

50376
1989
185

50376
1989
185

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE-FLANDRES-ARTOIS

n° d'ordre : H1H

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

en

~~BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES~~
Sciences de la Vie et de la Santé

par

Annick DELAIRE HESDIN

**PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE DES
NEUROSECRETIONS DU CERVEAU DE *NEREIS VIRENS* :
PURIFICATION DES NEUROPEPTIDES RECONNUS ET
IDENTIFICATION DES CELLULES CONCERNEES**



Soutenue le 22 septembre 1989, devant la commission d'examen :

- Président : M. Porchet, Professeur à l'Université de Lille-Flandres-Artois
Rapporteurs : G. Tramu, Professeur à l'Université de Bordeaux I
D. Zachary, Professeur à l'Université de Strasbourg
Examineurs : N. Dhainaut-Courtois, Professeur à l'Université de Lille-Flandres-Artois
C. Auriault, Directeur de Recherches à l'Institut Pasteur de Lille

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'Endocrinologie Comparée des Invertébrés, unité associée au CNRS n°148 sous la direction de Monsieur le Professeur Maurice Porchet, en collaboration avec les Docteurs Philippe Bulet, et Eliane Porchet-Henneré.

Je dédie ce mémoire

à Pierre,
à ma famille.

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
I - Rappels sur l'anatomie et la biologie de la Néréis	3
II - Premiers travaux d'ordre biochimique réalisés chez les Annélides Polychètes	4
III - Influence du cerveau sur la gamétogenèse	4
A - Mise en évidence de l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens	4
1 - <i>Evolution de l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens</i>	5
2 - <i>Régulation de l'activité endocrine cérébrale en fonction de l'état génital</i>	5
a - Les facteurs externes de la régulation	5
b - Les facteurs internes de la régulation	5
B - Etude biochimique de l'ovogenèse chez les Néréidiens	6
1 - <i>Choix du matériel biologique</i>	6
2 - <i>Rappels sur le processus de l'ovogenèse</i>	7
3 - <i>Dosage biochimique global des constituants cellulaires</i>	8
C - Evolution des composés glucidiques pendant l'ovogenèse	8
1 - <i>Ovogenèse naturelle</i>	8
a - Fraction micromoléculaire	9
b - Fraction macromoléculaire	9
2 - <i>Ovogenèse expérimentale</i>	9
3 - <i>Evolution des composés glucidiques du liquide coelomique</i>	10
4 - <i>Enzymes impliquées dans la biosynthèse des glycoconjugués</i>	10

	Page
D - Evolution des composés lipidiques pendant l'ovogenèse	11
E - Evolution des composés protéiques des ovocytes au cours de l'ovogenèse	12
F - Conclusion	14
G - Etude de la spermatogenèse chez les Néréidiens	14
IV - Travaux biochimiques réalisés sur le cerveau des Néréidiens	15
A - Purification de peptides apparentés à des peptides de Vertébrés	15
B - Etude des précurseurs de neuropeptides apparentés à des peptides de Vertébrés	16
C - Purification de la neurohormone inhibitrice de la spermatogenèse	16
V - Objectifs de notre travail	16
MATERIEL ET METHODES	19
I - Matériel biologique	19
II - Préparation des fractions antigéniques	19
A - Homogénats de cerveaux	19
B - Sécrétions cérébrales	19
1 - <i>Mise en culture des prostomiums</i>	19
2 - <i>Chromatographie sur Biogel P₂ du milieu de sécrétion</i>	20
3 - <i>Préparation de l'échantillon pour l'injection en chromatographie liquide à haute performance</i>	20
4 - <i>Purification par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse</i>	21
C - Test biologique	21

	Page
III - Production des anticorps monoclonaux	22
A - Protocole d'immunisation	22
B - Préparation des cellules nourricières	22
C - Obtention des lymphocytes	23
D - Préparation des myélomes	23
E - La fusion cellulaire	23
F - Sélection des cellules hybrides	24
G - Détection des cellules ayant une sécrétion immunoréactive	24
H - Expansion des cultures à sécrétion positive	24
I - Congélation	25
J - Clonage	25
IV - Sélection des hybridomes	25
A - Préparation des plaques pour les tests	25
B - Révélation de l'activité des surnageants de culture d'hybridomes	26
V - Techniques immunologiques	26
A - Immunohistologie	26
B - Coloration histologique	27
C - Détermination de la sous-classe de NV 24	28
D - Electrophorèse des protéines cérébrales en milieu dénaturant	28
E - Transfert des protéines séparées par électrophorèse sur une membrane Immobilon	29

	Page
RESULTATS ET DISCUSSION	31
I - Purification du facteur inhibiteur de la spermatogenèse	31
A - Résultats	31
B - Discussion	32
II - Production et sélection d'une sonde immunologique dirigée contre une neurosécrétion contenue dans la fraction biologiquement active	33
A - Résultats	33
B - Discussion	34
III - Identification de l'antigène reconnu par NV 24	35
A - Purification par RP-HPLC	35
B - Etude des molécules reconnues dans l'homogénat de cerveau total	36
C - Localisation des antigènes reconnus par NV 24 dans le système nerveux central de <i>Nereis virens</i>	36
1 - <i>Le cerveau</i>	36
2 - <i>La chaîne nerveuse</i>	37
D - Discussion	37
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES	40
BIBLIOGRAPHIE	45

INTRODUCTION

Dans l'évolution animale, les Annélides - auxquelles appartiennent les Néréidiens - sont situées à l'origine des Coelomates, dans la branche des Protostomes qui a divergé très tôt de la branche des Deutérostomes conduisant aux Vertébrés.

C'est dire l'intérêt que revêt toute étude comparative entre les animaux des deux branches. Un des problèmes les plus passionnants est celui de la conservation des molécules tout au long de l'évolution : en particulier de nombreuses études récentes mettent en évidence des parentés frappantes entre les neuropeptides des Invertébrés mêmes les plus primitifs (tels que l'hydre) et ceux des Vertébrés.

De nombreux travaux expérimentaux ont montré la présence dans le système nerveux des Néréidiens d'hormones influençant des phénomènes biologiques essentiels tels que la reproduction, la croissance somatique et la régénération (voir les revues de Durchon, 1967; Golding et Whittle, 1977).

Par ailleurs, des investigations immunocytologiques réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre des neuropeptides de Vertébrés ont permis de détecter, dans le système nerveux de Néréis, l'existence de nombreuses molécules apparentées à ces substances (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985; 1986 ; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988).

La purification de ces neurosécrétions peut être effectuée en ayant recours à deux procédés de détection.

Le premier utilise les propriétés biologiques de la molécule à isoler. Il a déjà été employé avec succès lors de l'isolement de neuropeptides contrôlant la ponte chez l'aplysie (Scheller *et al.*, 1982) et chez la lymnée (Ebberink *et al.*, 1985). Il permet actuellement la purification du facteur inhibiteur de la spermatogenèse qui est détecté d'après son activité biologique *in vitro* sur des parapodes isolés (Bulet et Delaire Hesdin, 1988).

La seconde approche pour localiser les molécules au cours de leur purification, a recours aux dosages immunologiques. Ainsi des peptides appartenant à la famille des opioïdes chez le Mollusque *Mytilus edulis* (Leung et Stefano, 1984) et une molécule apparentée à la cholécystokinine chez le Crustacé *Palaemon serratus* (Favrel *et al.*, 1987) ont été détectés par voie immunologique lors de leur purification. Dans ces exemples précédents, les auteurs ont utilisé des sondes hétérologues (c'est-à-dire fabriquées contre des neuropeptides de Vertébrés pour détecter des molécules d'Invertébrés présentant un épitope commun).

Il nous a semblé intéressant d'employer comme réactif immunologique dans nos tests, lors des étapes de purification, des sondes homologues, en l'occurrence dirigées contre des molécules endogènes de Néréis. Nous espérons grâce à ce travail pouvoir mettre en évidence une ou des molécules jusqu'alors "ignorées" par les autres procédés de détection.

Nous avons alors décidé de tenter d'isoler une sonde dirigée contre une molécule dont nous connaissons parfaitement l'activité biologique : le facteur inhibiteur de la spermatogenèse (SIF) .

Après avoir situé notre travail dans le contexte des recherches menées dans le laboratoire, nous relaterons plus particulièrement nos travaux portant sur la purification du SIF, puis nous exposerons notre méthode de production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des neurosécrétions de Néréis. Nous décrirons ensuite les caractéristiques des molécules détectées que nous localiserons enfin dans le système nerveux .

GENERALITES

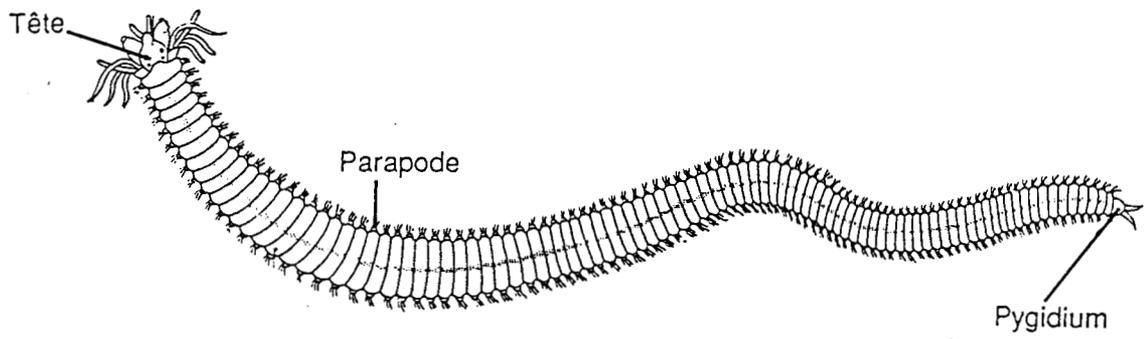


Figure 1a - Morphologie externe d'une Néréis, vue dorsale.

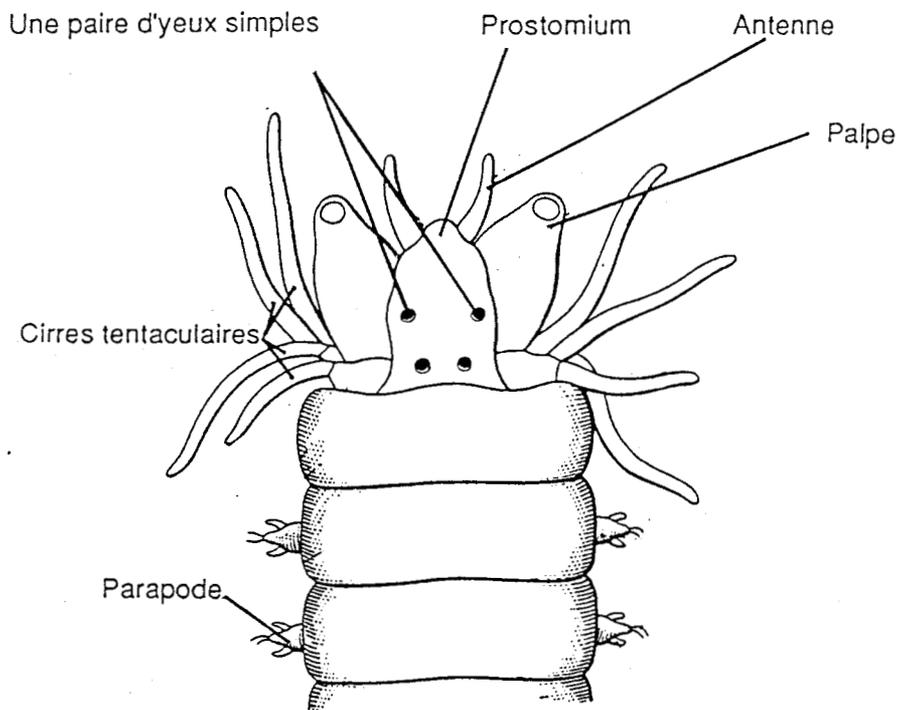


Figure 1b - Région antérieure d'une Néréis, vue dorsale.

I - Rappels sur l'anatomie et la biologie de la Néréis

Les Néréis sont des annélides polychètes. Ce sont des vers marins au corps très allongé comprenant de nombreux métamères (fig.1 a), qui présentent latéralement une paire d'expansions symétriques : les parapodes. La cavité du corps (fig. 2) renferme un abondant liquide coelomique où coexistent trois catégories principales de cellules :

- les éléocytes qui sont impliqués dans la synthèse de la vitellogénine, composant majeur du vitellus, ces cellules ont donc un rôle dans la gamétogenèse ;
- les granulocytes participent aux mécanismes de défense immunitaire ;
- les gamètes : spermatozoïdes ou ovocytes.

Le cerveau est logé dans le prostomium (fig. 1b). Il comprend 26 paires de noyaux ganglionnaires (fig. 3) (Holmgren, 1916). Les noyaux 1 à 3 correspondent aux corps pédonculés similaires à ceux trouvés chez les Arthropodes. Ils sont probablement impliqués, ainsi que le noyau 16, dans des systèmes regroupant de nombreux axones. Le noyau 19 est supposé recevoir des informations provenant de photorécepteurs (Dhainaut-Courtois, 1970).

Les autres noyaux contiennent des cellules qui ont des affinités variables pour les colorants classiques des neurosécrétions tels que ceux de la méthode de Clark (1955).

Le cerveau contracte des rapports très étroits avec le système circulatoire qui transporte vraisemblablement des neurosécrétions. Les neuropeptides sont libérés au niveau de l'organe infracérébral équivalent à une aire neurohémale (Dhainaut-Courtois, 1970).

Reliée au cerveau par le collier périœsophagien, la chaîne nerveuse ventrale se présente, dans chaque métamère, sous la forme d'un ganglion nerveux renflé qui contient les corps cellulaires des neurones destinés aux métamères. L'étude histologique de la chaîne nerveuse a révélé l'existence de trois groupes principaux de cellules (Dhainaut-Courtois et Warembourg, 1967) présents dans chaque ganglion de la chaîne. Parmi ces groupes cellulaires l'existence de cellules neurosécrétrices a été montrée.

Les Néréis ont des sexes séparés. La maturité sexuelle chez certaines espèces (*Nereis virens*, *Nereis diversicolor*) ne se signale extérieurement que par un changement de couleur dû aux produits sexuels alors en grande abondance. D'autres espèces (*Perinereis*, *Platynereis*) subissent une métamorphose peu de temps avant la reproduction : l'épitoquie. Ces transformations adaptent l'animal à une vie pélagique qui se termine par l'émission des gamètes dans l'eau de mer où s'effectue la fécondation. Les Néréis épitoques sont nommées hétéronéréis.

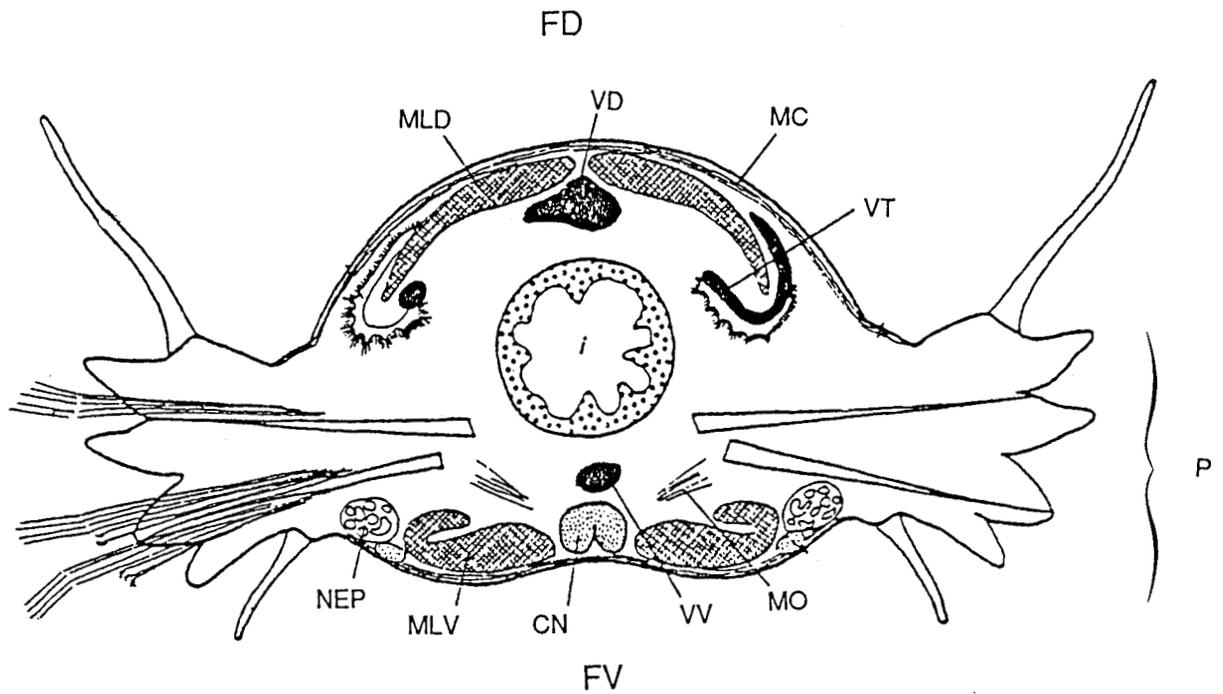


Figure 2 - Représentation schématique d'une coupe transversale d'un métamère de Néréis (d'après Wattez-Combaz, 1985).
 CN, chaîne nerveuse ; FD, face dorsale ; FV, face ventrale ; I, intestin ; MC, muscles circulaires ; MLD, muscle longitudinal dorsal ; MLV, muscle longitudinal ventral ; MO, muscles obliques ; NEP, néphridie ; P, parapode ; VD, vaisseau sanguin dorsal ; VT, vaisseau sanguin transversal ; VV, vaisseau sanguin ventral.

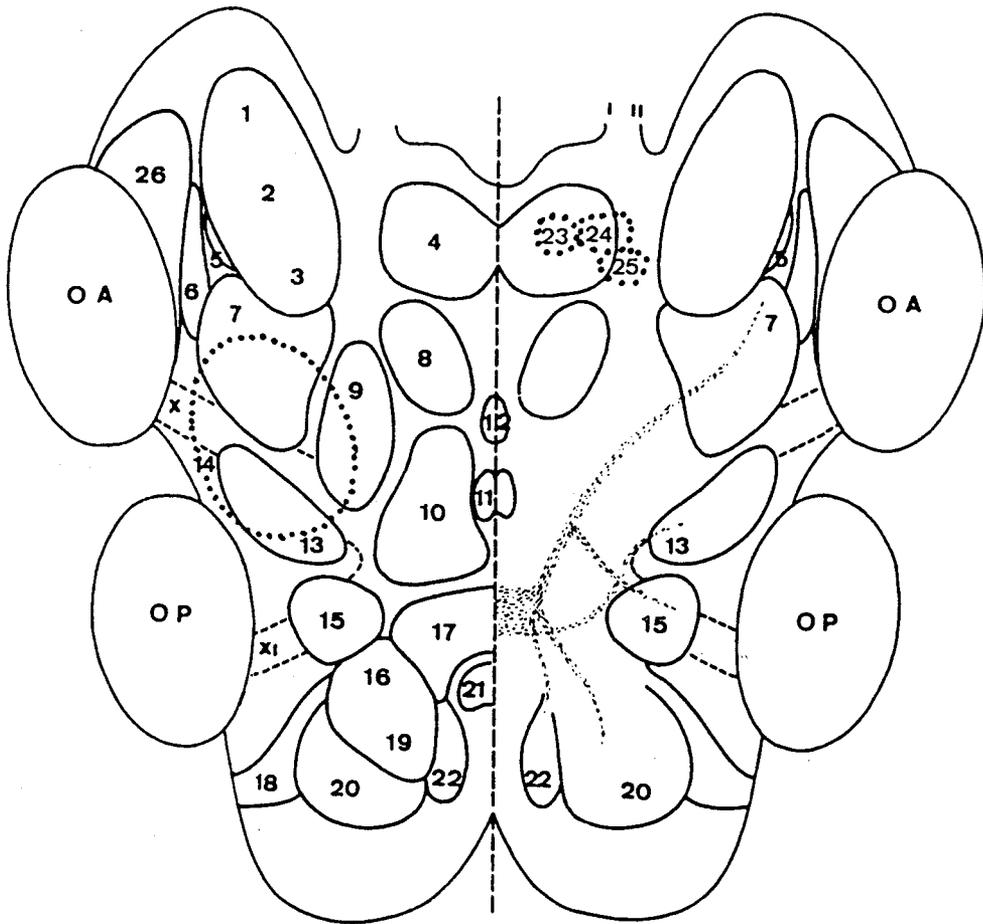


Figure 3 - Distribution des noyaux ganglionnaires dans le cerveau de *Nereis diversicolor*, coupe horizontale (d'après Dhainaut-Courtois, 1970).
 I, II..., nerfs I, II... ; 1-26, noyaux 1-26 ; OA, oeil antérieur ; OP, oeil postérieur.

II - Premiers travaux d'ordre biochimique réalisés chez les Annélides Polychètes

Selon Durchon et Lafon (1951) c'est Brand qui en 1927 le premier tente une étude de la composition chimique de différentes espèces d'annélides. Beaucoup plus tard, Wilber et Bayers (1947) déterminaient la composition en lipides du corps de quelques annélides marines.

Ensuite, Clark (1964) entreprend l'exploration systématique des acides aminés et de quelques glucides du liquide coelomique de *Nephtys hombergii*. En 1968, Ishimoto fournit la composition chimique de la gelée des œufs fécondés de *Nereis japonica*.

En 1969, Gould et Schroeder confirment le rôle du nucléole dans les synthèses des ARN messagers de *Nereis grubei*.

L'ensemble de ces travaux a apporté des connaissances générales quant à la composition en glucides, lipides, protéines des Polychètes dans leur entier ou de leur milieu intérieur. Cependant, le rôle physiologique et les interactions des différentes molécules mises en évidence restaient encore obscurs.

III - Influence du cerveau sur la gamétogenèse

A - Mise en évidence de l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens

Parallèlement aux premiers travaux biochimiques entrepris chez les Néréidiens, des travaux expérimentaux menés par Durchon en 1948 montrent l'existence, dans le cerveau des vers, d'une hormone responsable de l'inhibition de la gamétogenèse. Cette découverte conférait aux Néréis un intérêt nouveau car elles devenaient alors un modèle "simple" d'études endocrinologiques. Par la suite, les travaux se sont multipliés : Durchon (1948, 1956), Boilly-Marer (1962) chez *Perinereis cultrifera*, Durchon (1948, 1952) chez *Nereis irrorata*, Hauenschild (1963) chez *Platynereis dumerillii* montraient l'effet inhibiteur de l'hormone cérébrale sur les transformations hétéronéréidiennes. L'action inhibitrice du cerveau sur la croissance germinale et éléocytaire de *Perinereis cultrifera* (Choquet, 1962; Dhainaut et

Porchet, 1967), de *Nereis diversicolor* (Clark et Ruston, 1963a), de *Nereis pelagica* (Dhainaut, 1966) été par la suite mise en évidence. Par ailleurs, l'action stimulatrice de cet organe sur la régénération était montrée chez *Platynereis dumerilii* (Hauenschild, 1960; Hofmann, 1966), chez *Nereis diversicolor* (Durchon, 1956a, 1967b; Durchon et Marcel, 1962; Clark et Ruston, 1963b; Golding, 1963, 1967).

1 - Evolution de l'activité endocrine cérébrale en fonction de l'état génital

Des données expérimentales (Durchon, 1952, 1962; Hauenschild, 1956, 1963; Durchon *et al.*, 1965; Clark, 1966; Golding, 1965; Porchet, 1970) ont mis en évidence l'existence de différences significatives dans l'activité neurosécrétoire du cerveau au cours du cycle vital des vers. Ainsi, il est admis qu'elle est "importante" chez les jeunes vers puisqu'elle décroît régulièrement pour s'annuler au moment de la maturité sexuelle. En 1971, Durchon et Porchet, grâce à la technique de dosage de l'activité en culture organotypique, ont montré que chaque taux hormonal est caractéristique d'une étape déterminée de l'évolution génitale (fig. 4). Dans le genre *Nereis* (*Nereis pelagica*, *N. diversicolor*) la décroissance de l'activité cérébrale est rapide et continue. Chez les *Perinereis* (*P. cultrifera*, *P. marionii*) la décroissance s'effectue en deux temps : jusqu'à une taille ovocytaire de 130 μm , la chute de l'inhibition est faible, au delà de ce stade elle est brutale. Ces résultats ont été confirmés par Bulet et Porchet (1986) qui montrent que le taux de sécrétion *in vitro* des cerveaux diminue lorsque l'animal évolue vers la maturité.

2 - Régulation de l'activité endocrine cérébrale

La réduction progressive du taux de sécrétion de l'hormone cérébrale est la résultante de l'action de différents facteurs au niveau du cerveau. Ceux-ci sont soit d'origine externe, soit d'origine interne.

a - Les facteurs externes de la régulation

Les expériences d'Hauenschild (1959), Golding (1967), Clark (1969) montrent que la photopériode intervient directement sur le fonctionnement endocrine cérébral responsable du déclenchement de l'épitoquie chez les néréidiens. Par la suite, il a été prouvé que la température a aussi une influence sur l'activité endocrine du cerveau (Durchon et Porchet, 1971).

b - Les facteurs internes de la régulation

Dès 1952, Durchon note que l'inhibition cérébrale est levée chez les jeunes *Perinereis cultrifera* après l'injection d'ovocytes submatures dans la cavité coelomique.

Activité endocrine cérébrale

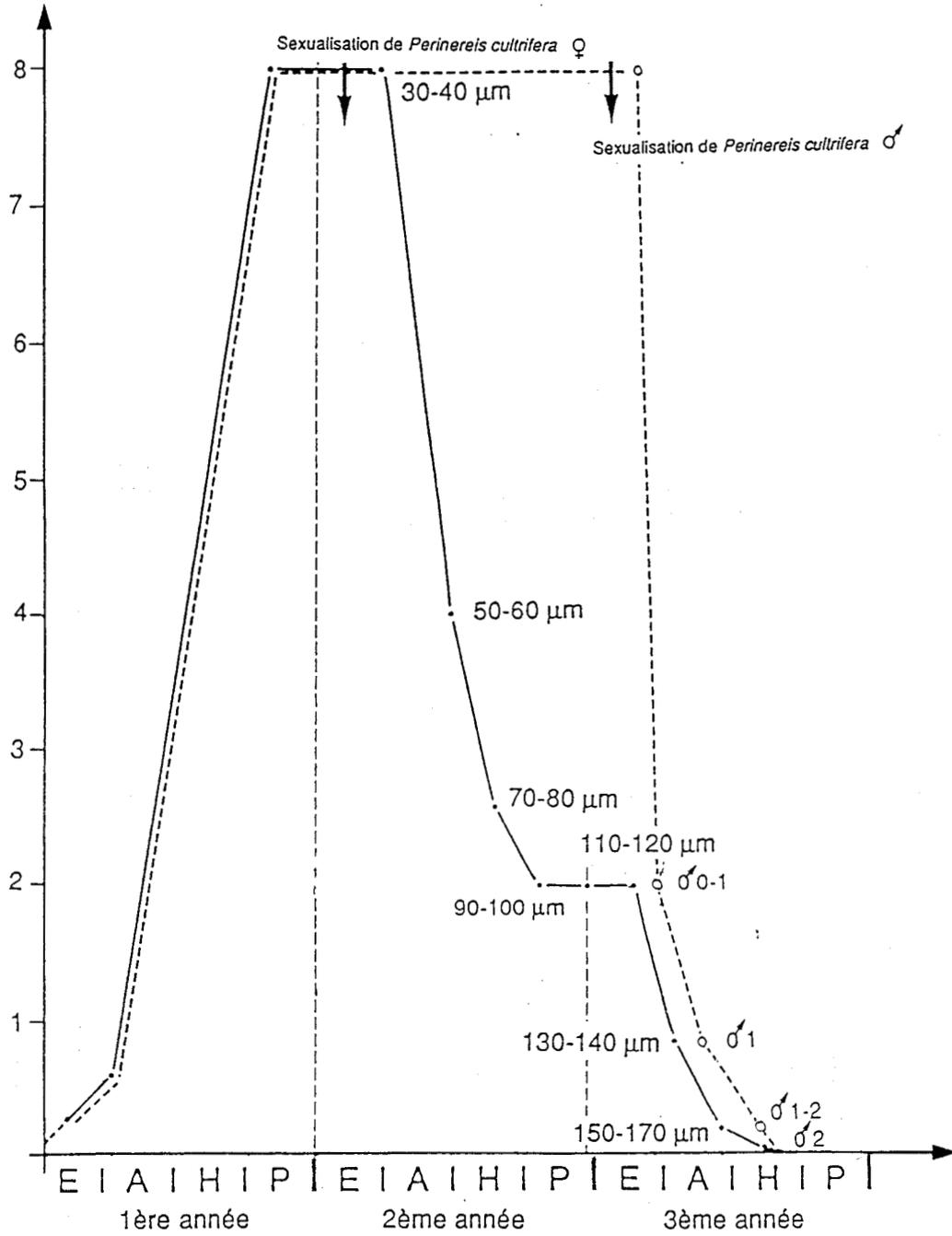


Figure 4 - Variation de l'activité endocrine cérébrale chez *P. cultrifera* en fonction de l'état génital et de la période de l'année (d'après Porchet, 1976).

E, été ; A, automne ; H, hiver ; P, printemps.
 30-40μm, 50-60 μm..., diamètre ovocytaire.

Porchet et Cardon (1972, 1976), Cardon et Porchet (1973) mettent en évidence dans les ovocytes, dont le diamètre est supérieur à 180 μm , une substance capable de bloquer la production hormonale du cerveau aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ainsi, chez de très jeunes *Perinereis cultrifera*, l'épitoquie est artificiellement provoquée avec 2 années d'avance, par rapport aux témoins naturels, à la suite de l'injection de la substance ovocytaire dans le coelome.

La purification partielle de ce composé "feed-back" a montré qu'il n'est pas de nature peptidique et qu'il est de poids moléculaire faible. Gaillet (1985) met en évidence l'existence de similitudes existant entre la substance feed-back isolée des ovocytes matures et la 20 hydroxyecdysone. Cependant Blanckaert (1988) montrait que si des taux de 10^{-9}M équivalent ecdysone (d'après dosages radioimmunologiques) d'un extrait obtenu à partir de *Nereis virens* bloquent la libération de l'hormone cérébrale, des taux supérieurs à 10^{-8}M stimuleraient par contre la sécrétion. Par ailleurs, deux peptides nommés B1 et B2 issus du liquide coelomique stimulent fortement la croissance ovocytaire probablement en augmentant la synthèse et/ou la sécrétion du facteur feed-back par l'ovocyte (Dhainaut et Porchet, 1980).

L'ensemble de ces résultats a suscité les travaux portant sur les aspects biochimiques de l'action hormonale. Il devenait en effet nécessaire de connaître la nature chimique de la neurohormone ainsi que celle des molécules sur lesquelles elle exerce son action.

Avant de relater les recherches menées en vue de la purification de l'hormone cérébrale du cerveau des Néréidiens, nous évoquerons d'abord les nombreuses études biochimiques qui ont été consacrées à l'élucidation de la modulation de son influence au cours de la maturation des vers.

B - Etude biochimique de l'ovogenèse chez les néréidiens

1 - Choix du matériel biologique

Hauenschild (1956) a le premier étudié le conditionnement endocrine de l'ovogenèse chez les néréidiens. Il a constaté que les ovocytes de *Platynereis dumerillii* subissent une croissance accélérée après ablation du prostomium. La même expérience conduite chez *Nereis pelagica* aboutit à une maturation précoce des gamètes femelles (Choquet, 1962). Ces résultats reposent sur des observations biométriques et sur l'étude cytologique des ovocytes (Dhainaut, 1970b, 1984).

Les ovocytes sont dès lors utilisés comme test de l'influence hormonale. Ils constituent une fraction importante du corps de l'animal: de 10 % pour la phase juvénile à 36 %

du poids total d'un ver mature ce qui présente un avantage pour les études biochimiques. La taille des ovocytes est considérée comme un bon critère de l'âge et du degré de maturité du ver (Durchon, 1956a; Hauenschild, 1956; Clark et Ruston, 1963; Dhainaut et Porchet, 1967).

2 - *Rappels sur le processus de l'ovogenèse*

L'étude de l'ovogenèse a été effectuée au laboratoire de façon détaillée (Dhainaut, 1966, 1967, 1970, 1977, 1984 ; Dhainaut et Porchet, 1967).

Il est possible de distinguer trois grands stades cytologiques (fig. 5):

- . la vitellogenèse,
- . la corticogenèse ou grand accroissement,
- . la maturité.

Le stade 1 : synthèse du vitellus ou vitellogenèse

Ce stade recouvre la période de croissance lente de l'ovocyte (30 μm à 120 μm). Durant cette période, la cellule accumule des substances de réserve nommées "vitellus" destinées au développement embryonnaire. Ces éléments sont de nature essentiellement glycoprotéique et forment les globules vitellins. Dans le même temps, l'ovocyte élabore dans son cytoplasme des réserves lipidiques.

Le stade 2 : synthèse des alvéoles corticaux ou corticogenèse

Il recouvre la période de croissance ovocytaire rapide d'où la dénomination de grand accroissement. Des inclusions à structure fibreuse apparaissent, ce sont les alvéoles corticaux. Ceux-ci sont délimités par une membrane et apparaissent entre les globules vitellins et lipidiques. Ils sont disséminés dans tout le cytoplasme jusque dans la zone périnucléaire. Le matériel contenu dans les alvéoles corticaux s'est révélé être de nature glucidique.

Le stade 3 : maturité génitale

A ce stade cytologique, aucune inclusion nouvelle n'apparaît. On constate un arrêt des synthèses des substances de réserve et un profond remaniement dans l'ovocyte. Les alvéoles migrent en position périphérique sous le plasmalemme tandis que les réserves lipidiques et les globules vitellins se regroupent vers le centre de la cellule. La maturation ovocytaire s'opère parallèlement à l'épitoquie (chez les hétéronérés) en prélude à la reproduction.

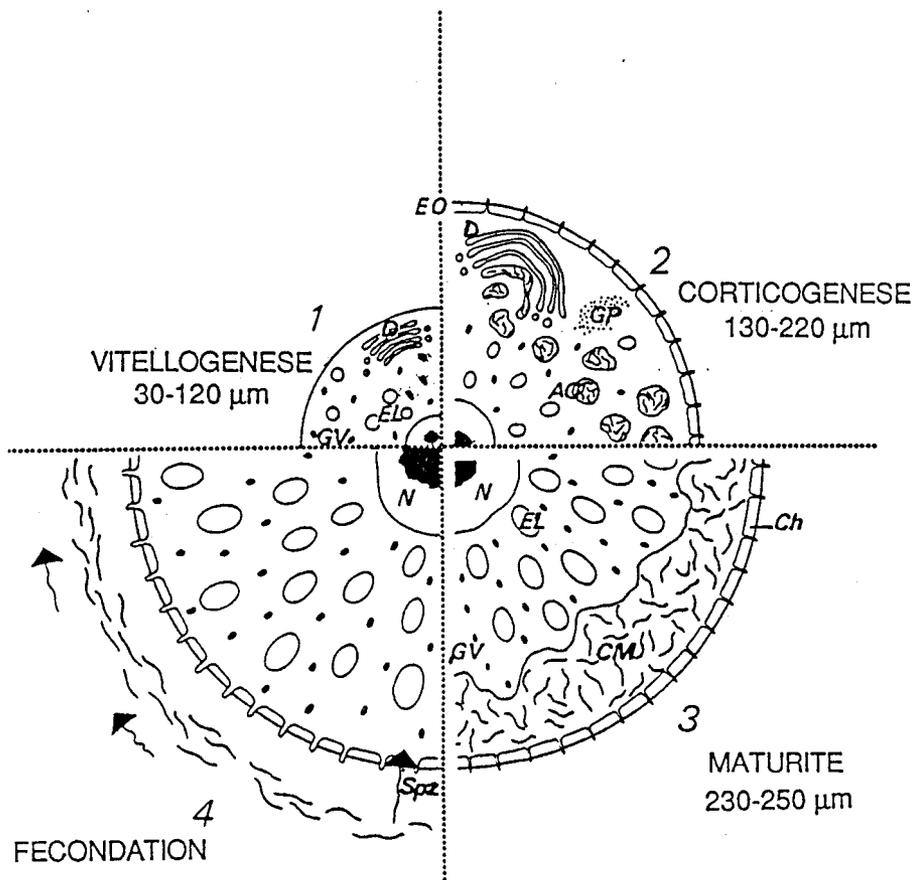


Figure 5 - Représentation schématique des différentes étapes de l'ovogenèse (d'après Porchet, 1976).

AC, alvéole cortical ; CM, couche muqueuse ; Ch, chorion ; D, dictyosome ; EL, enclave lipidique ; EO, enveloppe ovocytaire ; GP, glycogène particulaire ; GV, globule vitellin ; N, noyau ; Spz, spermatozoïde.

La fécondation

Les œufs matures sont rejetés dans l'eau de mer où ils sont fécondés. Dans les trente minutes qui suivent la pénétration du spermatozoïde, le contenu des alvéoles corticaux est expulsé de l'œuf et forme la gelée protectrice qui donnera une "coque" enveloppant l'embryon.

3 - Dosage biochimique global des constituants cellulaires

Ces dosages réalisés par Caner (1981) ont porté sur des ovocytes de *Perinereis cultrifera* de 110 à 150 μm de diamètre, soit de la période finale de la vitellogenèse à la maturité ovocytaire.

Il a ainsi été montré que protéines et lipides sont les constituants majeurs des ovocytes en fin de vitellogenèse. Des variations quantitatives sensiblement différentes sont observées pour chaque substance dosée (fig. 6). Ainsi, les glucides voient leur concentration multipliée par un facteur proche de 50 et les protéines par un facteur de 20. Dans le même temps, les lipides progressent d'une manière moins importante : leur concentration est 8 fois supérieure, à la maturité, à celle déterminée au stade juvénile.

Ces résultats peuvent être corrélés aux données cytologiques précédemment obtenues (Dhainaut, 1966, 1967, 1970, 1984 ; Dhainaut et Porchet, 1977a) : la période de faible accroissement des ovocytes se caractérise par l'apparition progressive des inclusions de vitellus et de globules lipidiques ; corrélativement, protéines et lipides représentent les constituants majeurs de la cellule germinale. Le grand accroissement s'accompagne de l'apparition et du développement des alvéoles corticaux de nature essentiellement glucidique (Dhainaut et Porchet, 1977b); à ce stade, la croissance des glucides est considérable et de loin la plus importante.

C - Evolution des composés glucidiques pendant l'ovogenèse

1 - Ovogenèse naturelle

Les premiers travaux biochimiques entrepris sur l'étude du mécanisme de l'action hormonale ont été ceux de Porchet (1974, 1976). Ses recherches ont porté sur la fraction glucidique des ovocytes de *Perinereis cultrifera* depuis leur apparition dans le coelome jusqu'à la fécondation. Les glucides représentant la partie la plus importante des réserves cytoplasmiques, ils devenaient un modèle de choix. Les ovocytes de *Perinereis cultrifera* isolés ont été soumis à un fractionnement à l'éthanol. Les glucides ont été identifiés et dosés au niveau des deux fractions ainsi obtenues : micro- et macromoléculaire (Porchet *et al.*, 1977; Porchet et Spik, 1978).

ng / ovocyte (10^{-2})

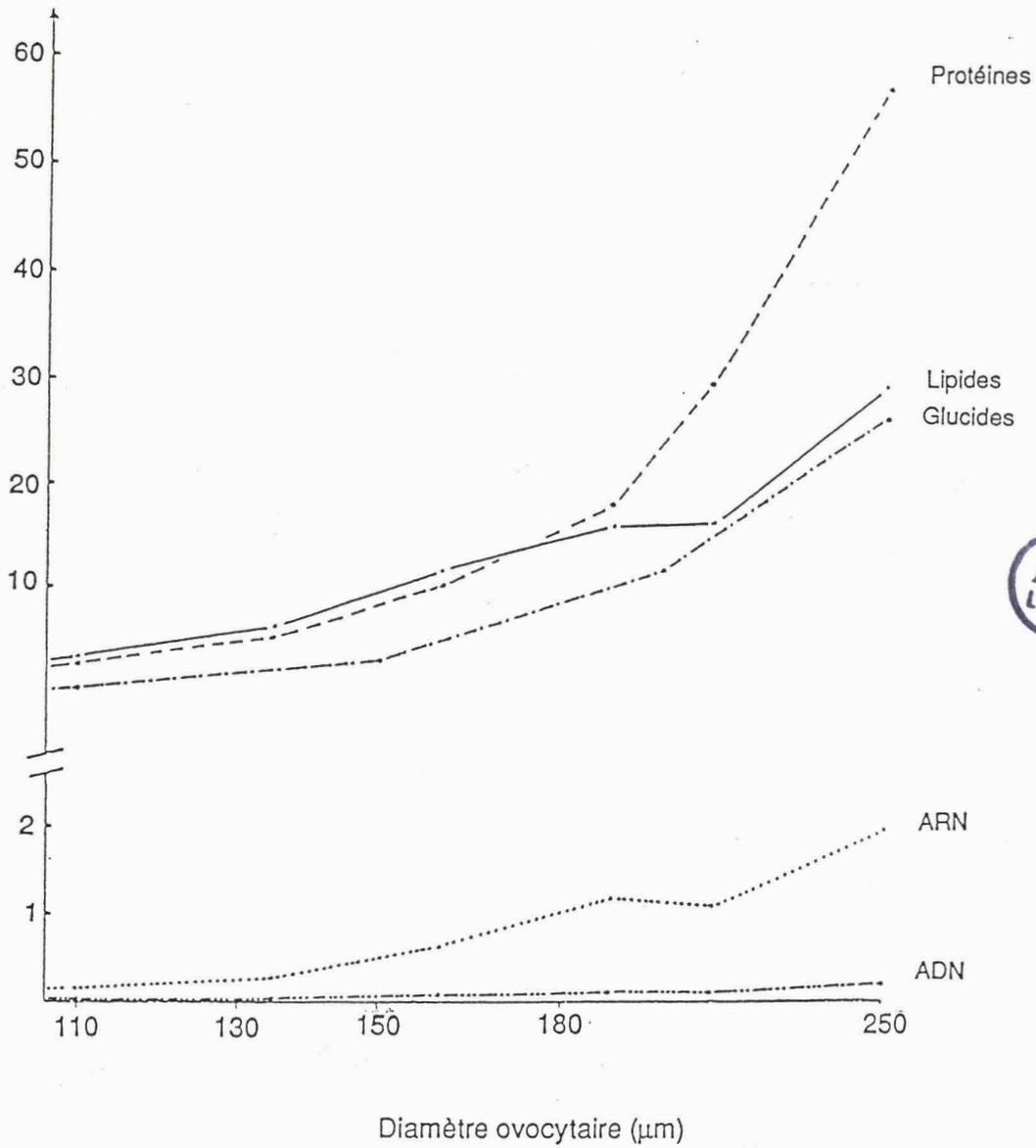


Figure 6 - Dosage des constituants des ovocytes de *P. cultrifera*, exprimés en nanogramme par ovocyte (d'après Caner, 1981)

a - La fraction micromoléculaire

Quel que soit le stade d'évolution de l'ovocyte on retrouve toujours, dans les fractions micromoléculaires, les mêmes constituants glucidiques mais en proportions variables: le glucose (libre ou lié sous forme d'oligosaccharides), l'acide glucuronique.

La teneur en glucose libre et en acide glucuronique présente une très nette augmentation au cours des deux stades intermédiaires (ovocytes de 130 à 220 μm) puis subit une diminution importante au moment de la maturité génitale (fig. 7).

b - La fraction macromoléculaire

Elle est constituée essentiellement de glucides conjugués (polysaccharides et glycoconjugués). Sa composition est diversifiée: le galactose, le mannose, le xylose, le fucose, le rhamnose, l'acide glucuronique, la glucosamine, la galactosamine, le glucose trouvé essentiellement sous forme de glycogène, ont été identifiés. Les monosaccharides neutres sont nettement majoritaires puisqu'ils représentent de 56 à 78 % de l'ensemble des sucres. Leur taux augmente considérablement entre le premier et le deuxième stade de l'ovogenèse (60-120 μm à 130- 170 μm de diamètre ovocytaire). Cette variation est liée à une très importante synthèse de glycogène dans les ovocytes mesurant entre 130 et 170 μm (fig. 7)

Le taux d'acide glucuronique augmente régulièrement tout au long de la croissance ovocytaire.

Parmi les monosaccharides neutres, le galactose et le mannose ont une concentration relativement constante du premier au dernier stade de l'ovogenèse tandis que le taux du xylose, du fucose et du rhamnose est multiplié par six pendant le même temps.

Tout se passe comme si à partir de la submaturité génitale la biosynthèse des glycoconjugués portait essentiellement sur ceux qui vont constituer la gelée protectrice de l'œuf après sa fécondation. Comme à partir de ce stade l'activité endocrine cérébrale s'interrompt (Durchon et Porchet, 1971; Porchet, 1970, 1972), on peut penser que la levée de l'inhibition hormonale accélère les biosynthèses des glycoconjugués ovocytaires et notamment de l'acide glucuronique, du fucose et du rhamnose. A l'inverse, la présence de l'hormone cérébrale semble nécessaire pour assurer la biosynthèse des hexosamines.

2 - Ovogenèse expérimentale

L'étude du contrôle endocrine de la biosynthèse des glycoconjugués ovocytaires a été envisagée par voie biochimique (Porchet et Spik, 1978). L'expérience fondamentale est la comparaison du niveau de synthèse des glycoconjugués entre les ovocytes d'animaux privés de cerveau et les ovocytes d'animaux témoins. La synthèse des glycoconjugués ovocytaires est accrue

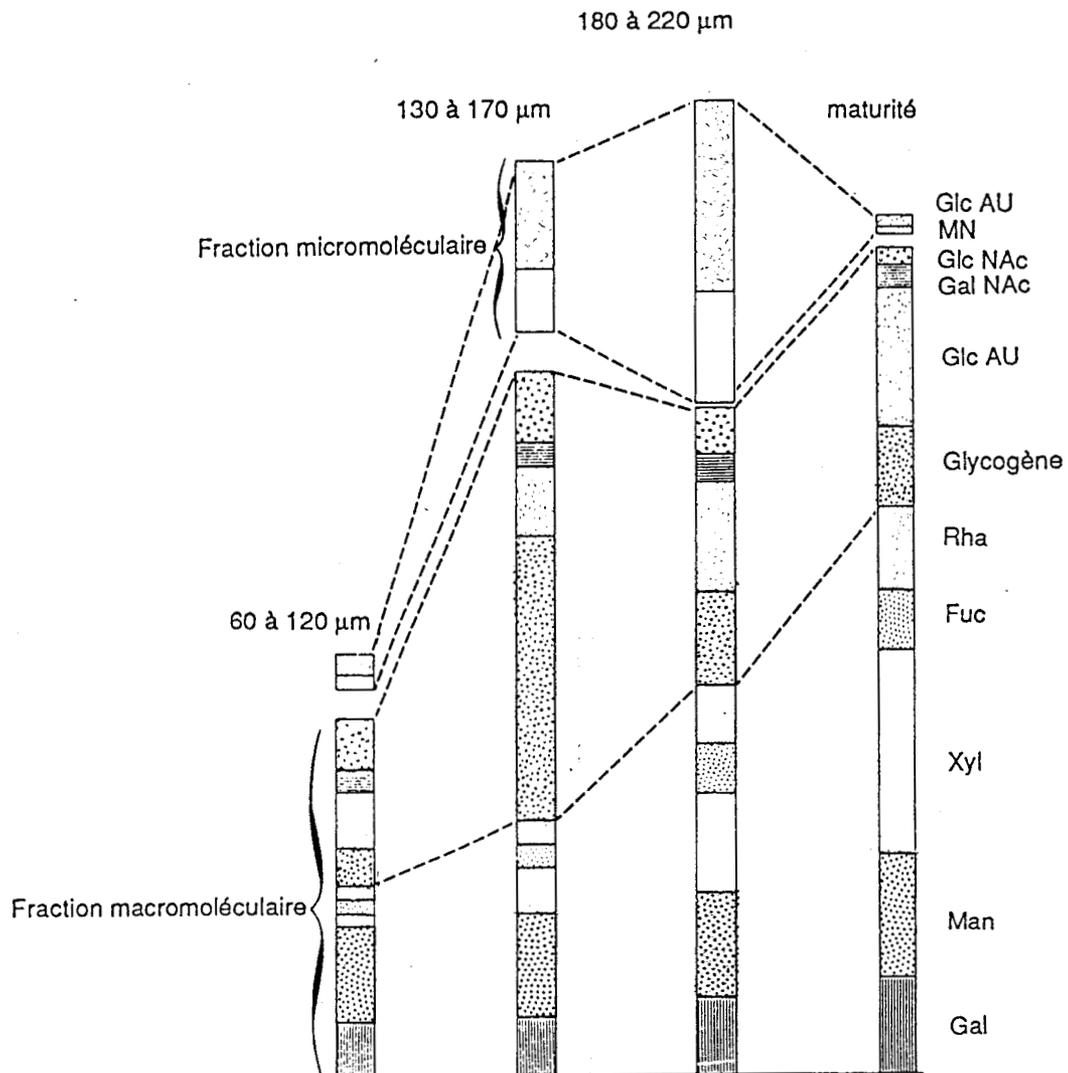


Figure 7 - Représentation schématique des variations quantitatives des monosaccharides et du glycogène dans les fractions micro- et macromoléculaires des ovocytes de *P. cultrifera* (d'après Porchet *et al.*, 1977).
 Fuc, fucose ; Gal, galactose ; Gal NAc, N-acétyl galactosamine ; Glc, glucose ; Glc AU, acide glucuronique ; Glc NAc, N-acétyl glucosamine ; Man, mannose ; MN, monosaccharides neutres ; Rha, rhamnose ; Xyl, xylose.

par la levée de l'inhibition cérébrale. L'évolution générale des constituants glucidiques est comparable à l'évolution naturelle mais le processus est considérablement accéléré.

3 - Evolution des composés glucidiques du liquide cœlomique

Poursuivant ses travaux concernant l'étude systématique de l'évolution des composés glucidiques de *Perinereis cultrifera* en fonction de l'âge de l'animal, Porchet (1974, 1976) s'est ensuite intéressé au milieu intérieur des vers : le liquide cœlomique où baignent les ovocytes et les cœlomocytes. Dans le liquide cœlomique, il a montré l'existence des mêmes monosaccharides que ceux identifiés dans l'ovocyte à l'exception de la galactosamine. Plus on se rapproche de la maturité génitale, plus les glycoconjugués riches en xylose, fucose, rhamnose, acide glucuronique sont abondants. L'évolution du taux d'acide glucuronique est la plus remarquable : il n'y en a pas dans le cœlome d'animaux jeunes, il n'apparaît que chez les vers ayant un diamètre ovocytaire supérieur à 130-210 μm . L'apparition de l'acide glucuronique, dans le cœlome, coïncide avec le ralentissement de l'activité endocrine cérébrale.

L'ensemble des travaux de Porchet sur l'analyse biochimique des glucides chez *Perinereis cultrifera* a permis d'identifier neuf monosaccharides présents quel que soit l'état génital et, pour un même stade, quelle que soit la fraction cellulaire considérée. Ce qui caractérise la différenciation, ce n'est pas l'apparition de nouveaux glucides mais une modulation dans le temps de leur biosynthèse. Ceci suggère que, sous conditionnement hormonal, l'ovocyte inhibe sélectivement les activités enzymatiques. L'analyse des composés du liquide cœlomique a montré l'influence certainement importante exercée par les facteurs métaboliques dans la régulation de l'ovogenèse. Porchet (1974) suggérait un rôle probable des cellules cœlomiques dans l'élaboration des glycoconjugués cœlomiques. Elles participeraient à la nutrition de l'ovocyte. Tous ces facteurs métaboliques sont soumis à l'influence de l'hormone cérébrale qui s'exerce de deux manières différentes au niveau de l'ovocyte :

- . directement par action gonadotrope,
- . indirectement par l'intermédiaire des métabolites et des cellules cœlomiques.

4 - Enzymes impliquées dans la biosynthèse des glycoconjugués

S'appuyant sur les résultats précédents (Porchet 1974, Porchet et Spik 1978) sur l'évolution des glycoconjugués au cours du développement ovocytaire, Bulet (1981) a entrepris une étude des enzymes impliquées dans la biosynthèse des glycoconjugués : les glycosyltransférases. C'est ainsi que l'existence d'activités galactosyl, glucuronyl, sialyl, xylosyl, fucosyl et mannosyl transférases a été démontrée au niveau des cellules cœlomiques de *Perinereis cultrifera*.

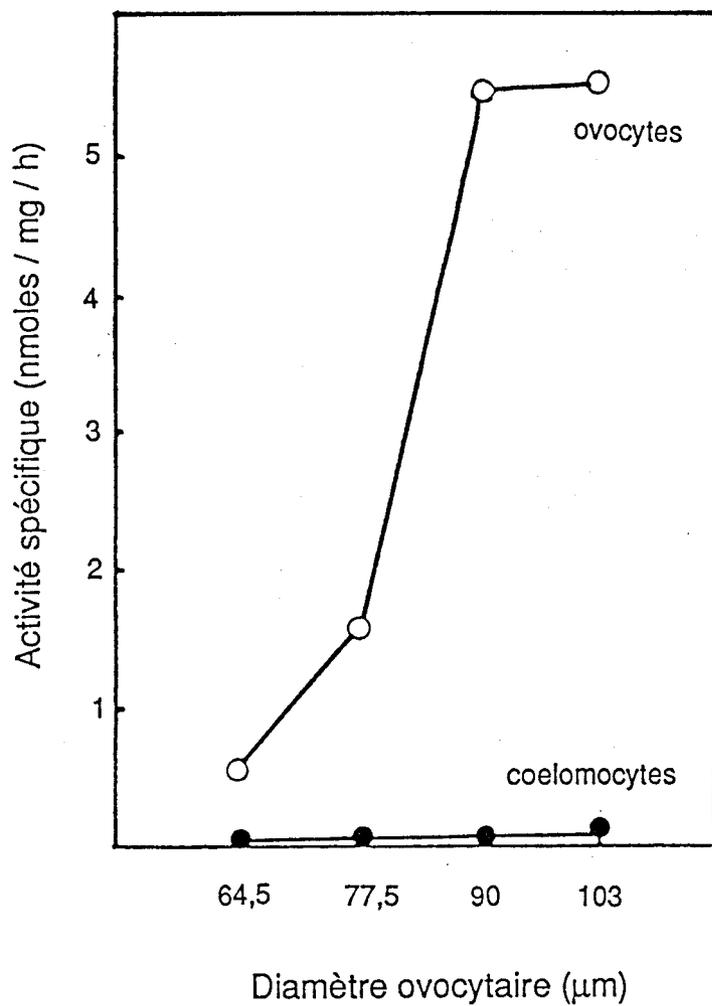


Figure 8 - Evolution du taux de transformation du GDP mannose au cours de la maturation des ovocytes de *P. cultrifera* (d'après Bulet, 1983).

Par ailleurs, Porchet et Spik (1978) ont remarqué qu'en conditions an hormonales, les glycoprotéines des ovocytes s'enrichissent en fucose et en xylose lorsque leur diamètre dépasse 130 μm . L'étude de l'évolution de l'activité des enzymes impliquées dans la conversion GDP-Man en GDP-Fuc en fonction du stade de maturité des ovocytes de *Perinereis cultrifera* a montré que le système de synthèse du GDP-Fuc est progressivement "mis en place" dans les ovocytes de plus de 80 μm de diamètre (fig. 8)(Bulet 1983). Cette taille ovocytaire correspond à celle à partir de laquelle le taux de fucose augmente fortement (Porchet *et al.*, 1977). De plus, c'est à partir de cette taille de 80 μm environ que l'activité hormonale devient faible. Il est enfin à remarquer que si cette activité enzymatique est aussi présente dans les cœlomocytes, elle ne subit aucune variation au cours de l'évolution du ver. Cette activité enzymatique constitue un excellent marqueur du stade de maturité de l'ovocyte.

D - Evolution des composés lipidiques pendant l'ovogenèse

Dans le but d'étudier les relations métaboliques existant entre les cœlomocytes, les ovocytes et le liquide coelomique, l'analyse des lipides neutres ainsi que leur évolution au cours de l'ovogenèse a été réalisée (Fontaine *et al.*, 1984a). Les ovocytes sont riches en lipides (entre 20 et 40 % de leur poids sec). Six classes de lipides neutres ont été identifiées dans les ovocytes, les cœlomocytes et le liquide cœlomique : ce sont des mono-, di- et triglycérides, des acides gras libres, des stérols libres et estérifiés, leurs proportions varient beaucoup au cours de l'ovogenèse (fig. 9). Les mono- et diglycérides sont présents en grande proportion seulement dans le liquide cœlomique. Il y a beaucoup de triglycérides dans les cœlomocytes et les ovocytes. Leur taux dans les cœlomocytes tend à augmenter au cours de l'ovogenèse alors qu'il diminue dans le même temps dans les ovocytes. En conditions an hormonales, les triglycérides s'accumulent dans les cœlomocytes.

Analysant les teneurs en acides gras des divers compartiments (ovocytes, cœlomocytes, liquide cœlomique), Fontaine (1979) a observé que les premiers acides gras de certaines séries métaboliques apparaissent d'abord dans les cœlomocytes (diamètre ovocytaire 140-170 μm), puis dans le liquide cœlomique (diamètre ovocytaire 180-190 μm) pour enfin être mis en évidence dans les ovocytes (180 à-210 μm).

Cette constatation l'amenait à considérer les cœlomocytes comme d'importants lieux de stockage et de biosynthèse des lipides consommés par les ovocytes. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude de l'incorporation de glycérol ^{14}C par les cellules cœlomiques et les ovocytes (Fontaine *et al.*, 1984) : la synthèse des triglycérides est très semblable pour les deux

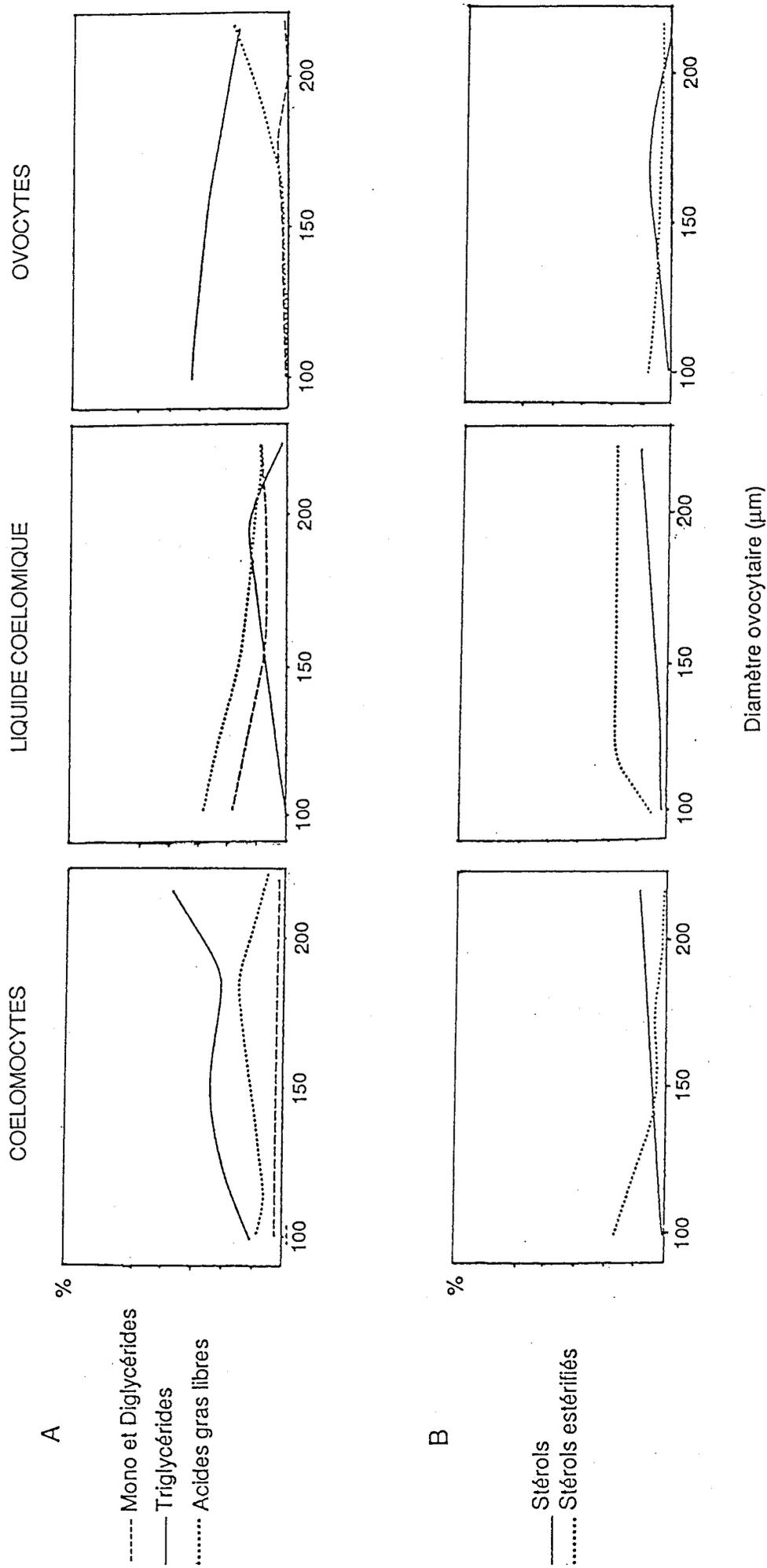


Figure 9 - Evolution des composants lipidiques du milieu intérieur de *P. cultrifera* (d'après Fontaine, 1982). A : glycérides et acides gras libres; B : stérols et stérols estérifiés.

compartiments cellulaires. L'incorporation de glycérol ^{14}C dans le liquide coelomique est mise en évidence par le marquage obtenu dans les mono- et diglycérides. Ces résultats permettent de suggérer que deux voies existent pour l'accumulation des glycérides dans les ovocytes :

- ils sont prélevés directement dans le liquide coelomique,
- ils sont synthétisés par les coelomocytes puis libérés dans le liquide coelomique et captés par les ovocytes.

E - Evolution des composés protéiques des ovocytes au cours de l'ovogenèse

La composition protéique du vitellus des ovocytes de *Perinereis cultrifera* a été étudiée par Baert en 1986.

C'est ainsi que 5 lipoglycoprotéines majeures (V_1 à V_5) ont été identifiées dans les jeunes ovocytes. L'analyse des protéines solubles à partir d'ovocytes prélevés chez des animaux à différents stades de leur développement a montré que des cinq lipoglycoprotéines caractérisées dans les jeunes ovocytes, seules les formes V_3 à V_5 subsistent comme éléments majeurs dans l'ovocyte à l'approche de la submaturité (diamètre ovocyttaire 120-130 μm). Les protéines V_1 et V_2 les plus lourdes disparaissent petit à petit au cours de la croissance ovocyttaire. Seule V_5 , la protéine de plus bas poids moléculaire (390 kDa) reste visible jusqu'à la maturité complète de l'ovocyte. Cette protéine est la seule lipoglycoprotéine qui s'accumule dans l'ovocyte. Elle a été nommée vitelline. V_5 n'est pas le seul produit métaboliquement stable issu de V_1 . La conversion de V_1 en V_5 se double en effet de la formation d'une chaîne polypeptidique de 15 kDa qui s'accumule conjointement à la vitelline mature (fig. 10).

Un résultat similaire a été obtenu chez *Nereis diversicolor* (Bonnier, 1987) où la vitelline lipoglycoprotéine de 400 kDa (V_{400}) s'accumule dans les ovocytes et est absente des cellules germinales jeunes.

Des études métaboliques *in vitro* et *in vivo* réalisées chez *Perinereis cultrifera* et chez *Nereis diversicolor* ainsi que des traductions d'ARNm totaux de coelomocytes de *Perinereis cultrifera* (Curgy *et al.*, 1987) ont montré que les ovocytes ne synthétisent pas la vitelline. Ce sont les coelomocytes qui sont responsables de cette synthèse. Ceux-ci produisent un précurseur de la vitelline : la vitellogénine, polypeptide de 176 kDa chez *P. cultrifera* et de 280 kDa chez *N. diversicolor*, qui après adjonction d'une fraction lipidique est libéré dans le liquide coelomique.

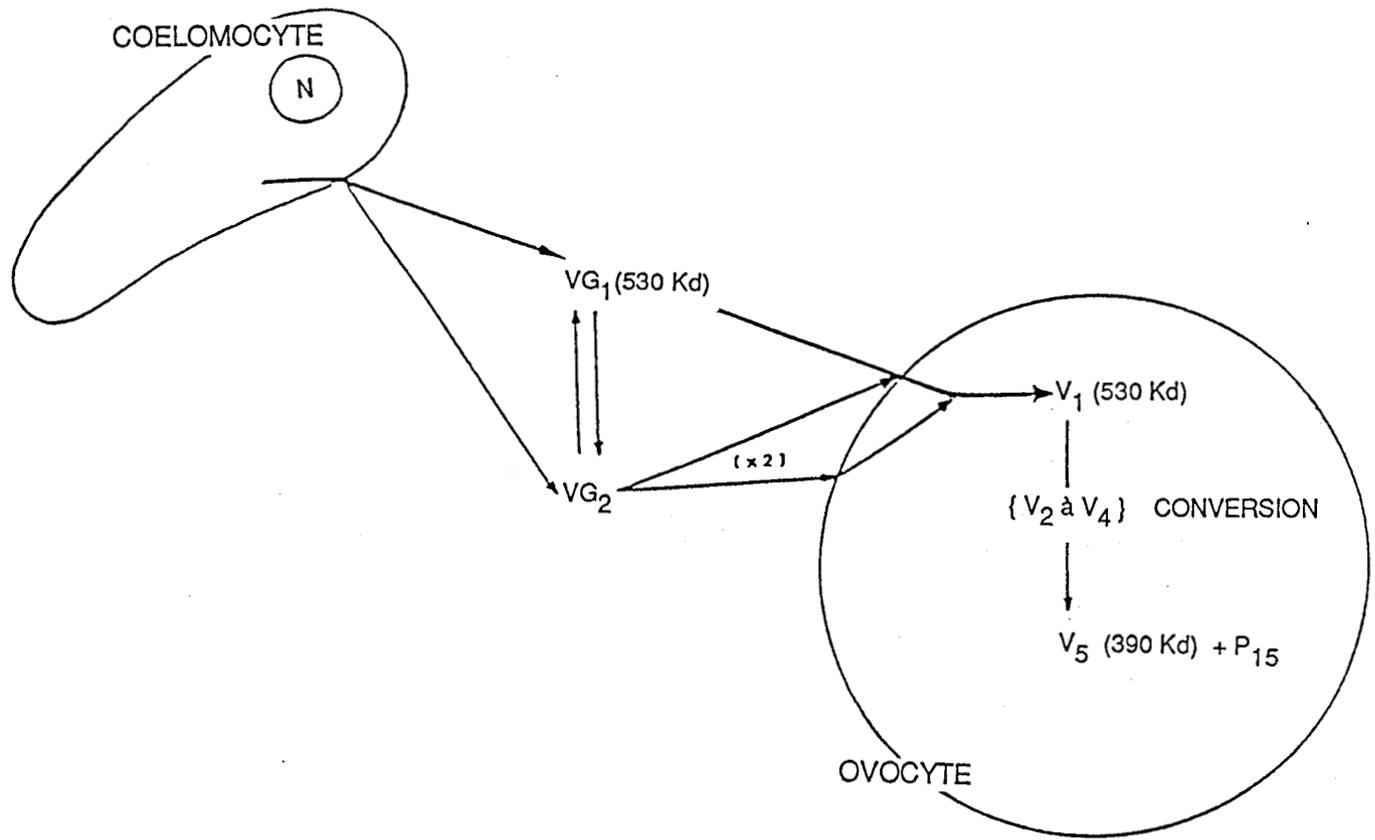


Figure 10 - Représentation schématique de la vitellogénèse chez *Perinereis cultrifera* (d'après Baert, 1986).

L'ovocyte ne participant pas à la synthèse de la vitelline, la vitellogenèse chez *Perinereis cultrifera* (Baert, 1986), chez *Nereis diversicolor* (Bonnier, 1987) et chez *Nereis virens* (Fischer et Henning, 1986) a été définie comme un processus hétérosynthétique. Ces données ne confirmaient pas ce qui avait d'abord été supposé par Dhainaut (1980, 1984) qui grâce à des travaux en autoradiographie à haute résolution montrait que les ovocytes étaient responsables des synthèses du vitellus du fait de leur capacité à prélever directement dans le liquide coelomique les nutriments (amino acides, monosaccharides...) constitutifs du vitellus et des alvéoles corticaux (Dhainaut, 1967, 1968; Bertout et Dhainaut, 1971; Porchet *et al.*, 1977, Dhainaut et Porchet, 1977).

Par contre, l'existence du rôle des éléocytes dans la maturation des gamètes présentée par Dales (1957, 1964), Dhainaut (1967), Schroeder (1971), Eckelbarger (1971), Fischer (1979), Dhainaut *et al.* (1980), Fontaine *et al.* (1984) était confirmée successivement par Baert (1986) et Bonnier (1987).

Le fait d'avoir montré l'origine exogène du composant majeur du vitellus a permis de redéfinir la notion de réorientation métabolique de l'ovocyte au moment de la submaturité. Au cours de la première phase de l'ovogenèse dite de vitellogenèse, l'activité essentielle de l'ovocyte ne correspond pas à la synthèse de vitellus mais à la formation de celui-ci à partir d'un produit élaboré par les cellules coelomiques.

De plus, les études métaboliques ont montré que cet apport de vitellogénine à l'ovocyte persiste bien au delà du stade juvénile (Baert, 1986).

Cette représentation fait ressortir la notion de dépendance de l'ovocyte et met en relief le rôle primordial joué par des cellules somatiques : les éléocytes dans le cadre de l'ovogenèse.

Cette fonction de synthèse du précurseur du composant essentiel du vitellus vient s'ajouter à la fonction nourricière attribuée aux éléocytes : stockage et redistribution d'éléments micromoléculaires nécessaires à l'ovocyte pour réaliser ses propres synthèses (Dhainaut *et al.*, 1980, 1984; Fontaine *et al.*, 1984).

D'abord considéré comme un métabolisme essentiellement actif chez les animaux jeunes sur la base des résultats d'études autoradiographiques (Dhainaut et Porchet, 1977), la vitellogenèse dure en fait tout au long de l'ovogenèse. En effet, la cinétique d'incorporation de la vitelline dans l'ovocyte s'amplifie considérablement à la période de submaturité (Baert, 1986).

Un ovocyte de 120-130 μm de diamètre ne contient que 16 % des réserves en vitelline présentes dans un ovocyte mature (260 μm). Plus de 80 % du contenu en vitelline d'un ovocyte lui est fourni pendant la période du grand accroissement ou corticogenèse. Enfin, l'activité de synthèse de la vitelline augmente de façon significative au cours du développement des animaux.

Ceci peut être compris comme étant un mécanisme qui subit une activation progressive pendant l'ovogenèse, activation concomitante de la décroissance de l'activité endocrine du cerveau. Cependant, les résultats obtenus *in vitro* par Baert (1986) sur l'activité des éléocytes n'ont pas confirmé l'hypothèse d'une activation de la production de vitellogénine en liaison avec la levée d'inhibition de la neurohormone cérébrale. De la même manière, aucun changement significatif n'a pu être détecté lorsque les éléocytes ont été incubés *in vitro* avec des cerveaux actifs issus de jeunes animaux. En conséquence, les modalités du contrôle hormonal de la vitellogenèse semblent encore obscures.

F - Conclusion

L'ensemble des travaux biochimiques que nous venons de décrire a mis en évidence les importantes variations du taux des trois constituants majeurs (lipides, protéines, glucides) du milieu intérieur des annélides polychètes.

Les études menées sur les lipides neutres puis sur les protéines ont permis de confirmer l'existence d'interrelations étroites entre les ovocytes et les éléocytes : les premiers stockant les substances élaborées par les seconds.

Cependant, malgré une connaissance maintenant approfondie des mécanismes biochimiques de l'ovogenèse, aucune conclusion précise n'a pu être dégagée jusqu'à présent quant au mode d'action des neurohormones cérébrales.

G- Etude de la spermatogenèse chez les Néréidiens

L'évolution structurale des cellules germinales mâles a été décrite en particulier par Bertout (1976).

Les spermatogonies sont regroupées en amas mûriformes (fig. 11). Les cellules d'un même amas sont reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques. A ce stade, le noyau a une forme aplatie....

L'appareil de Golgi présente une intense activité sécrétoire qui aboutit à l'élaboration de deux types de formations appelées corps denses et corps multivésiculaires.

Les cellules germinales subissent ensuite de discrètes modifications morphologiques. Ces éléments ne se distinguent des spermatogonies que par leur noyau qui devient plus sphérique et la chromatine plus dispersée. Ces cellules sont engagées de manière irréversible dans le processus aboutissant à la méiose (Durchon *et al.*, 1965). Dès ce stade, elles seront donc désignées sous le terme de spermatocytes.

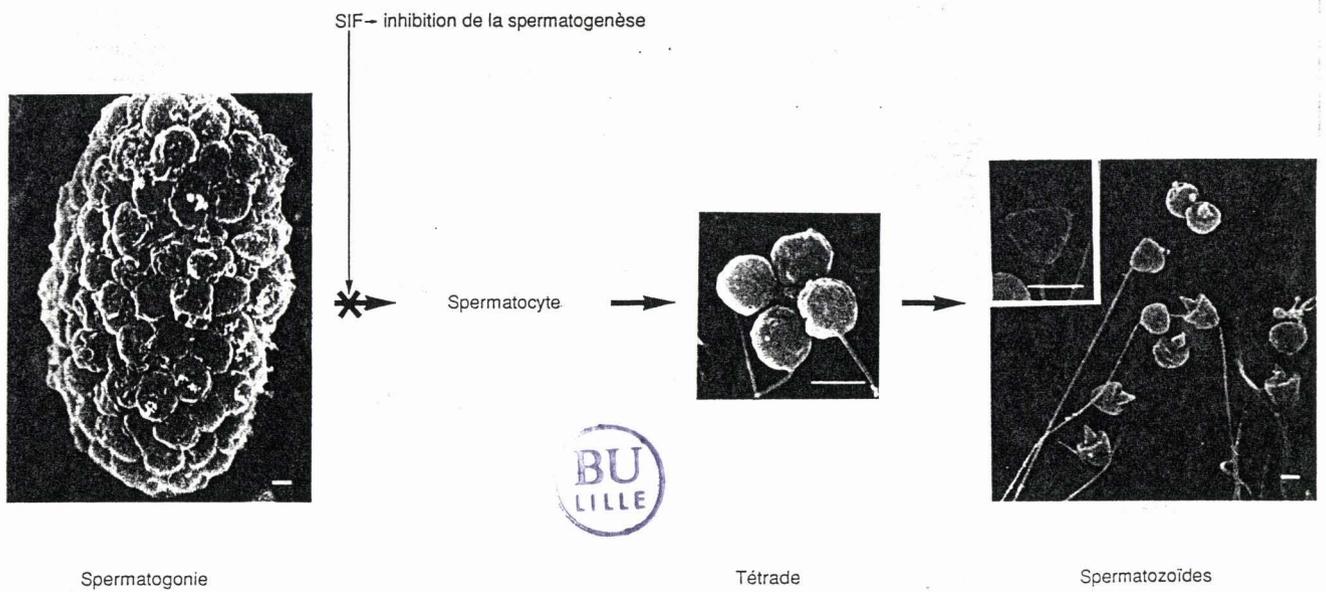


Figure 11- Les principales étapes de la spermatogenèse chez *Nereis diversicolor*.
Les barres indiquent 10 μ m.

Tableau II - Distribution chez les Néréidiens de substances immunologiquement apparentées à des peptides de Vertébrés et d'Invertébrés.

Famille de Peptides	Distribution				Référence
	Cerveau	GSO	CNV	Autres tissus	
<u>Opiacés</u>					
Leu-enképhaline	+	+	+	ovocytes	1
Met-enképhaline	+		+		2
α -endorphine	+			SNP	1
β -endorphine	+		+		
α -néoendorphine	+	+			2
Dynorphine 1-17	+			spermatocytes	2
<u>Hormones hypothalamiques</u>					
Somatostatine	+	+	+	ovocytes	2
GRF	+	+	+		1-2
CRF	+	+	+		1
Vasopressine	+	+	+		3
<u>Hormone antéhypophysaire</u>					
β -MSH	+	+	+		1
<u>Hormones gastrointestinales</u>					
CCK	+	+	+	intestin	4-5
Substance P	+	+	+		1
VIP	+	+	+		1
Insuline	+			SNP	3
<u>Divers</u>					
Angiotensine	+				3
FMRF amide	+	+	+	intestin	6
CDCH	+				7
Neuroparsine	+	+	+		8

- 1 - Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985a.
- 2 - Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986.
- 3 - Dhainaut-Courtois, Masson, Azeddoug (inédit).
- 4 - Engelhardt *et al.*, 1982
- 5 - Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985b.
- 6 - Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988.
- 7 - Baratte, Van Minnen, Masson, Dhainaut-Courtois (inédit).
- 8 - Dhainaut-Courtois, Masson, Girardie (inédit).

GSO, Ganglion sous-oesophagien ; CNV, Chaîne nerveuse ventrale ; SNP, Système nerveux périphérique ; GRF, Growth hormone releasing factor ; CRF, Corticotropin releasing factor ; MSH, Melanocyte stimulating hormone ; CCK, Cholecystokinine ; VIP, Vasoactive intestinal peptide ; CDCH, Caudo dorsal cell hormone.

Pendant la prophase de méiose les amas mûrifomes se dissocient par résorption totale des ponts intercellulaires.

Le spermatocyte possède alors un noyau globuleux et s'apprête à subir les divisions de maturation. Celles-ci aboutissent à la formation de quatre spermatides reliées entre elles par des ponts résultant vraisemblablement d'une cytodièrese incomplète, formant ainsi une tétrade (fig. 11). Elle reste formée pendant la plus grande partie de la spermiogenèse où débute l'élaboration du flagelle. Suite à la méiose, on constate simultanément la disparition des "corps denses" et l'apparition d'une vésicule acrosomienne renfermant les mêmes constituants que les corps denses.

Ces derniers remaniements conduisent à la formation des spermatozoïdes (fig. 11).

La différenciation méiotique est accompagnée par une augmentation de la synthèse des ARN (interphase préméiotique) puis par la réplication des ADN (phase S préméiotique) (Bertout 1983a et Dhainaut 1964)

Les cellules germinales peuvent être maintenues expérimentalement au stade de spermatogonies en introduisant dans la culture des extraits de cerveaux ou des cerveaux provenant d'animaux jeunes (Bertout 1983b). Cette propriété a été utilisée en particulier pour la mise au point d'un test biologique permettant la détection de l'hormone cérébrale inhibitrice de la spermatogenèse au cours de sa purification.

IV - Travaux biochimiques réalisés sur le cerveau des Néréidiens

A - Purification de peptides immunologiquement apparentés à des peptides de vertébrés

De nombreux peptides immunologiquement apparentés à des peptides de vertébrés ou d'invertébrés ont été détectés dans le cerveau des néréidiens par immunocytochimie (Tableau II) (Dhainaut- Courtois *et al.* , 1985, 1986 et voir revue Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988).

A la suite de ces travaux, il a paru intéressant d'entreprendre la purification de molécules apparentées à la dynorphine, au FMRFamide (Baratte, 1987; Baratte et Dhainaut-Courtois, communication personnelle) et à la cholécystokinine (Smiri, 1988) en utilisant les dosages radioimmunologiques (dynorphine et cholécystokinine) ou le "dot immunobinding" (FMRFamide) comme procédés de détection.

B - Etude des précurseurs de neuropeptides apparentés à des peptides de vertébrés

L'étude des précurseurs de neuropeptides a été effectuée grâce à la traduction *in vitro* et *in ovo* (en ovocytes de Xénope) d'ARN messagers isolés de cerveaux de *Nereis diversicolor*. Des immunodétections réalisées à l'aide d'anticorps anti-procholécytokinine, anti-dynorphine et anti- α -néoendorphine ont permis de mettre en évidence l'existence de précurseurs de haut poids moléculaire (60-70 Kdaltons).

Un même polypeptide de 70 Kdaltons a été détecté avec les trois types d'anticorps suggérant chez la néréis l'existence d'un petit nombre de précurseurs mais de masse moléculaire élevée (Guissi-Kadri, 1989).

C - Purification de la neurohormone inhibitrice de la spermatogénèse

Les essais de purification de la neurohormone cérébrale impliquée dans le contrôle de la spermatogénèse ont débuté dès 1963 (Durchon *et al.*).

Cette molécule, également nommée Néréidine (Durchon, 1984), a un faible poids moléculaire (\approx 2000 daltons) ; elle n'absorbe pas à 254 nm ce qui exclut la présence éventuelle d'acides aminés aromatiques (Cardon, 1970; Cardon *et al.*, 1981).

Sa structure a été proposée comme étant N-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-C (Durchon, 1984; Porchet *et al.*, 1985). L'activité biologique des peptides synthétisés chimiquement à partir de la séquence supposée de la neurohormone n'a pu formellement être démontrée.

Le terme de Néréidine repose sur des faits expérimentaux qui ont attribué à une même molécule plusieurs fonctions physiologiques (contrôle de la gamétogénèse, croissance somatique, régénération). Nous basant sur la fonction biologique de la molécule, objet de notre attention, nous introduisons le terme de "facteur inhibiteur de la spermatogénèse" (SIF) pour la désigner. Cette molécule fait partie de la famille de la Néréidine sans que nous puissions présager si cette notion repose sur une base structurale.

V - Objectifs de notre travail

Jusqu'en 1985, le facteur inhibiteur de la spermatogénèse (SIF) était extrait à partir d'homogénats de cerveaux de Néréis. Dans ces conditions de préparation, il fallait un équivalent de 4 cerveaux pour obtenir l'inhibition *in vitro* de la spermatogénèse. Les travaux de Cardon et

Porchet (1981) ont abouti à l'obtention d'une fraction hormonale purifiée, en quantité toutefois insuffisante pour permettre les analyses nécessaires à la détermination de la séquence.

C'est pourquoi il a été indispensable de mettre au point une nouvelle méthode de purification. Durchon et Schaller (1964) ont montré que des cerveaux isolés maintenus *in vitro* sur un milieu de culture approprié continuent à sécréter le SIF. Bulet et Porchet (1986) ont modifié les techniques mises au point par les auteurs précédents en particulier en utilisant un milieu de culture compatible avec une survie satisfaisante des cerveaux mais simplifié de manière à être utilisable directement pour la purification du SIF.

C'est à partir de cette source hormonale plus concentrée (0,2 équivalent cerveau entraînent une inhibition *in vitro* de la spermatogenèse) que nous avons entrepris les travaux d'isolement du SIF.

Au cours des différentes étapes de sa purification, la présence du facteur inhibiteur de la spermatogenèse est détectée grâce à son activité biologique *in vitro*. Il faut 6 jours en moyenne pour que la maturation des spermatogonies en spermatozoïdes se déclenche dans les cultures témoins. Ainsi, toute prolongation de cette durée dans une culture expérimentale traduira la présence de la neurohormone.

Le test biologique nécessite donc au moins 8 jours d'attente pour obtenir une réponse. Ce délai est difficilement compatible avec les travaux portant sur l'isolement de la neurohormone.

Notre but, dans le cadre de ce travail, a été d'essayer de mettre au point un test moins long qui permette de détecter le facteur inhibiteur de la spermatogenèse au cours des étapes de purification.

Pour localiser des neuropeptides au cours de leur purification, la technique la plus employée à l'heure actuelle, si l'on excepte le test biologique, est la détection immunologique. De nombreux peptides ont été purifiés à l'aide de ce type de test, chez les vertébrés et chez les invertébrés. En particulier, des enképhalines chez *Mytilus edulis* (Leung et Stefano, 1984), le RFamide de l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (Grimmelikhuijzen et Graff, 1986), des peptides apparentés à la gastrine/cholécystokinine chez le crustacé *Palaemon serratus* (Favrel *et al.*, 1987), un peptide apparenté à l'arginine vasopressine chez le criquet *Locusta migratoria* (Proux *et al.*, 1987), ont été purifiés et caractérisés en utilisant des dosages immunologiques comme procédé de détection.

L'objectif initial de notre travail a été d'obtenir un anticorps dirigé contre le facteur inhibiteur de la spermatogenèse. Nous espérons ainsi pouvoir disposer d'un moyen de détection rapide et sensible, complémentaire du test biologique.

Ne disposant que d'une fraction enrichie en SIF, nous avons dû avoir recours à une méthode alternative de celle classiquement utilisée pour l'obtention de sondes immunologiques : la production d'anticorps monoclonaux.

Les raisons pour lesquelles nous avons utilisé cette technologie sont de plusieurs natures :

- Cette méthode offre la possibilité de produire des anticorps dirigés contre des antigènes précis après une immunisation avec un mélange complexe.
- Etant donné que de nombreux clones de cellules hybrides peuvent être générés et sélectionnés, il est théoriquement possible de détecter des antigènes même s'ils sont rares.
- Les anticorps monoclonaux, contrairement aux anticorps polyclonaux, sont des réactifs homogènes qui peuvent être obtenus indéfiniment (ce qui dans notre cas s'avère fort utile).

Chez les Invertébrés, cette technologie a surtout été utilisée jusqu'à présent, à des fins topographiques et pour l'étude du développement du système nerveux chez la sangsue (Zipser et Mc Kay, 1981), chez la drosophile (Fujita *et al.*, 1982) et chez le cafard (Denburg *et al.*, 1986).

L'utilisation des anticorps monoclonaux en tant que marqueurs de neurosécrétions est plus récente. Boilly-Marer *et al.* (1987) ont produit des anticorps qu'ils ont sélectionnés en fonction de leur reconnaissance de neurones dont par ailleurs l'immunoréactivité vis-à-vis de l'anti-vasopressine et de l'anti-angiotensine avait été montrée. Ils disposent ainsi de sondes permettant d'envisager l'isolement des molécules antigéniques reconnues. Par ailleurs, Holder *et al.* (1988) ont utilisé comme critère de sélection, la réactivité des anticorps vis-à-vis de granules de neurosécrétion des cellules de la *pars intercerebralis* de *Locusta migratoria*.

Dans le cadre de notre travail, le critère retenu a été la réactivité vis-à-vis d'une fraction biologiquement active, contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse, que nous avons purifiée.

Nous avons d'abord produit et sélectionné un anticorps dirigé contre une neurosécrétion cérébrale purifiée.

Nous nous sommes ensuite attachés à caractériser l'antigène reconnu par cet anticorps.

Enfin, nous avons localisé les cellules contenant cet antigène au niveau du système nerveux central de *Nereis virens*.

MATERIEL ET METHODES

I - Matériel biologique

Les *Nereis virens* ont été obtenues auprès d'une ferme d'élevage industriel (Bruinisse, Hollande).

Au laboratoire, les animaux sont conservés à 15°C dans des aquariums contenant du sable et de l'eau de mer oxygénée en permanence.

Une ponction coelomique examinée au microscope photonique permet de déterminer l'état génital des vers. Pour les femelles, il est fonction du diamètre moyen des ovocytes observés à travers un oculaire micrométrique. Nous n'avons retenu pour nos expériences que les animaux dont le sexe est indéterminable et les femelles ayant des ovocytes dont le diamètre n'excédait pas 80 μm . Le stade de la spermatogenèse, chez les mâles, est apprécié par simple observation de la morphologie des cellules germinales.

II - Préparation des fractions antigéniques

Les souris ont été immunisées d'abord par un homogénat de cerveaux puis par une fraction obtenue par chromatographie liquide à haute performance.

A - Homogénats de cerveaux

Des cerveaux de jeunes *Nereis virens* (diamètre ovocytaire inférieur à 80 μm) sont homogénéisés dans du tampon phosphate 0,01 M, NaCl 200 mM, pH 7,4, à raison de 25 cerveaux dans 0,5 ml pour une immunisation. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes, le surnageant est prélevé en vue de son utilisation pour l'immunisation des souris ou les tests immunoenzymatiques.

B - Nécrotions cérébrales

1- Mise en culture des prostomiums

Les sécrétions sont recueillies dans le milieu d'incubation *in vitro* de prostomiums de *Nereis virens*. Les méthodes décrites ci-dessous sont issues des techniques publiées par Bulet et Porchet (1986) et Bulet et Delaire-Hesdin (1988).

Les prostomiums de jeunes *Nereis virens* (de sexe indéterminé ou ayant des ovocytes dont le diamètre est inférieur à 80 μm) sont maintenus en culture 9 jours sur une grille en acier recouverte d'un filtre Millipore (taille de pores : 8 μm) au contact d'un milieu simplifié renouvelé intégralement tous les trois jours :

- eau de mer artificielle	8	ml	
- acides aminés essentiels (X 100, Serva)	100	μl	
- acides aminés non essentiels (X 100, Serva)	100	μl	
- glucose	10	mg	
- céphalosporine (Sigma)	10	mg	
- Hepes 1	100	μl	qsp 10 ml

ajusté à pH 7,4 avec NaHCO_3 0,4 % dans l'eau de mer artificielle.

2 - Chromatographie sur Biogel P_2 du milieu de sécrétion

Le milieu contenant les sécrétions des cerveaux de la Néréis est ensuite chromatographié par tamisage moléculaire sur une colonne (100 cm x 4,5 cm) de Biogel P_2 (200-400 mesh, Biorad). Les molécules sont éluées au débit de 40 ml/h, par le tampon :

NaCl	0,5 M
NH_4HCO_3	10 mM

3 - Préparation de l'échantillon pour l'injection en chromatographie liquide à haute performance

Les fractions contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse sont chromatographiées sur une cartouche Sep Pak C_{18} (Waters) afin d'éliminer les sels.

L'échantillon est déposé sur la cartouche Sep Pak qui est ensuite lavée par de l'eau bidistillée. Ce lavage permet de séparer de la fraction biologiquement active tous les composés hydrophiles tels que les sels et les éléments du milieu de culture de faible poids moléculaire. Le SIF est élué par le mélange ternaire acétonitrile / isopropanol / eau dans les proportions 10 / 15 / 75, par volume.

Les fractions issues de la cartouche Sep Pak sont évaporées sous vide et reprises par de l'eau distillée.

4 - Purification par chromatographie liquide à haute performance

Elle a été effectuée sur une colonne μ bondapak C₁₈ (300mm de longueur x 4,6 mm de diamètre interne, Waters) reliée à un système monopompe LKB. La densité optique des molécules éluées est lue à 226 nm. Les solvants utilisés sont l'acétonitrile (Backer) et l'eau (Milli Q, Millipore). Les fractions sont collectées à la main.

La fraction contenant le facteur inhibiteur de la spermatogénèse recueillie après cette étape a été utilisée pour l'injection intraveineuse permettant de stimuler la réponse immunitaire des souris quelques jours avant la réalisation de la fusion.

C - Test biologique

Il permet de repérer le facteur inhibiteur de la spermatogénèse dans les fractions obtenues au cours de sa purification, son activité biologique est détectée en culture organotypique. La technique employée est celle de Chen (1954) modifiée par Durchon et Schaller (1964) et Durchon et Porchet (1971).

Les parapodes prélevés sur des *Nereis diversicolor* mâles (stade spermatogonies) sont déposés sur des rondelles de papier filtre (type papier Joseph) flottant sur 500 μ l de milieu de culture contenu dans un verre de montre. Ce dernier est placé dans une boîte de Pétri sur du coton hydrophile imbibé d'eau bidistillée stérile.

Le milieu de culture est constitué par :

- eau de mer artificielle (glucose 0,1 %)	4,5 ml
- albumine d'oeuf	1,5 ml
- sérum de cheval	1 ml
- embryon de poulet	1 ml
- spécilline (100 000 UI/ml)	1 ml
Total	9 ml

Les boîtes de Pétri sont incubées à 23°C.

Une fraction aliquote (100 μ l au maximum) des différents extraits obtenus après chaque étape de purification est déposée dans le verre de montre en même temps que le milieu de culture. Une culture témoin est constituée par des parapodes placés en conditions an hormonales : les spermatogonies qu'ils contiennent présentent une évolution rapide et le stade de spermatozoïde

est atteint dans un délai de 6 jours en moyenne. Celui-ci est pris comme base de référence pour le dosage de l'activité hormonale : il indique le nombre de jours nécessaire au déclenchement de la maturation génitale en absence d'hormone.

En présence d'une fraction contenant le facteur hormonal, les spermatogonies restent quiescentes pendant 3 à plus de 15 jours, délai variant selon la quantité d'hormone introduite dans le milieu de culture.

III - Production des anticorps monoclonaux

Le protocole employé dérive directement des travaux de Köhler et Milstein (1975) et est largement inspiré du traité de Campbell (1984).

A - Protocole d'immunisation

Les souris âgées d'environ 8 semaines ont d'abord été immunisées par voie sous-cutanée avec un homogénat de 25 cerveaux de *Nereis virens* mélangé à un volume d'adjuvant complet de Freund (voir paragraphe II, A).

Deux semaines plus tard, un homogénat de 50 cerveaux additionné d'adjuvant complet de Freund a été injecté dans la cavité intrapéritonéale. Cette injection a été répétée deux fois à quinze jours d'intervalle.

Le sérum des souris a été testé afin de déterminer la qualité de la réponse immunologique vis-à-vis d'un homogénat de cerveaux puis vis-à-vis de la fraction contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse.

Une souris donnant une réponse satisfaisante a subi une injection intraveineuse supplémentaire de la fraction biologiquement active issue du passage sur colonne μ bondapak C₁₈, dans l'espoir que les lymphocytes sécrétant des anticorps spécifiques de cette fraction, soient ainsi stimulés préférentiellement.

B - Préparation des cellules nourricières

Certaines étapes délicates de la culture des hybridomes (fusion, clonage, décongélation) nécessitent la coopération de cellules "nourricières" qui fournissent en particulier des facteurs de croissance. Nous avons utilisé des cellules péritonéales de souris qui

Tableau 1 - Milieux utilisés pour la culture cellulaire

Milieu D : Milieu de culture de DULBECCO

- 1 sachet de milieu sec : milieu essentiel de Eagle modifié selon Dulbecco (Eurobio) reconstitué dans 5 l d'eau distillée
- Antibiotiques (péni- strepto 100 UI et 100 µg/l)
- NaHCO₃ bicarbonate 3,7 g/l

pH ajusté à 7,5 ; filtré sur membrane 0,22 µm

Milieu A : Milieu de culture complet

- Milieu D
- SVF : sérum de veau foetal 10 % décomplémenté 1/2 h à 56°C
- Acides aminés non essentiels de Eagle 100 X (Eurobio) 1,2 %
- Glutamine (Eurobio) 2,4 %

Milieu de sélection : HAT

- Milieu A
- HAT: Hypoxanthine 10⁻⁴M
- Aminoptérine 4.10⁻⁴M
- Thymidine 4.10⁻⁴M

Milieu de transition : HT

- Milieu A
- HT: Hypoxanthine 10⁻⁴M
- Thymidine 4.10⁻⁴M

Milieu de congélation

- SVF 9 V
- Dimethylsulfoxyde (DMSO) 1 V

Milieu à l'HEPES : MF employé pendant

les étapes de la fusion cellulaire

- Milieu D sans carbonate
- HEPES 5,9 g/l
- NaCl 1,74 g/l
- NaHCO₃ 0,35 g/l

pH ajusté entre 7,2 et 7,4

Milieu de fusion

- PEG Kodak 5000, 30 g dissous dans 42 ml de tampon phosphate 0,01 M NaCl 0,015 M ; pH 7,2
 - DMSO 6,2 ml
- Autoclavé à 120°C pendant 20 minutes

offrent l'avantage de contenir des macrophages qui phagocytent les débris de cellules assainissant ainsi le milieu. Les cellules sont obtenues par lavage de la cavité péritonéale de souris (Balb/C ou Swiss) par injection de 5 ml de milieu de culture. Les cellules obtenues à partir d'une souris sont mises en suspension dans un volume total de 12 ml et réparties en plaque de culture.

C - Obtention des lymphocytes

La rate de la souris est prélevée et placée dans une boîte de Pétri stérile.

Une suspension de cellules libres est obtenue en dilacérant la rate puis en l'écrasant sur un tamis métallique. Le tamis est régulièrement rincé par du milieu à l'HEPES (MF) (voir tableau de composition des milieux). Le filtrat est ensuite centrifugé 5 minutes à 1500 tours/mn.

Le culot est repris par 5 ml de milieu MF.

D - Préparation des myélomes

La lignée SP₂O/Ag 14 a été utilisée d'une part parce qu'elle ne sécrète pas d'immunoglobulines, d'autre part, du fait de sa déficience en hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase. Cette particularité fait qu'en présence d'aminoptérine dans le milieu de culture, les cellules du myélome ne peuvent pas se multiplier et meurent. Ceci permettra leur destruction sélective après la fusion.

Les cellules sont mises en suspension dans leur milieu de culture, centrifugées à 1500 tours/mn pendant 5 minutes. Le culot est lavé deux fois par du milieu MF. Enfin, il est repris par 5 ml de MF.

E - Fusion cellulaire

La fusion cellulaire est réalisée à l'aide du polyéthylène glycol (PEG). Elle s'effectue dans un tube à centrifuger dans lequel on a mélangé les lymphocytes et les cellules du myélome à raison d'environ 5 cellules spléniques pour 1 myélomateuse. L'ensemble est centrifugé à 1000 tours/mn pendant 5 minutes. Les cellules sont remises en suspension, puis le milieu de fusion porté à 37°C (voir tableau de composition des milieux) est ajouté, goutte à goutte, sous agitation douce en 45 secondes.

Ensuite, 1 ml de MF est ajouté selon le même principe, puis 20 ml de MF en 4 minutes sous agitation continue.

Les cellules sont ensuite lavées en milieu MF afin d'éliminer le PEG puis reprises dans du milieu A (voir tableau de composition des milieux). La suspension est ensuite distribuée sur plaques à 96 puits dans le fond desquels séjournent depuis 24 heures les cellules nourricières. Les plaques sont ensuite placées en étuve à 37°C, humide et sous atmosphère à 5 % de CO₂.

F - Sélection des cellules hybrides

24 heures après la fusion, 50 µl de milieu HAT sont ajoutés dans chaque puits afin de débiter la sélection des hybridomes. 48 heures après la fusion, 50 µl de milieu HAT sont à nouveau ajoutés. Le troisième jour après la fusion, le milieu de chaque puits est remplacé par du milieu HAT "neuf". Les cultures sont laissées au repos pendant une semaine. Environ deux semaines après la fusion, les cellules myélomateuses étant mortes, le milieu sélectif HAT est remplacé par du milieu HT permettant la transition avec du milieu normal qui sera introduit, progressivement, environ une semaine après le milieu HT. Les surnageants des cultures peuvent être testés lorsque les cellules sont à confluence.

G - Détection des cultures ayant une sécrétion immunoréactive

Tous les surnageants de culture ont été testés par ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) (voir paragraphe IV).

H - Expansion des cultures à sécrétion positive

Les cellules produisant une sécrétion positive sontensemencées dans des récipients de plus en plus grands. Lorsque les cellules d'une même culture atteignent le nombre de 15 millions au minimum, elles sont congelées.

I - Congélation

Les cellules destinées à être congelées sont mises en suspension, centrifugées et reprises par 1 ml de milieu de congélation (voir tableau de composition des milieux).

Les suspensions cellulaires sont réparties en ampoules de congélation (Nunc) et stockées dans l'azote liquide.

J - Clonage

Le clonage est effectué par la technique de la dilution limite. Les cellules sont mises en suspension et diluées de façon sériée afin de n'avoir statistiquement que 20 cellules/ml de milieu. Cette suspension est répartie sur plaques à 96 puits à raison de 50 μ l/puits, soit en principe une cellule par puits.

IV - Sélection des hybridomes

La méthode utilisée est un test immunoenzymatique en phase solide ou ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Il a l'avantage d'être facile à mettre en oeuvre et de posséder une grande sensibilité.

A - Préparation des plaques pour les tests

Les antigènes utilisés successivement pour la sélection des anticorps ont été :

1 ° - l'homogénat de cerveau total

Dans chaque puits d'une plaque souple (Falcon), 50 μ l d'homogénat ont été déposés soit 1/2 équivalent cerveau par puits.

2 ° - le milieu de sécrétion *in vitro* de cerveaux de *Nereis virens*

Le milieu simplifié contenant les sécrétions de cerveaux a été utilisé à raison de 50 μ l de milieu par puits préparé selon le paragraphe II B.

3 ° - les fractions issues d'injections en chromatographie liquide à haute performance

L'ensemble des fractions issues du passage sur une colonne μ bondapak C₁₈ est évaporé sous vide puis repris dans l'eau.

50 μ l de chaque fraction sont déposés par puits auxquels sont ajoutés 50 μ l de bicarbonate de sodium 50 mM. Le rôle de ce tampon est d'amener les fractions à un pH (basique) qui favoriserait la fixation des antigènes sur les parois du puits de la plaque de microtitration.

Dans chaque cas les antigènes sont laissés en contact avec la plaque pendant une nuit à 4°C. Les sites restés inoccupés dans les puits sont saturés par une solution à 2 % de sérum albumine bovine dans le tampon phosphate 0,01 M, NaCl 200 mM.

Les puits sont lavés deux fois avec du tampon phosphate contenant 0,1 % de sérum albumine bovine (= PBS 0,1 % SAB)

Les plaques sont séchées et conservées à 4°C pendant quelques semaines au plus.

B - Révélation de l'activité des surnageants de culture d'hybridomes

Le surnageant des puits de culture d'hybridomes ayant des cellules à confluence est prélevé et déposé dans les puits préparés selon le procédé que nous venons de décrire à raison de 100 μ l par test. Après 2 heures d'incubation à 37°C, les puits sont lavés trois fois avec PBS 0,1% SAB. L'anticorps de lapin anti-immuno-globulines G+M de souris (Nordic) marqué à la peroxydase (au 1/5000 dans du PBS 0,1 % SAB) est ensuite déposé dans les puits 2 heures à 37°C. Les puits sont lavés 5 fois par PBS 0,1 % SAB. La révélation de l'activité peroxydase est réalisée en utilisant l'orthophénylène diamine (Sigma) dans la solution suivante :

9 mg orthophénylène diamine
 25 ml tampon phosphate 0,1 M ajusté à pH 5,5 avec l'acide citrique 1 M
 16 μ l H₂O₂ 30 %

L'incubation avec le substrat est réalisée pendant 30 mn à 37°C.

L'intensité de la réponse obtenue est mesurée au lecteur de plaque à 490 nm.

V - Techniques immunologiques

A - Immunohistologie

Des prostomiums et des fragments du corps de *Nereis virens* ont été fixés au Bouin Hollande sans acide acétique additionné d'une solution de chlorure de mercure saturée.

Après déshydratation, les pièces sont incluses dans du paraplast et débitées en coupes sériées de 7 μ m d'épaisseur.

Les coupes sont déparaffinées et laissées dans le tampon Coons :

Barbiturate de sodium	2,06 g
NaCl	8,5 g
qsp 1 l	
ajusté à pH 7,2 avec HCl	

au minimum un quart d'heure.

Elles sont ensuite incubées dans du sérum de lapin sain dilué au 1/10e dans du Coons. Le surnageant de culture contenant l'anticorps monoclonal est laissé en contact avec les coupes une nuit à température ambiante. Après deux lavages de 10 mn dans le tampon Coons, elles sont incubées une heure trente avec un anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris couplé à la biotine (Jackson immuno research).

Les coupes sont ensuite lavées 2 fois 10 mn dans le tampon Coons puis mises en contact avec de l'avidine marquée à la peroxydase (Vector laboratories), 40 mn.

La révélation s'effectue avec la diaminobenzidine (DAB, Sigma)

- DAB	100 mg
- Tris	0,05 M
- NaCl	0,15 M
- 0,01 % H ₂ O ₂ à 30 %	
qsp 200 ml, pH 7,6	

pendant 5-7 mn à l'obscurité

La réaction est stoppée par lavage avec de l'eau.

B - Coloration histologique

Le marquage obtenu après réaction des anticorps est éliminé selon la technique de Tramu *et al.* (1978). Les coupes sont immergées dans l'acétone quelques minutes. Après un rinçage à l'eau distillée elles sont trempées dans une solution :

H ₂ SO ₄ 5 %	1	volume
KMnO ₄ 2,5 %	1	volume
eau distillée	80	volumes

pendant 10 à 15 mn.

Elles sont rincées à l'eau distillée et passées rapidement dans un bain de métabisulfite de sodium à 0,5 % dans l'eau. Après un rinçage à l'eau distillée, les coupes peuvent alors être colorées selon la méthode de Clark (1955).

Cette coloration histologique a pour but de faciliter la caractérisation des cellules immunoréactives et de déterminer si elles sont ou non fuchsinophiles (élément en faveur de leur fonction neurosécrétrice).

C - Détermination de la sous classe de NV 24

La sous-classe de l'anticorps issu de la sélection a été déterminée selon la méthode décrite par Ouchterlony et Nielsson (1978).

Un surnageant de culture concentré par précipitation au sulfate d'ammonium et dialysé a été utilisé. Les immunoglobulines anti IgM, IgG, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ ont été obtenues auprès de la firme Sigma.

D - Electrophorèse des protéines cérébrales en milieu dénaturant

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Des gels de 0,75 mm d'épaisseur sont utilisés. Le gel de séparation est constitué par un gradient d'acrylamide 5-25 %.

Avant le dépôt, les protéines sont traitées 3 minutes au bain-marie bouillant dans le tampon :

Tris/HCl	62,5 mM	pH 6,8
SDS	2 %	(p/v)
saccharose	10 %	(p/v)
β -mercaptoéthanol	5 %	

Un mélange de protéines témoins de poids moléculaire 94 kDa (phosphorylase B), 67 kDa (albumine), 43 kDa (ovalbumine), 30 kDa (anhydrase carbonique), 20 kDa (trypsine inhibiteur), 14,4 kDa (α -lactalbumine) est analysé conjointement aux échantillons.

Après 16 à 28 heures de migration (4-5 mA), le gel est coloré pendant deux heures sous agitation par le bleu de Coomassie à 0,1 % dans le mélange isopropanol 25 % - acide acétique 10 % - eau 65 %. Il est décoloré par l'acide acétique à 10 %.

E - Transfert des protéines séparées par électrophorèse sur membrane Immobilon (Millipore)

Après la migration électrophorétique, le gel est équilibré 30 mn dans le tampon de transfert :

Tris	25	mM
Glycine	190	mM
Méthanol 10 %		(v/v)
SDS 0,01 %		(v/v)

L'Immobilon est d'abord activé par un passage dans le méthanol pur puis il est plongé 5 mn dans l'eau distillée enfin 5 mn dans le tampon de transfert.

Ensuite, sur une feuille de papier Whatman 1 imbibée de tampon de transfert on dépose successivement le gel, l'Immobilon puis une autre feuille de papier Whatman 1. Le tout est placé sur un support en plastique et l'ensemble est mis en place dans la cuve de transfert de manière à ce que la feuille d'Immobilon soit du côté de l'électrode positive. Le transfert dure 2 heures à 220 mA.

L'Immobilon est immergé pendant 2 heures dans le tampon de saturation :

Tris/HCl	10	mM pH 7,4
NaCl	150	mM
Lait écrémé en poudre 5 %		(v/v)
Tween 20 0,05 %		(v/v)

Après la saturation, l'Immobilon est incubé avec l'anticorps monoclonal pendant une

Après la saturation, l'Immobilon est incubé avec l'anticorps monoclonal pendant une heure à température ambiante et 1 nuit à 4°C, sous agitation. Après avoir été lavée 3 fois 10 mn par le tampon de lavage :

Tris/HCl	10	mM	pH 7,4
NaCl	150	mM	

la feuille d'Immobilon est alors incubée avec un anticorps de lapin anti-immunoglobulines G+M de souris marqué à la peroxydase (Nordic) pendant 1h 30 à température ambiante, sous agitation. Ensuite, l'Immobilon est lavé 3 fois 10 mn avec le tampon de lavage.

L'activité peroxydase est révélée avec le mélange :

50 ml Tris/HCl 10 mM
NaCl 150 mM
3 ml de chloronaphtol à 0,3 % dans le méthanol
10 µl H₂O₂ 30 %

La réaction est arrêtée avec de l'eau distillée.

RESULTATS ET DISCUSSION

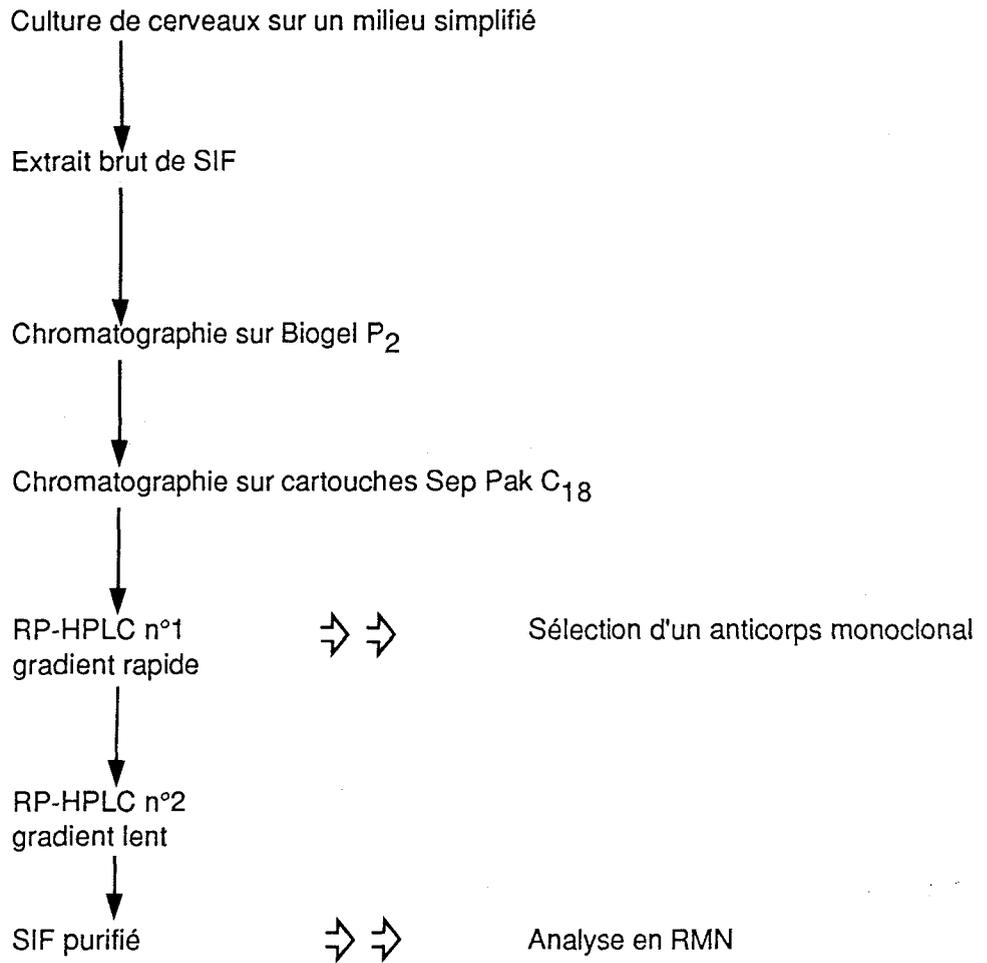


Figure 12 - Purification du facteur inhibiteur de la spermatogenèse

I - Purification du facteur inhibiteur de la spermatogénèse.

(travail effectué en collaboration avec P. Bulet)

A - Résultats

La purification a été entreprise en utilisant le milieu de sécrétion *in vitro* de cerveau de Néréis dont il a été montré qu'il contient le SIF (Bulet et Porchet 1986). Le protocole d'extraction est résumé par la figure 12.

Un exemple de fractionnement du milieu de sécrétion sur Biogel P₂ est montré figure 13. Les fractions obtenues ont été regroupées en cinq parties :

- fraction I : correspondant aux molécules exclues du gel
- fraction II : contenant l'essentiel de l'antibiotique utilisé lors de la culture (voir chapitre IIB des méthodes)
- pic I : correspondant à la zone d'éluion des sels (volume total de la colonne)
- pic II, pic III contiennent des molécules éluées après le volume total.

Chaque fraction a été soumise au test biologique afin de rechercher la présence du SIF. L'activité biologique a été détectée dans les fractions "pic I et pic II".

Du fait de la teneur élevée en NaCl (0,5 M) du tampon d'éluion, la fraction SIF doit subir une étape de dessalage avant son analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC). De toutes les techniques essayées (chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'adsorption, chromatographie en phase inverse), ce sont les cartouches Sep Pak C₁₈ (séparation en phase inverse) qui se sont avérées être les plus performantes. L'éluion du SIF et des principales neurosécrétions présentes dans les fractions pic I et pic II est réalisée avec le mélange ternaire (acétonitrile/isopropanol/eau ; 10/15/75 ; par volume) avec un rendement de 80 % estimé grâce au test biologique.

La figure 14 représente une séparation caractéristique obtenue après injection sur une colonne μ bondapak C₁₈ (Waters). Le test biologique réalisé sur les fractions issues de cette séparation montre que le SIF est élué entre 50 et 58% d'acétonitrile.

Le produit de plusieurs séparations a été rassemblé et utilisé pour effectuer le dernier rappel avant la fusion ainsi que la dernière étape de sélection des anticorps monoclonaux.

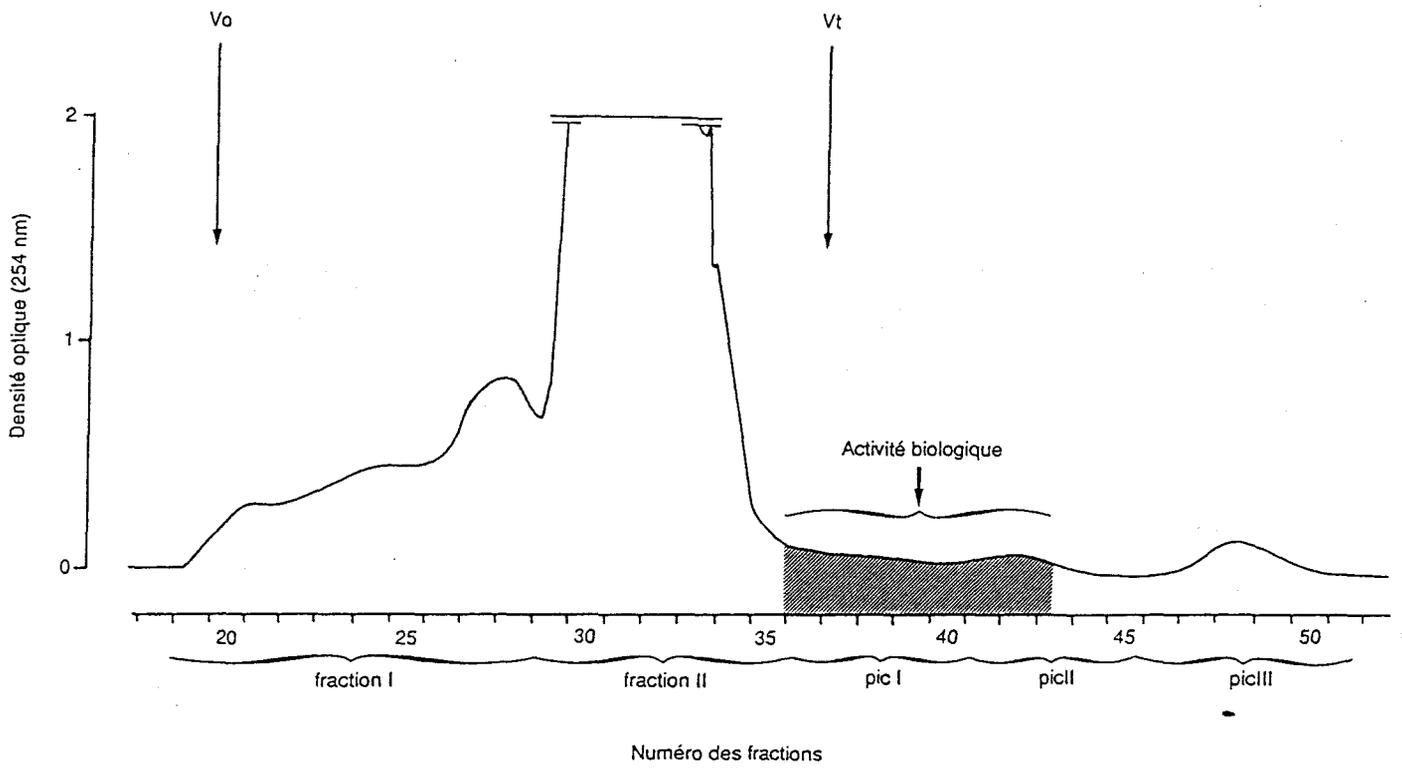


Figure 13- Profil d'élution du milieu de sécrétion des cerveaux de *Nereis virens* sur Biogel P₂.

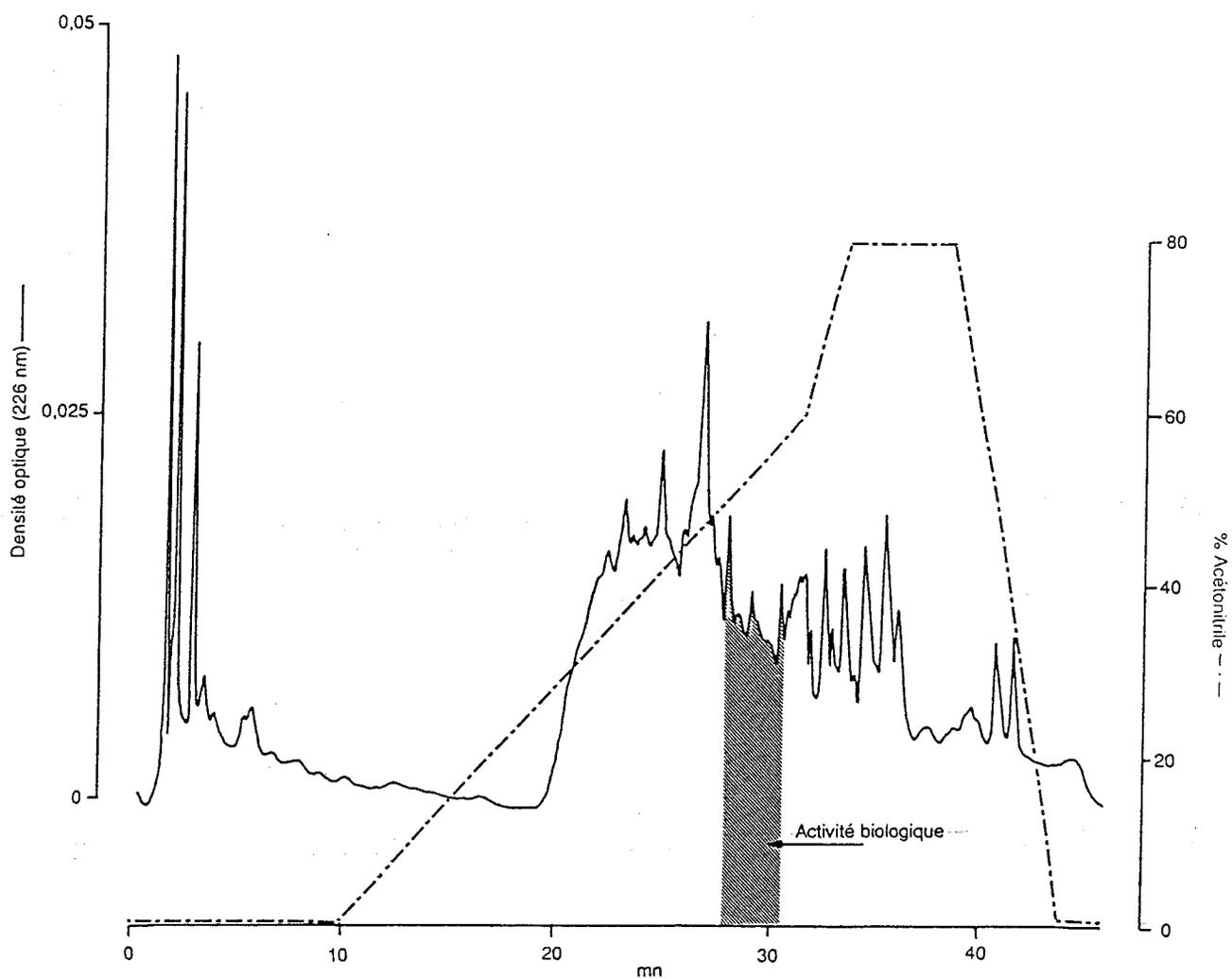


Figure 14 - Profil d'élution obtenu après chromatographie liquide à haute performance en phase inverse de la fraction biologiquement active issue du passage sur Biogel P₂. Colonne μ Bondapak C₁₈, débit 1 ml/mn, Vitesse du papier 5mm/mn.

B - Discussion

L'utilisation d'un milieu de culture simplifié ne contenant que des acides aminés, du glucose et de la céphalosporine dans l'eau de mer artificielle a permis de pouvoir envisager la purification du SIF en peu d'étapes à partir d'une source hormonale beaucoup plus concentrée que celle obtenue à partir d'homogénats de cerveau.

L'intérêt de ce procédé réside dans le fait que le cerveau des Néréis, dans les conditions naturelles, sécrète pratiquement en permanence le SIF sans stimulation particulière. On peut toutefois supposer que son isolement lors de la mise en culture puisse constituer un facteur de stimulation.

Le cerveau maintenu en culture relargue dans un premier temps le SIF contenu dans les cellules sécrétrices puis, au bout de 4 à 5 jours de culture, débute la synthèse des neurosécrétions qui sont à leur tour libérées dans le milieu (Bulet, communication personnelle).

Ainsi, dans un homogénat de cerveaux seuls les neuropeptides présents à un temps donné sont extraits alors que dans le cas de la culture organotypique les cerveaux continuent à synthétiser des neurosécrétions.

La limitation d'une telle technique est liée à la possibilité de maintenir les cerveaux dans de bonnes conditions de survie. Dans notre cas, du fait de l'extrême simplicité du milieu de culture, ils ne peuvent être préservés que 9 jours. Au delà de cette période, l'activité sécrétrice diminue fortement du fait du mauvais état des cerveaux.

Le comportement très particulier du SIF sur la colonne de Biogel P₂ nous a été d'un grand secours puisqu'il permet d'éliminer l'essentiel de l'antibiotique contenu dans le milieu de culture. Un comportement similaire a déjà été remarqué dans le cas du "head activator" de l'hydre qui, soumis à une séparation en chromatographie de tamisage moléculaire, est élué près de deux volumes de colonne après le volume total (Schaller et Bodenmüller 1981).

Il faut noter la présence d'une fraction éluee très nettement après le volume total. Elle pourrait correspondre à des produits de dégradation de la céphalosporine ou à des neurosécrétions cérébrales.

La facilité d'utilisation des cartouches Sep Pak permet de traiter rapidement de grands volumes et d'obtenir une fraction très enrichie en SIF (jusqu'à 100 fois). De plus, l'élution du SIF est obtenue avec de faibles proportions de solvant organique (25 %) qui sont compatibles avec la conservation de son activité biologique.

La RP-HPLC est actuellement la technique la plus efficace pour la séparation des peptides et des polypeptides parce qu'elle offre les avantages d'un temps d'élution court, une excellente résolution avec des échantillons en faible quantité ainsi que de bons rendements.

De nombreux solvants peuvent être employés pour la séparation en RP-HPLC mais le choix du système dépend de la nécessité de retrouver les molécules intactes pour une analyse ultérieure. Comme de plus il est indispensable de pouvoir préserver le SIF pour le test biologique, un solvant volatile et un système de détection non destructif sont requis. L'eau et l'acétonitrile ont donc été choisis et l'absorbance UV à 226 nm a été retenue pour détecter les molécules issues de la séparation.

La colonne μ bondapak a été utilisée parce que le SIF est élué à un pourcentage moyennement élevé, ce qui permet un rendement optimal. Un gradient avec une pente assez forte a été retenu car sur un laps de temps très restreint de grands volumes d'échantillon peuvent être purifiés en vue de leur utilisation pour la production d'une sonde immunologique.

II - Production et sélection d'une sonde immunologique dirigée contre une neurosécrétion contenue dans la fraction biologiquement active purifiée par RP-HPLC

A - Résultats

Les lymphocytes d'une souris immunisée avec un homogénat de cerveau total et avec une fraction purifiée contenant le SIF de *Nereis virens* ont été fusionnés avec des cellules myélomateuses, selon le protocole décrit dans le paragraphe III des méthodes.

A l'issue de la fusion, l'activité immunologique des surnageants des puits contenant des hybridomes a été testée envers des homogénats de cerveau total. Parmi les 153 surnageants obtenus, 38 d'entre eux ont montré une immunoréactivité.

Nous avons ensuite sélectionné, parmi ces cultures, celles qui produisent des anticorps ayant une affinité vis-à-vis de molécules effectivement sécrétées par le cerveau de Néréis.

Parmi les 38 cultures "anti-cerveau total", 8 d'entre elles synthétisent des anticorps réagissant avec des neurosécrétions de cerveau.

Dans l'espoir de sélectionner un anticorps dirigé contre le SIF, nous avons opéré une troisième sélection en utilisant la fraction contenant le SIF, issue de la purification en RP-HPLC, comme antigène. Nous avons ainsi obtenu deux cultures d'hybridomes présentant à la fois une réaction positive avec la fraction SIF et négative avec les autres fractions. La culture ayant la plus grande réactivité a été clonée par dilution limite .

L'anticorps issu du clonage a été nommé NV 24, sa sous-classe a été déterminée par la technique d'Ouchterlony : NV 24 est une IgG₁ (fig. 15). Il a été produit par culture *in vitro* des hybridomes et *in vivo* en liquide d'ascite, puis purifié sur une colonne de protéine A-Sépharose.

B - Discussion

La technologie des hybridomes était toute indiquée pour la production de sondes immunologiques spécifiques de la fraction SIF parce qu'elle n'était disponible qu'en faible quantité et qu'elle était hétérogène.

De ce fait, nous ne pouvions pas envisager une immunisation directe des souris à l'aide de ce produit. C'est pourquoi, nous avons choisi de les immuniser avec un homogénat de cerveau total.

Une telle stratégie entraînait deux risques :

- d'abord, celui d'obtenir des anticorps dirigés contre des composants du cerveau sans intérêt dans le cadre de ce travail (neurofilaments, protéines de structure...);
- ensuite, on pouvait redouter que la quantité peu élevée de SIF présente dans le cerveau de Néréis induise une immunoréaction si faible qu'elle ne serait pas détectée au cours des étapes de sélection.

Cependant, la première phase de sélection était indispensable en raison des faibles quantités de fraction SIF disponibles.

La deuxième phase de notre sélection qui consiste à tester l'activité des anticorps envers le milieu de sécrétion *in vitro* de cerveau de Néréis, présente un intérêt majeur. Le milieu de culture ne contient que des substances effectivement sécrétées par le cerveau, autrement dit, des produits finis du métabolisme dont on peut raisonnablement suspecter qu'ils aient une activité biologique. L'homogénat de cerveau contient par contre un ensemble complexe d'autres molécules n'ayant pas toutes une relation avec des neuropeptides.

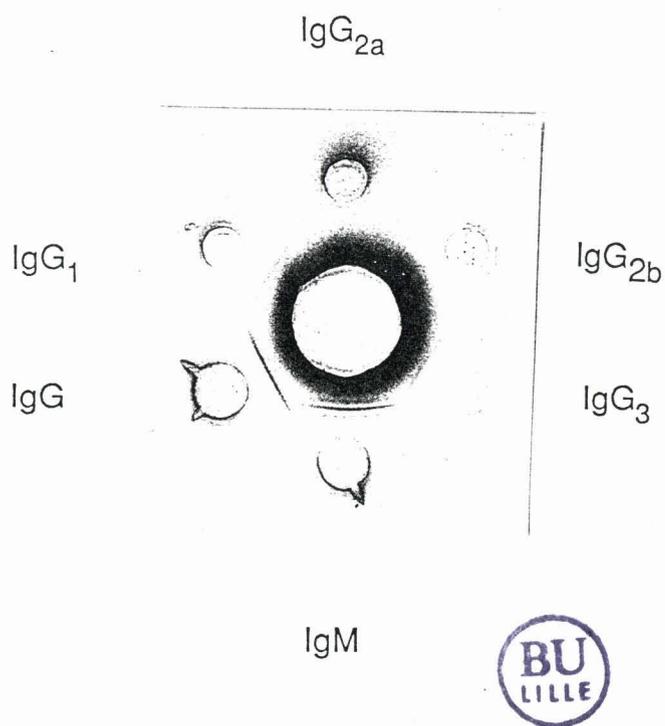


Figure 15 - Détermination de l'isotype de NV 24 par la technique d'Ouchterlony.

Le puits central contient l'anticorps NV 24.

Enfin, il était intéressant de tester l'activité des anticorps envers ce milieu de sécrétion car c'est à partir de celui-ci qu'est extrait le SIF.

Lors de la troisième étape de sélection, nous avons retenu un double critère : le ou les anticorps sélectionnés devaient non seulement être positifs vis-à-vis de la fraction SIF mais aussi être négatifs envers les autres fractions issues de la séparation en RP-HPLC. Nous espérions ainsi éviter les réactions croisées entre neuropeptides ayant des conformations voisines ce qui constitue une source d'erreur pour les tests ultérieurs.

III - Identification de l'antigène reconnu par l'anticorps NV 24

A - Purification de l'antigène par RP-HPLC

La sélection de l'anticorps NV 24 a été réalisée en utilisant un test d'immunodétection envers une fraction obtenue après une séparation en RP-HPLC réalisée avec un gradient rapide. Dès que nous avons disposé d'un matériel suffisant, nous avons entrepris la séparation des constituants de la fraction contenant le SIF.

Nous l'avons donc soumise à une seconde séparation, en réduisant la pente du gradient. Les fractions obtenues ont subi deux tests :

- un test d'activité biologique en culture organotypique
- un test d'antigénicité envers NV 24 par ELISA

Les résultats obtenus consignés sur la figure 16 montrent qu'activité biologique et immunoréactivité ne sont pas superposées. La fraction SIF est éluée entre 25 et 27 % d'acétonitrile alors que la fraction immunoréactive se présente sous la forme d'un pic élué à 22 % que l'on nommera par commodité pic A. Celui-ci a été ensuite soumis à un troisième passage en RP-HPLC (fig. 17) et les fractions issues de cette séparation ont été testées en ELISA. Nous avons ainsi déterminé que l'antigène reconnu par NV 24 est élué par 15 % d'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique.

L'étude de la fraction contenant le SIF et du pic A en résonance magnétique nucléaire (en collaboration avec le laboratoire de neurochimie de Strasbourg, Dr Luu Bang), a permis de montrer qu'ils sont tous deux de nature peptidique.

Des expériences préliminaires ont été réalisées pour déterminer la séquence du pic A (en collaboration avec le laboratoire du Professeur Tartar à Lille) selon le principe de la

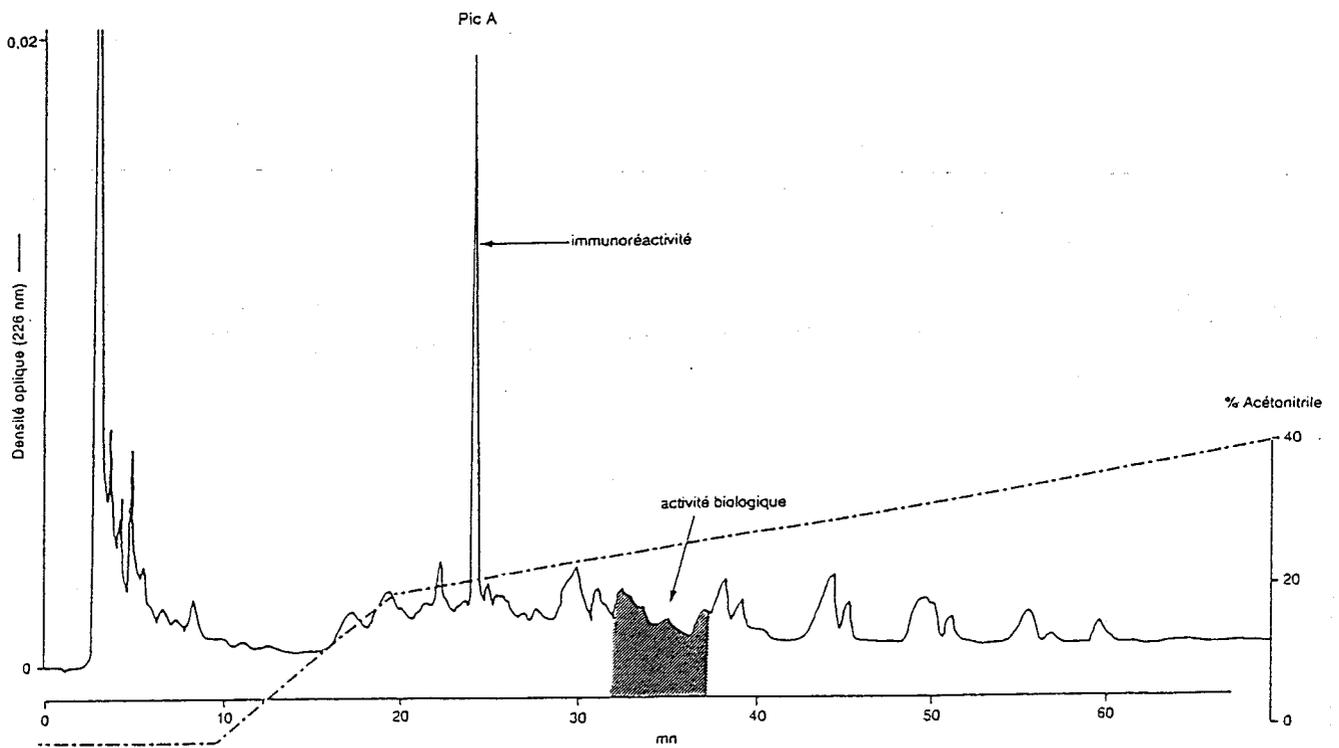


Figure 16 - Profil d'élution de la fraction biologiquement active issue de la première étape en RP- HPLC.

Les conditions sont les mêmes que celles utilisées pour la séparation précédente.

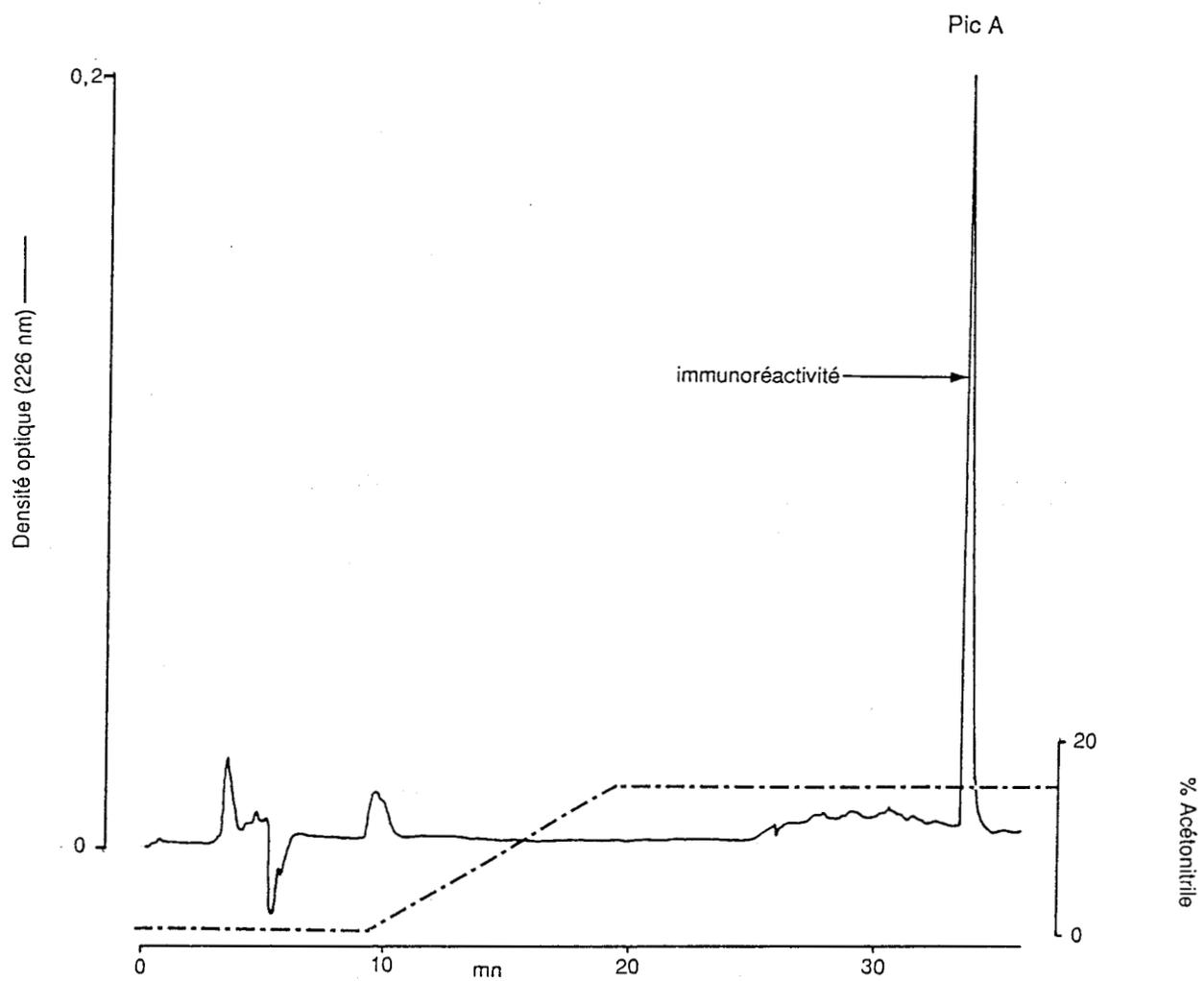


Figure 17 - Purification du pic immunoréactif envers NV 24 ; élution en système isocratique

dégradation d'Edman à l'aide d'un séquenceur automatisé. La présence de deux peptides a été détectée dans la fraction pic A, le début de leur séquence a été déterminée ; il s'agirait de Gln-Val-Pro -Gly (ou Glu) et de Glu-Leu-Trp-Glu (ou Gly) les analyses n'ont pu être poussées plus loin faute de matériel purifié.

B - Etude des molécules reconnues dans l'homogénat de cerveau total.

Nous avons éprouvé la réactivité de NV 24 vis-à-vis d'un extrait de protéines du prostomium de *Nereis virens*. Nous les avons homogénéisés dans le tampon utilisé lors du dépôt de l'échantillon en vue de l'électrophorèse (voir paragraphe D des méthodes). L'homogénat ainsi obtenu a été ensuite soumis à une séparation sur un gel de polyacrylamide (gradient 5-25 %) en milieu dénaturant.

Les protéines ainsi séparées ont été transférées et une immunodétection a été effectuée selon la méthode décrite au paragraphe E des méthodes.

Nous avons pu mettre en évidence deux protéines immunoréactives majeures dont le poids moléculaire est d'environ 75,8 kDa et 109 kDa (fig. 18). D'autres protéines sont aussi faiblement révélées, peut-être de façon non spécifique .

C - Localisation immunohistochimique des antigènes reconnus par NV 24 dans le système nerveux central de *Nereis virens*

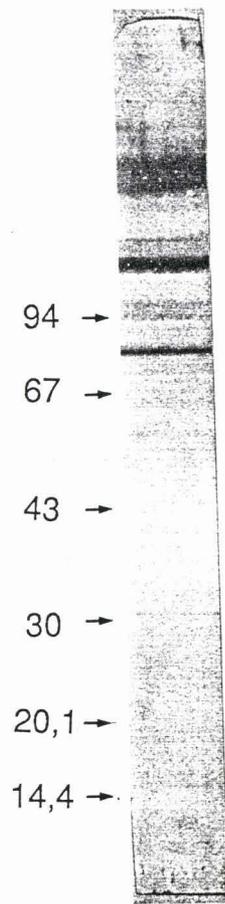
La présence de molécules immunoréactives a été détectée dans le cerveau et dans la chaîne nerveuse.

1 - Le cerveau

La répartition des noyaux immunoréactifs a été reportée sur la figure 19.

Des cellules immunoréactives ont été observées dans 8 noyaux se répartissant en 3 régions (les résultats sont résumés dans le tableau III) :

- La partie antérodorsale contient 4 noyaux immunoréactifs (7, 8, 9, 10), figure 20b, c, d. Dans chaque noyau 2 à 4 cellules sont réactives. Leur diamètre est compris entre 9 et 10 μm pour les noyaux 7, 8, 9 et 27 μm pour le noyau 10. Après décoloration et recoloration par la



PM (KDa)

Figure18 - Immunodétection de protéines cérébrales par NV 24 .

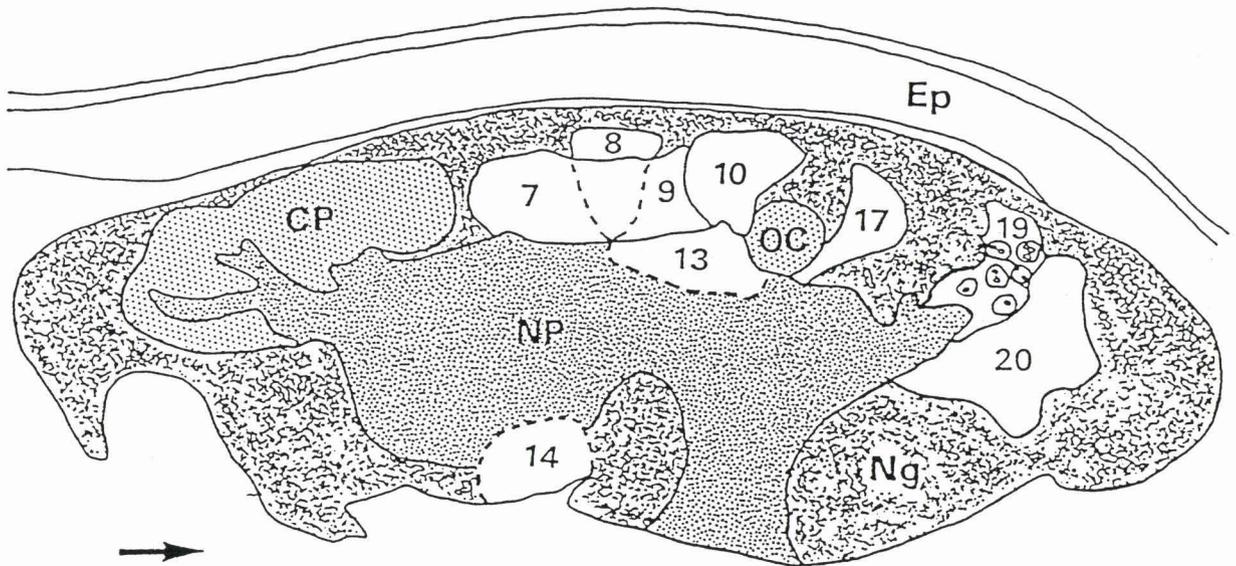


Figure 19 - Représentation schématique de la répartition des noyaux immunoréactifs envers NV 24 dans le cerveau de *Nereis virens* (coupe sagittale).

Tableau III - Noyaux du cerveau de Nereis virens immunoréactifs envers l'anticorps NV 24

Noyaux	Localisation dans le cerveau	Nombre de cellules immunoréactives envers NV 24	Fuchsinophilie après la coloration de Clark
7	Latéro dorsal	3	-
8, 9, 10	médio dorsal	8	+ (noyau 8)
13	médio latéral	5	-
14	ventro latéral	4	+
17	postéro dorsal	3	+
20	postéro ventral et postéro dorsal	8	+++ mais quelques cellules sont négatives

technique de Clark, des cellules fuchsinophiles sont trouvées uniquement au niveau des cellules immunoréactives du noyau 8.

- Dans la partie ventrolatérale (noyau 14), figure 20f et médiolatérale (noyau 13), figure 20d, 4 à 5 cellules immunoréactives sont mises en évidence. Leur diamètre est de 12 μm pour le noyau 13 et 9-12 μm à 30 μm pour le noyau 14. Ces deux noyaux montrent une forte fuchsinophilie au niveau des cellules immunoréactives.
- Dans la région postérieure 2-3 cellules sont réactives dans le noyau 17 figure 20c et environ 6 dans le noyau 20, figure 20a, c, e. Leur diamètre est de 9 à 15 μm pour le noyau 17 et de 9 à 28 μm pour le noyau 20. Toutes les cellules réactives du noyau 17 sont fuchsinophiles alors que dans le noyau 20 coexistent des cellules immunoréactives fuchsinophiles et non fuchsinophiles. Dans la partie postérieure du cerveau, des varicosités immunoréactives matérialisant les trajets axoniques ont été observées le long des trajets nerveux, dans le neuropile.

2 - La chaîne nerveuse ventrale

Environ 6 cellules sont immunoréactives dans le groupe antérieur figure 20g. Aucune réaction n'a été observée dans les deux autres groupes. La coloration selon Clark indique l'existence d'une forte fuchsinophilie au niveau des cellules immunoréactives.

Dans tous les cas, l'immunoréactivité n'existe que dans le cytoplasme, le noyau n'a jamais été marqué.

D - Discussion

Il est à présent certain que NV 24 reconnaît une molécule différente du SIF. Cette molécule présente dans le pic A est de nature peptidique. Cependant, il ne nous a pas été possible de l'isoler en quantité suffisante pour être en mesure de déterminer sa séquence. C'est le même produit qui a servi à l'analyse en RMN et au séquençage. Du fait des évaporations effectuées lors de la préparation de l'échantillon, pour échanger des atomes d'hydrogène labiles avec des atomes de deutérium, il se pourrait que le produit que nous avons isolé ait subi une coupure conduisant à l'apparition des deux peptides détectés lors du séquençage. Il semblerait qu'il s'agisse de molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 2000 daltons).

Figure 20 - Localisation par voie immunohistochimique des cellules du système nerveux central réactives envers NV 24.

a - f : coupes de cerveau de *Nereis virens*

a : coupe transversale à travers la partie postérieure du cerveau.

Cellules immunoréactives dans le noyau 20.

b - c : coupes sagittales au niveau de la partie dorsale du cerveau montrant les noyaux 7, 10, 17, 20 immunoréactifs envers NV 24.

d - e - f : coupes transversales des parties latérales et postérieures du cerveau.

Cellules immunoréactives dans les noyaux 9, 13, 14, 20.

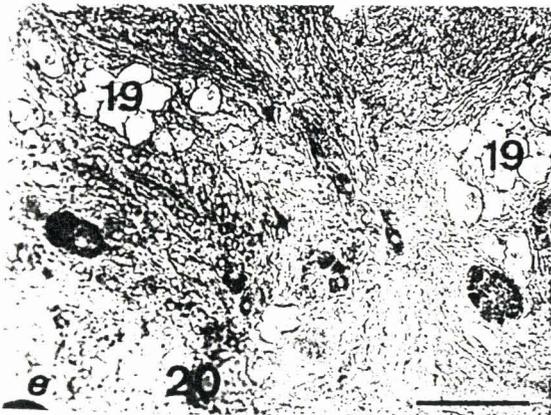
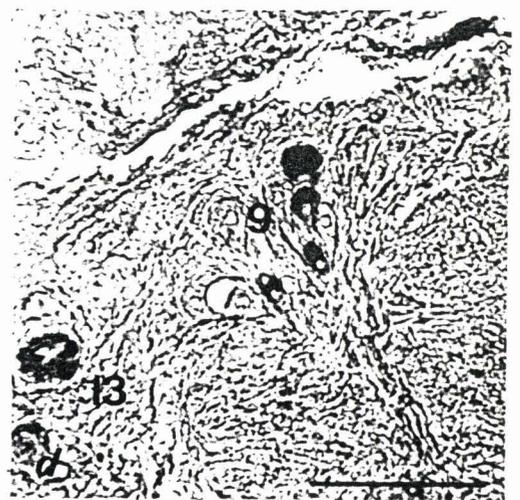
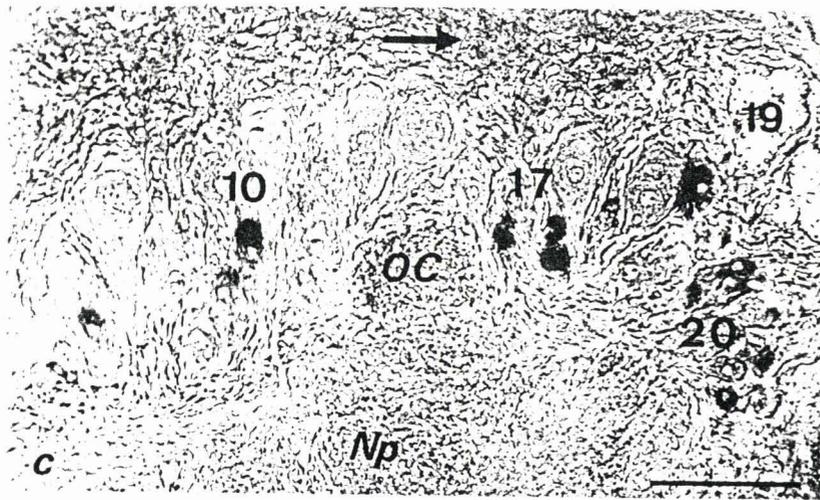
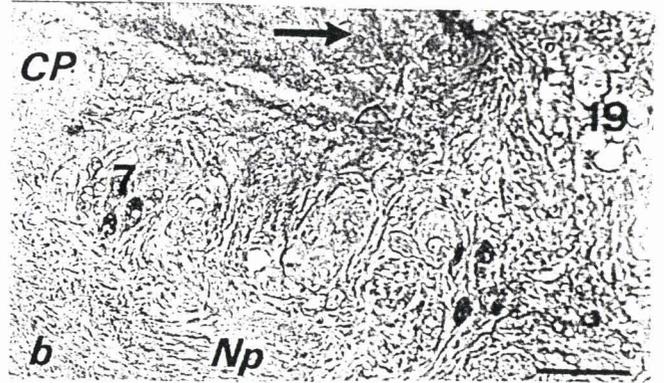
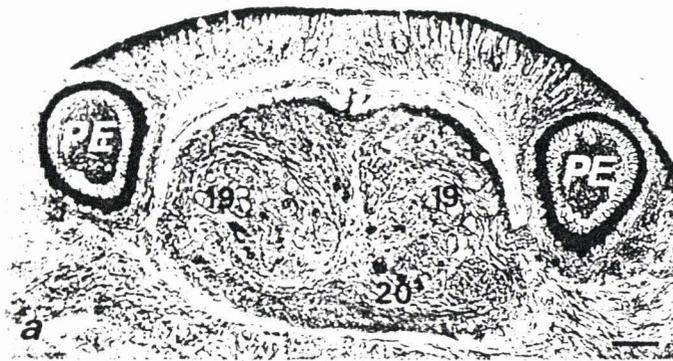
Noter la présence de granules dans le cytoplasme de cellules appartenant aux noyaux 13 et 20.

g : coupe horizontale de la chaîne nerveuse ventrale. Les cellules immunoréactives sont localisées dans le groupe antérieur (AG).

La flèche indique la direction antéro-postérieure ; 9, 13, 20..., noyaux 9, 13, 20.

Np, neuropile; CP, corps pédonculés ; OC, commissure optique.

Sur toutes les figures la barre indique 60 μm sauf en d où elle représente 30 μm .



A l'issue de cette étape de purification nous avons obtenu une fraction contenant le SIF. Cependant, l'absence quasi totale d'absorbance dans la zone d'éluion nous interdit toute tentative d'appréciation de son degré de pureté alors que dans un même temps nous détectons une très forte activité biologique.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à la reconnaissance dans les extraits de cerveaux, de plusieurs protéines par NV 24.

La première serait que NV 24 réagisse avec un épitope appartenant à des molécules n'ayant entre elles aucune relation métabolique.

La seconde hypothèse suppose que NV 24 soit dirigé contre une famille de molécules qui dériveraient d'une molécule précurseur qui pourrait être en l'occurrence la protéine de 109 KDa. En effet, l'existence de précurseurs de neuropeptides apparentés à ceux de Vertébrés, de haut poids moléculaire (70 Kdaltons) a été décrite chez *Nereis diversicolor* (Guissi-Kadri, 1989).

Les cellules réactives envers NV 24 sont peu nombreuses et assez dispersées dans le cerveau. La nécessité d'employer un système (avidine-biotine) permettant d'amplifier la réaction immunologique indique que NV 24 reconnaît sélectivement un épitope peu représenté. La grande distribution de l'immunoréactivité (8 noyaux réactifs dans le cerveau et un groupe cellulaire dans la chaîne nerveuse) rappelle celle qui a été trouvée avec des anticorps anti-cholécystokinine 8 (Engelhardt *et al.*, 1982) où 12 noyaux sont immunoréactifs ainsi qu'avec des anticorps anti-FMRFamide où 10 à 12 noyaux sont mis en évidence dans le cerveau (Baratte et Dhainaut-Courtois, communication personnelle).

Bien que les souris aient été immunisées avec des homogénats de cerveau, NV 24 reconnaît des cellules de la chaîne nerveuse ventrale. Une telle réaction permet de confirmer l'existence de molécules similaires dans ces deux parties très différentes du système nerveux. La même méthode utilisée chez la sangsue pour produire des anticorps a conduit à l'obtention d'un résultat similaire (Boilly-Marer *et al.*, 1987). De plus, des expériences réalisées avec des anticorps dirigés contre des molécules de Vertébrés ont abouti à la même conclusion quant à l'existence d'une identité immunologique entre les produits de sécrétion du cerveau et ceux de la chaîne nerveuse (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985, 1986).

La coloration séquentielle réalisée selon la méthode de Clark a permis de mettre en évidence deux types de cellules immunoréactives : les cellules fuchsinophiles et celles qui ne le sont pas. La réaction conduisant à l'apparition d'une fuchsinophilie dans les cellules est considérée comme étant un élément en faveur de l'existence de produits de neurosécrétion. Cette

réaction apparaît, par exemple, dans le noyau 20 (fig. 20e) où l'on peut observer la présence de granules de sécrétion.

Les granulations immunoréactives détectées dans les trajets nerveux de la partie postérieure du cerveau nous conduisent à penser que NV 24 est effectivement dirigé contre une neurosécrétion cérébrale.

Dans le tableau IV, nous avons réuni quelques résultats obtenus après immunodétection à l'aide d'anticorps dirigés contre des neuropeptides de Vertébrés.

Nous pouvons remarquer que certains noyaux ganglionnaires sont toujours immunoréactifs et ce quelque soit la nature de l'anticorps utilisé (noyaux 10 et 20). Ceci indique la coexistence au sein d'un même noyau de plusieurs substances. Cependant, il n'est pas possible de superposer exactement les noyaux et/ou les cellules immunoréactifs envers NV 24 et envers les divers anticorps dirigés contre des neuropeptides de Vertébrés. Par exemple, le sérum anti-cholécystokinine 8 induit un marquage dans tous les noyaux réactifs envers NV 24 ainsi que dans trois autres noyaux que NV 24 ne met pas en évidence.

Nous pouvons supposer que les molécules reconnues par NV 24 n'ont pas d'épitopes communs avec les peptides apparentés à ceux de Vertébrés mis en évidence dans le système nerveux.

Grâce à NV 24, il nous a été possible d'obtenir des informations relatives à la localisation des noyaux impliqués dans l'accumulation ou la synthèse des molécules qu'il reconnaît sans qu'il soit possible à l'heure actuelle d'attribuer à l'un ou l'autre de ces noyaux une ou plusieurs des fonctions que nous venons d'énumérer.

Tableau IV - Neuropeptides détectés dans les noyaux immunoréactifs envers NV 24

Noyaux immunoréactifs envers NV 24	Anticorps anti peptides de Vertébrés utilisés			Substance P ^c
	CCK- 8 ^a	FMRF-amide ^b	Met-Enk ^c	
7	+	+	-	+
8 - 9 - 10	+	+	+(10)	+(10)
13	+	+	-	+
14	+	+	+	+
17	+	+	-	-
20	+	+	+	+

a - Engelhardt *et al.* 1982

b - Baratte et Dhainaut-Courtois, communication personnelle.

c - Dhainaut- Courtois *et al.* 1985

+, réactions positives ; - réactions négatives;

(10) indique que seul le noyau 10 est immunoréactif

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

L'étude des neuropeptides chez les Invertébrés est une discipline actuellement en plein essor au niveau international. Cependant, elle est encore en retard sur celles qui ont déjà été effectuées chez les Vertébrés.

Les difficultés liées à la caractérisation des peptides chez les Invertébrés en sont souvent la cause. Ceci n'est pas seulement dû à la petite taille de l'organisme duquel sont extraits les neuropeptides, mais aussi à la différence d'organisation entre les systèmes nerveux de Vertébrés et Invertébrés.

Chez ces derniers, chaque neurone peut être identifié et peut n'exprimer qu'un seul phénotype. Ainsi, il peut n'y avoir qu'une seule cellule spécifique d'un peptide donné pour l'ensemble du système nerveux.

Paradoxalement cette caractéristique, si utile chez les Invertébrés pour une approche fonctionnelle, devient un handicap lors des travaux de caractérisation de peptides !

Quelques cas existent pourtant où des neurohormones d'Invertébrés ont pu être isolées selon des procédures extrêmement simples. Il s'agit, par exemple, de la "Egg Laying Hormone" ou ELH de l'aplysie (Chiu *et al.*, 1979) et de "l'Adipokinetic Hormone" des corps cardiaques du criquet (Stone *et al.*, 1976).

Il est en effet remarquable de constater que ces deux peptides ont été purifiés en seulement deux étapes. Les glandes qui synthétisent ces hormones en contiennent de grandes quantités qui doivent être en partie responsables du succès de leur purification par des procédés très simples.

Hormis ces cas que l'on pourrait qualifier d'exceptionnels, la plupart des hormones purifiées à ce jour ont nécessité la mise au point de nombreuses étapes. Citons, par exemple, le "Head Activator" de l'hydre qui a été extrait en 9 étapes, et la "Prothoracicotropic Hormone" de *Bombyx mori* qui a requis 10 étapes de purification (Nagasawa *et al.*, 1986). Ces deux hormones sont présentes en très faibles quantités dans le système nerveux de ces animaux, ce qui a nécessité de pouvoir en traiter un grand nombre pour isoler une quantité suffisante de neurohormone.

Le même cas de figure s'est présenté lorsque nous avons entrepris l'étude des neurosécrétions de Néréis.

Les travaux de purification du SIF se sont heurtés à plusieurs problèmes.

Du fait de l'instabilité de la molécule en milieu acide, aucune des techniques généralement employées pour l'isolement de peptides n'était utilisable. Cet état de choses nous a obligés à n'avoir recours qu'à des solvants exempts de tous additifs tels que des contre ions, par exemple.

Un autre problème qui s'est rapidement posé est celui de l'absence de densité optique (à 226 nm) dans la zone d'élution de la molécule portant l'activité biologique. Cardon et Porchet (1981) avaient aussi observé ce fait et l'avaient attribué à l'absence d'acides aminés aromatiques dans le SIF. Nous avons pu le confirmer grâce à la résonance magnétique nucléaire. On ne distingue aucun signal dans la zone correspondant aux déplacements chimiques attribués aux fonctions aromatiques.

L'absence de densité optique peut s'expliquer d'une autre façon. En effet le SIF pourrait n' être présent qu'en très faible quantité et ne serait donc pas détectable en UV même à une faible longueur d'onde (les mesures effectuées à 210 nm ne se sont pas révélées plus performantes). Dans ce cas, même si cela constitue un handicap certain dans la poursuite des travaux de purification, il serait du plus haut intérêt qu'une molécule possède une telle activité biologique à si faible dose.

A ce stade de nos travaux, nous sommes en possession d'une fraction ayant une très forte activité biologique. Les objectifs à court terme de ce travail sont naturellement de poursuivre l'accumulation de ce produit en vue de son analyse chimique. Nous envisageons de suivre les progrès de la purification grâce à la RMN qui par comparaison avec une étape précédente nous permettra d'évaluer (du moins partiellement) le degré de pureté de la molécule.

L'isolement du pic A (immunoréactif envers NV 24) a été réalisé conjointement à celui du SIF. En effet, les quatre premières étapes de purification sont communes. Les deux molécules ne sont séparées que lors de la dernière étape. Les résultats quant à la séquence du pic A ne sont encore que fragmentaires du fait de la faible quantité de produit que nous avons pu purifier.

Nous envisageons de poursuivre les travaux de purification afin de déterminer la structure primaire du produit. Grâce à celle-ci, nous pourrions déterminer s'il s'agit effectivement d'une molécule caractéristique de l'espèce *Néréis* ou s'il s'agit d'une molécule dont la séquence a des homologues avec des produits connus.

L'objectif à long terme est l'étude du métabolisme de ces deux neurohormones que ce soit au niveau de leur synthèse et de leur régulation (rappelons que le taux du SIF décroît régulièrement tout au long de la vie de l'animal) ou que ce soit au niveau de l'étude de leur mode d'action.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons utilisé une méthode spécifique pour la sélection d'hybridomes produisant des anticorps dirigés contre des neurosécrétions du cerveau de *Nereis virens*.

Les travaux effectués jusqu'à présent concernant la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre le système nerveux d'invertébrés ont retenu plusieurs critères de sélection.

Les anticorps ont été choisis en fonction de leur réactivité vis à vis d'ensembles limités de neurones (Zipser et Mac Kay, 1981, Denburg *et al.*, 1986). Ensuite n'ont été retenus que les anticorps réagissant avec une ou plusieurs cellules dont l'activité biologique avait été précédemment démontrée (Boilly-Marer *et al.*, 1987, Boer et Van Minnen, 1988).

Plus récemment, Holder *et al.* (1988) n'ont privilégié que les hybridomes sécrétant des anticorps réactifs avec des granules de neurosécrétion du système nerveux de *Locusta migratoria*.

Nous avons disposé d'un critère supplémentaire de sélection pour nos recherches parce que nous pouvons avoir un "accès direct" aux neurosécrétions du cerveau de Néréis grâce à la culture *in vitro* de cerveaux isolés. Nous avons pu ainsi détecter les hybridomes réactifs contre ce milieu et espérer raisonnablement obtenir des anticorps dirigés contre des molécules neurosécrétées.

En faisant une sélection en plusieurs étapes, nous avons préservé la fraction SIF purifiée pour les phases ultérieures de son isolement.

Dans notre cas nous ne pouvions pas opérer une sélection selon des critères cytologiques car les cellules impliquées dans la synthèse du SIF ne sont pas connues.

La mise en évidence de granules de neurosécrétion immunoréactifs à NV 24 dans des cellules et des trajets nerveux du cerveau de *Nereis virens* confirme que notre anticorps est effectivement dirigé contre une neurohormone.

Les sept anticorps dirigés contre des neurosécrétions que nous avons obtenus en même temps que NV 24 constituent dès lors des outils permettant de mettre en évidence des produits dont l'existence n'a pu être démontrée jusqu'ici. Ils permettront peut-être aussi d'entreprendre une étude physiologique du système nerveux.

NV 24 réagit avec deux protéines cérébrales de 75,8 et 109 KDa que nous supposons être des formes précurseurs des peptides reconnus par NV 24. Guissi-Kadri (1989) a montré que chez les Néréis une protéine de 70 KDa est le précurseur de peptides apparentés à la cholécystokinine et à la dynorphine. La grande taille de ces molécules peut s'expliquer de deux façons :

- Tout d'abord, ces précurseurs seraient formés de multiples copies d'un même peptide. Cette répétition de séquence a été mise en évidence dans le précurseur du FMRFamide de l'aplysie. En effet, Taussig *et al.* (1988) ont montré l'existence de 28 copies d'un même pentapeptide incluses dans un précurseur de 71 KDa
- L'autre explication serait que ce précurseur contienne plusieurs peptides différents qui peuvent avoir des activités biologiques variées. De telles molécules ont été décrites chez la lymnée où le précurseur de la "Caudo dorsal cell hormone" contient 12 peptides ayant chacun une fonction différente (Vreugdenhil *et al.*, 1988).

Jusqu'à présent, le précurseur mis en évidence chez les Néréis n'a pu être classé dans l'une ou l'autre des catégories que nous venons d'évoquer.

En définitive, l'ensemble de nos travaux a conduit dans un premier temps à l'obtention d'une fraction purifiée contenant le facteur inhibiteur de la spermatogenèse.

Parallèlement à ces recherches, nous avons développé une méthode permettant de sélectionner, parmi un ensemble d'anticorps dirigés contre le cerveau total, ceux qui reconnaissent des produits de neurosécrétion. Nous avons plus particulièrement focalisé notre attention sur un anticorps (NV 24) reconnaissant une fraction contenant le SIF.

Lorsque nous avons pu affiner la séparation des constituants de cette fraction, nous avons montré que NV 24 réagit avec une molécule différente du SIF. L'analyse que nous avons effectuée en RMN a révélé que le produit reconnu est de nature peptidique.

Nous avons ensuite montré l'existence de deux protéines cérébrales reconnues par NV 24 dont le poids moléculaire est 75,8 et 109 KDa. Nous supposons que ces protéines représentent les précurseurs des molécules purifiées par RP-HPLC.

Les études au niveau cytologique ont abouti à la mise en évidence de cellules immunoréactives dans 8 noyaux du cerveau et d'un groupe cellulaire dans la chaîne nerveuse. La réactivité de granules de neurosécrétions vis à vis de NV 24 nous a permis de confirmer que cet anticorps est effectivement dirigé contre une neurosécrétion.

L'ensemble de ces résultats est en faveur de l'aspect logique de notre approche.

Par ailleurs, la répartition des cellules immunoréactives envers NV 24 ne peut que partiellement être rapprochée de celle obtenue avec des anticorps dirigés contre des peptides de Vertébrés. Ceci permet de supposer que NV 24 reconnaît un ensemble de molécules jusqu'alors non détectées.

Le but à long terme de ces travaux est de rechercher l'existence des molécules que nous avons étudiées chez d'autres organismes plus ou moins évolués.

Des neuropeptides, tels que "l'Head activator" de l'hydre et le FMRFamide des

Mollusques, d'abord purifiés chez les Invertébrés ont ensuite été mis en évidence chez les Vertébrés supérieurs (Bodenmüller et Schaller, 1981 ; Dockray, 1985).

Inversement, de nombreux neuropeptides isolés chez les Vertébrés ont été également découverts et parfois purifiés chez les Invertébrés : c'est le cas des enképhalines (Leung et Stephano, 1984) et de l'arginine-vasopressine (Proux *et al.*, 1987).

La présence des mêmes molécules peptidiques dans tout le règne animal pose un intéressant problème d'évolution et de conservation du génome. Il faut toutefois préciser que la fonction de ces molécules peut varier selon les groupes zoologiques. Ainsi, il est clairement établi que chez de nombreux Invertébrés les neuropeptides jouent souvent le rôle de neurohormones (Brownstein, 1989) alors que cela n'est pas toujours le cas chez les Vertébrés.

Le grand nombre de neurones et la complexité des connexions interneuronales peuvent expliquer la multitude de neuropeptides existant dans le système nerveux. C'est la raison pour laquelle l'étude de ces structures moléculaires nous paraît aussi importante. Elle doit cependant être associée à une exploration neurophysiologique qui seule peut élucider la réelle fonction de ces substances.

Du fait de ces caractéristiques anatomiques, le système nerveux central des Invertébrés constitue un modèle favorable pour cette étude morphofonctionnelle qui permettra d'explicitier en détail une fonction physiologique d'un point de vue anatomique et chimique. C'est dans cette voie que s'inscrivent nos recherches à venir.

BIBLIOGRAPHIE

- Baert J.-L., 1986. Vitelline et organisation de la vitellogenèse protéique chez *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète). Thèse d'Etat, Sciences Naturelles, Lille.
- Baratte B., 1987. Contribution à l'étude chez un Invertébré marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller) de peptides immunologiquement apparentés aux opioïdes endogènes des Vertébrés. D.E.A. Lille.
- Bertout M., 1976. Spermatogenèse de *Nereis diversicolor* O. F. Müller (Annélide Polychète).
1. Evolution du cytoplasme et élaboration de l'acrosome. J. Microscopie Biol. Cell., 25, 87-94.
- Bertout M., 1983a. Syntheses of nucleic acids during spermatogenesis in *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta) : a quantitative autoradiographic study. J. Exp. Zool., 226, 143-149.
- Bertout M., 1983b. Endocrine regulation of spermatogenesis in *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta) : experimental study of the control of meiotic differentiation. J. Exp. Zool., 226, 151-161.
- Bertout M. et Dhainaut A., 1971. Etude cytochimique et autoradiographique de l'ovogenèse de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. Gen. Comp. Endocr., 17, 371-387.
- Blanckaert V., 1988. De la présence d'ecdystéroïdes chez les Invertébrés non Arthropodes (Annélides Polychètes). D.E.A., Lille.
- Bodenmüller H. et Schaller H.C., 1981. Conserved amino acid sequence of a neuropeptide, the head activator, from coelenterates to humans. Nature, 293, 579-580.
- Boer H. H. et Van Minnen J., 1988. Immunocytochemistry of hormonal peptides in molluscs : optical and electron microscopy and the use of monoclonal antibodies. In Neurohormones in Invertebrates (Thorndyke M. C. et Goldworthy G. J. Eds.) Cambridge University Press, 19-41.
- Boilly-Marer Y., 1962. Inhibition des transformations hétéronéridiennes par le cerveau d'espèces sans épitoque (Néréidiens). C. R. Acad. Sci., 254, 2830-2832.
- Boilly-Marer Y., Porchet-Henneré E., Watez C., Verger-Bocquet M. et Malecha J., 1987. Caractérisation de neurones immunoréactifs dans le système nerveux de la sangsue *Theromyzon tessulatum* à l'aide d'anticorps monoclonaux. C. R. Acad. Sci., 305, 411-415.
- Bonnier P., 1987. Vitelline et principales protéines marquant l'ovogenèse chez *Nereis diversicolor*. D.E.A. Lille.
- Brand Th. E., 1927. Stoffbestand und Ernährung einiger Polychäten und anderer mariner Würmen. Zeitschr. F. vergleich. Physiol., 5, 643-698.

- Brownstein M.J., 1989. Neuropeptides. *In* Basic neurochemistry : Molecular, Cellular and Medical aspects, 4^e édition (Siegel J.G. *et al.* Eds), Raven Press, New York, pp. 287-309.
- Bulet P., 1981. Mesure des activités glycosyltransférasiques chez les cellules coelomiques de *P. cultrifera* (Annélide Polychète). D.E.A. Lille.
- Bulet P., 1983. Mise en évidence d'un marqueur biochimique de la maturation des ovocytes chez *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) : la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose. Thèse 3e Cycle, Lille.
- Bulet P. et Delaire-Hesdin A., 1988. Isolation of a spermatogenesis inhibiting factor in Nereids (Annelida, Polychaeta). 14th Conference of European Comparative Endocrinologists, Salzburg, Autriche.
- Bulet P. et Porchet M., 1986. A new purification procedure for the neuropeptide controlling gametogenesis in Nereids (Annelida Polychaeta). *In* Advances in Invertebrate Reproduction (Porchet, Andriès, Dhainaut Eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 498.
- Campbell A.M., 1984. Monoclonal antibody technology. *In* Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Burton R.H. et Van Knippenberg P.H. eds), 13, 241 p.
- Caner F., 1981. Contribution à l'étude biochimique de l'ovogenèse de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète). Thèse 3ème Cycle, Lille.
- Cardon C., 1970. Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de *Nereis diversicolor* O.F. Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation. Bull. Soc. Zool. Fr., 95, 543-549.
- Cardon C., Durchon M. et Porchet M., 1981. Purification par chromatographie liquide haute pression (HPLC) de l'hormone cérébrale chez *Nereis diversicolor* et *Perinereis cultrifera* (Annélides, Polychètes). *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 21, 383-390.
- Cardon C. et Porchet M., 1973. Purification partielle d'une substance responsable de la rétroaction génitale sur l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. C. R. Acad. Sci., 277, 1761-1764.
- Chen J.M., 1954. The cultivation in fluid medium of organised liver, pancreas and other tissues of foetal rats. *Exptl. Cell Res.*, 7, 518-529.
- Chiu A.Y., Hunkapiller M., Heller E., Stuart D.K., Hood L.E. et Strumwasser F., 1979. Neuropeptide egg laying hormone of *Aplysia californica* : purification and primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 6656-6660.
- Clark M.E., 1964. Biochemical studies on the coelomic fluid of *Nephtys hombergii* (Polychaeta, Nephtidae) with observations on changes during different physiological states. *Biol. Bull.*, 127, 63-84.

- Clark R.B., 1955. The posterior lobes of the brain in *Nephtys* and the mucus glands of the prostomium. Q. J. Microsc. Sci., 96, 545-565.
- Clark R.B., 1966. The integrative action of a worm's brain. Symp. Soc. exper. Biol. USA, 20, 345-379.
- Clark R.B., 1969. Endocrine influence in Annelids. Gen. Comp. Endocr., 2, 572-581.
- Clark R.B. et Ruston R.J.G., 1963a. The influence of brain extirpation on oogenesis in the Polychaete *N. diversicolor*. Gen. Comp. Endocr., 3, 529-541.
- Clark R.B. et Ruston R.J.G., 1963b. Time of release and action of a hormone influencing regeneration in the Polychaete *N. diversicolor*. Gen. Comp. Endocr., 3, 542-553.
- Choquet M., 1962. Effet inhibiteur de l'hormone cérébrale sur l'évolution des cellules sexuelles chez *Nereis pelagica*. C.R. Soc. Biol., 156, 1112-1114.
- Curgy J.-J., Vennin M. et Baert J.-L., 1987. The extra-oocyte synthesis of the egg yolk precursor, vitellogenin, in *Perinereis cultrifera* (Annelida, Polychaeta) : evidence from cell-free translation of mRNA. Biol. Cell. 59, 187-192.
- Dales R.P., 1957. Preliminary observations in the role of the coelomic cells in food storage and transport in certain polychaetes. J. Mar. Biol. Ass. UK., 36, 91-110.
- Dales R.P., 1964. The coelomocytes of the terebellid polychaete *Amphitrite johnstoni*. Q. J. Microsc. Sci., 105, 263-279.
- Denburg J.L., Caldwell R.T., et Marner J.A.M., 1986. Monoclonal antibodies to the cockroach nervous system. J. Comp. Neurol., 345, 123-1136.
- Dhainaut A. 1964. Etude, en culture organotypique, de l'influence de l'hormone cérébrale des Néréidens sur les synthèses de DNA au cours de la spermatogenèse. C. R. Acad. Sci., 259, 461-464.
- Dhainaut A., 1966. Etude ultrastructurale de l'évolution cytoplasmique au cours des premiers stades de l'ovogenèse chez *N. pelagica*. C. R. Acad. Sci., 262, 2616-2619.
- Dhainaut A., 1967. Etude de la vitellogenèse chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète) par autoradiographie à haute résolution. C. R. Acad. Sci., 265, 434-436.
- Dhainaut A., 1970a. Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire de *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète). I. Ovogenèse naturelle. Z. Zellforsch., 96, 375-389.
- Dhainaut A., 1970b. Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire de *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète). II. Ovogenèse expérimentale en absence d'hormone cérébrale. Z. Zellforsch., 96, 390-404.
- Dhainaut A., 1984. Oogenesis in Polychaetes. Ultrastructural differentiation and metabolism of nereid oocytes. Fortschr. Zool., 29, 183-205.

- Dhainaut A. et Porchet M., 1967. Evolution ovocytaire en l'absence d'hormone cérébrale chez *P. cultrifera*. C. R. Acad. Sci., 264, 2807-2810.
- Dhainaut A. et Porchet M., 1977a. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. II. Etude autoradiographique des ovocytes jeunes. Biol. Cell., 28, 233-240.
- Dhainaut A. et Porchet M., 1977b. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. III. Etude autoradiographique des ovocytes submatures. Biol. Cell., 28, 241-250.
- Dhainaut A., Porchet M., Fischer A. et Baert J.-L., 1984. Biochemical and metabolic aspects of oocyte differentiation in Nereids (Annelida, Polychaeta). Adv. Invert. Reprod., 3, 3-16.
- Dhainaut A., Porchet M. et Fontaine F., 1980. La vitellogenèse chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). Bull. Soc. Zool. Fr., 105, 395-400.
- Dhainaut-Courtois N., 1970. Contribution à l'étude morphologique des processus sécrétoires dans le système nerveux central et au niveau de la glande infracérébrale des *Nereidae* (Annélides Polychètes). Thèse d'Etat, Sciences Naturelles, Lille.
- Dhainaut-Courtois N., Dubois M.P., Tramu G. et Masson M., 1985a. Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annelida Polychaeta) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. Cell Tissue Res., 242, 97-108.
- Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Beauvillain J.-C. et Masson M., 1986. A qualitative approach of the Nereis neuropeptides by use of antibodies to several vertebrate peptides. Neurochem. Int., 8, 327-338.
- Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Marcel R., Malecha J., Verger-Bocquet M., Andriès J.-C., Masson M., Selloum L., Belemtougri G. et Beauvillain J.-C., 1985b. Cholecystokinin in the nervous system of Invertebrates and Protochordates. Immunohistochemical localization of a cholecystokinin 8-like substance in Annelids and Insects. Ann. N.Y. Acad. Sci., 448, 167-187.
- Dhainaut-Courtois N. et Warembourg M., 1967. Etudes des cellules neurosécrétrices de la chaîne nerveuse de *Nereis pelagica* L.(Annélide Polychète). Gen. Comp. Endocr., 9, 276-286.
- Dockray G.J., 1985. Characterization of FMRF amide-like immunoreactivity in rat spinal cord by region specific antibodies in radioimmunoassay and HPLC. J. Neurochem., 45, 152-158.
- Durchon M., 1948. Epitoquie expérimentale chez deux Polychètes : *P. cultrifera* et *N. irrorata*. C. R. Acad. Sci., 227, 157-158.
- Durchon M., 1952. Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. Ann. Sc. Nat. Zool. et Biol. Anim., 14, 119-206.

- Durchon M., 1956a. Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoque chez les Néréidiens. *Ann. Sc. Nat. Zool. et Biol. Anim.*, 18, 269-273.
- Durchon M., 1956b. Influence du cerveau sur les processus de régénération caudale chez les Néréidiens. *Arch. Zool. exp. et Gén.*, 94, 1-9.
- Durchon M., 1962. Induction et inhibition expérimentale de l'épitoque par homogreffes chez les Néréidiens. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 87, 575-582.
- Durchon M., 1967a. Rôle du système nerveux dans la régénération des Annélides. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 92, 319-331.
- Durchon M., 1967b. L'endocrinologie des Vers et des Mollusques. Masson et Cie Eds, pp. 1-241.
- Durchon M., 1984. Peptidic hormones in Annelids. *In* : Biosynthesis, Metabolism and Mode of action of Invertebrate Hormones (Hoffmann et Porchet Eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 10-18.
- Durchon M., Boilly B. et Dhainaut A., 1965. Recherches en culture organotypique sur l'action de l'hormone cérébrale des Néréidiens (Annélides Polychètes). *C. R. Soc. Biol. Fr.*, 159, 106-113.
- Durchon M. et Lafon M., 1951. Quelques données biochimiques sur les Annélides. *Ann. Sc. Nat. Zool.* 11ème série, XIII, 427-452.
- Durchon M. et Marcel R., 1962. Influence du cerveau sur la régénération postérieure chez *N. diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). *C. R. Soc. Biol. Fr.*, 156, 661-663.
- Durchon M., Montreuil J. et Boilly-Marer Y., 1963. Résultats préliminaires sur la nature chimique de l'hormone inhibitrice du cerveau des Néréidiens (Annélides Polychètes). *C. R. Acad. Sci.*, 257, 1807-1808.
- Durchon M. et Porchet M., 1971. Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. *Gen. Comp. Endocr.*, 16, 555-565.
- Durchon M. et Schaller F., 1964. Recherches endocrinologiques en culture organotypique chez les Annélides Polychètes. *Gen. Comp. Endocr.*, 4, 427-432.
- Duve H., Thorpe A. et Rehfeld J.F., 1985. Localization and characterization of cholecystokinin (CCK)-like peptides in the brain of the blowfly *Calliphora vomitoria*. *In* Neurosecretion and the Biology of Neuropeptides (Kobayashi *et al.* Eds), Springer Verlag, Berlin, 401-409.
- Ebberink R.H.M., Van Loenhout H., Geraerts W.P.M. et Joose J., 1985. Purification and amino acid sequence of the ovulation hormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7767-7771.

- Eckelbarger K.J., 1974. The reproductive biology and development of the terebellid polychaete *Nicolea zostericola* and the origin and role of the coelomic cells in oogenesis. Diss. Abstr. 35B, 3110-3111.
- Engelhardt R.-P., Dhainaut-Courtois N. et Tramu G., 1982. Immunohistochemical demonstration of a CCK-like peptide in the nervous system of a marine worm, *Nereis diversicolor* O.F. Müller. Cell Tissue Res., 227, 401-411.
- Favrel. P., Van-Wormhoudt A., Studler J.M. et Bellon C., 1987. Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinin peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea decapoda) : Intermolt variations. Gen. Comp. Endocrinol., 65, 363-372.
- Fischer A., 1979. A vitellin-like antigen in the coelomic fluid of maturing *Nereis virens* females. Naturwiss., 66, 316.
- Fischer A. et Henning R., 1986. Molecules and cellular functions driving oocyte growth in Nereids annelids. Avd. Invert. Reprod., 4, (Porchet, Andriès, Dhainaut Eds), Elsevier Sciences, pp. 195-205.
- Fontaine F., Gevaert M.-H. et Porchet M., 1984a. Distribution of neutral lipids in coelomic constituents during oogenesis of *Perinereis cultrifera* (Annelida, Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., 77A, 45-50.
- Fontaine F., Gevaert M.-H. et Porchet M., 1984b. Acylglycerol metabolism in the coelomic constituents during oogenesis of *Perinereis cultrifera* (Annelida, Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., 78B, 581-584.
- Fujita S.C., Zipursky S.L., Benzer S., Ferrus A. et Shotwell S.L., 1982. Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7929-7933.
- Gaillet N., 1985. Mise en évidence et rôle physiologique des ecdystéroïdes chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). Thèse 3ème Cycle, Lille.
- Golding D.W., 1963. Activation of the supra œsophageal ganglion of *N. diversicolor* for the production of hormone relating to regeneration. Gen. Comp. Endocr., 3, 703-704.
- Golding D.W., 1965. Endocrinology and morphogenesis in *N. diversicolor*. Gen. Comp. Endocr., 5, 651.
- Golding D.W., 1967. Endocrinology, Regeneration and Maturation in *Nereis*. Biol. Bull., 133, 567-577.
- Golding D.W. et Whittle A.C., 1977. Neurosecretion and related phenomena in Annelids. Int. Rev. Cytol., Suppl. 5, 189-302.
- Gould M.C. et Schroeder P.C., 1969. Studies on oogenesis in the Polychaete Annelid *Nereis grubei*. I. Some aspects of RNA synthesis. Biol. Bull., 136, 216-225.

- Grimmelikhuijzen G.J.P. et Graff D., 1986. Isolation of <math>\langle \text{Glu-Gly-Arg-Phe-NH}_2 \text{ (Antho-RF Amide)} \text{>>, a neuropeptide from sea anemones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 9817-9821.
- Guissi-Kadri S., 1989. Expression de gènes spécifiant des précurseurs de neuropeptides chez un ver marin *Nereis diversicolor*. Thèse de Doctorat d'Université, Lille.
- Hauenschild C., 1956. Hormonale Hemmung der Geschlechtsreife und Metamorphose bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. Z. Naturforsch., 11B, 125-132.
- Hauenschild C., 1959. Zyklische Veränderungen an den inkretorischen Drüsenzellen in Prostomium des Polychaeten *Platynereis dumerilii* als Grundlage der Schwärm Periodizität. Z. Naturforsch., 14, 81-87.
- Hauenschild C., 1960. Abhängigkeit der Regenerationsleitung von der inneren Sekretion im Prostomium bei *Pl. Dumerilii*. Z. Naturforsch. 15b, 52-55.
- Hauenschild C., 1963. Postembryonale Entwicklungsteuerung durch ein Gehirn hormon bei *Pl. dumerilii*. Verhandl. deutsch. Zool. Gesellsch (München), 3-120.
- Holder F.C., Lwoff L., Wicker C., Goltzené F., Meister M.F., Zachary D. et Reichhart J.M., 1988. Production of monoclonal antibodies against *corpora cardiaca* extracts of *Locusta migratoria* : a potential tool for the isolation of Insect neurohormones. Int. J. Invert. Reprod., 14, 105-120.
- Holmgren N., 1916. Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns von Polychäten, Onychophoren, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden und Insekten. Kgl. Avenska Ventenskapskad. Handl., 56, 1-303.
- Hofmann D.K., 1966. Untersuchungen zur Regeneration des Hinterendes bei *Platynereis dumerilii* (Audouin et Milne Edwards) (Annelida, Polychaeta). Zool. Jb., Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere, Dtsch, 72, 374-430.
- Ishimoto K., Maekawa K. et Sawada N., 1968. Jelly substance extruded from eggs of *Nereis japonica* Izuka. Mem. Coll. Agric. Ehime Univ., 13, 1-13.
- Köhler G. et Milstein C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256, 495-497.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Leung M.K. et Stefano G.B., 1984. Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 955-958.

- Nagasawa H., Kataoka H., Isogai A., Tamura S., Suzuki A., Mizoguchi A., Fujiwara Y., Suzuki A., Takahashi S.Y. et Ishizaki H., 1986. Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5840-5843.
- Ouchterlony Ö et Nielsson L.Å., 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In : Handbook of experimental immunology (Weir D.M. Ed), Scientific Publications Ltd, Oxford, pp. 1-44.
- Porchet M., 1970. Relations entre le cycle hormonal cérébral et l'évolution ovocytaire chez *Perinereis cultrifera*. Gen. Comp. Endocr., 15, 220-231.
- Porchet M., 1972. Variation de l'activité endocrine du cerveau en fonction de l'espèce, du sexe et du cycle vital chez quelques Néréidiens. Gen. Comp. Endocr., 18, 278-283.
- Porchet M., 1974. Activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. Thèse d'Etat, Sciences Naturelles, Lille.
- Porchet M., 1976. Données actuelles sur le contrôle endocrine de la maturation génitale des Néréidiens (Annélides Polychètes). Ann. Biol., 7-8, 329-377.
- Porchet M. et Cardon C., 1972. Régulation de l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. C. R. Acad. Sci., 275, 2375-2378.
- Porchet M. et Cardon C., 1976. The inhibitory feed back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in *Nereis* (Polychaetes, Annelids). Gen. Comp. Endocr., 30, 378-390.
- Porchet M. et Dhainaut-Courtois N., 1988. Neuropeptides and monoamines in Annelids. In Neurohormones in Invertebrates (Thorndyke M. C. et Goldworthy G. J. Eds.) Cambridge University Press, 219-234.
- Porchet M., Dhainaut-Courtois N., Cardon C. et Bataille M., 1985. Structure and functions of neuropeptides of Polychaete Annelids. In : Neurosecretion and the biology of neuropeptides. (Kobayashi et al. Eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 377-385.
- Porchet M. et Spik G., 1978. Biochemical analysis of *Nereidae* gametogenesis. Evolution of glycoconjugates during natural oogenesis of *Perinereis cultrifera*. Comp. Biochem. Physiol., 59B, 175-181.
- Porchet M., Spik G. et Dhainaut A., 1977. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. I. Etude biochimique. Biol. Cell., 28, 225-232.

- Proux J.P., Miller C.A., Li J.P., Carney R.L., Girardie A., Delaage M. et Schooley D.A., 1987. Identification of an arginine vasopressin-like diuretic hormone from *Locusta migratoria*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 180-186.
- Schaller H. C. et Bodenmüller H., 1981. Isolation and amino acid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 7000-7004.
- Scheller R.H., Jackson J.F., McAllister L.B., Schwartz J.H., Kandel E.R. et Axel R., 1982. A family of genes that codes for ELH, a neuropeptide eliciting a stereotyped pattern of behavior in *Aplysia*. *Cell*, 28, 707-719.
- Schroeder P.C., 1971. Studies on oogenesis in the polychaete annelid *Nereis grubei*. II. Oocyte growth rates in intact and hormone-deficient animals. *Gen. Comp. Endocr.*, 16, 312-322.
- Smiri Y., 1988. Reconnaissance par voie biochimique de substances apparentées à la gastrine/cholécystokinine dans le cerveau de *Nereis diversicolor* (Annélide, Polychète). D.E.A. Lille.
- Stone J.V., Mordue W., Batley K.E. et Morris H.R., 1976. Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature*, 263, 207-211.
- Taussig R., Nambu J.R. et Scheller R.H., 1988. Evolution of peptide hormones : an *Aplysia* CRF-like peptide. Neuropeptides and monoamines in Annelids. *In Neurohormones in Invertebrates* (Thorndyke M. C. et Goldworthy G. J. Eds.) Cambridge University Press, pp. 299-309.
- Tramu G., Pillez A. et Léonardelli J., 1978. An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 26, 322-324.
- Vreugdenhil E., Jackson J.F., Bouwmeester T., Smit A.B., van Minnen J., Van Heerikhuizen H., Klootwijk J. et Joosse J., 1988. Isolation, characterization and evolutionary aspects of a cDNA clone encoding multiple neuropeptides involved in the stereotyped egg-laying behavior of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci.*, sous presse.
- Wattez-Combaz A., 1985. Contrôle par la chaîne nerveuse de l'établissement de la polarité dorso-ventrale du régénérat caudal chez la Néréis (Annélide Polychète). Thèse d'Etat Sciences Naturelles, Lille.
- Wilber C.G. et Bayers W.M., 1947. A comparative study on the lipids in some marine annelids. *Biol. Bull. Woods Hole*, 93, 99-101.



Zipser B. et McKay R., 1981. Monoclonal antibodies distinguish identifiable neurones in the leech. Nature, 289, 549-554.

