50376
1990
148

69035

50376
1990
148

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

UFR DE BIOLOGIE

Année 1990 *N° d'ordre 595*

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'UNIVERSITE EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

Blandine BARATTE

CARACTERISATION CHEZ UNE ANNELIDE POLYCHETE (NEREIS DIVERSICOLOR O.F. MULLER) DE PEPTIDES APPARENTES AU FMRF-AMIDE.

LOCALISATION IMMUNOCYTOCHIMIQUE
PURIFICATION - STRUCTURE

Présentée le 27 octobre 1990 devant la Commission d'examen:

Président	M. PORCHET, Professeur
Rapporteurs	J. JOOSSE, Professeur
	A. TARTAR, Professeur
Examinateurs	N. DHAINAUT-COURTOIS, Professeur
	J.-C. BEAUVILLAIN, Directeur de Recherche

A mes parents

A mes frères, ma sœur,

mon beau-frère et ma belle-sœur

A toute ma famille

A Stanislas

A tous mes ami(e)s et ceux qui me sont chers

Monsieur le Professeur M. Porchet, recevez ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et pour l'honneur que vous me faites en présidant ce Jury. Que ce travail soit le témoignage de ma très respectueuse reconnaissance.

Madame le Professeur N. Dhainaut-Courtois, vous avez guidé mes premiers pas dans la recherche; l'encadrement dont j'ai pu bénéficier, ainsi que les conseils et les encouragements que vous m'avez prodigués m'ont beaucoup appris. Je vous en suis très reconnaissante; que ce jour soit pour moi l'occasion de vous exprimer mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Professeur J. Joosse, le stage que vous avez eu la bienveillance de m'accorder dans votre laboratoire, au cours duquel j'ai pu apprécier le dynamisme et la compétence de votre équipe, a été pour moi source d'enrichissement et a constitué une étape fondamentale dans l'initiation de ce travail. Qu'il me soit permis à cette occasion de vous exprimer mes plus vifs remerciements. Veuillez également accepter l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'analyser et de juger ce travail.

Monsieur le Professeur A. Tartar, votre implication dans ce sujet ainsi que les facilités techniques que vous m'avez accordées m'ont beaucoup aidée et ont été déterminantes pour la réalisation de ce travail. Je vous en remercie particulièrement, et suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant d'examiner et de juger cette thèse.

Monsieur le Directeur de Recherche J.-C. Beauvillain, lorsque j'ai eu recours à vos compétences, vous m'avez toujours très aimablement reçue et conseillée. Je vous en remercie vivement et vous prie de croire en l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de faire partie de mon Jury de thèse.

Monsieur le Professeur B. Fournet, votre implication au cours de l'étape finale de ce travail a permis la caractérisation complète des molécules purifiées. Je vous en suis très reconnaissante et vous exprime tous mes regrets de ne pouvoir vous compter parmi les membres de ce Jury.

Je tiens à remercier très sincèrement Messieurs les Docteurs J. van Minnen et R.H.M. Ebberink pour le chaleureux accueil qu'ils m'ont réservé lors de mon séjour à Amsterdam ainsi que pour l'aide et les conseils qu'ils m'ont prodigués lorsque j'ai abordé la partie biochimique de ce travail.

J'exprime mes plus vifs remeciements à Madame le Professeur H. Gras-Masse avec qui j'ai eu plaisir à travailler, ainsi qu'à Pierrette Masse qui a effectué le séquençage des peptides et à Eric Diesis pour la synthèse peptidique.

Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées par Messieurs Y. Leroy et G. Ricart à qui j'adresse mes sincères remerciements.

Maryse Masson, depuis mon arrivée au laboratoire, tu as toujours été disponible pour m'aider et me conseiller. Enumérer ici les multiples services que tu m'a rendus serait illusoire. Ton amitié m'a été d'un grand réconfort et j'espère que tu trouveras dans ces quelques lignes l'expression de ma plus amicale reconnaissance.

Françoise Bonet, tu as très aimablement et avec bonne humeur effectué la dactylographie de cette thèse. La qualité de ton travail est inestimable et je t'en remercie très sincèrement. Reçois également toute ma reconnaissance pour l'aide technique que tu m'as apportée.

Philippe Bulet, ton enthousiasme et ta gaieté m'ont permis de surmonter les moments de découragement. Tu as toujours su trouver du temps à m'accorder pour de fructueuses et enrichissantes discussions. Reçois toute mon amitié et mes plus vifs remerciements.

Les reproductions photographiques ont été assurées par Monsieur D. Lazarecki et Madame A. Auger à qui j'exprime toute ma reconnaissance.

Je ne saurais oublier tous ceux, et en particulier Bernadette Léü et Yvette Himpens, qui en m'apportant une aide technique ou morale ont contribué à la réalisation de ce travail. Il m'est agréable de leur adresser tous mes remerciements ; qu'ils trouvent ici l'expression de mon amicale reconnaissance.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

GENERALITES 3

I - Le FMRF-amide et les peptides qui lui sont apparentés à travers le règne animal 3

I-1. Chez les mollusques 3

I-1.1. Les principaux peptides apparentés au FMRF-amide 3

- Les FaRPs majeurs 3
- Les FaRPs mineurs 4

I-1.2. Localisation et rôle des substances FMRF-amide immunoréactives 5

- Chez *Aplysia* 5
- Chez *Lymnaea* 7
- Chez *Helix* 8

I-2. Chez les invertébrés autres que les mollusques 13

I-2.1. Les cœlentérés 13

I-2.2. Les vers 14

- Les plathelminthes 14
- Les némathelminthes 14
- Les annélides 15

I-2.3. Les arthropodes 16

- Les crustacés 16
- Les insectes 17

I-2.4. Les échinodermes 19

I-3. Chez les vertébrés 20

I-4. Etude des relations structure-activité 24

I-5. Gènes et précurseurs du FMRF-amide 26

II - Etat actuel des connaissances relatives au système nerveux des néréidiens 27

III - But du travail 32

MATERIEL ET METHODES 33

I - Matériel biologique 33

II - Etudes cytochimiques en microscopie photonique 33
II-1. Préparation des tissus 33
II-2. Réaction immunocytochimique 34
II-3. Coloration signalétique des neurosécrétions 34

III - Purification et caractérisation des FaRPs de *Nereis diversicolor* 35
III-1. Chromatographie d'affinité 35
III-1.1. Préparation de l'immunoadsorbant 35
- Purification des immunoglobulines G (IgG) anti-FMRF-amide 35
- Couplage des IgG purifiées à un support solide (Affi-Gel 10) 35
III-1.2. Préparation de l'extrait biologique 35
III-1.3. Purification de l'extrait biologique 36
III-2. Immunodétection des FaRPs: Dot Immunobinding Assay (DIA) 36
III-3. Purification par chromatographie liquide à haute performance 37
III-3.1. Chromatographie en phase inverse C_{18} (RP-HPLC 1) 37
III-3.2. Chromatographie en phase inverse C_8 (RP-HPLC 2) 37
III-4. Caractérisation des FaRPs purifiés 38
III-4.1. Détermination de la séquence en acides aminés 38
III-4.2. Analyses en spectrométrie de masse 38
- Spectrométrie de masse par bombardement d'atomes neutres accélérés (FAB-MS) 38
- Spectrométrie de masse en tandem (FAB-MS/MS) 39

RESULTATS 40

I - Etudes immunocytochimiques en microscopie photonique avec l'anticorps anti-FMRF-amide 40
I-1. Localisation des molécules reconnues par l'anticorps (illustrations p. 43 à 50) 40
I-1.1. Chez *Nereis diversicolor* 40
I-1.1.1. Le cerveau 40
I-1.1.2. La chaîne nerveuse 41
I-1.1.3. L'intestin 42
I-1.1.4. Les autres tissus 42
I-1.2. Chez *Nereis virens* et *Perinereis cultrifera* 42

I-2. Spécificité des immunoréactions 42
I-3. Discussion 51

II - Etude biochimique des FaRPs de *Nereis diversicolor* 55
II-1. Le test d'immunodétection (DIA) 55
II-2. Purification et caractérisation des FaRPs
(illustrations p. 65 à 78) 55
II-2.1. Chromatographie d'affinité 55
II-2.2. Purification par RP-HPLC 1 56
II-2.3. Analyse du pic II 56
II-2.3.1. Purification en RP-HPLC 2 56
II-2.3.2. Détermination de la séquence en acides aminés 57
II-2.3.3. Analyse du pic II(2) en spectrométrie de masse 57
II-2.4. Analyse du pic I 57
II-2.4.1. Mise en évidence de sa nature 57
II-2.4.2. Microséquençage du pic I 58
II-2.4.3. Purification en RP-HPLC 2 59
II-2.4.3.1. Analyse du pic IB 59
II-2.4.3.1.1. Détermination de la séquence en acides aminés 59
II-2.4.3.1.2. Analyse en spectrométrie de masse du pic IB et du FM(O)RF-amide 60
- Analyse en FAB-MS 60
- Analyse en FAB-MS/MS 60
II-2.4.3.2. Analyse du pic IA 61
II-2.4.3.2.1. Microséquençage 61
II-2.4.3.2.2. Synthèse peptidique 62
- Test d'immunodétection avec le peptide FTRF-amide 62
- Analyse en RP-HPLC 1 63
- Analyse en RP-HPLC 2 63
II-2.4.3.2.3. Analyse en spectrométrie de masse du pic IA et du FTRF-amide 63
- Analyse en FAB-MS 64
- Analyse en FAB-MS/MS 64
II-3. Discussion 79

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION 82

BIBLIOGRAPHIE

Abréviations

Ac	:	Anticorps
Ach	:	Acétylcholine
AchE	:	Acétylcholine estérase
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
C-terminal	:	Carboxy-terminal
CDCs	:	Cellules caudo-dorsales
DB	:	Corps dorsaux
DIA	:	Dot immunobinding assay
FAB-MS	:	Fast atom bombardment mass spectrometry
FaRPs	:	Peptides apparentés au FMRF-amide de mollusques
HPLC	:	Chromatographie liquide à haute performance
5-HT	:	5-hydroxytryptamine
N-terminal	:	Amino-terminal
NM	:	Neuromodulateur
NT	:	Neurotransmetteur
PBS	:	Tampon phosphate salin
PTH	:	Phénylthio-hydanthoïne
RP-HPLC	:	Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
SN	:	Système nerveux
SNC	:	Système nerveux central
SNP	:	Système nerveux périphérique
TFA	:	Acide trifluoroacétique

Annexe 1

Sigles servant à la dénomination des peptides d'invertébrés

ACEP-1 = Achatina cardioexcitatory peptide-1, peptide cardioexcitateur d'*Achatina fulica* (Fujimoto *et al.*, 1990)

AKH = Adipokinetic hormone, hormone adipokinétique du criquet (*Locusta migratoria, Schistocerca gregaria*) (Stone *et al.*, 1976)

αBCP = α Bag cell peptide d'*Aplysia californica* (Rothman *et al.*, 1983)

CDCH = Caudo-dorsal cell hormone. hormone de ponte de *Lymnaea stagnalis* (Ebberink *et al.*, 1985)

DBH = Dorsal body hormone, hormone des corps dorsaux d'*Helix* (*in* Joosse et Geraerts, 1983)

DRPH = Distal retinal pigment hormone, hormone du pigment rétinal distal de la crevette *Pandalus borealus* (Fernlund, 1976)

DSKs = Drosulfakinines I et II de la mouche *Drosophila* (Nichols *et al.*, 1988)

ELH = Egg-laying hormone, hormone de ponte d'*Aplysia californica* (Chiu *et al.*, 1979)

LMS = Leucomyosuppressine de la blatte *Leucophaea maderae* (Holman *et al.*, 1986)

LSKs = Leucosulfakinines I et II de la blatte *Leucophaea maderae* (Nachman *et al.*, 1986a, b)

MIPs = Molluscan insulin-related peptides, peptides de mollusques apparentés à l'insuline (*in* Ebberink *et al.*, 1989)

PSKs = Périsulfakinines I et II de la blatte *Periplaneta americana* (Veenstra, 1989)

RPCH = Red pigment concentrating hormone, hormone concentrant le pigment rouge de la crevette *Pandalus borealus* (Fernlund et Josefsson, 1972)

SCPs A, B = Small cardioexcitatory peptides A, B; petits peptides cardioactifs A et B de l'aplysie (*Aplysia californica* , Lloyd *et al.*, 1987;*Aplysia brasiliana* , Morris *et al.*, 1982)

Sigles servant à la dénomination des peptides de vertébrés

BPP = Bovine pancreatic polypeptide

CCK = Cholecystokinin

CLIP = Corticotropin-like intermediate-lobe peptide

CRF = Corticotropin-releasing factor

hpGRF = Human pancreatic gonadotropin-releasing factor

LRF = Luteinin-releasing factor

γ_1-MSH = Melanophore stimulating hormone

NPY = Neuropeptide Y

PP = Pancreatic polypeptide

TRF = Thyrotropin-releasing factor

VIP = Vasoactive intestinal peptide

Annexe 2

Codes de 3 et 1 lettres utilisés pour la dénomination des acides aminés

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Acide pyroglutamique	pGlu	pQ
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Méthionine sulfoxyde	Met(O)	M(O)
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

INTRODUCTION

Au cours de ces vingt dernières années, un grand nombre de peptides ont été identifiés dans le système nerveux central (SNC) des vertébrés. Déjà en 1983, Krieger en dresse une liste d'une quarantaine dont certains, tels que la cholécystokinine (CCK), le polypeptide intestinal vasoactif (VIP), l'insuline, le glucagon, le neuropeptide Y (NPY) et la substance P, avaient préalablement été isolés de tissus non nerveux.

Bien que dernièrement les travaux effectués sur les neuropeptides d'invertébrés se soient considérablement multipliés, le nombre de molécules caractérisées chez ces animaux reste relativement faible.

Parmi ceux qui ont été isolés chez les invertébrés, nous pouvons actuellement distinguer quatre groupes:

1- les peptides apparemment spécifiques d'invertébrés, tels que l'ELH, la CDCH, l'AKH, la RPCH, la DRPH, l'αBCP et les SCPs (la signification de ces sigles est explicitée dans l'annexe 1).

2- les peptides isolés chez un invertébré et qui ultérieurement se sont révélés être également présents chez les vertébrés. C'est le cas pour le facteur activateur de l'hydre: "Head activator" (Bodenmüller et Schaller, 1981) et les peptides apparentés au FMRF-amide de mollusques (voir Généralités I).

3- les peptides d'abord identifiés chez les vertébrés, tels que les opioïdes Met-enképhaline, Leu-enképhaline isolés du cerveau du porc (Hughes *et al.*, 1975), et qui par la suite ont été purifiés chez la moule (Leung et Stefano, 1983, 1984).

4- les peptides possédant une structure similaire à celle de peptides connus de vertébrés, tels que les leucosulfakinines (LSKs) de blattes qui présentent une homologie structurale avec la gastrine et la CCK (Nachman *et al.* 1986a, b). De même, de nombreux peptides apparentés à l'insuline ont été caractérisés chez divers invertébrés (revue *in* Ebberink *et al.*, 1989), citons par exemple, les MIPs ("molluscan insulin-related peptides") isolés chez *Lymnaea stagnalis* (Ebberink et Joosse, 1985; Ebberink *et al.*, 1987; Smit *et al.*, 1988) et les bombyxines (hormones prothoraciques d'insectes) isolées chez *Bombyx mori* (Nagasawa *et al.*, 1984,1986).

La diversité des travaux concernant le FMRF-amide reflète la position particulière que ce dernier occupe au sein des études concernant les neuropeptides d'invertébrés. L'intérêt de son étude est double et relève, d'une part, de sa large répartition à travers tout le règne animal et, d'autre part, de la mise en évidence dans différents phyla de l'existence de nombreuses molécules de structures variées qui lui sont apparentées. Ceci a conduit à la notion de famille peptidique interespèce, intraphylétique et même interphylétique. L'attention considérable apportée à ce peptide relève également de son implication dans de nombreuses fonctions physiologiques en tant, probablement, que neurotransmetteur ou neuromodulateur.

Parmi les nombreux travaux relatifs à l'étude du FMRF-amide depuis les coelentérés jusqu'à l'homme, il en existe très peu concernant les annélides polychètes. Nous nous sommes proposés de poursuivre sur *Nereis diversicolor* une étude immunocytochimique abordée antérieurement (revue *in* Dhainaut-Courtois et Golding, 1988, Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988) et d'entreprendre l'isolement et la caractérisation de la ou des substances responsables de l'immunoréactivité observée.

Avant d'aborder l'exposé de nos propres résultats, nous rappellerons les principales données actuelles relatives au FMRF-amide, acquises à travers le règne animal. Nous ferons également le point sur les connaissances obtenues à partir d'études morphologiques, immunocytochimiques et biochimiques sur le système nerveux (SN) des néréidiens.

GENERALITES

Tableau I - Peptides apparentés au FMRF-amide chez les mollusques.

Classe / Sous-classe / Ordre / *Espèce*	FaRPs majeurs: FMRF-NH_2	FaRPs majeurs: heptapeptides[h] (X-DPFLRF-NH_2) 1°	2°	FaRPs mineurs: FLRF-NH_2	FaRPs mineurs: autres	Réf.
Polyplacophora						
Acanthopleura granulata	+	---- ni ----		ni		1
Bivalvia						
Pteriomorpha						
Geukensia demissa	+	---- ni ----		+		2
Heterodonta						
Macrocallista nimbosa	+			ni		3
Gastropoda						
Prosobranchia						
Mesogastropoda						
Pomacea paludosa	+	---- ni ----		+	SGFLRF	2
Neogastropoda						
Busycon contrarium	+	---- ni ----		+		2
Opisthobranchia						
Aplysia brasiliana	+	---- ni ----		ni		4
Aplysia californica	+	---- ni ----		+*	nt-GYLRF-NH_2*	5
Pulmonata						
Basommatophora						
Syphonaria pectinata	+	Gly	Asn	ni		6
Lymnaea stagnalis	+	Gly	Ser	ni		7
Stagnicola palustris	+	---- c ----		ni		2
Helisoma sp.	+	Gly	ni	ni		1
Stylommatophora						
Strophocheilus oblongus	+	pGlu	c	ni		1
Succinea campestris	+	pGlu	c	ni		2
Limax maximus	+	pGlu	c	ni		8
Helix aspersa	+	pGlu	Asn et Ser	ni		9, 1, 14
Cepaea nemoralis	+	pGlu	c	ni		2
Achatina fulica					SGQSWRPQGRF-NH_2	15
Cephalopoda						
Octopus vulgaris	+	---- ni ----		+	YGGFMRF-NH_2 TFLRF-NH_2 et AFLRF-NH_2	10, 11 12
Octopus bimaculoides	+	---- ni ----		+		13

\+ identifié
ni non identifié, mais supposé existant
* prédit à partir de la séquence du gène
h pour les heptapeptides identifiés, le résidu N-terminal (X) est indiqué: le premier heptapeptide (1°) est caractéristique de l'ordre, le deuxième heptapeptide (2°) ne l'est pas.
c pic non résolu, éluant en HPLC (système acétonitrile/TFA) avec Ser-, Asn-, et Gly-DPFLRF-NH_2
nt indique que le peptide est situé à l'extrémité N-terminal du précurseur

Les codes de 3 et 1 lettres utilisés pour les acides aminés sont donnés en annexe 2.

1 Price *et al.*, 1987a
2 Price, 1986
3 Price et Greenberg, 1977
4 Lehman *et al.*, 1984
5 Taussig et Scheller, 1986
6 Price *et al.*, 1987c
7 Ebberink *et al.*, 1987
8 Krajniak *et al.*, 1985
9 Price *et al.*, 1985
10 Voigt et Martin, 1986
11 Voigt *et al.*, 1987
12 Martin et Voigt, 1987
13 Price, 1987
14 Price *et al.*, 1987b
15 Fujimoto *et al.*, 1990

I - LE FMRF-AMIDE ET LES PEPTIDES QUI LUI SONT APPARENTES A TRAVERS LE REGNE ANIMAL

I-1. Chez les mollusques

Le FMRF-amide est un tétrapeptide amidé (Phe-Met-Arg-Phe-NH_2) qui a été isolé pour la première fois à partir d'extraits du système nerveux central (SNC) de la palourde *Macrocallista nimbosa* (mollusque bivalve) (Price et Greenberg, 1977). Par la suite, le FMRF-amide s'est révélé être ubiquitaire chez les mollusques et le composant invariablement majeur de l'immunoréactivité FMRF-amide détectée dans ce phylum.Toutefois, les études réalisées sur différentes espèces de mollusques ont conduit dans de nombreux cas à l'identification, en plus du FMRF-amide lui-même, d'autres peptides qui lui sont apparentés (nous les nommerons par la suite FaRPs: "FMRF-amide related peptides", peptides apparentés au FMRF-amide) et se distinguant par leur comportement chromatographique et leur activité biologique (Price *et al.*, 1987; Greenberg *et al.*, 1988; Cottrell, 1989). Ces FaRPs peuvent être classés en deux groupes: le groupe des FaRPs majeurs constitué des peptides les plus fréquemment rencontrés, et le groupe des FaRPs mineurs renfermant, d'une part, les peptides présents chez plusieurs espèces parallèlement aux FaRPs majeurs, mais en faible quantité, et d'autre part, les peptides qui n'ont été caractérisés que chez une seule espèce.

I-1.1. Les principaux peptides apparentés au FMRF-amide (tableau I)

- Les FaRPs majeurs

Dans le cas des pulmonés, trois FaRPs majeurs ont été identifiés et sont présents en quantité égale dans les extraits:

-l'un est le FMRF-NH_2,

-les deux autres sont des heptapeptides dont la structure commune est: X-DPFLRF-NH_2; le résidu amino-terminal (N-terminal) X pouvant être: pGlu(pQ)-Gly(G)-Ser(S) ou Asn(N).

Chez les stylommatophores (tels que *Helix aspersa* ou *Limax maximus*), l'un des heptapeptides est toujours le pQDPFLRF-NH_2; chez *Helix*, deux autres heptapeptides sont présents, le SDPFLRF-NH_2 et le NDPFLRF-NH_2 (Price *et al.*, 1985, 1987a, b). Par contre, chez *Limax* le deuxième heptapeptide n'est pas encore totalement identifié (Krajniak *et al.*, 1985).

Chez les basommatophores, l'heptapeptide caractéristique est le GDPFLRF-NH_2; le deuxième heptapeptide étant variable suivant les espèces: chez *Siphonaria pectinata* (espèce primitive de cet ordre) on trouve le NDPFLRF-NH_2 (Price *et al.*, 1987c), alors que chez *Lymnaea stagnalis* (espèce plus évoluée) il s'agit du SDPFLRF-NH_2 (Ebberink *et al.*, 1987). Dans cet ordre, l'heptapeptide pQDPFLRF-NH_2 n'a jamais été détecté.

- **Les FaRPs mineurs**

Le plus fréquemment rencontré est le FLRF-amide découvert chez un mésogastéropode *Pomacea paludosa* (Price, 1986), il est responsable de 10 à 20 % de l'immunoréactivité FMRF-amide détectée dans le ganglion, la majorité de l'immunoréactivité étant due au FMRF-amide. Le FLRF-amide est également présent chez d'autres mollusques (tels que *Busycon*, *Octopus*...) mais toujours en faible quantité (3 à 20 % du taux de FMRF-amide). Sa non détection chez un certain nombre d'espèces peut résulter, d'une part, de sa faible concentration, et d'autre part, du fait qu'il est moins immunoréactif. Toutefois, dans le cas des opistobranches (*Aplysia californica*) et des pulmonés (*Lymnaea*), bien que ce peptide n'ait pas été détecté, il est supposé être présent, au vu de la séquence du gène codant pour le précurseur du FMRF-amide (Schaefer *et al.*, 1985; Taussig et Scheller, 1986; Linacre *et al.*, 1990). Un peptide mineur, non amidé le SGFLRF présent en faible quantité chez *Pomacea*, a également été isolé (Price, 1986).

Chez *Octopus vulgaris* (céphalopode), trois autres FaRPs mineurs ont été identifiés. Le YGGFMRF-NH_2 ou méthionine-enképhaline-Arg-Phe-NH_2 (Voigt et Martin, 1986; Voigt *et al*, 1987) dont la forme non amidée (Met-enképhaline-Arg-Phe) a d'abord été isolée chez le boeuf (Stern *et al*;, 1979) et ne présente pas d'activité similaire à celle du FMRF-amide, alors que la forme carboxy-terminale (C-terminale) amidée présente une activité analogue à celle du FMRF-amide. Les deux autres peptides, le TFLRF-NH_2 et le AFLRF-NH_2, sont étroitement apparentés au FLRF-amide (Martin et Voigt, 1987).

Récemment, Fujimoto *et al* (1990) ont caractérisé chez *Achatina fulica*, un nouveau neuropeptide renfermant 11 acides aminés: "l'Achatina cardio-excitatory peptide-1" (ACEP-1, Ser-Gly-Gln-Ser-Trp-Arg-Pro-Gln-Gly-Arg-Phe-NH_2). Celui-ci présente sur le cœur et sur le muscle rétracteur du pénis d'*Achatina* une activité similaire à celle du FMRF-amide.

SCP_A	Ala-Arg-Pro-Gly-Tyr-Leu-Ala-Phe-Pro-Arg-Met-NH_2
SCP_B	Met-Asn-Tyr-Leu-Ala-Phe-Pro-Arg-Met-NH_2
FMRF-amide	Phe-Met-Arg-Phe-NH_2

Figure 1- Séquences des SCPs (SCP_A et SCP_B) et du FMRF-amide.
La structure commune aux trois peptides est encadrée.

I-1.2. Localisation et rôle des substances FMRF-amide immunoréactives

La localisation neuronale et les effets pharmacologiques potentiels des peptides apparentés au FMRF-amide suggèrent qu'ils agissent comme messagers intercellulaires au niveau du SNC et du système nerveux périphérique (SNP). L'étude de trois espèces de mollusques gastéropodes nous donne un bon aperçu des différentes fonctions attribuées aux FaRPs.

- **Chez *Aplysia*** (gastéropode opisthobranche)

Le FMRF-amide a été identifié chez deux espèces d'aplysies: *Aplysia brasiliana* (Lehman *et al.*, 1984) et *Aplysia californica* (Taussig et Scheller, 1986). Chez cette dernière espèce, l'isolement du gène codant pour le précurseur de ce neuropeptide a permis de supposer, au vu de la séquence, l'existence de deux autres peptides: le FLRF-amide et le nt-GYLRF-amide (nt indique que le peptide est situé à l'extrémité N-terminale du précurseur). L'immunoréactivité FMRF-amide est localisée dans le système nerveux au niveau de neurones du ganglion buccal (Lloyd *et al.*, 1987a), du ganglion abdominal (Schaefer *et al.*, 1985) d'*A. californica.*; mais aussi dans les ganglions périœsophagiens (ganglions cérébraux, pleuraux, pédieux) d'*A.brasiliana* (Lehman *et al.*, 1984).

Dans le ganglion buccal, l'immunoréactivité FMRF-amide concerne surtout les petits neurones et quelques grands neurones situés dans un groupe ventral de neurones moteurs. Au niveau de ce ganglion, une autre classe de neuropeptides a été identifiée: les petits peptides cardioactifs (SCPs) A et B (SCP_A et SCP_B) (Lloyd *et al.*, 1987b; Morris *et al.*, 1982). Lloyd *et al.* (1985a) ont montré que plusieurs des grands neurones de ce ganglion contiennent les SCPs et que certains sont également marqués avec un anticorps (Ac) anti-FMRF-amide (Lloyd *et al.*, 1985b, 1987a). Or, nous pouvons constater que la séquence du FMRF-amide est légèrement analogue à la séquence conservée des SCPs (fig. 1). Toutefois, des contrôles ont permis d'affirmer que les doubles marquages obtenus dans quelques neurones pour les SCPs et le FMRF-amide ne sont pas dus à une réaction croisée mais résultent bien de la présence à l'intérieur de ces neurones à la fois des SCPs et du FMRF-amide. Ainsi, ces deux types de peptides peuvent être synthétisés par les mêmes neurones dans le ganglion buccal. Sachant que les SCPs sont issus d'un seul précurseur renfermant une copie de chacun des SCPs mais ne comportant aucune région susceptible de donner naissance à des peptides apparentés au FMRF-amide (Mahon *et al.*, 1985), et que, par ailleurs, le précurseur du FMRF-amide (Schaefer *et al.*, 1985) contient de multiples copies du

FMRF-amide mais aucune région apparentée aux SCPs, Lloyd *et al.* (1987a) émettent donc l'hypothèse que la coexistence des SCPs et du FMRF-amide dans un même neurone résulterait de l'expression des deux gènes codant pour leur précurseur, ou encore, qu'il existerait un troisième gène codant pour un précurseur contenant des copies des trois peptides. Une telle coexistence mérite d'être soulignée, étant donné que ces peptides ont des activités biologiques opposées. Les SCPs facilitent la transmission synaptique entre les neurones moteurs et sensoriels dans le ganglion abdominal, accroissent l'efficacité de la transmission neuromusculaire dans un muscle buccal particulier (l'ARC) (Lloyd *et al.*, 1984), et augmente la fréquence des contractions péristaltiques de l'intestin. A l'opposé, le FMRF-amide est inhibiteur dans chacun de ces systèmes (*in* Lloyd *et al*, 1987a). L'ensemble de ces données révèle que ces peptides, malgré leur forte homologie structurale, ne sont pas apparentés.

Le FMRF-amide contenu dans les petits neurones du ganglion buccal pourrait agir comme modulateur ou transmetteur sensoriel (Lloyd *et al.*, 1987a). Par ailleurs, sachant que les neurones moteurs du ganglion buccal provoquent des contractions des muscles buccaux avec un temps de latence court et que le FMRF-amide et les SCPs n'ont pas d'action sur la contraction de ces muscles, Lloyd *et al.*(1987a) suggèrent que ces peptides contenus dans les grands neurones auraient un rôle de transmetteur neuromusculaire excitateur. Un tel rôle a déjà été proposé pour le FMRF-amide chez d'autres mollusques (Painter, 1982; Cottrell *et al.*, 1983a, b). Toutefois, il se pourrait que les SCPs et le FMRF-amide soient des agents modulateurs coexistant au niveau de ces grands neurones avec des transmetteurs excitateurs conventionnels. Cette hypothèse, qui apparaît comme la plus vraisemblable, est renforcée par le fait que ces peptides sont, chez l'aplysie, de puissants modulateurs de l'activité contractile de plusieurs muscles buccaux (Lloyd *et al.*, 1984; Richmond *et al.*, 1984), et que le FMRF-amide, ou des substances qui lui sont apparentées, sont impliqués dans la modulation de l'activité contractile des muscles des ouïes (Weiss *et al.*, 1984). Lloyd *et al* (1987a) proposent que le mécanisme d'action de ces neuropeptides serait une forme de modulation homosynaptique: ils seraient libérés des terminaisons des neurones moteurs et moduleraient l'efficacité de ces mêmes neurones sur leur cible musculaire.

Le FMRF-amide chez l'aplysie jouerait en fait de multiples rôles, fonctionnant comme un messager chimique de neurones sur d'autres neurones, sur des muscles et sur des glandes (Schaefer *et al*, 1985).

- **Chez *Lymnaea*** (gastéropode pulmoné basommatophore)

Chez *Lymnaea stagnalis*, Boer *et al* (1980) ont initialement montré à l'aide d'un Ac anti-FMRF-amide que de nombreux neurones du SNC et du SNP renferment des peptides apparentés au FMRF-amide. Le type de fixation utilisée influence l'immunoréactivité des cellules. En effet, l'utilisation de deux fixateurs différents a permis de montrer que des neurones ne sont identifiables à l'aide d'un Ac anti-FMRF-amide qu'avec du matériel fixé par l'un ou l'autre des fixateurs (Schot et Boer, 1982; Schot *et al.*, 1984). Ceci implique qu'il pourrait exister plus d'une substance apparentée au FMRF-amide.

En fait, trois peptides ont été purifiés et séquencés (Ebberink *et al.*, 1987): le FMRF-NH_2 lui-même, responsable de 20 % de l'immunoréactivité contenue dans un extrait de SNC et deux heptapeptides qui lui sont apparentés: le SDPFLRF-NH_2 et le GDPFLRF-NH_2 fournissant les 80 % restant de l'immunoréactivité.

Récemment, le clonage et le séquençage du gène codant pour le précurseur du FMRF-NH_2 (Linacre *et al.*, 1990) ont conduit, à partir de la séquence en acides aminés de ce précurseur, à l'identification de deux nouveaux neuropeptides: le EFLRI-NH_2 et le QFLRI-NH_2. L'obtention d'un anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement le peptide EFLRI-NH_2 a rendu possible l'étude, par technique immunocytochimique, de l'expression de ce peptide dans le SNC de *Lymnaea*. Des immunoréactivités ont été observées au niveau de nombreux neurones dans les onze ganglions du SNC et dans des tractus nerveux (Santana *et al.*, 1990). Dans la plupart des cas, l'immunoréactivité EFLRI-amide coïncide avec celle du FMRF-amide. Toutefois, ce nouveau peptide est également exprimé dans de nombreux autres types de neurones. L'étude en microscopie électronique fait apparaître que les peptides EFLRI-amide et FMRF-amide sont, à l'intérieur d'un même neurone, séparés dans des vésicules sécrétoires de classes différentes. Enfin, des dosages radioimmunologiques, réalisés sur des extraits de cœur de *Lymnaea,* montrent que le peptide EFLRI-amide serait présent dans cet organe (Santana *et al.*, 1990).

A l'issue des études immunocytochimiques (Schot et Boer, 1982), une fonction neurohormonale a été proposée suite à l'observation de terminaisons axonales immunoréactives localisées au niveau de sites connus servant d'aire neurohémale pour les cellules neuroendocrines "classiques". D'autre part, une fonction de neurotransmetteur ou de neuromodulateur est également suggérée par le fait que des

fibres immunoréactives semblent se terminer, probablement synaptiquement, sur des neurones non réactifs et sur des cellules épithéliales. Cette fonction a aussi été proposée par Cottrell (1980) à partir de l'observation d'effets directs du FMRF-amide sur un neurone géant dans le ganglion cérébral d'*Helix aspersa*.

Des fibres immunoréactives sont également localisées entre les cellules musculaires du coeur, du rein, de l'uretère, du pénis et de nombreuses parties du tractus alimentaire; ceci suppose une innervation de ces muscles par des fibres contenant une substance apparentée au FMRF-amide (Schot et Boer, 1982). Au niveau du muscle rétracteur du pénis, des axones immunoréactifs avec un Ac anti-FMRF-amide forment des synapses neuromusculaires avec les fibres musculaires.

La neurotransmission peptidergique impliquant le système FMRF-amide a été confirmée par des observations morphologiques au niveau ultrastructural (Boer *et al.*, 1984).

Le FMRF-amide a de plus une action cardioactive excitatrice sur le cœur de *Lymnaea* (il augmente l'amplitude et le rythme des battements cardiaques) similaire à celle de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Geraerts *et al.*, 1981).

Enfin, l'observation de "varicosités" immunoréactives avec un Ac anti-FMRF-amide, et en association étroite avec les cellules caudo-dorsales neurosécrétrices (CDCs), révèle que les neurones contenant le FMRF-amide ou des peptides apparentés libèrent leurs produits sur les CDCs, synaptiquement ou non synaptiquement (Brussaard *et al.*, 1988, 1989). Le FMRF-amide, à ce niveau, a une double action. Sa présence provoque une réponse hyperpolarisante transitoire (réponse H) et une suppression de l'excitabilité des CDCs. Ces deux actions sont indépendantes. L'action du FMRF-amide se fait par activation directe des sites récepteurs présents sur les CDCs; les effets observés sont dépendants de la concentration et réversibles (Brussaard *et al.*, 1989).

- **Chez *Helix*** (gastéropode pulmoné stylommatophore)

Marchand *et al.* (1982) ont démontré l'existence de peptides apparentés au FMRF-amide dans le collier périoesophagien d'*Helix aspersa*. Les immunoréactions sont localisées au niveau des péricaryons, des fibres et du neuropile de divers ganglions du collier nerveux.

Les peptides immunoréactifs ont été identifiés comme étant le FMRF-amide et trois analogues du FLRF-amide possédant une extension N-terminale: le pQDPFLRF-NH_2 (Price *et al.*, 1985), le NDPFLRF-NH_2 et le SDPFLRF-NH_2 (Price *et al.*, 1987a, b).

Chez *Helix*, il existe donc une famille de peptides apparentés au FMRF-amide. La recherche des cellules cibles et de la fonction de ces peptides passe par l'identification des sites récepteurs et l'étude de leur distribution dans les différents tissus (Payza, 1987; Payza *et al.*, 1989). Ceci a été réalisé à l'aide de tests biologiques (étude de l'activité biologique sur différents organes) et par l'étude de la liaison aux récepteurs d'un ligand radioactif analogue au FMRF-amide. Toutes les études pharmacologiques montrent que ces peptides ont une action sur les tissus excitables (muscles, neurones) et sont impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques (alimentation, reproduction). Ils agiraient en tant que neurotransmetteur ou joueraient un rôle neurohormonal (Price, 1986). Il apparaît par ailleurs que tous les peptides endogènes apparentés au FMRF-amide ont des effets similaires sur les organes digestifs et reproducteurs. Par contre, les effets pharmacologiques des heptapeptides sur les muscles rétracteurs, le cœur et les neurones, sont distincts de ceux du FMRF-amide lui-même.

**** Action musculaire***

Ces peptides sont des agents cardioexcitateurs chez de nombreuses espèces de mollusques (Painter et Greenberg, 1982).

L'activité de ces peptides est généralement étudiée sur le coeur, mais également sur les muscles non cardiaques tels que le muscle protracteur de la radula de *Busycon*, et le muscle rétracteur des tentacules d'*Helix*.

Chez certaines espèces telles que *Rapana thomasiana* (Kobayashi et Muneoka, 1986), *Lymnaea stagnalis* (Ebberink *et al.*, 1987) et *Eledone cirrhosa* (*in* Cottrell, 1989), le FMRF-amide est aussi et même plus actif sur le cœur que les peptides possédant une extension N-terminale. Par contre, sur le cœur isolé d'*Helix aspersa* (Price *et al.*, 1985), l'heptapeptide pQDPFLRF-amide est, à faible concentration, 100 fois plus actif que le FMRF-amide, alors qu'à forte concentration, il est fortement inhibiteur (Payza, 1987). De plus, il provoque une relaxation des muscles rétracteurs du pharynx et des tentacules alors que le FMRF-amide entraîne une contraction de ces muscles (Lehman et Greenberg, 1987). Ces résultats ont conduit à l'hypothèse qu'il existerait chez *Helix* de multiples sites récepteurs périphériques (Price *et al.*, 1985) parallèlement à la variété des peptides apparentés au FMRF-amide. Ainsi, Muneoka et Saitoh (1986) ont montré que, chez *Mytilus*, au niveau du muscle ABRM ("anterior byssus retractor muscle"), il pourrait exister deux récepteurs pour les peptides apparentés

au FMRF-amide. En effet, de faibles doses de FMRF-amide induisent une relaxation de la contraction induite par l'acétylcholine, alors que des doses élevées provoquent une contraction.

Cette notion de sites récepteurs multiples avait déjà été proposée par Cottrell (1982) après qu'il eut constaté que des analogues du FMRF-amide pouvaient induire sélectivement des courants ioniques opposés dans les neurones d'*Helix*. Payza *et al.* (1989), par leurs études pharmacologiques et de liaison de radioligands aux récepteurs. confirment que les heptapeptides et les tétrapeptides agissent sur des récepteurs différents.

D'un autre côté, les études de Hill et Langton (1986, 1989 *in* Cottrell 1989) concernant l'effet de l'acétylcholine (Ach) et du FMRF-amide sur l'activité électrique du muscle de *Busycon*, montrent que des doses de FMRF-amide, qui provoquent une contraction, n'affectent pas significativement le potentiel de membrane des fibres musculaires, alors que l'Ach dépolarise le muscle. Des observations similaires ont été faites en ce qui concerne le muscle rétracteur des tentacules d'*Helix* (Bewick et Cottrell, 1988 *in* Cottrell, 1989). De plus, la mobilisation de seconds messagers dans certains muscles périphériques, sous l'action du FMRF-amide, a également été signalée (Painter, 1982a, b).

L'ensemble de ces résultats conduit à penser que les peptides apparentés au FMRF-amide pourraient exercer des effets sur les "stocks" intracellulaires d'ions calcium *via* des systèmes de second messager relativement indépendants du potentiel de membrane (Cottrell, 1989).

**** Action sur les neurones centraux***

Les peptides apparentés au FMRF-amide agissent sur la perméabilité de la membrane des neurones aux ions calcium (Ca^{2+}), potassium (K^+) et sodium (Na^+).

La séquence C-terminale est indispensable pour l'activité de ces molécules; de plus, les effets observés sont spécifiques pour chacun des peptides FMRF-amide endogènes. Les profils d'activité des heptapeptides et du FMRF-amide sur divers courants ioniques sont nettement différents. Ainsi, le FMRF-amide provoque une augmentation de la perméabilité de la membrane des neurones aux ions Na^+, alors que les heptapeptides sont inactifs sur cette réponse. Par contre, ils activent une augmentation rapide de la perméabilité aux ions K^+, alors que le FMRF-amide active uniquement une lente augmentation de cette perméabilité (Cottrell, 1989).

Au niveau des neurones centraux, il existerait donc également des sites récepteurs multiples pour les peptides apparentés au FMRF-amide (Cottrell *et al.*, 1984; Cottrell et Davies, 1987).

Lesser *et al.* (1988 *in* Cottrell, 1989) ont observé une décharge de FMRF-amide immunoréactif à partir d'un ganglion isolé d'*Helix* exposé à une solution physiologique contenant un taux élevé de K^+. Cette décharge est dépendante des taux de Ca^{2+}. Ce phénomène est également observé chez *Macrocallista nimbosa* (Nagle, 1982), la décharge se faisant à partir de granules de neurosécrétion. Dans le SNC, les FaRPs auraient donc un rôle de messager extracellulaire et agiraient en tant que neurotransmetteur ou neurohormone.

**** Action hormonale***

Certains peptides FMRF-amide exerceraient leur action *via* la circulation.

Dans le sang d'*Helix aspersa* le peptide pQDPFLRF-NH_2 représente un tiers de l'immunoréactivité totale apparentée au FMRF-amide (Price *et al.*, 1985). Sa concentration moyenne est de 3 à 7 nanomoles. Ce taux élevé suggère que ce peptide fonctionnerait comme une hormone. L'extension N-terminale pQDP- constituerait alors pour la séquence active -FLRF-NH_2 une protection contre une dégradation enzymatique. Cette structure conférerait ainsi au peptide une haute stabilité lui permettant d'agir sur une cible éloignée. Notons à ce propos que la séquence pQ(X)P est présente dans de nombreux peptides biologiquement actifs non apparentés tels que "l'head activator" (facteur activateur de l'hydre), la gastrine, la sauvagine et la ranatensine.

Les organes cibles du pQDPFLRF-amide sont encore inconnus. Toutefois, le cœur d'*Helix*, particulièrement sensible à ce peptide, pourrait en être un. Price *et al.* (1985) concluent que l'un des rôles hormonaux de cet heptapeptide est la cardiorégulation. Les muscles rétracteurs du pharynx et des tentacules constituent également des cibles possibles pour ce peptide.

**** Rôle dans certaines fonctions physiologiques***

- La reproduction

Dans le système reproducteur mâle, Payza *et al* (1989) ont montré l'existence de nombreux sites de liaison pour le FMRF-amide et de taux élevés d'immunoréactivité. Par ailleurs, le FMRF-amide a une action stimulatrice sur certaines parties isolées de ce tractus (Lehman et Greenberg, 1987; Lehman et Price, 1987).

Par contre, le tractus reproducteur femelle et les glandes muqueuses accessoires ne renferment qu'une faible immunoréactivité. Toutefois, les sites de liaison, absents au niveau des membranes de l'oviducte, sont présents dans les glandes muqueuses. Ceci suggère un rôle hormonal pour le FMRF-amide (Payza *et al.*, 1989).

- L'alimentation

Le système digestif d'*Helix* renferme une faible immunoréactivité FMRF-amide; par contre, les taux de liaison d'un radioligand analogue au FMRF-amide sont très élevés (Payza *et al.*, 1989). A ce niveau, le FMRF-amide apparaît comme un puissant inhibiteur du mouvement et du tonus intestinal ainsi que du programme moteur d'alimentation (Cooke *et al.*,1985). Ce peptide jouerait un rôle dans l'inhibition de l'alimentation.

**** Rôle dans le métabolisme cellulaire***

Une population de cellules neurosécrétrices de grande taille dispersées dans le tissu conjonctif à proximité des corps dorsaux (DB, "dorsal bodies") d'*Helix aspersa* est immunoréactive à l'égard d'un Ac anti-FMRF-amide. Le contenu des prolongements axonaux émis par ces cellules et innervant les DB est également immunoréactif. Suite à ces observations, une action possible du FMRF-amide sur l'activité des corps dorsaux a été envisagée (Marchand *et al.*, 1989).

Griffond *et al.* (1989) ont montré que le peptide synthétique FMRF-amide a un effet inhibiteur sur l'incorporation *in vitro* de méthionine par les corps dorsaux. Les résultats obtenus *in vitro* avec des doses physiologiques permettent de considérer, qu'*in vivo*, le FMRF-amide ou des peptides apparentés pourraient être impliqués dans la régulation des DB et seraient le ou l'un des facteurs inhibiteurs contrôlant l'activité des DB et plus précisément la synthèse de la DBH ("dorsal body hormone"). Cette hormone produite par les corps dorsaux stimule la vitellogenèse dans les ovocytes et contrôle la croissance, la différenciation et l'activité sécrétrice des organes sexuels accessoires femelles (Joosse et Geraerts, 1983).

Suite aux travaux de Price et Greenberg (1977) chez le mollusque *Macrocallista*, des études immunocytochimiques conduites à l'aide d'un Ac anti-FMRF-amide ont mis en évidence l'existence de peptides apparentés au sein des autres groupes d'invertébrés ainsi que chez les vertébrés. Ces peptides apparaissent donc largement répandus dans tout le règne animal.

Tableau II - Peptides apparentés au FMRF-amide chez les invertébrés autres que les mollusques.

Source	Peptide	Séquence	Référence
Coelentérés			
Anthozoaires			
Anthopleura elegantissima	Antho-RF-amide	pQGRF-NH_2	1
	Antho-RW-amide I	pQSLRW-NH_2	2
	Antho-RW-amide II	pQGLRW-NH_2	3
Renilla köllikeri	Antho-RF-amide	pQGRF-NH_2	4
Hydrozoaires			
Polyorchis penicillatus	pol-RF-amide	pQLLGGRF-NH_2	5
Vers			
Némathelminthes			
Ascaris suum		KNEFIRF-NH_2	6
Annélides			
Nereis virens		FMRF-NH_2	7
Arthropodes			
Crustacés			
Homarus americanus	FLI 3	SDRNFLRF-NH_2	8
	FLI 4	TNRNFLRF-NH_2	8
Insectes			
Schistocerca gregaria	Schisto-FLRF-amide	PDVDHVFLRF-NH_2	9
Leucophaea maderae	Leucomyosuppressine (LMS)	pQDVDHVFLRF-NH_2	10
	Leucosulfakinines LSK I	EQFEDYGHMRF-NH_2	11
	LSK II	pQSDDYGHMRF-NH_2	12
Aedes aegypti	Aea-HP I	pQRPhPSLKTRF-NH_2	13
	Aea-HP II	TRF-NH_2	13
Drosophila melanogaster		DPKQDFMRF-NH_2	14
Echinodermes			
Asterias rubens	S 1	GFNSALMF-NH_2	15
	S 2	SGPYSFNSGLTF-NH_2	15

Le code à 1 lettre utilisé pour les acides aminés est donné en annexe 2.

1 Grimmelikhuijzen et Graff, 1986
2 Graff et Grimmelikhuijzen, 1988a
3 Graff et Grimmelikhuijzen, 1988b
4 Grimmelikhuijzen et Groeger, 1987
5 Grimmelikhuijzen *et al.*, 1988
6 Cowden *et al.*,1989
7 Krajniak et Price, 1990
8 Trimmer *et al.*, 1987
9 Robb *et al.*,1989
10 Holman *et al.*, 1986
11 Nachman *et al.*, 1986a
12 Nachman *et al.*, 1986b
13 Matsumoto *et al.*, 1989
14 Nambu *et al.*, 1987
15 Elphick *et al.*, 1989b

I-2. Chez les invertébrés autres que les mollusques
(tableau II)

I-2.1. Les coelentérés

L'étude de Grimmelikhuijzen *et al.*(1982), effectuée sur l'hydre *Hydra attenuata* à l'aide d'un Ac anti-FMRF-amide, révèle la présence d'immunoréactivités localisées dans différentes parties de son SN. Des résultats similaires ont été observés chez plusieurs autres espèces de coelentérés (hydrozoaires, anthozoaires, scyphozoaires et cténaires) révélant ainsi qu'un matériel apparenté au FMRF-amide, largement réparti dans tout ce phylum, pourrait jouer un rôle important dans le fonctionnement du SN primitif (Grimmelikhuijzen, 1983, 1984; Grimmelikhuijzen *et al.*, 1984).

Chez les coelentérés, l'antho-RF-amide (pQGRF-NH_2) isolé de l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (anthozoaire) est le premier peptide apparenté au FMRF-amide à avoir été identifié (Grimmelikhuijzen et Graff, 1986). Ce même peptide a ensuite été isolé chez *Renilla köllikeri* (anthozoaire) (Grimmelikhuijzen et Groeger, 1987). Cette substance semble donc être caractéristique des anthozoaires. L'activité biologique de ce peptide, testé chez l'anémone de mer *Calliactis parasitica,* se traduit par une excitation des muscles (McFarlane *et al.*, 1987). Son action sur le système musculaire de *Renilla* a également été démontrée (Anctil et Grimmelikhuijzen, 1989). L'antho-RF-amide agirait directement, en tant que neurotransmetteur ou neuromodulateur (NT/NM), sur les fibres musculaires par liaison à un site récepteur spécifique. La présence de la partie C-terminale Arg-Phe-NH_2 étant indispensable pour l'obtention d'une telle activité. Grimmelikhuijzen *et al.* (1988) ont isolé chez *Polyorchis* (hydrozoaire) un peptide similaire muni d'une extension N-terminale: le pQLLGGRF-NH_2 (pol-RF-amide) apparaissant être la version hydrozoaire de l'antho-RF-amide.

Deux autres peptides plus étroitement apparentés au FMRF-amide ont récemment été isolés de l'anémone de mer: le pQSLRW-NH_2 (antho-RW-amide I) et le pQGLRW-NH_2 (antho-RW-amide II) (Graff et Grimmelikhuijzen, 1988a, b). Ces peptides présentent une terminaison C-terminale Trp-NH_2 à la place du Phe-NH_2 caractéristique du FMRF-amide. Il apparaît que la substitution du résidu Phe par le résidu Trp ne modifie pas l'activité de ces analogues dans le cadre de tests biologiques chez les mollusques. Ces deux peptides ont par ailleurs le résidu Leu en commun avec le FLRF-amide, ce qui suggère que leur activité biologique apparentée au FMRF-amide pourrait être supérieure à celle des FaRPs de coelentérés se terminant par -GRF-NH_2 (Price et Greenberg, 1989).

I.2.2. Les vers

- Les plathelminthes

Des immunoréactivités pour le FMRF-amide ont été observées au niveau de péricaryons et de fibres nerveuses du SNC et du SNP (innervant le pharynx, la paroi intestinale et l'organe copulateur mâle) de *Microstomum lineare* (turbellarié) (Reuter *et al.*, 1984, 1986).

Au vu de leur localisation, les substances immunoréactives pourraient, comme cela a été montré chez les mollusques et les coelentérés, jouer un rôle dans la régulation de l'activité musculaire. Toutefois, par rapport à ces deux embranchements, la fonction des peptides apparentés au FMRF-amide chez *Microstomum* serait plus proche de celle proposée chez les coelentérés. En effet, la fonction neurohormonale au sens strict, suggérée chez *Helix* par la présence de FaRPs dans le sang, est totalement impossible chez un ver dépourvu d'appareil circulatoire. Ces peptides interviendraient donc plutôt dans la coordination de l'activité musculaire en tant que NT/NM. Cette hypothèse a également été émise pour d'autres plathelminthes tels que *Fasciola hepatica* chez qui des immunoréactions pour le FMRF-amide ont été détectées (Magee *et al.*, 1989). Par contre, les immunoréactions pour le FMRF-amide observées dans le SNC et le SNP ainsi que dans le système osmorégulateur de trois espèces de schistosomes : *Schistosoma mansoni*, *S. matthei*, *S. janonicum* restent problématiques (Basch et Gupta, 1988). En effet, chez ces trois espèces, l'utilisation des colorants classiques des neurosécrétions ne permet pas de discerner les fibres et les cellules neurosécrétrices alors que chez *Fasciola hepatica* d'excellents résultats ont été obtenus. Ainsi, chez ces espèces, il n'est pas possible de conclure quant à la nature de la molécule reconnue par l'anticorps utilisé. Celui-ci a pu se lier à des produits peptidiques physiologiquement actifs ou se fixer sur des épitopes de protéines de structure. Jusqu'à présent aucune molécule apparentée au FMRF-amide n'a été isolée et chimiquement caractérisée dans cet embranchement.

- Les némathelminthes

Davenport *et al.* (1988) ont observé des immunoréactions pour le FMRF-amide à la fois dans le SNC et le SNP d'*Ascaris suum*. Selon ces auteurs, les molécules immunoréactives agiraient en tant que NT/NM sur la contraction des muscles de la paroi du corps et, par conséquent, seraient impliquées dans la locomotion du ver. En outre, la présence d'immunoréactions au niveau des nerfs du pharynx permet d'envisager une action de ces molécules sur la contraction des muscles de cet organe durant l'alimentation.

Chez ce ver, Cowden *et al.* (1989) ont isolé un heptapeptide apparenté au FMRF-amide: le KNEFIRF-NH_2, qui est en fait le premier peptide naturel apparenté possédant un résidu d'isoleucine à la place de la méthionine. Ce changement ne produirait, par rapport au FMRF-amide lui-même, qu'une baisse modérée de l'activité biologique de ce peptide sur le cœur de la palourde (Price et Greenberg, 1989).

- Les annélides

Chez la sangsue *Hirudo medicinalis* (hirudinée), Kulman *et al.* (1985a, b) ont montré que de nombreux neurones présentent une immunoréactivité pour le FMRF-amide. Li et Calabrese (1987), à l'aide d'études chromatographiques (HPLC) et de tests d'inhibition de la liaison à l'anticorps, concluent que la majorité de l'immunoréactivité est due au FMRF-amide lui-même. Les immunoréactions sont localisées dans des neurones moteurs excitateurs innervant les muscles dorso-ventraux et longitudinaux (Norris et Calabrese, 1987). Ces neurones ont précédemment été identifiés comme étant cholinergiques (Wallace, 1981a, b). La réponse des muscles longitudinaux à l'application d'Ach et de FMRF-amide a été étudiée (Norris et Calabrese, 1987). Il apparaît que le FMRF-amide provoque une contraction prolongée de ces muscles et qu'il est, de plus, capable de potentialiser la réponse de ces muscles à l'application d'Ach. Chez la sangsue, le FMRF-amide agirait donc en tant que NT/NM dans les neurones moteurs cholinergiques innervant les muscles longitudinaux et dorso-ventraux.

Le FMRF-amide est également présent dans les corps cellulaires et les axones des neurones moteurs excitateurs cholinergiques (HE) et des neurones modulateurs (HA) innervant le cœur de la sangsue (Kuhlman *et al.*, 1985a). Les neurones moteurs HE sont responsables de l'activité myogénique normale (Maranto et Calabrese, 1984). La stimulation des neurones HA augmente l'amplitude et la durée du battement (Calabrese et Maronto, 1984). Le FMRF-amide serait utilisé, d'une part, comme modulateur extrinsèque par les neurones HA et interviendrait pour réguler la force des battements et, d'autre part, comme modulateur intrinsèque et régulerait l'activité myogénique (Calabrese, 1989).

Chez le ver de terre *Eisenia foetida* (oligochète), la localisation des immunoréactions pour le FMRF-amide laisse envisager la fonction neurotransmettrice ou neuromodulatrice des peptides responsables de l'immunoréactivité observée. Une fonction neurohormonale est également possible suite à l'observation dans les ganglions cérébraux et sous-oesophagiens de produits immunoréactifs en contact étroit avec les vaisseaux sanguins (Fujii *et al.*, 1989). Enfin, chez *Nereis virens* (polychète), Krajniak et Price (1990) ont récemment isolé le FMRF-amide dont la fonction chez cette espèce reste à établir .

I-2.3. Les arthropodes

- Les crustacés

L'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie C-terminale du FMRF-amide a permis à Kobierski *et al.* (1987) d'étudier la distribution des FaRPs dans le SN du homard *Homarus americanus*. Des immunoréactions observées au niveau de certains péricaryons, de fibres nerveuses et dans des régions particulières du neuropile font apparaître une intervention probable de ces peptides dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'intégration d'informations visuelles et olfactives, le contrôle des muscles de l'exosquelette et les fonctions alimentaires et digestives de l'intestin antérieur et postérieur. D'autre part, des immunoréactions sont présentes au niveau de terminaisons axonales dont l'aspect en microscopie électronique et la localisation suggèrent un rôle neurohormonal. Cette dernière hypothèse est confortée par la détection de molécules immunoréactives dans l'hémolymphe.

Les organes sécréteurs péricardiaques, riches en produits immunoréactifs, ont servi à l'extraction et à la purification des FaRPs chez le homard. Deux octopeptides, dont les séquences sont: SDRNFLRF-NH_2 (FLI 3) et TNRNFLRF-NH_2 (FLI 4), ont ainsi été isolés (Trimmer *et al.*, 1987). Ces peptides semblent être libérés des organes péricardiaques par dépolarisation en présence de calcium. Des études préliminaires montrent que le peptide FLI 4 pourrait agir comme un modulateur des jonctions neuromusculaires cardiaques et exosquelettiques.

Chez le crabe *Limulus polyphemus*, des immunoréactions pour le FMRF-amide ont été détectées dans toutes les régions du SN (cerveau, ganglion cardiaque et chaîne nerveuse ventrale) (Watson *et al.*, 1984). Les premières études biochimiques montrent la présence d'au moins trois peptides apparentés au FMRF-amide dont l'un serait le FMRF-amide lui-même. De même les premières études physiologiques proposent pour ces peptides une fonction de NT ou NM. A forte dose, le FMRF-amide stimule le rythme cardiaque de *Limulus*.

Fingerman *et al.* (1985) ont mis en évidence chez *Uca pugilator* l'existence d'immunoréactivité à l'aide d'Ac anti-substance P, -Met-enképhaline, -Leu-enképhaline, -FMRF-amide. La Met-enképhaline est un opioïde qui, chez *Uca*, stimule la décharge d'hormones concentrant le pigment noir et le pigment rouge (Quackenbush et Fingerman, 1984). Le FMRF-amide, par contre, agit uniquement en stimulant la décharge d'hormones concentrant le pigment rouge (Butler et Fingerman, 1985). Chez *Uca*, le FMRF-amide est donc impliqué dans le processus de libération des hormones chromatotropes (Kulkarni et Fingerman, 1987).

Gastrine	pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr(SO_3H)-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2
CCK 8	Asp-Tyr(SO_3H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2
LSK I	Glu-Gln-Phe-Glu-Asp-Tyr(SO_3H)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2
PSK I	Glu-Gln-Phe-Asp-Asp-Tyr(SO_3H)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2
LSK II	pGlu-Ser-Asp-Asp-Tyr(SO_3H)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2
PSK II	pGlu-Ser-Asp-Asp-Tyr-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2
DSK I	Phe-Asp-Asp-Tyr(SO_3H)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2
DSK II	Asp-Gln-Phe-Asp-Asp-Tyr(SO_3H)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH_2
FMRF-amide	Phe-Met-Arg-Phe-NH_2

Figure 2 - Structure primaire de la gastrine, de la CCK 8, des sulfakinines (leucosulfakinines (LSK), périsulfakinines (PSK), drosulfakinines (DSK)) et du FMRF-amide. L'encadré montre l'homologie structurale existant entre ces peptides.

Krajniak et Greenberg (1988) ont montré que les peptides apparentés au FMRF-amide ont un effet cardioexcitateur sur le cœur de crustacés. Les tests d'activité des peptides FMRF-amide de mollusques et des deux peptides connus de crustacés (FLI 3 et FLI 4), sur le cœur du crabe bleu *Callinectes sapidus*, indiquent que tous ces peptides provoquent une augmentation du rythme et (ou) de l'amplitude qui est dépendante de la dose de peptide appliquée. Toutefois, les peptides spécifiques de crustacés agissent à faible concentration (10^{-9} à 10^{-8} mole/litre), alors que les heptapeptides spécifiques des mollusques (SDP-, NDP-, pQDP-FLRF-amide) sont mille fois moins actifs. Leur seuil d'action est de 10^{-6} à 10^{-5} mole/litre.

- Les insectes

L'hypothèse de l'existence chez les insectes de peptides apparentés au FMRF-amide est soutenue par trois faits:

- la mise en évidence d'immunoréactions pour le FMRF-amide dans des cellules spécifiques du SN de divers insectes (Boer *et al.*,1980; Veenstra et Schoonveld, 1984; Carroll *et al.*,1986; White *et al.*, 1986; Myers et Evans, 1985a, b; Verhaert *et al.*, 1985),
- la libération de matériel immunoréactif pour le FMRF-amide par des cellules isolées du système cérébral neurosécréteur (corps cardiaques et corps allates) de *Manduca sexta*, dépolarisées en présence de potassium (Carroll *et al.*, 1986),
- la purification de trois neuropeptides bioactifs: la leucomyosuppressine (LMS) (Holman *et al.*, 1986) et les leucosulfakinines I et II (LSK I , LSK II) (Nachman *et al.*, 1986a, b) isolés chez la blatte *Leucophaea maderae*: sur la base de leurs activités biologiques (action myotrope) et présentant une communauté structurale avec le FMRF-amide par leur séquence C-terminale Arg-Phe-NH_2.

La LMS est un analogue du FLRF-amide possédant une extension N-terminale. En outre, ce peptide ne diffère du schisto-FLRF-amide (isolé chez le criquet *Schistocerca gregaria*) (Robb *et al.*, 1989) que par son acide aminé N-terminal (pGlu à la place de P). Les LSK I et II ont en commun avec le FMRF-amide la séquence C-terminale Met-Arg-Phe-NH_2. Cette structure se rencontre également dans deux autres molécules, récemment isolées, les périsulfakinines I et II (PSK I et PSK II isolés chez la blatte *Periplaneta americana* , Veenstra, 1989) et les drosulfakinines I et II (DSK I et DSK II isolés chez la drosophile, Nichols *et al.*, 1988). Ces peptides sulfatés (LSK, PSK et DSK) sont de plus apparentés à la CCK/gastrine et pourraient de ce fait constituer un lien entre ces deux familles de peptides (fig. 2).

Chez le moustique *Aedes aegypti*, de nombreuses cellules localisées dans le cerveau et divers ganglions (suboesophagien, abdominal, thoracique et ventriculaire) sont immunoréactives pour le FMRF-amide (Brown et Lea, 1988). A partir d'extraits de têtes, Matsumoto *et al.* (1989) ont purifié deux peptides appelés "Head Peptide I et II" (Aea-HP-I et Aea-HP-II), dont les séquences sont : pGlu-Arg-Pro-Hyp-Ser-Leu-Lys-Thr-Arg-Phe-NH_2 (Aea-HP-I) et Thr-Arg-Phe-NH_2 (Aea-HP-II). Le peptide Aea-HP-II correspond à la structure C-terminale de Aea-HP-I. Ceci peut laisser supposer qu'il s'agirait d'un produit de dégradation. Toutefois, il se pourrait que ces deux peptides soient issus du même précurseur. Cette hypothèse est soutenue par le fait que, chez la drosophile, de nombreux peptides apparentés au FMRF-amide sont codés par un seul gène (Schneider et Taghert, 1988; Nambu *et al.*, 1988).L'un de ces peptides a été isolé, le DPKQDFMRF-NH_2 (Nambu *et al*, 1987).

Les effets du FMRF-amide et des peptides apparentés ont particulièrement été étudiés sur le cœur et le muscle extenseur du tibia chez le criquet *Schistocerca gregaria.*

Les premières études ont montré que ces peptides ont un effet modulateur sur le muscle extenseur du tibia (Walther *et al.*, 1984; Evans et Myers, 1986a, b) et sur l'activité contractile spontanée d'une préparation de cœur semi-isolé (Myers, 1986; Evans *et al.*, 1988).

Cuthbert et Evans (1989) révèlent que les actions du FMRF-amide et des peptides analogues sur le cœur semi-isolé du criquet sont complexes. Les effets observés dépendent d'une part de la structure et de la concentration des molécules testées et d'autre part de l'activité cardiaque initiale existant avant l'application du peptide. Ainsi, les peptides apparentés au FMRF-amide peuvent avoir des effets cardioexcitateurs se traduisant par une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des contractions cardiaques. Dans ce type d'action, l'intervention d'un second messager (dont la nature reste inconnue) est fort probable étant donné que l'effet cardioexcitateur persiste quelque temps encore après la période d'application du peptide.

Le FMRF-amide lui-même a un effet purement excitateur. Par contre, les heptapeptides (pQDP-, SDP-, GDP-FLRF-amide), à faible concentration, ont une action cardioexcitatrice qui est plus intense que celle du FMRF-amide, alors qu'à concentration élevée, ils provoquent un effet biphasique. Ainsi, comme chez *Helix* (Payza, 1987), le cœur du criquet apparaît être plus sensible aux analogues possédant une extension N-terminale. Une telle préférence pour ce type d'analogue a également été constatée pour le cœur de *Macrocallista* et le muscle rétracteur du byssus antérieur de *Geukensia* (Painter *et al.*, 1982; Payza, 1987). Contrairement aux effets cardioexcitateurs, les effets cardioinhibiteurs sont uniquement observables en présence du

peptide; ils disparaissent rapidement en fin d'application. L'induction de ces effets par rapport aux effets cardioexcitateurs requiert des concentrations plus élevées de peptide.

Le seul analogue du FMRF-amide produisant un effet purement cardioinhibiteur est la leucomyosuppressine. A l'origine, ce peptide a été caractérisé par son effet inhibiteur sur les contractions spontanées de l'intestin postérieur isolé de la blatte *Leucophaea maderae* (Holman *et al.*, 1986).

La diversité des effets observés pourrait s'expliquer par l'existence de plusieurs types de récepteurs pour les peptides apparentés au FMRF-amide ayant chacun un mode d'action différent, comme cela a été proposé chez les mollusques pour le cœur (Payza, 1987) et les neurones (Cottrell *et al.*, 1984; Cottrell et Davies, 1987). Enfin, en ce qui concerne le site d'action de ces peptides apparentés au FMRF-amide, il se pourrait qu'ils agissent directement sur le myocarde ou indirectement sur les éléments nerveux associés au coeur.

Récemment, des extraits de SN fractionnés en HPLC ont révélé l'existence de trois pics majeurs immunoréactifs pour le FMRF-amide. L'un de ces pics a aussi été identifié dans l'hémolymphe alors qu'un autre est également présent dans le cœur du criquet (Robb et Evans, *in* Curthbert et Evans, 1989). Ainsi, ces résultats et ceux précédemment décrits vont dans le sens d'une régulation de l'activité du cœur du criquet par des peptides apparentés au FMRF-amide. Ces derniers sont libérés dans l'hémolymphe comme neurohormones et plus localement comme neurotransmetteurs ou neuromodulateurs à partir d'éléments neuronaux à l'intérieur même du coeur.

I-2.4. Les échinodermes

L'étude immunocytochimique conduite chez *Asterias rubens* (Elphick *et al.*, 1989a) montre l'existence dans de nombreux neurones des nerfs radiaux, de peptides immunologiquement apparentés au FMRF-amide. Ces peptides ont été isolés; il s'agit de deux molécules apparentées: le GFNSALMF-NH_2 (S 1) et le SGPYSFNSGLTF-NH_2 (S 2), constituant les membres d'une nouvelle famille de neuropeptides: les SALMF-amide (Elphick *et al.*, 1989b). S 1 est identique à l'octopeptide C-terminal de S 2 à l'exception de trois acides aminés. Toutefois, ces résidus représentent des substitutions conservatives d'acides aminés et résulteraient d'un changement d'une base au niveau nucléotidique.

Etant donné que des taux équivalents de S 1 et S 2 ont été extraits à la fois chez *Asterias rubens* et *A. forbesi*, Elphick *et al.* (1989b) proposent que le gène des SALMF-amide code pour un même nombre de copies de chacun de ces peptides.

Tableau III - Peptides de vertébrés apparentés au FMRF-amide.

Source	Peptide	Séquence	Réf.
		Série I	
Poulet		LPLRF-NH_2	1
Boeuf	F8Fa	FLFQPRF-NH_2	2
	A18FA	AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH_2	2
		Série II	
Boeuf	Met-enképhaline [Arg^6-Phe^7]	YGGFMRF	3
Boeuf	γ_1-MSH	YVMGHRFRWDRF-NH_2	4
Alligator	Polypeptide pancréatique (PP)	TPLQPKYPGDGAPVEDLIQFYNDLQQYLNVVTRPRF-NH_2	5
Saumon	Polypeptide pancréatique	YPPKPENPGEDAPPEELAKYYTALRHYINLITRQRY-NH_2	6
Boeuf	Polypeptide pancréatique BPP	APLEPQYPGDDATPEQMAQYAAELRRYINMLTRPRY-NH_2	7
Poulet	Polypeptide pancréatique APP	GPSQPTYPGDDAPVEDLIRFYDNLQQYLNVVTRHRY-NH_2	7
Cochon			
(cerveau)	Polypeptide pancréatique NPY	YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRQRY-NH_2	8
(intestin)	Polypeptide pancréatique PYY	YPAKPEAPGEDASPEELSRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH_2	9

Série I : Peptides de parenté proche dont l'isolement a fait intervenir l'utilisation d'un anticorps anti-FMRF-amide.

Série II : Peptides de parenté moins étroite isolés avant le FMRF-amide, ou indépendamment de l'utilisation d'un anticorps anti-FMRF-amide.

Le code à 1 lettre utilisé pour les acides aminés est donné en annexe 2.

1 Dockray *et al.*, 1983
2 Yang *et al.*, 1985
3 Stern *et al.*, 1979
4 Nakinishi *et al.*, 1979
5 Lance *et al.*, 1984
6 Kimmel *et al.*, 1986
7 Lin et Chance, 1974
8 Tatemoto, 1982a
9 Tatemoto, 1982b

I-3. Chez les vertébrés

L'existence de FaRPs chez les vertébrés a d'abord été montrée par Boer *et al.* (1980). Par la suite, des immunoréactions pour le FMRF-amide ont été détectées dans le SNC de nombreuses espèces de vertébrés inférieurs: cyclostomes (Jirikowski *et al.*, 1984; Ohtomi *et al.*, 1989), cyprinidés (Bonn et König, 1988, 1989) et de vertébrés supérieurs: oiseaux (Dockray *et al.*, 1981), mammifères: rat, chien, vache, cochon d'inde, souris, singe (Dockray *et al.*, 1981; O'Donohye *et al.*, 1984: Chronwall *et al.*, 1984; Triepel et Grimmelikhuijzen, 1984; Chen *et al.*, 1989).

Chez les mammifères, les immunoréactions sont localisées dans le cerveau, le tractus gastrointestinal et le pancréas (Dockray *et al.*, 1981; Weber *et al.*, 1981; Dockray et Williams, 1983; O'Donohue *et al.*, 1984). Le matériel immunoréactif distinct des peptides apparentés connus (CCK et Met-enképhaline) pourrait avoir un double rôle d'hormone intestinale et de neurorégulateur central (en tant que neurotransmetteur ou neuromodulateur).

Kubber *et al.* (1986) montrent l'existence d'une immunoréactivité pour le FMRF-amide dans le système neuroendocrine gastro-entéropancréatique chez le rat et l'homme. La substance qui en est responsable est différente de la gastrine ou des peptides pancréatiques.

Toutes les études réalisées sur diverses espèces de vertébrés font apparaître que le peptide cardioexcitateur de mollusques, le FMRF-amide, n'est pas présent en tant que tel. En fait, trois peptides apparentés au FMRF-amide ont pu être isolés et chimiquement caractérisés. Le premier a été identifié à partir du cerveau de poulet: le LPLRF-NH_2 (Dockray.*et al.* 1983) . Un peu plus tard, Yang *et al.* (1985) ont caractérisé deux autres peptides extraits du cerveau du boeuf, l'octopeptide FLFQPQRF-NH_2 (F8Fa) et l'octodécapeptide AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH_2 (A18Fa) (tableau III). Ces trois peptides ne présentent en commun avec le FMRF-amide que la partie terminale Arg-Phe-NH_2. L'activité biologique de ces peptides sur le muscle protracteur de la radula et le cœur isolé de la palourde a été testée. Les effets observés sont relativement plus faibles, mais qualitativement similaires à ceux du FMRF-amide. Toutefois, le peptide du poulet LPLRF-NH_2 se révèle être, parmi ces trois substances, le plus actif (Greenberg *et al.*, 1988).

Dockray (1985) met en évidence par HPLC et à l'aide de dosages radioimmunologiques l'existence dans la moëlle épinière du rat d'au moins deux peptides apparentés au FMRF-amide ou au LPLRF-amide et distincts du neuropeptide Y (NPY), du polypeptide pancréatique (PP) et de la γ-1-MSH ("melanophore stimulating hormone").

Chez l'homme, d'après Boarder *et al.* (1985), un seul peptide amidé semble possible au vu de la séquence de la proenképhaline humaine. Il s'agit de l'octopeptide Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-NH_2 (la métorphamide). Ce peptide a été trouvé dans des extraits post-mortem humains.

Des immunoréactivités pour les peptides F8Fa et A18Fa ont été détectées dans des extraits de moëlle épinière de plusieurs espèces: rat, souris, boeuf, cochon d'inde (pas d'immunoréaction pour A18Fa), homme (pas d'immunoréaction pour F8Fa). Toutefois, les analyses en HPLC montrent que les immunoréactivités majeures pour le F8Fa et le A18Fa sont obtenues à des temps de rétention différents d'une espèce à l'autre (Majane *et al.*, 1988). Ces peptides pourraient donc représenter les deux formes majeures des peptides de mammifères apparentés au FMRF-amide mais il existe une hétérogénéité moléculaire interspécifique. L'existence d'une famille de peptides fonctionnellement apparentés mais structuralement différents d'une espèce à l'autre n'est pas sans précédent. La famille des polypeptides pancréatiques présente cette particularité. Cette famille renferme des peptides de 36 acides aminés ayant un rôle physiologique similaire mais présentant des variations au niveau de leur composition en acides aminés, l'hexapeptide-amide C-terminal étant la région la mieux conservée (tableau III).

L'étude de Majane *et al.* (1988) confirme l'existence dans le SNC des mammifères d'un nouveau système de peptides apparentés au FMRF-amide dont certains semblent plus étroitement apparentés aux peptides de boeuf (F8Fa et A18Fa) qu'au FMRF-amide.

Chez les mammifères, le FMRF-amide exerce des activités biologiques variées.

Action sur le système cardiovasculaire

Les effets cardiovasculaires des peptides FMRF-amide, Met-enképhaline, Met-enképhaline-Arg-Phe (YGGFMRF) et Met-enképhaline-Arg-Phe-NH_2 (YGGFMRF-amide) ont été testés par Wong *et al* (1985) chez le rat. L'injection intracérébroventriculaire du FMRF-amide et du YGGFMRF-amide entraîne une élévation rapide de la pression sanguine. Par contre, les peptides non amidés n'ont pas d'effet. Ainsi, il apparaît que la présence de l'amide C-terminale est nécessaire pour l'obtention de ce type de réponse.

Chai *et al* (1986) montrent que le FMRF-amide a un rôle en tant que "substance anti-opioïde" dans la modulation centrale des fonctions cardiovasculaires. L'action sur la pression sanguine des deux peptides apparentés au FMRF-amide: F8Fa et A18Fa spécifiques des mammifères a également été étudiée (Roth *et al.*, 1987).

L'injection de ces peptides entraîne une augmentation dose-dépendante de la pression artérielle moyenne. Le peptide A18Fa est le plus actif des deux dans cette action. Les résultats obtenus montrent par ailleurs que ces peptides agissent par deux mécanismes, l'un dépendant de la décharge de catécholamine, et l'autre indépendant d'une telle décharge.

Rôle d'antagoniste des opioïdes endogènes

L'évidence d'une parenté possible entre le FMRF-amide et les opioïdes endogènes chez les mammifères résulte de plusieurs constatations. D'une part, il existe une séquence Phe-Met-Arg-Phe commune au FMRF-amide, à la Met-enképhaline-Arg-Phe (peptide opioïde naturel de mammifères) (Stern *et al.*, 1979) et à la Met-enképhaline-Arg-Phe-NH_2 , peptide présentant à la fois des actions apparentées à l'enképhaline et au FMRF-amide (Painter *et al.*, 1982). D'autre part, les effets cardioexcitateurs observés suite à l'injection intracérébroventriculaire du FMRF-amide sont supprimés lorsque l'injection est précédée d'un traitement par la naloxone (antagoniste des récepteurs mu et delta des opioïdes) (Wong *et al.*, 1985). Enfin, le FMRF-amide s'est révélé être un antagoniste de la morphine et des peptides opioïdes (Raffa, 1988).

Tang *et al.* (1984) suggèrent pour la première fois qu'un peptide reconnu par un Ac anti-FMRF-amide pourrait être un antagoniste d'un opioïde endogène. Cette proposition repose sur plusieurs observations, notamment le fait que l'action analgésique de la morphine est atténuée par un prétraitement par le FMRF-amide. Cette action du FMRF-amide n'est pas limitée à la morphine, mais s'étend à un autre peptide opioïde, la Met-enképhaline-Arg-Phe . Par ailleurs, un peptide apparenté au FMRF-amide, purifié à partir du cerveau de boeuf, atténue également l'action analgésique de la Met-enképhaline-Arg-Phe (Raffa, 1988). Par la suite, Zhu et Raffa (1986) ont montré que le FMRF-amide est capable d'inhiber la liaison de deux ligands, chacun spécifique d'un type de récepteur à opioïde (mu et kappa). Toutefois, l'affinité du FMRF-amide pour ces récepteurs est relativement faible. Ceci pouvant s'expliquer notamment par le fait que les peptides endogènes apparentés au FMRF-amide chez les mammifères ne sont pas le FMRF-amide lui-même. Il est fort probable que le matériel endogène ait une affinité plus élevée, que celle du FMRF-amide, pour les récepteurs mu et kappa des opioïdes.

De nombreuses études ont montré que le FMRF-amide a un rôle d'antagoniste dans l'analgésie induite par les opioïdes. A ce propos, Hill *et al.* (1987) rapportent l'existence d'effets anti-analgésiques du FMRF-amide chez les mammifères (rat, souris). De même, Kavaliers et Yang (1989) montrent que les peptides endogènes de

mammifères (F8Fa et A18Fa) agissent comme des antagonistes d'opioïdes et interviennent dans la régulation de l'analgésie. Enfin il existe des concentrations élevées en F8Fa et A18Fa dans des régions du SN de mammifères connues pour leur importance dans la régulation de l'analgésie par l'intermédiaire des opioïdes (Majane et Yang, 1987; Majane *et al.*, 1988). Toutefois, les études de Jacoby *et al.* (1987) et de Raffa et Jacoby (1989), chez la souris, montrent que le FMRF-amide et les neuropeptides apparentés: F8Fa et A18Fa ne sont pas des antagonistes des opioïdes dans tous les tests effectués chez les mammifères. Ces peptides pourraient avoir des propriétés partielles d'agonistes ou pourraient modifier l'action des opioïdes par des mécanismes indirects pouvant impliquer la disponibilité des ions Ca^{2+}.

Actions endocrines

Sorenson *et al.* (1984) ont étudié l'action du FMRF-amide sur le pancréas du rat. Les décharges d'insuline et de somatostatine induites par le glucose sont inhibées sous l'action du FMRF-amide. Par contre, celui-ci est sans effet sur la sécrétion de glucagon. De plus, un Ac anti-FMRF-amide permet d'observer des immunoréactions localisées dans les cellules des îlots de Langerhans contenant le polypeptide pancréatique. Ces résultats indiquent que l'Ac anti-FMRF-amide reconnaît une substance qui pourrait être capable de moduler l'activité sécrétoire des îlots de Langerhans.

Actions diverses

- ***Effets sur le comportement d'ingestion de nourriture***

Les travaux de Kavaliers et Hirst (1985a, b) suggèrent que le FMRF-amide ou un peptide apparenté peut, chez les mammifères, avoir un rôle de neuromodulateur ou de régulateur antagoniste dans le comportement d'alimentation faisant intervenir les opioïdes. Ceci peut impliquer un antagonisme direct au niveau des récepteurs aux opioïdes, une activation des circuits neuronaux inhibiteurs, ou des actions directes sur d'autres transmetteurs ou modulateurs du comportement d'alimentation.

- ***Effets sur la fonction gastrointestinale***

L'action antagoniste d'opioïde du FMRF-amide n'est pas limitée à l'analgésie et à l'alimentation. Elle s'étend également au tractus gastrointestinal. Ainsi, il a été montré que la morphine peut induire une constipation; l'administration simultanée du FMRF-amide et de la morphine atténue cette action (Raffa, 1988). Par contre, chez la souris, le FMRF-amide et les peptides A18Fa et F8Fa de mammifères ont, comme la morphine, un effet inhibiteur sur le transit du colon (Jacoby *et al.*, 1987; Raffa et Jacoby,

1989). Dans ce cas, ces peptides n'apparaissent pas comme des antagonistes de la morphine mais présentent plutôt des propriétés d'agonistes. Toutefois, un rôle indirect ou modulateur du FMRF-amide est aussi possible.

Enfin, chez les mammifères, le FMRF-amide jouerait également un rôle dans certains comportements tels que le dressage (Raffa *et al.*, 1986) et dans l'amnésie (Telegdy et Bollok, 1987).

I-4. Etude des relations structure-activité

Des études réalisées sur différents tissus (coeur, muscle, neurones) de mollusques en particulier, mais également d'insectes, montrent que l'activité biologique des molécules (FMRF-amide et peptides apparentés) est dépendante de leur structure. Ainsi, la substitution d'un ou de plusieurs des quatre résidus Phe^1, Met^2, Arg^3., Phe^4, modifie la potentialité de ces molécules.

Chez *Lymnaea stagnalis*, Brussaard *et al.* (1988, 1989) ont étudié la structure requise pour l'induction des réponses des CDCs au FMRF-amide. La terminaison Arg-Phe-NH_2 apparaît être indispensable pour obtenir une activité: les analogues non amidés, substitués en position 4 (FMRW-NH_2, FMRL-NH_2) ou en position 3 (FMKF-NH_2) sont totalement inactifs. De plus, l'acide aminé en position 2 doit posséder un groupe radical (R) non polaire: FMRF-NH_2, FLRF-NH_2 ou FnLRF-NH_2 sont équipotents; par contre l'oxydation de la méthionine, lui conférant une polarité, rend la molécule totalement inactive. A ce propos, Price (1986) avance l'hypothèse que l'oxydation de la méthionine serait un mécanisme possible d'inactivation dans la neurotransmission impliquant le FMRF-amide. Enfin, le résidu en position 1 peut être différent de la phénylalanine mais doit posséder un groupe R aromatique et non polaire.

La partie N-terminale (Phe-Met) paraît donc avoir une importance mineure dans l'activation des récepteurs. Par contre, un changement au niveau de la partie C-terminale (Arg-Phe-NH_2) entraîne une perte totale de l'activité biologique.

Chez *Lymnaea*, ce type de structure est nécessaire à la fois pour l'induction de la réponse hyperpolarisante et pour la suppression de l'excitabilité des CDCs. De plus, l'activité sur les CDCs des peptides naturels ou synthétiques possédant une extension N-terminale (GDP-, SDP-, pQDP-, P-FLRF-NH_2) est équivalente à celle du FMRF-amide pour l'induction des deux réponses précédemment citées. Les récepteurs des CDCs ne font donc pas la distinction entre les tétra- et les heptapeptides natifs. Les auteurs concluent que les CDCs ne possèdent qu'un seul type de récepteur pour les FaRPs dont l'activation requiert la séquence Arg-Phe-NH_2, tandis que les acides aminés N-terminaux seraient impliqués dans la liaison au récepteur.

Chez *Helix*, la structure de base des molécules FMRF-amide requise pour obtenir une activité biologique (cardiostimulation) ou une liaison aux récepteurs est commune à celle des autres mollusques. L'amide C-terminale ainsi que l'arginine en position 3 sont indispensables. La substitution des résidus Phe^1 et Met^2 par des acides aminés portant un groupe R similaire est possible; l'oxydation de la méthionine entraîne une perte de l'activité. Enfin, la longueur minimale nécessaire est de 4 résidus.

Il existe toutefois certaines caractéristiques spécifiques aux récepteurs d'*Helix*. Ceux-ci présentent une certaine affinité pour les dérivés FMRF-amide N-bloqués ou possédant une extension N-terminale (Tyr désaminé, Tyr, Tyr-Gly-Gly, acétyl). Notons de plus que les heptapeptides endogènes d'*Helix* analogues au FLRF-amide, présentant les extensions N-terminales pQDP-, NDP-, SDP-FLRF-amide, produisent une réponse biphasique sur le coeur. Ils sont stimulateurs à faible dose, mais inhibiteurs à dose modérée ou élevée. Par ailleurs, les tests de liaison aux récepteurs du cœur ou du cerveau montrent que la capacité de ces peptides à déplacer un radioligand est vingt fois plus faible que celle du FMRF-amide. Les heptapeptides n'agissent donc pas au niveau des récepteurs du FMRF-amide (Payza, 1987).

Chez le criquet *Schistocerca gregaria*, l'activité cardioexcitatrice des molécules apparentées au FMRF-amide nécessite la présence de l'amide C-terminale et de l'arginine en position 3. La substitution des résidus Met^2, Phe^1 et Phe^4 entraîne une chute considérable de l'activité. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cadre de l'étude de la modulation de la transmission neuromusculaire au niveau du muscle extenseur du tibia du criquet (Evans et Myers, 1986a, b).

La structure des peptides FMRF-amide est donc un facteur déterminant pour l'obtention d'une activité biologique ou d'une liaison au récepteur. Chez la limnée, un seul type de récepteur au niveau des CDCs serait impliqué dans l'induction des deux réponses (hyperpolarisante et suppressive) (Brussaard *et al.*, 1989). Par contre, chez l'escargot *Helix*, des sites récepteurs d'affinité et de spécificité différentes seraient présents au sein de divers tissus et notamment au niveau du cœur et du cerveau (Payza, 1987; Payza *et al.*, 1989). Heptapeptides et tétrapeptides n'interagiraient pas sur les mêmes sites récepteurs: les heptapeptides à faible dose sont beaucoup plus actifs sur le cœur que le FMRF-amide et ont des effets cardioexcitateurs plus importants. Sur les muscles rétracteurs, le FMRF-amide provoque une contraction alors que l'heptapeptide pQDPFLRF-amide relache le muscle contracté (Payza *et al.*, 1989).

Les effets distincts des tétra- et heptapeptides sur les neurones dans le SNC d'*Helix* seraient dus à l'existence de sites récepteurs multiples: deux types seraient plus

ou moins exclusivement sensibles aux tétrapeptides et deux autres types seraient plutôt affectés par les heptapeptides YGGFMRF-amide et pQDPFLRF-amide (Cottrell et Davies, 1987).

Notons pour terminer que la structure du peptide influence également l'immunoréactivité. Par exemple, la présence d'un résidu de leucine à la place d'un résidu de méthionine dans un FaRP a pour effet de réduire l'immunoréactivité de l'analogue, le contenant de 75 à 80 % (Greenberg *et al.*, 1988).

I-5. Gènes et précurseurs du FMRF-amide

Le gène codant pour le précurseur du FMRF-amide chez *Aplysia californica* a été cloné et séquencé (Schaefer *et al.*, 1985; Taussig et Scheller, 1986). Le précurseur de 597 acides aminés (fig. 3A) comporte à son extrémité amino-terminale une séquence signal hydrophobe qui est immédiatement suivie d'une copie du peptide nt-GYLRF-amide (nt indique que ce peptide se situe du côté N-terminal du précurseur). Ce peptide, bien que n'ayant jamais été identifié dans des extraits, est supposé être un FaRP mineur chez l'aplysie. On trouve ensuite une copie du tétrapeptide FLRF et 28 copies du tétrapeptide FMRF; chacune étant flanquée du côté N-terminal par les résidus Lys-Arg et du côté C-terminal par les résidus Gly-Lys. Ces résidus constituent les sites de reconnaissance nécessaires au clivage protéolytique. Le résidu glycine du côté C-terminal des produits de clivage sert de substrat pour l'amidation produisant ainsi le tétrapeptide FMRF amidé (Taussig *et al.*, 1988). La majorité des fragments répétés de 15 à 16 acides aminés (contenant chacun un FMRF-amide), ainsi que les nucléotides les codant, sont virtuellement identiques. De ce fait, Price *et al.* (1987) proposent que ces répétitions représentent des évènements survenus relativement récemment. Ces auteurs considèrent donc que le gène ancestral peut être identifié approximativement par délétion de ces séquences itératives (fig. 3B). Le précurseur résultant contiendrait neuf copies de FMRF-amide, une de FLRF-amide et une de nt-GYLRF-amide. Un tel précurseur serait en accord étroit avec le rapport observé entre les taux de FMRF-amide et de FLRF-amide dans des extraits tissulaires de nombreux mollusques (bivalves, céphalopodes, et la plupart des gastéropodes); ce rapport reflétant le nombre de copies de ces deux peptides dans le précurseur. Dans le cas des pulmonés, Price *et al.* (1987) suggèrent l'existence de deux gènes distincts codant pour deux précurseurs des FaRPs. L'un serait similaire au précurseur ancestral des mollusques et donnerait plusieurs copies de FMRF-amide (environ 9), une de FLRF-amide et un analogue du nt-GYLRF-amide. Le second donnerait naissance aux heptapeptides. Le gène codant pour ce deuxième précurseur,

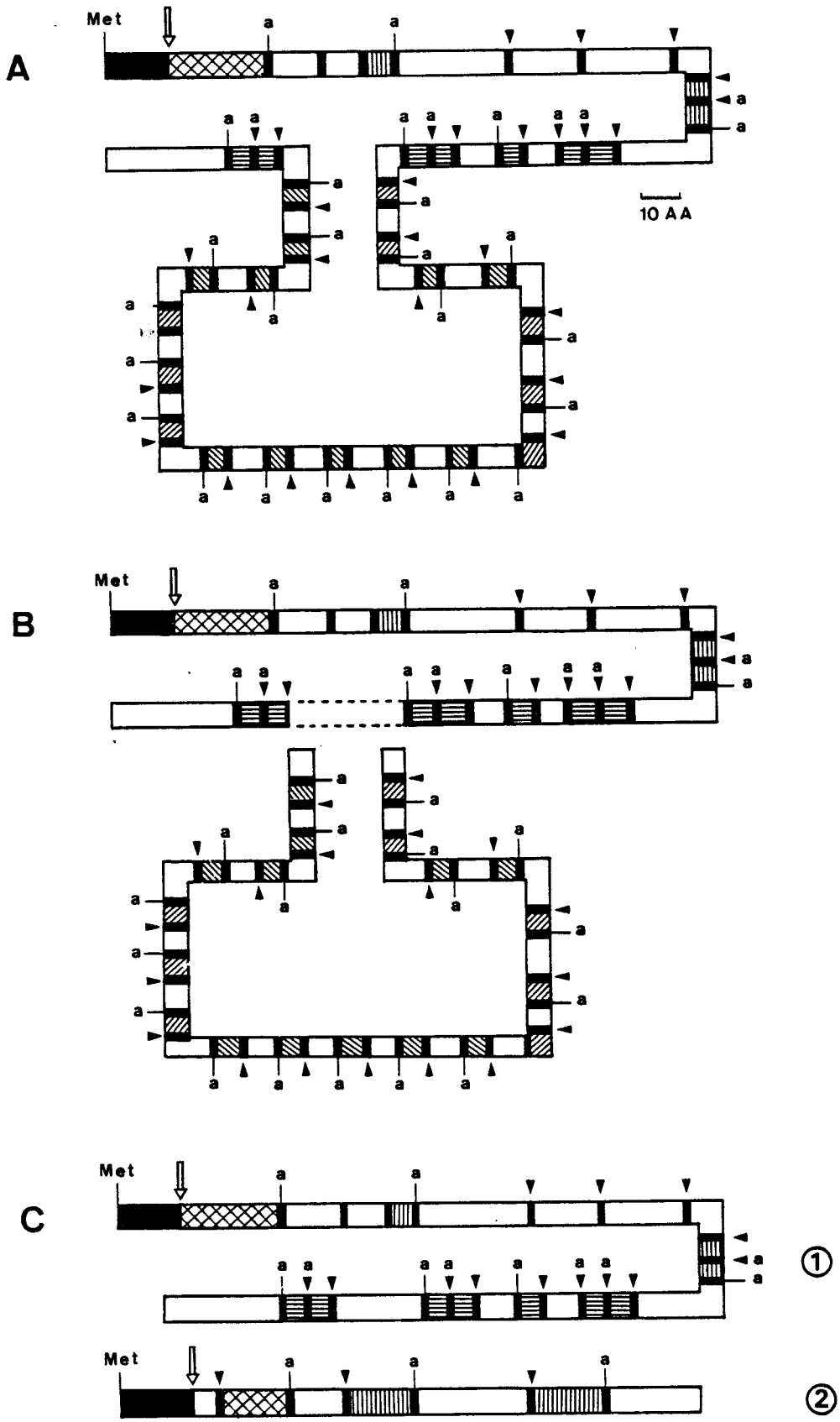
Figure 3

Représentation hypothétique des précurseurs du FMRF-amide chez les mollusques et de leur origine par extrapolation à partir du précurseur connu de l'aplysie.
(d'après Price *et al.*, 1987).

A - Précurseur du FMRF-amide de l'aplysie.
(d'après Taussig et Scheller, 1986).
La méthionine d'initiation à l'extrémité N-terminale (Met) est suivie de la séquence signal hydrophobe (zone noircie). La large flèche indique le site au niveau duquel cette séquence est clivée du précurseur et qui est immédiatement suivie par le peptide nt-GYLRF-amide (zone quadrillée). Les barres verticales noires représentent les résidus d'acides aminés basiques, sites potentiels de coupure. Les sites de clivage simple sont indiqués par les pointes de flèche noires, ceux possédant un signal d'amidation (résidu glycine) sont signalés par la lettre "a". La seule copie de FLRF-amide est hachurée verticalement. Les copies de FMRF-amide localisées dans la région "ancestrale" du précurseur sont hachurées horizontalement, celles de la région itérative sont hachurées obliquement.

B - Hypothèse sur la structure de base du précurseur du FMRF-amide de mollusques.
Par délétion de la région itérative du précurseur de l'aplysie (A), le précurseur ancestral du FMRF-amide résultant renfermerait une copie de FLRF-amide et neuf copies de FMRF-amide.
Les symboles utilisés sont ceux décrits en A.

C - Les deux précurseurs hypothétiques rendant compte des peptides apparentés au FMRF-amide chez *Helix* et les autres pulmonés.
L'un de ces précurseurs (1) est présumé similaire au précurseur ancestral des mollusques. Il produit du FMRF-amide, du FLRF-amide et un analogue du nt-GYLRF-amide.
Le second précurseur (2), spécifique aux pulmonés, produirait trois heptapeptides.
Les symboles utilisés sont ceux décrits en A.


A
Met
10 AA
B
Met
C
Met
①
Met
②

proviendrait d'une modification et d'une duplication de la partie N-terminale du gène ancestral des mollusques (fig. 3C). Cette hypothèse est confortée par différentes études:

- l'observation d'une distribution tissulaire différente entre le FMRF-amide et les heptapeptides (Lehman et Price, 1987),
- les effets biologiques distincts de ces peptides sur les muscles d'*Helix* (Lehman et Greenberg, 1987),
- l'isolement et le séquençage récents, chez *Lymnaea stagnalis*, d'un clone cDNA codant pour un précurseur contenant neuf copies de FMRF-amide et deux de FLRF-amide (Linacre *et al.*, 1990). Ce précurseur est donc environ deux fois plus petit que celui de l'aplysie, il est aussi moins hautement répliqué. Toutefois, les gènes de ces deux espèces sont nettement homologues. Par ailleurs, ce précurseur ne code pour aucun des heptapeptides isolés chez la lymnée (Ebberink *et al.*, 1987). Ces dernières recherches soutiennent donc l'idée que les heptapeptides sont codés sur un ou sur des gènes séparés (Price et Greenberg, 1989).

Le gène codant pour les neuropeptides apparentés au FMRF-amide a également été isolé et séquencé chez la mouche *Drosophila*. (Schneider et Taghert, 1988). Ce gène code pour un précurseur polyprotéique de 342 acides aminés (39 kDa) renfermant 13 séquences peptidiques apparentées au FMRF-amide parmi lesquelles on retrouve cinq fois la séquence du peptide identifié par Nambu *et al.* (1987): le DPKQDFMRF-amide.

Ce précurseur présente en outre une séquence homologue à celle du CRF ("corticotropin-releasing factor") ou de peptides qui lui sont apparentés. Chez l'aplysie le précurseur du FMRF-amide renferme également des séquences homologues à celles de neuropeptides de vertébrés tels que le CRF, l'α-MSH ("melanophore stimulating hormone") et le CLIP ("corticotropin-like intermediate-lobe peptide") (Taussig et Scheller, 1986). La mise en évidence de ces homologies renforce l'argument selon lequel le gène du FMRF-amide d'invertébrés est ancestralement apparenté à certains gènes de neuropeptides de vertébrés (Schneider et Taghert, 1988).

II - ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES RELATIVES AU SYSTEME NERVEUX DES NEREIDIENS

Les études morphologiques, histochimiques et immunohistochimiques conduites chez les *Nereidae*, ont abouti à une bonne connaissance du SNC, et en particulier du cerveau (Dhainaut-Courtois, 1970; Engelhardt, 1978; bibl. *in* Dhainaut-Courtois et Golding, 1988; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988). Ce dernier renferme 26 paires de

noyaux ganglionnaires (Holmgren, 1916) parmi lesquels les noyaux 18-20 constituent deux complexes neurosécréteurs symétriques en relation étroite, dorsalement, avec un organe présumé photorécepteur (noyau ganglionnaire 19) (Dhainaut-Courtois, 1965), latéralement, avec l'organe nucal considéré comme étant chimiorécepteur, et, ventralement, avec une aire neurohémale: le complexe neuroglandulovasculaire (Dhainaut-Courtois , 1968; Golding et Whittle, 1977; Pfannenstiel et Grothe, 1988) mettant en contact le cerveau et le système circulatoire et le milieu coelomique. L'utilisation des techniques classiques de coloration des neurosécrétions telles que la méthode de Clark (1955) a permis d'identifier deux types majeurs de cellules neurosécrétrices dans le noyau ganglionnaire 20: des cellules fuchsinophiles (C I) et des cellules ayant une affinité pour le vert lumière (C II), dont les axones se terminent au niveau de l'aire neurohémale.

Le cerveau est relié par le collier périœsophagien à la chaîne nerveuse ventrale. Celle-ci est constituée d'une succession de ganglions renfermant chacun trois groupes cellulaires principaux (Dhainaut-Courtois et Warembourg, 1967): les groupes antérieur, médian et postérieur.

L'utilisation de méthodes cytochimiques, enzymologiques, radioautographiques et biochimiques a, par la suite, révélé la présence dans le SNC de neurotransmetteurs classiques tels que l'acétylcholine (Ach), les amines biogènes: 5-hydroxytryptamine (5-HT) et dopamine (DA), et l'acide-γ-amino-butyrique (GABA) (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1969, 1979a, b).

Le développement des méthodes immunocytochimiques en microscopie photonique et électronique et l'utilisation d'anticorps dirigés contre des peptides de vertébrés ont été les éléments déterminants ayant provoqué un progrès considérable dans la connaissance du SNC des polychètes et en particulier de celui de *Nereis diversicolor* (Engelhardt *et al.*, 1982; Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985a, b, 1986; et biblio.*in* Dhainaut-Courtois et Golding, 1988; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988). Ainsi, l'observation d'immunoréactivités, au sein du SNC et parfois du SNP à l'aide d'anticorps dirigés contre des neuropeptides de vertébrés, met en évidence l'existence de substances immunologiquement apparentées à la leucine- et à la méthionine-enképhaline, l'α- et la β-endorphine, l'α-néo-endorphine, la dynorphine 1-17, la somatostatine, le hpGRF ("human pancreatic gonadotropin-releasing factor"), le CRF, la vasopressine, l'ocytocine, la β-MSH, la CCK/gastrine, la substance P, le VIP, l'insuline, l'angiotensine. La localisation des cellules immunoréactives pour chacun des anticorps utilisés et les techniques classiques de coloration des neurosécrétions ont permis de dresser une cartographie détaillée du cerveau de *Nereis diversicolor* (voir fig. 4, chap.

Résultats). Les peptides apparentés aux opioïdes Leu-, Met-enképhaline et dynorphine 1-17 sont présents exclusivement dans le cerveau au niveau de péricaryons, ainsi que dans des fibres et terminaisons axonales situées dans la région infracérébrale. Par ailleurs, l'anticorps anti-dynorphine 1-17 marque sélectivement les cellules C II du noyau 20. Dans ce même noyau, parmi les cellules fuchsinophiles C I, les petites dorsales (C Ia) sont marquées pour la CCK (Engelhardt *et al.*, 1982) alors que les grosses cellules ventrales (C Ib) sont marquées pour la Leu-enképhaline. De plus, parmi tous les anticorps testés, seules des immunoréactions pour les peptides opioïdes (Leu-, Met-enképhaline et dynorphine 1-17) ont été observées au niveau de l'aire neurohémale où parviennent les axones des cellules C Ib et C II (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986). Enfin, l'existence d'au moins deux substances à l'intérieur d'un même neurone a également été observée: CCK/gastrine et GRF/CRF, CCK/gastrine et 5-HT (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985a, b, 1986).

Dernièrement, des études immunocytochimiques ont été réalisées à l'aide d'anticorps spécifiques de neuropeptides d'invertébrés. Des immunoréactions ont notamment été observées avec un anti-neuroparsine (fourni par le Dr Girardie, Bordeaux, France) (Dhainaut-Courtois, communication personnelle). L'anti-CDCH (fourni par le Dr van Minnen, Amsterdam, Pays-Bas) marque diverses régions du SNC. Entre autres, dans le cerveau, des péricaryons localisés dans la région caudo-dorsale du noyau ganglionnaire 20, proche d'une zone supposée être photosensible, et des terminaisons axonales situées dans le neuropile sont immunoréactifs. Il se pourrait que la substance détectée chez *Nereis* ait au moins partiellement un rôle de NT (ou NM) (Baratte et Dhainaut-Courtois, 1989). Enfin, avec l'anti-FMRF-amide des résultats préliminaires ont montré la présence d'immunoréactions dans tout le SNC (Dhainaut-Courtois et Golding, 1988; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988). La mise en évidence dans le SNC de nombreux neuropeptides, apparentés à ceux de vertébrés et quelques-uns apparentés à ceux d'invertébrés, permet de supposer que de nombreux systèmes peptidergiques encore inconnus restent à identifier.

Le rôle exact de ces substances n'a pas encore été établi. Toutefois, leur abondance et la localisation des immunoréactions suggèrent qu'elles agissent au moins partiellement comme des neuromodulateurs. Cette proposition est soutenue par les résultats de Golding et May (1982) qui révèlent une exocytose de granules de sécrétion dans le neuropile des polychètes. La présence de substances apparentées aux opioïdes au niveau des terminaisons axonales dans la région infracérébrale est un élément en faveur d'une action neuromodulatrice ou neurotransmettrice de ces substances dans la régulation des sécrétions au niveau de l'aire neurohémale. Cette fonction serait similaire à celle des

opioïdes chez les mammifères (Kuhn et Saltiel, 1986) et semble probable chez d'autres invertébrés chez qui des opioïdes ont également été découverts au niveau d'organes neurohémaux (Martin *et al.*, 1973; Gros *et al.*, 1978; Hansen *et al.*, 1982; Jaros *et al.*, 1985). Il est également possible que certains de ces peptides opioïdes jouent un rôle dans la physiologie de la reproduction. En effet, des immunoréactions pour la Leu-enképhaline et la dynorphine 1-17 ont été respectivement observées dans les ovocytes et les spermatocytes (Baratte, 1987; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988). Rappelons que l'implication des peptides opioïdes dans la spermatogenèse et l'ovogenèse a également été établie chez l'escargot (Marchand et Dubois,1985), chez l'oursin (Cariello *et al.*, 1986) et chez le rat (Engelhardt *et al.*, 1986).

Des dosages radioimmunologiques de la dynorphine 1-17, dans les milieux de culture sur lesquels ont été incubés des prostomiums, ont par ailleurs montré que la substance apparentée à la dynorphine 1-17 est libérée au niveau de la région infracérébrale (Dhainaut-Courtois et Golding, 1988; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988).

En ce qui concerne les substances apparentées à l'insuline et à la vasopressine, elles pourraient respectivement avoir un rôle dans les mécanismes de morphogenèse (Boilly-Marer, 1983) et d'osmorégulation (Dhainaut-Courtois, communication personnelle).

Chez les néréidiens, l'implication d'une molécule synthétisée par le cerveau dans la régulation d'une fonction biologique a été montrée par Durchon (1948, 1949, 1952, 1965) dont les travaux mettent en évidence l'existence d'une neurosécrétion cérébrale responsable de l'inhibition de la gamétogenèse mâle et femelle.

Par la suite, de nombreuses études expérimentales ont montré l'influence du SNC dans les processus de croissance somatique et de régénération. Toutefois, la structure biochimique et le site de synthèse du ou des facteur(s) neuroendocrine(s) impliqué(s) sont encore mal connus (Durchon, 1967; Golding et Whittle, 1977; Durchon, 1984; Porchet et Dhainaut-Courtois, 1988).

Les travaux de Porchet (1970), Durchon et Porchet (1971), font de plus apparaître que l'activité endocrine cérébrale impliquée dans l'inhibition de la gamétogenèse n'est pas constante au cours de la vie de l'animal. Importante durant la phase juvénile, elle diminue progressivement chez le ver d'âge moyen pour s'annuler pratiquement à l'approche de la maturité sexuelle. La chute de cette activité résulte à la fois de l'influence de facteurs externes agissant au niveau du cerveau, tels que la photopériode (Hauenschild, 1959; Golding, 1967; Clark, 1969), la température (Durchon et Porchet, 1971) et de facteurs internes (Durchon, 1952; Porchet et Durchon, 1968; Porchet 1970, 1974; Porchet et Cardon, 1976). La neurosécrétion cérébrale impliquée

dans le contrôle du développement des néréidiens a été l'objet d'une tentative de purification dès 1963 par Durchon *et al.*. Par la suite, les travaux de Cardon (1970), Cardon *et al.* (1981) ont permis d'envisager qu'il s'agirait d'un neuropeptide de faible poids moléculaire n'absorbant pas à 254 nm, donc ne renfermant pas d'acides aminés aromatiques. Ce peptide est vraisemblablement riche en glycine et proline (Porchet *et al.*, 1985) et possède un point isoélectrique situé entre 6,3 et 6,4 (Bulet et Porchet, 1986). L'isolement de ce peptide dénommé facteur inhibiteur de la spermatogenèse se poursuit actuellement. Au cours de sa purification ce facteur est détecté par son activité biologique *in vitro* (en culture organotypique). Ce test biologique nécessite au minimum 8 jours, ce qui dans le cadre d'une purification représente un réel handicap. Dans le but de disposer d'un test plus rapide et plus sensible pour repérer la molécule, la production d'une sonde immunologique spécifique a été entreprise (Delaire-Hesdin, 1989). L'anticorps monoclonal sélectionné, appelé NV 24, reconnaît une fraction semi-purifiée biologiquement active donc contenant le facteur inhibiteur. L'injection de cette fraction dans un deuxième gradient d'élution en HPLC fait apparaître, qu'en fait, la fraction immunoréactive reconnue par l'anticorps NV 24 est différente de celle contenant l'activité biologique du facteur inhibiteur. Les essais préliminaires de séquençage du pic immunoréactif révèlent la présence de deux peptides, l'un commençant par la séquence Gln-Val-Pro-Gly (ou Glu) et l'autre par Glu-Leu-Trp-Glu (ou Gly).

Les études immunohistochimiques réalisées en microscopie photonique sur le cerveau et la chaîne nerveuse de *Nereis virens* à l'aide de l'anticorps NV 24 ont permis, d'une part, d'établir que NV 24 est effectivement dirigé contre une neurosécrétion cérébrale et, d'autre part, d'identifier les cellules impliquées dans la synthèse ou le stockage des molécules reconnues. Par ailleurs, l'anticorps NV 24 reconnaît deux protéines cérébrales de haut poids moléculaire: 75,8 et 109 kDa pouvant représenter les précurseurs des molécules purifiées (Delaire-Hesdin, 1989).

En effet, chez *Nereis diversicolor*, l'étude des précurseurs de neuropeptides apparentés à des peptides de vertébrés, à l'aide d'anticorps anti-procholécystokinine, anti-dynorphine 1-17 et anti-α-néoendorphine a établi qu'un même polypeptide de haut poids moléculaire (70 kDa) et reconnu par les trois anticorps constituerait le précurseur des molécules concernées. Par ailleurs, l'utilisation de l'anticorps NV 24 spécifique de molécules de néréidiens, montre la présence, parmi les protéines extraites du cerveau et parmi les produits traduits *in ovo* à partir des ARNm de cerveau de *Nereis diversicolor*, d'un polypeptide de 28 kDa. Ces données témoignent de l'existence, dans le cerveau des néréidiens, d'au moins deux types de précurseurs à partir desquels différents neuropeptides actifs sont maturés (Guissi-Kadri, 1989). Chez les néréidiens, il existerait donc un petit nombre de précurseurs neuropeptidiques de masse moléculaire élevée. Ces

résultats sont à rapprocher de ceux obtenus chez l'aplysie, chez qui le précurseur du FMRF-amide est un polypeptide de 71 kDa renfermant 28 copies du même pentapeptide Phe-Met-Arg-Phe-Gly (Taussig *et al.*, 1988). De même, chez la limnée, le précurseur de la CDCH (hormone de ponte) de 30 kDa, renferme 12 peptides différents possédant des fonctions biologiques différentes (Vreugdenhil *et al.*, 1988).

Actuellement, le matériel apparenté à la CCK/gastrine est en cours de purification. Les travaux révèlent l'existence d'une certaine hétérogénéité, 3 à 4 formes différentes semblent être présentes. Parmi celles-ci, une molécule nettement prédominante apparaît être plus apparentée à la CCK qu'à la gastrine (Smiri, 1990). Ces résultats sont en corrélation avec les données immunohistochimiques acquises précédemment et confirment l'existence dans le SNC des néréidiens de matériel apparenté à la CCK/gastrine des mammifères. L'obtention d'une quantité suffisante de matériel purifié pour déterminer sa structure permettrait la production d'une sonde oligonucléotidique susceptible de repérer le précurseur et d'établir s'il s'agit bien du polypeptide de 70 kDa reconnu par l'anticorps (Guissi-Kadri, 1989).

III - BUT DU TRAVAIL

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des neuropeptides de *Nereis diversicolor* et concerne l'identification et la caractérisation des molécules apparentées au FMRF-amide. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à définir précisément la localisation des immunoréactions observées à l'aide de l'anticorps anti-FMRF-amide. Nous avons ensuite entrepris la purification et la caractérisation structurale de ce matériel immunoréactif.

L'intérêt de ce travail réside à différents niveaux:

- sur le plan phylogénique nous pourrons, connaissant la structure exacte de ces molécules et comparativement aux molécules apparentées au FMRF-amide isolées au sein des diverses espèces de mollusques et d'arthropodes (embranchements proches de celui des annélides), établir si, au travers de ces embranchements, la famille des FMRF-amide est relativement bien conservée.

- l'étude de leur rôle et de leur possible implication dans des processus de régulation métabolique ou de coordination de certaines fonctions du corps permettra en outre de progresser dans la compréhension de la physiologie de la néréis.

- dans le cadre des travaux entrepris en biologie moléculaire et concernant la caractérisation des précurseurs des neuropeptides chez la néréis, la séquence en acides aminés de ces molécules pourrait servir à la fabrication d'une sonde homologue permettant d'isoler leur(s) précurseur(s).

MATERIEL et METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

Les vers marins sur lesquels nous avons travaillé sont: *Nereis diversicolor* O.F. Müller, *Nereis virens* Sars, et *Perinereis cultrifera* Grübe (annélides polychètes). Les premiers ont été récoltés à Petit-Fort-Philippe et Grand-Fort-Philippe (Nord) dans la vase de l'estuaire de l'Aa. Les seconds ont été obtenus dans une ferme d'élevage (Bruinïsse, Pays-Bas). Enfin, la troisième espèce a été récoltée à Luc-sur-Mer (Calvados) au niveau du faciès rocheux de la plage.

Au laboratoire, les animaux sont maintenus dans de l'eau de mer naturelle à 13°C, avec dans le cas de *Nereis virens* la présence de sable et une oxygénation permanente des aquariums.

Le sexe et l'âge des animaux sont déterminés par ponction cœlomique. Les mâles sont reconnaissables par la présence d'amas mûriformes de spermatogonies; quant aux femelles, elles sont triées en fonction de leur diamètre ovocytaire.

Les études cytologiques ont été réalisées sur les trois espèces d'annélides polychètes: *Nereis diversicolor*, *Nereis virens* et *Perinereis cultrifera* et restreintes dans le cas des deux dernières espèces à des femelles d'âge moyen (diamètre ovocytaire de 90 à 120 µm). *Nereis diversicolor* a été l'espèce utilisée pour la purification du matériel apparenté au FMRF-amide et ceci sans distinction de sexe et de l'état de maturité.

II - ETUDES CYTOCHIMIQUES EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Les tissus étudiés sont le cerveau (localisé dans le prostomium), la chaîne nerveuse et l'intestin. Des prostomiums et des tronçons de corps (de 2 à 3 métamères) sont prélevés et fixés pour l'étude en microscopie photonique.

II-1. Préparation des tissus

Les prostomiums et les métamères sont fixés pendant 24 heures dans du Bouin Hollande (sans acide acétique) contenant 10 % d'une solution saturée de chlorure mercurique. Les tissus fixés sont déshydratés par passages successifs dans des alcools à 70 %, 90 % et 100 %, puis laissés une nuit dans un bain d'alcool butylique normal. Après inclusion dans de la cytoparaffine, les pièces sont sectionnées au microtome en coupes sériées transversales, horizontales ou sagittales de 7 µm d'épaisseur.

II-2. Réaction immunocytochimique

Les coupes déparaffinées dans 2 bains de toluène sont réhydratées par passages successifs dans des bains d'alcool à 100 %, 90 % et 70 %. Le sublimé est éliminé par passage dans un bain d'alcool iodé. Après 15 mn d'immersion dans le tampon Coons (150 mM NaCl; 100 mM véronal sodique; pH 7,2), les coupes sont traitées de la façon suivante:

- incubation avec le premier anticorps polyclonal anti-FMRF-amide préparé chez le lapin (Ac 646) (don du Professeur Boer et du Docteur van Minnen, Amsterdam, Pays-Bas) pendant une nuit à température ambiante, sous atmosphère humide. Différentes dilutions de l'anticorps dans le tampon Coons ont été testées: 1/300, 1/500, 1/1000,
- lavage de 10 mn dans le tampon Coons,
- incubation avec le deuxième anticorps: sérum de chèvre anti IgG de lapin marquées à la péroxydase (Diagnostics Pasteur) dilué au 1/40 dans le tampon Coons, pendant 1h30 à température ambiante,
- lavage de 10 mn dans le tampon Coons,
- révélation de l'activité péroxydasique par application d'une solution de 4-chloro-1-naphtol (Sigma) (40 mg/100 ml de Tris 0,1 M, pH 7,6; 0,15% H_2O_2). La réaction est arrêtée par immersion dans de l'eau distillée.

Un anticorps polyclonal anti-cholécystokinine (CCK/8) dilué au 1/200 (fourni par le Professeur Tramu, Université de Bordeaux I) a également été testé en parallèle avec l'anticorps anti-FMRF-amide sur des coupes alternées de prostomium de *Nereis diversicolor,* dans le but d'étudier une colocalisation éventuelle de deux molécules présentant des homologies structurales par leur extrémité carboxy-terminale.

II-3. Coloration signalétique des neurosécrétions

Les coupes présentant un marquage pour le FMRF-amide sont décolorées dans un bain d'acétone qui élimine le produit de réaction bleu formé par le 4-chloro-1-naphtol, et rincées à l'eau distillée. Elles sont alors colorées par la technique de Clark (1955) dans laquelle le chromotrope 2R a été remplacé par l'hématoxyline de Groat. Cette coloration séquentielle permet de distinguer les différents types neuronaux immunoréactifs.

III - PURIFICATION ET CARACTERISATION DES FaRPS DE *NEREIS DIVERSICOLOR*

III-1. Chromatographie d'affinité

III-1.1. Préparation de l'immunoadsorbant

Réalisée en collaboration avec le Docteur van Minnen, Amsterdam, Pays-Bas.

- Purification des immunoglobulines G (IgG) anti-FMRF-amide

L'antisérum obtenu chez le lapin est dilué en tampon phosphate salé (PBS) 50 mM; NaCl 150 mM; pH 7,2 (1V/3V). Les IgG sont précipitées par addition lente sous agitation constante d'un volume égal de sulfate d'ammonium (707 g $(NH_4)_2SO_4$/litre). Après une heure de contact à 4°C sous agitation douce, la solution est centrifugée (12000 t/mn, 10 mn, 4°C). Le culot est repris par 50 % de sulfate d'ammonium. A l'issue d'une nouvelle centrifugation (12000 t/mn, 10 mn, 4°C), le culot est solubilisé dans 1 ml de PBS puis dialysé contre le même tampon pendant 1 nuit à 4°C.

- Couplage des IgG purifiées à un support solide (Affi-Gel 10)

6 ml de gel (Affi-Gel 10, Bio Rad) sont lavés par 3 volumes de propanol-2 froid (-20°C). Après centrifugation (3000 t/mn, 3 mn, 4°C), le gel est lavé par 3 volumes d'eau distillée froide (4°C). 75 mg d'IgG purifiées, diluées dans 12 ml de tampon de couplage (HEPES 0,1 M; pH 7,5) sont ajoutés au support d'affinité (Affi-Gel 10). Le couplage est réalisé pendant 2 heures à température ambiante. Les groupes réactifs du gel inoccupés par les IgG sont bloqués par addition d'éthanolamine 1 M, pH 8 (0,5 ml/ml de gel). Après une heure de contact à température ambiante, le gel est coulé dans une colonne et équilibré dans du PBS. La colonne est conservée à 4°C en présence d'azide de sodium 0,02 %.

III-1.2. Préparation de l'extrait biologique

Des lots de 30 g de vers congelés dans l'azote liquide et conservés à -70°C sont broyés à l'aide d'un homogénéiseur Polytron dans 100 ml

d'acétone (80 %) glacial maintenu dans un bain de glace. Après centrifugation (3000 t/mn, 30 mn, 4°C), le surnageant est filtré puis concentré à l'évaporateur rotatif (Büchi) à 45°C afin d'éliminer l'acétone. La solution aqueuse restante est congelée dans l'azote liquide puis lyophilisée.

III-1.3. Purification de l'extrait biologique

Le lyophilisat est solubilisé dans de l'eau distillée (4 g d'extrait lyophilisé équivalent à 250 animaux/90 ml). La solubilisation complète est obtenue par ultra-sonication (1 à 2 mn). L'extrait est centrifugé (20000 t/mn, 1 heure, 4°C), le surnageant est prélevé et déposé, à un débit de 0,3 ml/mn, sur la colonne d'affinité préalablement équilibrée en tampon PBS sans azide de sodium. La colonne est ensuite lavée par 25 ml de PBS à un débit de 0,5 ml/mn.

L'élution des molécules immunoadsorbées est réalisée par 2,5 ml d'acide propionique 1 M (pH 3) à un débit de 0,2 ml/mn; 15 fractions de 1,5 ml ont été collectées; la mesure de leur pH permet d'éliminer les éluats ne contenant pas d'acide propionique.

III-2. Immunodétection des FaRPs: Dot Immunobinding Assay (DIA)

Les fractions acides recueillies en sortie d'affinité sont concentrées par centrifugation sous vide ("Speed Vac", Savant Instrument) jusqu'à un volume de 100 µl. Les FaRPs sont détectés par DIA (technique de Hawkes *et al.*, 1982) adaptée à la détection de faibles quantités de FMRF-amide.

La membrane de nitrocellulose (Schleider et Schuell, BA 85/21, de porosité 0,45 µm, présentant un quadrillage de 0,3 mm/0,3 mm) est saturée par une solution de pili d'*Escherichia coli* ou d'ovalbumine à 0,5 mg/ml préparée en tampon TNGT (Tris 50 mM; NaCl 150 mM; Gélatine 0,25 %; Tween 20 0,15 %; pH 7,6) pendant 2 à 3 mn. La nitrocellulose est ensuite séchée (20 mn) dans une étuve à 110°C. Des dépôts (1 µl par échantillon) de chacune des fractions à analyser ont été réalisés. Sur chaque dépôt, 1 µl d'une solution de glutaraldéhyde à 1 % dans le tampon TNGT est ajouté afin de permettre la fixation des peptides sur les molécules utilisées pour la saturation (ovalbumine ou pili). La nitrocellulose est placée à l'étuve à 37°C pendant 30 mn. Elle est ensuite saturée par 5 % de lait écrémé (Gloria) préparé dans le tampon, pendant 20 mn à 37°C et sous agitation douce.

Après 4 lavages de quelques minutes dans le tampon TNGT, la nitrocellulose est mise en présence de l'Ac 646 anti-FMRF-amide dilué au 1/1000 dans ce

tampon pendant 45 mn à 37°C. Après 4 lavages de 3 mn chacun dans le tampon, la nitrocellulose est incubée avec un deuxième anticorps conjugué (sérum de chèvre anti-IgG de lapin marquées à la péroxydase, Diagnostics Pasteur) dilué au 1/1000 dans le même tampon. Après 4 lavages de 3 mn chacun, la révélation de l'activité péroxydasique est faite par une solution à 0,02 % de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma) et 0,015 % d'eau oxygénée (H_2O_2) préparée extemporanément dans le tampon PBS. La réaction est ensuite arrêtée par plusieurs lavages en tampon TNGT puis dans de l'eau distillée.

III-3. Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les fractions immunoréactives obtenues après chromatographie d'affinité sont analysées en HPLC. Celle-ci est effectuée en deux étapes par deux systèmes chromatographiques différents.

III-3.1. Chromatographie en phase inverse C_{18} (RP-HPLC 1)

L'échantillon est analysé sur une colonne de phase inverse µBondapak C_{18} (300 mm x 4,6 mm, Waters) associée à une précolonne RP 8 (Merck), branchée sur un système monopompe LKB 2150.

Les produits sont élués par augmentation linéaire de la concentration du mélange éluant, acétonitrile/isopropanol/acide trifluoroacétique (TFA) (45 %/20 %/0,06 %), de 0 % à 100 %, en 60 mn à un débit de 1 ml/mn. L'enregistrement densitométrique est effectué à 226 nm.

Les fractions collectées dans des tubes Minisorbe sont séchées au "Speed Vac", reprises par 100 µl d'eau distillée et testées en DIA afin de détecter les FaRPs.

III-3.2. Chromatographie en phase inverse C_8 (RP-HPLC 2)

Les pics immunoréactifs issus de la première analyse en HPLC sont individuellement chromatographiés sur une colonne phase inverse Microbore C_8 (250 mm x 1 mm, Aquapore) dans un système de chromatographie liquide Applied Biosystems 130 A. L'élution est réalisée par augmentation linéaire de la concentration du couple éluant acétonitrile/TFA (75 %/ 0,05 %) de 0 % à 25 % en 40 mn à un débit de

50 µl/mn. L'enregistrement densitométrique est effectué à 215 nm. Les pics sont collectés individuellement dans des tubes pyrolysés, les FaRPs sont détectés par DIA.

III-4. Caractérisation des FaRPs purifiés

Les produits purifiés contenus dans les pics immunoréactifs avec l'anti-FMRF-amide sont séquencés et analysés en spectrométrie de masse.

III-4.1. Détermination de la séquence en acides aminés

Les séquences ont été réalisées dans le Service de Chimie des Biomolécules du Pr Tartar, UA CNRS 1309, Institut Pasteur de Lille.

Les peptides purifiés par HPLC sont séquencés selon le principe de la dégradation d'Edman à l'aide d'un séquenceur phase gaz Applied Biosystems 470 A. Les dérivés phénylthio-hydantoïne (PTH)-acides aminés sont analysés par un dispositif HPLC (Applied Biosystems 120 A) couplé au séquenceur.

III-4.2. Analyses en spectrométrie de masse

Les analyses ont été effectuées en collaboration avec le Pr Fournet au Laboratoire de Spectrométrie de Masse, USTL Flandres-Artois.

Le spectromètre de masse Kratos Concept II H-H de géométrie E_1B_1-E_2B_2 utilisé est un spectromètre de masse en tandem à haute résolution.

- Spectrométrie de masse par bombardement d'atomes neutres accélérés (FAB-MS)

Les peptides sont dissous dans de l'eau (4 µg/250 µl.), 10 µl de solution sont déposés sur la cible de la sonde d'introduction directe, évaporés et recouverts d'un dépôt de 2 µl de matrice constituée d'un mélange glycérol/eau (10/90) ou thioglycérol contenant 2 % d'acide acétique.

Dans la source d'ions du premier analyseur, les produits sont soumis à un bombardement d'atomes neutres (Xénon) d'énergie 7 kV et d'intensité 1 mA. Les ions formés sont soumis à une tension d'accélération de 8 kV. La gamme de masse est balayée en mode positif à 10s/décade avec une résolution de 1500; le standard de calibration est l'iodure de césium ($(CsI)nCs^+$).

- Spectrométrie de masse en tandem (FAB-MS/MS)

Les peptides sont dissous dans l'eau (10 µg/250 µl); 10 µl sont déposés sur la cible de la sonde d'introduction avec comme matrice le glycérol/eau (10/90). Dans le premier spectromètre de masse (MS 1), les ions précurseurs spécifiques produits (ions parents) sont sélectionnés et introduits dans une cellule de collision. L'hélium est utilisé comme gaz de collision à une pression qui réduit de 1/3 le signal de l'ion parent. L'énergie de collision pour induire la fragmentation de l'ion précurseur est de 6 kV. Les ions fils sont analysés dans le deuxième spectromètre de masse (MS 2). Celui-ci est calibré avec l'iodure de césium en mode positif. La gamme de masse de MS 2 est balayée à 10s/décade avec une résolution de masse de 1200. Les spectres des ions fragments fils induits par collision résultent d'une accumulation de 10 balayages.

RESULTATS

I - ETUDES IMMUNOCYTOCHIMIQUES EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE AVEC L'ANTICORPS ANTI-FMRF-AMIDE

I-1. Localisation des molécules reconnues par l'anticorps (figures et planches p. 43 à 50)

I-1.1. Chez *Nereis diversicolor* (planches I, II, III, IV).

Les études menées sur des animaux de sexe indéterminé, sur des femelles à différents stades de maturation ovocytaire (de diamètre ovocytaire inférieur à 80 µm, ou compris entre 90-120 µm, 130-145 µm et 150-170 µm) et sur des mâles, ont toutes donné des résultats similaires.

Des immunoréactions sont détectées à la fois dans le SNC (cerveau et chaîne nerveuse) et au niveau de l'intestin.

I-1.1.1. Le cerveau

Il renferme de nombreux péricaryons et fibres nerveuses marqués. Leur répartition au sein du cerveau est indiquée sur les figures 4 et 5.

Les péricaryons immunoréactifs sont distribués dans la plupart des noyaux ganglionnaires (pl. I, figs a-e; pl. II, figs a-f; pl. III, figs a, d, f). Les seuls noyaux ne renfermant aucune cellule marquée sont les noyaux ganglionnaires 1, 2 et 3 constituant les corps pédonculés, le noyau 19 présumé photorécepteur et les noyaux 16 et 26.

Les péricaryons immunoréactifs sont de tailles et de formes diverses (uni- et bipolaires) (pl. I, figs a-e; pl. II, figs a-f; pl. III, figs a, d, f).

La coloration signalétique des neurosécrétions, réalisée selon la technique de Clark (1955), nous permet d'identifier parmi ces péricaryons marqués différents types neuronaux. Certains présentent une affinité tinctoriale pour la fuchsine paraldéhyde (FP^+) alors que d'autres ont une affinité tinctoriale pour le vert lumière (FP^-) (pl. III, fig b). Ainsi, dans le noyau ganglionnaire 20 localisé dans la région caudale du cerveau, nous observons que les grandes cellules neurosécrétrices caudo-ventrales C Ib, ainsi que les petites cellules caudo-dorsales C Ia (pl. III, fig b), toutes deux FP^+, sont immunoréactives pour le FMRF-amide (pl. III, fig. a).

Dans ce même noyau, les cellules C II non fuchsinophiles (FP^-) ne sont pas immunoréactives. Par contre, dans d'autres noyaux, tels que les noyaux 9 et 15, des péricaryons FP^- (pl. III, fig. b) sont immunoréactifs (pl. III, fig. a).

Au niveau du neuropile, de nombreuses fibres nerveuses sont immunoréactives (pl. I, figs a-f; pl. II, figs a-f; pl. III, figs a, d, f). Quelques immunoréactions présentent un aspect particulier, certaines apparaissent sous forme de "petits grains" bien individualisés (pl. I, fig. a et pl. II, fig. a, petites flèches). D'autres, visualisées sur la planche II (fig. e) à proximité du noyau 7, constituent un "faisceau" en relation, d'une part, avec le prolongement axonal immunoréactif d'une cellule du noyau 7 elle-même immunoréactive et, d'autre part, avec la racine du collier périœsophagien. Un marquage est également visible dans les faisceaux de fibres (FN) se dirigeant vers la région infracérébrale et même à proximité de la capsule infracérébrale (pl I, fig. f, petites flèches). Des fibres nerveuses immunoréactives sont également observées dans les racines du collier périœsophagien (pl. I, figs e, g; pl. II, fig. a).

Enfin, le collier périœsophagien, de même que le ganglion sous-œsophagien (pl. I, fig. h) renferment tous deux des péricaryons et des trajets nerveux marqués. Dans le ganglion sous-œsophagien, comme d'ailleurs dans le cerveau, des plans de coupe favorables nous ont permis d'observer des fibres nerveuses immunoréactives provenant de péricaryons immunoréactifs et se dirigeant vers le neuropile (pl. I, fig. h; pl. II, fig. e; pl. III, fig. d).

Les réactions immunocytochimiques effectuées sur des coupes alternées de prostomium traitées respectivement par les anticorps anti-CCK/gastrine (pl. III, figs c, e) et anti-FMRF-amide (pl. III, figs d, f) montrent que quelques neurones présentent un double marquage. Ainsi, dans le noyau 10, deux neurones (a et b) sont immunoréactifs à la fois pour la CCK et pour le FMRF-amide. De même, ce double marquage est également obtenu dans deux petites cellules nerveuses (x et y) du noyau 17 (pl. III, figs d, e). Dans le noyau 20, quelques péricaryons sont uniquement immunoréactifs pour le FMRF-amide (✱) (pl. III, figs c, d) alors que d'autres possèdent la double immunoréactivité (cellule z) (pl. III, figs e, f).

Au niveau du neuropile, les immunoréactions sont beaucoup plus fortes avec l'anti-FMRF-amide qu'avec l'anti-CCK.

I-1.1.2. La chaîne nerveuse

Sur la figure 6, schématisant la chaîne nerveuse en coupe horizontale, les étoiles indiquent d'une manière générale la localisation des immunoréactions observées pour le FMRF-amide. Dans les différents ganglions, des immunoréactions sont visibles à la fois dans des péricaryons appartenant aux groupes cellulaires antérieur et médian (pl. IV, figs a-d) ainsi qu'au niveau de fibres nerveuses situées dans le neuropile et dans le nerf II (pl. IV, figs a-f). Les trajets nerveux immunoréactifs localisés dans le neuropile cheminent dans deux directions: l'une

longitudinale en position latérale aux fibres géantes dorsales; l'autre, transversale, révèle l'existence de fibres se croisant à travers le neuropile (pl. IV, figs e, f).

I-1.1.3. L'intestin

A la base de l'épithélium intestinal, un réseau de fibres nerveuses et de péricaryons est immunoréactif pour le FMRF-amide (pl. IV, figs g, h). Ce réseau suit parfaitement les contours de l'intestin.

I-1.1.4. Les autres tissus

Des immunoréactions ont également été observées dans des éléments nerveux localisés à la périphérie du ver, entre l'épiderme et la musculature (pas d'illustration donnée).

I-1.2. Chez *Nereis virens* et *Perinereis cultrifera* (planche V)

Pour ces deux espèces, les résultats obtenus sur le cerveau sont comparables à ceux précédemment décrits pour *Nereis diversicolor*. Chez *Nereis virens* (pl. V, figs a-c) comme chez *Perinereis cultrifera* (pl. V, figs d-g), les péricaryons immunoréactifs sont distribués dans de nombreux noyaux ganglionnaires; des fibres nerveuses marquées sont également présentes dans le neuropile.

I-2. Spécificité des immunoréactions

L'omission de l'un des anticorps (premier ou deuxième anticorps) entraîne une absence totale de réaction. De même, l'extinction de la réaction immunocytochimique est obtenue par adsorption pendant 1 nuit à 4°C de l'anticorps anti-FMRF-amide à l'aide de l'antigène spécifique à une concentration de 4 µg de FMRF-amide par ml de sérum dilué au 1/1000. Par contre, l'adsorption dans les mêmes conditions de l'anticorps par le peptide de synthèse FTRF-amide (voir chap.Résultats II) jusqu'à une concentration de 10 µg/ml de sérum dilué au 1/1000, ne permet d'observer qu'une extinction partielle de la réaction. Quelques cellules essentiellement localisées dans la région caudo-dorsale et quelques autres dispersées dans le cerveau ainsi que des trajets nerveux situés dans le neuropile restent immunoréactifs. Ce résultat peut s'expliquer par la nature polyclonale de l'anticorps utilisé impliquant la présence d'IgG anti-FMRF-amide de spécificités différentes.

Figures 4 à 6

Planches I à V

Abréviations utilisées

C = cœlome
CIC = cellules infracérébrales
CN = chaîne nerveuse
CO = commissure optique
CP = corps pédonculés
D = dissépiment
Ep = épiderme
FGd = fibres géantes dorsales
FGl = fibres géantes latérales
FN = faisceau de fibres nerveuses
GA = groupe cellulaire antérieur
GM = groupe cellulaire médian
GP = groupe cellulaire postérieur
L = lumière
M = muscle
Np = neuropile
OA = oeil antérieur
OP = oeil postérieur
p = péricaryon
RCd = racine dorsale du collier périœsophagien
RCv = racine ventrale du collier périœsophagien
RIC = région infracérébrale
rn = réseau nerveux
TD = tube digestif
VS = vaisseau sanguin

Les chiffres arabes désignent les différents noyaux ganglionnaires.
Les chiffres romains indiquent les différents nerfs du cerveau et de la chaîne nerveuse.

Figure 4

Vue parasagittale du cerveau de *Nereis diversicolor* montrant la localisation de plusieurs noyaux ganglionnaires et de la région infracérébrale (RIC).

Les principaux résultats obtenus à l'aide de divers anticorps, au niveau de la région caudale du cerveau (qui contient les cellules neurosécrétrices classiques) et de la région infracérébrale, sont notés.

La distribution générale des immunoréactions observées pour le FMRF-amide au niveau des noyaux ganglionnaires et dans le neuropile est indiquée (✷).

La grande flèche indique la direction antéro-postérieure.

(modifiée d'après Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986).

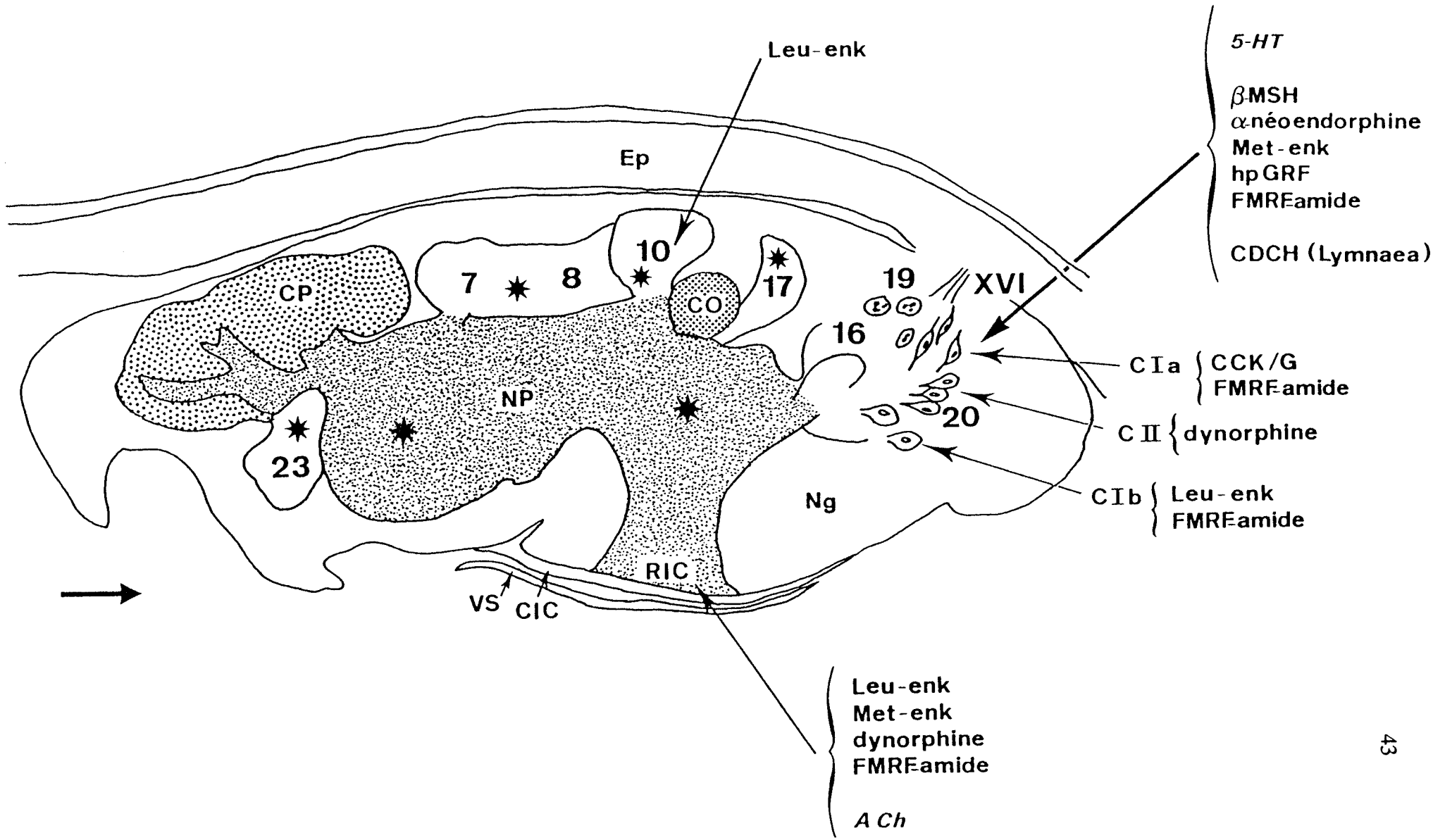

Leu-enk
Ep
CP
7
8
10
CO
17
19
XVI
16
NP
20
23
Ng
RIC
VS
CIC
5-HT
βMSH
α-néoendorphine
Met-enk
hpGRF
FMRFamide
CDCH (Lymnaea)
CIa
CCK/G
FMRFamide
CII
dynorphine
CIb
Leu-enk
FMRFamide
Leu-enk
Met-enk
dynorphine
FMRFamide
ACh

Figure 5

Représentation de la distribution des différents noyaux ganglionnaires dans le cerveau de *Nereis diversicolor* en projection dorso-ventrale.

Les immunoréactions pour le FMRF-amide sont observées dans le neuropile et la plupart des noyaux ganglionnaires et en particulier les noyaux 7, 10, 14, 17, 20 (✷).

(modifiée d'après Engelhardt *et al.*, 1982).

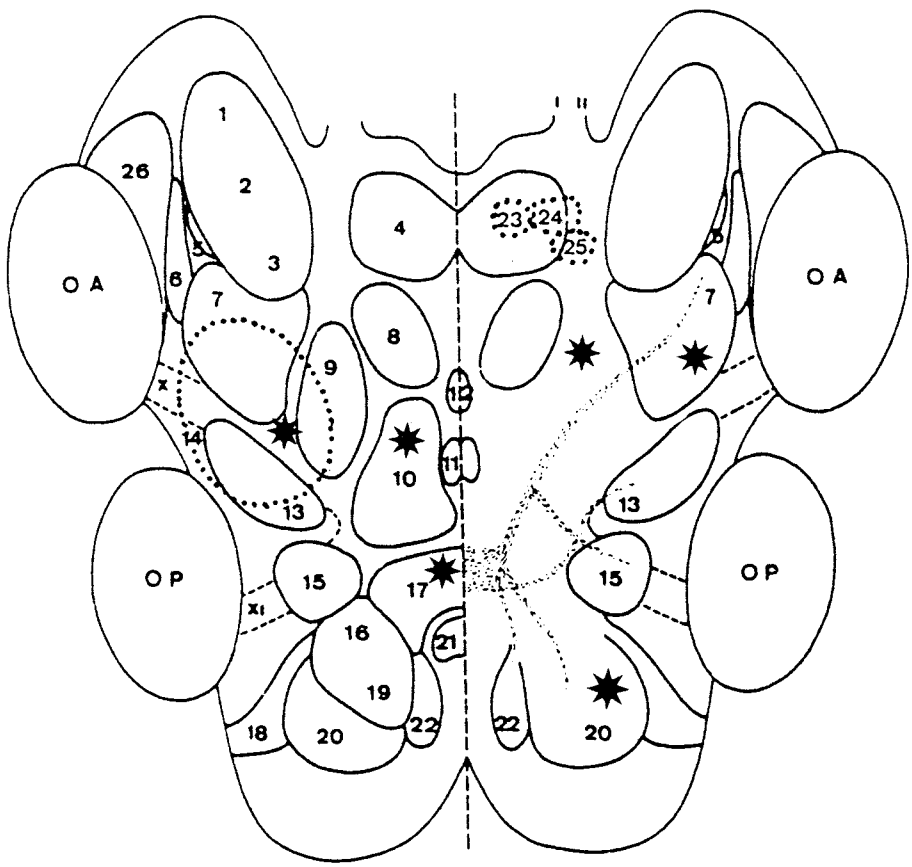

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
O A
O P
x
xi

Figure 6

Vue horizontale de la chaîne nerveuse ventrale de *Nereis diversicolor* montrant, pour un ganglion, la localisation des trois groupes cellulaires majeurs (GA, GM, GP) et des racines des nerfs I, II, III, IV.

Les immunoréactions pour le FMRF-amide sont observées dans les groupes cellulaires antérieur (GA) et médian (GM) des ganglions de la chaîne (✸).

La grande flèche indique la direction antéro-postérieure.

(modifiée d'après Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986).

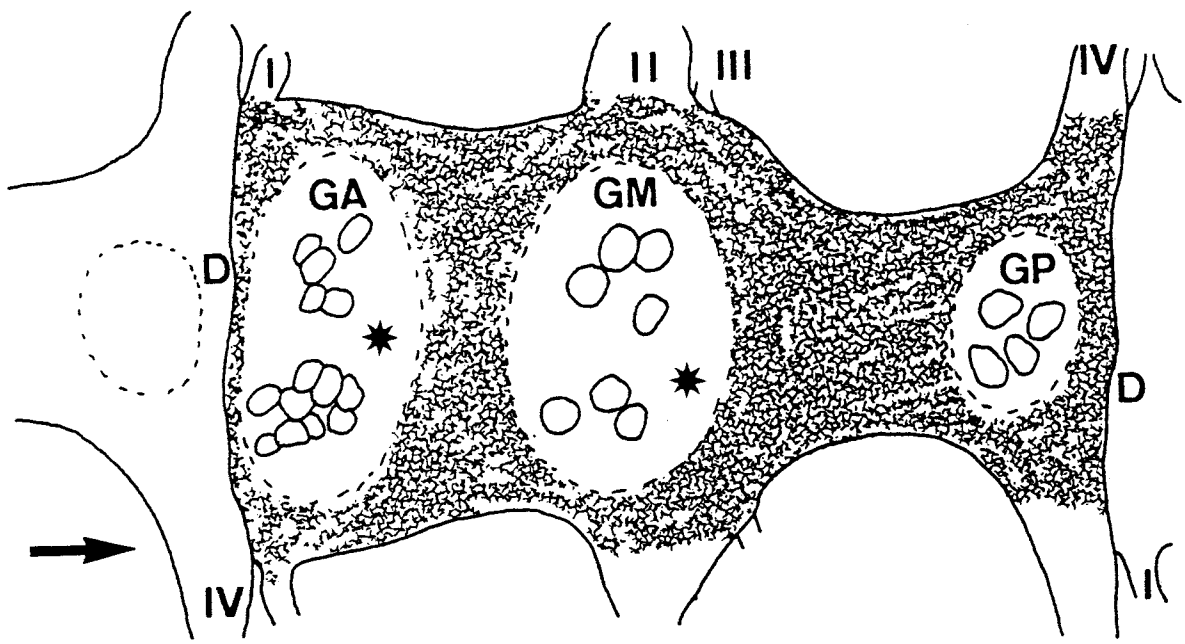

I
II
III
IV
GA
GM
GP
D
D
IV
I

Planche I

Planche I

Réactions immunocytochimiques chez *Nereis diversicolor* avec l'anticorps 646 anti-FMRF-amide sur le cerveau (a-f), la racine ventrale du collier périœsophagien (g) et le ganglion sous-œsophagien (h).
Coupes parasagittal s.

a, b, c, d, e: Péricaryons immunoréactifs dans les noyaux 5, 7, 10, 13, 14, 15, 18, 20, 25. Dans le noyau 20 (c), les cellules C Ia et C Ib sont immunoréactives, alors que les cellules C II ne le sont pas.
Trajets nerveux immunoréactifs dans le neuropile. Certaines immunoréactions ont un aspect particulier (a, petites flèches).
La grande flèche indique la direction antéro-postérieure. G x 220.

f: Trajets nerveux immunoréactifs (petites flèches) localisés dans les faisceaux de fibres nerveuses, à proximité de la région infracérébrale. G x 360.

g : Trajets nerveux immunoréactifs (flèches) dans la racine ventrale du collier périœsophagien. G x 360.

h: Ganglion sous-œsophagien avec péricaryons (flèches) et trajets nerveux immunoréactifs dans le neuropile. G x 220.

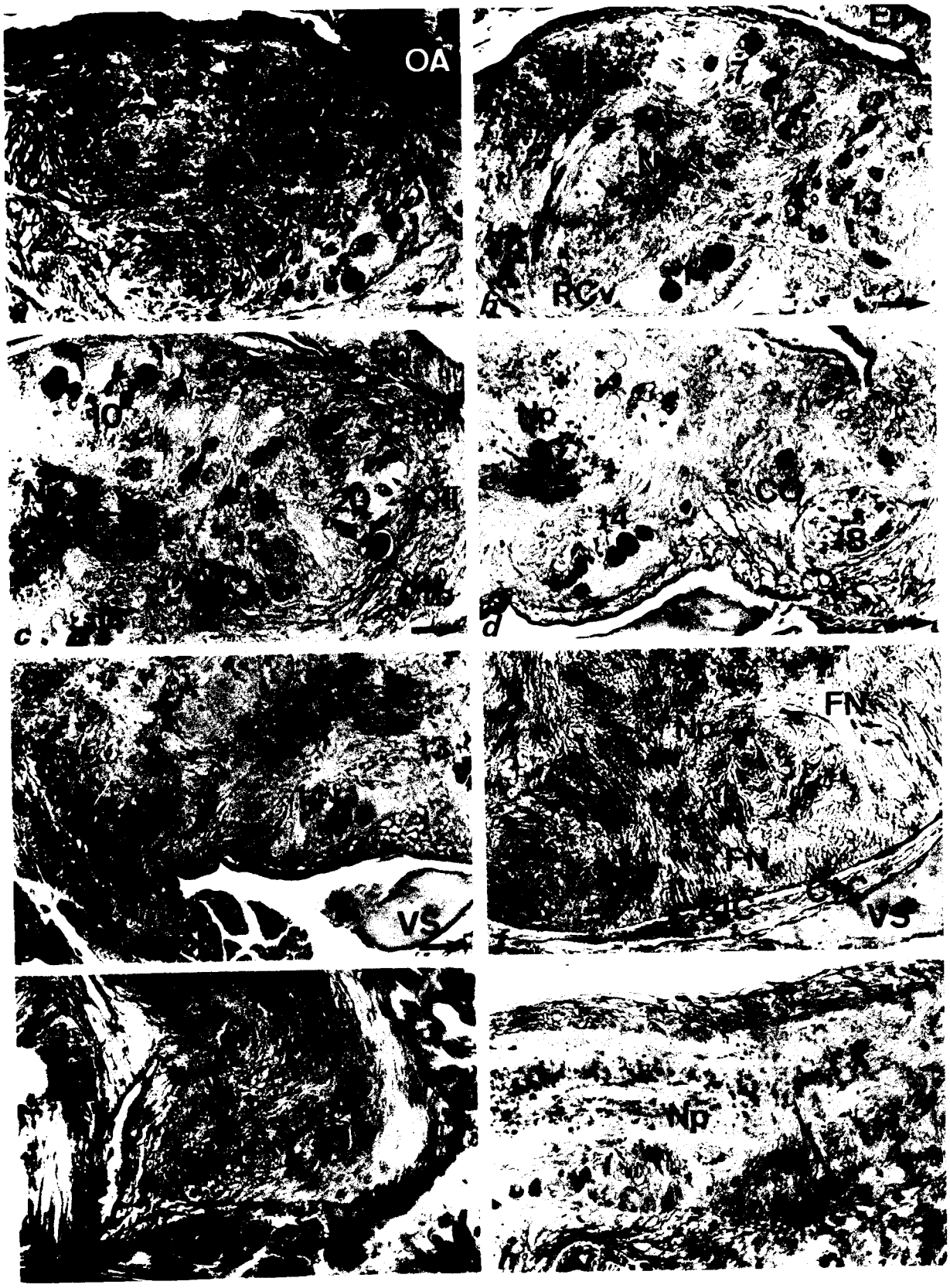

OA
RCv
c
d
Np
14
18
FN
VS
Np

Planche II

Planche II

Réactions immunocytochimiques avec l'anticorps 646 anti-FMRF-amide sur le cerveau de *Nereis diversicolor*.
Coupes transversales.

a: Coupe dans la région antérieure du cerveau, moitié gauche. Les péricaryons immunoréactifs sont localisés dans les noyaux ganglionnaires 4, 5, 6, 23, 24, 25. Des trajets nerveux immunoréactifs sont visibles dans le neuropile et la racine ventrale du collier périœsophagien (petites flèches). G x 220.

b et e: Coupes dans la région antéro-médiane du cerveau, moitié droite. Les noyaux ganglionnaires 7, 8, 9, 14 renferment des péricaryons immunoréactifs. Dans le neuropile, de nombreux trajets nerveux sont immunoréactifs. Notons la disposition en forme de faisceau des trajets nerveux positifs situés à proximité du noyau 7 (e) et se dirigeant vers la racine dorsale du collier périœsophagien. G x 330 pour b et x 220 pour e.

c-d: Coupes dans la région médiane du cerveau. De nombreux péricaryons localisés dans les noyaux 10, 13, 15, 17, et des trajets nerveux situés dans le neuropile, sont immunoréactifs. G x 220.

f: Coupe dans la région postérieure du cerveau. Nombreux péricaryons immunoréactifs dans les noyaux 18, 19, 20, 21, 22. G x 330.

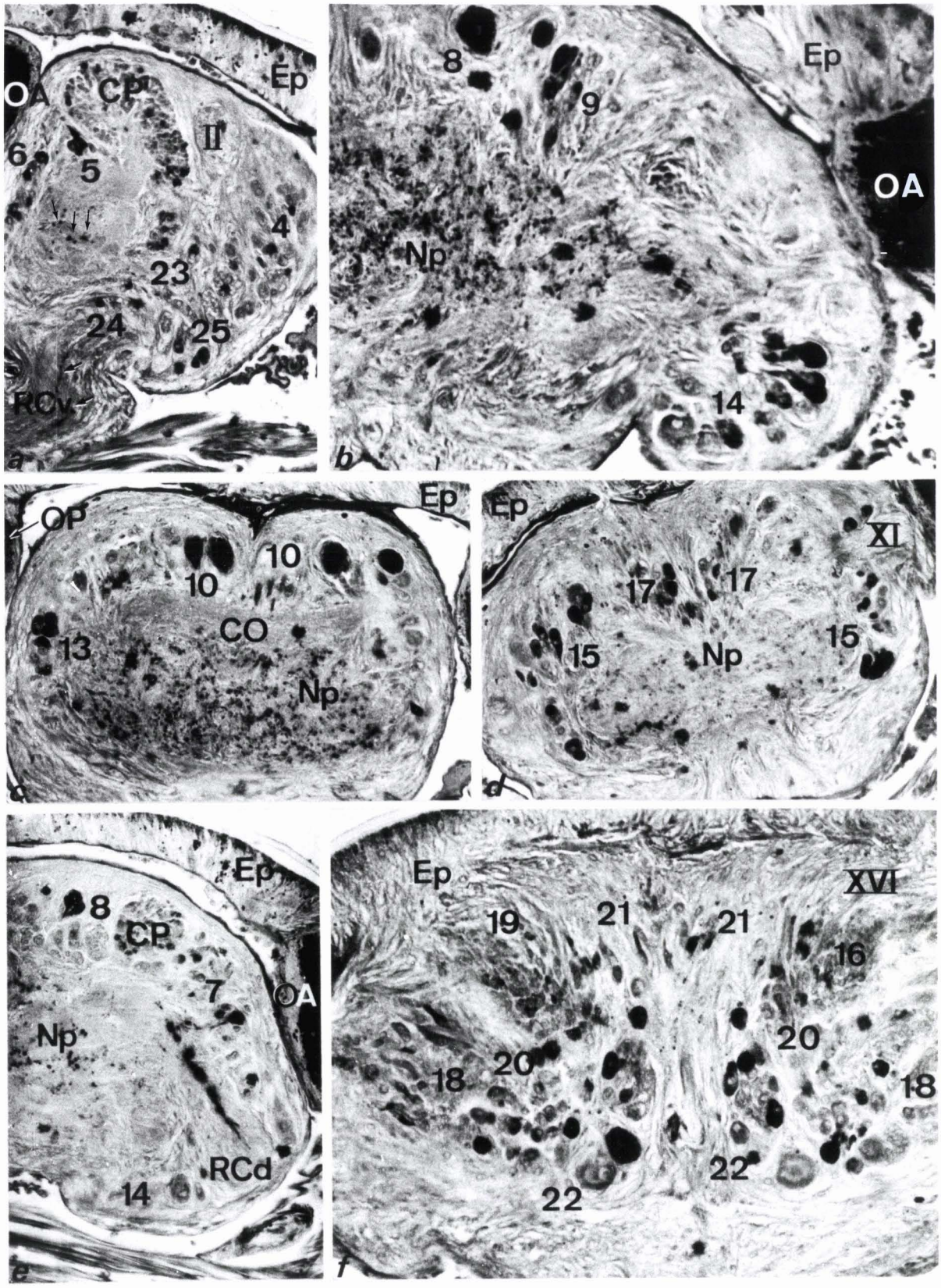

OA
CP
Ep
II
6
5
4
23
24
25
RCv
a
8
9
Ep
OA
Np
14
b
OP
Ep
10
10
CO
13
Np
c
Ep
XI
17
17
15
Np
15
d
Ep
8
CP
7
OA
Np
RCd
14
e
Ep
XVI
19
21
21
16
20
18
20
18
22
22
f

Planche III

Planche III

Etudes sur le cerveau de *Nereis diversicolor* de l'affinité tinctoriale des cellules immunoréactives pour le FMRF-amide (a et b), et de la colocalisation des immunoréactions obtenues avec l'anticorps anti-FMRF-amide (d et f) et avec l'anticorps anti-CCK/gastrine (c et e).
Coupes sagittales.

a, b: Coupe dans la région du noyau 20. La grande flèche indique la direction antéro-postérieure. G x 220.

a: Réaction immunocytochimique obtenue avec l'anticorps 646 anti-FMRF-amide (RFa).

b: La coupe, présentée en a, a été décolorée puis recolorée par la technique de Clark. Les cellules C Ia et C Ib immunoréactives (a) sont fuchsinophiles (b). Les cellules vertes C II (b) ne sont pas immunoréactives (a) . Dans les noyaux 9 et 15 certaines cellules immunoréactives (a) ne sont pas fuchsinophiles (b).

c, d, e, f: Coupes alternées de cerveau traitées respectivement par l'anticorps anti-CCK/gastrine (c et e) et anti-FMRF-amide (d et f).
La grande flèche indique la direction antéro-postérieure. G x 220.
Les péricaryons a et b dans le noyau 10, x et y dans le noyau 17, et z dans le noyau 20, immunoréactifs pour la CCK le sont aussi pour le FMRF-amide.
Dans le noyau 20, certains péricaryons ne sont immunoréactifs qu'avec l'anticorps anti-FMRF-amide (✳).
Les immunoréactions observées dans le neuropile sont beaucoup plus abondantes avec l'anti-FMRF-amide qu'avec l'anti-CCK.

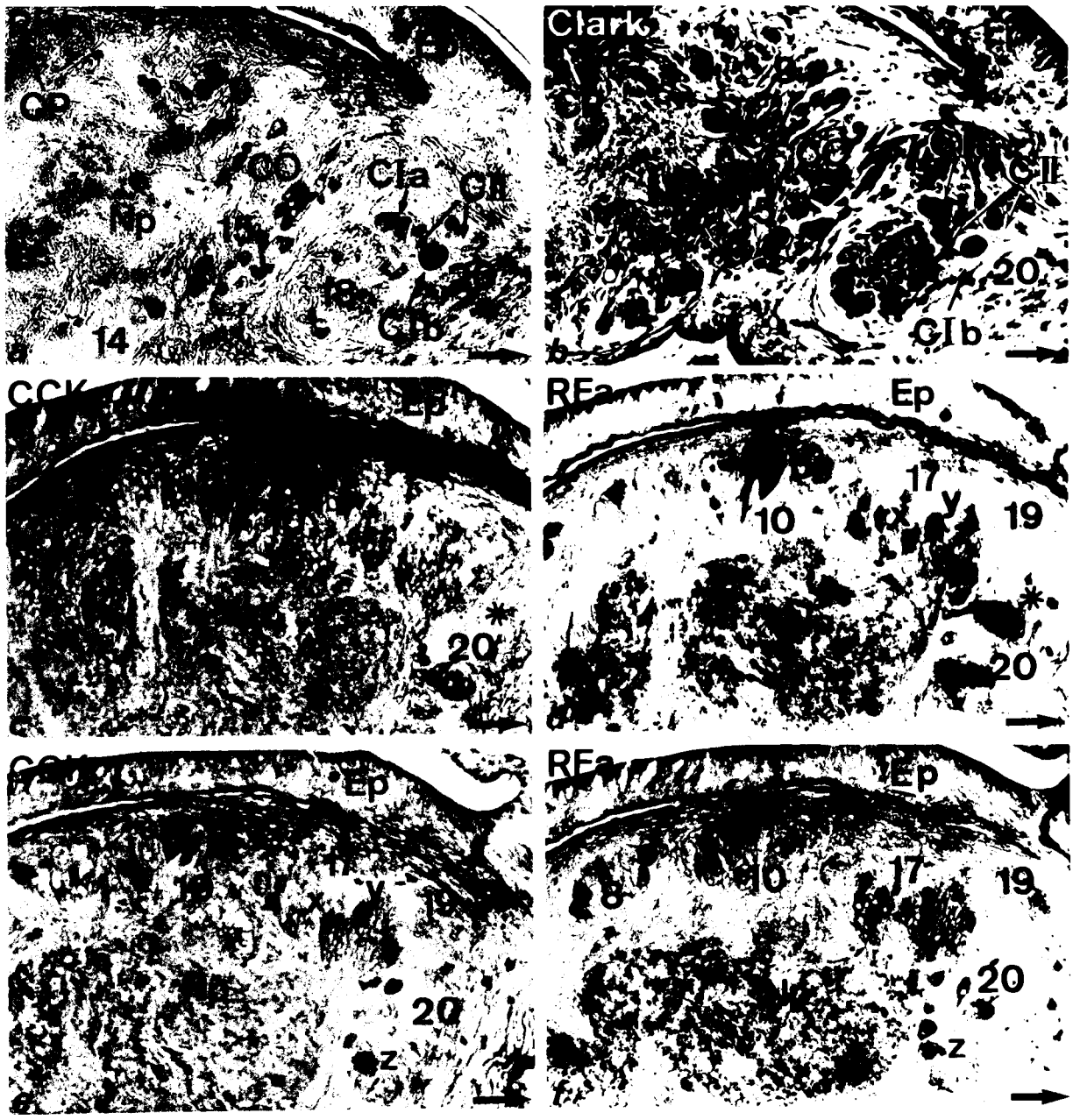

CP
Ep
Cla
Rp
14
Clb
Clark
Ep
CIb
20
CCK
Ep
20
REa
Ep
17
10
19
20
CCK
Ep
19
20
z
REa
Ep
8
10
17
19
20
z

Planche IV

Planche IV

Réactions immunocytochimiques avec l'anticorps 646 anti-FMRF-amide sur la chaîne nerveuse en coupes transversales (a, b), en coupes longitudinales (c, d, e, f) et sur le tube digestif en coupes transversales (g, h).

a, b: Des péricaryons situés ventralement (a) et latéralement (b) dans la chaîne nerveuse et des trajets nerveux du neuropile sont immunoréactifs.
La grande flèche indique la direction dorso-ventrale. G x 220.

c, d: Péricaryons immunoréactifs dans les groupes cellulaires antérieur et médian. Des trajets immunoréactifs sont visibles dans le neuropile et dans le nerf II (petites flèches).
La grande flèche indique la direction antéro-postérieure. G x 220.

e, f: Trajets nerveux immunoréactifs cheminant longitudinalement et transversalement dans le neuropile (longues flèches). G x 220.

g, h: Péricaryons et fibres nerveuses immunoréactifs formant un réseau à la base du tube digestif. G x 9O pour g et x 360 pour h.

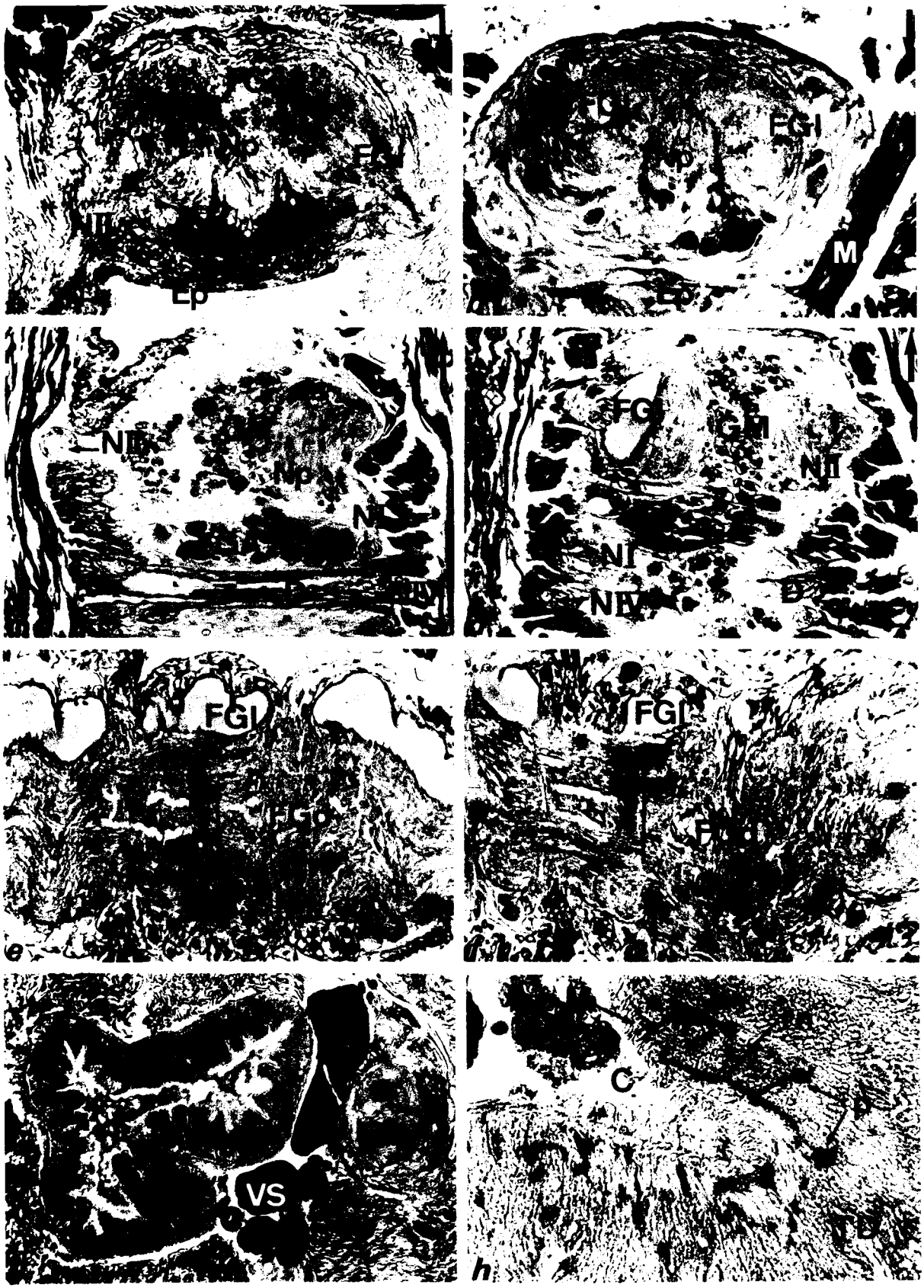
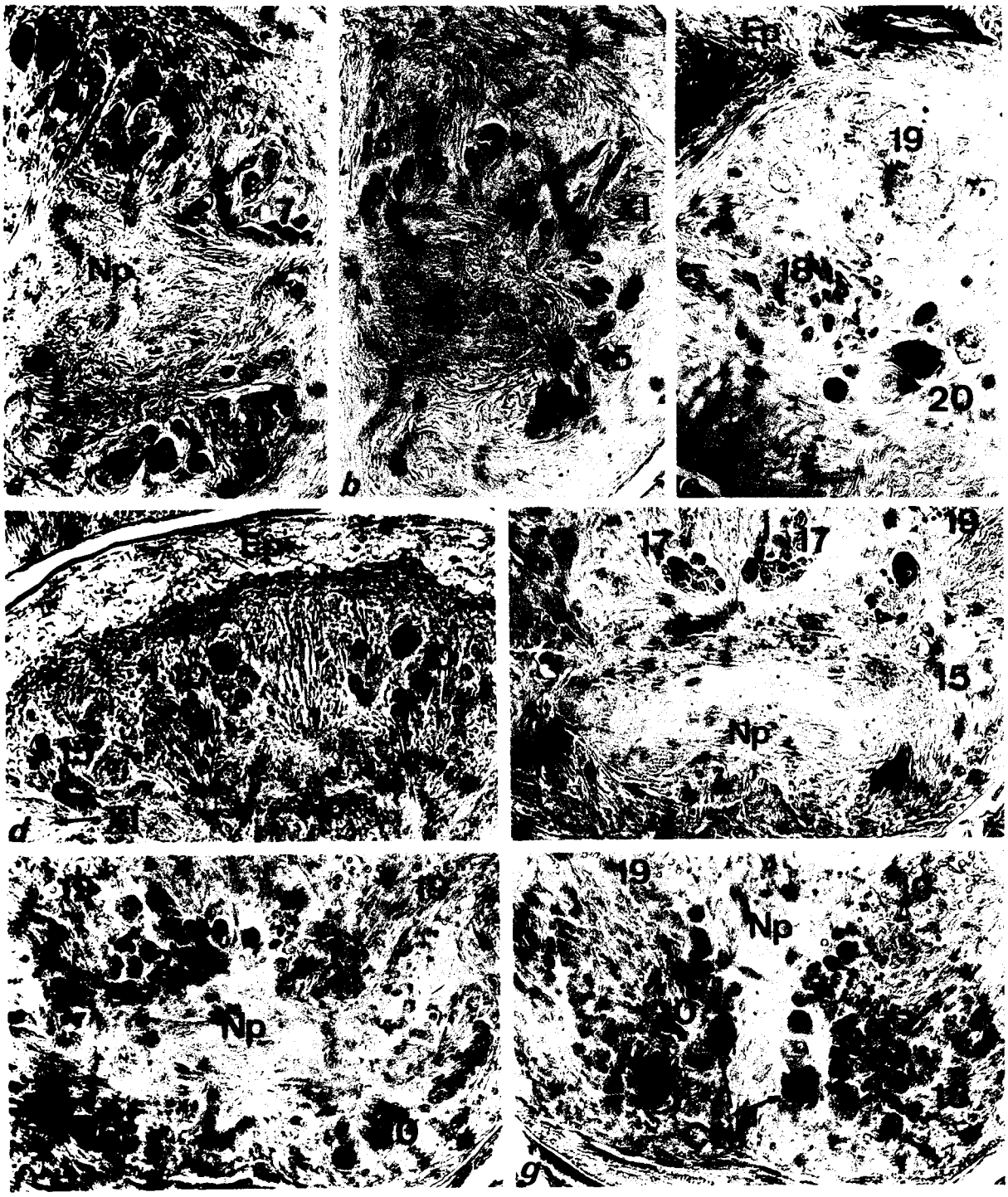

Ep
FGI
M
NIV
Np
N
FG
GM
NII
NI
NIV
D
FGI
FGO
e
FGI
VS
C
P
TD
h

Planche V

Planche V

Réactions immunocytochimiques avec l'anticorps 646 anti-FMRF-amide sur le cerveau de *Nereis virens* (a, b, c) et *Perinereis cultrifera* (d, e, f, g).
Coupes transversales.

Chez ces deux espèces, des péricaryons immunoréactifs sont observés dans les noyaux ganglionnaires 7, 8, 9, 14 (a), 10 (d), 15, 17 (b, d, e), 18, 20 (c, f, g), 21 (f). Des trajets nerveux immunoréactifs sont visibles dans le neuropile. G x 220.


Np
7
b
Ep
19
18
20
Ep
d
17
17
19
15
Np
18
19
Np
10
19
Np
g

I-3 - Discussion

Les cellules immunoréactives pour le FMRF-amide sont nombreuses et largement distribuées dans tout le SNC. Elles appartiennent à différents types neuronaux FP^+ et FP^-. Nous avons observé des cellules FP^+/FMRF-amide$^+$; FP^-/FMRF-amide$^+$; FP^+/FMRF-amide$^-$ et FP^-/FMRF-amide$^-$.

Au niveau du noyau ganglionnaire 20, certaines cellules immunoréactives pour le FMRF-amide ont précédemment été montrées immunoréactives pour d'autres peptides tels que la Leu-enképhaline et la CCK/gastrine (Engelhardt *et al.*, 1982; Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986).

Les immunoréactions obtenues à l'aide de divers anticorps dans la région caudale du cerveau, au niveau des cellules C Ia, C Ib et CII du noyau 20, sont résumées dans le tableau IV

Tableau IV - Neuropeptides détectés dans les cellules caractéristiques du noyau 20 et affinité tinctoriale de ces cellules.

Types cellulaires	Affinité tinctoriale pour la fuchsine paraldéhyde (FP)	Neuropeptides détectés			
		CCK (1)	Leu-enképhaline (2)	Dynorphine 1-17 (2)	FMRF-amide
C Ia	FP^+	+	-	-	+
C Ib	FP^+	-	+	-	+
C II	FP^-	-	-	+	-

(1) Engelhardt *et al.* (1982)
(2) Dhainaut-Courtois *et al.* (1986)

Ces résultats font apparaître l'existence d'une colocalisation de deux peptides au sein d'une même cellule. Ainsi dans les cellules C Ia coexistent des molécules apparentées à la CCK et au FMRF-amide, alors que dans les cellules C Ib, il y a coexistence de molécules apparentées à la Leu-enképhaline et au FMRF-amide. Par contre, les cellules C II semblent, jusqu'à présent, ne pas contenir d'autres peptides que ceux apparentés à la dynorphine 1-17.

A l'aide de coupes alternées, nous avons de plus montré que la colocalisation CCK/FMRF-amide est également visible dans certaines cellules situées dans d'autres noyaux ganglionnaires tels que les noyaux 10 et 17. Toutefois, il nous est possible d'affirmer que dans ces noyaux (10, 17, 20), certaines cellules sont spécifiquement immunoréactives pour le FMRF-amide.

Enfin, parmi les noyaux ganglionnaires présentant un marquage pour le FMRF-amide, quelques-uns renferment aussi des cellules immunoréactives pour la

substance P (noyaux 5, 7, 10, 13, 14, 20), pour le hpGRF (noyau 10) (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986) et pour la CCK (noyaux 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 23, 24) (Engelhardt *et al.*, 1982).

Les résultats actuels ne nous permettent pas d'affirmer si, au sein de ces noyaux, ce sont les mêmes cellules ou non qui sont immunoréactives pour ces peptides (substance P ou hpGRF) et pour le FMRF-amide.

En ce qui concerne la chaîne nerveuse, des immunoréactions ont été observées pour la CCK au niveau de péricaryons des groupes cellulaires antérieur et médian, ainsi qu'au niveau de fibres nerveuses localisées dans les parties latérales et centrales du neuropile (Engelhardt *et al.*, 1982). Notre étude a révélé un marquage similaire avec l'anticorps anti-FMRF-amide; toutefois, en l'absence d'une étude immunocytochimique réalisée à l'aide des deux anticorps (anti-CCK et anti-FMRF-amide) sur des coupes alternées de chaîne nerveuse, il est difficile de dire si ce sont les mêmes types de péricaryons et les mêmes trajets nerveux qui ont été marqués.

Par ailleurs, les travaux de Dhainaut-Courtois*et al.* (1985) montrent la présence dans la chaîne nerveuse de substances apparentées au hpGRF, CRF, VIP, à la substance P et à la 5-HT (5-hydroxytryptamine). La localisation des immunoréactions est résumée dans le tableau V.

Ces auteurs ont de plus mis en évidence l'existence de diverses colocalisations: CCK/hpGRF dans des cellules des groupes antérieur et médian, CCK/CRF dans des cellules du groupe médian et CCK/5-HT dans des cellules du groupe antérieur.

Tableau V - Substances détectées dans la chaîne nerveuse.

Chaîne nerveuse	CCK (1) (2)	hpGRF (2)	CRF (2)	Substance P (2)	VIP (2)	5-HT (3)	FMRF-amide
GA	+	+ (a)	-	-	-	+ (c)	+
GM	+	+ (a)	+ (b)	+	+	+	+
GP	-	-	-	-	-	+	-
Neuropile	+	+	+	-	-	+	+

Groupe cellulaire antérieur (GA), médian (GM), postérieur (GP)

Dans les groupes cellulaires GA et (ou) GM, certaines cellules immunoréactives pour la CCK le sont aussi pour le hpGRF (a), le CRF (b) ou la 5-HT (c). Ces mêmes groupes renferment en outre des cellules uniquement immunoréactives pour l'une ou l'autre de ces substances (CCK, hpGRF, CRF, 5-HT).

(1) Engelhardt *et al.* (1982)
(2) Dhainaut-Courtois *et al.* (1985a)
(3) Dhainaut-Courtois *et al.* (1986)

De telles colocalisations dans le cerveau comme dans la chaîne nerveuse peuvent s'expliquer soit par l'existence au sein d'une même cellule de deux substances distinctes, soit par une réaction croisée des anticorps avec des substances présentant une séquence commune. Cette dernière proposition ne peut être retenue en ce qui concerne la colocalisation CCK/5-HT observée dans quelques cellules de la chaîne nerveuse. Celle-ci résulterait donc de la coexistence d'une substance apparentée à la CCK et d'une autre substance immunologiquement apparentée à la 5-HT (amine biogène). Rappelons qu'une telle coexistence a déjà été observée dans un neurone géant chez le mollusque *Helix* (Osborne et Dockray, 1982; Osborne *et al.*, 1982). La colocalisation de cette amine biogène et d'un peptide a par ailleurs été démontrée chez les vertébrés (Lundberg et Hökfelt, 1983).

Par contre, parmi toutes les autres substances, nous pouvons noter l'existence d'une homologie structurale entre le FMRF-amide et la Leu-enképhaline (YGGFLRF) par leurs résidus phénylalanine et arginine. L'homologie entre le FMRF-amide et la CCK est par contre restreinte au seul résidu méthionine et à la fonction amide.

Ces homologies structurales ne sont toutefois pas suffisantes pour entraîner des réactions croisées. En effet, l'anticorps polyclonal que nous avons utilisé s'est révélé contenir des IgG de spécificités différentes. Les IgG les "moins spécifiques" (saturées par le FMRF-NH_2 et le FTRF-NH_2) seraient dirigées contre la terminaison Arg-Phe-NH_2. En revanche, les IgG les "plus spécifiques" (saturées par le FMRF-NH_2 mais pas par le FTRF-NH_2) reconnaîtraient un épitope contenant le résidu méthionine. De ce fait le déterminant antigénique pourrait être -Met-Arg-Phe-NH_2. Dans un cas comme dans l'autre, ces structures reconnues par l'anticorps ne sont pas présentes au niveau des molécules Leu-enképhaline et CCK.

Ces données nous permettent de penser que la majorité des immunoréactions observées pour le FMRF-amide ne résulte pas de réactions croisées, mais reflète la présence de molécules spécifiquement apparentées au FMRF-amide. Les résultats obtenus sur l'intestin vont également dans ce sens. En effet, parmi les entérocytes, l'anticorps anti-FMRF-amide nous a permis de visualiser des cellules neuroendocrines immunoréactives dont les prolongements établissent un réseau nerveux à la base de l'intestin. Dans ce même tissu, l'utilisation d'un anticorps anti-CCK avait permis de montrer l'existence de cellules de type endocrine immunoréactives (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985). Toutefois, au vu de leur localisation, nous pouvons affirmer que les cellules de type neuronal marquées pour le FMRF-amide ne le sont pas pour la CCK.

L'ensemble de ces résultats constitue un argument en faveur de l'existence chez *Nereis diversicolor* d'une authentique famille de FMRF-amide.

Par ailleurs, certaines immunoréactions observées dans le neuropile du cerveau, telles que celles présentées sur les planches I (fig. a) et II (figs a, e), pourraient être révélatrices de contacts synaptiques interneuronaux.

D'un autre côté, la position particulière des trajets nerveux immunoréactifs dans le neuropile des ganglions de la chaîne nerveuse pourrait être significative d'une implication du matériel apparenté au FMRF-amide dans des connexions nerveuses établies, d'une part, entre les ganglions successifs de la chaîne nerveuse et, d'autre part, entre les côtés droit et gauche d'un même ganglion.

Enfin dans la région infracérébrale les immunoréactions localisées à proximité de l'aire neurohémale indiquent qu'il se produit certainement une décharge des molécules réactives. Dans cette zone, des immunoréactions pour les peptides opioïdes Leu-enképhaline, Met-enképhaline et dynorphine 1-17 ont déjà été observées (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986). L'aire neurohémale est un complexe neuroglandulovasculaire mettant en contact le cerveau et le milieu intérieur. De ce fait, par analogie avec ce qui a été établi chez les mammifères (intervention des peptides opioïdes en tant que NT/NM dans la régulation des sécrétions hypophysaires) (Kuhn et Saltiel, 1986) il a été proposé que chez la néréis les molécules apparentées aux opioïdes auraient un rôle, en tant que NT ou NM, dans la régulation des sécrétions cérébrales libérées au niveau de l'aire neurohémale.

La présence de FMRF-amide dans la région infracérébrale et l'abondance des immunoréactions, tant dans le neuropile que dans divers péricaryons du cerveau et de la chaîne nerveuse ainsi qu'au niveau de l'intestin, nous permettent de suggérer une implication de ces molécules dans des fonctions physiologiques essentielles soit en tant que NT ou NM.

Dans le but de conclure définitivement quant à la nature des molécules immunodétectées et ultérieurement quant à leur rôle, nous avons entrepris une étude biochimique conduisant à la purification et à la caractérisation chimique de ce matériel. Etant donné les résultats d'immunocytochimie (abondance des cellules immunoréactives dans le SNC et le SNP), cette étude a été menée à partir d'animaux entiers.

II - ETUDE BIOCHIMIQUE DES FaRPs DE *NEREIS DIVERSICOLOR*

II-1. Le test d'immunodétection (DIA)

La sensibilité du test d'immunodétection a été déterminée à l'aide du peptide commercial FMRF-amide (Cambridge Research Biochemicals). Une gamme de concentrations de 100 à 0,01 pmol/µl préparée dans de l'eau distillée a été déposée selon le protocole précédemment décrit (voir chap. Matériel et Méthodes III-2). Le résultat présenté sur la figure 7 montre qu'avec l'Ac 646 anti-FMRF-amide dilué au 1/1000 une réaction est visualisée jusqu'à une concentration minimale de 0,25 pmol.

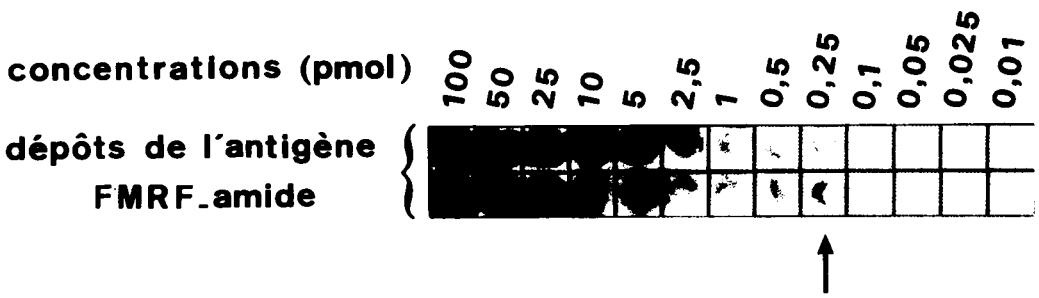


Figure 7 - Test d'immunodétection du peptide commercial FMRF-amide, la flèche indique la concentration constituant le seuil de détection.

II-2. Purification et caractérisation des FaRPs

(figures et tableaux p.65 à 78)

II-2.1. Chromatographie d'affinité

25 extraits de 120 animaux chacun (soit 3000 vers au total) ont été chromatographiés sur colonne d'affinité. La détection, dans les fractions acides, des FaRPs élués de la colonne a été réalisée par DIA.

Pour chaque extrait chromatographié, l'immunoréactivité n'est détectée que dans les quatre premières fractions acides de 1,5 ml chacune.

II-2.2. Purification par RP-HPLC 1

Les fractions immunoréactives obtenues par chromatographie d'affinité correspondant à 5 extraits (soit 600 animaux) sont réunies et analysées en RP-HPLC 1. Sur le profil d'élution (fig.8), on note la présence d'un nombre limité de pics.

Le test DIA effectué sur chacune des fractions collectées révèle que seulement deux sont immunoréactives. Elles correspondent respectivement aux pics I et II.

Le pic I est élué entre 35 et 36,5 % du mélange éluant (acétonitrile 45 %; isopropanol 20 %; TFA 0,06 %) pour un temps de rétention (Tr) compris entre 21 et 22 mn. Par contre, le pic II est élué plus tardivement, entre 43,5 et 45 % du mélange éluant, pour un Tr de 26 à 27 mn.

Dans ce système chromatographique le FMRF-amide commercial est élué pour un Tr de 26,5 mn (fig.8) sous forme d'un seul pic se superposant parfaitement au pic biologique II immunoréactif; ce qui conduit à de fortes présomptions sur l'existence de FMRF-amide dans le pic II.

II-2.3. Analyse du pic II

II-2.3.1. Purification en RP-HPLC 2

Le pic II a été analysé en RP-HPLC 2. Sur le profil d'élution (fig.9) on distingue la présence d'un pic majeur immunoréactif , élué avec un Tr de 36 mn.

100 pmol de FMRF-amide commercial chromatographiés en RP-HPLC 2 sont élués en un pic à un Tr de 36 mn (fig.10a).

L'injection simultanée du pic II et de 100 pmol de FMRF-amide commercial (fig.10b) donne un pic d'absorption de surface supérieure à celui précédemment obtenu (fig.10a) élué également pour un Tr de 36 mn.

Il y a donc coélution parfaite entre le peptide commercial FMRF-amide et le peptide contenu dans le pic II.

II-2.3.2. Détermination de la séquence en acides aminés

Le peptide, issu du pic II et contenu dans le pic immunoréactif après RP-HPLC 2 (nommé par la suite pic II(2)), a été analysé par microséquençage. Les quatre premiers cycles de dégradation d'Edman conduisent à la libération successive à partir de l'extrémité N-terminale des acides aminés Phe, Met, Arg, Phe.

La structure primaire résultante pour ce peptide Phe-Met-Arg-Phe est très similaire à celle du peptide commercial FMRF-amide (Phe-Met-Arg-Phe-NH_2). L'amide C-terminale non identifiée en microséquençage peut être supposée présente, étant donné que ce peptide est reconnu par un anticorps anti-FMRF-amide ayant une forte spécificité pour la terminaison Arg-Phe-NH_2. Par conséquent, nous proposons la structure primaire complète Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 pour le peptide contenu dans le pic II(2).La concentration de ce peptide est estimée à 750 fmol/ver.

II-2.3.3. Analyse du pic II(2) en spectrométrie de masse

Le spectre de masse en FAB positif du pic II(2) (fig.11) présente un pic de forte intensité à m/z 599 résultant de la formation d'un ion moléculaire $[M+H]^+$ de masse très proche de la masse calculée 598,3 du peptide commerciale FMRF-amide.

Cette analyse permet de confirmer la présence de l'amide C-terminale au niveau de la structure primaire déterminée par microséquençage et de conclure que **le peptide du pic II(2), de structure Phe-Met-Arg-Phe-NH_2, est le FMRF-amide.**

II-2.4. Analyse du pic I

II-2.4.1. Mise en évidence de sa nature

En RP-HPLC 1, l'élution plus rapide du pic I par rapport au pic II traduit son caractère plus hydrophile.

L'immunoréactivité détectée dans ce pic I avec l'anticorps anti-FMRF-amide révèle que le ou les peptides qu'il renferme ont une structure voisine de celle du FMRF-amide (pic II).

D'autre part, dans la littérature (Ebberink *et al.*, 1987; Krajniak et Price, 1990) il est mentionné que le FMRF-amide oxydé, possédant une méthionine sulfoxyde (FM(O)RF-NH_2), a un caractère plus hydrophile que le peptide non oxydé (FMRF-NH_2). Ceci se traduisant par une élution plus précoce de quelques minutes.

Ayant précédemment identifié le FMRF-amide dans le pic II, nous avons recherché la présence possible de son dérivé oxydé. Pour cela, 10 µg du peptide commercial (disponible en quantité plus importante par rapport au FMRF-amide biologique) ont été oxydés avec 60 µl/ml d'eau oxygénée (H_2O_2 à 30 %) pendant 15 mn à température ambiante, et analysés en RP-HPLC 1. Le profil d'élution montre la présence d'un seul pic d'absorption immunoréactif élué avec un Tr de 21,5 mn se superposant au pic I (fig.8).

Lorsque, par ailleurs, nous soumettons le pic II (contenant le FMRF-amide biologique) à une analyse en HPLC dans les mêmes conditions (RP-HPLC 1), nous observons sur le profil d'élution l'apparition d'un autre pic immunoréactif dont le temps de rétention correspond à celui du pic I. Ce résultat, parallèlement à celui obtenu avec le peptide commercial oxydé, indique que les pics I et II sont apparentés et que le pic I renfermerait, entre autres, une forme oxydée du FMRF-amide. Celle-ci pourrait résulter, au moins en partie, d'une oxydation du FMRF-amide du pic II suite aux conditions de purification et de conservation.

II-2.4.2. Microséquençage du pic I

Le ou les peptides contenus dans le pic I ont été analysés par microséquençage. Au cours des quatre premiers cycles de dégradation d'Edman, il y a eu successivement libération à partir de l'extrémité N-terminale des acides aminés Phe, Thr et Met, Arg, Phe. A ce stade, la quantité de matériel est estimée à 120 fmol/ver.

La détection au cours du second cycle de dégradation d'un PTH-Thr majoritaire et d'une trace de PTH-Met révèle l'hétérogénéité du pic I.Celui-ci renfermerait encore au moins deux molécules.

Nous avons donc entrepris de séparer ces molécules par l'utilisation du second système chromatographique (RP-HPLC 2).

II-2.4.3. Purification en RP-HPLC 2

Sur le profil d'élution obtenu lors de l'analyse du pic I en RP-HPLC 2 (fig.12, profil α) on note la présence de quelques pics mineurs et d'un pic majeur.

L'immunodétection par DIA réalisée sur chacun des pics révèle que deux sont immunoréactifs: le pic mineur IA élué avec un Tr de 27 mn et le pic majeur IB élué juste après le pic IA avec un Tr de 28,5 mn.

La réaction observée en DIA pour le pic IA est environ 10 fois plus faible que celle du pic IB et ceci malgré un dépôt 40 fois plus concentré.

L'hétérogénéité du pic I révélée lors du séquençage résulterait de la présence de deux molécules immunoréactives (IA et IB). Celles-ci semblent posséder des caractères hydrophiles similaires leur conférant le même comportement chromatographique en RP-HPLC 1.

En RP-HPLC 2, le peptide commercial FMRF-amide, préalablement oxydé, (FM(O)RF-NH_2) est élué avec un Tr de 28,5 mn sous forme d'un pic se superposant parfaitement au pic biologique IB immunoréactif (fig.12, profil β).

Le pic IB renfermerait donc un peptide de structure analogue à celle du FM(O)RF-NH_2.

II-2.4.3.1. *Analyse du pic IB*

II-2.4.3.1.1. Détermination de la séquence en acides aminés

Le microséquençage du peptide contenu dans le pic majeur immunoréactif IB conduit à la libération successive des quatre acides aminés Phe,Met,Arg,Phe. La coélution précédemment observée entre ce pic IB et le FM(O)RF-amide permet de supposer que la méthionine détectée en microséquençage est en fait une méthionine sulfoxyde.

L'immunoréactivité du pic IB pour l'anticorps anti-FMRF-amide spécifique de la terminaison Arg-Phe-NH_2 nous permet d'émettre l'hypothèse de la présence de l'amide C-terminale qui n'a pas été détectée en microséquence. La structure primaire résultante pour le peptide contenu dans le pic IB pourrait donc être: Phe-Met(O)-Arg-Phe-NH_2.

II-2.4.3.1.2. Analyse en spectrométrie de masse du pic IB et du FM(O)RF-amide.

Afin de confirmer la structure du peptide biologique IB, nous l'avons analysé, parallèlement au peptide FM(O)RF-amide, en spectrométrie de masse (FAB-MS et FAB-MS/MS).

- *Analyse en FAB-MS*

Le spectre de masse en FAB positif du peptide biologique IB (fig.13a) présente deux pics de forte intensité situés respectivement à m/z 569 et m/z 615, tandis que celui du peptide commercial oxydé FM(O)RF-amide (fig.13b) montre deux pics de forte intensité situés à m/z 599 et à m/z 615.

Ces spectres ont en commun l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à m/z 615 dont la masse est extrêmement proche de la masse moléculaire calculée [M+H] 615,3 du peptide oxydé FM(O)RF-amide.

L'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à m/z 599 visible sur le spectre de masse du peptide FM(O)RF-amide (fig.13b), et que l'on retrouve également sous forme d'un pic de faible intensité sur le spectre de masse du peptide biologique IB (fig.13a), est caractéristique, comme nous l'avons précédemment montré, du peptide FMRF-amide non oxydé. Sa présence est artéfactuelle et résulte d'une désoxydation d'une fraction des molécules de l'échantillon au cours de l'analyse.

L'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à m/z 569 présent sur le spectre du peptide biologique IB (fig.13a) révèle la présence d'une autre molécule et sera ultérieurement identifié par l'analyse du pic IA.

- *Analyse en FAB-MS/MS*

Les ions protonés $[M+H]^+$ à m/z 615 du peptide biologique IB et du peptide FM(O)RF-NH_2 ont été sélectionnés et soumis à une fragmentation induite par collision.

La nomenclature utilisée pour la dénomination des ions fragments produits à partir de l'ion initial d'un peptide est expliquée sur la figure 14. Les fragments attendus pour le peptide de référence possédant une méthionine sulfoxyde (FM(O)RF-NH_2) sont indiqués en haut de la figure 15.

Les spectres de fragmentation du peptide biologique IB (fig.15a) et du FM(O)RF-amide (fig.15b) font apparaître les mêmes ions fragments. Les principaux ions fragments observés pour les deux peptides sont indiqués dans le tableau VI. Entre autres, nous pouvons observer l'ion fragment à m/z 598

correspondant au FM(O)RF par perte de l'amide C-terminale. L'ion fragment à m/z 523 est obtenu par perte du groupement benzyl de la phénylalanine située du côté N-terminal. Enfin, l'ion fragment à m/z 551 résulte de la perte du méthyl sulfoxyde de la méthionine sulfoxyde.

Les fragments à m/z 598 et à m/z 551 permettent de confirmer respectivement la présence au niveau de l'ion initial, de l'amide C-terminale et d'une méthionine sulfoxyde qui n'avaient pas été identifiées lors du séquençage.

Par l'analyse comparée des spectres de fragmentation de ces peptides, il ressort que le peptide biologique IB possède la même structure primaire que celle du FM(O)RF-NH_2.

En conclusion, nous pouvons donc affirmer que le peptide du pic IB possède la structure Phe-Met(O)-Arg-Phe-NH_2.

II-2.4.3.2. *Analyse du pic IA*

Le microséquençage du pic I issu de l'analyse en RP-PHLC 1 a montré qu'au cours du deuxième cycle de dégradation deux acides aminés (thréonine et méthionine) sont détectés, alors que les autres cycles ne libèrent qu'un seul acide aminé.

Ce pic I renferme donc deux peptides de structure très voisine, ne différant que par leur acide aminé situé en seconde position. Analysé en RP-HPLC 2 ce pic I donne deux pics (IA et IB) immunoréactifs (fig.12, profil α). Précédemment, nous avons établi que le pic IB est composé de FM(O)RF-amide.

Le pic IA, de par son immunoréactivité avec l'anticorps anti-FMRF-amide, renfermerait un peptide de structure C-terminale Arg-Phe-NH_2. Suite au séquençage du pic I révélant la présence d'une thréonine, sa structure N-terminale serait Phe-Thr. Le peptide du pic IA aurait donc comme structure primaire Phe-Thr-Arg-Phe-NH_2.

II-2.4.3.2.1. Microséquençage

L'analyse en microséquence du pic IA n'a pas permis de détecter un seul acide aminé. Ceci peut s'expliquer par la faible quantité de matériel immunoréactif présente dans ce pic.

II-2.4.3.2.2. Synthèse peptidique

Cette synthèse a été réalisée dans le Service de Chimie des Biomolécules du Pr Tartar.

Dans le but de confirmer l'hypothèse de structure émise pour le peptide contenu dans le pic IA, le peptide de structure Phe-Thr-Arg-Phe-NH_2 (FTRF-amide) a été synthétisé en phase solide selon la technique de Meriffield (1963).

-Test d'immunodétection avec le peptide FTRF-amide

Afin de déterminer si ce peptide de synthèse est reconnu par l'anticorps 646 anti-FMRF-amide, nous avons réalisé un test identique à celui précédemment décrit pour le FMRF-amide (voir paragr.II-1). Une gamme de mêmes concentrations: 100 à 0,01 pmol/µl de FTRF-amide préparée dans l'eau distillée a été déposée.

La réaction obtenue (fig.16) montre qu'avec l'Ac 646 dilué au 1/1000, une réaction est visualisée jusqu'à une concentration minimale de 1pmol. soit 4 fois supérieure à celle du FMRF-amide. Le FTRF-amide, bien que présentant une terminaison Arg-Phe-NH_2, est par rapport au FMRF-amide moins reconnu par l'anticorps 646.

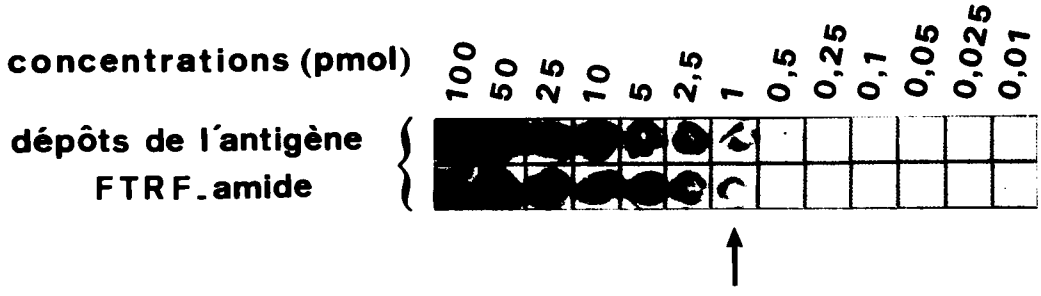


Figure 16 - Test d'immunodétection du peptide de synthèse FTRF-amide.
La flèche indique la concentration pour laquelle le seuil de détection est obtenu.

- *Analyse en RP-HPLC 1*

Ce peptide de synthèse analysé en RP-HPLC 1 est élué avec un Tr de 21 mn correspondant à la limite inférieure de la zone d'élution du pic I.

L'analyse simultanée (fig.17) des peptides FTRF-amide (a) et FM(O)RF-amide (b) en RP-HPLC 1 montre que les pics correspondant à chacun de ces peptides sont mal résolus et se chevauchent par leur base. La zone d'élution de ces peptides correspondant à celle du pic I permet d'expliquer leur possible coexistence dans le pic I (fig.8).

- *Analyse en RP-HPLC 2*

Le peptide de synthèse FTRF-amide analysé en RP-HPLC 2 est élué avec un Tr de 27 mn (fig.18, profil β), équivalent à celui obtenu pour le pic biologique IA (fig.12, profil α).

Dans ce système chromatographique, 100 pmol de FTRF-amide et 100 pmol de FMRF-amide préalablement oxydé (FM(O)RF-amide) injectés simultanément sont élués sous forme de trois pics: a,b et c (fig.18, profil α).

Les pics a et b sont bien résolus et se superposent respectivement aux pics biologiques IA et IB obtenus lors de l'analyse du pic I en RP-HPLC 2 (fig.12, profil α). Le pic a, élué avec un Tr de 27 mn, et le pic b, élué avec un Tr de 28,5 mn, correspondent respectivement aux peptides FTRF-amide (fig.18, profil β) et FM(O)RF-amide (fig.12, profil β). La coélution observée entre le pic IA et le peptide de synthèse FTRF-amide renforce la forte présomption précédemment émise sur la nature du peptide contenu dans le pic IA.

Le pic c, élué avec un Tr de 36 mn équivalent à celui du FMRF-amide non oxydé (fig.10a), résulte d'une oxydation incomplète des 100 pmol de FMRF-amide.

II-2.4.3.2.3. Analyse en spectrométrie de masse du pic IA et du FTRF-amide

Cette analyse a pour but de conclure définitivement quant à la structure du peptide biologique IA.

- *Analyse en FAB-MS*

Les spectres de masse en FAB positif du peptide biologique IA (fig.19a) et du peptide de synthèse FTRF-amide (fig.19b) présentent tous deux un pic de forte intensité à m/z 569. Celui-ci traduit l'obtention d'un ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ dont la masse est très proche de la masse moléculaire [M+H] 569,3 du peptide de synthèse FTRF-amide.

- *Analyse en FAB-MS/MS*

L'ion protoné $[M+H]^+$ à m/z 569 de chacun des deux peptides (IA et FTRF-amide de synthèse) a été fragmenté par collision. Les fragments attendus pour le peptide de synthèse FTRF-NH_2 sont indiqués en haut de la figure 20. Les spectres de fragmentation du peptide biologique IA (fig.20a) et du peptide de synthèse FTRF-amide (fig.20b) montrent que les mêmes ions fragments ont été formés. Les principaux ions observés sont indiqués dans le tableau VII.

En particulier, nous pouvons noter dans les deux cas la présence de l'ion fragment à m/z 552 correspondant à la structure FTRF par perte de l'amide C-terminale. De même l'ion à m/z 477,5 est obtenu par perte du groupement benzyl de la phénylalanine N-terminale.

Ainsi, l'obtention des mêmes ions fragments pour le peptide de synthèse et pour le peptide biologique, et notamment celui à m/z 552 confirmant la présence de l'amide C-terminale, permet de conclure que **le peptide biologique IA possède la structure primaire Phe-Thr-Arg-Phe-NH_2.**

Figures 8 à 15 et 17 à 20

Tableaux VI et VII

Figure 8

Séparation par chromatographie liquide à haute performance sur colonne C_{18} µBondapak (RP-HPLC 1) des fractions immunoréactives pour le FMRF-amide obtenues après chromatographie d'affinité.

Le système d'élution est constitué d'un solvant A (eau-TFA 0,075 %) et d'un solvant B (acétonitrile 45 %; isopropanol 20 %; TFA 0,06 %). La colonne est éluée avec un gradient de 0 à 100 % de B en 60 mn, à un débit de 1 ml/mn. Les zones grisées (I et II) représentent les fractions immunoréactives avec l'anticorps anti-FMRF-amide. Les positions d'élution des peptides de référence FMRF-NH_2 et FM(O)RF-NH_2 sont indiquées. Le FM(O)RF-NH_2 est préparé par traitement à l'H_2O_2 du FMRF-NH_2 pendant 15 mn à température ambiante.

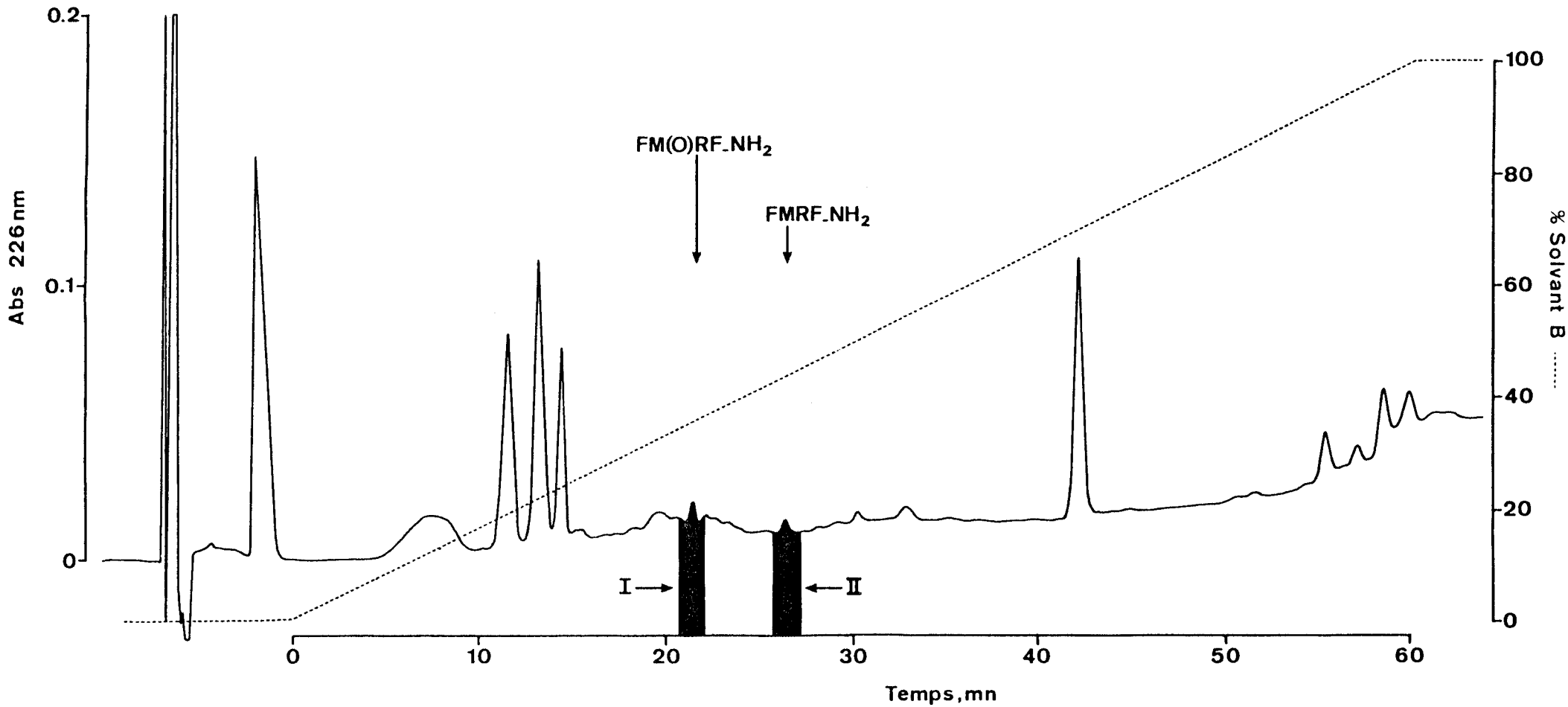

0.2
0.1
0
Abs 226nm
FM(O)RF-NH2
FMRF-NH2
I
II
0
10
20
30
40
50
60
Temps,mn
100
80
60
40
20
0
% Solvant B

Figure 9

Purification par chromatographie liquide à haute performance sur colonne C_8 Microbore (RP-HPLC 2) du matériel contenu dans le pic II issu de la séparation en RP-HPLC 1 (fig. 8).

Le système d'élution est composé d'un solvant A (eau-TFA 0,05 %) et d'un solvant B (acétonitrile 75 %; TFA 0,045 %). La colonne est éluée par un gradient de 0 à 25 % de B en 40 mn, à un débit de 50 µl/mn. La flèche indique le pic immunoréactif pour le FMRF-amide.

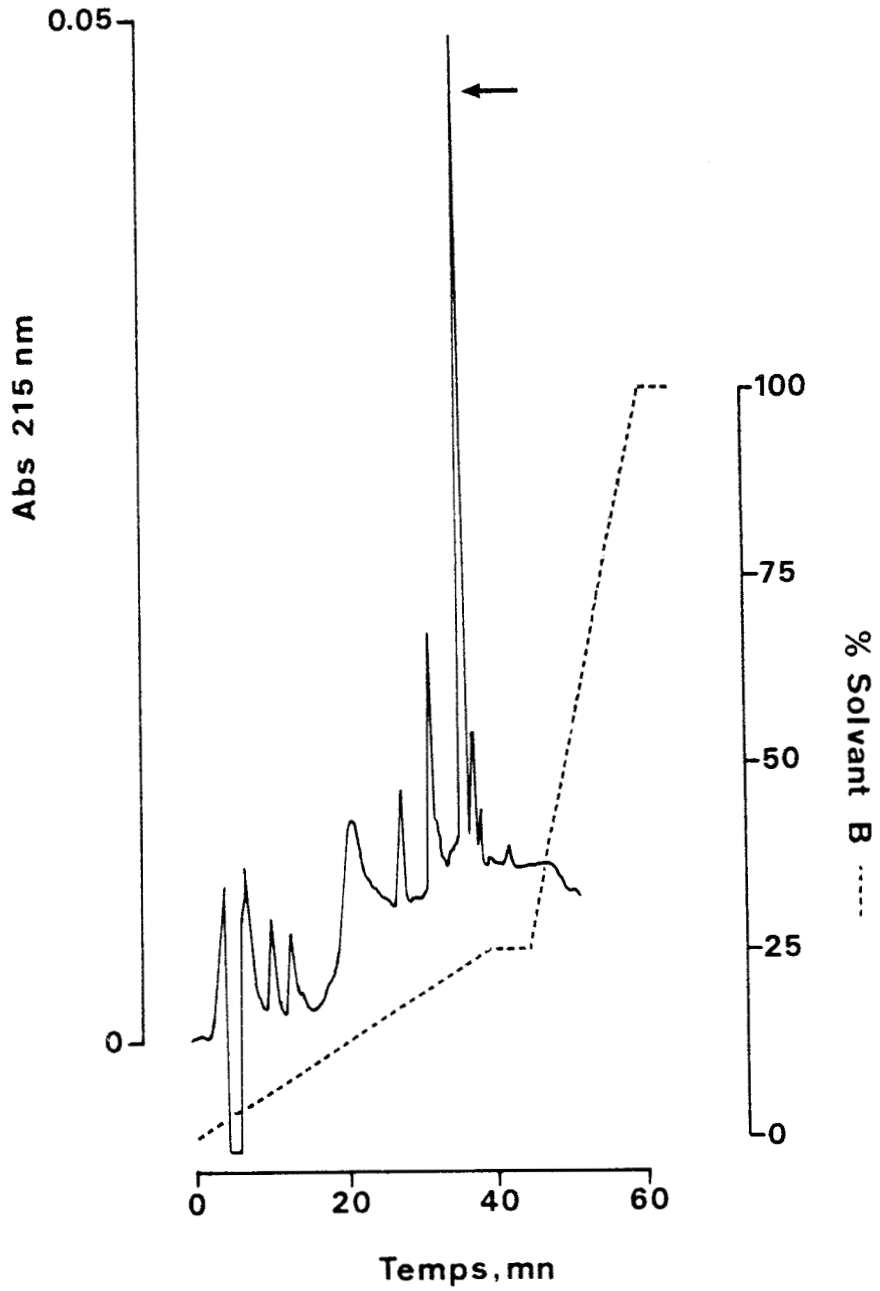
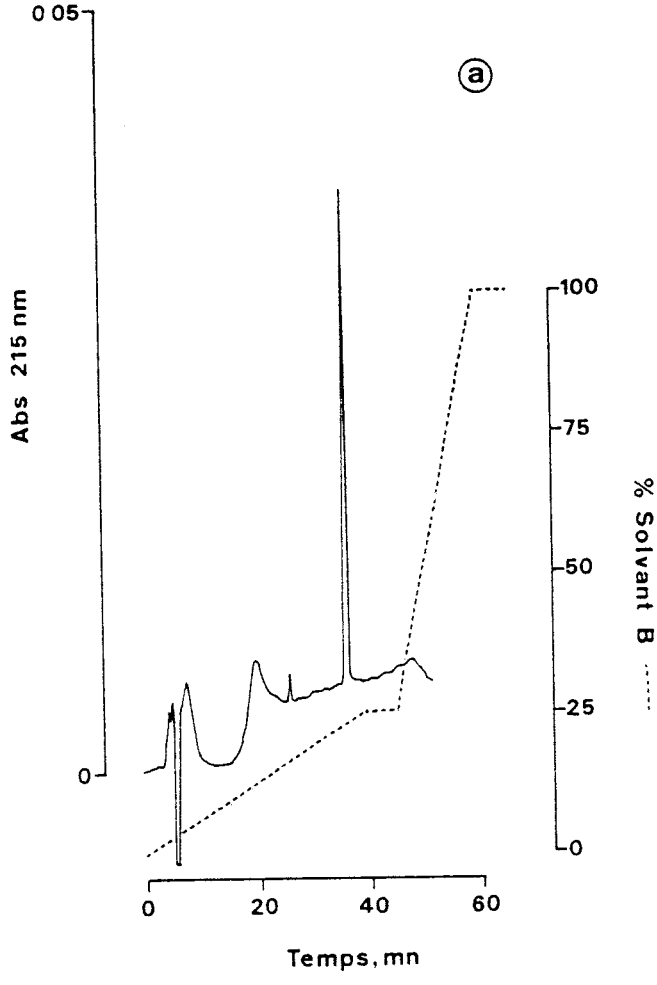

0.05
0
Abs 215 nm
100
75
50
25
0
% Solvant B
0
20
40
60
Temps, mn

Figure 10

Comparaison du profil RP-HPLC 2 de 100 pmol de FMRF-amide synthétique (a) avec celui du pic II additionné de 100 pmol de FMRF-amide synthétique (b).

Les conditions de chromatographie sont décrites figure 9.


a
0 05
Abs 215 nm
0
100
75
50
25
0
% Solvant B
0
20
40
60
Temps, mn

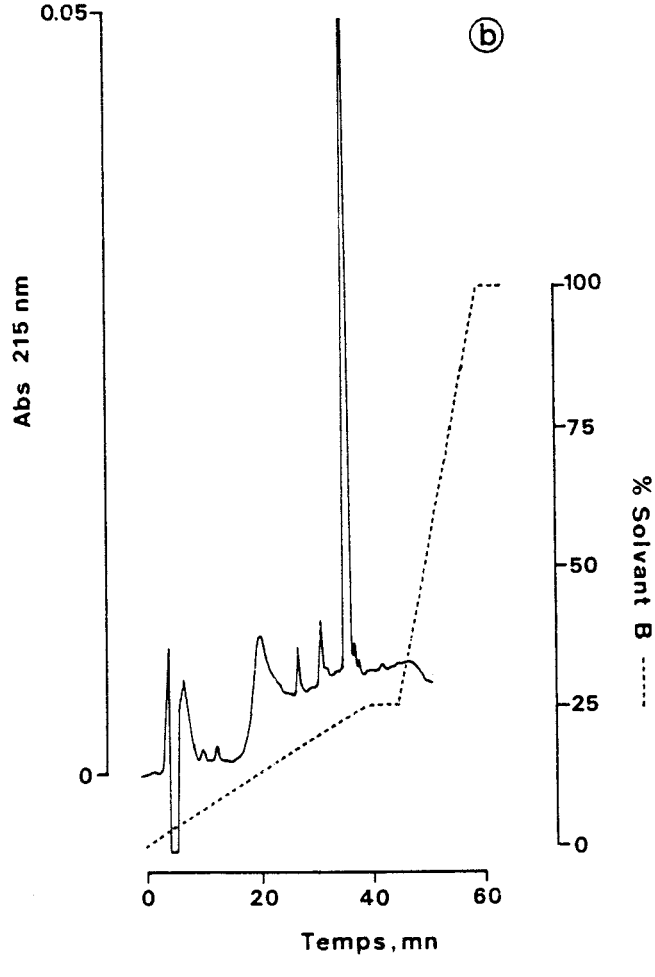

b
0.05
Abs 215 nm
0
100
75
50
25
0
% Solvant B
0
20
40
60
Temps, mn

Figure 11

Spectre en FAB-MS positif du peptide biologique contenu dans le pic immunoréactif après RP-HPLC 2 du pic II (fig. 9).

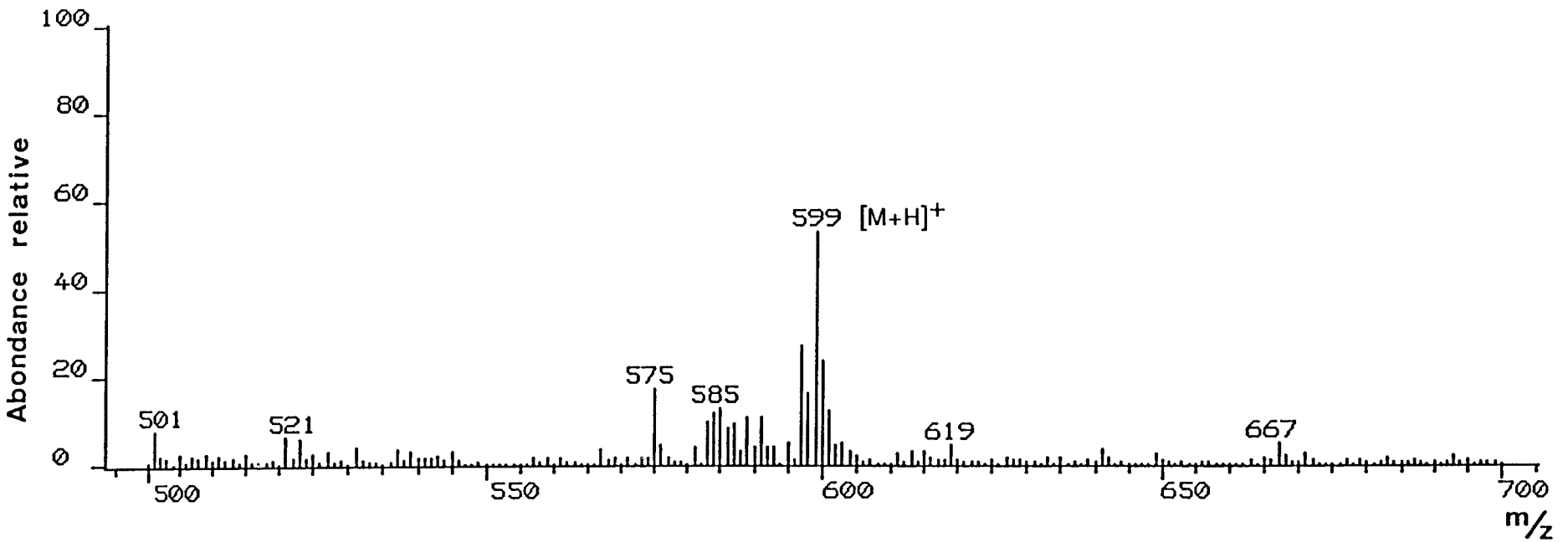

Abondance relative
100
80
60
40
20
0
501
521
575
585
599 [M+H]+
619
667
500
550
600
650
700
m/z

Figure 12

Fractionnement par RP-HPLC 2 (profil α) du matériel contenu dans le pic I provenant de la séparation par RP-HPLC 1 (fig. 8).

Les conditions d'élution sont celles rapportées figure 9.

Les pics IA et IB sont immunoréactifs.

Le profil d'élution obtenu pour le FM(O)RF-NH_2 préparé comme décrit figure 8 a été juxtaposé (profil β).

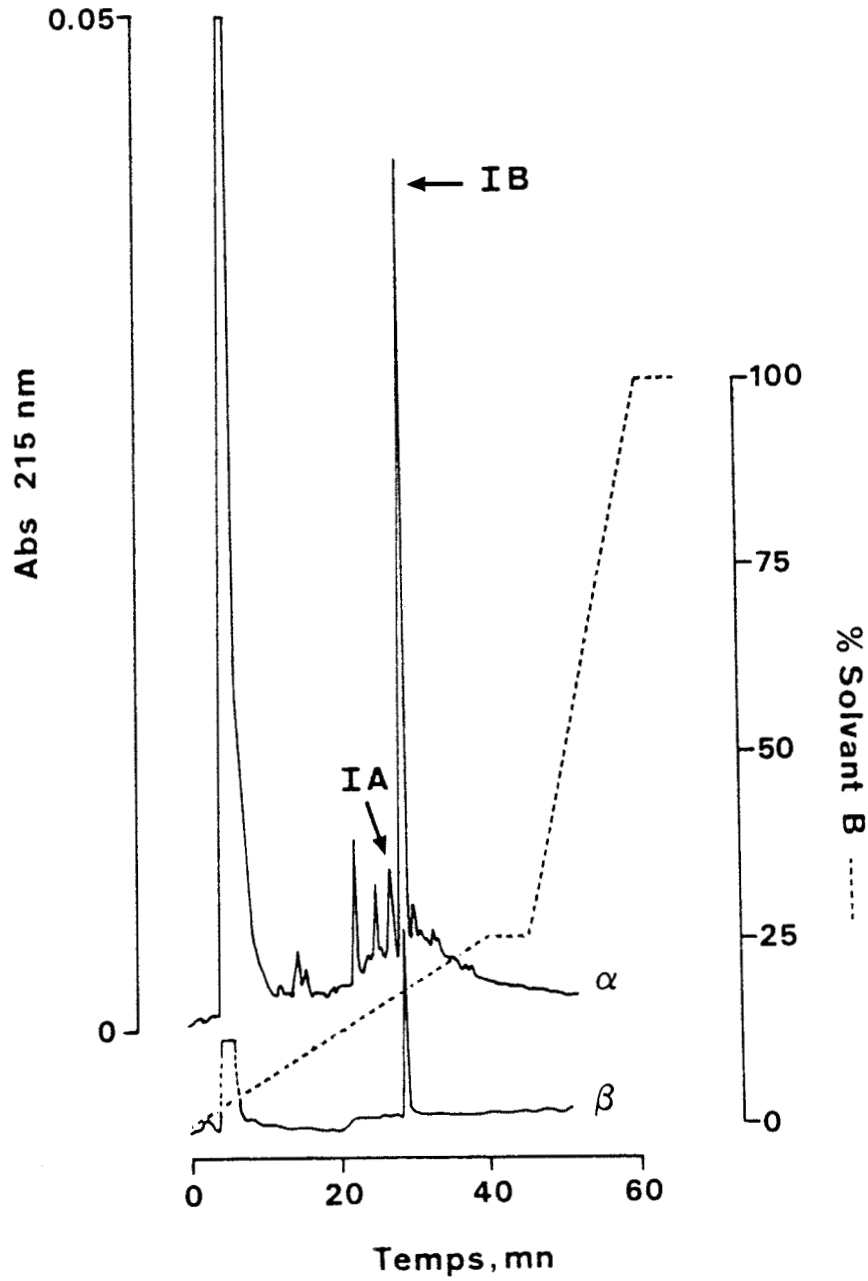
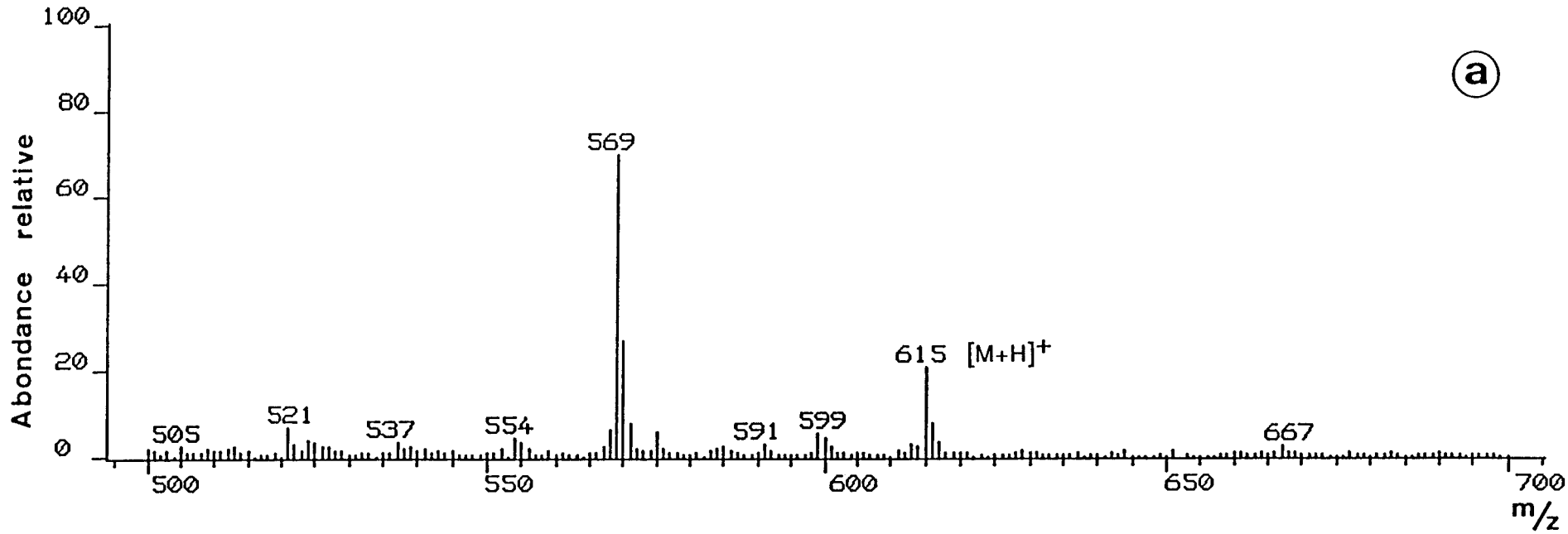

0.05
0
Abs 215 nm
IB
IA
α
β
100
75
50
25
0
% Solvant B
0
20
40
60
Temps, mn

Figure 13

Spectre en FAB-MS positif du peptide biologique du pic IB (a) et du peptide FM(O)RF-NH_2 (b) obtenu par oxydation à l'H_2O_2 du FMRF-amide commercial.


a
Abondance relative
100
80
60
40
20
0
569
615 [M+H]+
505
521
537
554
591
599
667
500
550
600
650
700
m/z

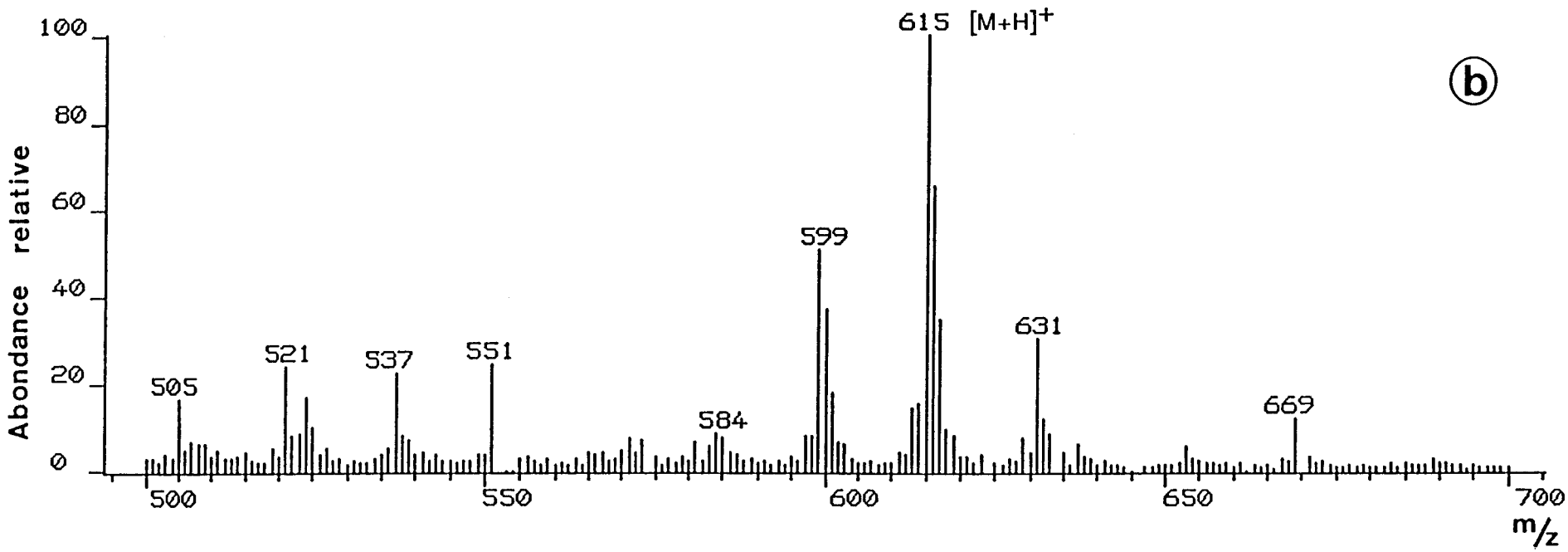

b
Abondance relative
100
80
60
40
20
0
615 [M+H]+
599
631
505
521
537
551
584
669
500
550
600
650
700
m/z

Figure 14

Nomenclature utilisée pour la dénomination des ions fragments susceptibles d'être produits lors de la fragmentation d'un peptide.

Les fragments A, B, C renferment l'extrémité N-terminale. Les fragments x, y, z possèdent l'extrémité C-terminale.

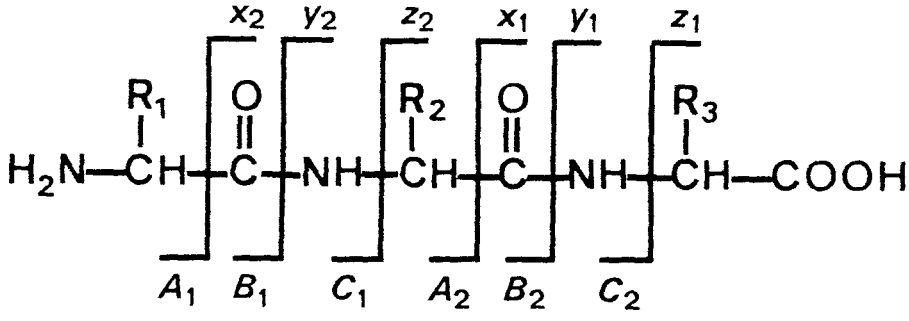
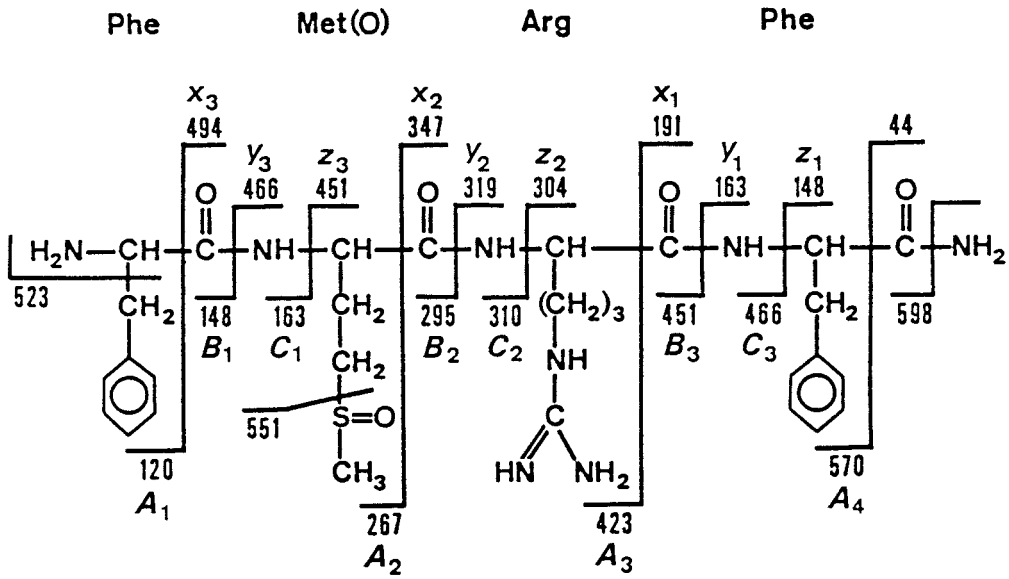
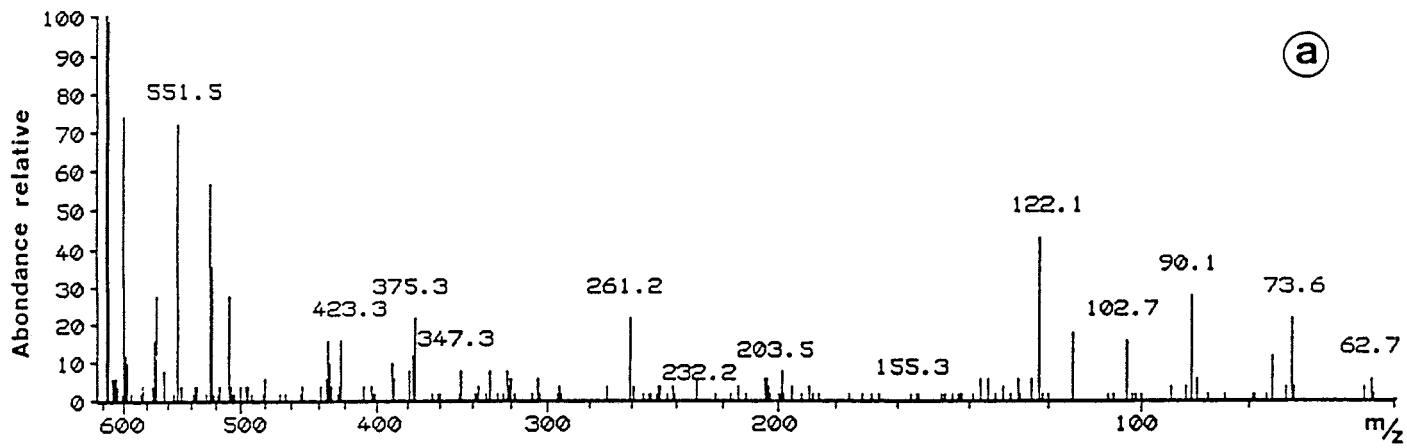

x2
y2
z2
x1
y1
z1
R1
O
R2
O
R3
H2N—CH—C—NH—CH—C—NH—CH—COOH
A1
B1
C1
A2
B2
C2

Figure 15

Spectres de fragmentation en FAB-MS/MS positif de l'ion protoné $[M+H]^+$ à m/z 615 du peptide biologique IB (a) et du FM(O)RF-NH_2 (b).

En haut de la figure est représentée la structure primaire du peptide FM(O)RF-NH_2 sur laquelle sont indiqués les fragments pouvant être attendus.


Phe
Met(O)
Arg
Phe
x_3 494
y_3 466
z_3 451
x_2 347
y_2 319
z_2 304
x_1 191
y_1 163
z_1 148
44
523
148 B_1
163 C_1
295 B_2
310 C_2
451 B_3
466 C_3
598
120 A_1
267 A_2
423 A_3
570 A_4
551


a
Abondance relative
551.5
122.1
90.1
73.6
375.3
423.3
347.3
261.2
102.7
62.7
203.5
232.2
155.3
m/z

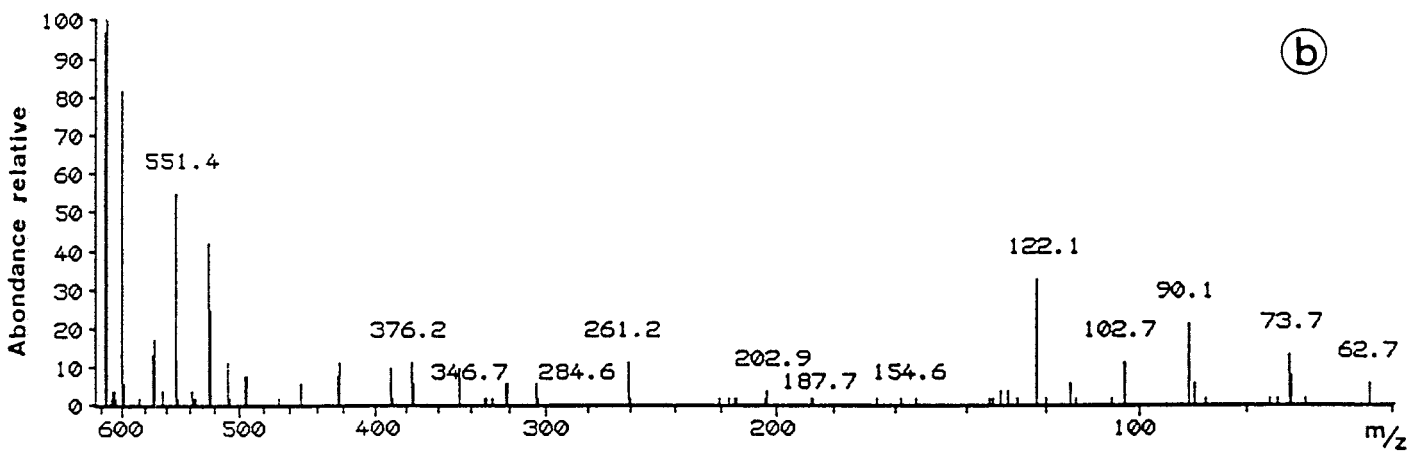

b
Abondance relative
551.4
122.1
90.1
73.7
376.2
261.2
102.7
62.7
346.7
284.6
202.9
187.7
154.6
m/z

Tableau VI - Principaux ions fragments observés sur les spectres de fragmentation (fig.15a,b) en mode positif de l'ion protoné $[M+H]^+$ à m/z 615 du peptide biologique IB et du peptide commercial oxydé FM(O)RF-NH_2.

m/z	Ions fragments
598	MH - NH_3
570	A_4
551	MH - [CH_3-SO]
523	MH - [CH_2-Ph]
423	A_3
347	x_2
321	y_2 + 2H
203	A_2 - [CH_2-CO]

Ph = phényl

Figure 17

Analyse du comportement chromatographique en RP-HPLC 1 du peptide de synthèse FTRF-NH_2 (pic a) et du FM(O)RF-NH_2 (pic b).

Les conditions d'élution et d'oxydation sont celles décrites figure 8.

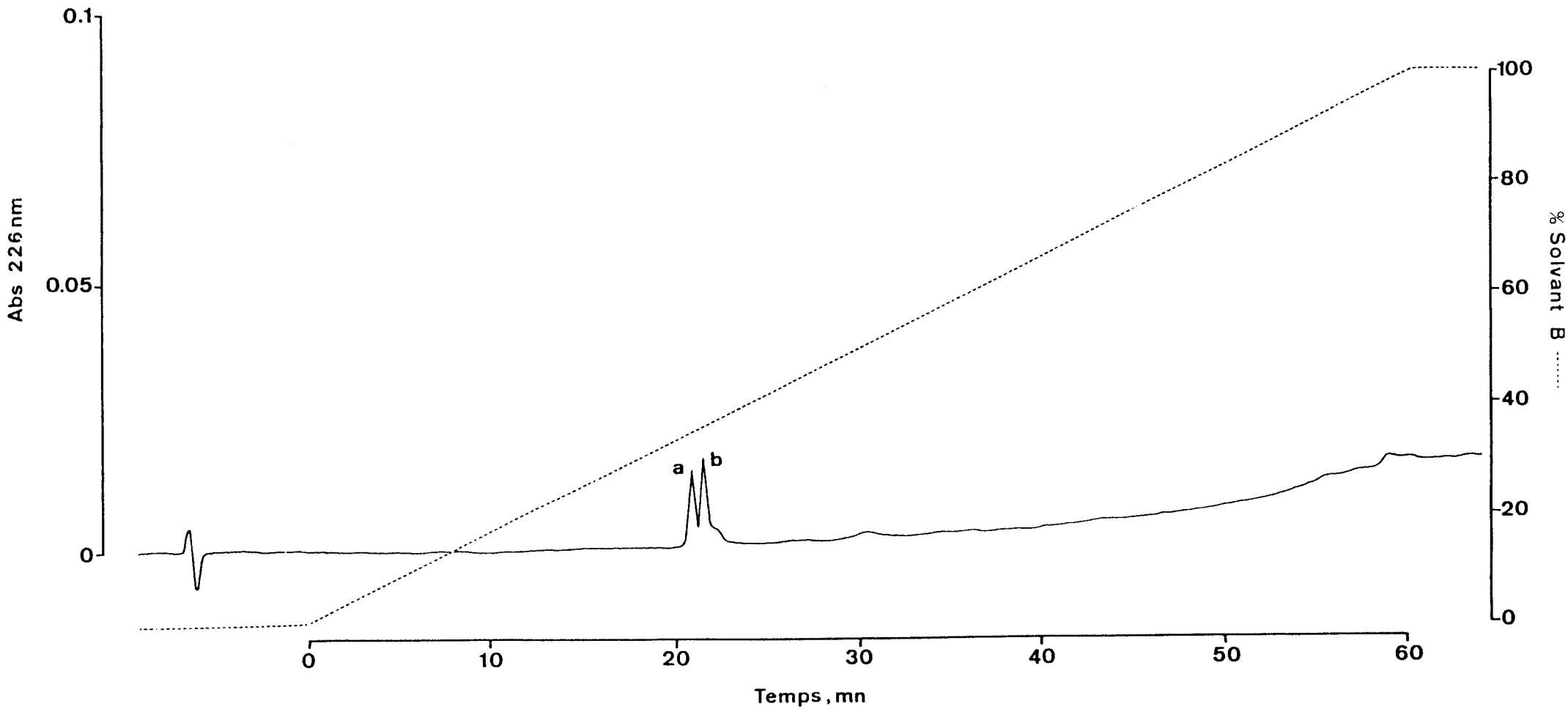

0.1
0.05
0
Abs 226nm
100
80
60
40
20
0
% Solvant B
a
b
0
10
20
30
40
50
60
Temps, mn

Figure 18

Séparation en RP-HPLC 2 (profil α) d'un mélange des peptides FTRF-amide (pic a) et FM(O)RF-amide (pic b). Le pic c représente le FMRF-amide restant après préparation du peptide oxydé.
Les conditions chromatographiques sont celles décrites figure 9.
Le profil d'élution du FTRF-amide a été juxtaposé (profil β).

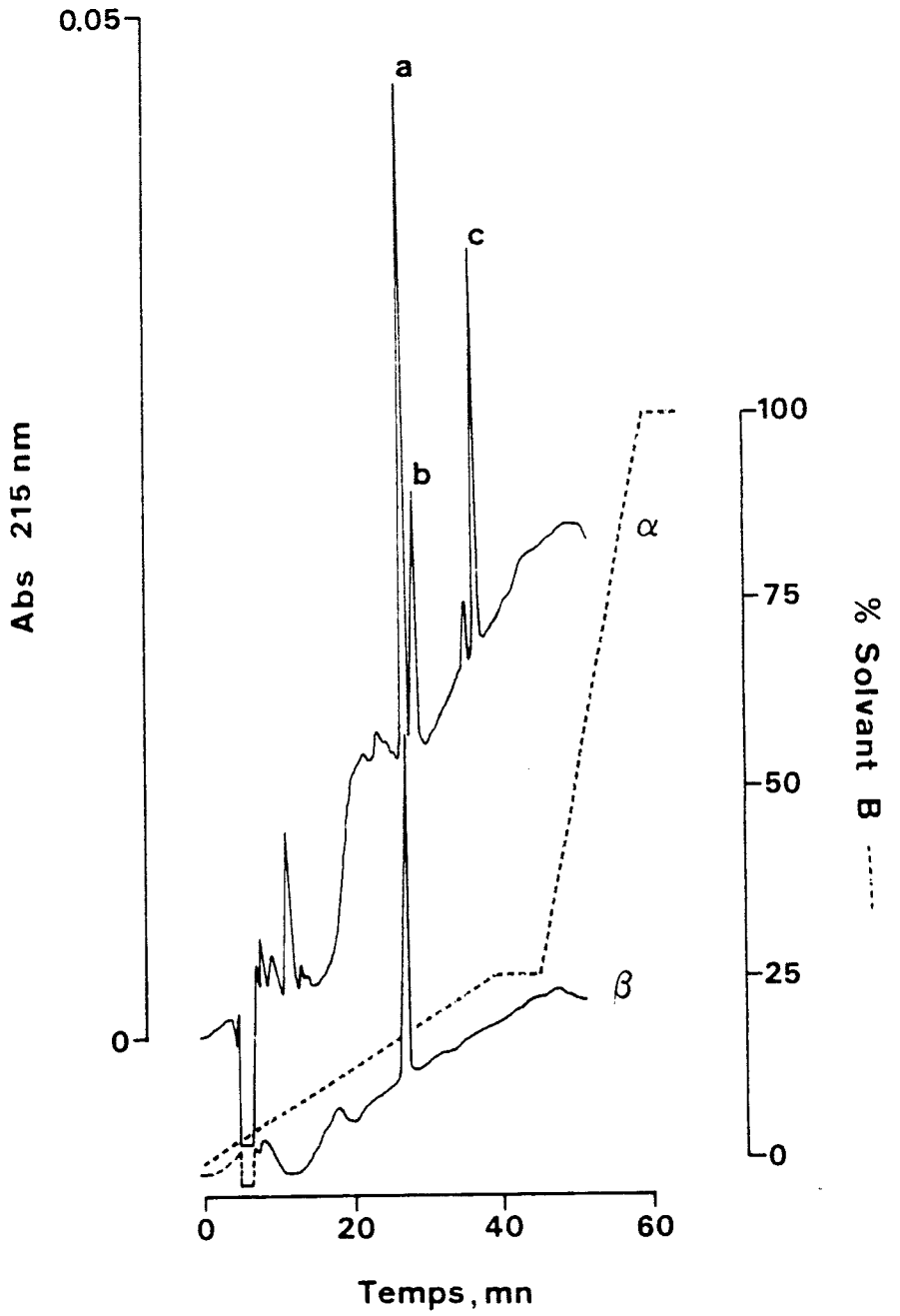
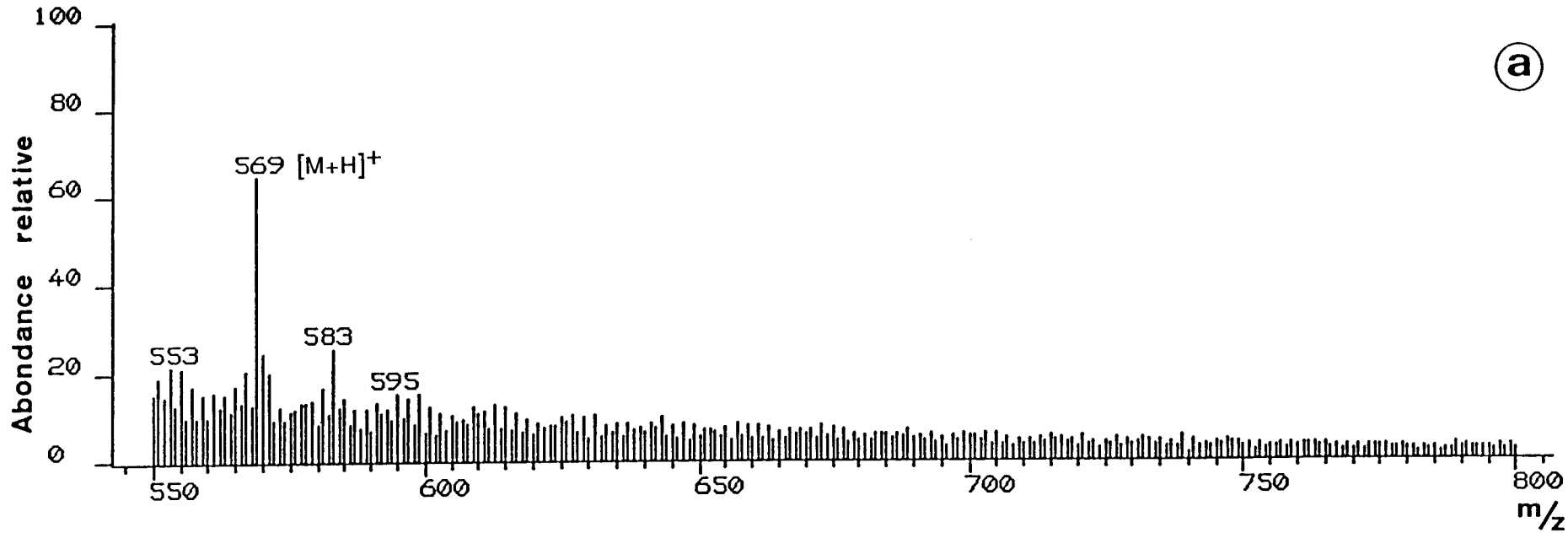

0.05
0
Abs 215 nm
a
b
c
α
β
100
75
50
25
0
% Solvant B
0
20
40
60
Temps, mn

Figure 19

Spectres en FAB-MS positif du peptide biologique du pic IA (a) et du peptide de synthèse FTRF-amide (b).


a
Abondance relative
100
80
60
40
20
0
569 [M+H]+
553
583
595
550
600
650
700
750
800
m/z

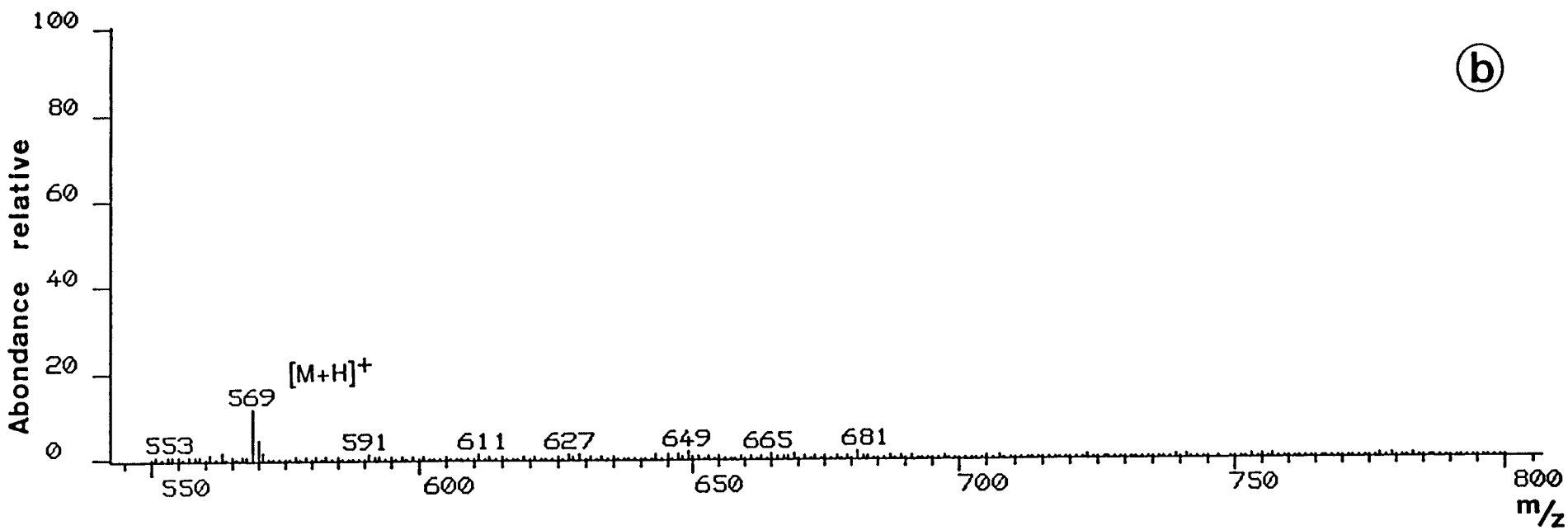
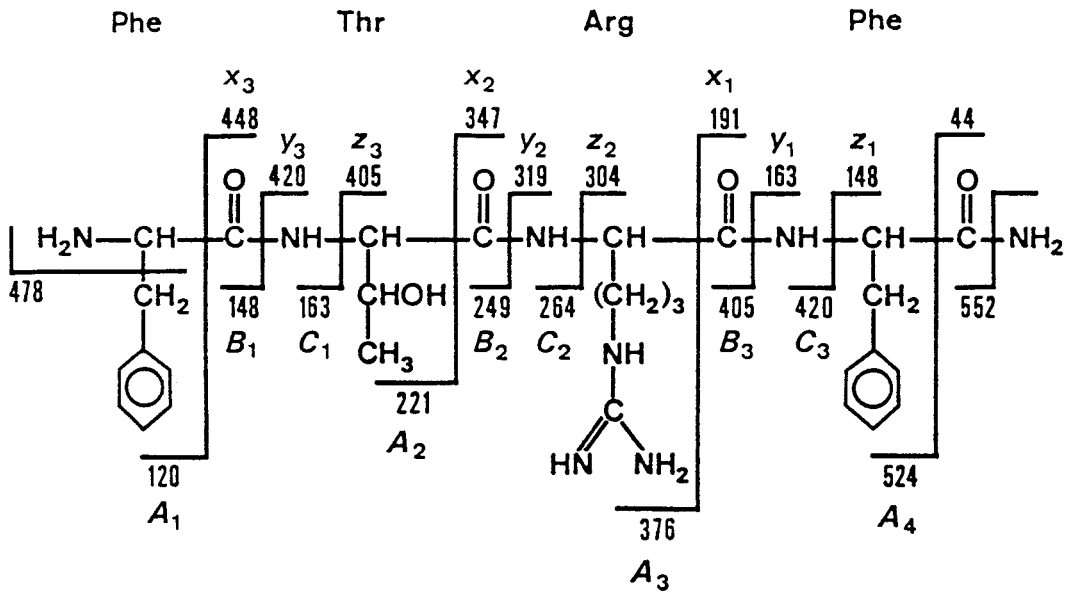
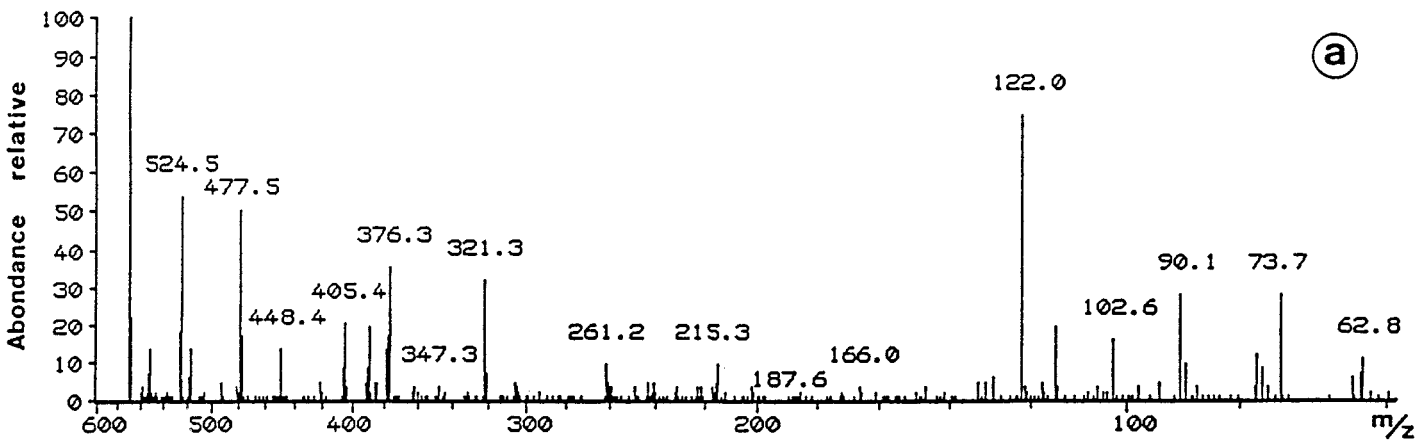

b
Abondance relative
100
80
60
40
20
0
[M+H]+
569
553
591
611
627
649
665
681
550
600
650
700
750
800
m/z

Figure 20

Spectres de fragmentation en FAB-MS/MS positif de l'ion protoné $[M+H]^+$ à m/z 569 du peptide biologique IA (a) et du peptide de synthèse FTRF-amide (b).

En haut de la figure est représentée la structure primaire du peptide FTRF-NH_2 sur laquelle sont indiqués les fragments pouvant être attendus.


Phe
Thr
Arg
Phe
x_3 448
y_3 420
z_3 405
x_2 347
y_2 319
z_2 304
x_1 191
y_1 163
z_1 148
44
478
148
163
249
264
405
420
552
120
221
376
524
A_1
B_1
C_1
A_2
B_2
C_2
A_3
B_3
C_3
A_4


a
Abondance relative
m/z
524.5
477.5
376.3
321.3
405.4
448.4
347.3
261.2
215.3
187.6
166.0
122.0
102.6
90.1
73.7
62.8

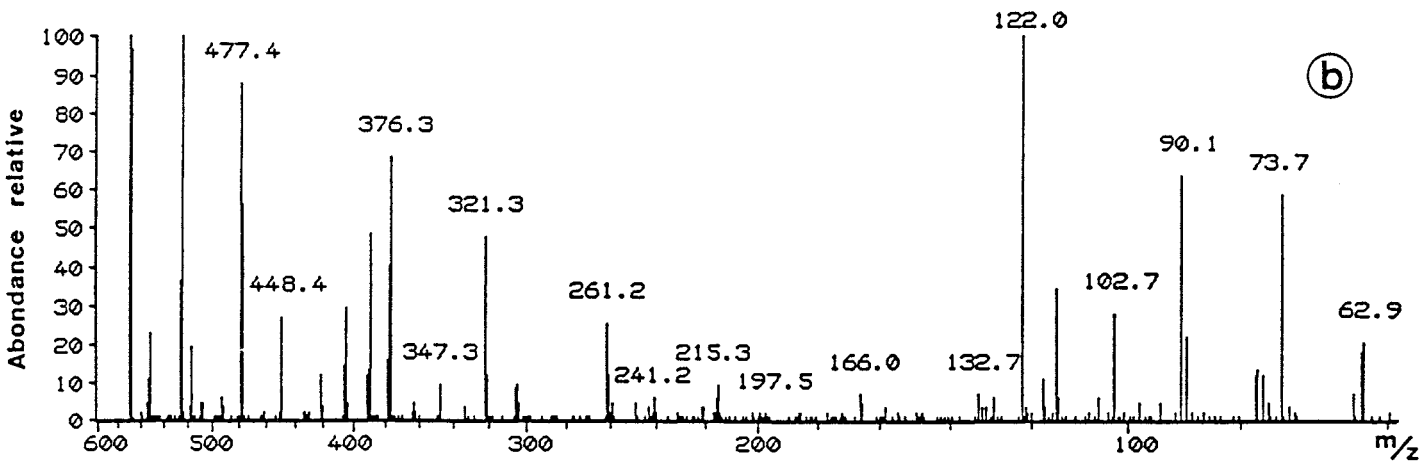

b
Abondance relative
m/z
477.4
376.3
321.3
448.4
347.3
261.2
241.2
215.3
197.5
166.0
132.7
122.0
102.7
90.1
73.7
62.9

Tableau VII - Principaux ions fragments observés sur les spectres de fragmentation (fig. 20a, b) en mode positif de l'ion protoné $[M+H]^+$ à m/z 569 du peptide biologique IA et du peptide de synthèse FTRF-NH_2.

m/z	Ions fragments
552	MH - NH_3
524	A_4
477	M - [CH_2-Ph]
448	x_3
405	z_3 et B_3
376	A_3
347	x_2
321	y_2 + 2H

Ph = phényl

II-3. Discussion

Nous avons établi un protocole de purification permettant d'isoler les trois peptides: FMRF-amide, FM(O)RF-amide et FTRF-amide avec un nombre limité d'étapes chromatographiques.

- L'extraction du matériel biologique a été effectuée à l'acétone aqueux qui a l'avantage de n'extraire que les petits peptides.

- La première étape chromatographique sur colonne d'affinité nous a permis d'enrichir la préparation en molécules apparentées au FMRF-amide.

- Deux étapes en chromatographie liquide à haute performance (RP-HPLC 1 et RP-HPLC 2) ont ensuite été nécessaires pour purifier de manière satisfaisante ces molécules.

* En RP-HPLC 1, le nombre restreint de pics présents sur le profil d'élution (fig.8) montre qu'à ce stade, les molécules immunoréactives ont un certain degré de pureté. Lors de cette étape de purification, les peptides FMRF-amide et FM(O)RF-amide ont été repérés par leur immunoréactivité et leur temps de rétention équivalent à celui des peptides de synthèse. Par contre, le peptide FTRF-amide n'a pu être détecté que par le microséquençage du pic I.

Dans ce système chromatographique (sur colonne C_{18} µBondapak) les peptides FTRF-amide et FM(O)RF-amide ont le même comportement chromatographique. Ceci n'est pas surprenant si l'on considère la structure de chacun de ces peptides. En effet, ils ne diffèrent que par leur second acide aminé: thréonine et méthionine, ce qui leur confère un caractère hydrophile pratiquement équivalent.

L'élution des peptides biologiques FTRF-amide et FM(O)RF-amide dans la même fraction (pic I, fig. 8) résulte de la résolution insuffisante du système HPLC utilisé (diamètre de la colonne 4,5 mm, débit de la phase mobile éluante 1 ml/mn), mais également de la largeur de la fraction collectée.

* En seconde étape HPLC (RP-HPLC 2), l'utilisation d'un système plus résolutif, suite au changement de divers paramètres: type de colonne (Microbore C_8 de diamètre 1 mm), modification de la phase mobile éluante, élution à l'aide d'un gradient lent (faible pente) et à un débit plus faible (50 µl/mn), a rendu possible la séparation de ces deux peptides sous forme de deux pics bien résolus IA et IB correspondant respectivement au FTRF-amide et au FM(O)RF-amide. Toutefois, bien que très résolutif, ce système ne nous a pas permis d'exclure totalement une contamination mutuelle des

deux peptides. Celle-ci a été constatée lors de l'étude du spectre de masse du peptide biologique IB (FM(O)RF-amide) par la présence d'un pic à m/z 569 caractéristique de l'ion protoné $[M+H]^+$ du peptide FTRF-amide.

- La faible immunoréactivité détectée au niveau du pic IA (FTRF-amide) par rapport à celle obtenue pour les pics IB (FM(O)RF-amide) et II (FMRF-amide) est due à la différence d'affinité de l'anticorps pour chacun de ces peptides et à la quantité de peptides existante.

* La différence d'affinité a été montrée en immunodétection lors des tests de sensibilité réalisés à l'aide de deux gammes de mêmes concentrations du peptide commercial FMRF-amide et du peptide de synthèse FTRF-amide. Ces deux peptides sont reconnus par l'anticorps polyclonal 646 anti-FMRF-amide. Néanmoins, la concentration minimale de détection diffère pour chacun d'eux. Elle est de 0,25 pmol pour le FMRF-amide alors que pour le FTRF-amide elle est de 1 pmol soit 4 fois supérieure. Cette différence de sensibilité peut s'expliquer par la nature de l'anticorps utilisé. En effet, cet anticorps est polyclonal (fabriqué chez le lapin par injection de FMRF-amide) et renferme donc des IgG de spécificités différentes. Les IgG les "plus spécifiques" ne reconnaîtraient que le FMRF-amide alors que les IgG les "moins spécifiques" reconnaîtraient à la fois le FMRF-amide et le FTRF-amide. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en immunocytochimie lors des tests de saturation de l'anticorps (voir chap. Résultats I-2.) et peuvent être rapprochés de l'étude réalisée par Greenberg *et al* (1988). Ces auteurs ont montré par dosage radioimmunologique (RIA) qu'un même anticorps anti-FMRF-amide ne reconnaît pas de la même façon les tétrapeptides FMRF-amide, FLRF-amide et FGRF-amide. La capacité des peptides FLRF-amide et FGRF-amide à fixer l'anticorps est respectivement de 1/4 et de 2/3 de celle du FMRF-amide. La substitution de la méthionine par un autre acide aminé rend donc le peptide moins immunoréactif. Ainsi le peptide FTRF-amide est par rapport au FMRF-amide moins immunoréactif avec l'anticorps 646 anti-FMRF-amide. Un dosage RIA serait néanmoins nécessaire pour confirmer l'affinité différente de l'anticorps pour ces deux peptides.

* En ce qui concerne la quantité de peptides existant chez l'animal, n'ayant pu disposer d'une technique de dosage, il nous est difficile d'apprécier la concentration relative du FTRF-amide par rapport à celle du FMRF-amide. Toutefois, par microséquençage, le taux de FMRF-amide est estimé à 750 fmol par ver. Celui-ci est proche de celui avancé chez *Nereis virens* 100 à 600 fmol par ver (Krajniak et Price, 1990). De plus, le microséquençage effectué sur le pic I en sortie de RP-HPLC 1 nous a permis d'estimer à 120 fmol la quantité de matériel immunoréactif présent (celui-ci

renferme à la fois le FTRF-amide et le FM(O)RF-amide). Par ailleurs, le test d'immunodétection réalisé à l'issue de l'étape finale de purification (RP-HPLC 2 du pic I) montre que l'immunoréaction obtenue pour le peptide biologique FTRF-amide est beaucoup moins intense que celle du FM(O)RF-amide. Le taux de FTRF-amide ne représenterait donc qu'un faible pourcentage sur les 120 fmol de matériel détecté dans le pic I. Par conséquent, la concentration de FTRF-amide serait bien inférieure à celle du FMRF-amide.

En conclusion, dans nos échantillons biologiques, le FTRF-amide isolé du FM(O)RF-amide étant difficilement détectable par la technique d'immunodétection utilisée, son comportement chromatographique similaire à celui du FM(O)RF-amide en RP-HPLC 1 a été l'un des facteurs important ayant permis de l'isoler par la suite. Son existence a en outre été décelée grâce au microséquençage réalisé sur le pic I partiellement purifié; ce qui nous a conduit à le rechercher spécifiquement au cours de l'étape suivante. Sa caractérisation chimique totale, ainsi que celle du FM(O)RF-amide, ont nécessité une étude approfondie en spectrométrie de masse (FAB-MS et FAB-MS/MS) au cours de laquelle l'emploi des peptides de synthèse a rendu plus aisée l'interprétation des spectres de fragmentation.

DISCUSSION GENERALE

et

CONCLUSION

L'étude immunocytochimique menée sur les trois annélides polychètes: *Nereis diversicolor*, *Nereis virens*, *Perinereis cultrifera* révèle l'abondance du matériel immunoréactif pour le FMRF-amide et la large distribution des structures nerveuses immunoréactives dans l'ensemble de leur SN. De nombreux types neuronaux ont été marqués. Une telle diversité de réactions rappelle les résultats obtenus chez le mollusque *Lymnaea stagnalis*, montrant qu'au moins 12 types de neurones réagissent; parmi ceux-ci, 7 renfermeraient effectivement des peptides réellement apparentés au FMRF-amide (Boer *et al.*, 1986).

Par la technique que nous avons utilisée, aucune variation d'intensité de réaction n'a été observée en fonction de l'âge et du sexe; un dosage radioimmunologique serait nécessaire pour confirmer l'absence effective d'une variation de la quantité de matériel immunoréactif chez les néréis. Par ailleurs, il ne nous est pas possible de distinguer quels sont les types neuronaux renfermant l'un ou l'autre des peptides que nous avons identifiés par voie biochimique (FTRF-NH_2, FMRF-NH_2). Cependant, lors des tests de saturation, nous avons pu constater qu'un groupe de neurones situés dans la région caudale et quelques cellules dispersées dans divers noyaux ganglionnaires du cerveau restent immunoréactifs après saturation de l'anticorps par le FTRF-NH_2. Cette persistance d'immunoréactivité, résultant d'une non-saturation des IgG les plus spécifiques du FMRF-amide, pourrait être révélatrice de la présence dans ces neurones marqués du FMRF-amide lui-même. Faire la distinction entre les neurones contenant l'une ou l'autre de ces molécules (FTRF-NH_2 et FMRF-NH_2) nécessiterait de disposer d'un anticorps très spécifique pour chacune d'elles. Il est néanmoins tout à fait possible que ces peptides soient localisés au sein des mêmes cellules.En effet, le FTRF-amide et le FMRF-amide pourraient être spécifiés par le même gène (voir ci-dessous). Issus du même précurseur, ces peptides seraient alors exprimés par les mêmes cellules.

Dans le cerveau, parmi les neurones marqués avec l'anticorps anti-FMRF-amide, certains sont également immunoréactifs pour la CCK/gastrine ou pour la Leu-enképhaline. La colocalisation du FMRF-amide avec d'autres peptides n'est pas rare, elle a été observée chez de nombreux autres invertébrés. Les exemples étant nombreux, nous n'en citerons que quelques-uns. Chez le moustique *Aedes aegypti* , quelques neurones sont immunoréactifs à la fois pour le FMRF-amide et l'AKH ("adipokinetic hormone") alors que d'autres le sont pour le FMRF-amide et le polypeptide pancréatique de boeuf (BPP) (Brown et Lea, 1988). Ce dernier type de colocalisation a également été observé dans des cellules nerveuses de *Schistocerca gregaria* (Myers et Evans, 1985a, b), de *Locusta migratoria* et de *Leptinotarsa decemlineata* (Veenstra et Schooneveld, 1984). Chez *Locusta migratoria*, un autre type de colocalisation: FMRF-amide/neuropeptide Y (NPY) a été observé dans certaines cellules neurosécrétrices (Rémy *et al.*, 1988). Chez

Limax maximus, Marchand *et al.* (1984) montrent l'existence d'une colocalisation FMRF-amide/somatostatine dans des cellules et fibres nerveuses du cerveau.Chez *Lymnaea stagnalis*, quelques cellules du SNC immunoréactives pour le FMRF-amide le sont également pour la vasotocine et la gastrine (Boer et Schot, 1983). Chez *Manduca sexta,* les cellules OL2 des lobes optiques immunoréactives pour la sérotonine le sont aussi pour le FMRF-amide et les SCPs (Homberg et Hildebrand, 1989). La coexistence FMRF-amide/SCPs a de plus été observée dans des neurones du ganglion buccal d'*Aplysia californica* (Lloyd *et al* , 1987a).Chez cette espèce, le neurone R2 innervant les glandes à mucus de la paroi du corps contient à la fois de l'acétylcholine (Ach) et du FMRF-amide (Schaefer *et al* , 1985).

Suivant les espèces, le FMRF-amide semble donc être colocalisé avec un neuropeptide d'invertébrés (AKH ou SCPs), une molécule apparentée à un neuropeptide de vertébrés (BPP, NPY, gastrine) ou un neurotransmetteur classique (sérotonine, Ach). La coexistence de multiples messagers chimiques dans des neurones d'invertébrés et de mammifères a souvent été rapportée (revue *in* Hökfelt *et al* , 1980).

- Ces coexistences peuvent refléter la présence de deux substances distinctes au sein d'une même cellule, en particulier lorsqu'il s'agit de la colocalisation d'un peptide avec un neurotransmetteur classique. Une telle coexistence a été observée dans des neurones de vertébrés (Chan-Palay et Palay, 1984; Hökfelt *et al* , 1986), ainsi que dans des neurones de mollusques (Cropper *et al*, 1987; Lloyd *et al*, 1988), de crustacés (Siwicki *et al*, 1987) et d'insectes (Worden *et al*, 1985; Takeda *et al*, 1986).La signification fonctionnelle d'un tel arrangement est encore mal connue. Cependant, les travaux de Jan et Jan (1983) chez la grenouille et de Lundberg *et al* (1980) chez les mammifères montrent que des peptides coexistant avec l'Ach agissent en modulant son action. Schaefer et al (1985) suggèrent par conséquent que, chez l'aplysie, le FMRF-amide fonctionnerait de façon similaire en modulant l'action de l'Ach sur les glandes à mucus de la paroi du corps. Ces auteurs émettent aussi l'hypothèse que le FMRF-amide (peptide amidé donc vraisemblablement dégradé plus lentement qu'un transmetteur classique) pourrait agir comme neurotransmetteur avec un effet post-synaptique de plus longue durée que celui de l'Ach qui est rapidement dégradée par l'acétylcholine estérase (AchE).

Chez *Nereis diversicolor*, des sites à activité AchE ont été mis en évidence dans le SNC (au niveau d'espaces interaxonaux dans le neuropile et autour de cellules neurosécrétrices), dans le SNP (au niveau de jonctions neuromusculaires à la base de l'épiderme) ainsi que dans la région infracérébrale (RIC), à la base des cellules infracérébrales (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1979a,b). Nous ne pouvons affirmer que des immunoréactions pour le FMRF-amide observées dans le neuropile comme dans la RIC

coïncident avec des sites à activité AchE. La démonstration d'une coexistence Ach/FMRF-amide, chez *Nereis diversicolor*, pourrait être un élément en faveur d'un rôle modulateur ou transmetteur du FMRF-amide comme cela a été proposé chez l'aplysie.

- L'observation de divers types d'immunoréactions dans une même cellule peut ne pas être significative d'une colocalisation de plusieurs molécules mais résulter de l'existence d'un seul peptide qui présenterait soit un épitope en commun avec les substances contre lesquelles sont dirigés les anticorps testés ou deux épitopes différents, chacun reconnu spécifiquement par l'un ou l'autre des anticorps (Veenstra 1984, 1988; Homberg et Hildebrand, 1989).

Des résultats obtenus chez *Leptinotarsa decemlineata* (Veenstra et Schooneveld, 1984; Veenstra *et al.*, 1985) illustrent bien cette proposition. Chez cet insecte, quatre neurones réagissent avec les anticorps anti-FMRF-amide, anti-polypeptide pancréatique de bœuf et anti-gastrine. L'interprétation possible serait une colocalisation de ces trois peptides au sein de ces quatre neurones. Pourtant il est plus probable que ces réactions ne résultent pas de la présence de deux molécules apparentées à des peptides de vertébrés mais soient dues à l'existence dans ces cellules d'un seul peptide d'invertébrés réagissant avec ces trois anticorps.

L'anticorps anti-FMRF-amide que nous avons utilisé reconnaît plus spécifiquement la terminaison Arg-Phe-NH_2 du peptide. Or de nombreuses molécules telles que les LSK I et II, les PSK I et II, les LMS I et II, la γ_1-MSH (voir tableaux II,III et figure 2) se terminent par la même séquence Arg-Phe-NH_2 et réagissent avec l'anticorps anti-FMRF-amide (revue *in* Greenberg *et al.*, 1988). Par contre, en ce qui concerne les peptides précédemment cités (NPY, BPP et CCK/gastrine), la communauté structurale avec le FMRF-amide est beaucoup plus restreinte (voir tableau III et figure 2). Les dosages radioimmunologiques ont d'ailleurs montré que, pour ces trois peptides, la réaction croisée avec l'anticorps anti-FMRF-amide est très faible (Greenberg *et al.*, 1988). Ainsi, parmi les neurones marqués pour le FMRF-amide chez *Nereis diversicolor*, la majorité des immunoréactions résulterait de réactions spécifiques et serait le reflet de la présence du FMRF-amide dans les cellules réactives. Toutefois, il est également possible que les cellules immunoréactives avec d'autres anticorps ne contiennent pas le FMRF-amide lui-même, mais plutôt une autre molécule présentant un épitope reconnu par l'anticorps. Cette hypothèse serait notamment à vérifier dans le cas de la colocalisation FMRF-amide/CCK/gastrine que nous avons démontrée. En effet, les sulfakinines d'insectes (LSKs, PSKs, DSKs), outre l'homologie structurale qu'elles possèdent avec la CCK/gastrine, ont une forte parenté avec le FMRF-amide par leur séquence C-terminale Met-Arg-Phe-NH_2 (voir fig. 2). Ainsi, chez *Nereis diversicolor*, le matériel apparenté à la CCK/gastrine actuellement en cours de purification (Smiri, 1990) pourrait,

lorsque la structure des produits purifiés sera connue, se révéler être plus apparenté aux sulfakinines d'insectes qu'à la CCK/gastrine de vertébrés. Chez *Nereis diversicolor*, la colocalisation FMRF-amide/CCK/gastrine observée dans certaines cellules du SNC résulterait alors de la présence dans ces cellules d'une molécule (que nous supposons apparentée aux sulfakinines) réagissant à la fois avec l'anticorps anti-CCK/gastrine et avec l'anticorps anti-FMRF-amide. Ces anticorps pourraient reconnaître soit le même déterminant antigénique soit deux déterminants antigéniques bien distincts.

Chez les invertébrés, le FMRF-amide et les peptides qui lui sont apparentés sont généralement impliqués dans des fonctions physiologiques essentielles en tant que NT ou NM. Ils agissent sur des tissus variés tels que les muscles (cardiaque et non cardiaques), les nerfs et les glandes (Greenberg *et al.*, 1983; Lehman et Price, 1987; Kobayashi, 1987; Raffa, 1988; Cottrell, 1989; Cottrell et Bewick, 1989) (voir chap. Généralités).

Par ailleurs, ces peptides, notamment chez les mollusques et les insectes, pourraient aussi agir en tant que neurohormones (Price *et al.*, 1985; Cuthbert et Evans, 1989).

Chez *Nereis diversicolor*, les immunoréactions pour le FMRF-amide dans le SNC comme dans le SNP, et notamment au niveau des fibres nerveuses situées dans le neuropile et à proximité de l'aire neurohémale ainsi que dans le réseau nerveux localisé à la base de l'intestin, peuvent être indicatrices de la fonction des peptides immunoréactifs (FTRF-NH_2 et FMRF-NH_2). Au niveau de l'intestin, le FMRF-amide pourrait, comme cela a été démontré chez les mollusques (Schot et Boer, 1982; Austin *et al.*, 1982), agir en tant que NT ou NM sur les contractions de ce tractus digestif.

Les immunoréactions observées dans le SNC au niveau de fibres nerveuses, et en particulier au niveau de structures pouvant refléter des contacts interneuronaux, laissent supposer une intervention de ces peptides dans la neurotransmission.

Ces peptides pourraient par ailleurs fonctionner comme une neurohormone.Les immunoréactions observées au niveau de l'aire neurohémale suggèrent une possible libération de ces peptides dans le sang ou le milieu intérieur (hémolymphe). Notons que, chez les insectes, Boer *et al.* (1980) ont montré l'existence d'immunoréactions pour le FMRF-amide au niveau de l'organe neurohémal (corps cardiaques). Chez *Nereis diversicolor* l'aire neurohémale constitue un complexe neuroglandulovasculaire mettant en contact le cerveau et le milieu intérieur. Parmi les cellules infracérébrales présentes à ce niveau, les cellules C 2 ont une activité sécrétrice (Dhainaut-Courtois, 1970). De ce fait, le FMRF-amide libéré au niveau de cette structure pourrait agir en modulant l'activité des cellules de cette glande.

Chez plusieurs espèces de mollusques, le FMRF-amide joue un rôle dans la régulation de l'activité de certaines glandes endocrines telles que les corps dorsaux d'*Helix* (Marchand *et al.*, 1989; Griffond et Mounzih, 1989), les cellules caudo-dorsales de *Lymnaea* (Brussaard *et al.*, 1988, 1989) et la glande optique de *Sepia* (Le Gall *et al.*, 1988).

Chez *Helix aspersa*, le FMRF-amide présente un effet inhibiteur sur l'activité des corps dorsaux (DB) et plus précisément sur la synthèse de la DBH (hormone gonadotrope des corps dorsaux). Il intervient donc dans le contrôle des processus liés à la reproduction (Marchand *et al.*, 1989; Griffond et Mounzih, 1989).

Chez *Lymnaea stagnalis*, le FMRF-amide, par sa double action sur les cellules neurosécrétrices caudo-dorsales, est impliqué dans le contrôle de la libération de l'hormone de ponte (CDCH) et joue donc également un rôle sur la fonction de reproduction (Brussaard *et al.*, 1988, 1989).

Enfin, chez *Sepia officinalis*, le FMRF-amide ou des substances qui lui sont apparentées auraient un effet inhibiteur s'exerçant synaptiquement sur l'activité sécrétrice de la glande optique, origine également d'une hormone gonadotrope (Le Gall *et al.*, 1988).

Ces trois exemples montrent que le FMRF-amide intervient, directement ou indirectement, sur des centres produisant une hormone gonadotrope.

Chez *Nereis diversicolor*, l'hormone sexuelle a une activité inhibitrice sur la gamétogenèse. Le centre producteur de cette hormone, bien que localisé dans le prostomium, n'est pas connu précisément; il ne nous est donc pas possible, par la localisation des immunoréactions observées, de postuler pour un rôle éventuel du FMRF-amide dans la régulation de la sécrétion de cette hormone. L'étude d'une telle action serait par contre envisageable *in vivo* par injection du peptide, ou *in vitro* à l'aide de cultures organotypiques de prostomiums dans un milieu contenant le peptide. Si le FMRF-amide intervient dans le contrôle de la sécrétion de l'hormone inhibitrice de la spermatogenèse l'effet pourrait alors être observé au niveau de la maturation des produits génitaux.

Chez le moustique *Aedes aegypti*, Brown et Lea (1988) proposent,suite à l'observation d'immunoréactions pour le FMRF-amide dans des cellules nerveuses du cerveau, des divers ganglions de la chaîne nerveuse et dans des cellules endocrines de l'intestin, l'existence d'un axe neuroendocrine cerveau-intestin faisant intervenir le FMRF-amide. Chez *Nereis diversicolor*, nous avons également observé de telles immunoréactions. Ainsi, l'existence d'un axe neuroendocrine cerveau-intestin mettant en jeu le FMRF-amide est envisageable.

En plus de l'étude immunocytochimique et morphofonctionnelle, l'abondance du matériel immunoréactif spécifique nous a permis d'isoler et de caractériser chimiquement chez *Nereis diversicolor* les molécules FMRF-NH_2, FM(O)RF-NH_2 et FTRF-NH_2 responsables des immunoréactions observées.

Jusqu'à présent, chez les annélides, l'existence d'immunoréactions pour le FMRF-amide a été rapportée chez plusieurs espèces telles que l'hirudinée *Hirudo medicinalis* (Norris et Calabrese, 1987) et l'oligochète *Eisenia foetida* (Fujii *et al,* 1989). Toutefois, le matériel immunoréactif n'a été purifié récemment que chez l'annélide polychète, *Nereis virens* (Krajniak et Price, 1990), il est caractérisé comme étant le FMRF-amide lui-même. Lors de la purification la forme oxydée FM(O)RF-amide était également présente. L'existence d'un dérivé oxydé du FMRF-amide pose le problème de déterminer si cette forme résulte d'un processus biologique, ou si elle est apparue suite aux conditions opératoires utilisées au cours de l'isolement. Il se peut que ces deux propositions soient exactes.

En effet, Price (1986) rapporte que l'oxydation de la méthionine pourrait constituer un mécanisme d'inactivation de la neurotransmission faisant intervenir le FMRF-amide. Brussaard *et al.* (1989) ont observé que l'oxydation du FMRF-amide entraîne une chute considérable de l'activité de ce peptide et que sa capacité à induire une réponse des CDCs chez la limnée est très affaiblie. Ainsi, les récepteurs impliqués pour l'obtention des deux actions du FMRF-amide sont relativement insensibles au FMRF-amide présentant une méthionine sulfoxyde. Ce résultat est en accord avec la notion précédemment énoncée (voir chap. Généralités I-4) selon laquelle le résidu en position 2 doit être non polaire.

Notre étude expérimentale révèle par ailleurs que ce peptide est très sensible à l'oxydation. Une deuxième analyse en RP-HPLC 1 du peptide biologique FMRF-amide purifié montre la réapparition de la forme oxydée. Celle-ci résulterait d'une oxydation due aux conditions de conservation de l'échantillon en solution. Il est de plus connu que les peptides renfermant un résidu méthionine s'oxydent facilement et qu'ils doivent être conservés dans un milieu dépourvu d'oxygène. Or, nos échantillons ont été conservés congelés en solution dans l'eau, et étaient en contact avec l'air ambiant au cours des expérimentations. Ainsi, il est fort probable qu'une quantité non négligeable de FM(O)RF-NH_2 résulte de l'oxydation du FMRF-NH_2 au cours de son isolement.

Chez *Nereis diversicolor*, bien qu'espèce très proche de *Nereis virens*, nous avons isolé, en plus du FMRF-amide, un tétrapeptide analogue - le FTRF-amide - qui n'a encore jamais été identifié chez aucune autre espèce animale.

Les tests d'immunodétection et de saturation de l'anticorps réalisés avec les peptides de synthèse FTRF-amide et FMRF-amide ont montré la faible immunoréactivité du FTRF-amide par rapport à celle du FMRF-amide. Nous avons de plus constaté que le FTRF-amide est présent à un taux bien inférieur à celui du FMRF-amide, ce qui le rend difficilement détectable.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus chez les mollusques. En effet, dans ce phylum, un autre tétrapeptide analogue, le FLRF-amide, est généralement présent parallèlement au FMRF-amide mais toujours en très faible quantité (de l'ordre de 10% de celle du FMRF-amide).

Chez certaines espèces, telles que l'aplysie et la limnée, le FLRF-amide du fait de son faible taux n'a jamais été purifié. Cependant, son existence a pu être démontrée par l'isolement et le séquençage du gène codant pour le précurseur du FMRF-amide. Celui-ci renferme, outre de multiples copies de FMRF-amide (28 chez l'aplysie et 9 chez la limnée), une seule copie de FLRF-amide chez l'aplysie et deux copies chez la limnée (Taussig *et al.*, 1988; Linacre *et al.*, 1990). Le rapport de quantité FLRF-amide/FMRF-amide, détecté dans les extraits tissulaires, est donc le reflet du nombre de copies de chacun des peptides au sein du précurseur. Un tel précurseur a conduit à l'hypothèse que chez les mollusques le gène du FMRF-amide résulterait d'une réplication multiple intragénique de la séquence nucléotidique spécifiant la structure primaire du peptide (Price *et al.*, 1987). Par ailleurs, au vu des codons spécifiant les acides aminés méthionine et leucine, il apparaît que celui de la leucine ne diffère de celui de la méthionine que par une seule base. On peut donc supposer qu'au cours de la réplication du gène ancestral, une mutation ponctuelle portant sur la première base du codon de la méthionine (ATG) engendrant ainsi le codon de la leucine (TTG) serait à l'origine de l'existence du FLRF-amide et aurait été conservée au cours du temps.

Chez *Nereis diversicolor*, sachant que le codon de la thréonine (ACG) ne diffère de celui de la méthionine (ATG) que par la deuxième base, il n'est pas impossible d'imaginer que le FTRF-amide résulterait, comme le FLRF-amide de mollusques, d'une mutation ponctuelle et qu'il serait alors issu du même précurseur que le FMRF-amide. La proportion relative de chacun de ces peptides dans les extraits tissulaires serait alors le reflet du nombre de copies présentes pour chacun d'eux dans le précurseur.

L'isolement et le séquençage du précurseur du FMRF-amide chez *Nereis diversicolor* restent nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Ceci pourrait être réalisé au laboratoire en utilisant des sondes oligonucléotidiques artificielles confrontées à une banque d'ADNc ou à une génothèque construites par ailleurs. Connaître ce précurseur permettrait en outre de déterminer s'il renferme d'autres peptides apparentés au FMRF-amide qui n'auraient pas été détectés au cours de notre étude. Après RP-HPLC 1, certains

peptides apparentés au FMRF-amide pourraient, en effet, être présents dans des fractions différentes de celles des pics I et II immunoréactifs. Le très faible taux de ces éventuels peptides expliquerait qu'ils n'aient pu être repérés par le test d'immunodétection utilisé. C'est peut-être le cas pour le FLRF-amide pour lequel, bien que nous ne l'ayons pas détecté, il ne nous est actuellement pas possible d'affirmer qu'il n'est pas présent.

Nos résultats n'interdisent pas de supposer que parmi les espèces chez lesquelles le FMRF-amide ou des FaRPs ont été isolés, certaines puissent présenter, en plus, des variants géniques mineurs n'ayant pu être identifiés de façon classique. Signalons à ce sujet que chez la limnée, la détermination de la séquence du précurseur du FMRF-amide a conduit à la caractérisation de deux nouveaux peptides: EFLRI-amide et pQFYRI-amide (Linacre *et al.*, 1990). De même, chez la drosophile, l'isolement d'un gène codant pour un précurseur polyprotéique, a permis de montrer que treize peptides de structure C-terminale Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 ou possédant une structure similaire sont présents au sein du même précurseur (Schneider et Taghert, 1988).

L'étude du précurseur du FMRF-amide chez l'aplysie, la limnée et du précurseur polyprotéique de la drosophile montre qu'ils renferment, en plus, des produits de clivage présentant une homologie avec le CRF de mammifères. Chez l'aplysie, ce précurseur contient en outre des séquences homologues à l'α-MSH et au CLIP susceptibles d'être libérées (Taussig *et al.*, 1988). Ainsi, connaître le précurseur d'un neuropeptide peut éventuellement conduire à l'identification d'autres neuropeptides. Chez *Nereis diversicolor*, le précurseur du FMRF-amide pourrait par conséquent se révéler être capable de donner naissance à de nouveaux peptides encore inconnus.

Chez *Lymnaea stagnalis* l'absence dans le précurseur du FMRF-amide des heptapeptides SDPFLRF-amide et GDPFLRF-amide renforce l'hypothèse de Price (1986) selon laquelle après une duplication du gène ancestral du FMRF-amide un gène deviendrait spécialisé pour la production de transmetteurs (FMRF-amide) et un autre pour la production de peptides apparentés au FMRF-amide présentant une extension N-terminale et qui auraient un rôle hormonal (Linacre *et al*, 1990).

Ce fait implique que des peptides apparentés au FMRF-amide, mais non encore détectés car issus d'un gène moins hautement répliqué, pourraient exister chez d'autres espèces de pulmonés ou d'autres invertébrés.

Chez les mollusques, la persistance de la mutation ponctuelle résulterait d'une pression sélective ayant conservé un polypeptide possédant une fonction biologique spécifique. Nous ne pouvons cependant pas exclure que cette simple substitution (méthionine-leucine), bien que conservée, n'ait aucune conséquence physiologique et ait engendré deux peptides ayant la même fonction. A ce propos, signalons que Greenberg *et al.* (1988) ont montré que les peptides FMRF-amide et FLRF-amide possèdent chez la

Tableau VIII - Peptides apparentés au FMRF-amide présentant la séquence C-terminale Phe-X-Arg-Phe-NH_2.

Groupe	Séquence peptidique	Référence
Mollusques		
Pour tous	Phe-Met-Arg-Phe-NH_2	1
	Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	
Pulmonés	pGlu-Asp-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	
	Ser-Asp-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	
	Gly-Asp-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	
	Asn-Asp-Pro-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	
Arthropodes		
Homarus americanus	Ser-Asp-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	2
	Thr-Asn-Arg-Asn-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	2
Leucophaea maderae	pGlu-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	3
Schistocerca gregaria	Pro-Asp-Val-Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	4
Drosophila melanogaster	Asp-Pro-Lys-Gln-Asp-Phe-Leu-Arg-Phe-NH_2	5
Nématodes		
Ascaris suum	Lys-Asn-Glu-Phe- Ile -Arg-Phe-NH_2	6
Annélides		
Nereis virens	Phe-Met-Arg-Phe-NH_2	7
Nereis diversicolor	Phe-Met-Arg-Phe-NH_2	
	Phe-Thr-Arg-Phe-NH_2	

Le code à 3 lettres utilisé pour les acides aminés est donné en annexe 2.

1 Price *et al*, 1987
2 Trimmer *et al*, 1987
3 Holman *et al*, 1986
4 Robb *et al*, 1989
5 Nambu *et al*, 1988
6 Cowden *et al*, 1989
7 Krajniak et Price, 1990

palourde *Mercenaria mercenaria* la même activité biologique sur le cœur et le muscle protracteur de la radula (RPM). En revanche, sur le cœur d'*Helix*, l'activité du FLRF-amide est légèrement plus faible que celle du FMRF-amide. Par ailleurs, les peptides de synthèse, FnLRF-amide et FGRF-amide, ont également été testés. Le FnLRF-amide a une activité comparable à celle du FLRF-amide, alors que le FGRF-amide est pratiquement inactif sur ces tissus. Ainsi, ces études révèlent qu'au niveau du FMRF-amide la substitution de la méthionine par un autre acide aminé peut entraîner une chute considérable de l'activité biologique du peptide sur certains muscles. L'hypothèse selon laquelle le FLRF-amide aurait chez les mollusques une autre fonction biologique encore inconnue n'est toutefois pas à exclure et a d'ailleurs été proposée par Linacre *et al.* (1990). La substitution de la leucine à la place de la méthionine confèrerait alors au peptide une plus grande stabilité due au fait que la leucine est moins sensible à l'oxydation que la méthionine. Cette stabilité accrue pourrait être fondamentale dans le cadre d'une activité hormonale possible pour le FLRF-amide (Price, 1986).

Chez *Nereis diversicolor*, le FTRF-amide apparemment caractéristique de cette espèce pourrait manifester une activité bien spécifique. Toutefois, en considérant les deux propositions suivantes: l'éventuelle absence du FLRF-amide chez *Nereis diversicolor* et l'éventuelle fonction spécifique de ce peptide chez les mollusques, nous pouvons avancer deux hypothèses. La première consiste à attribuer au FTRF-amide chez la néréis une fonction analogue à celle du FLRF-amide chez les mollusques. La deuxième est d'admettre que le FTRF-amide et le FLRF-amide coexistent chez la néréis et que ces deux peptides se distinguent par leur rôle. Seule une étude physiologique approfondie nous permettrait de choisir entre ces hypothèses.

En plus d'être un analogue du FMRF-amide, le peptide FTRF-NH_2 que nous avons isolé chez *Nereis diversicolor* possède par sa structure C-terminale T-R-F-NH_2, une homologie avec deux nouveaux neuropeptides récemment isolés chez le moustique *Aedes aegypti* (Matsumoto *et al.*, 1989): Aea HP I (pGlu-Arg-Pro-Hyp-Ser-Leu-Lys-Thr-Arg-Phe-NH_2) et Aea HP II (Thr-Arg-Phe-NH_2). Ces peptides Aea HP I et Aea HP II, à l'exception de leur séquence carboxy-terminale Arg-Phe-NH_2 impliquée dans la reconnaissance par l'anticorps anti-FMRF-amide utilisé en RIA pour les détecter, ne présentent aucune autre parenté structurale avec les FaRPs identifiés chez d'autres espèces et en particulier chez les mollusques et les arthropodes (tableaux I, II, VIII). Notons par ailleurs que le tripeptide Aea HP II correspond à la partie C-terminale du décapeptide Aea HP I. Aea HP II pourrait donc être un produit de dégradation de Aea HP I ou être libéré du précurseur de Aea HP I. L'activité biologique de ces peptides n'étant pas encore connue, il est difficile d'affirmer, sur la seule base d'une parenté

structurale relativement restreinte, l'existence d'une réelle analogie avec les FaRPs. Parmi les peptides apparentés au FMRF-amide isolés chez les mollusques, les arthropodes et les vers (nématodes, annélides) et possédant le tétrapeptide C-terminal Phe-X-Arg-Phe-NH_2, nous pouvons remarquer que seuls des résidus de Met, Leu ou Ile ont été identifiés en position X (tableau VIII). C'est par conséquent la première fois qu'une thréonine est caractérisée à cette place dans une telle structure. Phylogénétiquement, les arthropodes, les annélides et les mollusques ont de nombreuses caractéristiques suggérant qu'ils ont évolué à partir d'une lignée commune. Les résultats, concernant l'étude du FMRF-amide, obtenus dans chacun de ces trois phyla et en particulier l'isolement tant chez les mollusques (limnée et aplysie) que chez un insecte (drosophile) de précurseurs renfermant de multiples copies d'un même peptide, sont en accord avec cette hypothèse.

En conclusion, nos examens immunocytochimiques ont permis de localiser avec précision dans l'ensemble du SN de la néréis le matériel immunoréactif avec l'anticorps anti-FMRF-amide.

Notre étude biochimique nous a amenés à caractériser chez *Nereis diversicolor* le FMRF-amide détecté récemment chez une autre annélide polychète: *Nereis virens*. Elle a aussi révélé la présence chez *Nereis diversicolor* d'un autre tétrapeptide, le FTRF-amide, qui jusqu'à présent n'avait pas été signalé dans la littérature.

D'autres champs d'investigation s'ouvrent maintenant à nous.

Il conviendrait en effet de définir le rôle exact des deux tétrapeptides caractérisés. Déjà, l'étude morphofonctionnelle menée en microscopie photonique nous a permis de définir les sites d'action potentiels du matériel immunoréactif avec l'anticorps anti-FMRF-amide. D'ores et déjà, des expérimentations utilisant l'anticorps anti-FMRF-amide ou les molécules de synthèse peuvent être effectuées *in vivo* et surtout *in vitro* pour détecter une éventuelle action sur le système neuroendocrinien. D'un autre côté, si l'approche physiologique, voire électrophysiologique, reste à l'heure actuelle très délicate chez la néréis, celle-ci pourrait être envisagée chez la limnée pour démontrer les rôles respectifs du FMRF-amide et du FTRF-amide au niveau de la musculature et du muscle cardiaque en particulier.

Par ailleurs, l'approche moléculaire serait du plus grand intérêt. L'identification du gène et du précurseur des peptides détectés chez *Nereis* nous permettrait en effet de mieux cerner la signification du FMRF-amide et du FTRF-amide, de détecter éventuellement la présence en faible quantité d'autres peptides, par exemple le FLRF-amide, et de parfaire ainsi la comparaison phylogénique avec les molécules trouvées chez d'autres invertébrés, les insectes et les mollusques en particulier.

BIBLIOGRAPHIE

Anctil M, Grimmelikhuijzen CJP (1989) Excitatory action of the native neuropeptide Antho-RFamide on muscles in the pennatulid *Renilla köllikeri*. Gen Pharmacol 20: 381-384.

Austin T, Weiss S, Lukowiak K (1982) FMRFamide effects on spontaneous and induced contractions of the anterior gizzard in *Aplysia*. J Physiol Pharmacol 61: 949-953.

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. DEA Lille.

Baratte B, Dhainaut-Courtois N (1989) Présence chez les Annélides Polychètes *Nereidae* de molécules immunologiquement apparentées à l'hormone de ponte (CDCH) du mollusque gastéropode, *Lymnaea stagnalis* et au FMRF-amide. XIXème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Rouen, résumé n°9.

Basch PF, Gupta BC (1988) Immunocytochemical localization of regulatory peptides in six species of trematode parasites. Comp Biochem Physiol 91C: 565-570.

Boarder MR, Contractor H, Marriott D, McArdle W (1985) Metorphamide, a C-terminally amidated opioid peptide, in human adrenal and human phaeochromocytoma. Regul Pept 12: 35-42.

Bodenmüller H, Schaller HC (1981) Conserved amino acid sequence of a neuropeptide, the head activator, from coelenterates to humans. Nature 293: 579-580.

Boer HH, Geraerts WPM, Schot LPC, Ebberink RHM (1986) Immunocytochemical and physiological studies on (neuroendocrine) neurons of the pond snail *Lymnaea stagnalis*, with particular reference to coexistence of biological active peptides (BAP) and biogenic amines, to cardioactive peptides and to corelease of BAP from the ovulation hormone-producing caudodorsal cells. *In*: Handbook of Comparative Aspects of Opioid and Related Neuropeptide Mechanism, vol. 1, Stefano GB Ed, Boca Raton: CRC Press, pp. 223-241.

Boer HH, Schot LPC (1983) Phylogenetic aspects of peptidergic systems. *In*: Molluscan neuro-endocrinology, Lever J, Boer HH Eds, Monogr R Neth Acad Arts Sci North-Holland, Amsterdam, pp. 9-14.

Boer HH, Schot LPC, Reichelt D, Brand H, ter Maat A (1984) Ultrastructural immunocytochemical evidence for peptidergic neurotransmission in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Cell Tissue Res 238: 197-201.

Boer HH, Schot LPC, Veenstra JA, Reichelt D (1980) Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRFamide. Cell Tissue Res 213: 21-27.

Boilly-Marer Y (1983) Culture de segments et induction de morphogenèses surnuméraires en présence d'insuline chez *Nereis pelagica* L. (Néréidien à épitoquie, Annélide Polychète). C R Acad Sci Paris 297D: 213-218.

Bonn U, König B (1988) FMRFamide-like immunoreactivity in brain and pituitary of *Xenotaca eiseni* (Cyprinodontiformes, Teleostei). J. Hirnforsch 29: 121-131.

Bonn U, König B (1989) FMRFamide immunoreactivity in the brain and pituitary of *Carassius auratus* (Cyprinidae, Teleostei). J Hirnforsch 30: 361-370.

Brown MR, Lea AO (1988) FMRFamide- and Adipokinetic hormone-like immunoreactivity in the nervous system of the mosquito, *Aedes aegypti*. J Comp Neurol 270: 606-614.

Brussaard AB, Kits KS, ter Maat A (1989) One receptor type mediates two independant effects of FMRFa on neurosecretory cells of *Lymnaea*. Peptides 10: 289-297.

Brussaard AB, Kits KS, ter Maat A, van Minnen J, Moed PJ (1988) Dual inhibitory action of FMRFamide on neurosecretory cells controlling egg laying behavior in the pond snail. Brain Res 447: 35-51.

Bulet P, Porchet M (1986) A new purification procedure for the neuropeptide controlling gametogenesis in Nereids (Annelida Polychaeta). *In*: Advances in invertebrate reproduction, M Porchet, JC Andriès, A Dhainaut Eds, Elsevier, Amsterdam, pp 498.

Butler TA, Fingerman M (1985) Effects of dopamine and neuropeptides on the isolated eyestalk of the fiddler crab. Am Zool 25: 102A.

Calabrese RL (1989) Modulation of muscle and neuromuscular junctions in invertebrates. Neurosci 1: 25-34.

Calabrese RL, Maranto AR (1984) Neural control of the hearts in the leech, *Hirudo medicinalis*. III.Regulation of myogenicity by heart accessory neurons J. Comp Physiol (A) 154: 393-406.

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, Porchet M (1981) Purification par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) de l'hormone cérébrale de *Nereis diversicolor* et de *Perinereis cultrifera*. Reprod Nutr Develop 21: 383-390.

Cariello L, Zanetti L, Spagnuolo A, Nelson L (1986) Effects of opioids and antagonists on the rate of sea urchin sperm progressive motility. Biol Bull 171: 208-216.

Carroll LS, Carrow GM, Calabrese RL (1986) Localization and release of FMRFamide-like immunoreactivity in the cerebral neuroendocrine system of *Manduca sexta*. J Exp Biol 126: 1-14.

Chai SH, Tang J, Han JS (1986) Antiopioid activity of the cardioexcitatory peptide in central modulation of cardiovascular functions. Eur J Pharmacol 130: 315-318.

Chan-Palay V, Palay SL (1984) Coexistence of neuroactive substances in neurons. New-York: Wiley.

Chen ST, Tsai MS, Shen CL (1989) Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the formosan monkey (*Macaca cyclopsis*). Peptides 10: 825-834.

Chronwall BM, Olschowka JA, O'Donohue TL (1984) Histochemical localization of FMRFamide-like immunoreactivity in the rat brain. Peptides 5: 569-584.

Clark RB (1955) The posterior lobes of the brain in *Nephtys* and the mucus glands of the prostomium. Q J Microsc Sci 96: 545-565.

Clark RB (1969) Endocrine influence in Annelids. Gen Comp Endocr 2: 572-581.

Cooke I, Delaney K, Gelperin A (1985) Complex computation in a small neural network. *In*: Memory systems of the brain: Animal and human cognitive processes. NM Weinberger, JL McCaught, G Lynch Eds, New York, Guilford Publ, pp 173-192.

Cottrell GA (1980) Voltage dependant and voltage independant actions of the molluscan neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 on a snail neurone. J Physiol (London) 300: 41.

Cottrell GA (1982) FMRFamide neuropeptides simultaneously increase and decrease K^+ currents in an identified neurone. Nature 296: 87-89.

Cottrell GA (1989) The biology of the FMRFamide-series of peptides in molluscs with special reference to *Helix*. Comp Biochem Physiol 93A: 41-45.

Cottrell GA, Bewick GS (1989) Novel peripheral neurotransmitters in invertebrates. Pharmac Ther 41: 411-442.

Cottrell GA, Davies NW (1987) Multiple receptor sites for a molluscan peptide (FMRFamide) and related peptides of *Helix*. J Physiol (London) 382: 51-68.

Cottrell GA, Davies NW, Green KA (1984) Multiple actions of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide and related peptides on identified *Helix* neurones. J Physiol (London) 356: 315-333.

Cottrell GA, Greenberg MJ, Price DA (1983a) Differential effects of the molluscan neuropeptide FMRFamide and the related Met-enkephalin derivative YGGFMRFamide on the *Helix* tentacle retractor muscle. Comp Biochem Physiol 75C: 373-375.

Cottrell GA, Price DA, Greenberg MJ (1981) FMRFamide-like activity in the ganglia and in a single identified neurone of *Helix aspersa*. Comp Biochem Physiol 70C: 103-107.

Cottrell GA, Schot LPC, Dockray GJ (1983b) Identification and probable role of a single neurone containing the neuropeptide *Helix* FMRFamide. Nature 304: 638-640.

Cowden C, Stretton AOW, Davis R.E. (1989) A 1, a sequenced bioactive peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. Neuron 2: 1465-1473.

Cropper EC, Lloyd PE, Reed W, Tenenbaum R, Kupfermann I, Weiss KR (1987) Multiple neuropeptides in cholinergic motoneurons of *Aplysia*:: Evidence for modulation intrinsic to the motor circuit. Proc Natl Acad Sci USA, 84, 3486-3490.

Cuthbert BA, Evans PD (1989) A comparison of the effects of FMRFamide-like peptides on locust heart and skeletal muscle. J Exp Biol 144: 395-415.

Davenport TRB, Lee DL, Isaac RE (1988) Immunocytochemical demonstration of a neuropeptide in *Ascaris suum* (Nematoda) using an antiserum to FMRFamide. Parasitol 97: 81-88.

Delaire-Hesdin A (1989) Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des neurosécrétions du cerveau de *Nereis virens*: Purification des neuropeptides reconnus et identification des cellules concernées. Thèse Doct Univ Lille, 1-44.

Dhainaut-Courtois N (1965) Sur la présence d'un organe photorécepteur dans le cerveau de *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète). C R Acad Sci Paris 261: 1085-1088.

Dhainaut-Courtois N (1968) Contribution à l'étude du complexe cérébro-vasculaire des Néréidiens. Cycle évolutif des cellules infracérébrales de *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète); étude ultrastructurale. Z Zellforsch 85: 466-482.

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, 1-191.

Dhainaut-Courtois N, Caridroit N, Biserte G (1969) Sur la présence de la N,N'-diméthyl-5-hydroxytryptamine (bufoténine) et de l'acide γ-amino-butyrique dans le système nerveux d'une Annélide Polychète. C R Soc Biol 163: 1563-1567.

Dhainaut-Courtois N, Dubois MP, Tramu G, 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, Engelhardt RP, Dhainaut A (1979a) Etude cytophysiologique des systèmes monoaminergiques et cholinergique des *Nereis* (Annélides Polychètes). I.Système nerveux périphérique et jonctions neuromusculaires.Arch Biol (Bruxelles) 90: 225-244.

Dhainaut-Courtois N, Engelhardt RP, Dhainaut A (1979b) Etude cytophysiologique des systèmes monoaminergiques et cholinergique des *Nereis* (Annélides Polychètes). II. Système nerveux central. Arch Biol (Bruxelles) 90: 273-288.

Dhainaut-Courtois N, Golding DW (1988) Nervous system. *In*: The ultrastructure of Polychaeta. W Westheide, CO Hermans Eds, Microfauna marina, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York, 4 pp 89-110.

Dhainaut-Courtois N, Tramu G, Beauvillain JC, 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 JC, Masson M, Selloum L, Belemtougri G, Beauvillain JC (1985b) Cholecystokinin in the nervous systems of Invertebrates and Protochordates. Immunohistochemical localization of a cholecystokinin-8-like substance in Annelids and Insects. *In*: Neuronal Cholecystokinin, Ann NY Acad Sci 448 pp 167-187.

Dhainaut-Courtois N, Warembourg M (1967) Etudes des cellules neurosécrétrices de la chaîne nerveuse de *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète). Gen Comp Endocr 9: 276-286.

Dockray GJ (1985) Characterization of FMRFamide-like immunoreactivity in rat spinal cord by region-specific antibodies in radioimmunoassay and HPLC. J Neurochem 45: 152-158.

Dockray GJ, Reeve JR, Shively J, Gayton RJ, Barnard CS (1983) A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. Nature 305: 328-330.

Dockray GJ, Vaillant C, Williams RG (1981) New vertebrate brain-gut peptide related to a molluscan neuropeptide and an opioid peptide. Nature 293: 656-657.

Dockray GJ, Williams RG (1983) FMRFamide immunoreactrivity in rat brain: development of radioimmunoassay and its application in studies of distribution and chromatographic properties. Brain Res 266: 295-303.

Durchon M (1948) Epitoquie expérimentale chez deux Polychètes: *P. cultrifera* et *N. irrorata*. C R Acad Sci Paris 227: 157-158.

Durchon M (1949) Inhibition de l'épitoquie par le prostomium chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). C R Acad Sci Paris 229: 81-82.

Durchon M (1952) Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes: l'épitoquie et la stolonisation. Ann Sc Nat Zool Biol Anim 14: 119-206.

Durchon M (1965) Evolution phylogénique et ontogénétique de l'épitoquie chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). C R Acad Sci Paris 241: 445-447.

Durchon M (1967) L'endocrinologie des Vers et des Mollusques. Masson & Cie Eds, pp 1-241.

Durchon M (1984) Peptidic hormones in Annelids. *In*: Biosynthesis, Metabolism and Mode of action of Invertebrate Hormones, J Hoffmann, M Porchet Eds, Springer-Verlag Berlin, pp 10-18.

Durchon M, Montreuil J, Boilly-Marer Y (1963) Résultats préliminaires sur la nature chimique de l'hormone inhibitrice du cerveau des Néréidiens. C R Acad Sci Paris 257: 1807-1808.

Durchon M, 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.

Ebberink RHM, Joosse J (1985) Molecular properties of various snail peptides from brain and gut. Peptides 6, suppl 3: 451-457.

Ebberink RHM, Price DA, van Loenhout H, Doble KE, Riehm JP, Geraerts WPM, Greenberg MJ (1987) The brain of *Lymnaea* contains a family of FMRFamide-like peptides. Peptides 8: 512-522.

Ebberink RHM, Smit AB, van Minnen J (1989) The insulin family: evolution of structure and function in vertebrates and invertebrates. Biol Bull 177: 176-182

Ebberink RHM, van Loenhout H, van Beek J, de Wilde K, van Minnen J (1987) Characterization of peptides isolated from growth-controlling neuroendocrine cells of *Lymnaea stagnalis* with immunoreactivity to anti-insulin. *In*: Neurobiology, Molluscan Models, HH Boer, WPM Geraerts, J Joosse Eds, North Holland Publ Comp, Amsterdam, pp 224-227.

Elphick MR, Emson RH, Thorndyke MC (1989a) FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of the starfish *Asterias rubens*. Biol Bull 177: 141-145.

Elphick MR, Price DA, Lee TD, Thorndyke MC (1989b) The SALMFamides: a new family of neuropeptides isolated from an echinoderm. Soc Neurosci Abst: 15: 1276.

Engelhardt RP (1978) Contribution à l'étude des phénomènes neuroendocrines chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). Thèse 3ème Cycle, Lille, 1-67.

Engelhardt RP, Dhainaut-Courtois N, Tramu G (1982) Immunohistochemical demonstration of a CCK-like peptide in the nervous system of a marine annelid worm, *Nereis diversicolor* O.F. Müller. Cell Tissue Res 227: 401-411.

Engelhardt RP, Saint-Pol P, Tramu G, Léonardelli J (1986) Immunohistochemical localization of enkephalin-like peptide during testicular development in rats. Arch andrology 17: 49-56.

Evans PD, Myers CM (1986a) Peptidergic and aminergic modulation of insect skeletal muscle. J Exp Biol 124: 143-176.

Evans PD, Myers CM (1986b) The modulatory actions of FMRFamide and related peptides on locust skeletal muscle. J Exp Biol 126: 403-422.

Evans PD, Robb S, Cuthbert BA (1988) Modulation of neuromuscular transmission in the locust by FMRFamide-like peptides. *In*:: Modulation of Synaptic Transmission and Plasticity in Nervous Tissues, NATO ASI, G Hertting, Ch Spatz Eds, Springer-Verlag Berlin, 19 pp 305-318.

Fingerman M, Hanumante MM, Kulkarni GK, Ikeda R, Vacca LL (1985) Localization of substance P-like, leucine-enkephalin-like, methionine-enkephalin-like, and FMRFamide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Cell Tissue Res 241: 473-477.

Fujii K, Ohta N, Sasaki T, Sekizawa Y, Yamada C, Kobayashi H (1989) Immunoreactive FMRFamide in the nervous system of the earthworm, *Eisenia foetida*. Zoll Sci 6: 951-961.

Fujimoto K, Ohta N, Yoshida M, Kubota I, Muneoka Y, Kobayashi M (1990) A novel cardio-excitatory peptide isolated from the atria of the African giant snail *Achatina fulica*. Biochem Biophys Res Commun 167: 777-783.

Geraerts WPM, van Leeuwen JPThM, Nuyt K, de With ND (1981) Cardioactive peptides of the CNS of the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*.Experientia 37: 1168-1169.

Golding DW (1967) Endocrinology, regeneration and maturation in *Nereis*. Biol Bull 133: 567-577.

Golding DW, May BA (1982) Duality of secretory inclusions in neurons. Ultrastructure of the corresponding sites of release in Invertebrate nervous system. Acta Zool (Stockholm) 63: 229-238.

Golding DW, Whittle AC (1977) Neurosecretion and related phenomena in Annelids. Int Rev Cytol., suppl. 5: 189-302.

Graff D, Grimmelikhuijzen CJP (1988a) Isolation of pGlu-Ser-Leu-Arg-Trp-NH_2 a novel neuropeptide from sea anemones. Brain Res 442: 354-358.

Graff D, Grimmelikhuijzen CJP (1988b) Isolation of pGlu-Gly-Leu-Arg-Trp-NH_2 (Antho-RWamide II), a novel neuropeptide from sea anemones. FEBS Lett 239: 137-140.

Greenberg MJ, Painter SD, Doble KE, Nagle GT, Price DA, Lehman HK (1983) The molluscan neurosecretory peptide FMRFamide: comparative pharmacology and relationship to the enkephalins. Fed Proc 42: 82-86.

Greenberg MJ, Payza K, Nachman RJ, Holman GM, Price DA (1988) Relationships between the FMRFamide-related peptides and other peptide families. Peptides 9, suppl 1: 125-135.

Griffond B, Mounzih K (1989) *In vitro* inhibition of methionine incorporation in the dorsal bodies of *Helix aspersa* by synthetic FMRFamide. Comp Biochem Physiol 92C: 45-49.

BU LILLE

Grimmelikhuijzen CJP (1983) FMRFamide immunoreactivity is generally occurring in the nervous system of Coelenterates. Histochem 78: 361-381.

Grimmelikhuijzen CJP (1984) Peptides in the nervous system of Coelenterates. *In*: Evolution and tumour pathology of the Neuroendocrine System. S Falkmer, R Hakanson , F Sundler Eds, Elsevier Science Publisher BV, pp 39-58.

Grimmelikhuijzen CJP, Dockray GJ, Schot LPC (1982) FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of Hydra. Histochem 73: 499-508.

Grimmelikhuijzen CJP, Graff D (1986) Isolation of pGlu-Gly-Arg-Phe-NH_2 (Antho-RFamide), a neuropeptide from sea anemones. Proc Natl Acad Sci USA 83: 9817-9821.

Grimmelikhuijzen CJP, Groeger A (1987) Isolation of the neuropeptide pGlu-Gly-Arg-Phe-amide from the pennatulid *Renilla köllikeri*. FEBS Lett 211: 105-108.

Grimmelikhuijzen CJP, Hahn M, Rinehart KL, Spencer AN (1988) Isolation of pGlu-Leu-Leu-Gly-Gly-Arg-Phe-NH_2 (Pol-RFamide), a novel neuropeptide from hydromedusae Brain Res 475: 198-203.

Grimmelikhuijzen CJP, Spencer AN (1984) FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of the medusa *Polyorchis penicillatus*. J Comp Neurol 230: 361-371.

Gros C, Lafont-Cazal M, Dray F (1978) Présence de substances immunoréactivement apparentées aux enképhalines chez un Insecte *Locusta migratoria*. C R Acad Sci Paris 287: 647-650.

Guissi-Kadri S (1989) Expression de gènes spécifiant des précurseurs de neuropeptides chez un ver marin *Nereis diversicolor*. Thèse Doct. Univ Lille, 1-127.

Hansen BL, Hansen GN, Scharrer B (1982) Immunoreactive material resembling vertebrate neuropeptides in the corpus cardiacum and corpus allatum on the insect *Leucophaea maderae* Cell Tissue Res 225: 319-329.

Hauenschild C (1959) Zyklische veränderungen an den inkretorischen drusenzellen in prostomium des polychaeten *Platynereis dumerilii* als Grundlage der Schwärm periodizität. Z Naturforsch 14: 81-87.

Hill RB, Langton PD (1986) Electrical and mechanical responses of a molluscan muscle to FMRFamide. Am Zool 25, Abstr 54.

Hill RG, Hughes J, Pittaway KM (1987) Antinociceptive action of cholecystokinin octapeptide (CCK 8) and related peptides in rat and mice: effects of naloxone and peptidase inhibitors. Neuropharmacol 26: 289-300.

Hökfelt T, Fuxe K, Pernow B (1986) Coexistence of neuronal messengers: A new principle in chemical transmission.Progress in Brain Research, vol 68, Amsterdam: Elsevier

Hökfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M (1980) Peptidergic neurons. Nature 284, 515-521.

Holman GH, Cook BJ, Nachman RJ (1986) Isolation primary structure and synthesis of leucomyosuppressin, an insect neuropeptide that inhibits spontaneous contractions of the cockroach hindgut. Comp Biochem Physiol 85C: 329-333.

Holmgren N (1916) Zur veigleichenden Anatomie des Gehirms von Polychäten, Onychophoren, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden und Insekten. Kgl Avenska Ventenskapskad Handl 56: 1-303.

Homberg U, Hildebrand JG (1989) Serotonin immunoreactivity in the optic lobes of the sphinx moth *Manduca sexta* and colocalization with FMRFamide and SCP_B immunoreactivity. J Comp Neurol 288; 243-253.

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opioat agonist activity. Nature 258: 577-579.

Jacoby MB, Jacoby HI, Mathiasen JF, Raffa RB (1987) The effect of Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 (FMRFamide) on morphine-induced inhibition of colonic propulsive motility in mice. Neurosci Lett 83: 128-132.

Jan YN, Jan LY (1983) Coexistence and corelease of cholinergic and peptidergic transmitters in frog sympathetic ganglia. Fed Proc 42: 2929-2933.

Jaros P, Dircksen H, Keller R (1985) Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab, *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda). Cell Tissue Res 241: 111-117.

Jirikowski G, Erhart G, Grimmelikhuijzen CJP, Triepel J, Patzner RA (1984) FMRF-amide-like immunoreactivity in brain and pituitary of the hagfish *Eptatretuc burgeri* (Cyclostomata). Cell Tissue Res 237: 363-366.

Joosse J, Geraerts WPM (1983) Endocrinology. *In*: The Mollusca, ASM Saleuddin, KM Wilbur Eds, Acad Press New York, 14 pp 317-406.

Kavaliers M, Hirst M (1985a) FMRFamide, a putative endogenous opiate antagonist: evidence from suppression of defeat-induced analgesia and feeding in mice. Neuropeptides 6: 485-494.

Kavaliers M, Hirst M (1985b) FMRFamide suppresses kappa opiate induced feeding in the mouse. Peptides 6: 847-849.

Kavaliers M, Yang HYT (1989) IgG from antiserum against endogenous mammalian FMRF-NH_2-related peptides augments morphine- and stress-induced analgesia in mice. Peptides 10: 741-745.

Kobayashi H (1987) Innervation and control of the heart of a gastropod, *Rapana*.. Experientia 43: 981-986.

Kobayashi M, Muneoka Y (1986) Structural requirements for FMRFamide-like activity on the heart of the prosobranch *Rapana thomasiana*.Comp Biochem Physiol 84C: 349-352.

Kobierski LA, Beltz BS, Trimmer BA, Kravitz EA (1987) FMRFamide-like peptides of *Homarus americanus* : distribution, immunocytochemical mapping and ultrastructural localization in terminal varicosities. J Comp Neurol 266: 1-15.

Krajniak KG, Greenberg MJ (1988) Structure and activity relations of FMRFamide-related peptides (FaRPs) on crustacean heart. Neurosci Soc Abstr 14: 53.

Krajniak KG, Greenberg MJ, Doble KE, Price DA (1985) Localization of FMRFamide-related peptides in the slug *Limax maximus*, and their effects on the isolated crop and penis. Am Zool 25: 15A.

Krajniak KG, Price DA (1990) Authentic FMRFamide is present in the Polychaete *Nereis virens* Peptides 11: 75-77.

Krieger DT (1983) Brain peptides: what, where, and why ? Science 222: 975-985.

Kubben FJGM, van Assche CLMVJ, Bosman FT (1986)FMRF-amide immunoreactivity in the mammalian gastroenteropancreatic neuroendocrine system. Histochem 84: 439-444.

Kuhlman J.R., Li C, Calabrese RL (1985a) FMRFamide-like substances in the leech. I. Immunocytochemical localization. J Neurosci 5: 2301-2309.

Kuhlman J.R., Li C, Calabrese RL (1985b) FMRFamide-like substances in the leech. II. Bioactivity on the heart beat system. J Neurosci 5: 2310-2317.

Kuhn JM, Saltiel H (1986) Rôle des peptides endogènes dans la régulation des sécrétions hypophysaires. Ann Endocrinol (Paris) 47: 97-105.

Kulkarni GK, Fingerman M (1987) Distal retinal pigment of the fiddler crab *Uca pugilator*: release of the dark-adapting hormone by methionine-enkephalin and FMRFamide. Pigment Cell Res 1: 51-56.

Le Gall S, Féral C, van Minnen J, Marchand CR (1988) Evidence for peptidergic innervation of the endocrine optic gland in *Sepia* by neurons showing FMRFamide-like immunoreactivity. Brain Res 462: 83-88.

Lehman HK, Greenberg MJ (1987) The actions of FMRFamide-like peptides on visceral and somatic muscles of the snail *Helix aspersa*. J Exp Biol 131: 55-68.

Lehman HK, Price DA (1987) Localization of FMRFamide-like peptides in the snail *Helix aspersa*. J Exp Biol 131: 37-53.

Lehman HK, Price DA, Greenberg MJ (1984) The FMRFamide-like neuropeptide of *Aplysia* is FMRFamide. Biol Bull 167: 460-466.

Leung MK, Stefano GB (1983) Isolation of molluscan opioid peptides. Life Sci 33, suppl I: 77-80.

Leung MK, Stefano GB (1984) Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). Proc Natl Acad Sci USA 84: 955-958.

Linacre A, Kellet E, Saunders S, Bright K, Benjamin P, Burke JF (1990) FMRFamide and related peptides are encoded as multiple copies in a single gene in *Lymnaea stagnalis*. J Neurosci 10: 412-419.

Li C, Calabrese RL (1987) FMRFamide-like substances in the leech. III. Biochemical characterization and physiological effects. J Neurosci 7: 595-603.

Lloyd PE, Frankfurt M, Kupfermann I, Weiss KR (1985b) Co-localization of FMRFamide and the SCPs in motor neurons innervating *Aplysia* buccal muscle. Soc Neurosci Abstr 11: 482.

Lloyd PE, Frankfurt M, Stevens P, Kupfermann I, Weiss KR (1987a) Biochemical and immunocytological localization of the neuropeptides FMRFamide, SCP_A, SCP_B, to neurons involved in the regulation of feeding in *Aplysia*. J Neurosci 7: 1123-1132.

Lloyd PE, Kupfermann I, Weiss KR (1984) Evidence for parallel actions of a molluscan neuropeptide (SCP_B) and serotonin in mediating arousal in *Aplysia*. Proc Natl Acad Sci USA 81: 2934-2937.

Lloyd PE, Kupfermann I, Weiss KR (1987b) Sequence of small cardioactive peptide A: a second member of a class of neuropeptides in *Aplysia*. Peptides 8: 179-184.

Lloyd PE, Mahon AC, Kupfermann I, Cohen JL, Scheller RH, Weiss KR (1985a) Biochemical and immunocytological localization of molluscan small cardioactive peptides in the nervous system of *Aplysia californica*.J Neurosci 5: 1851-1861.

Lloyd PE, Masinovski BP, Willows AOD (1988) Multiple transmitter neurons in *Tritonia*. I Biochemical studies. J Neurobiol 19: 39-54.

Lundberg JM, Anggard A, Fahrenkrug J, Hökfelt T, Mutt V (1980) Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilatation and secretion. Proc Natl Acad Sci USA 77: 1651-1655.

Magee RM, Fairweather I, Johnston CF, Halton DW, Shaw C (1989) Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the nervous system of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematode, Digenea). Parasitol 98: 227-238.

Mahon AC, Lloyd PE, Weiss KR, Kupfermann I, Scheller RH (1985) The small cardioactive peptides A and B of *Aplysia* are derived from a common precursor molecule. Proc Natl Acad Sci USA 82: 3925-3929.

Majane EA, Casanova MF, Yang HYT (1988) Biochemical characterization of FMRF-NH_2- like peptides in spinal cords of various mammalian species using specific radioimmunoassays. Peptides 9: 1137-1144.

Majane EA, Yang HYT (1987) Distribution and characterization of two putative endogenous opioid antagonist peptides in bovine brain. Peptides 8: 657-662.

Maranto AR, Calabrese RL (1984) Neural control of the hearts in the leech, *Hirudo medicinalis*. II. Myogenic activity and its control by heart motor neurons. J Comp Physiol (A) 154: 381-391.

Marchand CR, Dubois MP (1985) Mise en évidence par immunocytologie de sites antigéniques fixant des anticorps anti-α-MSH et anti-méthionine-enképhaline dans l'ovotestis de l'escargot adulte Petit-Gris (*Helix aspersa* Müller). C R Acad Sci Paris 301: 233-238.

Marchand CR, Gomot A, Colard C (1989) Présence de cellules neurosécrétrices Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 (FMRF-amide) immunoréactives parmi les cellules des corps dorsaux supra- et sous-oesophagiens chez l'Escargot Gros-gris d'Algérie *Helix aspersa maxima.* C R Acad Sci Paris 309 (III): 313-316.

Marchand CR, Sokolove PG, Dubois MP (1984) Immunocytological localization of a somatostatin-like substance in the brain of the giant slug, *Limax maximus* L. Cell Tissue Res, 238: 349-353.

Marchand CR, Wijdenes J, Schot LPC (1982) Localisation par la technique cyto-immunoenzymologique d'un neuropeptide cardio-excitateur (le FMRF-amide) dans le collier nerveux péri-oesophagien d'*Helix aspersa* Müller (Gastéropode, Pulmoné, Stylommatophore). C R Acad Sci Paris 294 (III): 39-44.

Martin R, Frösch D, Weber E, Voigt KH (1979) Met-enkephalin-like immunoreactivity in cephalopod neurohemal organ. Neurosci Lett 15: 253-257.

Martin R, Voigt KH (1987) The neurosecretory system of the octopus vena cava. Experientia 43: 537-543.

Matsumoto S, Brown MR, Crim JW, Vigna SR, Lea AO (1989) Isolation and primary structure of neuropeptides from the mosquito, *Aedes aegypti*, immunoreactive to FMRFamide antiserum. Insect Biochem 19: 277-283.

McFarlane ID, Graff D, Grimmelikhuijzen CJP (1987) Excitatory actions of Antho-RFamide, an anthozoan neuropeptide, on muscles and conducting systems in the sea anemone *Calliactis parasitica.* J Exp Biol 133: 157-168.

Meriffield R (1963) Solid phase peptide synthesis. The synthese of a tetrapeptide. J Am Chem Soc 85: 2149.

Morris HR, Panico M, Karplus A, Lloyd PE, Riniker B (1982) Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia.* Nature 300: 643-645.

Muneoka T, Saitoh H (1986) Pharmacology of FMRFamide in *Mytilus* catch muscle. Comp Biochem Physiol 85C: 207-214.

Myers CM (1986) FMRFamide-like peptides in neurosecretory cells of the locust nervous system. PhD Thesis, Univ. Cambridge.

Myers CM, Evans PD (1985a) The distribution of bovine pancreatic polypeptide FMRFamide-like immunoreactivity in the ventral nervous system of the locust. J Comp Neurol 234: 1-16.

Myers CM, Evans PD (1985b) An FMRFamide antiserum differentiates between populations of antigens in the ventral nervous system of the locust, *Schistocerca gregaria.* Cell Tissue Res 242: 109-114.

Nachman RJ, Holman GM, Cook BJ, Haddon WF, Ling N (1986a) Leucosulfakinin-II, a blocked sulfated insect neuropeptide with homology to cholecystokinin and gastrin. Biochem Biophys Res Commun 140: 357-364.

Nachman RJ, Holman GM, Haddon WF, Ling N (1986b) Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. Science 234: 71-73.

Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Suzuki S, Suzuki A, Mizoguchi H, Fujiwara Y, Susuki At , Takahashi SY, Ishizaki H (1986) Amino acid sequence of the prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*.. Proc Natl Acad Sci USA 83: 5840-5843.

Nagasawa H Kataoka H, Isogai A, Suzuki S, Suzuki A, Ishizaki H, Mizoguc ıi A, Fujiwara Y, Susuki At (1984) Amino-terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone: homology with insulin. Science 226: 1344-1345.

Nagle GT (1981) The molluscan cardioactive neuropeptide FMRFamide: subcellular localization in bivalve ganglia. J Neurobiol 12: 599-611.

Nambu J, Andrews PC, Gotthried J, Scheller RH (1987) Purification and characterization of the FMRFamide related peptide of *Drosophila melanogaster*. Soc Neurosci Abstr 13: 1256.

Nambu J, Murphy-Erclosh C, Andrews PC, Feistner GJ, Scheller RH (1988) Isolation and characterization of a *Drosophila* neuropeptide gene. Neuron 1: 55-61.

Nichols R, Schneuwly SA, Dixon JE (1988) Identification and characterization of a *Drosophila* homologue to the vertebrate neuropeptide cholecystokinin. J Biol Chem 263: 12167-12170.

Norris BJ, Calabrese RL (1987) Identification of motor neurons that contain a FMRFamide-like peptide and the effects of FMRFamide on longitudinal muscle in the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. J Comp Neurol 266: 95-111.

O'Donohue TL, Bishop JF, Chronwall BM, Groome J, Watson WH (1984) Characterization and distribution of FMRFamide immunoreactivity in the rat central nervous system. Peptides 5: 563-568.

Ohtomi M, Fujii K, Kobayashi H (1989) Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain and neurohypophysis of the Lamprey *Lampetra japonica*. Cell Tissue Res 256: 581-584.

Painter SD (1982a) FMRFamide catch contractures of a molluscan smooth muscle: pharmacology, ionic dependence and cyclic nucleotides. J Comp Biochem 148A: 491-501.

Painter SD (1982b) FMRFamide inhibition of a molluscan heart is accompanied by increases in cyclic AMP. Neuropeptides 3: 19-27.

Painter SD, Greenberg MJ (1982) A survey of the responses of bivalves hearts to the molluscan neuropeptide FMRFamide and to 5-hydroxytryptamine. Biol Bull 162: 311-332.

Painter SD, Morley JS, Price DA (1982) Structure activity relations of the molluscan neuropeptide FMRFamide on some molluscan muscles. Life Sci 31: 2471-2478.

Payza K (1987) FMRFamide receptors in *Helix aspersa*. Peptides 8: 1065-1074.

Payza K, Greenberg MJ, Price DA (1989) Further characterization of *Helix* FMRFamide receptors: kinetics, tissue distribution, and interactions with the endogenous heptapeptides. Peptides 10: 657-661.

Pfannenstiel HD, Grothe C (1988) Neurosecretory elements. *In*: The ultrastructure of Polychaeta. W Westheide, CO Hermans Eds, Microfauna marina Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York, 4 pp 111-120.

Porchet M (1970) Relations entre le cycle hormonal cérébral et l'évolution ovocytaire chez *Perinereis cultrifera*. Gen Comp Endocr 15: 220-231.

Porchet M (1974) Activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. Thèse Etat Sciences Naturelles, Lille: 1-117.

Porchet M, Cardon C (1976) The inhibitory feed-back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in *Nereis* (Polychaetes, Annelids). Gen Comp Endocr 30: 378-390.

Porchet M, Dhainaut-Courtois N (1988) Neuropeptides and monoamines in Annelids. *In*: Neurohormones in Invertebrates,MC Thorndyke, G:J Goldworthy Eds,Cambridge Univ. Press, pp 219-234.

Porchet M, Dhainaut-Courtois N, Cardon C, 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, Durchon M (1968) Influence de la maturité génitale sur la régénération postérieure chez *Perinereis cultrifera*. C R Acad Sci Paris 167: 194-196.

Price DA (1982) The FMRFamide-like peptide of *Helix aspersa*. Comp Biochem Physiol 72C, 325-328.

Price DA (1986) Evolution of a molluscan cardioregulatory neuropeptide. Am Zool 26: 1007-1015.

Price DA (1987) The distribution of some FMRFamide- and SCP-related peptides in the Mollusca.*In*: Neurobiology, Molluscan Models, HH Boer, WPM Geraerts, J Joosse Eds, Mon Kon Ned Akad Wetensch, North-Holland Publ Co, Amsterdam, pp. 208-214.

Price DA, Cobb CG, Doble KE, Kline JK, Greenberg MJ (1987c) Evidence for a novel FMRFamide-like peptide in the pulmonate snail *Siphonaria pectinata*. Peptides 8: 533-538.

Price DA, Cottrell GA, Doble KE, Greenberg MJ, Jorenby W, Lehman HK, Riehm JP (1985) A novel FMRFamide-related peptide in *Helix*: pQDPFLRFamide. Biol Bull 169: 256-266.

Price DA, Davies NW, Doble KE, Greenberg MJ (1987a) The variety and distribution of the FMRFamide-related peptides in molluscs. Zool Sci 4: 395-410.

Price DA, Doble KE, Lee TD, Greenberg MJ (1987b) The distribution of the FMRFamide-related peptides in the gastropods. Soc Neurosci Abstr 13: 1076.

Price DA, Greenberg MJ (1977) The structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. Science 197: 670-671.

Price DA, Greenberg MJ (1989) The hunting of the FaRPs: the distribution of FMRFamide-related peptides. Biol Bull 177: 198-205.

Quackenbush LS, Fingerman M (1984) Regulation of neurohormone release in the fiddler crab, *Uca pugilator*: effects of gamma-aminobutyric acid, octopamine, Met-enkephalin and beta-endorphin. Comp Biochem Physiol 79C: 77-84.

Raffa RB (1988) The action of FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH_2) and related peptides on mammals. Peptides 9: 915-922.

Raffa RB, Heyman J, Porreca F (1986) Intrathecal FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH_2) induces excessive grooming behavior in mice. Neurosci Lett 65: 94-98.

Raffa RB, Jacoby HI (1989) A-18-Famide and F-8-Famide, endogenous mammalian equivalents of the molluscan neuropeptide FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH_2), inhibit colonic bead expulsion time in mice. Peptides 10: 873-875.

Rémy C, Guy J, Pelletier G, Boer HH (1988) Immunohistological demonstration of a substance related to neuropeptide Y and FMRFamide in the cephalic and thoracic nervous systems of the locust *Locusta migratoria*. Cell Tissue Res, 254: 189-195.

Reuter M, Karhi T, Schot LPC (1984) Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central and peripheral nervous systems of the flatworm *Microstomum lineare* with antiserum to FMRF-amide. Cell Tissue Res 238: 431-436.

Reuter M, Wikgren M, Lehtonen M (1986) Immunocytochemical demonstration of 5-HT-like and FMRF-amide-like substances in whole mounts of*Microstomum lineare* (Turbellaria). Cell Tissue Res 246: 7-12.

Richmond JE, Bulloch AGM, Lukowiak KL (1984) Peptidergic modulation of a neuromuscular junction in the mollusc, *Aplysia*. Soc Neurosci Abstr 10: 690.

Robb S, Packman LC, Evans PD (1989) Isolation, primary structure and bioactivity of schisto-FLRFamide, a FMRFamide-like neuropeptide form the locust, *Schistocerca gregaria*. Biochem Biophys Res Commun 160: 850-856.

Roth BL, Disimone J, Majane EA, Yang HYT (1987) Elevation of arterial pressure in rats by two new vertebrate peptides FLFQPQRF-NH_2 and AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH_2 which are immunoreactive to FMRF-NH_2 antiserum. Neuropeptides 10: 37-42.

Santana N, Burke JF, Benjamin PR (1990) Identification of novel peptides encoded by the FMRFamide gene precursor in the CNS of *Lymnaea stagnalis*. *In*: Society of Experimental Biology, Warwick Meeting, Book of Abstracts, Animal topics, Abstr A 7-10.

Schaefer M, Picciotto MR, Kreiner T, Kaldany RR, Taussig R, Scheller RH (1985) *Aplysia* neurons express a gene encoding multiple FMRFamide neurop. ptides. Cell 41: 457-467.

Schneider LE, Taghert PH (1988) Isolation and characterization of a *Drosophila* gene that encodes multiple neuropeptides related to Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 (FMRF-amide). Proc Natl Acad Sci USA 85: 1993-1997.

Schot LPC, Boer HH (1982) Immunocytochemical demonstration of peptidergic cells in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with an antiserum to the molluscan cardioactive tetrapeptide FMRFamide. Cell Tissue Res 225: 347-354.

Schot LPC, Boer HH, Montagne-Wajer C (1984) Characterization of multiple immunoreactive neurons in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* with different fixatives and antisera adsorbed with the homologous and the heterologous antigens. Histochem 81: 373-378.

Siwicki KK, Beltz BS, Kravitz EA (1987) Proctolin in identified serotonergic, dopaminergic, and cholinergic neurons in the lobster, *Homarus americanus*. J Neurosci 7: 522-532.

Smiri Y (1990) Caractérisation et purification de molécules apparentées à la gastrine/ cholécystokinine chez une annélide polychète, *Nereis diversicolor*. Thèse Doct Univ Lille, 1-35.

Smit AB, Vreugdenhil E, Ebberink RHM, Geraerts WPM, Klootwijk K, Joosse J (1988) Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. Nature 331: 535-538.

Sorenson RL, Sasek CA, Elde RP (1984) Phe-Met-Arg-Phe-amide (FMRF-NH_2) inhibits insulin and somatosatin secretion and anti-FMRF-NH_2 sera detects pancreatic polypeptide cells in the rat islet. Peptides 5: 777-782.

Stern SA, Lewis RV, Kimura S, Rossier J, Gerger LD, Brink L, Stein S, Udenfriend S (1979) Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin-[Arg^6, Phe^7] from bovine adrenal medullary granules and striatum. Proc Natl Acad Sci USA 76: 6680-6683.

Takeda S, Viellemaringe J, Geffard M, Rémy C (1986) Immunohistological evidence of dopamine cells in the cephalic nervous system of the silkworm *Bombyx mori*. Coexistence of dopamine and α-endorphin-like substance in neurosecretory cells of the subœsophageal ganglion. Cell Tissue Res 243: 125-128.

Tang J, Yang HYT, Costa E (1984) Inhibition of spontaneous and opiate-modified nociception by an endogenous neuropeptide with Phe-Met-Arg-Phe-NH_2-like immunoreactivity. Proc Natl Acad Sci USA 81: 5002-5005.

Taussig R, Nambu JR, Scheller RH (1988) Evolution of peptide hormones: an *Aplysia* CRF-like peptide. *in*: Neurohormones in Invertebrates MC Thorndyke, G.J Goldsworthy Eds,Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melburne, Sydney, pp 299-309.

Taussig R, Scheller RH (1986) The *Aplysia* FMRFamide gene encodes sequences related to mammalian brain peptides. DNA 5: 453-462.

Telegdy G, Bollok I (1987) Amnesic action of FMRFamide in rats. Neuropeptides 10: 157-163.

Triepel J, Grimmelikhuijzen CJP (1984) Mapping of neurons in the central nervous system of the guinea pig by use of antisera specific to the molluscan neuropeptide FMRFamide. Cell Tissue Res 237: 575-586.

Trimmer BA, Kobierski LA, Kravitz EA (1987) Purification and characterization of FMRFamide-like immunoreactive substances from the lobster nervous system: isolation and sequence analysis of two closely related peptides. J Comp Neurol 266: 16-26.

Veenstra JA (1984) Immunocytochemical demonstration of a homology in peptidergic neurosecretory cells in the subœsophageal ganglion of a beetle and a locust with antisera to bovine pancreatic polypeptide, FMRFamide, vasopressin and α-MSH. Neurosci Lett 48: 185-190.

Veenstra JA (1988) Immunocytochemical demonstration of vertebrate peptides in invertebrates: the homology concept. Neuropeptides 12: 49-54.

Veenstra JA (1989) Isolation and structure of two Gastrin/CCK-like neuropeptides from the american cockroach homologous to the Leucosulfakinins. Neuropeptides 14: 145-149.

Veenstra JA, Romberg-Privee HM, Schooneveld H, Polak JM (1985) Immunocytochemical localization of peptidergic neurons and neurosecretory cells in the neuroendocrine system of the Colorado potato beetle with antisera to vertebrate regulatory peptides. Histochem 82: 9-18.

Veenstra JA, Schooneveld H (1984) Immunocytochemical localization of peptidergic neurons in the nervous system of the Colorado potato beetle with antisera against FMRFamide and bovine pancreatic polypeptide. Cell Tissue Res 235: 303-308.

Verhaert P, Grimmelikhuijzen CJP, De Loof A (1985) Distinct localization of FMRFamide- and bovine pancreatic polypeptide-like material in the brain retrocerebral complex and suboesophageal ganglion of the cockroach, *Periplaneta americana* L. Brain Res 348: 331-338.

Voigt KH, Hirt R; Keihling C, Martin R (1987) Isolation and characterization of neuropeptides from *Octopus vulgaris*. *In*: Neurobiology, Molluscan Models. HH Boer, WPM Geraerts, J Joosse Eds Mon Kon Ned Akad Wetensch/North Holland, pp 219-223.

Voigt KH, Martin R (1986) Neuropeptides with cardioexcitatory and opioid activity in octopus nerves. *In*: Handbook of Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mech. nisms, GB Stefano Ed, Boca Raton: CRC Press, 1 pp 127-138.

Vreugden!.il E, Bogerd J, Mahon A, Bouwmeester T, Klootwijk C, Van Heerikhwizen H, Joosse J (1988) The genomic organization of the ovulation-hormone gene family of the snail *Lymnaea stagnalis*. *In*:: The molecular basis of egg-laying behaviour in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. E Vreugdenhil Ed Drukkerij All In, Katwijk, pp 37-54.

Wallace BG (1981a) Neurotransmitter chemistry. *In*: Neurobiology of the leech. KJ Muller, JG Nicholls, GS Srent Eds, Cold Springs Harbor Lab. New York, pp 147-172.

Wallace BG (1981b) Distribution of AChE in cholinergic and non-cholinergic neurons. Brain Res 219: 190-195.

Walther C, Schiebe M, Voigt KH (1984) Synaptic and non-synaptic effects of molluscan cardioexcitatory neuropeptides on locust skeletal muscle. Neurosci Lett 45: 99-104.

Watson WH III, Groome JR, Chronwall BM, Bishop J, O'Donohue TL (1984) Presence and distribution of immunoreactive and bioactive FMRFamide-like peptides in the nervous system of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Peptides 5: 585-592.

Weber E, Evans CJ, Samuelson SJ, Barchas JD (1981) Novel peptide neuronal system in rat brain and pituitary. Science 214: 1248-1251.

Weiss S, Goldberg JI, Cohan KS, Stell WK, Drummond GI, Lukowiak K (1984) Evidence for FMRFamide as a neurotransmitter in the gill of *Aplysia californica*. J Neurosci 4: 1994-2000.

White K, Hurteau T, Punsal P (1986) Neuropeptide FMRFamide-like immunoreactivity in *Drosophila*: development and distribution. J Comp Neurol 247: 430-438.

Wong TM, Greenberg MJ, Tse SYH (1985) Cardiovascular effects of intraventricular injection of FMRFamide, met-enkephalin and their common analogues in the rat. Comp Biochem Physiol 81C: 175-179.

Worden MK, Witten JL, O'Shea M (1985) Proctolin is a cotransmitter for the SETi motoneuron. Soc Neurosci Abstr 11: 327.

Yang HYT, Fratta W, Majane EA, Costa E (1985) Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7757-7761.

Zhu XZ, Raffa RB (1986) Low affinity inhibition of opioid receptor binding by FMRFamide. Neuropeptides 8: 55-61.

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

PPN 036105139

RESUME

Des études immunocytochimiques conduites chez les *Nereidae* à l'aide d'anticorps dirigés contre des neuropeptides de vertébrés et quelques neuropeptides d'invertébrés ont permis de poser l'hypothèse de l'existence de nombreuses substances apparentées. Ces études ont notamment révélé la présence dans le système nerveux de ces vers d'un matériel apparenté au FMRF-amide (tétrapeptide cardioexcitateur de mollusques).

Nous avons, dans un premier temps, précisé la localisation des cellules nerveuses contenant ce matériel chez trois espèces de *Nereidae* : *Nereis diversicolor*, *Nereis virens* et *Perinereis cultrifera*. Nos études immunocytochimiques en microscopie photonique, menées au moyen d'un anticorps polyclonal anti-FMRF-amide, révèlent la large répartition des molécules immunoréactives dans l'ensemble du système nerveux (central et périphérique). Des résultats similaires ont été obtenus chez les trois espèces étudiées, quels que soient l'âge et le sexe. Au vu des structures immunoréactives, nous postulons que les molécules détectées peuvent intervenir dans la neurotransmission en tant que neurotransmetteur ou neuromodulateur et même en tant que neurohormone.

Nous avons ensuite purifié, par chromatographie d'affinité et chromatographie liquide à haute performance, les molécules FMRF-amide immunoréactives extraites du système nerveux de *Nereis diversicolor*. La structure des peptides purifiés a été déterminée par séquençage des acides aminés et sur la base de leur réactivité avec l'anticorps anti-FMRF-amide spécifique du déterminant Arg-Phe-NH_2. Deux structures primaires ont été établies: Phe-Met-Arg-Phe-NH_2 (FMRF-amide) et Phe-Thr-Arg-Phe-NH_2 (FTRF-amide). En outre, un dérivé oxydé du FMRF-amide possédant une méthionine sulfoxyde (FM(O)RF-amide) a également été identifié. Le peptide FTRF-amide a été synthétisé et nous avons montré que, dans tous les cas, les peptides natifs se comportent comme leurs homologues de synthèse. Les structures des deux peptides natifs et du FM(O)RF-amide ont été confirmées par analyse en spectrométrie de masse.

Nous avons ainsi démontré que le FMRF-amide est présent chez *Nereis diversicolor*. Nous avons de plus révélé l'existence d'un nouveau tétrapeptide: le FTRF-amide qui n'avait, jusqu'à présent, pas été signalé dans la littérature.

MOTS CLES

FMRF-amide - Neuropeptides - Annélides polychètes - Immunocytochimie - Chromatographie d'affinité - Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) - Séquence peptidique - Spectrométrie de masse.