verhofstad AAJ, Emson PC, Spindel E (1981) Immunohistochemical support for three transmitters in one neurone : coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P- and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. *Neurosci* 6:1857-1881.
- Jones J (1978) Physiologically active factors in the corpora cardiaca of insects. Ph D Thesis, London.
- Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Marimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine  $\beta$ -neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298:245-249.
- Kangawa K, Matsuo H, Igarashi M (1979)  $\alpha$ -neo-endorphin : a "big" leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 95:1475-1481.
- Keshishian H, O'Shea M (1985) The distribution of a peptide neurotransmitter in the postembryonic grasshopper central nervous system. *J Neurosci* 5:992-1004.
- Klein RL, Wilson SP, Zielak DJ, Yang WH, Viveros OH (1982) Opioid peptides and noradrenaline coexist in large dense-core vesicles from sympathetic nerve. *Neurosci* 7:2255-2261.
- Klemm N (1976) Histochemistry of putative transmitter substances in the insect brain. *Proc Neurobiol* 7:99-169.
- Klemm N (1983) Monoamine-containing neurons and their projections in the brain (supraoesophageal ganglion) of cockroaches. *Cell Tissue Res* 229:379-402.
- Klemm N, Sundler F (1983) Organization of catecholamine and serotonin-immunoreactive neurons in the corpora pedunculata of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forsk. *Neurosci Lett* 36:13-17.
- Klemm N, Steinbusch HWM, Sundler F (1984) Distribution of serotonin-containing neurons and their pathways in the supraoesophageal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana* (L.) as revealed by immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 225:387-395.

- Kramer KJ, Childs CN, Speirs RD, Jacobs RM (1982) Purification of insulin-like peptides from insect haemolymph and royal jelly. *Insect Biochem* 12:91-98.
- La Vail, La Vail (1972) Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 176:1416-1417.
- Lavenseau L, Gadenne C, Trabelsi M (1984) Immunofluorescent localization of a substance immunologically related to insulin in the protocerebral neurosecretory cells of the European corn borer. *Cell Tissue Res* 238:207-208.
- Leboulenger F, Leroux P, Tonon MC, Coy DH, Vaudry H, Pelletier G (1983) Coexistence of vasoactive intestinal peptide and enkephalins in the adrenal chromaffin granules of the frog. *Neurosci Lett* 37:221-225.
- Lequellec Y, Gourdoux L, Moreau R, Dutrieu J (1982) Régulation endocrinienne de la tréhalosémie chez *Locusta migratoria* : comparaison des effets de deux extraits hormonaux endogènes avec ceux de l'insuline et du glucagon. *CR Acad Sci* 294:375-378.
- Leung M, Stefano GB (1983) Isolation of Molluscan opioid peptides. *Life Sci* 33, Suppl. 1:77-80.
- Lovick TA, Hunt SP (1983) Substance P-immunoreactive and serotonin containing neurones in the ventral brainstem of the cat. *Neurosci Lett* 36:223-228.
- Lundberg JM, Hökfelt T, Fahrenkrug J, Nilsson G, Terenius L (1979) Peptides in the cat carotid body (glomus caroticum) : VIP-, enkephalin- and substance P-like immunoreactivity. *Acta Physiol Scand* 107:279-281.
- Maddrell SHP (1963) Excretion in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* Stal. I. The control of diuresis. *J Exp Biol* 40: 247-256.
- Maddrell SHP, Gee JD (1974) Potassium-induced release of the diuretic hormones of *Rhodnius prolixus* and *Glossina austeni* : ca dependence, time course and localization of neurohaemal areas. *J Exp Biol* 61:155-171.
- Martin R, Voigt KH (1981) Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature* 289:502-504.
- Martin R, Geis R, Holl R, Schafer M, Voigt KH (1983) Co-existence of unrelated peptides in oxytocin and vasopressin terminals of rat neurohypophyses : immunoreactive methionine-enkephalin-, leucine-enkephalin- and cholecysto-kinin-like substances. *Neurosci* 8:213-227.

- May TE, Brown BE, Clements AN (1979) Experimental studies upon a bundle of tonic fibres in the locust extensor tibialis muscle. *J Insect Physiol* 25:169-181.
- Mayer RJ, Candy DJ (1969) Control of haemolymph lipid concentration during locust flight : an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J Insect Physiol* 15:611-620.
- McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V (1979) Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 90:227-233.
- Migliori-Natalizi G, Pansa MC, D'Ajello V, Casaglia O, Bettini S, Frontali N (1970) Physiologically active factors from corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *J Insect Physiol* 16:1827-1836.
- Miller TA (1979) Nervous versus neurohormonal control of insect heart-beat. *Am Zool* 19:77-86.
- Mordue W, Goldsworthy GJ (1969) The physiological effects of corpus cardiacum extracts in locusts. *Gen Comp Endocrinol* 12:360-369.
- Moreau R, Raoelison C, Sutter BC (1981) An intestinal insulin-like molecule in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera). *Comp Biochem Physiol* 69A:79-83.
- Mutt V, Jorpes JE (1968) Structure of porcine cholecystokinin pancreozymin. I. Cleavage with thrombin and with trypsin. *Eur J Biochem* 6:156-162.
- Mutt V, Jorpes JE (1971) Hormonal polypeptides of the upper intestine. *Biochem J* 125:57P-58P.
- Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Ishizaki H, Mizoguchi A, Fujiwara Y, Suzuki A (1985) Amino-terminal amino-acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone : homology with insulin. *Science* 226:1344-1345.
- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang ACY, Cohen SN, Numa S (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- $\beta$ -lipotropin precursor. *Nature* 278:423-427.
- Nässel DR, Cantera R (1985) Mapping of serotonin-immunoreactive neurons in the larval nervous system of the flies *Calliphora erythrocephala* and *Sarcophaga bullata* : a comparison with ventral ganglia in adult animals. *Cell Tissue Res* 239:423-434.
- Nässel DR, Klemm, N (1983) Serotonin-like immunoreactivity in the optic lobes of three insect species. *Cell Tissue Res* 232:129-140.

- Nassel DR, Hagberg M, Seyan HS (1983) A new, possibly serotonergic, neuron in the lamina of the blowfly optic lobe : an immunocytochemical and Golgi-EM study. *Brain Res* 280:361-367.
- Nishiitsutsuji-Uwo J, Takeda M, Saito H (1984) The production of an antiserum to serotonin and serotonin-like immunoreactivity in the cockroach brain-midgut system. *Biomed Res* 5:211-224.
- Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S (1982) Cloning and sequence of cDNA for bovine adrenal prepro-enkephalin. *Nature* 295:202-206.
- O'Connor KJ, Baxter D (1985) The demonstration of insulin-like material in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comp Biochem Physiol* 81B:775-760.
- Okamura H, Murakami S, Chihara K, Nagatsu I, Iyata Y (1985) Coexistence of growth hormone releasing factor-like and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities in neurons of the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinol* 41:177-179.
- Orchard I, Loughton BG (1980) A hypolipaeamic factor from the corpus cardiacum of locusts. *Nature* 286:494-496.
- Osborne NN, Cuello AC, Dockray GJ (1982) Substance P and cholecystokinin-like peptides in *Helix* neurons and cholecystokinin and serotonin in a giant neurone. *Nature* 216:409-411.
- O'Shea M, Witten J, Schaffer M (1984) Isolation and characterization of two myoactive neuropeptides : further evidence of an invertebrate peptide family. *J Neurosci* 4:521-529.
- Pages M, Jemenez F, Ferrus A, Peralta E, Ramirez G, Gelpi E (1983) Enkephalin-like immunoreactivity in *Drosophila melanogaster*. *Neuropeptides* 4:87-98.
- Pelletier G, Steinbusch HWM, Verhofstad AAJ (1981) Immunoreactive substance P and serotonin present in the same dense-core vesicles. *Nature* 293:71-72.
- Pernow B (1983) Substance P. *Pharmacol Reviews* 35:85-141.
- Piek T, Mantel P (1977) Myogenic contractions in locust muscle induced by proctolin and by wasp *Philanthus triangulum* venom. *J Insect Physiol* 23:321-325.
- Pujol JF (1985) Serotonin and GABA in raphe neurons. In : "Coexistence of neuroactive substances in neurons". Chan-Palay V, SL Palay eds, pp45-61.

- Raabe M (1985) Réactions immunocytochimiques au niveau de cellules neurosécrétrices périphériques des aires neurohémales, des organes périsympathiques et des corpora cardiaca chez quelques insectes. CR Acad Sci Paris 301:407-412.
- Rembold H, Schlagintweit B, Ulrich GM (1986) Activation of juvenile hormone synthesis *in vitro* by a corpus cardiacum factor from *Locusta migratoria*. J Insect Physiol 32:91-94.
- Rémy C, Dubois MP (1981) Immunohistological evidence of methionin-enkephalin-like material in the brain of the migratory locust. Cell Tissue Res 218:271-278.
- Rémy C, Girardie J, Dubois MP (1977) Exploration immunocytologique des ganglions cérébroïdes et sous-oesophagiens du phasme *Clitumnus extradentatus* : existence d'une neurosécrétion apparentée à la vasopressine-neurophysine. CR Acad Sci 285:1495-1497.
- Rémy C, Girardie J, Dubois MP (1978) Présence dans le ganglion sous-oesophagien de la chenille processionnaire du pin (*Thaumtopoea pityocampa* Schiff) de cellules révélées en immunofluorescence par un anticorps anti- $\alpha$ -endorphine. CR Acad Sci 286:651-653.
- Rémy C, Girardie J, Dubois MP (1979) Vertebrate neuropeptide-like substances in the suboesophageal ganglion of two insects : *Locusta migratoria* R and F (Orthoptera) and *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). Immunocytological investigation. Gen Comp Endocrinol 37:93-100.
- Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W (1982) Characterization of growth hormone releasing factor from a human pancreatic islet tumor. Nature 300:276-278.
- Romeuf M, Rémy C (1984) Early immunohistochemical detection of somatostatin-like and methionin-enkephalin-like neuropeptides in the brain of the migratory locust embryo. Cell Tissue Res 236:289-292.
- Roth KA, Weber E, Barchas JD (1982) Distribution of gastrin releasing-peptide bombesin-like immunostaining in rat brain. Brain Res 251:277-282.
- Said SI, Mutt V (1970) Polypeptide with broad biological activity : isolation from small intestine. Science 1969:1217-1218.
- Said SI, Mutt V (1972) Isolation from porcine intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. Eur J Biochem 28:199-204.

- Scarborough RM, Jamieson GC, Kalish F, Kramer SJ, McEnroe GA, Miller CA, Schooley DA (1984) Isolation and primary structure of two peptides with cardioaccelerating and hyperglycaemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. Proc Natl Acad Sci (US):5575-5579.
- Schaller F, Meunier J (1968) Etude du système neurosécréteur céphalique des Insectes Odonates. Bull Soc Zool Fr 93:233-249.
- Schaller F, Charlet M (1983) Cephalic neurohemal organs in Odonata. In: "Neurohemal organs of Arthropods. Their development, evolution, structures, and functions." AP Gupta ed. pp319-335.
- Schürmann FW, Klemm N (1984) Serotonin-immunoreactive neurons in the brain of the honey bee. J Comp Neurol 225:570-580.
- Shukle RH, Judson CL (1984) Action of two corpus cardiacal peptides on muscles of the hindgut of *Periplaneta americana* L. (Orthoptera : Blattidae). J Insect Physiol 30:927-937.
- Singer E, Sperk G, Placheta P, Leeman SE (1979) Reduction of substance P levels in the ventral cervical spinal cord of the rat after intracisternal 5, 7-dihydroxytryptamine injection. Brain Res 174:362-365.
- Sivasubramanian P, Nässel DR (1985) Axonal projections from transplanted ectopic legs in an insect. J Comp Neurol 239:247-253.
- Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Wu JY (1984) Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin - or cholecystokinin - immunoreactive material. J Neurosci 4:2590-2603.
- Spiess J, Rivier J, Vale W (1983) Characterization of rat hypothalamic growth hormone releasing factor. Nature 303:532-535.
- S-Rozsa K, Miller TA (1981) Aminergic and peptidergic receptors at the heart muscle of *Locusta migratoria migratorioides* R.F. Adv Physiol Sci 22:557-581.
- Starratt AN, Brown BE (1975) Structure of the pentapeptide proctolin, a proposed neurotransmitter in insects. Life Sci 17:1253-1256.
- Stefanini M, De Martino C, Zamboni L (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature 216:173-174.
- Stefano GB, Scharrer B (1981) High affinity binding of an enkephalin analog in the cerebral ganglion of the insect *Leucophaea maderae* (Blattaria). Brain Res 225:107-114.

- Steinbusch HWM, Verhofstad AAJ, Joosten HWJ (1982) Antibodies to serotonin for neuroimmunocytochemical studies. *J Histochem Cytochem* 30:756-759.
- Stone JV, Mordue W, Battley KE, Morris HR (1976) Structure of locust adipokinetic hormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* 263:207-211
- Studer RO, Trzeciak H, Lergier W (1973) Isolierung und Aminosäuresequenz von Substanz P aus Pferdedarm. *Helv Chim Acta* 56:860-866.
- Studler JM, Reibaud M, Tramu G, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP (1984) Pharmacological study on the mixed CCK 8/DA meso-nucleus accumbens pathway : evidence for the existence of storage sites containing the two transmitters. *Brain Res* 298:91-97.
- Tager HS, Markese J, Spiers RD, Kramer KJ (1975) Glucagon-like immunoreactivity in insect corpus cardiacum. *Nature* 254:707-708.
- Tager HS, Markese J, Kramer KJ, Spiers RD, Childs CN (1976) Glucagon-like and insulin-like hormones of the insect neurosecretory system. *Biochem J* 156:515-520.
- Taghert PH, Goodman CS (1984) Cell determination and differentiation of identified serotonin-immunoreactive neurons in the grasshopper embryo. *Neurosci* 4:989-1000.
- Takeda S, Vieillemaringe J, Geffard M, Rémy C (1986) Immunohistological evidence of dopamine cells in the cephalic nervous system of the silkworm *Bombyx mori*. Coexistence of dopamine and  $\alpha$  endorphin-like substance in neurosecretory cells of the suboesophageal ganglion. *Cell Tissue Res* 243:125-128.
- Tramu G (1980) Détection immunocytologique des polypeptides apparentés à la corticotropine et à la  $\beta$ -lipotropine dans l'adénohypophyse et l'hypothalamus du cobaye (*Cavia porcellus* L.) et du lérot (*Eliomys quercinus* L.). Thèse Etat, Lille.
- Tramu G, Beauvillain JC, Croix D, Leonardelli J (1981) Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig brain. *Brain Res* 215:235-257.
- Tramu G, Beauvillain JC, Croix D, Pillez A, Garaud JC (1984) Arguments immunohisto-chimiques en faveur de la colocalisation de neuropeptides dans des systèmes de neurones hypothalamo-infundibulaires. *Ann Endocrinol Paris* 45:175-187.



- Tyrer MM, Turner JD, Altman JS (1984) Identifiable neurons in the locust central nervous system that react with antibodies to serotonin. *J Comp Neurol* 227:313-330.
- Udenfriend S (1984) Proenkephalin and the products derived from its processing. In opioid modulation of endocrine function (Eds. G. Delitala, M. Motta, M. Serio) Raven Press New York pp 1-10.
- Vanderhaeghen JJ, Signeau JC, Gepts W (1975) New peptide in the vertebrate CNS reacting with anti-gastrin antibodies. *Nature* 257:604-605.
- Vanderhaeghen JJ, Lotstra F, Liston DR, Rossier J (1983) Proenkephalin, met-enkephalin and oxytocin immunoreactivities are co-localized in bovine hypothalamic magnocellular neurons. *Proc Natl Acad Sci* 80:5139-5143.
- Veenstra JA, Schooneveld H (1984) Immunocytochemical localization of neurons in the nervous system of the Colorado potato beetle with antisera against FMRF amide and bovine pancreatic polypeptide. *Cell Tissue Res* 235:303-308.
- Veenstra JA, Yanaihara N (1984) Immunocytochemical localization of gastrin-releasing peptide/bombesin-like immunoreactive neurons in insects. *Histochem* 81:133-138.
- Veenstra JA, Romberg-Privee HM, Schooneveld H (1984) Immunocytochemical localization of peptidergic cells in the neuro-endocrine system of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, with antisera against vasopressin, vasotocin and oxytocin. *Histochem* 81:29-34.
- Veenstra JA, Romberg-Privee HM, Schooneveld H (1985a) A proctolin-like peptide and its immunocytochemical localization in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Cell Tissue Res* 240:535-540.
- Veenstra JA, Romberg-Privee HM, Schooneveld H, Polak JM (1985b) Immunocytochemical localization of peptidergic neurons and neurosecretory cells in the neuro-endocrine system of the Colorado potato beetle with antisera to vertebrate regulatory peptides. *Histochem* 82:9-18.
- Verhaert P, De Loof A (1985) Immunocytochemical localization of a methionin-enkephalin-resembling neuropeptide in the central nervous system of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *J Comp Neurol* 239:54-61.

- Vieillemaringe J, Dubois P, Bensch C, Girardie J (1982) Co-localization of amines and peptides in the same median neurosecretory cells of locusts. *Neurosci Lett* 31:237-240.
- Vieillemaringe J, Duris P, Geffard M, Le Moal M, Delaage M, Bensch C, Girardie J (1984) Immunohistochemical localization of dopamine in the brain of the insect *Locusta migratoria migratorioides* in comparison with the catecholamine distribution determined by the histofluorescence technique. *Cell Tissue Res* 237:391-394.
- Watson AHD, Burrows M (1985) The distribution of synapses on the two fields of neurites of spiking local interneurons in the locust. *J Comp Neurol* 240:219-232.
- Watson AHD, Burrows M, Hale JP (1985) The morphology and ultrastructure of common inhibitory motor neurons in the thorax of the locust. *J Comp Neurol* 239:341-359.
- Witten J, O'Shea M (1985) Peptidergic innervation of insect skeletal muscle : immunochemical observations. *J Comp Neurol* 242:93-101.
- Witten J, Schaffer MH, O'Shea M (1983) Structure and biology of two new related neuropeptides from insect : further evidence for a peptide family. *Soc Neurosci Abstr* 9:313.
- Witten J, Schaffer MH, O'Shea M, Carter-Cock J, Hemling ME, Rinehart KL (1984) Structures of two cockroach neuropeptides assigned by fast atom bombardement mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Comm* 124:350-358.
- Yui R, Fujita T, Ito S (1980) Insulin-, gastrin-, pancreatic polypeptide-like immunoreactive neurons in the brain of the silkworm *Bombyx mori*. *Biomed Res* 1:42-46.

## PLANCHE I

Immunoréactivités anti-CCK-8 NS (figs. a, b, c, e, f et g) et -CCK-8S (figs. d et h) mises en évidence sur coupes à congélation.

Fig. a : tritocérébron ; petites cellules ventrales réagissant au sérum anti-CCK-8 NS. x 120.

Figs. b à e : lobes optiques.

Fig. b : réponse à un sérum anti-CCK-8 NS ; cellules dorsales innervant la médulla (m.) ; 10 strates de fibres nerveuses (1 à 10) présentes dans la médulla (l. : lobula). x 120.

Figs. c et d : médulla ; nombreuses couches de fibres détectées par le sérum anti-CCK-8 NS (fig. c) et, de façon bien moins nette, par le sérum anti-CCK-8S (fig. d) ; petites cellules CCK-8 NS positives (flèche) innervant la médulla. x 110.

Fig. e : réponse à un sérum anti-CCK-8 NS ; petites cellules (flèche) à proximité de la lobula (m. : médulla). x 110.

Figs. f à h : protocérébron, région antérieure.

Fig. f : réactivité à un sérum anti-CCK-8 NS ; petites cellules paramédianes (flèche) et grande cellule sagittale (flèche évidée). x 100.

Figs. g et h : réponse de coupes sériées à un sérum anti-CCK-8 NS (fig. g) et CCK-8S (fig. h) ; cellules paramédianes (flèches) et cellules (flèches évidées) innervant la médulla. x 100.

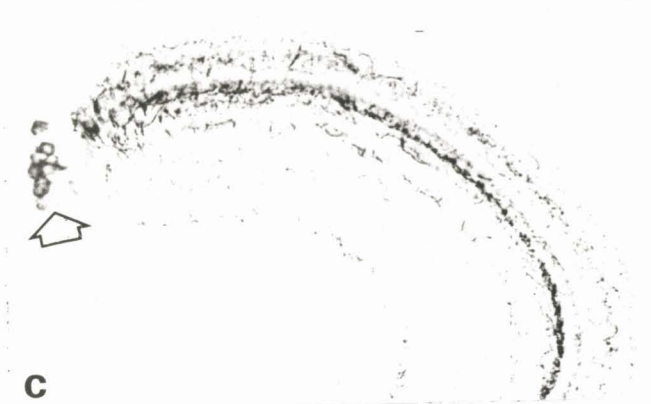
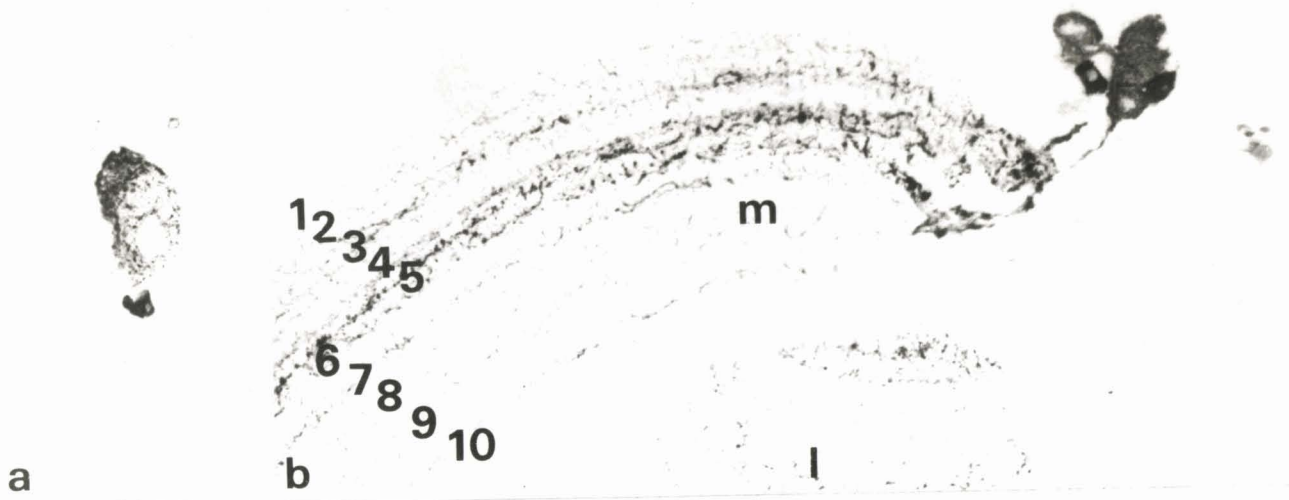
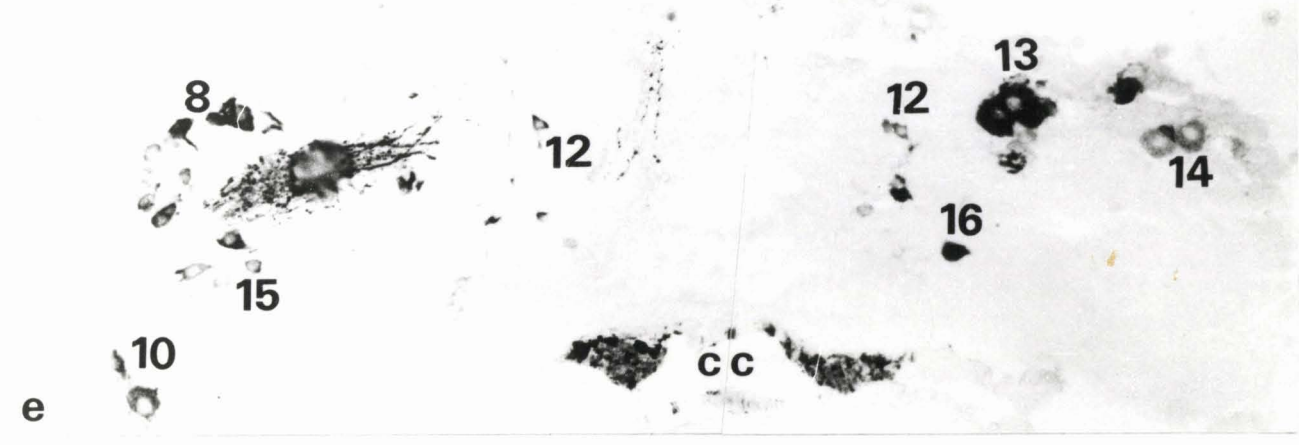
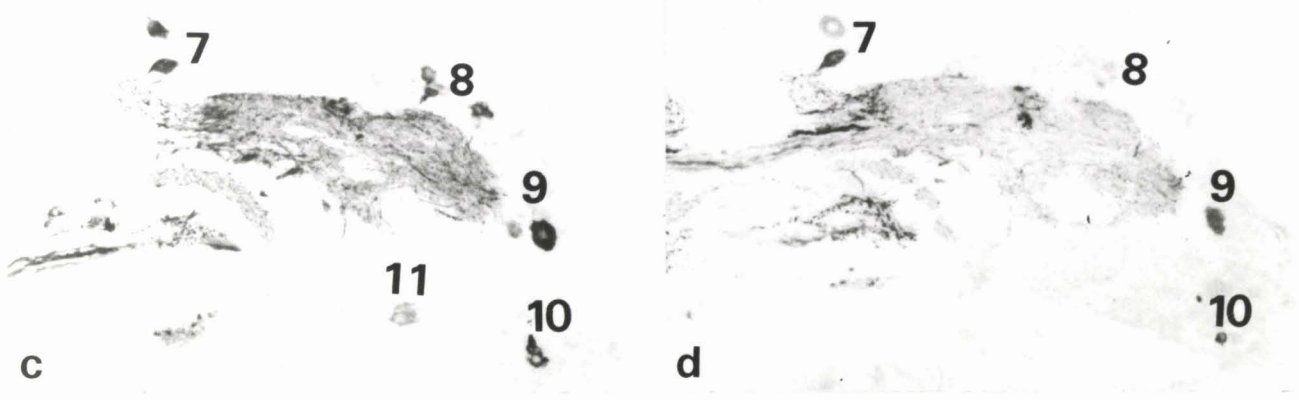
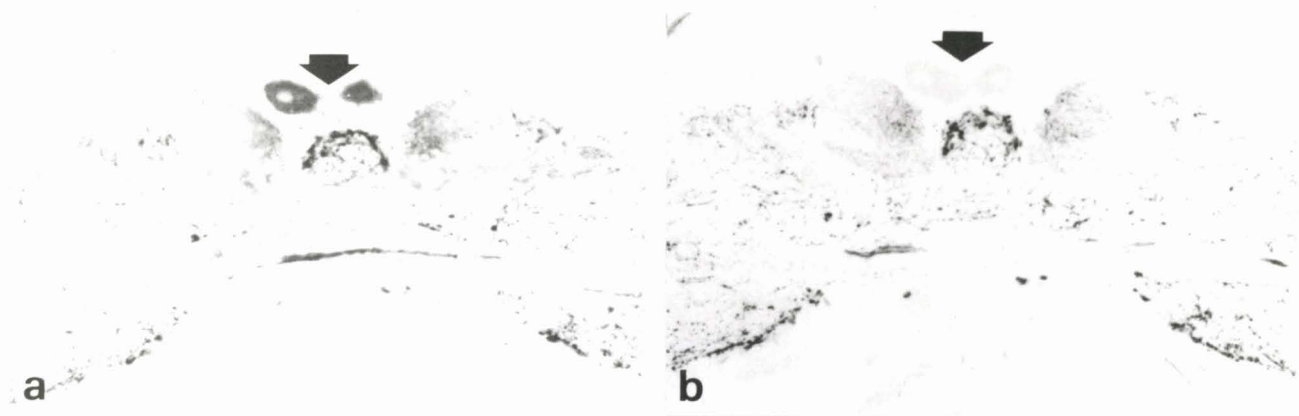


PLANCHE II

Immunoréactivités anti-CCK-8 NS (figs. a, c et e) et -CCK-8S (figs. b, d et f) mises en évidence sur coupes à congélation adjacentes.

Figs. a et b : région antérieure du protocérébron ; réponses aux sérums anti-CCK-8 NS (fig. a) et -CCK-8S (fig. b) ; cellules sagittales (flèches) x 110.

Figs. c-f : région postérieure du protocérébron ; réponses aux sérums anti-CCK-8 NS (figs. c et e) et -CCK-8S (figs. d et f). Cellules des groupes 7, 9, 10, 14, 16 détectées, avec la même intensité, par les deux antisérums ; cellules des groupes 8, 11, 12, 15 révélées par le sérum anti-CCK-8 NS et de façon beaucoup moins nette par le sérum anti-CCK-8S (c.c. : corps cardiaque). Figs. c et d : x 100, Figs. e et f : x 120.



### PLANCHE III

Immunoréactivités anti-CCK-8 NS (figs. a, c, e, f, h, i, k, l, n et p) et -CCK-8S (figs. b, d, g, f, m et o) mises en évidence sur coupes à congélation adjacentes.

Figs. a et b : ganglion frontal, réponse aux immunsérums anti-CCK-8 NS (fig. a) et -CCK-8S (fig. b). x 200.

Figs. c-e : ganglion sous-oesophagien, partie antérieure. Cellules des groupes 2, 3 et 5 révélées par les sérums anti-CCK-8 NS (figs. c et e) et -CCK-8S (fig. d). x 110.

Figs. f-h : ganglion sous-oesophagien, partie médiane. Cellules des groupes 8 et 9 révélées avec la même intensité par les sérums anti-CCK-8 NS (figs. f et h) et -CCK-8S (fig. g). x 110.

Figs. i-p : ganglion sous-oesophagien, partie postérieure. Cellules des groupes 10, 11 et 12 révélées par les sérums anti-CCK-8 NS (figs. i, k, l, n et p) et -CCK-8S (figs. j, m et o). x 110.

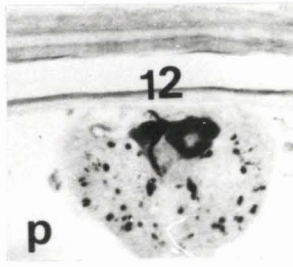
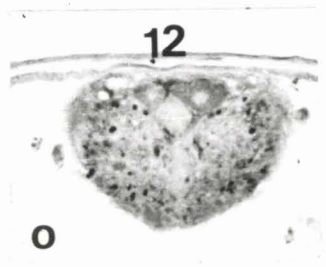
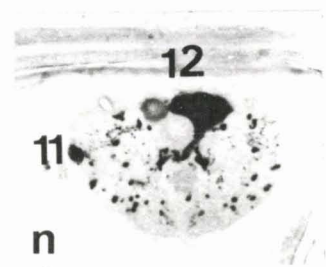
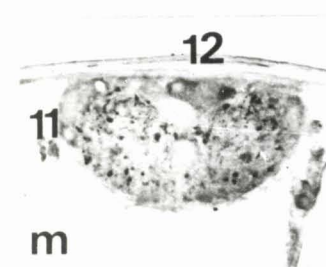
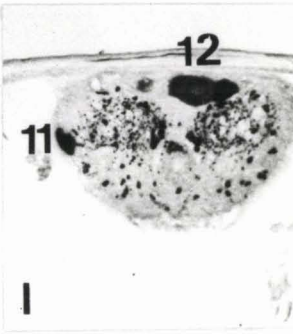
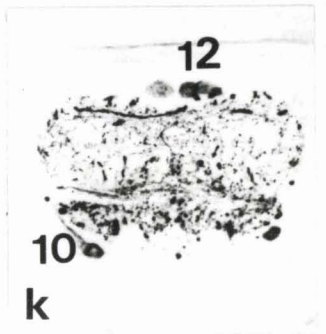
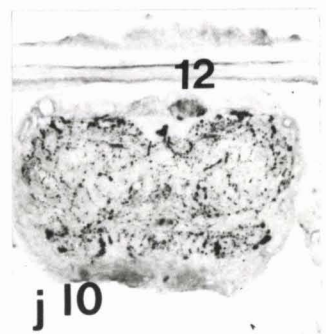
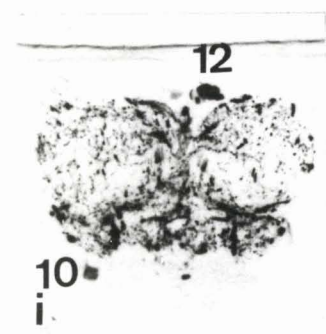
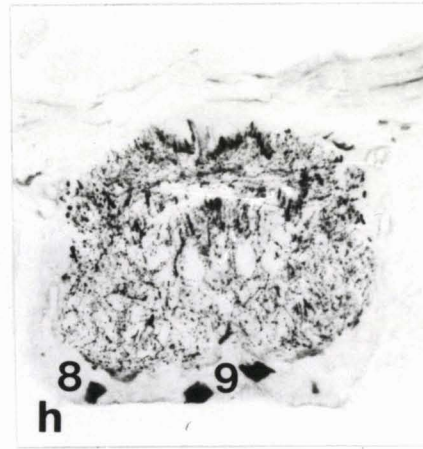
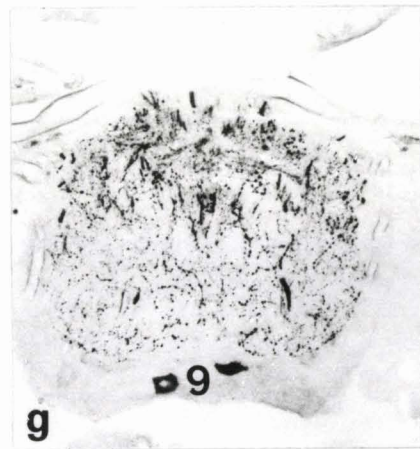
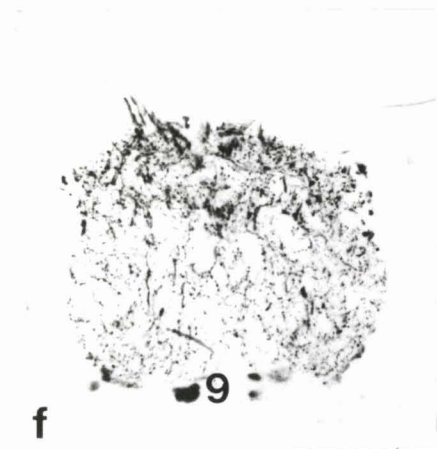
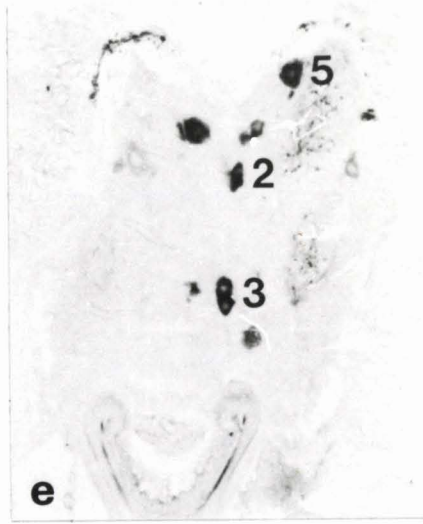
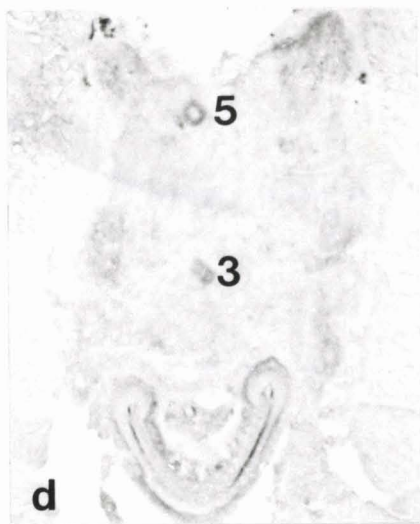
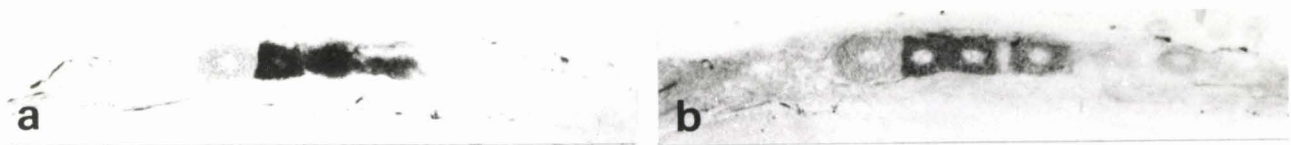




PLANCHE IV

Immunoréactivité anti-insuline mise en évidence sur coupes à la paraffine (figs. a-h et j) et sur coupe à congélation (fig. i).

Fig. a : ganglion frontal, fibres nerveuses (flèche). x 160.

Fig. b : lobe optique ; cellules innervant la médulla (flèche) et la lobula (flèche évidée). x 110.

Figs. c et d : tritocérébron ; petites cellules (flèches) situées latéro-ventralement. x 110.

Fig. e : partie antérieure du protocérébron ; cellule centrale (flèche), cellule paramédiane (pointe de flèche) et cellules innervant les lobes optiques (flèche évidée). x 90.

Fig. f : tritocérébron et lobe optique gauches ; cellules immunoréactives (flèches). x 90.

Fig. g : protocérébron, partie médiane ; petites cellules latéro-ventrales (flèche). x 90.

Figs. h-j : protocérébron, partie postérieure ; cellules paramédianes (flèches) (fig. h) et cellules dorsales (flèches) (figs. i et j) (c.c. : corps cardiaque). x 120.



PLANCHE V

---

Immunoréactivités anti-motiline (figs. a-f) et -VIP (figs. g-l).

Figs. a-f : immunoréactivité anti-motiline .

- Fig. a : ganglion frontal ; fibres nerveuses (flèche). x 110.  
Fig. b : protocérébron, région postérieure ; cellule (flèche) de la *pars intercerebralis*. x 110.  
Fig. c : protocérébron, région postérieure ; cellules dorsales (flèche). x 120.  
Fig. d : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; cellules latéro-dorsale (flèche évidée) et latéro-ventrale (flèche). x 110.  
Fig. e : ganglion sous-oesophagien, région médiane ; cellules sagittale (flèche évidée) et latéro-ventrales (flèches). x 110.  
Fig. f : tritocérébron (t.) et connectif périoesophagien ; fibres nerveuses.

Figs. g-l : immunoréactivité anti-VIP .

- Fig. g : ganglion frontal, fibres nerveuses (flèche).  
Fig. h : protocérébron, région antérieure ; cellule latéro-dorsale (flèche évidée). x 110.  
Fig. i : lobe optique, médulla (m.) et lobula (l.) ; fibres nerveuses. x 110.  
Fig. j et k : tritocérébron ; cellules latéro-ventrale (flèche) (fig. j) et dorsales (flèche) (fig. k). x 110.  
Fig. l : protocérébron, région postérieure ; cellules paramédianes (flèche évidée), latéro-dorsales (flèche noire) et centrales (pointes de flèches). x 110.

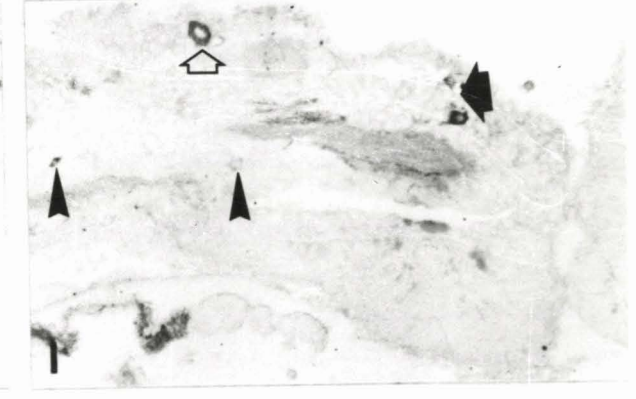
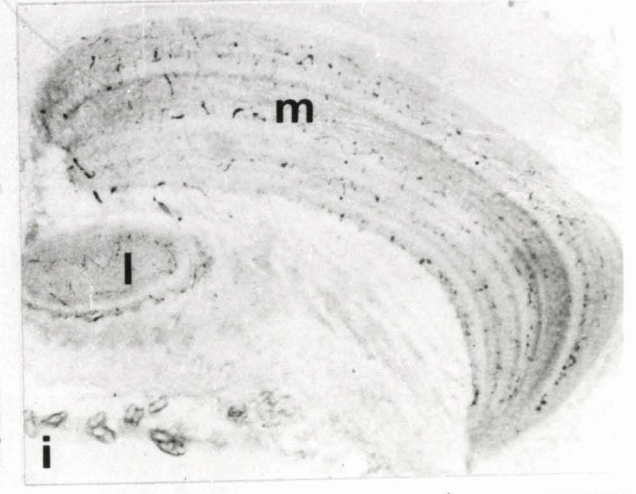
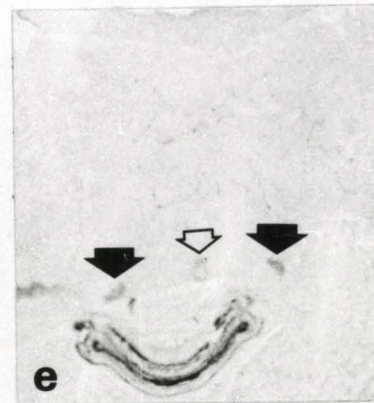
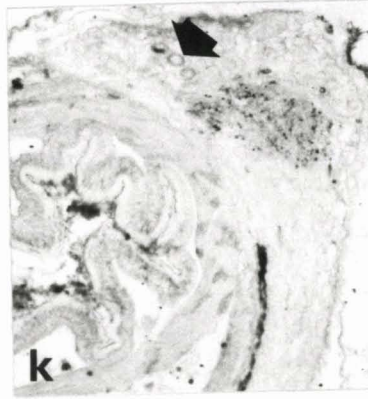
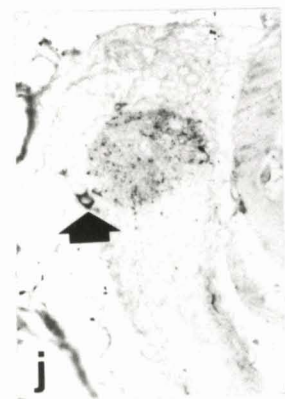
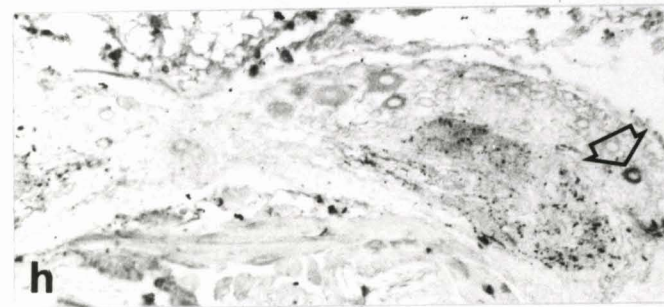
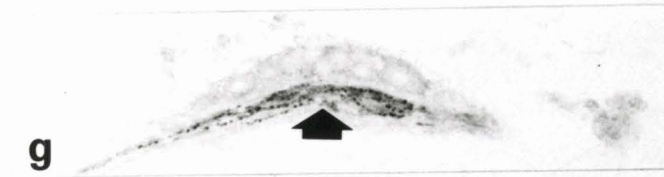
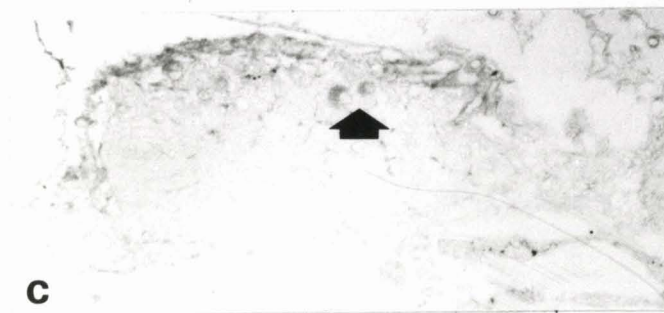
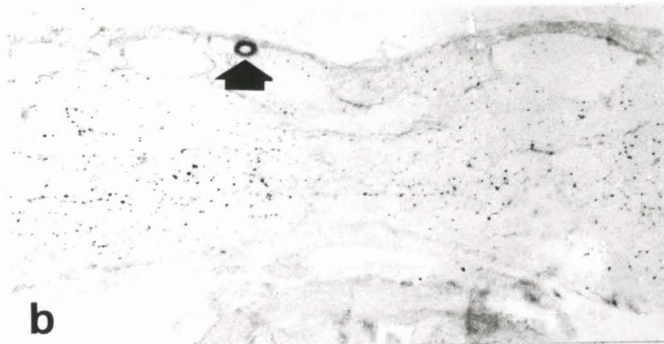


PLANCHE VI

---

Immunoréactivité anti-somatolibérine.

Fig. a : médulla, petites cellules (flèche). x 140.

Fig. b : protocérébron, région antérieure, *nervi corporis cardiaci* (nccI) (flèche). x 140.

Fig. c : tritocérébron, petites cellules latéro-ventrales (flèche). x 140.

Fig. d : protocérébron, région postérieure ; grandes cellules dorsales piriformes (flèche) et petite cellule latéro-dorsale (flèche évidée). x 140.

Fig. e ; ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; petites cellules médio-dorsales (flèche) et médio-ventrales (flèche évidée). x 140.

Fig. f : protocérébron, région postérieure ; cellules dorsales piriformes (flèche), latéro-dorsales (flèche évidée) et latérale (pointe de flèche). x 140.

Fig. g : ganglion sous-oesophagien, région médiane ; cellule médio-ventrale impaire (flèche). x 110.

Fig. h : protocérébron, région postérieure ; cellules dorsales piriformes (flèche) et paramédiane (flèche évidée). x 150.

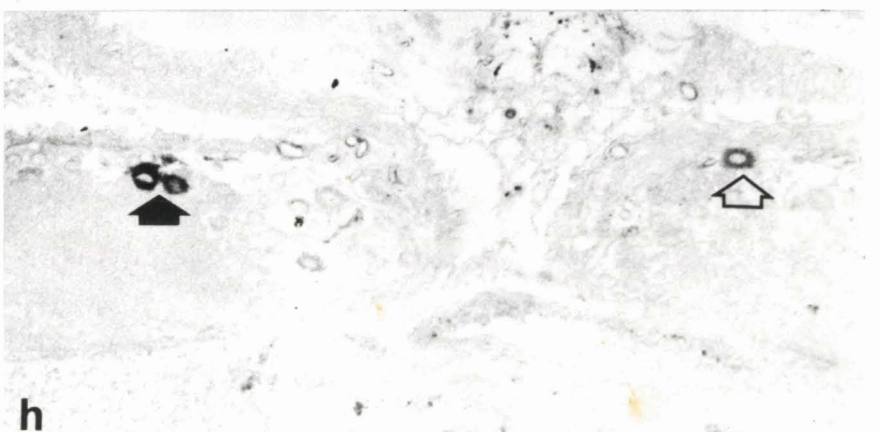
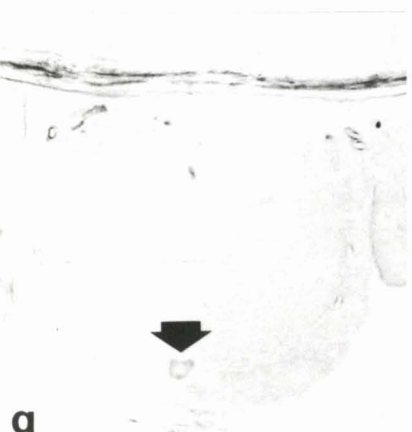
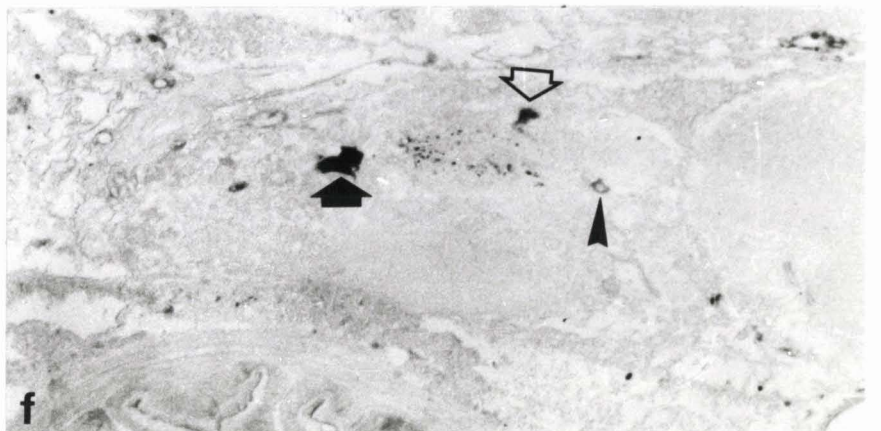
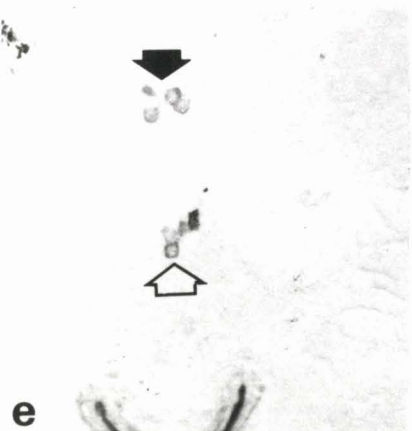
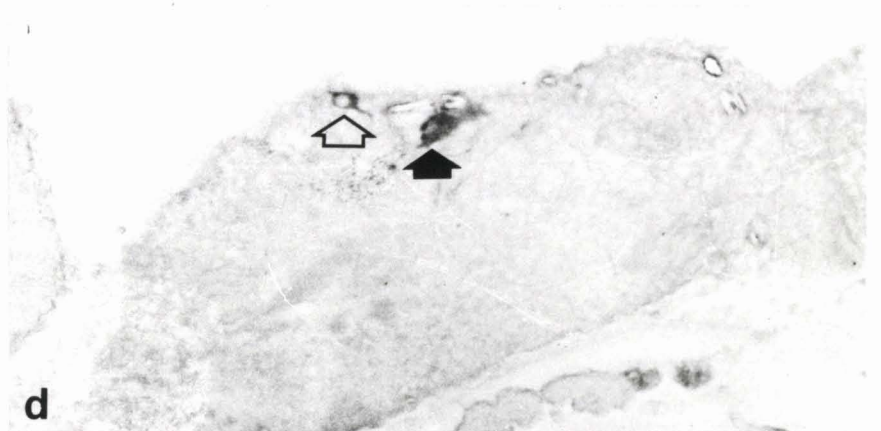
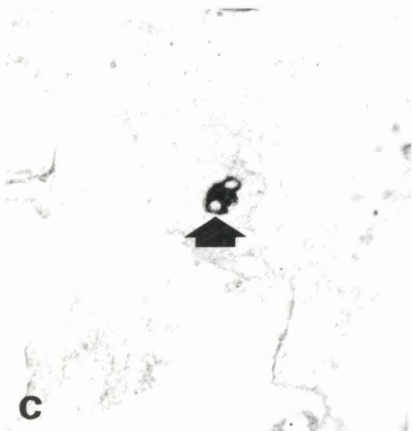
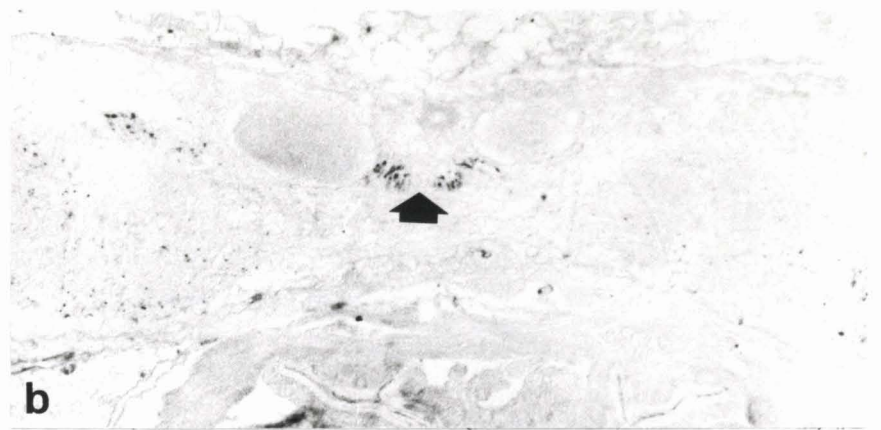
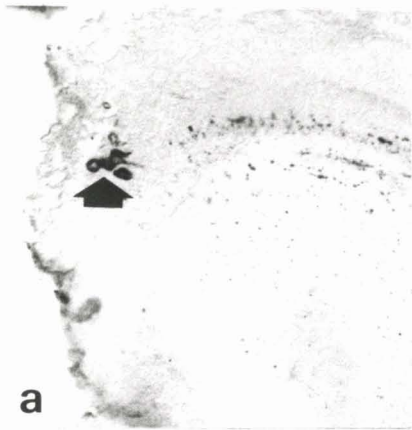


PLANCHE VII

Immunoréactivités anti-GRP (figs. a-e) et -substance P (figs. f et g).

Fig. a : protocérébron, région antérieure; grande cellule sagittale (flèche évidée). x 120.

Fig. b : protocérébron, région postérieure; petite cellule latérale (flèche évidée). x 110.

Fig. c : protocérébron, région postérieure, fibres nerveuses. x 280.

Fig. d : tritocérébron, fibres nerveuses. x 110.

Fig. e : ganglion sous-oesophagien, fibres nerveuses. x 110.

Fig. f : protocérébron, région postérieure, fibres nerveuses. x 300.

Fig. g : corps cardiaque (c.c.). x 110.

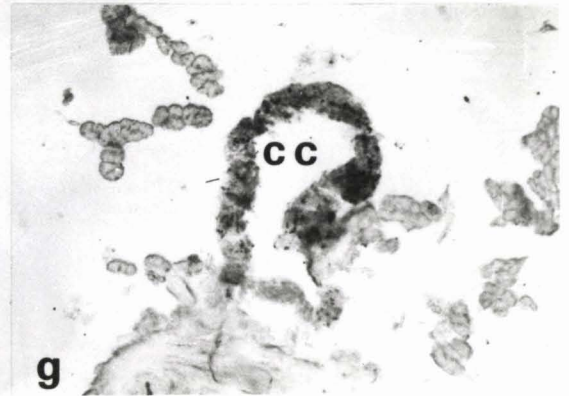
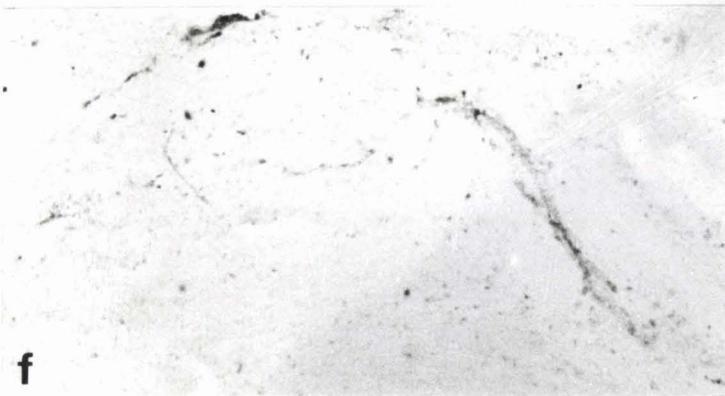
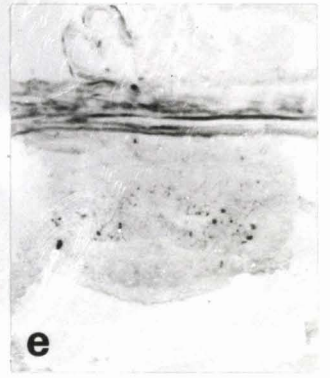
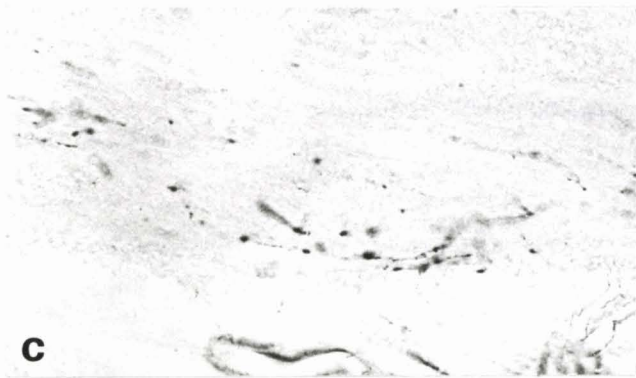




PLANCHE VIII

---

Immunoréactivités anti-leucine-enképhaline (figs. a-e) et -méthionine-enképhaline (figs. f-j).

Fig. a : protocérébron-lobe optique, région antérieure ; cellule innervant la médulla (flèche) et cellules à la limite du protocérébron et du lobe optique (flèche évidée). x 110.

Fig. b : protocérébron, région antérieure ; cellule paramédiane protocérébrale (flèche) et cellule (flèche évidée) innervant la médulla. x 110.

Fig. c : protocérébron, région antérieure ; cellules sagittales (flèche). x 110.

Fig. d : protocérébron, région postérieure ; cellules latéro-dorsale (flèche), centrale (flèche évidée) et latéro-ventrale (pointe de flèche) (c.c. : corps cardiaque). x 110.

Figs. e et f : protocérébron, région postérieure, coupes adjacentes ; cellules paramédiane (flèche), latéro-dorsale (flèche évidée), latéro-ventrale (pointe de flèche) et latérale (flèche courbe). x 110.

Figs. g et h : ganglion sous-oesophagien, région antérieure, coupes adjacentes ; cellule latéro-ventrale (flèches). x 110.

Fig. g : sérum anti-méthionine-enképhaline.

Fig. h : sérum anti-méthionine-enképhaline saturé par la leucine-enképhaline.

Figs. i et j : corps cardiaque , coupes adjacentes. x 110.

Fig. i : sérum anti-méthionine-enképhaline.

Fig. j : sérum anti-méthionine-enképhaline saturé par la leucine-enképhaline.

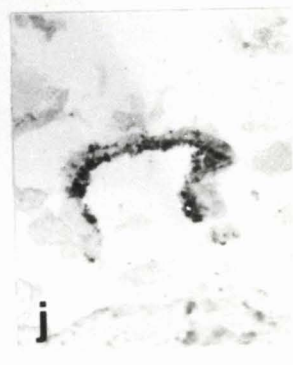
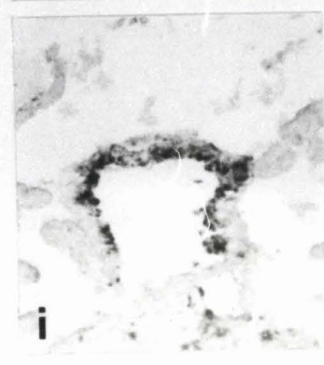
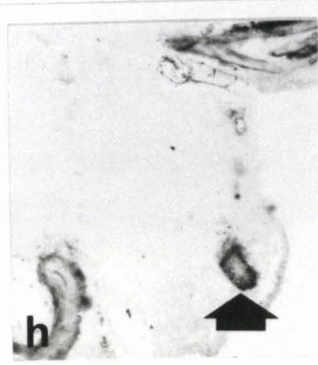
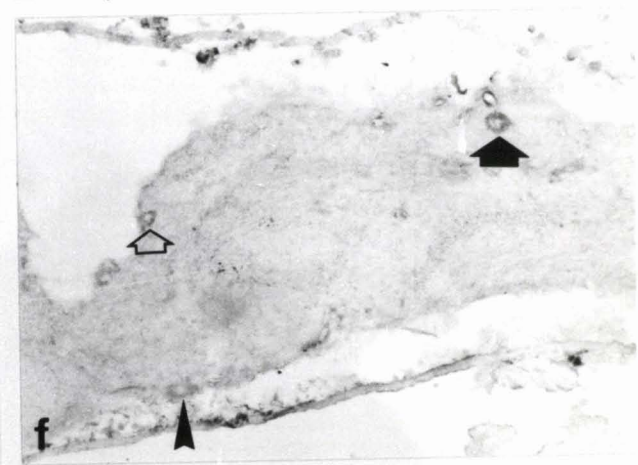
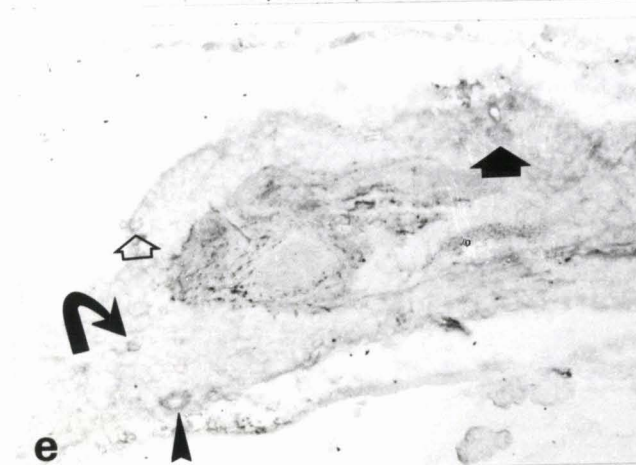
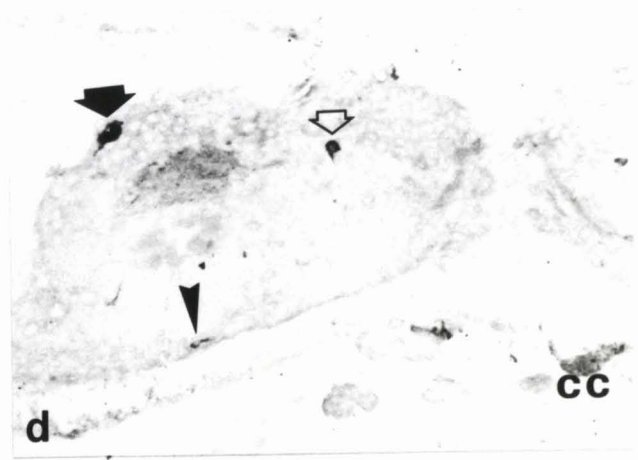
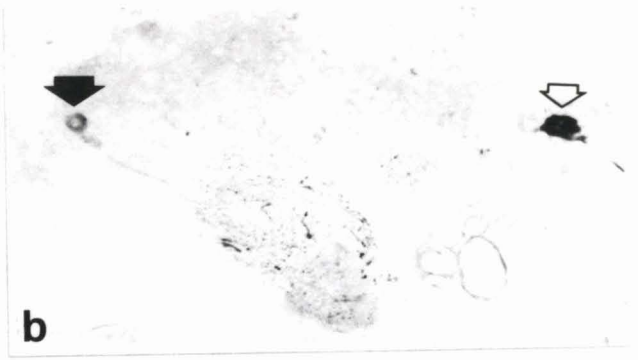
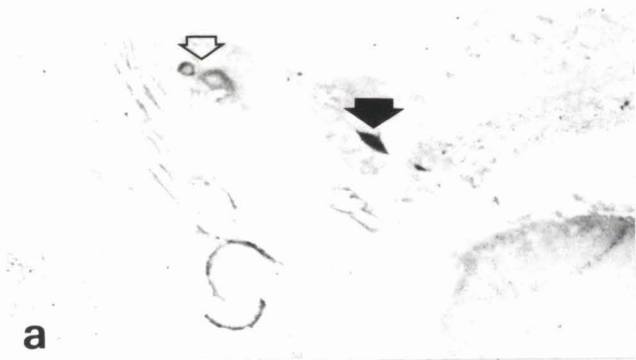


PLANCHE IX

Immunoréactivités anti-leucine-enképhaline (figs. a, c, e et f),  
-méthionine-enképhaline (figs. b et d), -dynorphine (Fig. g) et - $\alpha$ -néo-endorphine  
(figs. h et i).

Fig. a : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; petites cellules ventrales  
(flèches). x 110.

Figs. b et c : ganglion sous-oesophagien, région antérieure, coupes adjacentes ;  
grande cellule latéro-dorsale (flèche). x 100.

Figs. d et e : ganglion sous-oesophagien, région antérieure, coupes adjacentes ;  
grande cellule latéro-ventrale (flèche). x 100.

Fig. f : ganglion sous-oesophagien, région postérieure ; cellule latérale  
(flèche). x 110.

Fig. g : protocérébron, région postérieure ; cellules paramédianes (flèches)  
(c.c. : corps cardiaque ). x 110.

Figs. h et i : tritocérébron, coupes adjacentes ; cellules latérales (flèches). x 110

Fig. h : sérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine.

Fig. i : sérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine saturé par la leucine-enképhaline.

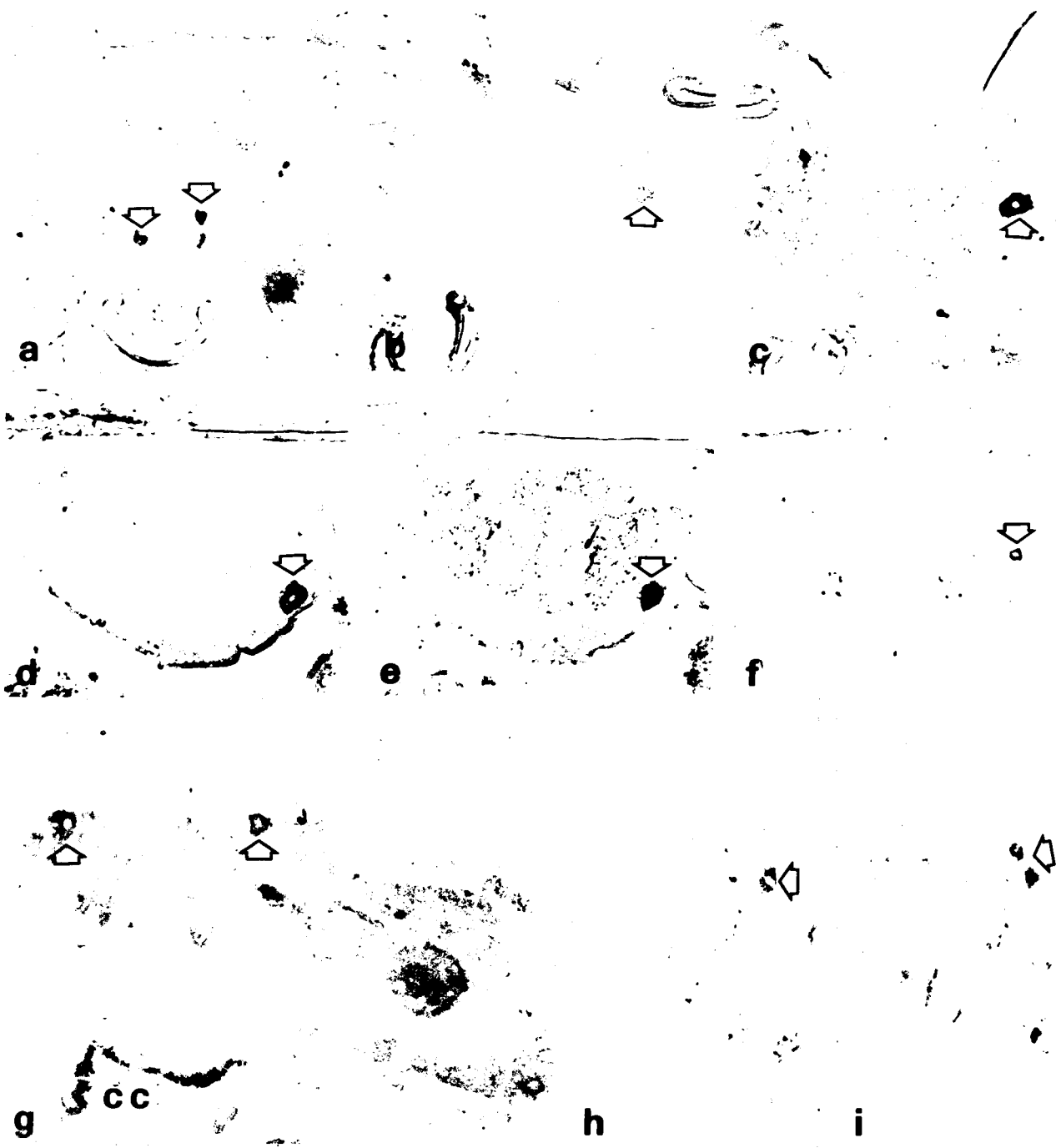


PLANCHE X

Immunoréactivité anti- $\alpha$ -néo-endorphine.

- Fig. a : ganglion frontal (g.f.) et tritocérébron (t.), région antérieure ; grandes cellules du ganglion frontal et petites cellules du tritocérébron. x 90.
- Fig. b : protocérébron, région antérieure ; cellules paramédianes (flèche) et très petites cellules dorsales (flèche évidée). x 100.
- Fig. c : ganglion frontal, région postérieure ; cellules immunoréactives (flèche). x 100.
- Fig. d : protocérébron et lobe optique droit ; cellules innervant la médulla (flèche). x 100.
- Fig. e : protocérébron, région postérieure ; cellules paramédianes (flèches), dorsale (flèche courbe), latéro-dorsales (flèche évidée) et latérale (pointe de flèche). x 120.
- Fig. f : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; cellules médio-ventrales (pointes de flèche), médio-dorsales (flèches évidées) et latéro-dorsale (flèche). x 120.
- Fig. g : protocérébron, région postérieure ; cellules paramédianes (flèches) et dorsales (flèches courbes) (c.c. : corps cardiaque). x 120.
- Fig. h : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; cellules latéro-dorsales (flèches) et médio-ventrales (pointes de flèches). x 120.
- Fig. i : protocérébron, région postérieure ; cellules ventrales (flèches évidées) et dorsales (flèches courbes). x 120.
- Fig. j : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; cellules dorsale (flèche) et latéro-dorsales (flèches évidées). x 120.

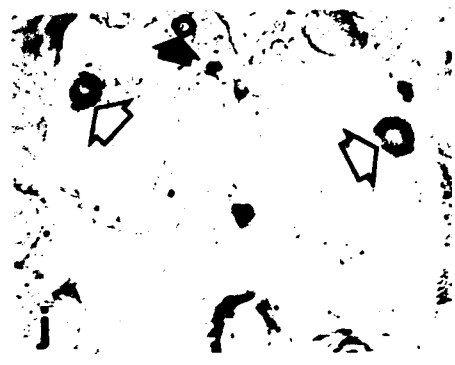
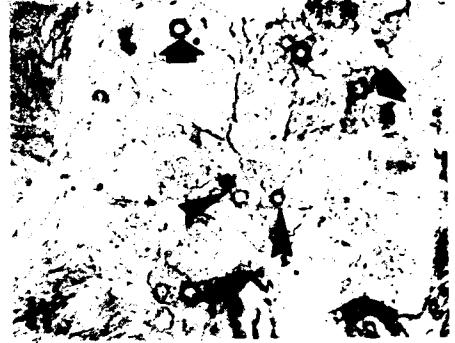
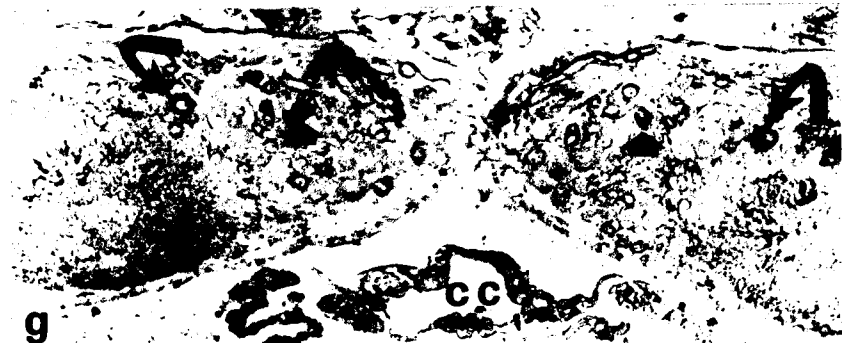
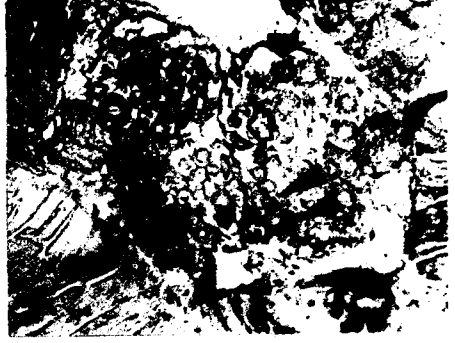
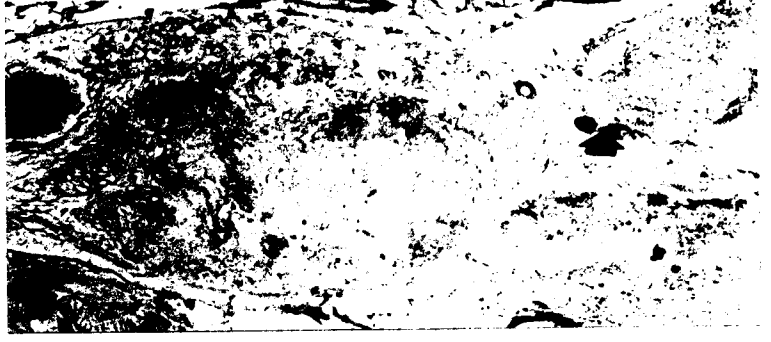
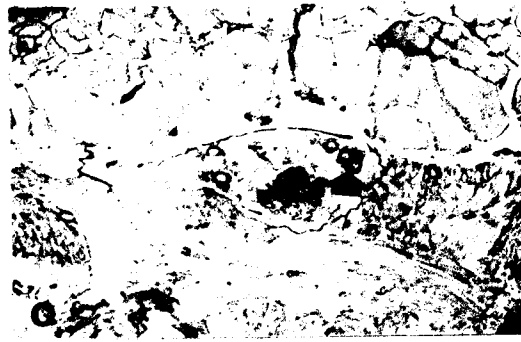
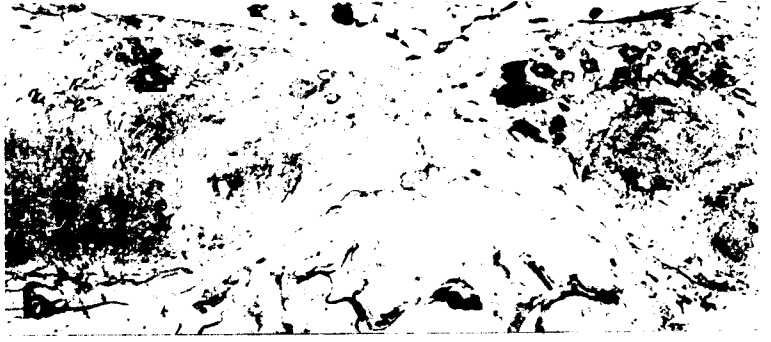


PLANCHE XI

Immunoréactivité anti-proctoline.

Fig. a : tritocérébron, petite cellule dorsale (flèche). x 110.

Fig. b : lobe optique droit, médulla (m.) et lobula (l.) ; cellule (flèche) innervant la médulla. x 120.

Fig. c : protocérébron, région postérieure ; cellules paramédianes dorsales (flèche). x 100.

Fig. d : protocérébron, région postérieure ; cellule latéro-dorsale (flèche). x 110.

Fig. e : corps cardiaque . x 120.

Fig. f : ganglion sous-oesophagien, région médiane. x 110.







PLANCHE XII

---

Immunoréactivité anti-sérotonine.

Fig. a : lobe optique gauche, médulla (m.) comprenant 6 couches de fibres nerveuses et lobula (l.) ; cellule latérale (flèche) innervant la médulla. x 140.

Fig. b : ganglion frontal, région antérieure. x 140.

Fig. c : lobe optique droit, médulla (m.) comprenant 6 strates de fibres nerveuses et lobula (l.) ; nombreuses petites cellules (flèche) innervant la médulla. x 140.

Fig. d : protocérébron, région postérieure ; cellules parasagittales (flèches). x 140

Fig. e : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; cellules latéro-dorsales (flèches). x 140.

Fig. f : protocérébron, région postérieure ; cellules latéro-dorsales (flèche). x 140

Fig. g : ganglion sous-oesophagien, région médiane ; petites cellules médio-ventrales (flèches). x 140.



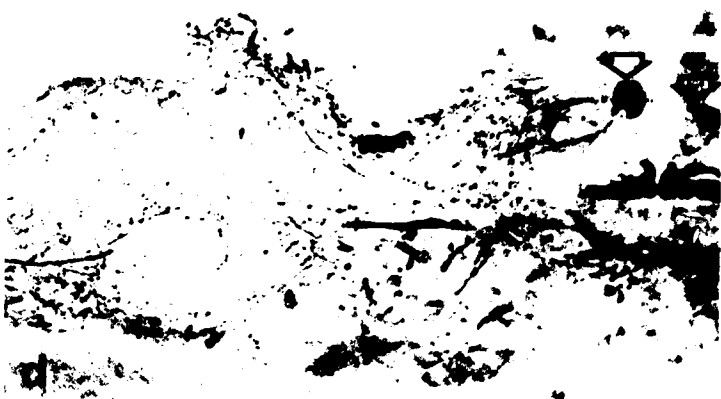
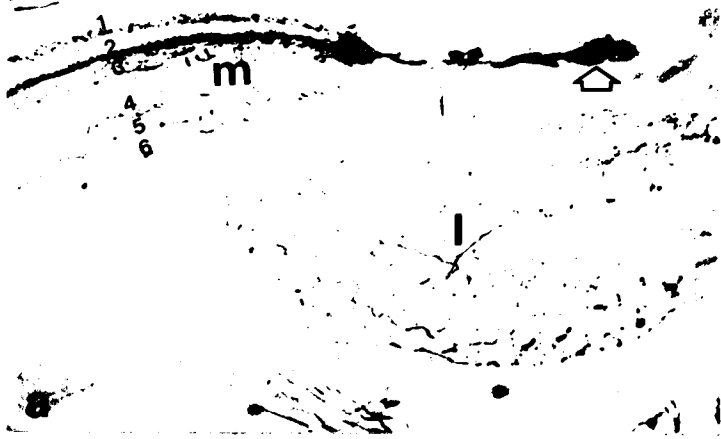


PLANCHE XIII

---

Immunoréactivités anti-hpGRF/-VIP révélées sur coupes adjacentes, à congélation (figs. a-d) ou à paraffine (figs. e-g).

Figs. a et b : protocérébron, région postérieure ; immunoréactivités anti-VIP (fig. a) et -hpGRF (fig. b) des cellules paramédianes dorsales (flèches évidées). x 110.

Figs. c et d : protocérébron, région postérieure ; immunoréactivités anti-VIP (fig. c) et -hpGRF (fig. d) des cellules piriformes dorsales (flèches évidées). x 110.

Figs. e-g : protocérébron, région postérieure ; immunoréactivités anti-VIP (figs. e et g) et -hpGRF (fig. b) des cellules piriformes dorsales (flèches évidées).. x 80.



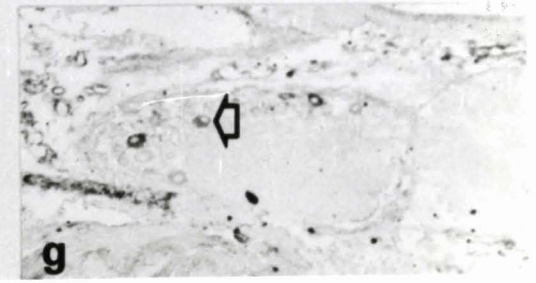
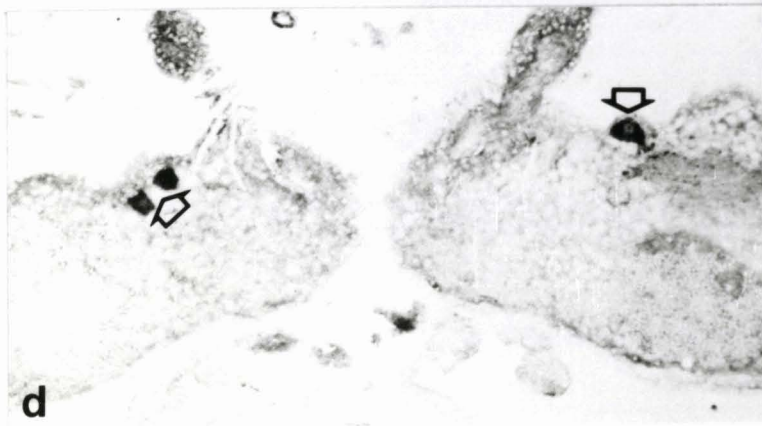
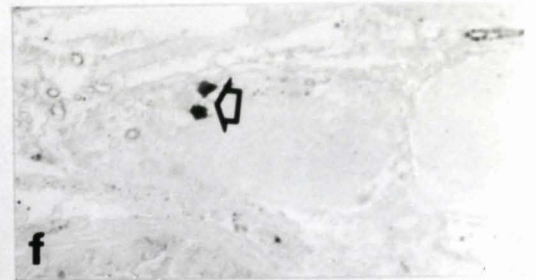
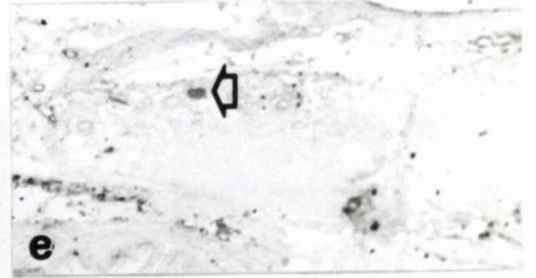
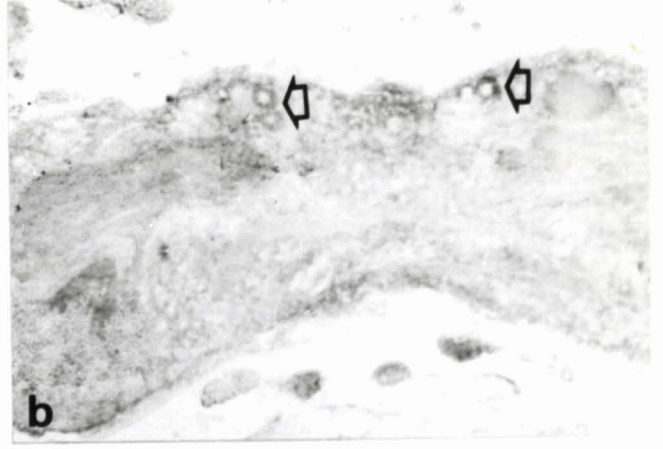
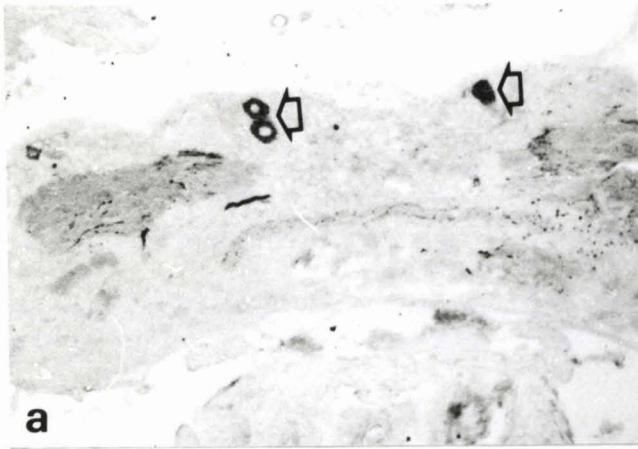


PLANCHE XIV

Immunoréactivités anti-CCK-8 NS/-hpGRF et anti-CCK-8 NS/-VIP révélées sur coupes adjacentes.

Figs. a et b : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; immunoréactivités anti-CCK-8 NS (fig. a) et -hpGRF (fig. b) de petites cellules médio-dorsales (flèches) et médio-ventrales (flèches évidées). x 90.

Figs. c et d : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; marquage (flèches évidées) après incubation avec le sérum anti-hpGRF saturé (fig. d) ou non (fig. c) avec un excès de CCK-8 NS. x 90.

Figs. e et f : protocérébron, région postérieure ; immunoréactivités anti-CCK-8 NS (fig. e) et -hpGRF (fig. f) des cellules dorsales piriformes (flèches évidées). x 120.

Figs. g et h : protocérébron, région postérieure ; immunoréactivités anti-CCK-8 NS (fig. g) et -VIP (fig. h) des cellules paramédianes dorsales (flèches évidées), latéro-dorsales (flèches) et centrales (pointes de flèche). x 100.

Figs. i et j : tritocérébron ; immunoréactivités anti-CCK-8 NS (fig. i) et -VIP (fig. j) de petites cellules latéro-ventrales (flèches évidées). x 150.



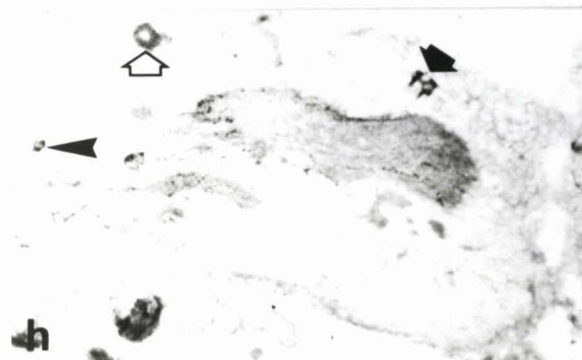
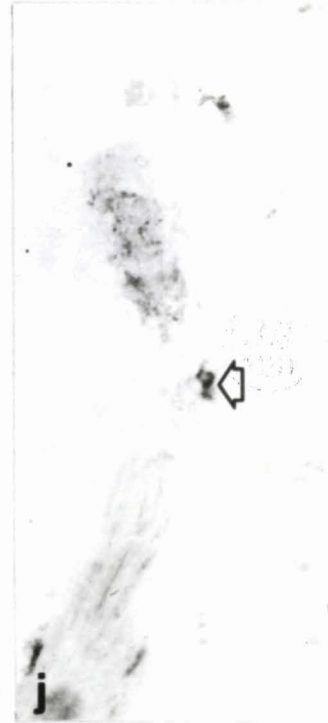
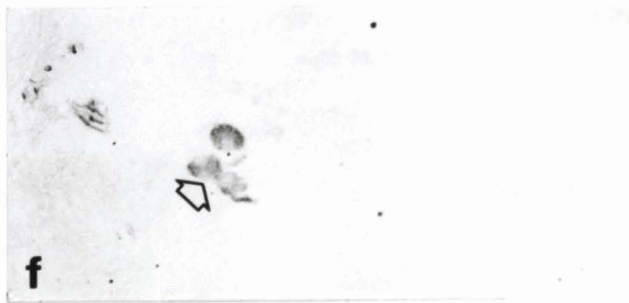
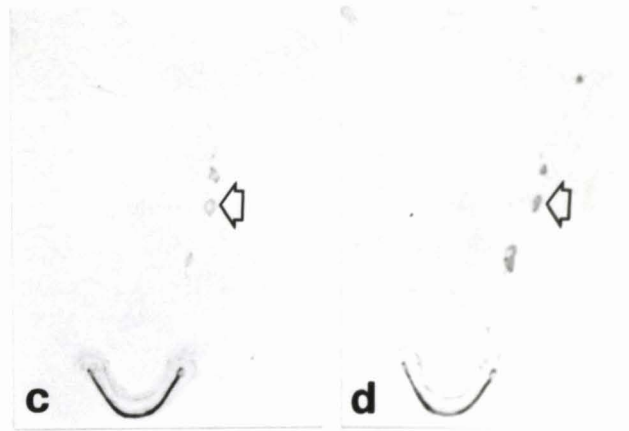
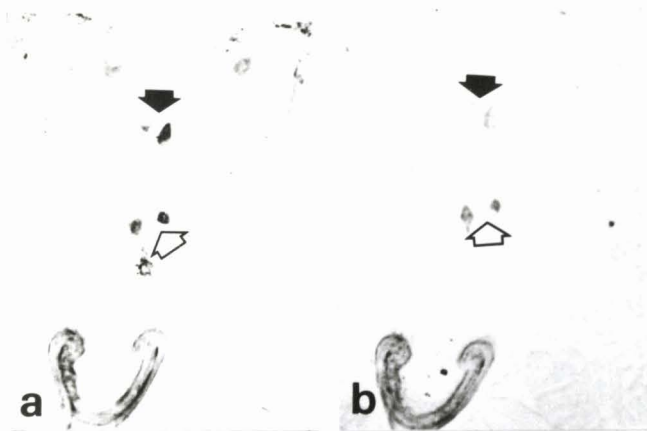


PLANCHE XV

Immunoréactivités anti-motiline/-hpGRF, anti-motiline/-leu-enképhaline et anti-CCK-8 NS/-GRP révélées sur coupes adjacentes.

Figs. a et b : protocérébron, région postérieure ; immunoréactivités anti-motiline (fig. a) et -hpGRF (fig. b) d'une cellule dorsale piriforme (flèches). x 110.

Figs. c et d : ganglion sous-oesophagien, région médiane ; immunoréactivités anti-motiline (fig. c) et -hpGRF (fig. d) d'une cellule ventrale sagittale (flèches). x 110.

Figs. f et g : ganglion sous-oesophagien, région postérieure ; immunoréactivités anti-motiline (fig. f) et -hpGRF (fig. g) d'une cellule latéro-ventrale (flèches). x 110.

Figs. e et h : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; immunoréactivités anti-motiline (fig. e) et -leu-enképhaline (fig. h) de cellules latéro-dorsales (flèches). x 110.

Figs. i et j : protocérébron, région antérieure ; immunoréactivités anti-CCK-8 NS (fig. i) et -GRP (fig. j) des cellules sagittales (flèches). x 110.







PLANCHE XVI

Immunoréactivités anti-leucine-enképhaline/-CCK-8 NS (figs. a-j) et anti-dynorphine/-CCK-8 NS (figs. k et l) révélées sur coupes adjacentes.

Figs. a et c : protocérébron, région antérieure et lobe optique droit. Cellules immunoréactives aux sérums anti-CCK-8 NS (fig. a) et -leu-enképhaline (fig. c) (flèches évidées) et au seul sérum anti-CCK-8 NS (flèches noires). x 110.

Figs. b et d : lobe optique droit; cellules immunoréactives aux sérums anti-CCK-8 NS (fig. b) et -leu-enképhaline (fig. d) (flèches évidées) et aux seuls sérums anti-leu-enképhaline (flèche noire) ou -CCK-8 NS (pointe de flèche). x 110.

Figs. e et h : protocérébron, région postérieure ; immunoréactivité aux sérums anti-CCK-8 NS (fig. e) et -leu-enképhaline (fig. h) (flèches). x 110.

Figs. f et i : ganglion sous-oesophagien, région postérieure ; immunoréactivité aux sérums anti-CCK-8 NS (fig. f) et anti-leucine-enképhaline (fig. i) (flèches). x 110.

Figs. g et j : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; immunoréactivités aux sérums anti-CCK-8 NS (fig. g) et -leu-enképhaline (fig. j) (flèches évidées), au seul sérum anti-leu-enképhaline (flèche noire). x 110.

Figs. k et l : protocérébron, région postérieure ; immunoréactivités aux sérums anti-CCK-8 NS (fig. k) et -dynorphine (fig. l) (flèches). x 110.



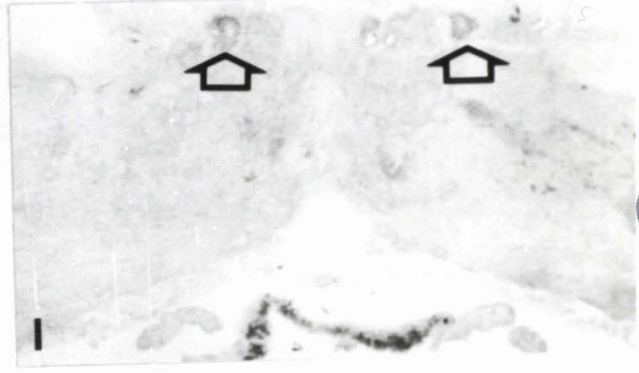
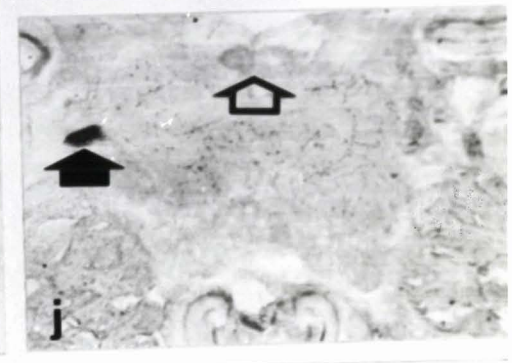
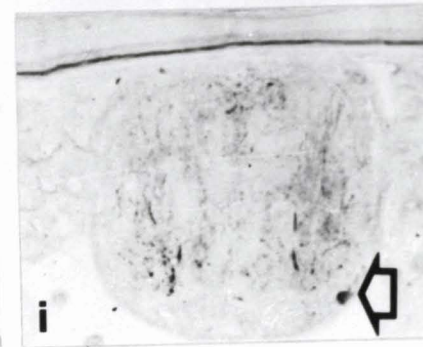
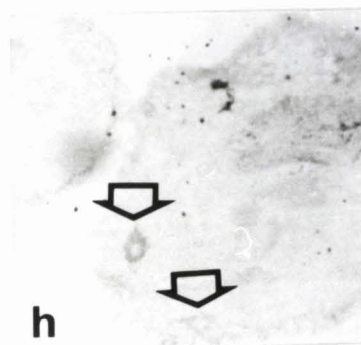
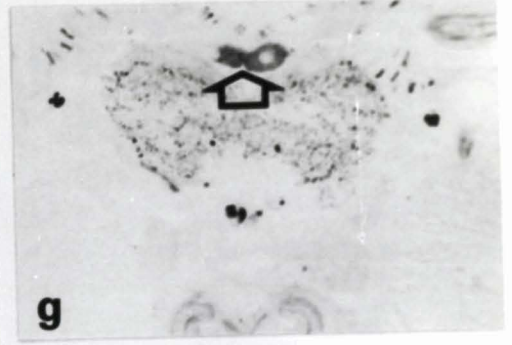
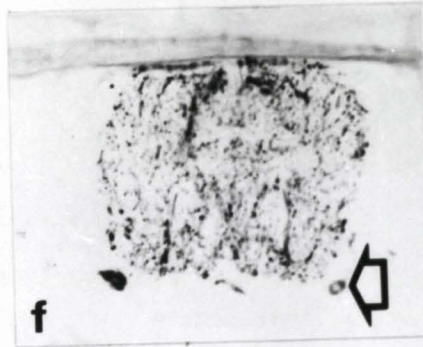
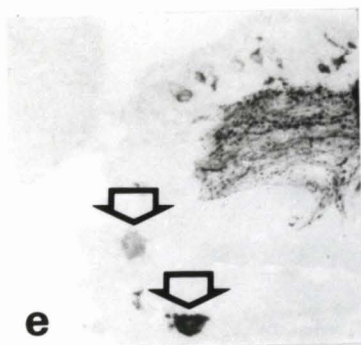
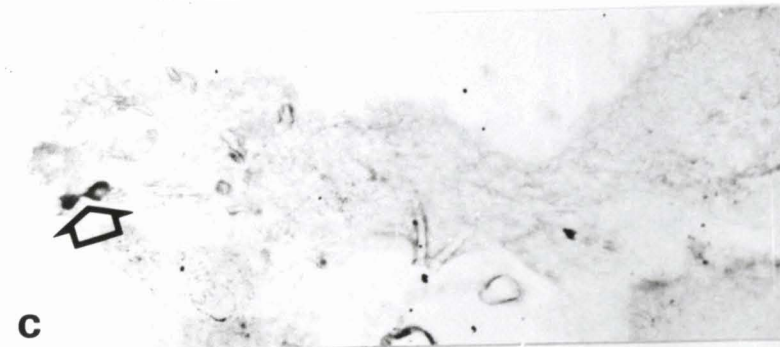
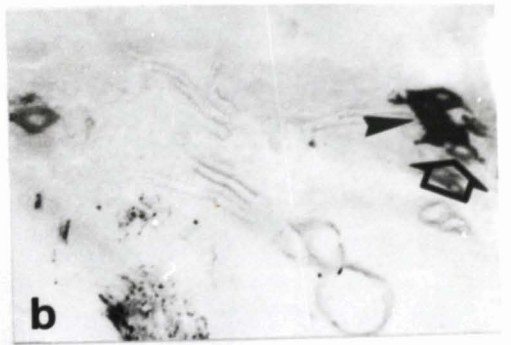
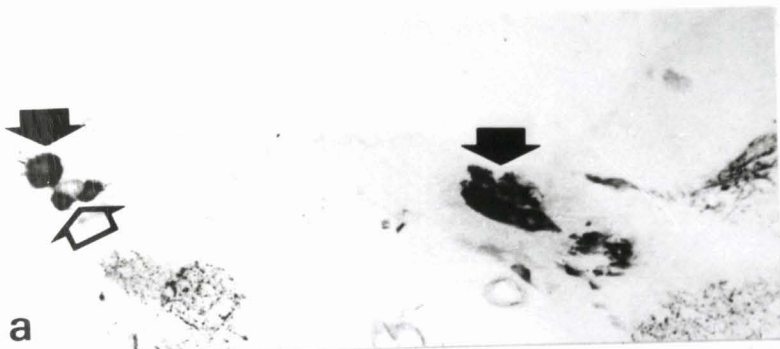


PLANCHE XVII

Immunoréactivités anti- $\alpha$ -néo-endorphine (figs. a, b, e, f, i et k) et -CCK-8 NS (figs. c, d, g, h et j) mises en évidence sur coupes adjacentes.

Figs. a et c : protocérébron et lobe optique gauche ; cellules innervant les lobes optiques réagissant aux sérums anti- $\alpha$ -néo-endorphine (fig. a) et -CCK-8 NS (fig. c) (flèches). x 110.

Figs. b et d : protocérébron, région postérieure ; cellule latérale (flèches) et latéro-dorsale (pointes de flèche) réagissant aux sérums anti- $\alpha$ -néo-endorphine (fig. b) et -CCK-8 NS (fig. d). x 110.

Figs. e et g : protocérébron, *pars intercerebralis* (p.i.); cellules paramédianes (flèches) réagissant aux sérums anti- $\alpha$ -néo-endorphine (fig. e) et -CCK-8 NS (fig. g). x 110.

Figs. f et h : ganglion sous-oesophagien, cellule latéro-ventrale (flèche) réagissant au sérum anti- $\alpha$ -néo-endorphine (fig. f) et non au sérum anti-CCK-8 NS (fig. h). x 90.

Figs. i-k : protocérébron, région postérieure; cellules dorsales (flèches) et ventrale (pointe de flèche) réagissant aux sérums anti- $\alpha$ -néo-endorphine (figs. i et k) et -CCK-8 NS (fig. j). x 90.



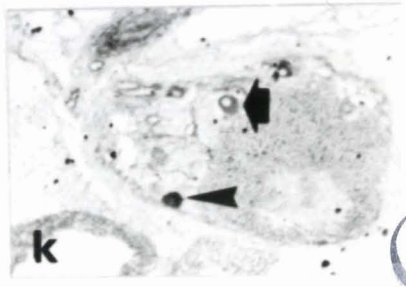
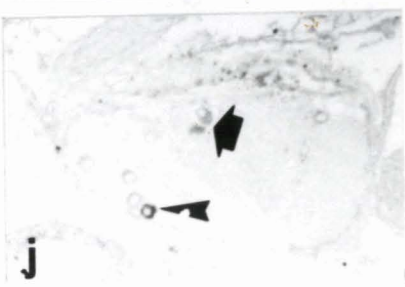
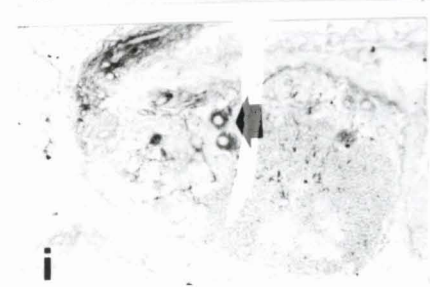
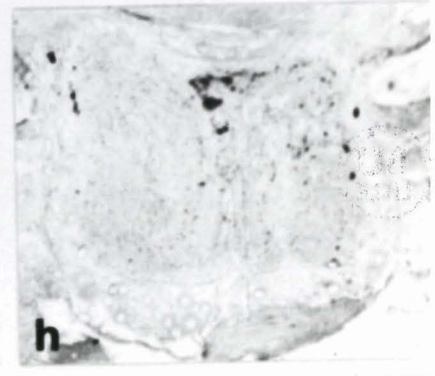
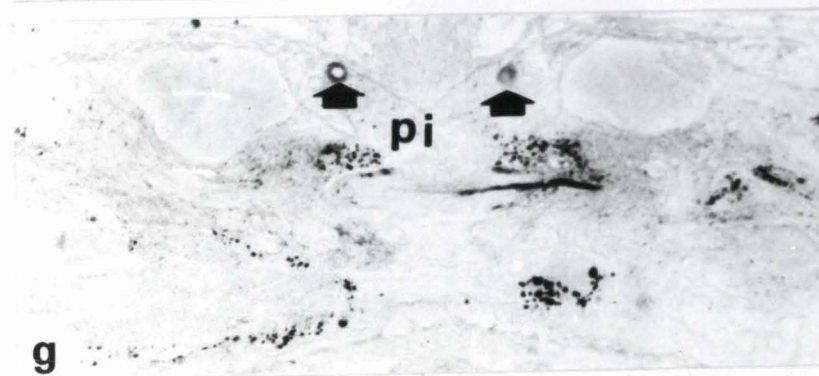
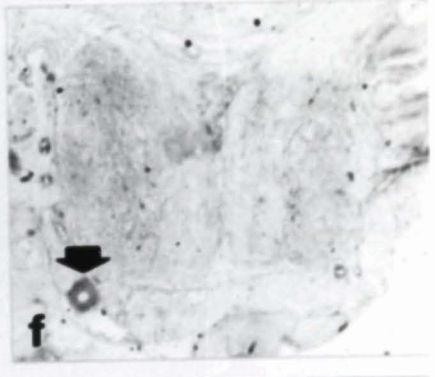
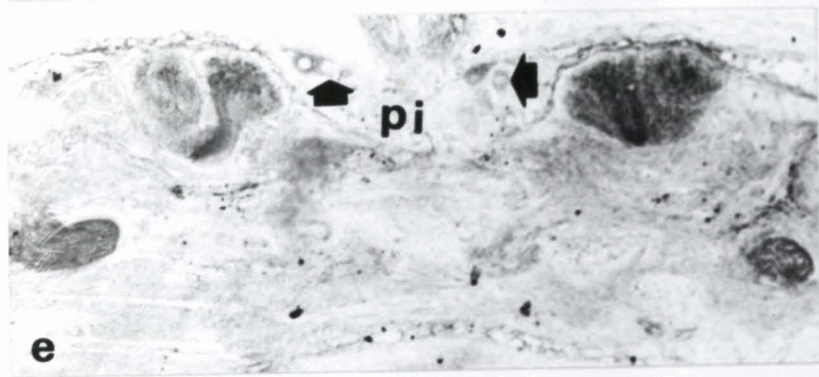
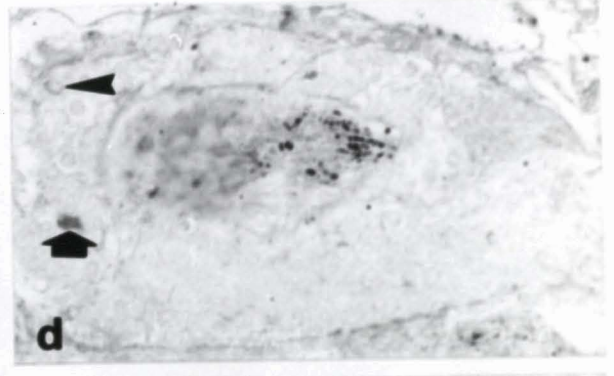
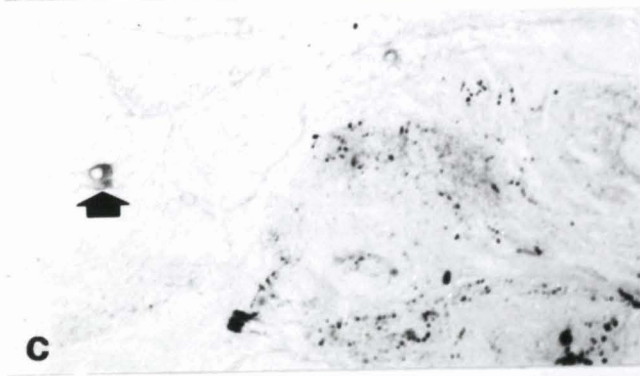
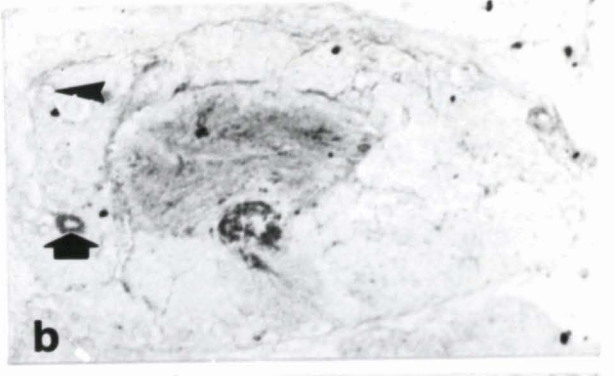
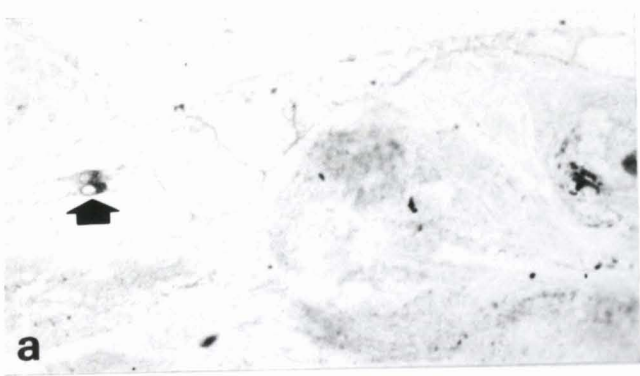


PLANCHE XVIII

Immunoréactivités anti-proctoline (figs. a et c) et -CCK-8 NS (figs. b et d) mises en évidence sur coupes adjacentes.

Figs. a et b : protocérébron, région postérieure ; cellule paramédiane réagissant aux sérums anti-proctoline (fig. a) et -CCK-8 NS (fig. b) (flèches évidées). x 110.

Figs. c et d : protocérébron, région postérieure ; cellule dorsale réagissant aux sérums anti-proctoline (fig. c) et -CCK-8 NS (fig. d) (flèches évidées). x 110.



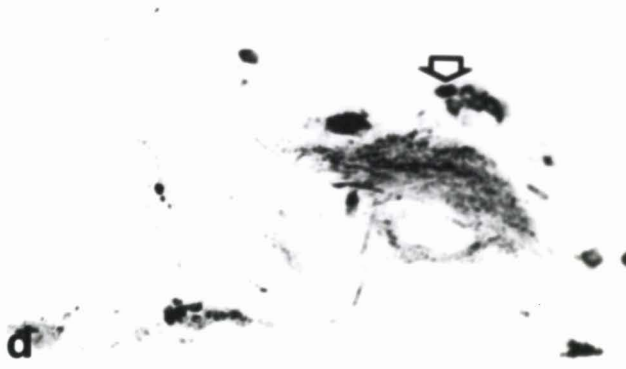
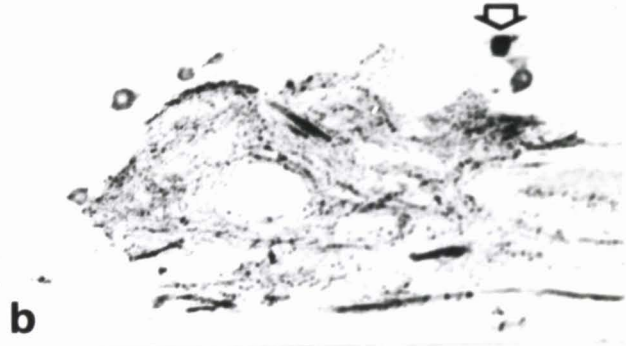


PLANCHE XIX

Immunoréactivités anti-sérotonine (figs. b, e, g) et -CCK-8 NS (figs. a, c, d, f et h) mises en évidence sur coupes adjacentes.

Figs. a-c : ganglion frontal ; cellules immunoréactives aux sérums anti-CCK-8 NS (figs. a et c) et -sérotonine (fig. b). x 300.

Figs. d et e : lobe optique droit ; cellules immunoréactives (flèches) aux sérums anti-CCK-8 NS (fig. d) et -5-HT (fig. e), innervant la médulla (m.) (l. : lobula). x 140.

Figs. f-h : ganglion sous-oesophagien, région antérieure ; cellules latéro-dorsales réagissant aux sérums anti-CCK-8 NS (figs. f et h) et -5-HT (fig. g) (flèches). x 120.

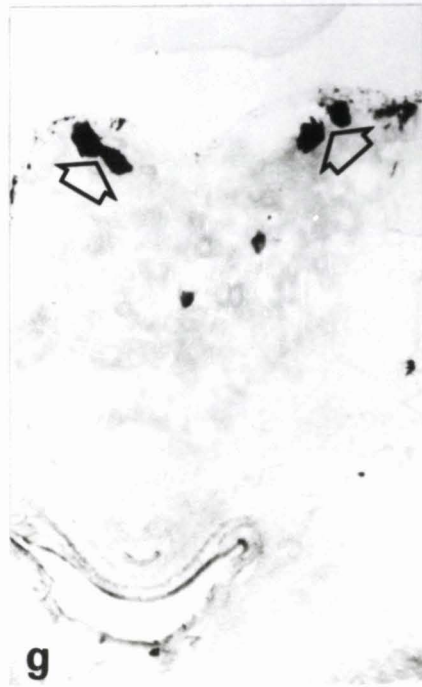
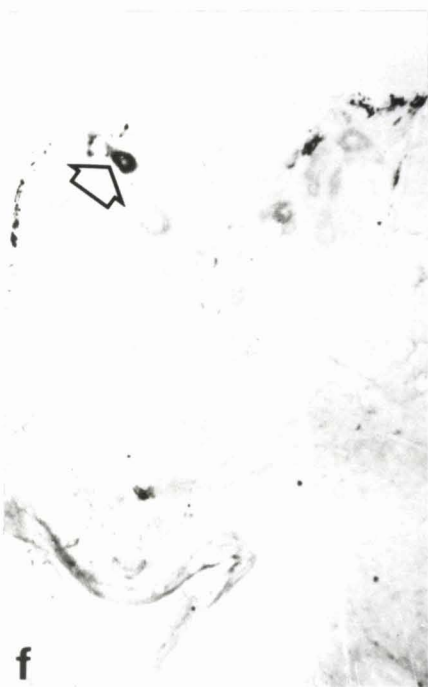
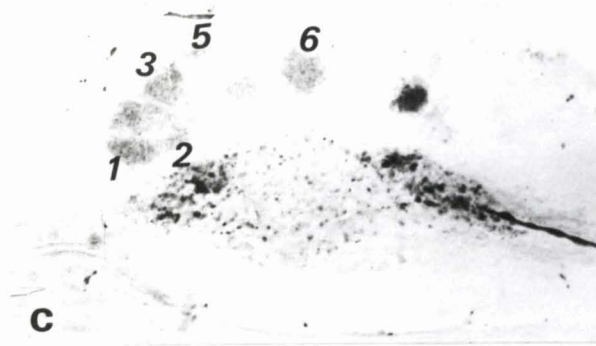
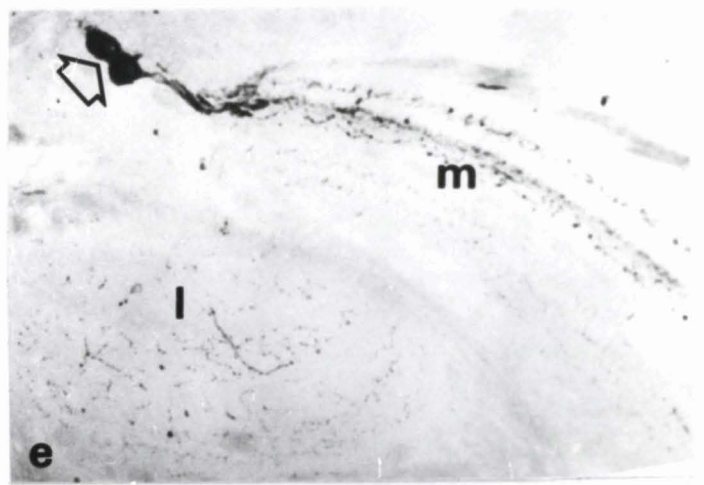
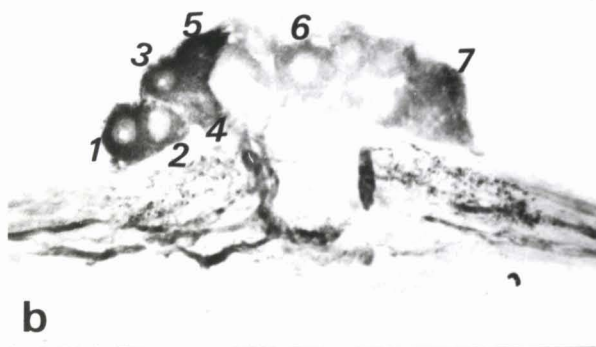
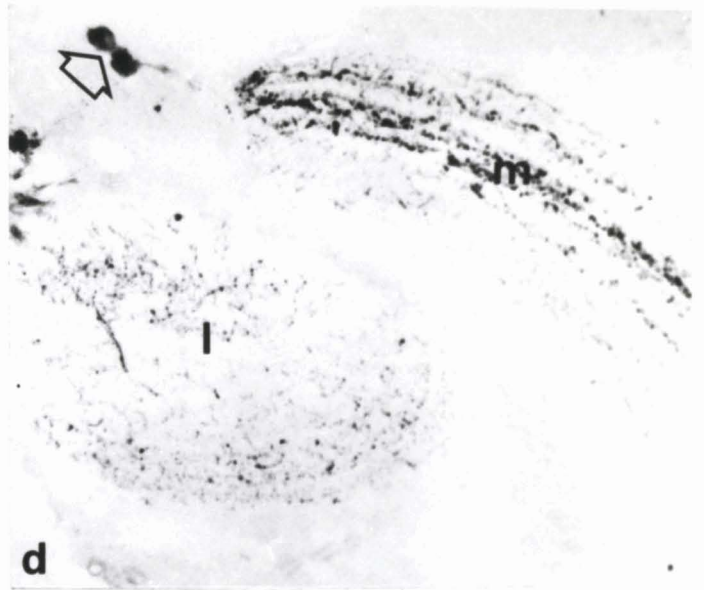
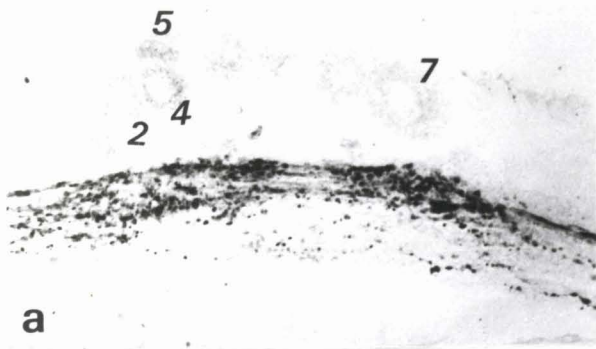




PLANCHE XX

Relations cerveau-corps cardiaque mises en évidence par l'injection de peroxydase dans le corps cardiaque .

Figs. a-d : protocérébron, région postérieure ; coupes sériées ; mise en évidence successive des nerfs se rendant aux corps cardiaques (figs. a et b) (flèches évidées) et de petites cellules latéro-dorsales (figs. b-d) (flèches évidées). x 110.

Fig. e : protocérébron, région postérieure ; démonstration de deux groupes symétriques de cellules marquées (flèches évidées) (c.c. : corps cardiaque ). x 180.

