

N° d'ordre:

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE BIOLOGIE

Diplôme Supérieur de Recherche de l'USTL

FEWOU Jean

**Reconstitution tridimensionnelle du cerveau de *Nereis diversicolor* et
démonstration immunocytochimique et expérimentale du rôle dans
l'osmorégulation de cette annélide polychète d'un matériel apparenté
à l'angiotensine II.**

Soutenu le

devant la Commission d'Examen

Président:

M^r le Professeur A. DHAINAUT

Rapporteur:

M^{me} le Professeur émérite N. DHAINAUT-COURTOIS

Examineurs:

M^r J.C. BEAUVILLAIN (Directeur de Recherche à l'INSERM)

M^r le Professeur J. MALECHA



Remerciements

A l'heure des remerciements, qu'il me soit permis d'exprimer ici ma profonde gratitude à Madame le **Pr. N. Dhainaut-Courtois**. Dès mon arrivée au bâtiment SN3, ne sachant dans quelle direction orienter mes recherches, vous m'avez accepté dans votre équipe et proposé différents thèmes qui ont fait l'objet de ce rapport. Vous m'avez toujours fait confiance; vos conseils et encouragements aux moments difficiles que j'ai traversés, ont été déterminant dans l'aboutissement de mes études. Que ce travail soit le témoignage de ma très respectueuse reconnaissance.

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le **Pr. M. Porchet** grâce à qui j'ai obtenu une place au bâtiment SN3.

Monsieur le **Pr. A. Dhainaut**, vous m'avez gardé au **laboratoire de Phylogénie moléculaire des annélides** lorsque vous en avez pris la direction. Une grande partie de mes travaux s'est d'ailleurs effectuée dans ce laboratoire. Vos précieux conseils m'ont permis d'éviter de nombreux obstacles que j'ai rencontrés dans mes travaux. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma profonde gratitude.

J'exprime mes plus vifs remerciements au **Pr. J. Malecha** qui m'a fait bénéficier d'une collaboration fructueuse au sein du groupe de recherche qu'il dirige.

A Monsieur **J.C. Beauvillain Directeur de Recherche à l'INSERM (Université de Lille II)**, qui me fait l'honneur d'être un des membres de jury de cette soutenance, j'exprime ma profonde gratitude.

Michel Salzet, tu as toujours été disponible pour m'aider. Les peptides que tu m'as fournis m'ont permis de progresser dans mes travaux. Reçois toute mon amitié et mes plus vifs remerciements.

J'adresse mes sincères remerciements aux **Prs. J.P. Godard et J.M. Mairie** pour avoir mis à ma disposition le laboratoire qu'ils dirigent à l'**Ecole des Hautes Etudes Industrielles de Lille**.

J'exprime toute ma reconnaissance pour l'aide technique que j'ai reçue au **laboratoire de Phylogénie moléculaire des annélides**.

SOMMAIRE

Introduction :

L'osmorégulation chez les vers marins

I -	Préambule	1
II -	Comportement des vers marins en rapport avec la baisse de salinité de leur environnement naturel.	2
III -	Réponses des espèces euryhalines. Notions d'osmorégulation et d'osmoconformité.	3
IV -	Réponses des espèces sténohalines.	5
V -	Mécanismes d'adaptation aux faibles salinités chez les osmorégulateurs et les osmoconformistes hyperosmotiques	6
	V.1. Mécanismes de régulation osmotique et ionique chez les osmorégulateurs.	
	V.2. Mécanismes d'adaptation aux faibles salinités chez les osmoconformistes hyperosmotiques.	7
	V.3. Conclusion.	
VI -	Contrôle neuroendocrinien de l'osmorégulation	8

Objectifs de l'étude

9

Matériels et Méthodes

11

I -	Matériel biologique	
II -	Antisérums	
III -	Immunocytochimie	
	I.1. Coupes à la paraffine	
	II.2. Coupes au cryostat	
	III.3. Application de la technique	12
IV -	Reconstitution assistée par l'ordinateur	12
V -	Expériences physiologiques	12

Résultats

14

I -	Caractéristiques morphologiques et immunocytochimiques	
	I.1. Peptide apparenté à l'Angiotensine II (AII*)	
	I.2. Peptide apparenté à l'Angiotensine I (AI*)	15
	I.3. Peptide apparenté à l'Ocytocine (OT*)	16

II -	Reconstitution tridimensionnelle des structures internes du cerveau	16
III -	Etudes physiologiques	17
	III.1 Effets des anticorps	
	III.2 Effets des peptides synthétiques	18
IV -	Illustrations (fig 1 à 8; tabl. 1)	18bis-27
	Discussion	28
	Conclusion générale	32

Introduction

INTRODUCTION :

L'OSMOREGULATION CHEZ LES VERS MARINS

I - Préambule

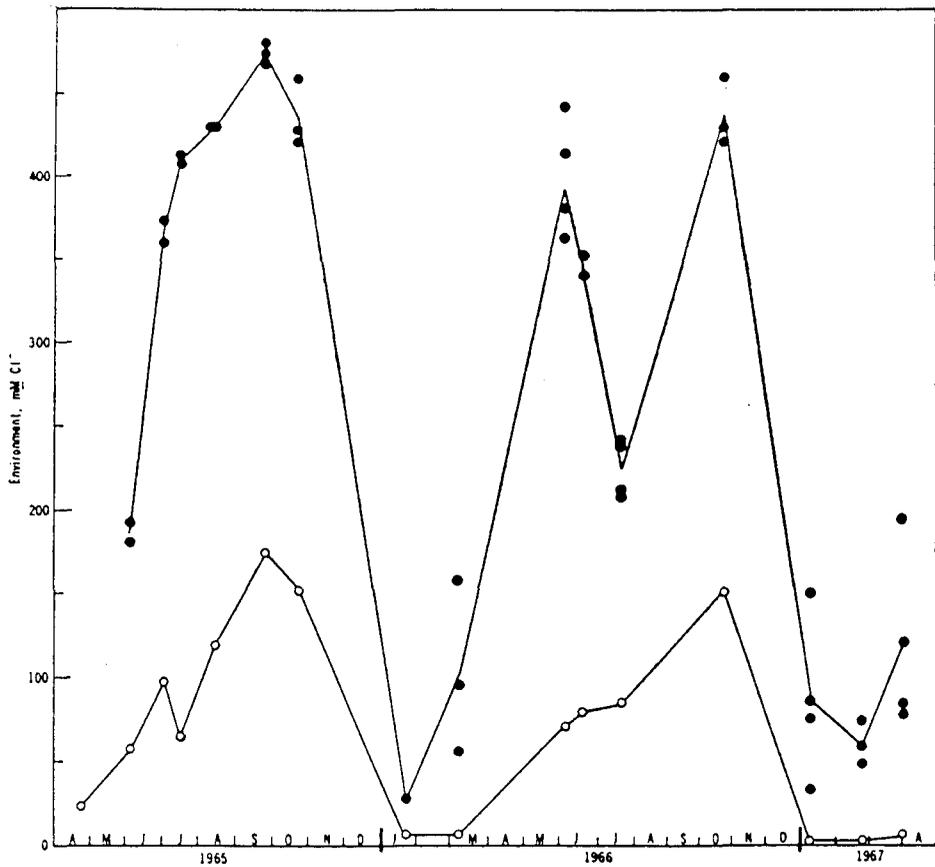
Les vers marins sont essentiellement constitués d'annélides et animaux apparentés (sipunculiens et échiuriens) qui vivent dans les eaux marines ou saumâtres couvrant une étendue qui va des estuaires jusqu'au large des côtes océaniques. Les polychètes, à quelques rares exceptions près, forment la majeure partie des annélides marins. Quelques rares espèces d'annélides oligochètes comme *Clitellio arenarius* (Müller) font partie des vers marins.

La plupart de ces vers vivent dans des estuaires et d'autres milieux saumâtres où ils sont exposés aux fréquents changements de marée.

La polychète errante *Nereis diversicolor* en est un exemple. Cette espèce de *Nereidae* est largement répandue dans le monde et se rencontre dans les vases plus ou moins polluées depuis la mer baltique, le nord-ouest de l'Europe et le nord-est de l'Amérique du nord jusqu'à la méditerranée, la mer noire et la mer caspienne (Smith, 1977). D'autres *Nereidae* comme *Nereis virens* et *Nereis limnicola* sont moins largement distribuées. *Nereis virens* se rencontre dans les lagunes de l'océan atlantique nord. *Nereis limnicola* a été localisée dans le sable vaseux des estuaires de l'Oregon en Amérique (Oglesby, 1968a). Les estuaires abritent aussi des polychètes sédentaires. Celles appartenant à la famille des *Arenicolidae* sont largement répandues à travers le monde et se rencontrent dans les marécages et surtout dans le sable vaseux de certaines plages des côtes océaniques (Wells, 1963). Quelques espèces oligochètes font aussi partie de la faune des estuaires.

Les autres vers marins non présents dans les estuaires vivent dans les eaux marines, au large des côtes. Parmi ceux-ci se trouvent de nombreuses familles d'annélides polychètes errantes à l'exemple des *Glyceridae*, *Nephtyidae* et *Eunicidae*. Certains oligochètes comme *Clitellio arenarius* sont aussi présents en milieu marin; cette espèce animale se rencontre généralement sur les parois rocheuses ou dans les fentes rocheuses situées aux endroits où les changements de marée sont fréquents. Les sipunculiens et les échiuriens qui sont apparentés aux annélides par certains traits de leur anatomie et leur structure larvaire, sont tous marins.

La variation de la salinité est l'une des caractéristiques des eaux estuariennes. Cette variation est en rapport avec les saisons ou les changements de marée. Les vers qui y vivent sont donc exposés à des fluctuations plus ou moins importantes de la salinité. Lorsque ces fluctuations se traduisent par une baisse de salinité, elles créent chez ces animaux un choc que l'on qualifie le plus souvent de stress hypoosmotique, stress auquel ils doivent faire face pour leur survie. Suite à ce



Chloride concentration of habitat of *Nereis limnicola* at Schooner Creek, Oregon, in 1965-67. Solid circles indicate values for seep water into holes dug for worms; open circles, values for bottom water in the middle of Schooner Creek at low tide, adjacent to worm diggings.

Figure I (in Oglesby, 1968 a)

stress, le comportement de ces animaux varie d'une espèce à l'autre et a été bien étudié par de nombreux auteurs. Parfois, les fluctuations vont aussi dans le sens de l'augmentation de la salinité du milieu; le comportement des vers dans ces conditions a été très peu envisagé.

La salinité des eaux au large des côtes marines ne varie, par contre, que légèrement. Cette variation est souvent due aux changements de marée. Les vers de ce milieu ne luttent pas en général pour leur survie parce qu'ils se trouvent dans des conditions de salinité moins contraignantes.

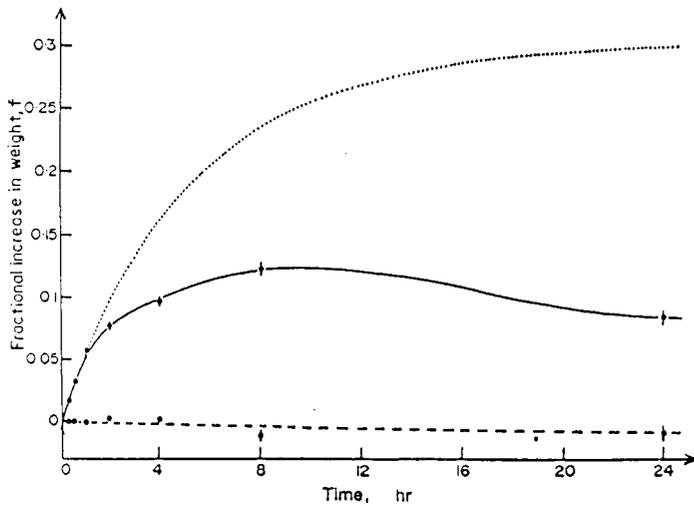
Dans les paragraphes suivants, nous prendrons en exemple quelques espèces dont nous étudierons le comportement dans des conditions de choc hypoosmotique ainsi que les mécanismes d'adaptation mis en oeuvre dans le milieu naturel.

II - Comportement de vers marins en rapport avec la baisse de salinité de leur environnement naturel.

Les études concernant la réponse des vers marins à l'altération de la salinité de leur environnement ont été en grande partie effectuées chez les espèces vivant dans les estuaires à cause des variations importantes de la salinité de ce milieu. En milieu estuarien, dans les endroits où la salinité est fortement réduite, on rencontre en majorité des espèces dites euryhalines parce qu'elles supportent bien les fluctuations très importantes de salinité auxquelles elles sont en permanence confrontées.

Les estuaires sont souvent alimentés en eau douce par des rivières et fleuves venant du continent. Pour cela, les variations saisonnières du flux de ces cours d'eau constituent l'une des plus importantes sources de variations de la salinité des eaux de ce milieu. A titre d'exemple, nous citerons une étude effectuée de 1965 à 1967 à Schooner Creek, dans l'estuaire de Siletz Bay (Oregon, USA), sur l'une des côtes de l'océan pacifique. La figure I est une illustration des variations de la salinité des eaux de Schooner Creek dues aux variations saisonnières du flux de Siletz River qui est la principale source d'eau douce de cet estuaire. On remarque sur cette figure que les variations de salinité atteignent les eaux interstitielles infiltrées dans les galeries où s'abritent les vers. Les pluies, quand elles sont fortes, sont une source de baisse rapide de salinité dans les estuaires. Il y a souvent émergence des vers à marée basse et immergence à marée haute. Ces variations de salinité sont toutefois moins importantes que les variations saisonnières décrites ci-dessus. Il est important de souligner aussi qu'à marée basse l'évaporation élève la salinité des eaux dans les estuaires (Johnson, 1967).

A l'inverse de celles des estuaires, les eaux au large des côtes océaniques sont caractérisées par une salinité qui ne varie que légèrement avec les changements de marée. On y trouve en majorité des espèces dites sténohalines parce qu'elles vivent dans des conditions définies de salinité d'eau. Les variations importantes de salinité sont vraisemblablement dangereuses, voire létales pour ces vers. Il convient



Fractional changes of weight of animals transferred from 70% sea water to 50% sea water (full line) or to 70% sea water (broken line), shown as means \pm S.E. Theoretical behaviour of animals lacking volume control shown by dotted line, asymptotic to $f = 0.3068$.

Figure II (in Fletcher, 1974 a)

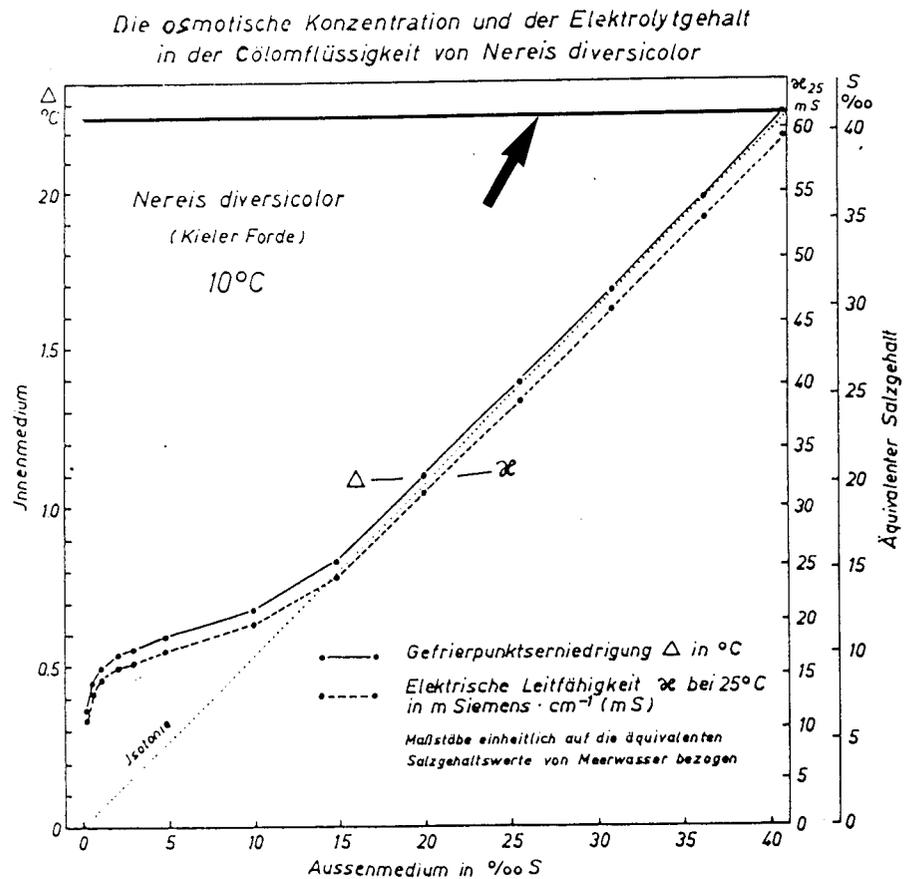


Figure III (d'après Hohendorf, 1963; modifiée par Fewou). La flèche indique la courbe théorique d'un osmorégulateur parfait.

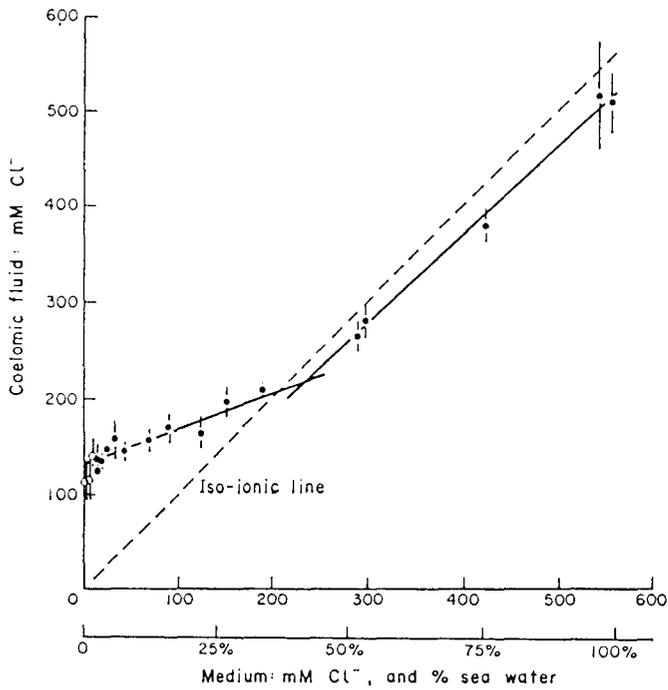
cependant de noter qu'à marée basse, la pluie entraîne quelquefois une baisse sensible de la salinité de ce milieu (Oglesby,1981).

Utilisant des dilutions d'eau de mer artificielle pour créer en laboratoire des conditions de variation de salinité semblables à celles du milieu naturel, de nombreux auteurs ont étudié les réponses des vers euryhalins et sténohalins au choc hypoosmotique.

III - Réponses des espèces euryhalines. Notions d'osmorégulation et d'osmoconformité.

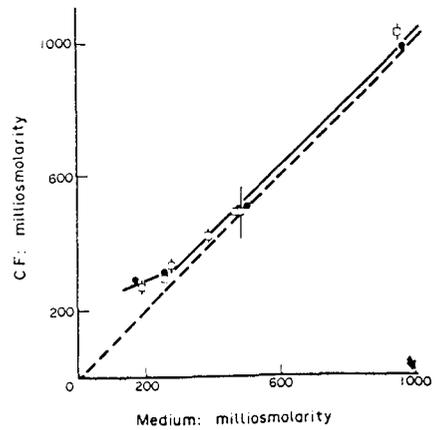
Nereis diversicolor est le modèle biologique le plus utilisé dans ces études parce que, dans son milieu naturel, cette espèce vit dans des conditions de variation de salinité les plus extrêmes. Dans les conditions expérimentale, elle peut résister dans une marge de salinité allant de l'eau douce à au moins 200% d'eau de mer normale (Oglesby, 1969a). Lorsque cet animal est transféré de 70% à 50% d'eau de mer normale (Fletcher,1974), on observe une phase initiale d'augmentation importante et rapide du volume corporel jusqu'à un maximum (augmentation due à un important influx d'eau) suivie d'une phase de diminution lente de ce volume (diminution traduisant un efflux d'eau) jusqu'à un nouvel état d'équilibre où le poids corporel reste stable (fig.II). Oglesby(1969b) observe que chez un grand nombre d'espèces euryhalines et spécialement chez les *Nereidae* des estuaires, une grande partie de l'excédent d'eau prise pendant la phase initiale d'influx est perdue pendant toute la durée du plateau de diminution de volume corporel qui suit. La tendance au retour à une teneur d'eau beaucoup plus basse, 1 à 3 jours après transfert hypoosmotique, est un signe de régulation volumique. D'après cet auteur, les espèces qui régulent le mieux leur volume hydrique prennent le moins d'eau possible pendant la phase initiale d'influx, gardent leur plateau de diminution de volume beaucoup plus bas et retournent rapidement au volume du nouvel état d'équilibre, pour un transfert hypoosmotique donné. D'après ce critère, *Nereis diversicolor* est un bon osmorégulateur. Ceci a d'ailleurs été confirmé par de nombreuses études (Smith,1955,1970a; Hohendorf,1963; Oglesby,1970). En effet, chez cette espèce, la régulation hyperosmotique commence lorsque la salinité du milieu extérieur passe en dessous de 35% d'eau de mer normale (salinité à 15‰). A la suite de cette régulation, la concentration du liquide coelomique se maintient à un niveau beaucoup plus élevé que celui du milieu extérieur.

Aux salinités externes extrêmement basses, la concentration du liquide coelomique reste maintenue à environ 1/4 à 1/3 de celle de l'eau normale. En revanche, aux salinités du milieu extérieur supérieures à 35% d'eau de mer normale, les variations de la concentration du liquide coelomique suivent celles du milieu extérieur (fig.III); il y a donc osmoconformité du liquide coelomique par rapport au milieu extérieur. *Nereis diversicolor* dans cet état est qualifiée d'osmoconformiste.



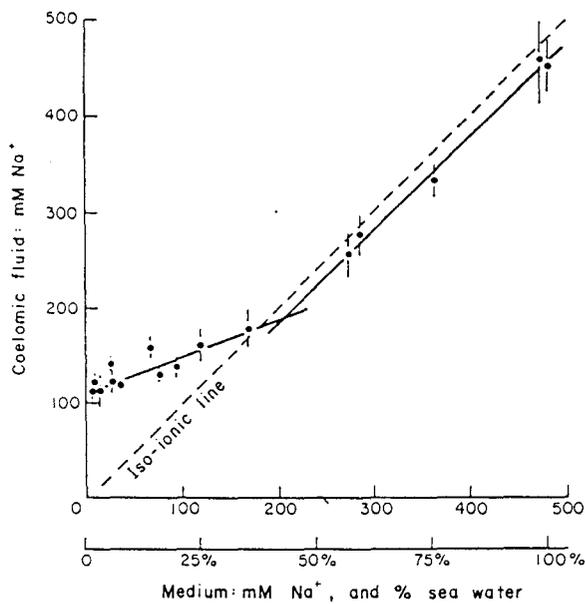
a Relationship of chloride concentration in coelomic fluid of *N. diversicolor* to environmental chloride, after adaptation to various salinities. Worms from River Wansbeck estuary. ●, sampled between September 1967 and January 1968; ○, sampled in autumn 1968 (data of R. I. Smith). $T = 14-18^{\circ}\text{C}$.

Figure V (in Oglesby *et al.*, 1982)



Relationship of osmotic concentration of the coelomic fluid of *Nereis virens* to that of the medium. Dashed line indicates equal internal and external concentration. Open squares, data from Marine Biological Laboratory, summer 1975 ($N = 58$); solid circles, data from Williamsburg, spring 1976 ($N = 38$). Solid lines are least squares regression lines. Vertical lines are ± 1 SD. Arrow indicates 100% seawater.

Figures IV a et b (in Oglesby, 1970)



b Relationship of sodium concentration in coelomic fluid of *N. diversicolor* to environmental sodium, after adaptation to various salinities. Worms from River Wansbeck estuary (September 1967–January 1968). $T = 14-18^{\circ}\text{C}$.

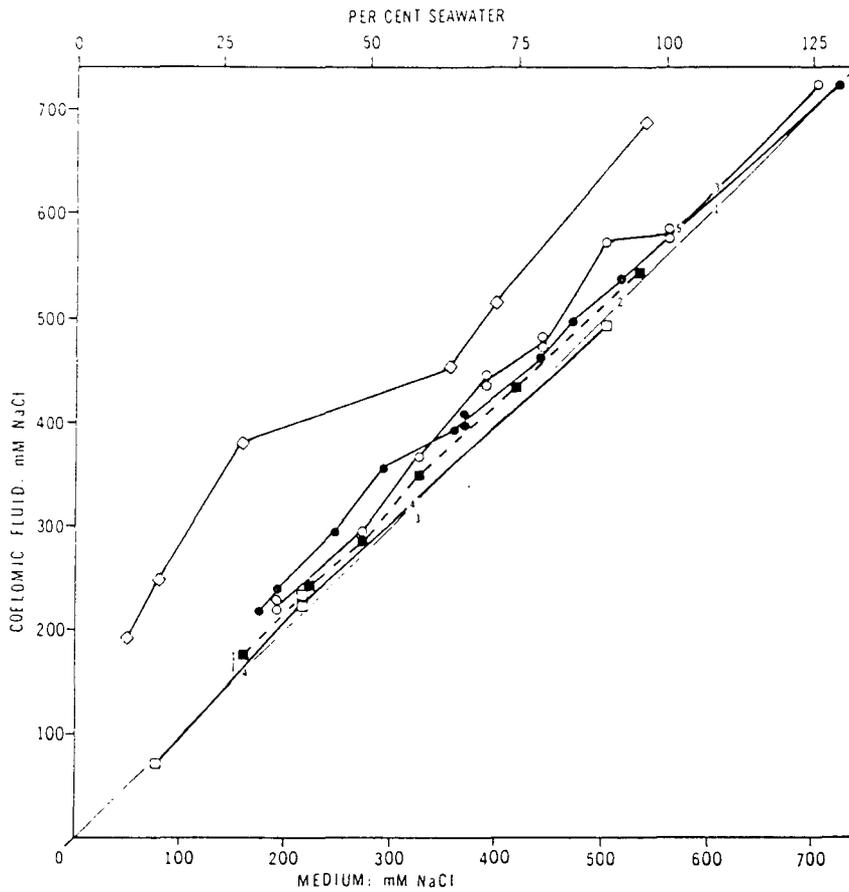
La courbe de variation de la concentration du liquide coelomique de ce *Nereidae* en fonction de la variation de salinité externe ne ressemble pas à celle d'un osmorégulateur dit parfait (fig.III); *Nereis diversicolor* est plutôt un osmorégulateur partiel. C'est d'ailleurs le cas des vers marins osmorégulateurs.

Par ailleurs, une étude sur les variations de l'abaissement cryoscopique et des teneurs ioniques du liquide coelomique en fonction de la salinité externe a montré que la régulation osmotique du milieu intérieur de *Nereis diversicolor* s'accompagne d'une régulation de tous les ions (De Leersnyder,1971). Oglesby (1970) a observé chez ce *Nereidae* une régulation hyperionique pour Na⁺ et Cl⁻ aux salinités externes inférieures à 25%-35% d'eau de mer normale et une osmoconformité hyperionique pour les 2 ions aux salinités externes plus élevées(fig.IV).

Des études sur le comportement en milieu hypoosmotique ont été effectuées chez 4 espèces de *Nereidae* (Oglesby,1965,1968b) comprenant, en plus de *Nereis diversicolor*, 3 espèces euryhalines vivant dans les estuaires : *Nereis (Hediste) limnicola* Johnson, *Laeonereis culveri* (Webster) et *Nereis (Neanthes) succinea* Leuckart. Il a été retrouvé chez ces 3 espèces certaines similitudes avec *Nereis diversicolor* : la régulation hyperosmotique commence lorsque la salinité du milieu extérieur passe en dessous de 36% d'eau de mer normale, pour s'effondrer aux salinités inférieures critiques d'environ 1 à 3% d'eau de mer normale. Aux salinités externes supérieures à 36% d'eau de mer normale, ces 3 *Nereis* euryhalines sont osmoconformistes isoosmotiques. La régulation hyperionique pour Cl⁻ a été observée chez *Nereis limnicola* aux salinités du milieu extérieur inférieures à 30% d'eau de mer.

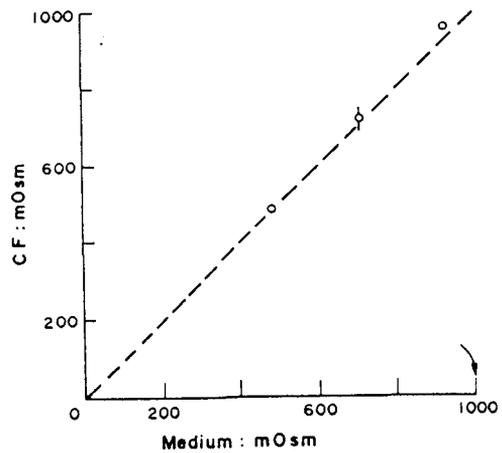
Nereis virens que l'on rencontre aussi bien dans les estuaires que dans les eaux marines peut, en condition expérimentale, survivre dans une marge de salinité de 15 à 100% d'eau de mer. Elle est moins euryhaline que *Nereis diversicolor*, *Nereis limnicola*, *Laeonereis culveri* et *Nereis succinea*. Oglesby (1982) a observé chez cette espèce une légère régulation hyperosmotique et hyperionique pour Na⁺ et Cl⁻. La régulation hyperosmotique se met en place aux salinités du milieu extérieur en dessous de 25% d'eau de mer normale et s'effondre aux salinités inférieures à 15% d'eau de mer normale. Par contre, aux salinités externes supérieures à 25% d'eau de mer normale, *Nereis virens* est osmoconformiste légèrement hyperosmotique (fig.V). Les niveaux de régulation hyperosmotique et hyperionique chez cet animal sont en général très inférieurs à ceux observés chez *Nereis diversicolor*, *Nereis succinea* et *Nereis limnicola* (Oglesby,1969b,1978).

Dans des conditions de laboratoire, les arénicoles survivent aux salinités d'au moins 23% d'eau de mer, mais ne peuvent, en milieu naturel, résister longtemps aux salinités inférieures à 50% d'eau de mer normale (Oglesby,1973). Ces vers sont



Relationship of osmotic concentrations in coelomic fluids of lugworms to osmotic concentrations of external medium: *Arenicola marina*: solid circles, White Sea (Belyaev, 1957); open circles, Barents Sea (Belyaev, 1957); open squares, Kiel and Helgoland (Schlieper, 1929); 1, Plymouth and Bangor (Beadle, in Wells and Ledingham, 1940); 2, Naples (Quinton, 1900); 3, Roscoff (Duchâteau-Bosson, Jeuniaux, and Florkin, 1961); 4, White Sea (Ginetzinsky, 1959); 5, (Krukenberg, in Ashworth, 1904); *Arenicolides branchialis*: open diamonds, Sea of Azov (Zenkevich, 1938a, 1938b); *Albarenicola pacifica*: solid squares, Coos Bay (this report).

Figure VI (in Oglesby, 1973)



Relationship of osmotic concentration of the coelomic fluid of *Phascolopsis gouldi* to that of the medium. Dashed line indicates equal internal and external concentration. Vertical lines are ± 1 SD deviation. Arrow indicates 100% seawater.

Figure VII (in Oglesby, 1982)

moins euryhalins que *Nereis vivens*. Dans les limites de salinité de survie, la concentration du liquide coelomique de *Abarenicola pacifica* et celle d'*Arenicola marina* varient avec la salinité du milieu extérieur dans les mêmes proportions tout en se maintenant aux valeurs toujours plus élevées par rapport à ce milieu. Ceci montre une limitation importante de la capacité d'osmorégulation. Ces 2 espèces d'arénicoles sont osmoconformistes hyperosmotiques. Ce comportement est vraisemblablement commun à toutes les arénicoles (fig.VI). Il a par ailleurs été observé que le liquide coelomique d'*Abarenicola pacifica* était légèrement hypoionique au milieu extérieur à toutes les salinités. La régulation ionique semble en général aussi limitée dans cette famille de polychètes.

Clitellio arenarius est isoosmotique en eau de mer normale, mais osmoconformiste hyperosmotique en milieu dilué. Cet annélide oligochète est hyperionique pour Na^+ et K^+ et hypoionique pour Cl^- en eau de mer normale ou diluée dans les conditions expérimentales (Oglesby,1978; Ferraris et Schmidt - Nielsen,1982; Ferraris,1984).

En résumé, les régulations hyperosmotiques et hyperioniques aux faibles salinités, couplées à l'osmoconformité aux salinités élevées, semblent être chez les vers euryhalins osmorégulateurs la réponse adaptée aux variations de la salinité de leur environnement naturel. Par ailleurs, chez les vers les moins euryhalins comme les arénicoles, l'absence d'osmorégulation hyperosmotique est compensée par une osmoconformité hyperosmotique. Ces vers, par ce moyen, maintiennent plus élevée la concentration du liquide coelomique par rapport au milieu extérieur dans les limites de salinité de survie.

IV - Réponses des espèces sténohalines

Les marges de salinités tolérées sont très réduites chez la plupart des vers sténohalins à l'exemple des sipunculien, échiuriens et quelques espèces polychètes comme *Nereis vexillosa* et *Phyllodoce maculata*. A titre d'exemple, la marge de salinités tolérées par le sipunculien *Phascolopsis gouldi* va de 100 à 45% d'eau de mer. A toutes les salinités de survie, cette espèce animale est osmoconformiste, mais isoosmotique, puisque la concentration du liquide coelomique est semblable à celle du milieu extérieur (fig.VII). Pour cette raison, on l'a comparée à tort à un simple osmomètre, parce qu'en réalité, cet animal possède des capacités limitées de régulation volumique aux salinités supérieures à 58% d'eau de mer. Une absence de régulation ionique a aussi été notée chez *P.gouldi* (Oglesby,1982). Trois autres sipunculien, *Themiste dyscrita* (Oglesby,1968b; Foster,1970), *Phascolosoma arcuatum* (Green et Dunn,1976) et *Physcosoma lurco* (Harms et Dragendorff,1933) sont osmoconformistes isoosmotique tout comme *Nereis vexillosa* (Oglesby,1965).

Après toutes ces observations, nous pouvons dire que les vers sténohalins, contrairement aux euryhalins, ont des capacités très réduites de résistance aux variations de la salinité de leur milieu naturel. En effet, en réponse aux variations de salinité externe, dans les limites de salinité de survie de ces animaux, les mouvements d'eau et d'ions suivent, à travers leur tégument, la direction imposée par le gradient de concentration pour restaurer l'équilibre de concentration de part et d'autre de la paroi corporelle. Ce sont, pour la plupart, des osmoconformistes isoosmotiques et, à ce titre, ils n'ont aucun moyen de survie aux salinités extrêmes.

Nous verrons au paragraphe suivant les mécanismes par lesquels, d'une part, s'opèrent les régulations hyperosmotiques et hyperioniques chez les vers osmorégulateurs et, d'autre part, comment le liquide coelomique reste hypertonique par rapport au milieu extérieur dans les limites de salinité de survie chez les vers osmoconformistes hyperosmotiques.

V - Mécanismes d'adaptation chez les osmorégulateurs et les osmoconformistes hyperosmotiques

V.1.Mécanismes de régulation osmotique et ionique chez les osmorégulateurs.

Les moyens physiologiques par lesquels les vers marins osmorégulateurs s'opposent aux entrées d'eau excessives et maintiennent l'hypertonie du liquide coelomique quand ils sont transférés d'un milieu de salinité relativement élevée à un milieu de salinité beaucoup plus faible ont fait l'objet de nombreuses investigations effectuées en général chez les *Nereidae*. Il ressort de ces études que les mécanismes de régulation osmotique et ionique incluent :

- Un transport actif des sels du milieu extérieur vers le liquide coelomique. Un transport contre le gradient de concentration à travers la paroi corporelle de Na^+ (Oglesby, 1972) et de Cl^- (Smith, 1970a) a été observé chez *Nereis diversicolor*. Mangum et Saintsing (1979) et Mangum, *et al.* (1980) ont observé chez *Nereis succinea* une augmentation importante de l'activité Na^+, K^+ ATPases au niveau des parapodes antérieurs lorsque ce ver a été transféré dans un milieu de salinité faible où s'effectue la régulation hyperosmotique. Cette observation a conduit ces auteurs à situer le lieu de transport du Na^+ au niveau des parapodes antérieurs.

- Une réduction de la perméabilité à l'eau et aux sels de la surface corporelle. Oglesby (1968a) a observé, chez *Nereis limnicola*, une baisse de la perméabilité au Cl^- après un transfert hypoosmotique. La perméabilité de la paroi corporelle de *Nereis diversicolor* au Na^+ et Cl^- est réduite aux faibles salinités (Smith, 1976). A un transfert hypoosmotique donné, les espèces les plus euryhalines prennent moins d'eau que les espèces sténohalines et démontrent ainsi une réduction de la perméabilité à l'eau de leur surface corporelle (Oglesby, 1969b).

- Une production d'urine hypoosmotique. L'urine de *Nereis diversicolor* est hypoosmotique au liquide coelomique lorsque ce ver est adapté aux très faibles salinités (Smith,1970b). Oglesby(1972) a observé une diminution de la perte urinaire de Na⁺ chez le même animal adapté aux faibles salinités. Smith(1970b) suggère que la production d'une urine hypoosmotique pourrait considérablement réduire le total des pertes salées chez les vers adaptés aux milieux proches de l'eau douce.

V.2. Mécanismes d'adaptation aux faibles salinités chez les osmoconformistes hyperosmotiques.

Les mécanismes d'adaptation aux salinités réduites ont été moins clairement établis chez certains vers osmoconformistes hyperosmotiques que chez les vers osmorégulateurs. Des observations faites par certains auteurs ont permis d'obtenir quelques informations sur les moyens utilisés par les arénicoles pour maintenir l'hypertonicité du liquide coelomique en milieu dilué.

Spaargaren et Weber (1979) ont observé dans le liquide coelomique d'*Arenicola marina*, une diminution de solutés organiques suite au stress hypoosmotique et une augmentation d'électrolytes quand ce ver est placé en milieu de salinité plus élevée. A la suite de ces observations, ces auteurs concluent que la régulation volumique chez cet animal s'explique par l'équilibre de Donnan qui s'établit à travers la paroi corporelle.

Reitze et Schöttler (1989) ont détecté deux principaux mécanismes de régulation volumique chez *Arenicola marina*, suite au stress hypoomotique : l'un est extracellulaire et l'autre intracellulaire. En effet, pendant l'adaptation en milieu de salinité réduite (salinité à 12‰), les cellules de la paroi musculaire de ce ver diminuent de volume et, simultanément, les concentrations cellulaires d'alanine et de glycine baissent aussi. Ces deux acides aminés ont été métabolisés puisque leur diminution est concomitante à l'augmentation considérable de l'excrétion d'ammoniac en milieu dilué. L'importance de l'alanine et de la glycine par rapport aux autres acides aminés présents dans la paroi musculaire de cette annélide polychète avait déjà été signalée (Duchâteau-Bosson *et al.*,1961). La réduction de leurs concentrations intracellulaires suite au stress hypoosmotique avait aussi été observée par Felbeck (1980). Les rôles des acides aminés dans l'osmorégulation chez les invertébrés est bien connu de nos jours (voir, par exemple, Clark,1968,1973).

Rappelons que la régulation hyperosmotique par des substances cellulaires osmotiquement actives telles que les acides aminés libres et certains ions

inorganiques a d'ailleurs été observée chez les mollusques et les crustacés (Pierce et Greenberg,1973; Pierce,1982).

En résumé, le maintien de l'hypertonie du liquide coelomique chez les arénicoles placées en milieu dilué est lié à la régulation volumique intracellulaire dans laquelle le métabolisme de l'alanine et de la glycine joue un rôle important.

V.3. Conclusion

Les vers marins n'ont pas les mêmes capacités de résistance aux variations de salinité externe. Les moyens de résistance qu'ils ont acquis au cours de leur existence sont en rapport avec les problèmes rencontrés en milieu naturel. Ainsi, on note une faible capacité de résistance chez les vers sténohalins puisque la salinité de leur milieu varie très peu. Ils sont, pour la plupart, osmoconformistes isoosmotiques.

Chez les vers euryhalins, par contre, les capacités de résistance sont plus grandes et leur permettent (de survivre, ou en d'autres termes) de s'adapter aux variations importantes de la salinité de leur environnement naturel. Parmi eux, on distingue les osmorégulateurs dont les capacités de résistance sont beaucoup plus grandes et les osmoconformistes hyperosmotiques dont les capacités de résistance sont relativement moins importantes. Les mécanismes d'adaptation aux variations de salinité externe observés chez les vers sténohalins ainsi que chez les vers euryhalins osmorégulateurs ou osmoconformistes hyperosmotiques diffèrent donc nettement.

VI- Contrôle neuroendocrinien de l'osmorégulation.

Très peu de travaux ont été réalisés dans ce domaine et les résultats sont parfois contradictoires.

Les études expérimentales effectuées par De Leersnyder et Durchon (1969) ont abouti à la conclusion que le cerveau de la néréis ne joue aucun rôle dans la balance hydrique. Par contre, chez l'oligochète marin, *Clitellio arenarius*, il a été montré que des facteurs neuroendocriniens sont impliqués dans le maintien, en milieu dilué, de l'hypertonie du liquide coelomique. Ces facteurs agissent en stimulant le prélèvement des ions Na⁺ et Cl⁻, probablement au niveau tégumentaire ou intestinal, et en augmentant le débit urinaire. En effet, en milieu dilué, l'ablation des ganglions cérébroïdes, d'une part, augmente les pertes de Na⁺ et Cl⁻ extracellulaires, et, d'autre part, diminue l'excrétion du liquide extracellulaire (Ferraris et Schmidt - Nielsen,1982; Ferraris,1984).

Objectifs de l'étude

Objectifs de l'étude

L'adaptation de l'annélide polychète *Nereis diversicolor*. OF. Müller (nom actuel : *Hediste diversicolor*) à la vie des estuaires dans un environnement très souvent pollué, est maintenant bien connue.

Des mécanismes de défense contre les pollutions métalliques ou bactériennes ont été détectés chez cet animal puis soigneusement décrits (voir, par exemple, Demuynck *et al.*,1991; Dhainaut-Courtois *et al.*,1991; Septier *et al.*,1991; Demuynck et Dhainaut-Courtois,1993; Salzet-Raveillon *et al.*,1993).

Par contre, s'il a expérimentalement été démontré que cet invertébré euryhalin peut résister sans dommage à de grandes variations de salinité (Hohendorf,1963; De Leersnyder et Durchon,1969; De Leersnyder,1971; Fletcher,1974 a et b; Mangum et Saintsing,1979; Spaargaren et Weber,1979; Costa *et al.*,1980; Costa et Pierce,1983; Pierce *et al.*,1988; Reitze et Schöttler,1989), les processus physiologiques par lesquels se fait le contrôle de l'osmorégulation restent inconnus.

De nombreuses études cytologiques, expérimentales et biochimiques ont pourtant été effectuées chez la néréis.

En effet, les études du système nerveux des annélides polychètes ont été initiées au 19^{ème} siècle (Quatrefages,1865) et sont passées depuis par des étapes variées marquées par le développement et l'application de nouvelles techniques (Dhainaut-Courtois et Golding,1988; Pfannenstiel et Grothe,1988). Il convient de faire un rappel des anciennes études anatomiques et histologiques (revues par Bullock et Horridge,1965; Dhainaut-Courtois,1970; Dhainaut-Courtois et Golding,1988) et des premières descriptions par Scharrer (1936) des cellules neurosécrétrices du cerveau de *Nereis*.

Des études expérimentales effectuées par Durchon et d'autres auteurs (voir, par exemple, Durchon et Joly,1978) ont établi le statut neuroendocrinien du cerveau chez cette annélide polychète et les microscopie photonique et électronique ont de manière corrélatrice permis de décrire les différents types de cellules nerveuses et le complexe neurohémal (revues par Dhainaut-Courtois,1970; Dhainaut-Courtois et Golding,1988; Pfannenstiel et Grothe,1988).

Par ailleurs, des expériences immunocytochimiques ou biochimiques ont permis de détecter et de localiser dans le système nerveux de ce ver des neurotransmetteurs classiques et de nombreux peptides immunologiquement apparentés à ceux des vertébrés (voir, par exemple, Dhainaut-Courtois *et al.*,1986; Dhainaut-Courtois et Golding,1988; Baratte *et al.*, 1990, 1991).

Des reconstitutions partielles de cerveau et de chaîne nerveuse ventrale de *Nereidae* montrant la distribution des noyaux ganglionnaires (bibl.in Dhainaut-Courtois, 1970) ainsi que les neurotransmetteurs conventionnels et les différents types de peptides de vertébrés (Dhainaut -Courtois *et al.*, 1986; Dhainaut-Courtois et Golding,1988) ont été effectuées.

Aucune des études citées ne concerne l'osmorégulation. Il convient toutefois de rappeler que les résultats des études expérimentales effectuées par De Leersnyder et Durchon (1969) indiquaient que le cerveau de la néréis ne devait jouer aucun rôle dans la balance hydrique. Ceci paraît surprenant puisque le contrôle neurohormonal de l'osmorégulation a été établi chez les annélides oligochètes (Takeuchi,1980; Ferraris et Schmidt-Nielsen,1982; Ferraris,1984; Oka *et al.*,1984) et achètes (Malécha,1979,1983; Malécha *et al.*,1986,1989). De plus, chez les achètes, des molécules immuoréactives avec les anticorps dirigés contre l'ocytocine (OT), la vasopressine (VP) et l'angiotensine II (A II) de vertébré, respectivement dénommées "Leech antidiuretic peptide" (LADP) selon la terminologie anglaise, lysine-conopressine et angiotensine II-amide (AII-amide), ont été récemment isolées et caractérisées (Salzet *et al.*,1993 a, b et c; Salzet *et al.*,1995). Il a été clairement démontré dans ce groupe d'annélides que les molécules immunoréactives citées ci-dessus jouent un rôle dans le contrôle volumique.

Il a donc semblé intéressant de reprendre chez *Nereis diversicolor* les études relatives à l'osmorégulation par des approches immunocytochimiques et expérimentales à l'aide des anticorps et des peptides testés chez la sangsue.

En bref, nous avons poursuivi les travaux d'Holmgren(1916), d'Hanström(1927,1928) et de Dhainaut-Courtois(1970) qui concernent l'architecture du cerveau de *Nereidae* montrant la distribution des noyaux ganglionnaires dans lesquels sont localisées les cellules immunoréactives. Ceci nous a conduit à effectuer, à l'aide d'un ordinateur, une reconstitution tridimensionnelle du cerveau de *Nereis diversicolor* à partir des coupes sériées. De plus, nous avons réalisé cette étude dans le but de rechercher chez cet animal la présence de peptides apparentés à l'angiotensine I(AI), l'AII et l'OT de mammifère et de déterminer, par des expériences physiologiques, le rôle éventuel de ces peptides dans l'osmorégulation chez la néréis.

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

I - Matériel biologique

Des spécimens de *Nereis diversicolor* ont été récoltés au printemps 1994 dans la vase de l'estuaire de l'Aa, à Petit-Fort-Philippe (France). Les vers ont été acclimatés au laboratoire à l'eau de mer normale fournie par le laboratoire de biologie marine de Wimereux, pendant au moins une semaine avant le début des expériences. Des femelles immatures (diamètre ovocytaire 55-76 um et 90-116 um) ont été sélectionnées pour cette étude.

II - Antisérums

Les anticorps polyclonaux dirigés contre l'angiotensine I (a-AI), l'angiotensine II (a-AII) et l'ocytocine (a-OT) de mammifère ont été produits au laboratoire. Ils ont été obtenus par immunisation de lapins avec des peptides synthétiques couplés au sérum albumine humain ou à la thyroglobuline et émulsionnés avec l'adjuvant complet de Freund (Malecha *et al.*,1986; Salzet *et al.*,1993 a et b).

III - Immunocytochimie

Cette étude a été réalisée sur le cerveau et la chaîne nerveuse ventrale en microscopie photonique.

III.1.Coupes à la paraffine

Des prostomiums et des métamères ont été fixés par le liquide de BOUIN-HOLLANDE dépourvu d'acide acétique, auquel a été ajoutée une solution saturée de chlorure mercurique (10%). Après déshydratation dans les alcools et passage dans l'alcool butylique, les pièces ont été incluses dans de la paraffine puis débitées en coupes sériées de 7 um d'épaisseur dans le plan sagittal ou horizontal.

III.2.Coupes au cryostat

Des prostomiums ont été fixés pendant 24 heures dans une solution de paraformaldéhyde à 4% préparée dans le tampon phosphate Sorensen 0,2M, pH 7,2, puis lavés toute la nuit dans le même tampon contenant 15% de sucrose et inclus dans du Tissu Tek (laboratoire Miles, Naperville, Illinois). Les tissus ont ensuite été congelés dans de l'azote liquide puis débités au cryostat en coupes sériées de 10 um d'épaisseur (plan sagittal). Les coupes ont été montées sur des lames gélatinées et brièvement séchées à l'air.

III.3. Application de la technique

Les coupes à la paraffine et au cryostat ont été traitées selon la technique indirecte d'immunocytochimie (ICC) précédemment décrite (Engelhardt *et al.*, 1982; Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985). Des coupes à la paraffine ont été déparaffinées, réhydratées et décolorées dans du métabisulfite de sodium à 2%. Elles ont ensuite été incubées dans des sérums anti-AII, anti-AI et anti-OT alors que des coupes débitées au cryostat ont été incubées uniquement avec des sérums anti-AII et anti-AI. Ces antisérums primaires ont été dilués dans le tampon Coons (pH 7,2) avant d'être utilisés en incubation (12-16 heures, dilution 1/300, 4°C). La spécificité de l'antisérum a été évaluée par des tests d'absorption dans lesquels l'antisérum dilué a été incubé avec l'antigène pendant toute la nuit à une dose de 100 ug d'antigène/ml d'antisérum pur. Après les premières incubations et le lavage au tampon, une deuxième incubation de 4 heures par une dilution dans le tampon Coons au 1/40 d'IgG de mouton anti IgG de lapin conjuguées à la peroxydase de Raifort (Institut Pasteur, Paris) a suivi. La visualisation de l'activité peroxydasique a été effectuée en plongeant les lames dans une solution de 4-chloro-1 naphthol/méthanol froid (4ml/200ml de tampon Tris-HCl 0,1M pH 7,6/0,02% H₂O₂). Les comparaisons entre les réactions immunologiques et les colorations histologiques ont été effectuées par décoloration avec l'acétone (Tramu *et al.*, 1978) des coupes marquées suivie que d'une coloration selon la méthode de Clark (1955) modifiée, dans laquelle le chromotrope 2R a été remplacé par l'hématoxyline de Groat (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986).

IV - Reconstitution assistée par ordinateur

Des tissus ont été fixés au Bouin-Hollande sans acide acétique pendant 24 heures, puis inclus dans de la cytoparaffine et débités en coupes horizontales sériées de 7, um d'épaisseur. Des coupes de prostomium ont été colorées selon la méthode de Clark (1955) modifiée comme décrit ci-dessus. Ces coupes ont été par la suite observées puis photographiées.

Des images de coupes sériées du cerveau projetées à l'aide d'un projecteur de négatifs (négatifs obtenus après développement des films en laboratoire photo) ont été reproduites sur des papiers millimétrés CANSON. Une reconstitution tridimensionnelle a été effectuée à partir des images de coupes sélectionnées de cerveau, selon les méthodes CATIA (Conception Assistée Tridimensionnelle Inter Active) système DASSAULT (France) précédemment décrites (Palluault *et al.*, 1991; Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995).

V - Expériences physiologiques

Cette étude a été réalisée pour la première fois chez des *Nereis diversicolor* femelles ayant un diamètre ovocytaire de 90-120 um. Des vers acclimatés à l'eau

de mer normale ont été individuellement séchés légèrement sur papier filtre puis pesés quelques minutes avant l'expérimentation, et leurs poids ont été enregistrés (poids initial). Ils ont été ensuite répartis en groupes de vers traités et groupes de vers témoins de 10 à 20 animaux par groupe. Des tests différents ont été successivement entrepris :

Dans un premier test, 10 ul de sérum brut non dilué contenant des anticorps a-AII, a-AI ou a-OT ont été injectés dans le coelome de chaque animal traité appartenant respectivement aux groupes a-AII, a-AI et a-OT avant le transfert en eau de mer diluée.

Dans un second test, les animaux traités ont reçu en injection de 10 ul d'une solution à 10 nmol/ml, soit de peptide synthétique (Neosystem) correspondant à l'angiotensine II-amide (groupe AII-amide) isolée chez *Erpobdella octoculata* (Salzet *et al.*,1995), soit d'angiotensine II synthétique (Sigma)(groupe AII). Les solutions citées ci-dessus ont été obtenues par dilution de peptides synthétiques avec de l'eau de mer normale et, pour cette raison, les animaux témoins (groupe Placebo) ont reçu en injection de 10 ul d'eau de mer normale.

Dans les deux tests, des groupes de vers témoins n'ayant reçu aucune injection et, soit transférés en eau de mer diluée (groupe CdsW), soit restés en eau de mer normale (groupe CnsW) pendant toute la durée de l'expérimentation, ont été constitués. L'eau de mer diluée à 20% a été préparée par dilution de l'eau de mer normale avec l'eau distillée. Le liquide coelomique des vers était considérablement hyperosmotique par rapport à l'eau de mer diluée.

Les expériences ont commencé quand les animaux de tous les groupes ont été séparément transférés de l'eau de mer normale dans l'eau de mer diluée à 20%, exceptés ceux des groupes CnsW qui sont restés dans l'eau de mer normale. Les variations de poids de ces vers ont été suivies toutes les heures ou toutes les deux heures depuis le début jusqu'à la fin du test avec séchage rapide des vers suivi de pesées individuelles. L'effet du traitement a été estimé en calculant aux intervalles de temps propices qui ont suivi le début du test, la moyenne de variation de masse de chaque groupe de vers évalué en fraction de masse initiale ou masse avant le transfert hypoosmotique. Chaque moyenne de variation de masse a été donnée avec son intervalle de confiance (risque : 0,05). Les différences statistiques entre les groupes de vers traités et les groupes témoins ont été déterminées soit par l'analyse de variance à une voie, soit par le test de Student bilatéral et non apparié (Snedecor et Cochran,1967).

Résultats

Résultats

I - Caractéristiques morphologiques et immunocytochimiques

Les descriptions antérieures du système nerveux central de la néréis ont été nécessaires pour l'identification des structures nerveuses immunoréactives. Il convient ici de rappeler que 3 des 7 principaux types cellulaires des noyaux ganglionnaires du cerveau sont situés dans un même noyau (noyau 20) et que leurs immunoréactivités diffèrent souvent : le type cellulaire II ou cellule unipolaire ayant une nette affinité pour le vert lumière, le type cellulaire Ia ou cellule fuchsinophile (PF+) de petite taille et souvent bipolaire, et enfin le type cellulaire Ib ou cellule PF+ unipolaire et de grande taille (voir, par exemple, Dhainaut-Courtois, 1970).

Les images des coupes dorsales, médianes et ventrales du prostomium, reproduites après projection de négatifs sont représentées par les figures 1(a,b et c); elles montrent la distribution dans un plan horizontal des 26 noyaux ganglionnaires du cerveau (voir aussi la vue tridimensionnelle sur la fig.2). La figure 3 présente une vue horizontale de la chaîne nerveuse ainsi que ses 3 principaux groupes cellulaires (groupe cellulaire antérieur: AG; groupe cellulaire médian : MG; groupe cellulaire postérieur : PG) selon Dhainaut-Courtois et Warembourg(1967) et Dhainaut-Courtois(1970).

La description des immunoréactivités obtenues dans cette étude a été effectuée dans l'ordre suivant : d'abord les immunoréactivités en rapport avec l'angiotensine II (AII), ensuite celles en rapport avec l'angiotensine I (AI) et en troisième position, celles en rapport avec l'ocytocine (OT). La spécificité des immunoréactions a été vérifiée, puisqu'aucun marquage n'a été observé dans les coupes témoins de cerveau et de métamère incubées, soit dans un milieu dépourvu de sérum primaire, soit dans un milieu où le sérum primaire a été préabsorbé par l'antigène. La plupart des antisérums testés ont donné de bons résultats avec cependant quelque différence dans l'intensité du marquage. Les principaux résultats sont résumés dans le tableau 1. Les illustrations présentent des structures, soit fortement marquées, soit d'une importance particulière.

I.1. Peptide apparenté à l'Angiotensine II (AII*)

Les coupes au cryostat et à la paraffine ont montré les mêmes immunoréactions pour l'AII et nous avons choisi de décrire seulement celles des coupes à la paraffine. Les coupes de cerveau des vers plus jeunes (diamètre ovocytaire 55-76 um) et celles des vers plus âgés (90-116 um de diamètre ovocytaire) ont présenté une similitude dans la distribution de l'immunoréactivité des noyaux ganglionnaires mais pas dans celle des tractus nerveux. Ainsi, 2 ou 3 cellules faiblement à modérément immunopositives pour l'AII ont été observées au niveau de quelques noyaux ganglionnaires (les noyaux 4,5,7,9,10,14,15 et 17) des parties antérieure et caudale du cerveau. Plus de 3 péricaryons positivement

marqués ont été observés seulement dans le noyau 20 (fig.4a). Ils ont été identifiés après la coloration de Clark comme appartenant à un petit nombre de cellules de type Ia, petites et PF+, et à une grande cellule PF+ de type Ib. Les fibres nerveuses immunoréactives du cerveau ont été restreintes aux nerfs (nerfs X + XI) et commissure optiques (fig. 4a). Chez les vers plus jeunes, alors que largement distribuées chez les vers plus âgés, elles ont été observées dans un grand nombre de tractus nerveux tels que la région du neuropile située au voisinage de l'aire neurohémale, le neuropile antérieur, le nerf antennaire (nerf II), le nerf sensitif III, les nerfs palpaire (nerfs V et VI) (fig.4b), le collier périoesophagien en plus des nerfs et commissure optiques déjà mentionnés chez les vers plus jeunes.

Seules les coupes de métamères des vers plus âgés ont présenté des réactions immunopositives. Les péricaryons immunopositifs de la chaîne nerveuse ventrale ont été exclusivement observés au niveau de 2 grands corps cellulaires appartenant au groupe cellulaire postérieur. Le cytoplasme de ces cellules a été coloré en vert par la coloration de Clark. Des fibres nerveuses immunoréactives, largement dispersées, ont été observées à l'intérieur de la chaîne nerveuse ventrale, dans le neuropile, la racine du nerf II, les fibres géantes latérales et médianes (IGF et mGF)(fig.5a) et à l'extérieur de la chaîne nerveuse, dans les nerfs périphériques ventraux et parapodiaux (fig.6a). Les structures non nerveuses immunopositives du métamère étaient exclusivement représentées par les cellules épithéliales très souvent situées près des nerfs périphériques.

I.2. Peptide apparenté à l'Angiotensine I (AI*)

L'immunoréactivité pour l'AI a été plus marquée et plus largement distribuée que celle pour l'AII au niveau des cellules du cerveau et de la chaîne nerveuse ventrale. En général, certaines similitudes et une légère différence entre les deux immunoréactivités ont été observées. Les péricaryons du cerveau immunopositifs pour l'AI ont été observés dans les noyaux 9,10,13,14,15,20 et 26. Les péricaryons immunopositifs du noyau 20 ont été limités aux cellules ayant une affinité pour le vert lumière. Les fibres nerveuses immunoréactives du cerveau ont été exclusivement observées dans les nerfs palpaire VI et VII ainsi que dans les nerfs et commissure optiques. A l'extérieur du cerveau, le marquage du prostomium a été observé au niveau de l'organe nuchal (NO) (fig.4g), un organe sensoriel de type chimiorécepteur.

Les structures de la chaîne nerveuses immunoréactives pour l'AI étaient restreintes au neuropile et au groupe cellulaire médian (MG) (fig.5c,d). La coloration de Clark a, par la suite, révélé que l'un des corps cellulaires immunoréactifs du MG était PF+ alors que les autres n'ayant aucune affinité tinctoriale pour la fuchsine paraldéhyde ou pour le vert lumière, appartenaient au type cellulaire C ou type ordinaire. A l'intérieur du métamère, en dehors de la chaîne nerveuse ventrale, l'immunoréactivité était exclusivement présente dans le tissu intestinal (fig.6b).

I.3. Peptide apparenté à l'ocytocine (OT*)

Les immunoréactivités du cerveau et de la chaîne nerveuse ventrale pour l'OT ont été en général bien nettes et plus largement distribuées que celles pour l'AII ou l'AI. Le marquage des coupes de cerveau de vers plus jeunes a été assez semblable à celui des vers plus âgés. Une grande dispersion de péricaryons immunopositifs a été observée d'un bout à l'autre du cerveau. Les principaux noyaux ganglionnaires immunoréactifs pour l'OT ont été représentés par le noyau 4 au niveau antérieur, le noyau 15 au niveau du cerveau moyen (fig.4c) et les noyaux 20 (fig.4c,d) et 21 au niveau du cerveau postérieur. Les péricaryons immunoréactifs du noyau 20 ont été identifiés par la coloration de Clark comme appartenant aux petites cellules PF+ de type Ia (fig.4 e). De nombreux autres noyaux (tels que les noyaux 5,7,8,9,10,13,17,18,22,23,24, et 25) ont été marqués, mais ont présenté chacun seulement 2 ou 3 péricaryons fortement ou modérément immunoréactifs (fig.4c et 6f). Des fibres immunopositives ont été observées dans les pédoncules des *corpora pedunculata* (fig.6f), au bord de la partie antérieure du neuropile située près du noyau 4, à l'intérieur du neuropile au voisinage de l'aire neurohémale et dans quelques terminaisons axonales de la région infracérébrale (ICR). Les vaisseaux sanguins sous-jacents à la glande infracérébrale (ICG) ont aussi été fortement marqués (fig.4c).

Une immunoréactivité importante a été observée dans les coupes de métamère des vers plus âgés. L'immunoréaction de la chaîne nerveuse a été exclusivement présente dans de nombreux péricaryons du groupe cellulaire médian (fig 5b). Ces corps cellulaires étant de type C ou ordinaire (voir, Dhainaut-Courtois et Warembourg,1967 ; Dhainaut-Courtois,1970) n'ont présenté d'affinité ni pour la fuchsine paraldéhyde, ni pour le vert lumière, après la coloration de Clark. Le marquage des structures du métamère à l'extérieur de la chaîne nerveuse a semblé plus intéressant. A ce niveau, l'immunoréactivité a été observée dans les vaisseaux sanguins, les néphridies et quelques cellules intestinales dispersées dans le tissu intestinal (fig.6 c,e). Pour les vers plus jeunes, l'immunoréactivité des coupes de métamère était présente exclusivement dans les péricaryons du MG.

II - Reconstitution tridimensionnelle des structures internes du cerveau

Les structures tridimensionnelles des noyaux ganglionnaires du cerveau ont été déterminées selon les descriptions antérieures de Holmgren(1916) et d'Hanström(1928) révisées par Dhainaut-Courtois(1970). Ces 26 noyaux ganglionnaires forment un anneau de corps cellulaires recouvrant aussi bien les parties dorsales, latérales, ventrolatérales que les bords antéro-et postérolatéraux du neuropile. Leur distribution autour de ce centre fibreux n'est pas homogène. Ainsi, le regroupement le plus important de ces noyaux est observé dans la région postérieure du cerveau (noyaux 15-22)(fig.1a,b et 2c-f). Les noyaux 16-20 et 22 forment dans cette région un amas resserré qui entoure la partie latérale de la

commissure mucale au niveau de la limite postérieure du neuropile (fig.1b). Les noyaux médio-dorsaux (noyaux 8-12) sont dispersés sur la face dorsale du neuropile (fig.2 c,d) alors qu'à la partie latérale du cerveau se trouve un autre regroupement important de noyaux qui s'étend du nerf antennaire (nerf II) jusqu'au voisinage de l'oeil antérieur (noyaux 1-3, 5-7, 13 et 26) (fig.2 a,b).

Ce regroupement est cependant moins resserré que celui observé dans la région postérieure du cerveau. Le long du bord antérieur du neuropile, quelques noyaux antérieurs forment une chaîne qui commence à l'une de ses extrémités par le noyau 4 entourant le nerf stomodéal (nerf I) et se poursuit par les noyaux 23, 24 et 25, lesquels passent respectivement près de la racine ventrale du collier péri-oesophagien, la commissure de celle-ci et la racine des nerfs palpaires (fig. 1c et 2c et d).

La vue tridimensionnelle donne aussi des informations sur la taille et la morphologie des noyaux ganglionnaires. Les noyaux les plus volumineux sont représentés par les noyaux 4, 7, 10, 17, 19, 20 et 26 (fig.2 b-f). A la différence de ces énormes noyaux et les noyaux les plus petits du cerveau que représentent les noyaux 11, 12 et 23 (fig. 2d), les autres noyaux sont de taille relativement moyenne. Certains noyaux ganglionnaires ont une morphologie caractéristique. Ainsi, le noyau 15 possède 2 lobes dorso-ventraux (lobes antérieur et postérieur); le lobe postérieur est le plus grand des deux (fig. 2e). La partie postérieure du noyau 22 forme aussi 2 lobes (fig. 2f). Le noyau 20 est volumineux dans sa partie dorsale et se présente ventralement sous forme de pointe (fig. 2f).

III - Etudes physiologiques.

III.1 - Effets des anticorps. En général, le poids des animaux témoins restés en eau de mer normale a été assez stable tout au long du test (5fig.7 a-c). Par contre, les vers transférés en eau de mer diluée (groupes CdsW, a-AII, a-AI et a-OT) ont pris du poids comme décrit précédemment (De Leersnyder et Durchon,1969 ; Fletcher,1974 a,b) : une augmentation rapide de poids corporel jusqu'à un maximum, suivie d'une baisse lente jusqu'à un nouvel état d'équilibre auquel le poids reste au-dessus de sa valeur initiale. La prise de poids était évidemment due à la rétention d'eau à cause du stress hypoosmotique. Pendant la première heure qui a suivi le transfert hypoosmotique, l'augmentation de poids des groupes a-AII et a-OT a été beaucoup plus faible que celle des animaux témoins en eau de mer diluée (CdsW) et cette différence importante est probablement due à l'injection (fig.7a,b).

L'un des aspects les plus intéressants de cette étude qui mérite d'être souligné est que, pendant toute la durée de l'expérience, l'augmentation de poids corporel des animaux traités (groupes aII, a-OT et a-AI) est restée en général plus faible que celle du groupe témoin CdsW. Cette différence d'augmentation de poids a été très marquée entre les animaux traités des groupes a AII et A-OT et les témoins CdsW (fig.7a,b). En effet, les moyennes d'augmentation de poids corporel de groupes a-

OT et a-AII ont été significativement différentes de celles des animaux témoins (groupe Cds_w) respectivement pendant 10 et 15 heures qui ont suivies le transfert hypoosmotique. Les différences les plus importantes ($P < 0,01$) ont été observées entre les valeurs du groupe témoin Cds_w et celles des groupes a-OT et a-AII respectivement de la quatrième à la cinquième heure (fig.7b) et de la troisième à la dixième heure (fig.7a) pendant l'exposition en milieu hypoosmotique. Ces différences significatives ont clairement exprimé l'inhibition partielle de l'augmentation de poids provoquée par les antisérums polyclonaux anti-AII et anti-OT respectivement dans les groupes a-AII et a-OT. Par contre, aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre le groupe a-AI et le groupe témoin Cds_w (fig.7c); ceci montre l'inefficacité de l'antisérum polyclonal anti-AI.

Il a été rapporté que la modulation volumique chez *Nereis diversicolor* est en rapport avec l'activité des néphridies (Fletcher, 1974 a,b), et notre observation indique que l'effet inhibiteur des antisérums anti-AI et anti-OT se produit au moins partiellement par une augmentation de la diurèse probablement due aux anticorps anti-AII et anti-OT contenus dans les sérums bruts non dilués. Si l'on admet que les anticorps anti-AII et anti-OT sont diurétiques, les peptides immunoréactifs correspondants sont inévitablement antidiurétiques.

La recherche d'évidence supplémentaire concernant le rôle exact de la substance endogène nous a conduit à effectuer, dans un second test physiologique, une injection de peptides synthétiques disponibles (l'AII ou l'AII-amide).

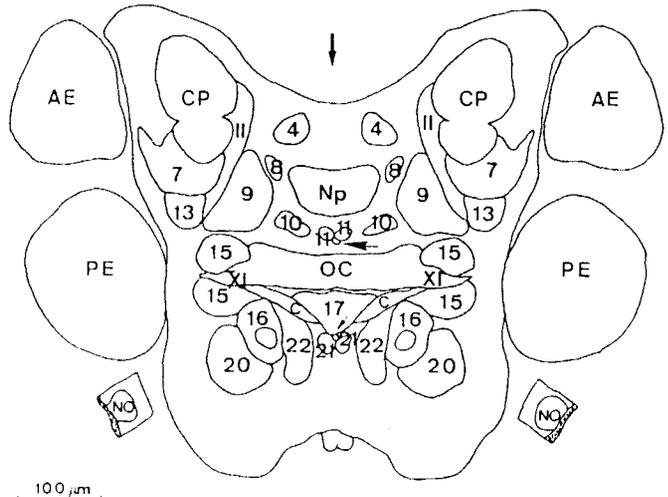
III.2 - Effets des peptides synthétiques. Il est apparu que pendant l'exposition en eau de mer diluée, l'augmentation du poids corporel des vers ayant reçu en injection l'AII (groupe AII) ou l'AII-amide (groupe AII-amide) a été plus importante que celle des animaux témoins (groupes Cds_w et Placebo). Les moyennes d'augmentation de poids des animaux traités (groupes AII et AII-amide) ont été significativement différentes ($P < 0,01$) de celle des témoins Cds_w (fig.8a) ou des Placebos (fig.8b) pendant les 4 heures qui ont suivi le transfert hypoosmotique. A partir de 6 heures jusqu'à 8 heures post-transfert, les différences significatives ($P < 0,05$) ont été observées seulement entre les animaux traités (groupes AII et AII-amide) et le groupe Placebo (fig.8b).

Illustrations

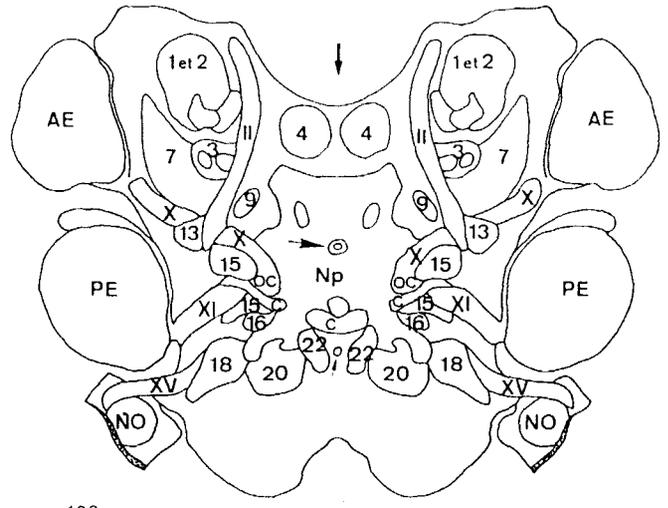
(fig 1 à 8; tabl. 1)

Figure 1. Horizontal view of the nereis dorsal (a), medial (b) and ventral (c) brain sections showing the localization of ganglionic nuclei, nerves and commissures. The large arrows show the antero-posterior direction and the small arrows, the anterior and posterior cœlomic tubes. a, commissure a (which is the ventral commissure of the ventral roots of circumesophageal connective) ; AE, anterior eyes ; C, commissure c (which is the dorsal commissure of the dorsal roots of circumesophageal connective) ; CP, *Corpora pedunculata* ; d, commissure d (which is the ventral commissure of the dorsal roots of circumesophageal connective) ; dC, dorsal roots of circumesophageal connective ; NO, nuchal organs ; NP, neuropile ; OC, optic commissure ; PE, posterior eyes ; v, blood vessels ; vC, ventral roots of circumesophageal connective. The Roman and Arabic numerals respectively show the different nerves and ganglionic nuclei.

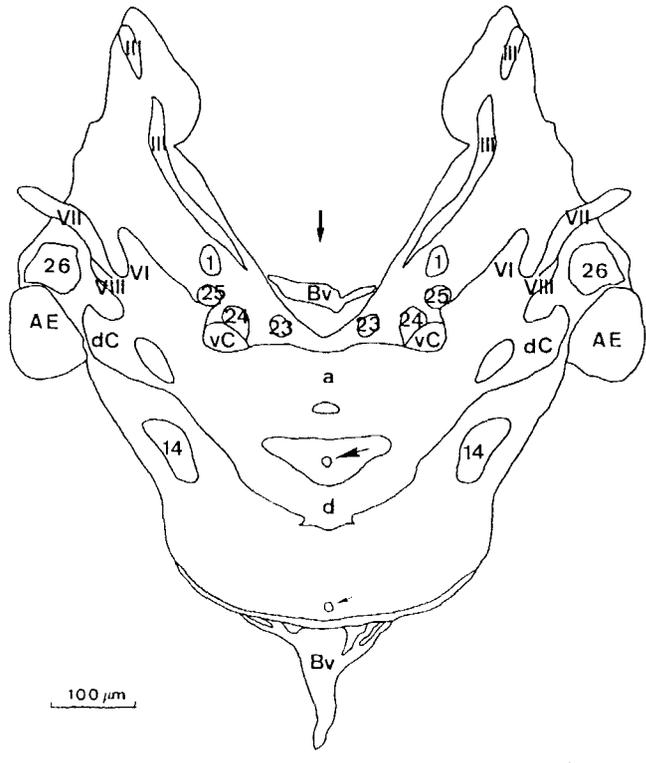
(in Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)



a 100 μm



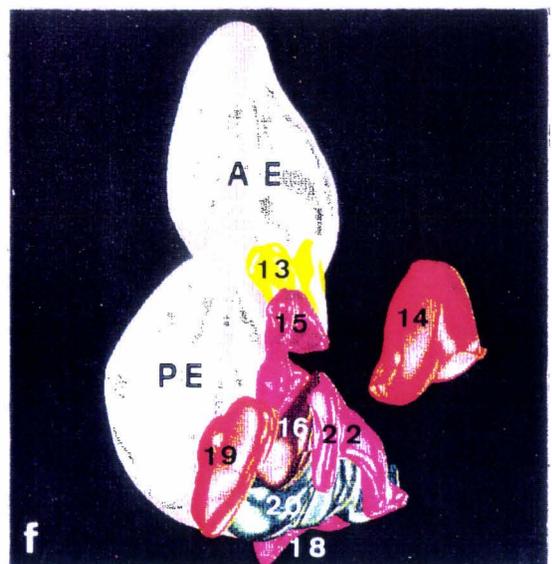
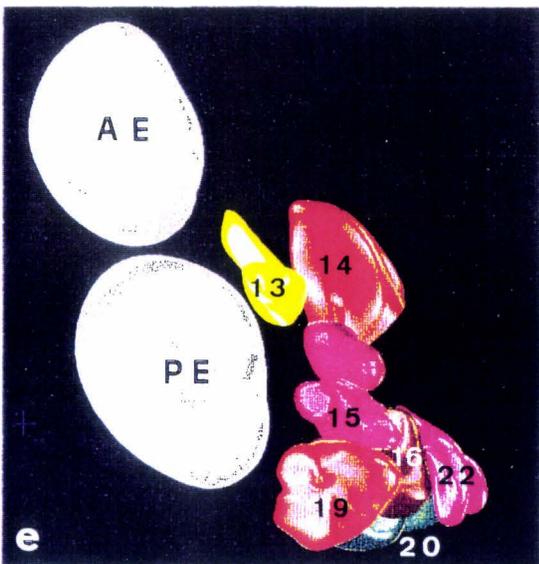
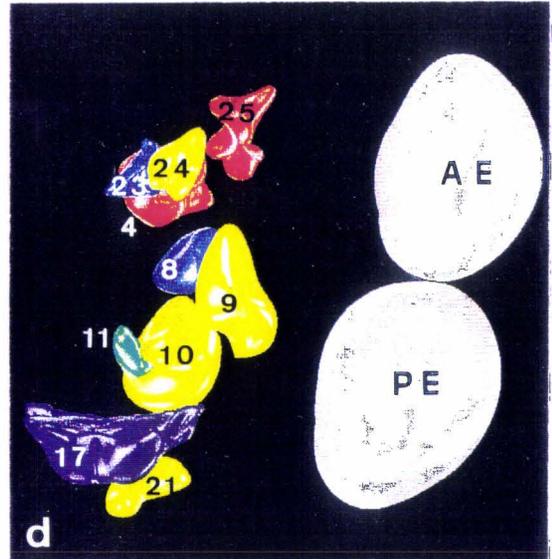
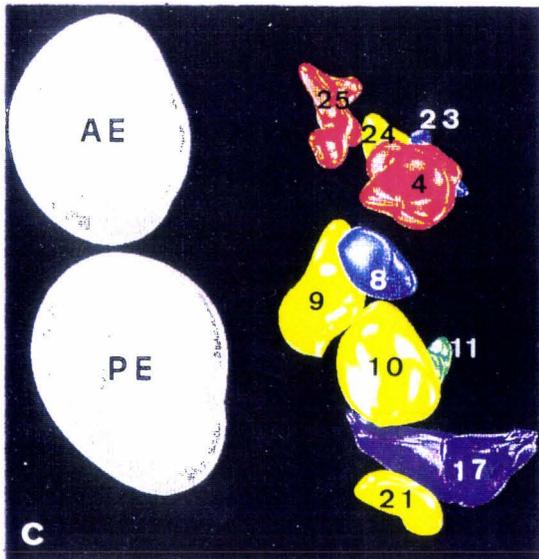
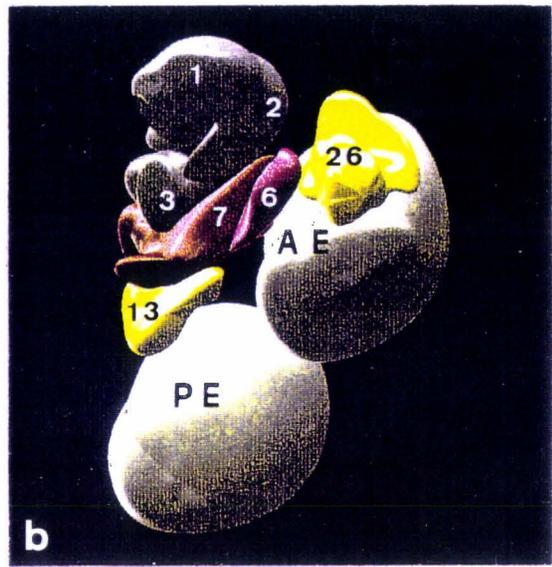
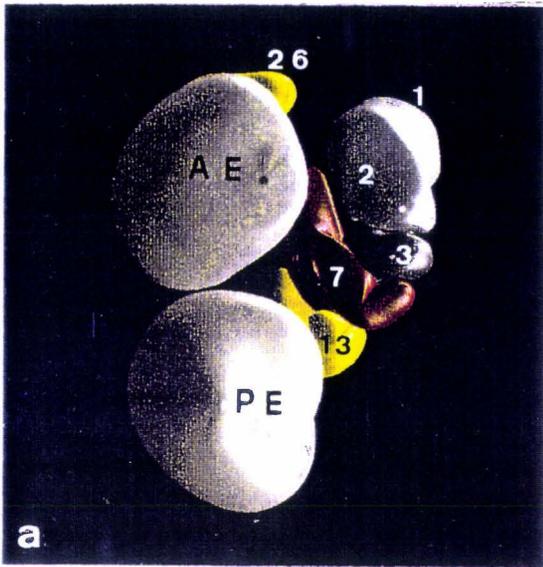
b 100 μm



c 100 μm

Figure 2. Three-dimensional reconstruction of one of the two symmetrical halves of brain ganglionic nuclei in *Nereis diversicolor*. a, b : horizontal views of the brain showing the dorsal (a) and ventral (b) faces of some nuclei of the antero-lateral cluster. The large nuclei 7 and 26 are shown as well as a partial fusion of nuclei 1 and 2, and the well-separated nucleus 3. c, d : horizontal views of the brain showing the dorsal (c) and ventral (d) faces of some anterior, medio-dorsal and posterior nuclei. The voluminous nuclei 4, 10 and 17 are observed as well as the small-sized nuclei 11 and 23. e, f : horizontal views of the brain showing the dorsal (e) and lateral faces (f) of some nuclei of the posterior tightened cluster as well as the lateral nucleus 13 and the tremendous latero-ventral nucleus 14. The anterior and posterior lobes of nucleus 15 are observed as well as the posterior part of nucleus 22 which presents also two lobes. AE, anterior eyes ; PE, posterior eyes. The Arabic numerals show the different nuclei

(*in* Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)



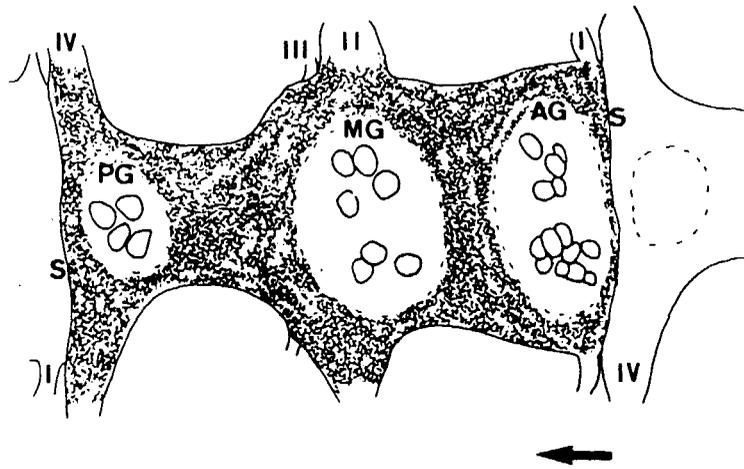
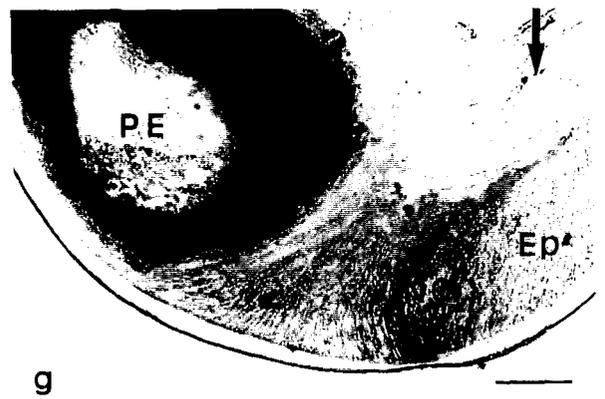
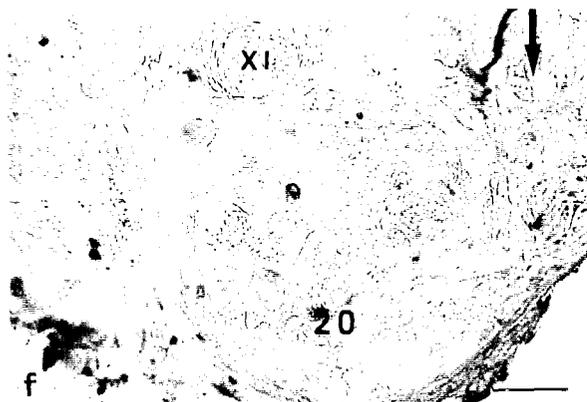
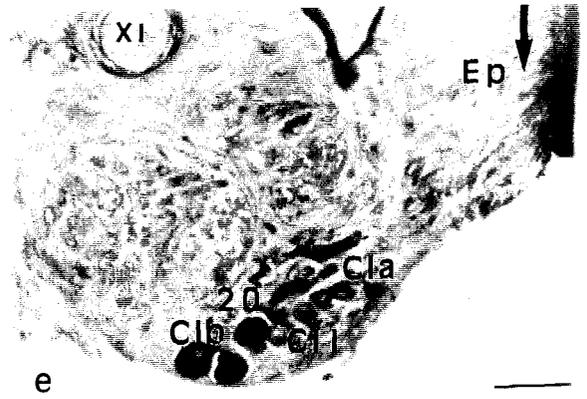
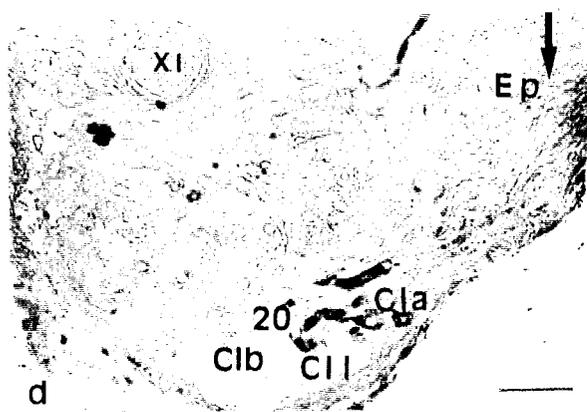
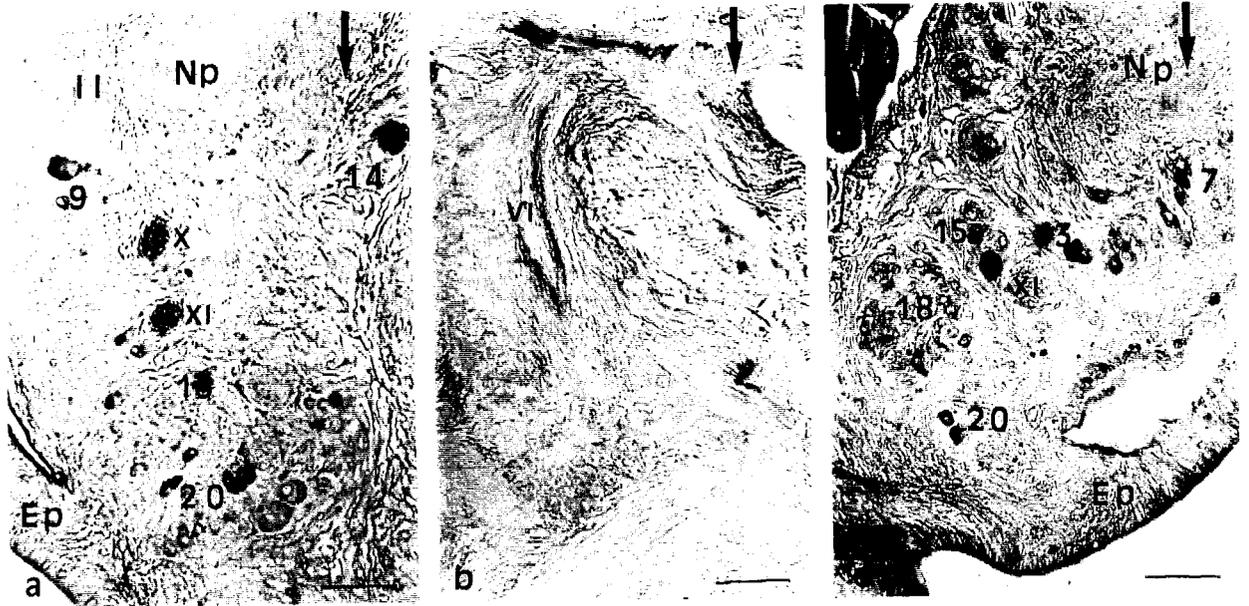


Figure 3. Horizontal view of the *Nereis* VNC showing the localization of the 3 major cellular groups and the segmental nerve roots in a ganglion. The large arrow shows the antero-posterior direction. AG, anterior cellular group ; MG, medial cellular group ; PG, posterior cellular group ; S, septum. The Roman numerals show the different nerves.

(in Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)

Figure 4. Parasagittal sections through the prostomium. The large arrows indicate the antero-posterior direction. a : paraffin section of the brain of female nereis (mean diameter of oocytes 55-76 μm). Some perikarya of nuclei 9,14 and 20 as well as the optic nerves X and XI are immunoreactive for angiotensin II. b : Paraffin section of the brain of female nereis (mean diameter of oocytes 90-116) immunostained for angiotensin II. Immunoreactivity of the palpal nerve VI. c, d : Paraffin sections through the brain of female nereis (mean diameter of oocytes 90-116 μm) immunostained for oxytocin. Immunoreactivity found in the blood vessels (c) and in nuclei 7, 13, 15, 18 and 20 (c, d).e : Section shown on (d) decolorized and subsequently stained by Clark's method showing that immunoreactivity for oxytocin of nucleus 20 (d) was restricted to the small PF⁺ cell bodies of CIa type (e). f : Paraffin control section of the brain adjacent to that shown on (d) and stained with anti-oxytocin preabsorbed with synthetic oxytocin. Immunostaining seen on (d) is abolished after preabsorption with oxytocin (f). g : Cryostat section through the prostomium of female nereis (mean diameter of oocyte 90-116 μm) immunostained for angiotensin I. The nuchal organ is immunoreactive. Ep, epithelium ; Np, neuropile. Bars = 50 μm .

(*in* Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)



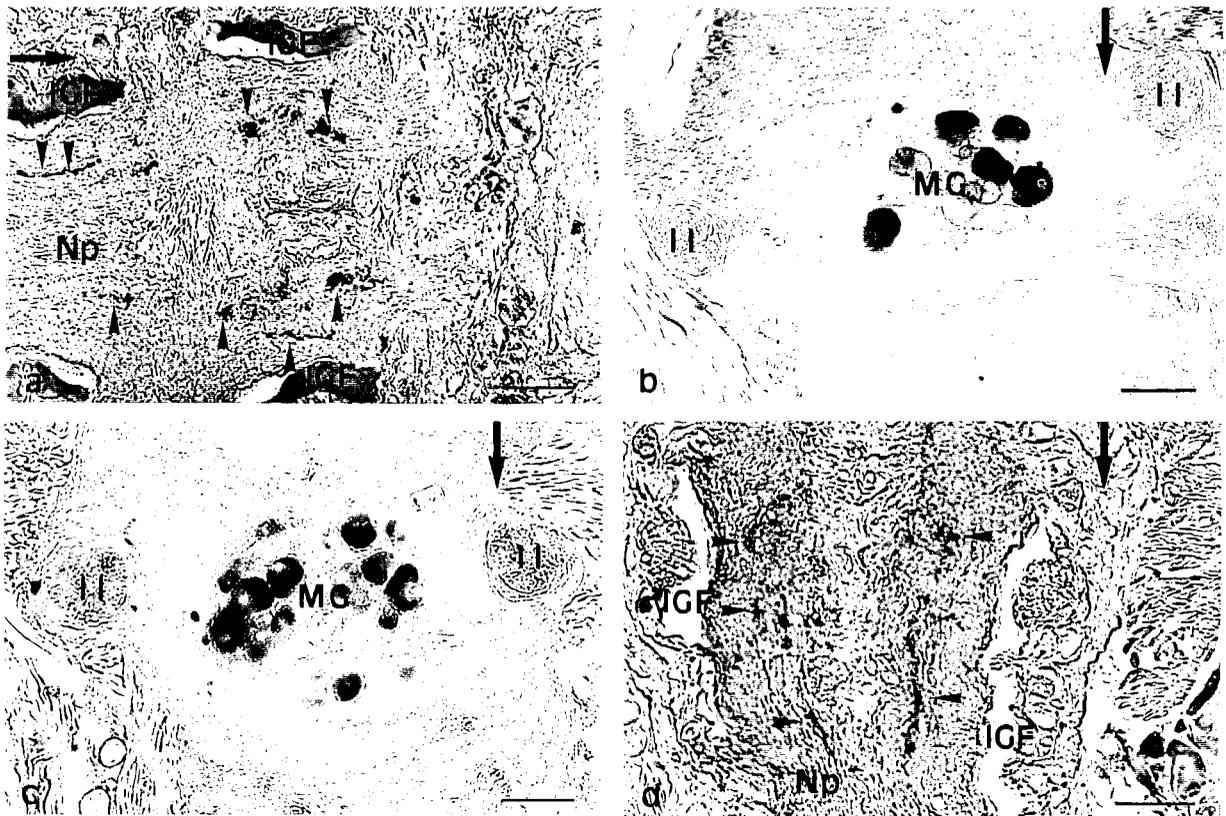


Figure 5. Paraffin horizontal sections through the VNC female nereis (mean diameter of oocytes 90-116 μm). Large arrows indicating the antero-posterior direction. a : Section showing nerve fibres (small arrows) within the neuropile and lateral giant fibres immunopositive for angiotensin II. b : Immunoreactivity for oxytocin (small arrows) of the medial cellular group situated at the level of nerve-II roots. c, d : Sections showing abundant angiotensin I-like material of the medial cellular group situated at the nerve-II roots level (c) and angiotensin I immunopositive nerve fibres (small arrows) within the neuropile (d). Remark the lateral giant fibres which are not immunoreactive. IGF, lateral giant fibres ; MG, medial cellular group ; Np, neuropile. Bars = 50 μm .

(*in* Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)

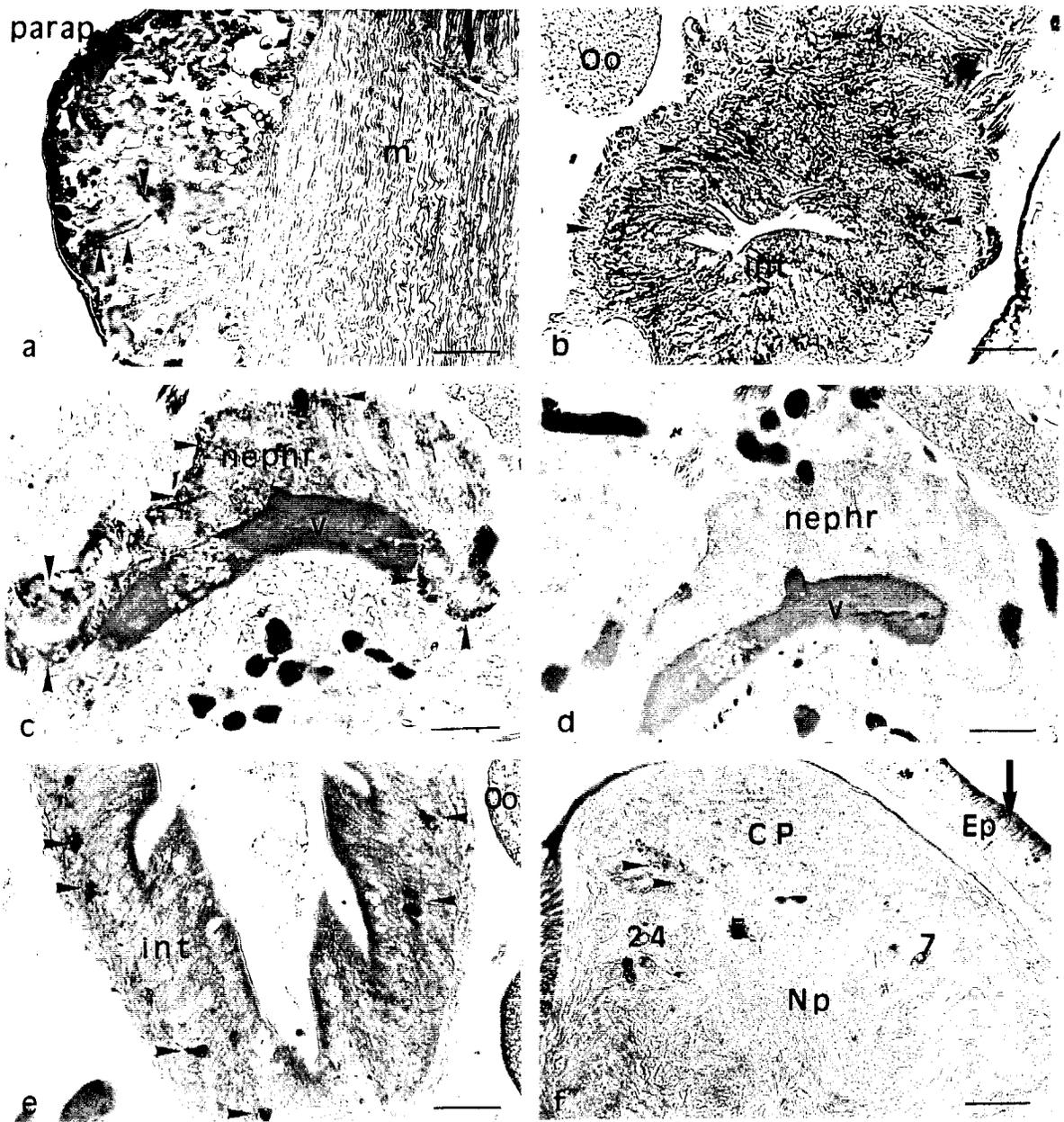
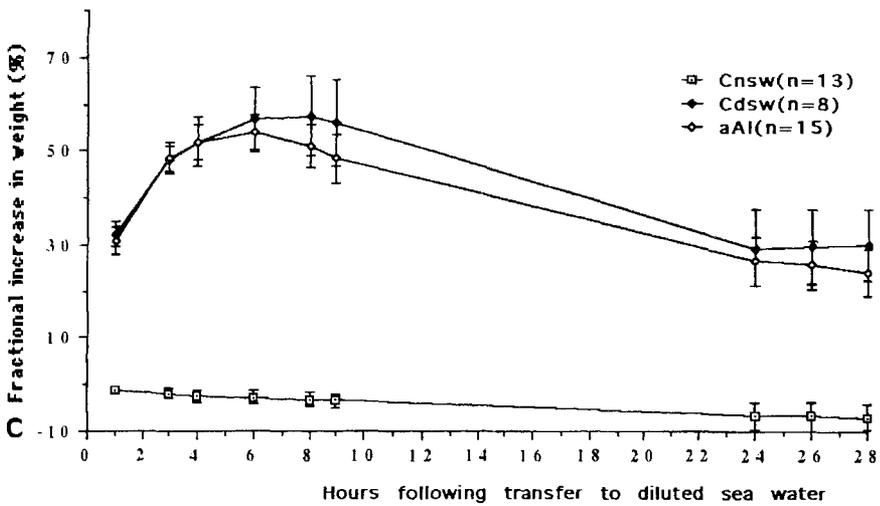
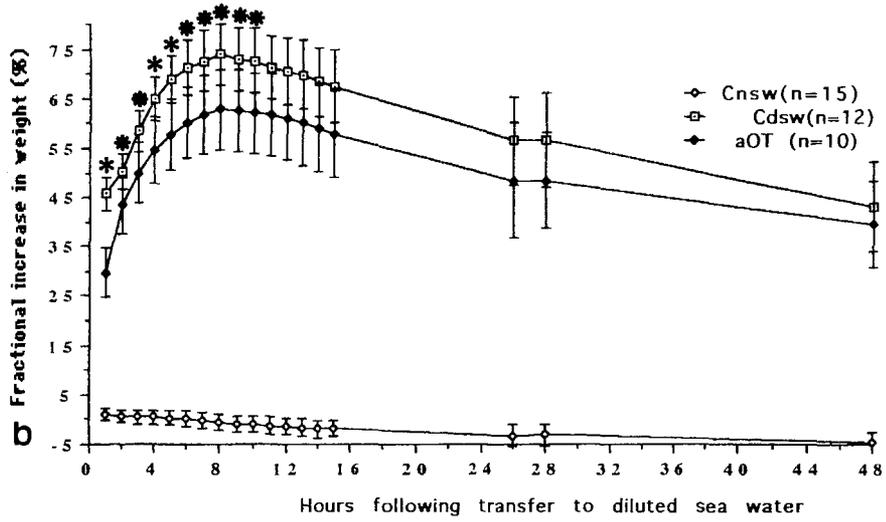
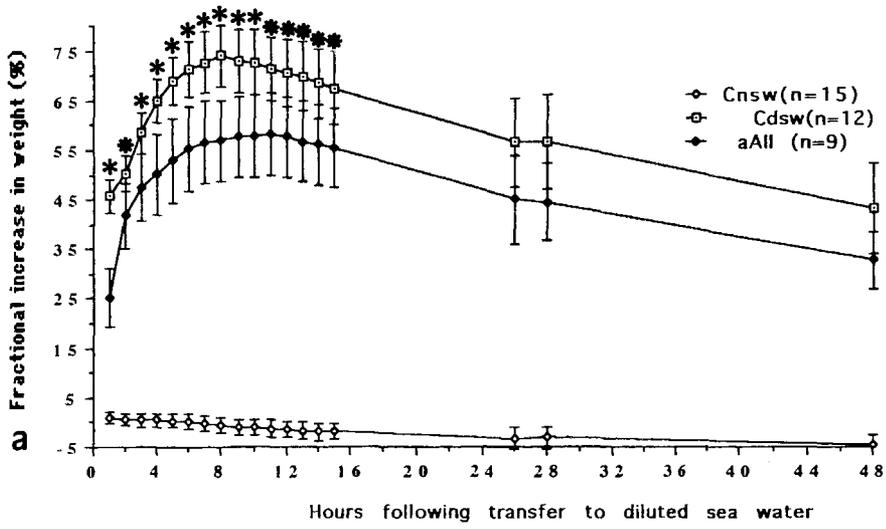


Figure 6. Paraffin parasagittal and horizontal sections respectively through the brain and metamere of female nereis (mean diameter of oocyte 90-116 μm). a : Section immunostained for angiotensin II showing immunoreactivity of a peripheral nerve (small arrow). The large arrow indicates the antero-posterior direction. b : Abundant angiotensin I-like material within the intestinal tissue (small arrows). c : Section of a nephridium immunostained for oxytocin. Small arrows : immunoreactivity observed. d : Control section of a nephridium (Nephhr) adjacent to that shown on (c) immunostained with anti-oxytocin preabsorbed with synthetic oxytocin. Immunostaining seen on (c) is abolished after preabsorption with oxytocin (d). e : Section immunostained for oxytocin showing some immunoreactive intestinal cells (small arrows) scattered within the intestinal tissue. f : Section immunostained for oxytocin showing immunoreactivity of a stalk of *Corpora pedunculata* (small arrows). The large arrow indicates the antero-posterior direction. CP, *Corpora pedunculata* ; Ep, epithelium ; int, intestine ; m, muscle ; nephhr, nephridium ; Np, neuropile ; Oo, oocyte ; parap, parapodium ; v, blood vessel. Bars = 50 μm . (in Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)

Figure 7. Effect of intra-cœlomic injection of polyclonal antisera against angiotensin II (a), oxytocin (b) or angiotensin I (c) on the body mass of *Nereis* during exposure to hypo-osmotic medium. Values are means \pm SD (Risk=5%). Cnsw, control animals exposed to normal sea water ; CdsW, control animals exposed to diluted sea-water ; aAI, experimental animals injected with antibodies against angiotensin I ; aAII, experimental animals injected with antibodies against angiotensin II ; aOT, experimental animals injected with antibodies against oxytocin. Experimental groups of animals are compared with controls CdsW. The size of each animal group at the end of the test is given above. Analysis of variance was used to determine statistical significance of differences between experimental worms (a-AII and a-OT) and control animals (CdsW) during exposure to hypo-osmotic medium: * P < 0.05; * P < 0.01. (*in* Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)



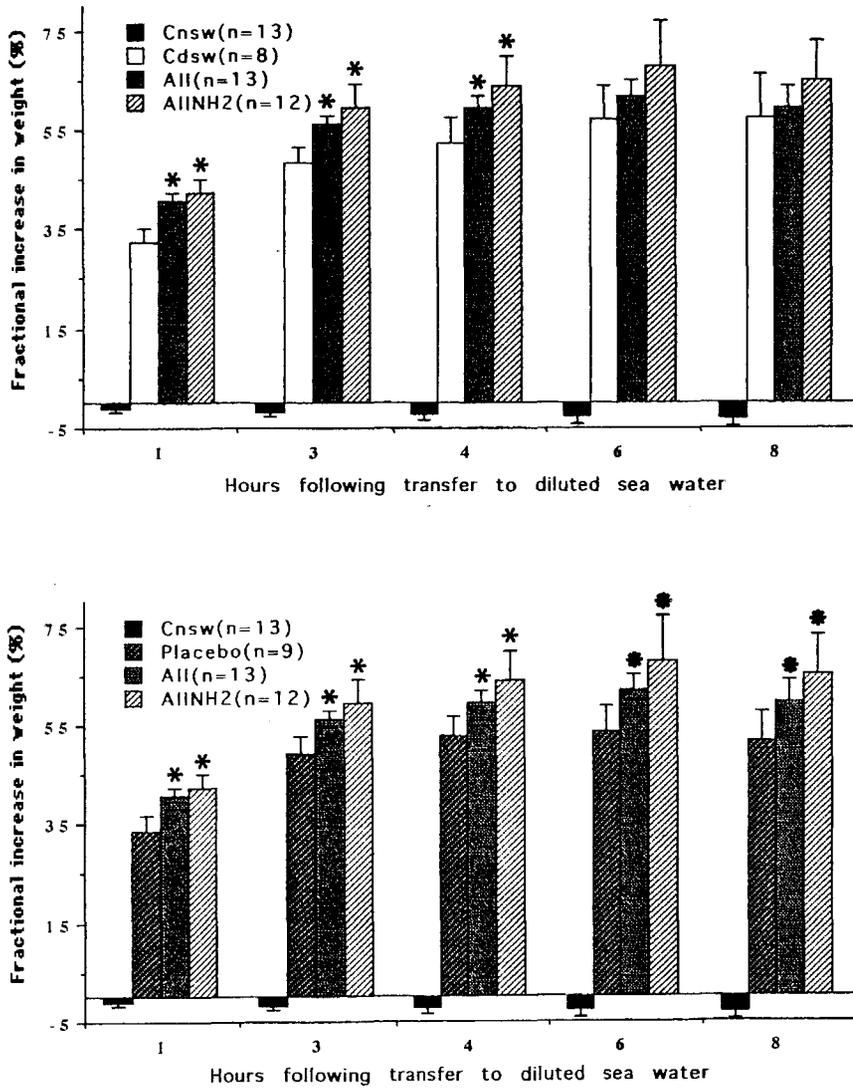


Figure 8. Effect of intra-cœlomic injection of angiotensin II or angiotensin II-amide on the body mass of nereis during exposure to hypoosmotic medium. Experimental animals are compared either with control group Cdsw (a), or with placebo group (b). Values are means \pm SD. Cnsw, control animals exposed to normal sea water ; Cdsw, control animals exposed to diluted sea water ; AII, experimental animals injected with angiotensin II ; AII-NH₂, experimental animals injected with angiotensin II-amide. The size of each animal group at the end of the test is given above. Statistical significance of differences between experimental worms (AII and AII-amide) and control group Cdsw (a) or placebo group (b) during exposure to hypo-osmotic medium : * P< 0.05; * P< 0.01 (Student's t-test). (*in* Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)

TABLE 1 : Distribution in *Nereis diversicolor* (oocyte diameter ; 90-116 μm) of substances related to vertebrate angiotensin II, angiotensin I and oxytocin
(in Fewou et Dhainaut-Courtois, 1995)

SUBSTANCES RELATED TO	LOCALIZATION							
	PROSTOMIUM				METAMERE			
	BRAIN			OTHER PROSTOMIAL STRUCTURES	V N C			OTHER METAMERE STRUCTURES
	Anterior nuclei (1)	Caudal nuclei (2)	Other Tissues		Medial Cellular Group (MG)	Posterior Cellular Group (MG)	Other Tissues	
AII	+	+	Antennal nerve (nerve II) Nerve III Palpal nerves (nerves V and VI) Optic nerves (nerves X and XI) OC Neuropile Circes. Conn.				Nerve II-root Neuropile IGF mGF	Peripheral nerves Epithelial cells
AI	+	+	Palpal nerves (nerves VI and VII) Optic nerves (nerves X and XI) OC	Nuchal organ	+		Neuropile	Peripheral nerves Epithelial cells Intestine
OT	+	+	Neuropile Peduncle of CP ICR	Blood vessels	+			Blood vessels Intestine Nephridia

+ : present

(1) Anterior ganglionic nuclei : 1-14 ; 23-26

(2) Caudal ganglionic nuclei : 15-22

Discussion

IV - DISCUSSION

La localisation exacte des cellules immunoréactives pour certaines molécules testées nécessitait une très bonne connaissance de la répartition des 26 noyaux ganglionnaires. Ceci nous a amenés à réaliser à l'aide d'un ordinateur une reconstitution tridimensionnelle de ces noyaux. Cette approche technologique pour la connaissance des structures nerveuses est encore rare actuellement et c'est en tout cas la première fois qu'elle est réalisée chez des annélides. Elle apporte des informations supplémentaires sur la structure de certains noyaux ganglionnaires par rapport aux études précédentes (Holmgren,1916 ; Hanström,1927, 1928 ; Bullock et Horridge,1965 ; Dhainaut-Coutois,1970 ; Dhainaut-Courtois et Golding,1988). Il convient de signaler que le noyau 17 trapézoïdal, est impair comme les noyaux 12 et 21 précédemment décrits par Holmgren(1916), Hanström(1928) et Dhainaut-Courtois(1970). Quant aux 3 premiers noyaux ganglionnaires appelés "mushroom bodies", "globuli" ou "corpora pedunculata"(CP) respectivement par Hamaker (1898), Holmgren(1916) et Hanström(1927, 1928), la vue tridimensionnelle montre une fusion partielle des 2 premiers globuli et la séparation du troisième globulus des 2 premiers (fig.2e,f); ces observations sont en accord avec celles de Richard(1964) et Dhainaut-Courtois(1970).

Les réactions immunopositives observées constituent une évidence en faveur de la présence chez *Nereis diversicolor* de peptides immunologiquement apparentés à l'angiotensine II, l'angiotensine I et l'ocytocine de vertébré (AI*,AII*,OT*). Les colorations obtenues ont varié avec l'âge : elles ont été plus marquées chez les vers plus âgés. Les coupes de cerveau et de métamère des vers plus jeunes ou plus âgés ont présenté des structures immunoréactives pour l'OT. L'immunoréactivité pour l'AII a aussi été observée à ces 2 niveaux mais seulement chez les vers plus âgés, alors qu'elle était limitée au cerveau chez les vers plus jeunes.

Les immunoréactions les plus importantes ont donc été obtenues chez les vers plus âgés, et c'est pour cette raison que nous les avons préférés aux vers plus jeunes, pour les premières séries de tests physiologiques qui ont suivi.

Les noyaux immunoréactifs pour l'OT ont été plus largement distribués à l'intérieur du cerveau que ceux pour l'AII. L'OT* du noyau 20 était présente de manière frappante uniquement dans les péricaryons des cellules Ia, alors que l'AII* du même noyau était observée seulement dans un petit nombre de cellules Ia et aussi dans une grande cellule de type Ib. La distribution des fibres nerveuses du cerveau, immunoréactives pour l'AII, était plus importante chez les vers plus âgés. Les fibres nerveuses du cerveau immunoréactives pour l'OT n'étaient pas largement réparties; leur présence était limitée à un petit nombre de structures nerveuses comme les pédoncules des corps pédonculés (CP), le neuropile et la région infracérébrale (ICR). Il est possible que OT* joue un rôle dans les phénomènes d'intégration à l'intérieur des pédoncules des CP comme cela a été antérieurement supposé pour la BMSH* (Dhainaut-Courtois *et al*,1985). Cette hypothèse est

renforcée par le fait que, chez les arthropodes, les centres d'intégrations sont représentés par les CP.

La présence de AII* dans le neuropile, près de l'aire neurohémale, et celle de l'OT* aussi bien dans quelques terminaisons axonales de l'ICR que dans les vaisseaux sanguins sous-jacents est un argument en faveur de leur rôle neuroendocrine.

Il convient de rappeler que la région infracérébrale aussi appelée aire neurohémale est le cône fibreux décrit en microscopie photonique par Bobin et Durchon(1952) puis en microscopie électronique par Dhainaut-Courtois(1966a,b) et Golding, *et al.* (1968) comme étant constitué de terminaisons axonales qui s'étendent ventralement à partir du neuropile jusqu'à la face interne de la région postérieure de la capsule collagène du cerveau. Il se peut que ces terminaisons axonales soient, avec la glande infracérébrale(ICG) sous-jacente, la voie de transport des granules neurosécrétoires comportant des neurohormones (revue *in* Dhainaut-Courtois et Golding,1988). La présence de ces peptides dans les autres fibres nerveuses est peut-être l'indice du rôle qu'ils pourraient jouer dans la neurotransmission /neuromodulation, comme, par exemple, l'&-néoendorphine dans le neuropile du cerveau de la néréis (Dhainaut-Courtois *et al.*,1986).

Les immunoréactivités du métamère pour l'AII et pour l'OT ont été importantes seulement chez les vers plus âgés ; aussi, chez ces animaux, des réactions immunopositives ont été observées aussi bien dans la chaîne nerveuse que dans quelques structures situées hors de cette chaîne nerveuse. Alors que les éléments

immunoréactifs pour l'OT de la chaîne nerveuse ont été limités à quelques corps cellulaires du groupe MG, AII* a été largement distribuée dans cet organe et a été observée dans quelques péricaryons du groupe PG ainsi que dans quelques tractus nerveux (neuropile, racine du nerf II, IGF et mGF). La présence de l'OT* dans certaines cellules intestinales soulève quelques questions : ces cellules font-elles partie du système nerveux intrinsèque de l'intestin, comme c'est le cas chez certains vertébrés? Sont-elles au contraire des cellules ordinaires de l'intestin? Quelle est la signification de la présence dans l'intestin de cette substance? Stimule-t-elle les contractions de cet organe comme l'ocytocine dans muscles lisses de la glande mammaire et de l'utérus chez les mammifères? Exerce-t-elle un contrôle sur l'osmorégulation à ce niveau?

Il convient de rappeler ici que, chez la sangsue, une ocytocine* est colocalisée avec le peptide FMRF-amide*. Chez la néréis, il a été montré antérieurement que l'intestin contient de nombreuses cellules immunoréactives pour le FMRF-amide (Baratte *et al.*,1990,1991), mais nous ne sommes pas en mesure actuellement de dire si le peptide OT* et le FMRF-amide sont colocalisés chez ce ver marin.

Puisque par clivage enzymatique de l'AI on obtient l'AII qui est la forme hormonale biologiquement active chez les vertébrés, nous avons pensé que les immunoréactivités pour ces deux peptides étaient semblables. En fait, aussi bien

dans le cerveau que dans la chaîne nerveuse, l'immunoréactivité pour l'AI a été plus importante que pour l'AII au niveau des corps cellulaires et inversement au niveau des fibres nerveuses. De plus, des structures n'appartenant pas au système nerveux central telles que l'organe nucal et l'intestin ont été immunoréactives pour l'AI, mais pas pour l'AII.

L'effet antidiurétique des anticorps anti-AII et anti-OT chez *Nereis diversicolor* est fortement appuyé par l'inhibition partielle de l'augmentation de poids corporel provoquée par les sérums anti-AII et anti-OT pendant l'exposition en milieu hypoosmotique. L'effet de l'anti-AII a été plus prononcé que celui de l'anti-OT.

Il a été antérieurement rapporté que dans des conditions hypoosmotiques, ce ver marin s'oppose à la charge volumique et à la déplétion de sels seulement par une simple augmentation de la production urinaire (Fletcher,1974 a,b). Les anticorps anti-AII et anti-OT ont sans doute affecté l'augmentation de poids en induisant une augmentation significative du débit urinaire.

Le gonflement le plus important observé chez les animaux qui ont reçu les peptides synthétiques en injection par comparaison aux animaux témoins, a clairement montré que l'AII et l'AII-amide favorisaient l'augmentation de volume de *Nereis diversicolor* en milieu hypoosmotique. Pour cette raison, ces peptides sont considérés comme étant antidiurétiques chez cet animal. Ce résultat concorde bien avec l'effet diurétique des anticorps correspondants observé chez ce ver. L'effet antidiurétique induit par l'AII semble plus puissant lorsque ce peptide agit sous sa forme amidée. L'activité biologique de l'AII ou de l'AII-amide dans cette étude est un indice du rôle véritable de la molécule endogène de la néréis; cette molécule serait donc antidiurétique. De ces résultats, on peut conclure que l'anticorps anti-AII reconnaît au niveau de l'AII* de la néréis des épitopes identiques à ceux de l'AII sur lesquels il se fixe pour inhiber son activité biologique. La substance AII* de ce ver pourrait donc présenter une parenté de structure avec l'AII de mammifère. Dans son environnement naturel, lorsqu'elle est exposée au stress hypoosmotique, *Nereis diversicolor* fait face à la prise excessive de poids, peut-être en réduisant le taux circulant de ce facteur antidiurétique par une diminution de sa libération dans la circulation sanguine, ou bien, par une dilution du sang due à l'entrée massive d'eau. Mais cette hypothèse doit être vérifiée. Il a aussi été rapporté que la prise de poids chez cet animal était due à un arrêt de l'activité des néphridies (Fletcher,1974 b); cette observation laisse supposer que l'action biologique de l'AII* endogène s'exerce directement ou indirectement sur les néphridies malgré le fait, qu'à ce niveau, seule la présence d'immunoréactions pour l'OT ait été décelée.

Bien qu'il soit connu que, chez le polychète, la balance volumique est influencée par certaines substances osmotiquement actives telles que les acides aminés libres, les ions Na⁺, K⁺,Ca²⁺ et Mg²⁺ (Costa *et al*,1980,1983; Pierce *et al*,1988; Reitze et Schöttler,1989), c'est en tout cas la première fois que des arguments en faveur de contrôle neuroendocrinien de l'osmorégulation sont

présentés dans ce groupe d'annélides. L'AII* n'est sans doute pas la seule substance agissant comme une neurohormone dans l'osmorégulation. Il existe peut-être chez la néréis de nombreux autres facteurs neuroendocriniens contrôlant l'osmorégulation comme chez le vertébré ou la sangsue. Si l'on peut facilement rayer la substance AI* de la liste des facteurs endogènes putatifs de l'osmorégulation, parce qu'elle est inefficace comme chez les vertébrés, le rôle du peptide OT* dans l'osmorégulation chez la néréis (partiellement démontré dans cette étude) a besoin d'être clarifié par des expériences physiologiques supplémentaires qui nécessitent l'injection de peptide(s) synthétique(s) ou de substance(s) endogène(s). La présence des AII* et OT*, respectivement dans le tégument et l'intestin, nous fait penser à la possibilité d'un contrôle exercé à ces niveaux par ces 2 peptides.

Cette étude a apporté une explication concernant l'expérience de décérébration qui n'a pas permis d'impliquer le cerveau dans le contrôle de l'osmorégulation chez *Nereis diversicolor* (De Leersnyder et Durchon, 1969); notre hypothèse est la suivante : si les facteurs de l'osmorégulation sont présents dans le cerveau, on les trouve aussi à l'intérieur des métamères où ils sont en fait très abondants.

Il convient aussi de remarquer que l'AII* est antidiurétique chez la néréis alors que son analogue chez la sangsue est diurétique (Salzet *et al.*, 92). Cette observation est intéressante puisqu'un peptide a des effets opposés dans deux espèces différentes appartenant au même phylum (annélides). La connaissance profonde de cette molécule chez la néréis exige des investigations supplémentaires qui nécessitent l'extraction, l'isolement, la caractérisation et l'injection de substance(s) endogène(s).

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Cette étude a, premièrement, confirmé l'existence chez la néréis de substances apparentées à l'AI, l'AII et l'OT de vertébré (AI*, AII* et OT*). Ces substances sont présentes dans le système nerveux central de cette annélide polychète, aussi bien au niveau du cerveau qu'au niveau de la chaîne nerveuse ventrale. Elles ont été également observées dans certaines structures telles que l'organe nuchal, l'intestin, les néphridies, les cellules épithéliales du tégument, les nerfs métamériques et les vaisseaux sanguins (tableau 1).

En second lieu, ce travail a aidé par la reconstitution tridimensionnelle effectuée, à préciser l'architecture complexe du cerveau de *Nereis diversicolor*. Par ailleurs, les schémas issus de cette reconstitution peuvent être utilisés dans l'établissement de la cartographie des substances du cerveau de la néréis.

En troisième lieu, les recherches effectuées ont confirmé l'existence chez les annélides polychètes d'un contrôle neuroendocrinien de l'osmorégulation. Ainsi, des arguments en faveur du rôle antidiurétique de l'AII* ont été réunis après observation chez *Nereis diversicolor*, d'abord de l'effet diurétique de l'anticorps polyclonal anti-AII, ensuite de l'effet antidiurétique des peptides synthétiques immunoréactifs qui lui correspondent, à savoir l'AII mammalienne et l'AII-amide de la sangsue.

Si l'on sait maintenant que l'AII* exerce un contrôle volumique chez la néréis, on ne connaît malheureusement ni son mécanisme d'action, ni le ou les organe(s) cible(s). Il convient de rappeler le mécanisme de régulation hyperosmotique observé antérieurement chez cette annélide polychète *Nereidae* : diminution de la perméabilité tégumentaire à l'eau et aux ions, production d'une urine hypotonique, accroissement du débit urinaire, et transport actif de certains ions. Dans cette optique, il serait intéressant de rechercher si l'action de l'AII* est directe et s'exerce sur les néphridies en diminuant à ce niveau la production urinaire, ou bien, indirecte, et passe par une réduction de la perte de certains ions extracellulaires qu'elle induirait en stimulant leur transport actif à travers le tégument, l'intestin ou les néphridies. Rappelons que chez le ver osmorégulateur *Nereis succinea*, le site du transport actif de NaCl a été localisé au niveau des parapodes antérieurs (Mangum *et al.*, 1980). Par ailleurs, Smith (1970b) a observé que les néphridies de *Nereis diversicolor* étaient capables de produire une urine hypoosmotique. Il a aussi été rapporté que chez *Clitellio arenarius*, il existait une influence des ganglions cérébraux sur les mouvements de Na⁺ et Cl⁻, probablement à travers le tégument ou l'intestin (Ferraris et Schmidt-Nielsen, 1982; Ferraris, 1984); par cette influence, ces ganglions induisent une réduction de la perte de Na⁺ et Cl⁻ extracellulaire, contribuant ainsi au maintien de l'hypertonie du liquide coelomique en milieu dilué.

L'AII* n'est probablement pas le seul facteur de l'osmorégulation chez la néréis. La possibilité d'un effet antidiurétique de l'OT* a été partiellement démontrée dans cette étude. Il serait utile de rechercher chez cet animal la présence

de substances apparentées aux peptides dont le rôle dans l'osmorégulation est déjà connu dans certains groupes de vertébrés ou d'invertébrés, comme, par exemple, la vasopressine chez les vertébrés ou son analogue chez les invertébrés (par exemple : la lysine - conopressine; Salzet *et al.*,1993c).

Notons d'ailleurs que des immunoréactions pour la vasopressine ou un peptide apparenté ont déjà été obtenues chez *Nereis diversicolor* (Dhainaut-Courtois et Golding,1988).

Il serait également intéressant de savoir si le contrôle de l'osmorégulation par la neurosécrétion n'est pas finalement commun à tous les vers marins euryhalins. L'exemple de *Clitellio arenarius* et celui de *Nereis diversicolor* nous permettent d'en émettre l'hypothèse.

Il convient enfin de souligner à nouveau que les capacités de résistance aux faibles salinités ont une influence sur la répartition horizontale et verticale des vers marins dans leur environnement naturel. Concernant la répartition horizontale, on rencontre surtout, en amont des estuaires, au niveau de l'entrée des rivières ou fleuves, les vers les plus euryhalins, pour la plupart osmorégulateurs; en aval, le nombre d'espèces les moins euryhalines augmente au fur et à mesure que l'on s'approche de l'entrée en mer. Sur les plages des côtes océaniques, ce sont les vers osmoconformistes qui abondent, et au large des côtes océaniques, on trouve surtout les vers sténohalins. Quant à la répartition verticale, les capacités de résistance aux faibles salinités ont une influence sur la profondeur des galeries creusées par ces vers en milieu estuarien.

REFERENCES

- 1 - Baratte B., Gras-Masse H., Ricart G., Bulet P. et Dhainaut-Courtois N. (1991). Isolation and characterization of authentic Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ and the novel Phe-Thr-Arg-Phe-NH₂ peptide from *Nereis, diversicolor*. Eur. J. Biochem., **198**, 627-633.
- 2 - Baratte B., Van Minnen J., Masson M. et Dhainaut-Courtois N. (1990). Localisation par voie immunohistochimique d'un matériel apparenté au FMRF-amide chez trois Annélides Polychètes *Nereidae* (*Nereis diversicolor*, *Nereis virens*, *Perinereis cultrifera*). C.R. Acad. Sci. Paris, t. 311, 495-500.
- 3 - Bobin G. et Durchon M. (1952). Etude histologique du cerveau de *Perineis cultrifera*. Mise en évidence d'un complexe cérébro-vasculaire. Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp., **41**, 25-40.
- 4 - Bullock T.H. et Horridge G.A. (1965). Structure and function in the nervous systems of invertebrates. W. H. Freeman and Company, San Francisco and London.
- 5 - Clark M.E. (1968). Free amino-acid levels in the coelomic fluid and body-wall of polychaetes. Biol. Bull., **134**, 35-47.
- 6 - Clark M.E. (1973). Amino acids and osmoregulation. In Experiments in physiology and Biochemistry (Edited Kerkut G.A.), **6**, 81-114. Academic Press, New York.
- 7 - Clark R.B. (1955). The posterior lobes of the brain of *Nephtys* and the mucus glands of the prostomium. Quart. J. microsc. Sci., **96**, 545-565.
- 8 - Costa C.J. et Pierce S.K. (1983). Volume regulation in the red coelomocytes of *Glycera dibranchiata* : an interaction of amino acid and K⁺ effluxes. J. Comp. Physiol., **151**, 133-144.
- 9 - Costa C.J., Pierce S.K. et Warren M.K. (1980). The intracellular mechanism of salinity tolerance in polychaetes : volume regulation by isolated *Glycera dibranchiata* red coelomocytes. Biol. Bull., **159**, 626-638.
- 10 - De Leersnyder M. (1971). Sur la régulation ionique du milieu intérieur de *Nereis diversicolor* O.F. Müller. Cahiers de Biologie Marine, **XII**, 49-55.

- 11 - De Leersnyder M. et Durchon M. (1969). Sur le rôle du cerveau dans l'osmorégulation chez les néréidiens (Annélides Polychaetes). Cahier de Biologie Marine, X, 63-70.
- 12 - Demuynck S. et Dhainaut-Courtois N. (1993). Identification of the extracellular hemoglobin as the major high molecular weight cadmium-binding protein of the polychaete annelid *Nereis diversicolor*. Comp. Biochem. Physiol., 106 C, 467-472.
- 13 - Demuynck S., Sautière P., Van Beeumen J. et Dhainaut-Courtois N. (1991). Homologies entre les hémérythrine des sipunculien et une metalloprotéine complexant le cadmium (MPII) d'une annélide polychète, *Nereis diversicolor*. C.R. Acad. Sci. Paris, 312, 317-322.
- 14 - Demuynck S., Li K. W., Van der Schors R. et Dhainaut-Courtois N. (1993). Amino acid sequence of the small cadmium-binding protein (MPII) from *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). Evidence for a myohemerythrin structure. Eur. J. Biochem., 217, 151-156.
- 15 - Dhainaut-Courtois N. (1966 a). Le complexe cérébrovasculaire de *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète). Données histologique et ultrastructurales. C. R. Acad. Sci. Paris, 262, 2048-2051.
- 16 - Dhainaut-Courtois N. (1966 b). Le complexe cérébrovasculaire de *Nereis pelagica* L. Origine des cellules infracérébrales et structure de la paroi du réseau vasculaire. C. R. Soc. Biol., Paris, 160, 1232-1234.
- 17 - 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 Doctorat d'Etat, Université de Lille I, 1-191.
- 18 - Dhainaut-Courtois N., Dubois M-P., Tramu G. et Masson M. (1985). Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annelida Polychaeta) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. Cell Tissue Res., 242, 97-108.
- 19 - Dhainaut-Courtois N. et Golding D.W. (1988). Nervous system. In : The ultrastructure of Polychaeta. Eds W. Westheide, C.O. Hermans Microfauna marina. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York, 4, 89-110.
- 20 - Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Beauvillain J.C. et Masson M. (1986). A qualitative approach of the *Nereis* neuropeptides by use of antibodies to several vertebrate peptides. Neuroch. Int., 8, 327-338.

- 21 - Dhainaut-Courtois N. et Warembourg M. (1967). Etudes des cellules neurosécrétrices de la chaîne nerveuse de *Nereis pelagica* L. (Annélides Polychète). Gen. Comp. Endocr., 9, 276-286.
- 22 - Duchâteau-Bosson G., Jeuniaux C. et Florkin M. (1961). Rôle de la variation de la composante amino-acide intracellulaire dans l'euryhalinité d'*Arenicola marina*. Arch. Int. Physiol. Biochem., 69, 30-35.
- 23 - Durchon M. et Joly P. (1978). L'endocrinologie des Invertébrés. Presses Universitaires de France, Coll. P.U.F. "le Biologiste", 1-235.
- 24 - Engelhardt R.P., Dhainaut-Courtois N. et 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.
- 25 - Felbeck H. (1980). Investigations on the role of the amino-acids in anaerobic metabolism of the lugworm *Arenicola marina* L.. J. Comp. Physiol., 137, 183-192.
- 26 - Ferraris J.D. (1984). Volume regulation in intertidal *Procephalothrix spiralis* (Nemertina) and *Clitellio arenarius*. (Oligochaeta). II. Effects of decerebration under fluctuating salinity conditions. J. Comp. Physiol., 154, 125-137.
- 27 - Ferraris J.D. et Schmidt-Nielsen B. (1982). Volume regulation in an intertidal oligochaete, *Clitellio arenarius* (Müller). I. Short-term effects and the influence of the supra - and subesophageal ganglia. J. Exp. Zool., 222, 113-128.
- 28 - Fewou J. et Dhainaut-Courtois N. (1995). Research of polychaetes annelids osmoregulatory peptide(s) by immunocytochemical and physiological approaches. Computer reconstruction of the brain and evidence for a role of angiotensin-like molecules in *Nereis (Hediste) diversicolor* O.F. Müller. Biol. Cell., 85, N° 1, (sous presse).
- 29 - Fletcher C.R. (1974 a). Volume regulation in *Nereis diversicolor*. II. The effect of calcium. Comp. Biochem. Physiol., 47A, 1215-1220.
- 30 - Fletcher C.R. (1974 b). Volume regulation in *Nereis diversicolor*- III. Adaptation to a reduced salinity. Comp. Biochem. Physiol., 47A, 1221-1234.
- 31 - Forster R.C. (1970). Free amino acid and electrolyte adjustments in the Sipunculid worm, *Themiste dyscritum*, during salinity-stress. Am. Zool., 10, 518.

- 32 - Golding D.W., Baskin D.G. et Bern H.A. (1968). The infracerebral gland - A possible neuroendocrine complex in *Nereis*. J. Morph., **124**, 187-216.
- 33 - Green J.P. et Dunn D.F. (1976). Chloride and osmotic balance in the euryhaline Sipunculid *Phascolosoma arcuatum* from a Malaysian mangrove swamp. Biol. Bull., **150**, 211-221.
- 34 - Hamaker J.I. (1898). The nervous system of *Nereis virens* Sars. A study in comparative neurology, Bulletin of the museum of comparative Zoology. Harvard college, **32**, 1-124.
- 35 - Hanström B. (1927). Das zentrale und periphere Nervensystem des Kopflappens einiger Polychäten. Z. Morphol. Oekol. Tiere, **7**, 543-596.
- 36 - Hanström B. (1928). "Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere". Springer, Berlin.
- 37 - Harms J.W. et Dragendorff O. (1933). Die Realisation von Genen und die konsekutive Adaptation. 3. Mitteilung: Osmotische Untersuchungen an *Physcosoma lurco* Sel. und de Man aus den Mangrove-Vorländern der Sunda-Inseln. Z. wiss. Zool., **143**, 263-322.
- 38 - Hohendorf K. (1963). Der Einfluss der Temperatur auf die Salzgehaltstoleranz und Osmoregulation von *Nereis diversicolor* O.F. Müller. Kiel. Meeresforsch., **19**, 196-218.
- 39 - Holmgren N. (1916). Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns von Polychäten, Onychophoren, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden und Insekten. Kgl Svenska Vetenskapsakad. Handl., **56** (1), 1-303.
- 40 - Johnson R.G. (1967). Salinity of interstitial water in a sandy beach. Limnol. Oceanogr., **12**, 1-7.
- 41 - Malecha J. (1979). Mise en évidence d'une action du système nerveux central sur les échanges d'eau chez l'Hirudinée Rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). C.R. Acad Sci. Paris, **288**, D, 693-696.
- 42 - Malecha J. (1983). L'osmorégulation chez l'hirudinée rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). Localisation expérimentale de la zone sécrétrice d'un facteur de régulation de la balance hydrique. Gen. Comp. Endocr., **49**, 344-351.
- 43 - Malecha J., Tramu G., Cardon C. et Verger-Bocquet M. (1986). Mise en évidence de peptides apparentés à la vasopressine et à l'ocytocine dans le cerveau de l'Hirudinée Rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). Gen. Comp. Endocr., **64**, 13-20.

- 44 - Malecha J., Verger-Bocquet M., Leprêtre A. et Tramu G. (1989). Mise en évidence d'une action des anticorps anti-ocytocine sur les échanges d'eau chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* (O.F.M). C.R. Acad. Sci. Paris, 309, III, 127-130.
- 45 - Mangum C.P. et Saintsing D.G. (1979). The site of sodium uptake in the osmoregulating annelid *Nereis succinea*. American Zoologist, Vol 19, N°3, 867.
- 46 - Mangum C.P., Saintsing D.G. et Johnson J.M. (1980). The site of ion transport in an estuarine annelid. Marine Biology Letters, 1, 197-204.
- 47 - Oglesby L.C. (1965). Steady-state parameters of water and chloride regulation in estuarine nereid polychaetes. Comp. Biochem. Physiol., 14, 621-640.
- 48 - Oglesby L.C. (1968 a). Responses of an estuarine population of the polychaete *Nereis limnicola* to osmotic stress. Biol. Bull., 134, 1, 118-138.
- 49 - Oglesby L.C. (1968 b). Some osmotic responses of the Sipunculid worm *Themiste dyscritum*. Comp. Biochem. physiol., 26, 155-177.
- 50 - Oglesby L.C. (1969 a). Inorganic components and metabolism; ionic and osmotic regulation: Annelida, Sipunculan, and Echiura. In Chemical Zoology (edited by Florkin M. and Scheer B.T.). Academic press, New york, IV, 221-310.
- 51 - Oglesby L.C. (1969 b). Salinity-stress and desiccation in intertidal worms. Am. Zoologist, 9, 319-331.
- 52 - Oglesby L.C. (1970). Studies on the salt and water balance of *Nereis diversicolor* - I. Steady-state parameters. Comp. Biochem. Physiol., 36, 449-466.
- 53 - Oglesby L.C. (1972). Studies on the salt and water balance of *Nereis diversicolor* - I. Components of total sodium efflux. Comp. Biochem. Physiol., 41A, 765-790.
- 54 - Oglesby L.C. (1973). Salt and water balance in lugworms (polychaeta: *Arenicolidae*), with particular reference to *Abarenicola pacifica* in Coos Bay, Oregon. Biol. Bull., 145, 1, 180-199.
- 55 - Oglesby L.C. (1978). Salt and water balance. In Physiology of Annelids. Mill P.J. ed., Academic Press, New York, 555-658.

- 56 - Oglesby L.C. (1981). Volume regulation in aquatic invertebrates. The Journal of Experimental Zoology, 215, 289-301.
- 57 - Oglesby L.C. (1982). Salt and water balance in the Sipunculan *Phascolopsis gouldi*: is any animal a "simple osmometer"? Comp. Biochem. Physiol., 71A, 363-368.
- 58 - Oglesby L.C., Mangum C.P., Heacox A.E. et Ready N.E. (1982). Salt and water balance in the polychaete *Nereis virens*. Comp. Biochem. Physiol., 73A, 1, 15-19.
- 59 - Oka K., Takeda N. et Hashimoto T. (1984). Examination of water balance and ionic regulation in the earthworm, *Eisenia foetida*. Comp. Biochem. Physiol., vol 79A, N°3, 405-408.
- 60 - Palluault F., Pietrzyk B., Dei-Cas E., Slomianny C., Soulez B. et Camus D. (1991). Three-dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii* from serial-thin sections I : Trophozoite. J. Protozool., 38 (4), 402-407.
- 61 - Pfannenstiel H. D. et Grothe C. (1988). Neurosecretory Elements. In : The Ultrastructure of Polychaeta. Eds. W. Westheide, C.O.Hermans, Microfauna Marina, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York, 4, 111-120.
- 62 - Pierce S.K. (1982). Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino-acids and inorganic ions as osmotic solute. Biol. Bull., 163, 405-419.
- 63 - Pierce S.K. et Greenberg M.J. (1973). The initiation and control of free amino acid regulation of cell volume in salinity-stressed marine bivalves. J. Exp. Biol., 59, 435-440.
- 64 - Pierce S.K., Politis A.D., Smith Jr L.H. et Rowland L.M. (1988). A CA^{2+} influx in response to hypo-osmotic stress may alter osmolyte permeability by a phenothiazine-sensitive mechanism. Cell Calcium, 9, 129-140.
- 65 - Quatrefages A. de (1865). Histoire naturelle des Annélides marins et d'eau douce (Annélides et Gephyriens). Paris Lib. Encycl. Roret.
- 66 - Reitze M. et Schöttler U. (1989). The time dependence of adaptation to reduced salinity in the lugworm *Arenicola marina* L. (Annelida : Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., vol 93A, N°3, 549-559.
- 67 - Richard A. (1964). Contribution à l'étude du cerveau des Néréidiens (Annélides Polychètes). Vascularisation, neurosécrétion. Diplôme d'Etudes Supérieures (Sci. Nat.), Lille, 1-85.

- 68 - Salzet M., Bulet P., Wattez C., Verger-Bocquet M. et Malecha J. (1995) Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata*: Angiotensin II-amide. J. Biol. Chem., 270, 1575-1582.
- 69 - Salzet M., Verger-Bocquet M., Wattez C. et Malecha J. (1992). Evidence for angiotensin-like molecules in the central nervous system of the leech *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). A possible diuretic effect. Comp. Biochem. Physiol., 101 A, 83-90.
- 70 - Salzet M., Wattez C., Baert J.L. et Malecha J. (1993 a). Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. Brain Res., 631, 247-255.
- 71 - Salzet M., Wattez C., Verger-Bocquet M., Beauvillain J.C. et Malecha J. (1993 b). Oxytocin-like peptide: a novel epitope colocalized with the FMRF amide-like peptide in the supernumerary neurons of the sex segmental ganglia of leeches - morphological and biochemical characterization ; putative antidiuretic function. Brain Res., 601, 173-184.
- 72 - Salzet M., Bulet P., Van Dorsselaer A. et Malecha J. (1993 c). Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. Eur. J. Biochem., 217, 897-903.
- 73 - Salzet-Raveillon B., Rentier-Delrue F. et Dhainaut A. (1993). Detection of mRNA encoding an antibacterial metalloprotein (MPIO) by *in situ* hybridization with a cDNA probe generated by Polymerase Chain Reaction in the worm *Nereis diversicolor*. Cell. Molec. Biol., 39, 105-114.
- 74 - Scharrer B. (1936). Über "Drüsenervenzellen" im Gehirn von *Nereis virens* Sars. Zool. Anz., 113, 299-302.
- 75 - Septier F., Demuynck S., Thomas P. et Dhainaut-Courtois N. (1991). Bioconcentration des métaux lourds chez une annélide polychète estuarienne : *Nereis diversicolor*. Oceanologica Acta. Actes du Colloque international sur l'environnement des mers épicontinentales, Lille, 20-22 mars 1990, vol. sp. n° 11, 263-274.
- 76 - Smith R.I. (1955). Comparison of the level of chloride regulation by *Nereis diversicolor* in different parts of its geographical range. Biol. Bull., 109, 453-474.
- 77 - Smith R.I. (1970 a). Chloride regulation at low salinity by *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). I. Uptake and exchange of chloride. J. Exp. Biol., 53, 75-92.

- 78 - Smith R.I. (1970 b). Hypo-osmotic urine in *Nereis diversicolor*. J. Exp. Biol., 53, 101-108.
- 79 - Smith R.I. (1976). Exchanges of sodium and chloride at low salinities by *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). Biol. Bull., 151, 587-600.
- 80 - Smith R.I. (1977). Physiological and reproductive adaptations of *Nereis diversicolor* to life in the Baltic Sea and adjacent water, In Essays on Polychaetous Annelids. Edited by Reish D.J. and Fauchald K., Special publication of the Allan Hancock Foundation, University of Southern California, Los Angeles, Calif., 373-390.
- 81 - Snedecor G.W. et Cochran W.G (1967). Statistical Methods. Ames, Iowa : The Iowa State Univ. Press.
- 82 - Spaargaren D.H. et Weber R.E. (1979). Osmotic responses in the cœlomic fluid of *Arenicola marina* subjected to salinity change. Netherlands Journal of Sea Research, 13 (3/4), 547-561.
- 83 - Takeuchi N. (1980). Effects of brain removal on the osmotic and ionic concentrations of the cœlomic fluid of earthworms placed in soil and salt solutions. Comp. Biochem. Physiol., 67A, 347-352.
- 84 - Tramu J., Pillez A. et Léonardelli J. (1978). An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. J. Histochem. Cytochem., 26, 322-324.
- 85 - Wells G.P. (1963). Barriers and speciation in lugworms (*Arenicolidae*, Polychaeta). pages 79-98, In J.P. Harding and N. Tebble, Eds. J.P., Speciation in the sea. Systematics Association Publication 5, London.

