



Détection immunohistochimique chez des planaires marines (Plathelminthes Tricladida) de la 5-hydroxytryptamine et de neuropeptides apparentés à ceux des vertébrés.

Saïda TEKAYA* ET Nicole DHAINAUT-COURTOIS**

* Laboratoire de Biologie Animale, Faculté des Sciences de Tunis. Campus Universitaire, Belvédère, 1060 Tunis, Tunisie.

** Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides, Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie, Bâtiment SN3,
Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex, France.

Fax : 20 43 68 49

Résumé : Depuis plus de deux décennies, l'utilisation chez des invertébrés d'anticorps dirigés contre des peptides de vertébrés a permis, avec toute la prudence requise pour éviter des interprétations erronées dues à des réactions croisées, non spécifiques, de faire naître et se développer le concept de phylogénie moléculaire. Il est maintenant bien établi que quelques familles de molécules sont apparues très tôt dans l'évolution, chez des métazoaires très primitifs tels que les Cnidaires, tandis que d'autres au contraire n'ont été décelées que chez des invertébrés plus élevés dans l'arbre phylogénétique. En ce qui concerne les vers, beaucoup de groupes ont été explorés. Il est toutefois à noter que c'est le système nerveux qui a généralement retenu l'attention des auteurs. De plus, les travaux concernant les planaires marines sont actuellement très rares. Dans le but d'apporter des éléments nouveaux sur un maillon intéressant en raison même de son caractère primitif, nous avons entrepris de tester sur l'ensemble du corps de planaires marines, en particulier sur *Procerodes lobata* et, très accessoirement, sur *Sabussowia dioica*, divers anticorps dirigés contre : leu- et mét-enképhaline, α -néo-endorphine, β -endorphine, dynorphine 1-17, somatostatine, GRF, substance P, CCK-8s, FMRF-amide, et 5 - hydroxytryptamine. Les résultats des immuno-réactions (IR) repérées sont comparés à ceux obtenus sur le même matériel biologique avec des techniques signalétiques des neurosécrétions, ainsi qu'aux données recueillies sur d'autres espèces par divers auteurs.

Abstract : Antibodies raised against vertebrate peptides have been used in the study of invertebrates since more than 20 years. This has made it possible to develop the molecular phylogeny concept, with all the carefulness required to avoid wrong interpretations due to unspecific cross-reactions. It is now clearly established that some families of molecules appeared very early in the course of evolution, in primitive metazoan such as the cnidarians, whereas others were only detected in invertebrates occupying higher positions in the phylogenetical tree. Among worms, many groups have been investigated. However, most studies have been focused on the description of the nervous system. In addition, reports concerning marine planarians are still rare. In order to contribute to a more complete knowledge of the relationships between flatworms and other invertebrates, we studied two marine planarians *Procerodes lobata* and, to a lesser extent, *Sabussowia dioica*, which are of interest because of their primitive phylogenetic position. Several antibodies raised against leu- and met-enkephalin, α -neo-endorphin, β -endorphin, dynorphin 1-17, somatostatin, GRF, substance P, CCK-8s, FMRF-amide, and 5-hydroxytryptamine were tested on whole body worm sections. The results given by immunoreactions (IR) were compared with those obtained with histochemical technics used for neurosecretory products, and with the results reported by other authors for a diversity of species.

Keywords : Flatworms, Tricladida, *Procerodes lobata*, *Sabussowia dioica*, immunohistochemistry, neuropeptides, 5-hydroxytryptamine.

Introduction

Reçu le 26 février 1996 ; accepté après révision le 25 juin 1996.
Received 26 February 1996 ; accepted in revised form 25 June 1996.

Depuis 25 ans environ, l'utilisation chez les invertébrés d'anticorps dirigés contre des neuropeptides de vertébrés a

permis d'obtenir des réponses positives depuis les cnidaires jusqu'aux insectes.

Déjà en 1978, Scharrer avançait que les peptides détectés immunologiquement ou biologiquement étaient du point de vue biochimique structuralement identiques ou très intimement apparentés chez les deux groupes. En 1980, Martin soutenait aussi qu'il était dès lors bien établi qu'il existait une parenté immunologique entre les neurofacteurs de vertébrés et d'invertébrés. On sait maintenant que ces postulats ont pu être vérifiés grâce à l'isolement et au séquençage d'un certain nombre de peptides détectés antérieurement par la technique immunohistochimique. A l'évidence, malgré quelques réactions croisées qualifiables d'"aspécifiques" qui rendent les contrôles obligatoires, cette méthode a donné un essor formidable aux études des processus neurosécrétaires et de la phylogénie moléculaire. C'est ainsi que l'abondance des substances présentes dans le tissu nerveux des invertébrés (indétectables pour beaucoup par les techniques signalétiques des neurosécrétions) et, par voie de conséquence, la complexité des relations interneuronales, ont pu être découvertes. Les modèles biologiques sont nombreux. En ce qui concerne les vers, à simple titre d'exemples, nous ne citerons pour les annélides que deux revues de synthèse sur les résultats obtenus à l'aide de nombreux anticorps (Dhainaut-Courtois & Golding, 1988 ; Porchet & Dhainaut-Courtois, 1988) ainsi que les travaux de Salzet *et al.*, (1995) et de Fewou & Dhainaut-Courtois (1995) qui démontrent biochimiquement et/ou expérimentalement le rôle d'un peptide étroitement apparenté à l'angiotensine dans les processus d'osmorégulation, respectivement chez des sangsues et chez une néréis. Pour les plathelminthes, rappelons que dès 1980 et 1981, Dei-Cas *et al.* avaient obtenu des immunoréactions (IR) pour la 5-hydroxytryptamine chez le Trématode Digène, *Schistosoma mansoni*, tandis que Bautz *et al.* (1980) réalisaient la détection immunologique de cellules à somatostatine (SRIF) chez deux espèces de planaires d'eau douce : *Dugesia lugubris* et *Dendrocoelum lacteum*. Signalons aussi que Reuter *et al.* (1988), dans une revue de synthèse, ont réalisé une comparaison entre les immuno-réactions obtenues avec divers anticorps non seulement chez les plathelminthes Acoela, Proseriata, Tricladida et Rhabdocoela mais aussi chez des hydriates. L'étude a permis à ces auteurs de démontrer que certaines familles de molécules telles que celle du FMRF-amide sont apparues très précocement tandis que d'autres ne sont détectables que chez certains plathelminthes. Ce serait le cas, par exemple, pour la leu-enképhaline. Il convient enfin de noter que grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre un authentique neuropeptide de plathelminthes, le neuropeptide F, Reuter *et al.* (1995a, b) ont pu apporter des données originales sur la neuroanatomie de deux Tricladida : *Dugesia tigrina* et *Procerodes littoralis*.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier un maillon encore très peu exploré parmi les plathelminthes Tricladida, à savoir celui des planaires marines généralement considérées comme les plus primitives des planaires. De plus, les travaux antérieurs effectués chez les planaires ayant porté presque exclusivement sur le système nerveux, il convenait de rechercher les IR dans l'ensemble des tissus, en particulier dans le parenchyme dont la fonction endocrine peut être postulée. Comme on le sait, il n'existe pas de cavité coelomique chez les turbellariés (acoelomates) et les lacunes représentent un vestige de la cavité blastocoeliennes. Selon Beaumont & Cassier (1981), "la cavité périviscérale est comblée par un parenchyme ou coelenchyme d'origine mésodermique formé par des cellules étoilées, anastomosées. Ces cellules délimitent un ensemble de lacunes qui constituent un système lymphatique rudimentaire parcouru par des cellules amiboides, des néoblastes et par un liquide interstitiel. Le parenchyme assure des fonctions variées : respiration, excrétion, glycogénèse, adipogenèse, etc.".

Notre recherche a été faite essentiellement sur la planaire marine hermaphrodite : *Procerodes lobata* O. Schmidt (1862) dont un schéma de l'organisation générale modifié d'après Lang est donné par De Beauchamp (1961, p. 109). Toutefois, pour des raisons matérielles, c'est la planaire marine, *Sabussowia dioica* Claparède (1863), qui a servi de modèle pour la recherche du FMRF-amide.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Les planaires hermaphrodites *Procerodes lobata* ainsi que les planaires gonochoriques *Sabussowia dioica* ont été récoltées dans le golfe de Tunis, à Salambô, à proximité de l'Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de Pêche (INSTOP). Pour ce faire, des entéromorphes, algues côtières, ont été prélevées, transportées au laboratoire et mises dans des cristallisoirs remplis d'eau de mer. Au bout de quelques heures, les planaires apparaissent à la surface de l'eau ou sur les parois transparentes. Elles sont prélevées à l'aide d'un pinceau et placées dans un récipient contenant de l'eau de mer filtrée où elles peuvent être maintenues en élevage quelques jours avant utilisation.

Technique immunohistochimique

Les planaires entières sont fixées dans le liquide de Bouin-Hollande (dépourvu d'acide acétique) additionné de 10 % de HgCl₂ puis incluses dans la paraffine. Les coupes sagittales séries de 7 µm d'épaisseur sont traitées, selon la méthode immunocytochimique décrite antérieurement (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985 a et b, 1986), par divers anticorps dirigés contre des neuropeptides de vertébrés, leu-enképhaline, mét-enképhaline, α-néo-endorphine, β-endorphine, dynorphine 1-17, somatostatine, GRF (Growth Hormone Releasing Factor), substance P, cholécystokinine

(CCK-8s), FMRF-amide, et contre la sérotonine. Ces immunoglobulines fabriquées chez le lapin sont utilisées après dilution au 1/200 pendant une nuit en chambre humide. Des témoins sont laissés dans un sérum de chèvre sans anticorps. Après rinçage des coupes dans le tampon de Coons, on fait agir un sérum de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase dilué au 1/40 (Diagnostics Pasteur) pendant une heure et demie. La révélation est faite au 4-chloro-1-naphtol. Des témoins n'ont pas été soumis à ce deuxième anticorps.

Après observation et photographie, la réaction immunologique obtenue est élueée selon la méthode de Tramu *et al.* (1978) puis les coupes sont colorées par la technique de détection des neurosécrétions de Clark (1955) modifiée en remplaçant le chromotrope 2R par l'hématoxyline de Groat (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1986). Il convient de souligner ici que la fuchsine paraldéhyde (FP) colore certaines cellules neurosécrétrices mais aussi des cellules muqueuses.

Abréviations utilisées : Ac : anticorps ; c : cerveau (ganglions cérébroïdes) ; CCK-8s : cholécystokinine-8s ; cnv : cordon nerveux ventral ; D : face dorsale ; Dyn 1-17 : dynorphine 1-17 ; β -end : β -endorphine ; épид : épiderme ; FP+, FP- : éléments fuchsinophiles et non fuchsinophiles ; GRF : Growth Hormone Releasing Factor ; gvc : groupe de cellules du parenchyme localisé ventralement par rapport au cerveau ; 5-HT : 5-hydroxytryptamine ; i : intestin ; IR : immunoréaction ; Leu-enk : leucine-enképhaline ; M ét-enk : méthionine-enképhaline ; α -néo-end : α -néo-endorphine ; o : œil (ocelle) ; ov : ovaire ; par : parenchyme ; ph : pharynx ; R : racine du pharynx ; SRIF : Somatotropin Release Inhibitory factor ; subst P : substance P ; t : testicule ; V : face ventrale ; v : glandes vitellogènes.

Résultats

Les faits les plus marquants obtenus avec la méthode immunohistochimique sont présentés dans le tableau 1 et sur les figures 1 à 28.

Anticorps anti-opioïdes

Ac. anti-leu-enképhaline (non illustré)

Une réaction positive a été observée dans les ganglions cérébroïdes, quelques grosses cellules dispersées dans le parenchyme et des cellules situées dans les glandes génitales (ovaires et testicules). La réponse est faible au niveau d'un groupe de cellules du parenchyme localisé ventralement par rapport au cerveau (gvc).

Ac. anti-mét-enképhaline (Figs 1 et 2)

Des immunoréactions (IR) ont été détectées à la fois dans les ganglions cérébroïdes et dans les cordons nerveux ventraux (péricaryons et fibres nerveuses) et dans l'épiderme, le parenchyme de la région prépharyngienne, le pharynx, les ovaires et les testicules.

A part quelques rares cellules du parenchyme et quelques sites des cordons nerveux ventraux qui sont à la fois mét-enk+ et FP+, la majorité des éléments mét-enk+ sont FP-.

Ac. anti- α -néo-endorphine (Figs 3 à 6)

Sont à signaler des réponses positives dans le tissu nerveux, surtout au niveau des péricaryons des ganglions cérébroïdes, dans le parenchyme dorsal et ventral, le pharynx, quelques cellules de l'ovaire et dans la paroi des testicules.

Les cellules α -néo-end+ sont nettement FP-.

Ac. anti- β -endorphine (Figs 7 à 9 et 12)

D'une manière générale, les rares réactions enregistrées dans le tissu nerveux sont faibles. On note, par contre, des marquages dans les cellules du parenchyme dont le groupe ventral au cerveau (gvc), dans les cellules présumées sensorielles situées à l'extrémité antérieure de la planaire, et dans quelques cellules des ovaires et des testicules.

A l'exception de celles du gvc, les cellules β -end+ sont FP-.

Ac. anti-dynorphine 1-17 (Figs 10 et 11)

Aucun marquage n'a été observé dans le tissu nerveux. Par contre, des réactions généralement faiblement positives ont été enregistrées au niveau du pôle apical des cellules tactiles de l'épiderme ainsi que dans de nombreuses cellules du parenchyme ; ces dernières, grandes et piriformes, ressemblent à des néoblastes. Les testicules et quelques petites cellules ovariques sont également immunoréactifs.

Anticorps anti-neurohormones hypothalamiques

Ac. anti-somatostatine (Somatotropin Release Inhibitory Factor : SRIF) (Figs 13 à 17)

Des IR ont été repérées dans les ganglions cérébroïdes, les ovaires et le parenchyme. Dans ce dernier, les marquages sont répartis dans des cellules situées dorsalement et ventralement, dans le gvc. A l'exception de ce groupe qui est SRIF+ et FP+, les autres éléments SRIF+ sont FP-.

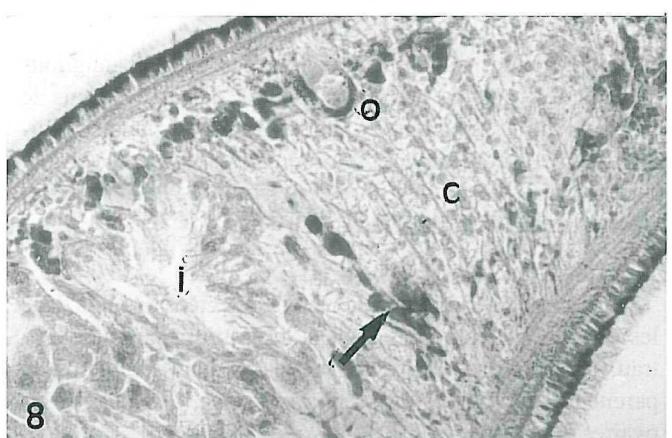
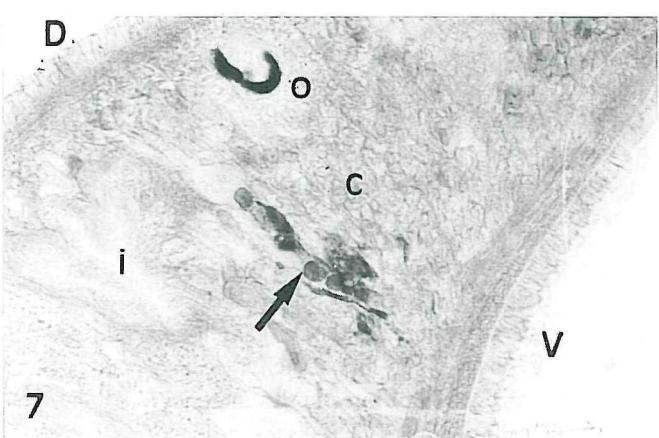
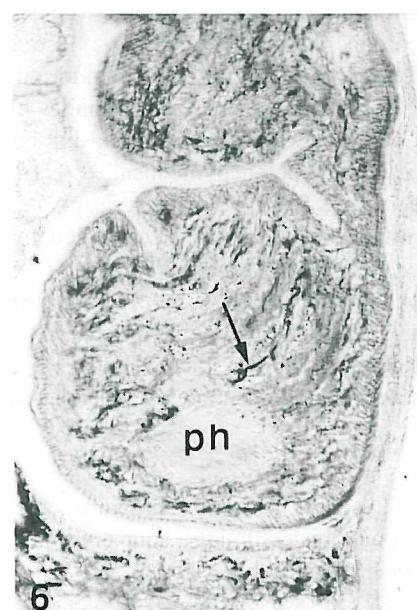
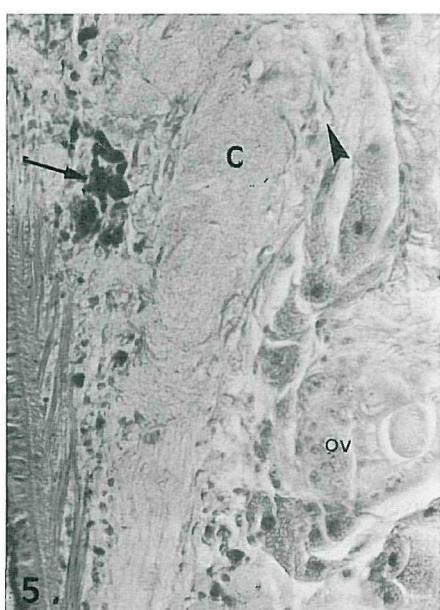
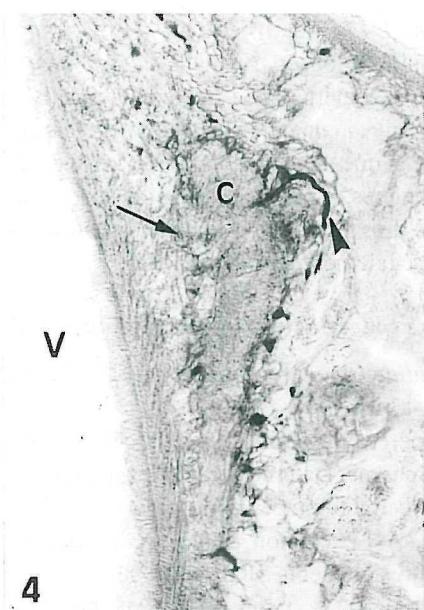
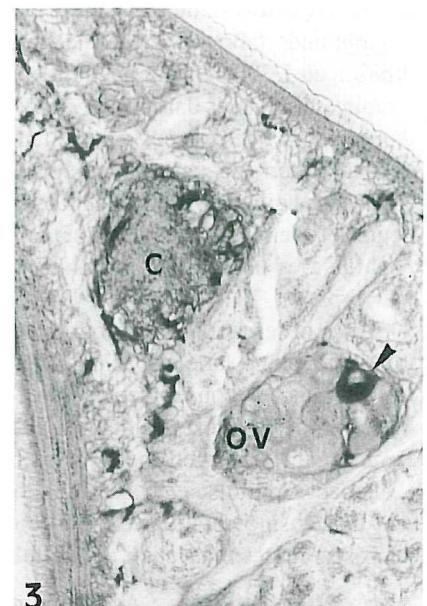
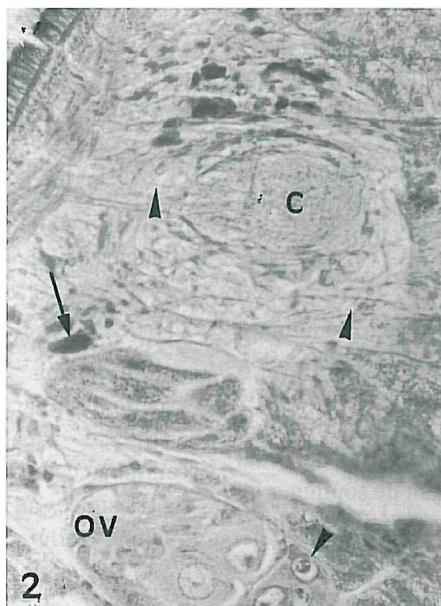
Ac. anti-GRF (Growth Hormone Releasing Factor) (non illustré)

Des marquages n'ont été obtenus que dans le tissu nerveux (péricaryons et fibres nerveuses). Les éléments GRF+ sont FP-.

Anticorps dirigés contre des hormones gastro-intestinales

Ac. anti-cholécystokinine (CCK-8s) (Figs 18 et 19)

Des éléments CCK-8s+ ont été observés en grand nombre dans le système nerveux (ganglions cérébroïdes et trajets), le pharynx et le parenchyme. Par contre, dans l'épiderme, l'ovaire et l'intestin, les marquages étaient plus rares. Toutes les cellules CCK-8s+ sont FP-.



Ac. anti-substance P (Figs 20 à 23)

Des IR ont été repérées dans les ganglions cérébroïdes (corps cellulaires périphériques et fibres centrales) et le parenchyme ventral (y compris le gvc), ainsi que dans les organes photorécepteurs. Dans le parenchyme dorsal, les ovaires et les testicules, les cellules marquées sont peu nombreuses.

A l'exception de ceux du gvc, les éléments substance P+ sont FP-.

Anticorps anti-FMRF-amide (Fig. 28)

Pour des raisons matérielles, la recherche n'a pu être effectuée que sur la planaire *Sabussowia dioica*. Des IR abondantes ont été observées dans le cerveau, l'intestin et le parenchyme.

Anticorps dirigé contre une monoamine biogène : la 5-hydroxytryptamine (5-HT) ou sérotonine (Figs 24 à 27)

L'étude immunohistochimique a abouti aux résultats suivants :

- absence d'immunomarquage dans l'épiderme, l'intestin et les glandes vitellogènes ;

- en revanche, présence dans le système nerveux (corps cellulaires et fibres des ganglions cérébroïdes et des cordons longitudinaux ventraux), dans le pharynx, dans de grandes cellules du parenchyme prépharyngien, dans les testicules, et à un degré moindre, dans le groupe de cellules du parenchyme, ventrales par rapport au cerveau (gvc) ;

- à l'exception de ceux du gvc et des testicules, les éléments 5-HT+ sont FP-.

Discussion

Cette étude menée sur des planaires marines a montré que les onze anticorps choisis provoquaient, à des degrés variables, des immunomarquages. Ceux-ci n'apparaissent pas si, dans le protocole, le premier ou le deuxième anticorps est omis.

Figures 1-2. Immunoréaction (IR) avec un Anticorps (Ac) anti-mét-enképhaline chez *Procerodes lobata*.

Figure 1. Coupe parasagittale au niveau des régions antérieure et moyenne. Des cellules marquées sont visibles dans le cerveau (c) et l'ovaire (ov), (têtes de flèches) et dans le parenchyme dorsal (grosse flèche). x 180.

Figure 2. L'IR démontrée sur la Fig. 1 a été éluee et la coupe a été colorée par la méthode de Clark. Les éléments marqués avec l'Ac sont FP- (têtes de flèches). On notera, par contre, la présence de cellules parenchymateuses non immunoréactives mais FP+ (flèche). x 290.

Figures 1-2. Immunoreaction (IR) with an antibody (Ac) to met-enkephalin in *Procerodes lobata*.

Figure 1. Parasagittal section through the anterior and the middle parts of the body. Immunostained cells are seen in the brain (c) and ovary (ov), (arrow heads) and in the dorsal parenchyma (thick arrow). x 180.

Figure 2. The section shown on Fig. 1 was destained and restained by Clark's method. Immunostained elements are FP- (arrow heads). Note the existence of not immunoreactive but FP+ parenchymal cells (arrow). x 290.

Figures 3-6. IR avec un Ac anti- α -néo-endorphine chez *P. lobata*.

Figure 3. Partie de coupe parasagittale au niveau du cerveau et d'un ovaire. En plus des éléments marqués dans le tissu nerveux, une cellule de l'ovaire est nettement immunopositive (tête de flèche). x 180.

Figure 4. Coupe parasagittale passant par le cerveau qui se prolonge par un cordon nerveux ventral. Les éléments immunoréactifs sont représentés par des corps cellulaires et des trajets périphériques du tissu nerveux. V, côté ventral. x 180.

Figure 5. Même coupe que Fig. 4 après élution et coloration selon Clark. Les éléments marqués avec l'Ac sont FP- (tête de flèche). Le groupe de cellules du parenchyme localisé ventralement par rapport au cerveau (gvc) est IR- et FP+ (flèches). x 290.

Figure 6. IR dans le pharynx (ph) (flèche). x 180.

Figures 3-6. IR with an antibody to α -neo-endorphin in *P. lobata*.

Figure 3. Part of a parasagittal section through the brain and an ovary. In addition to immunostained elements in the nerve tissue, a cell in the ovary is strongly immunoreactive. x 180.

Figure 4. Parasagittal section through the brain and a ventral nerve cord. Perikarya and peripheral nerve fibres are immunostained. V, ventral side. x 180.

Figure 5. The section shown on fig 4 was destained and restained by Clark's method. Immunoreactive elements are FP- (arrow head). The group of parenchymal cells located under the brain (gvc) is IR- and FP+ (arrows). x 290.

Figure 6. IR in the pharynx (ph) (arrow). x 180.

Figures 7-8. IR avec l'Ac anti- β -endorphine chez *P. lobata*. (voir également Fig. 9 et 12).

Figure 7. Partie de coupe parasagittale dans la région céphalique passant par l'œil (o), la périphérie du cerveau et le groupe de cellules du parenchyme situé sous le cerveau (gvc) (grosse flèche). Ce dernier est nettement immunoréactif. D, côté dorsal ; V, côté ventral. x 290.

Figure 8. Même coupe que celle de la Fig. 7 après élution et coloration de Clark. Le gvc est à la fois immunoréactif et FP+ (grosse flèche). x 290.

Figures 7-8. IR with an antibody to β -endorphin in *P. lobata* (see also Fig. 9 & 12).

Figure 7. Part of a parasagittal section through the eye (o), the periphery of the brain and the gvc (thick arrow). This latter is strongly immunostained. D, dorsal side, V, ventral side. x 290.

Figure 8. The section shown on Fig. 7 was destained and restained by Clark's method. The gvc is both immunoreactive and FP+ (thick arrow). x 290.

Tableau 1. Localisation chez la planaire marine *Procerodes lobata* des éléments immunoréactifs pour des neuropeptides de vertébrés et la 5-HT.

Table 1. Localization in the marine planarian *Procerodes lobata* of immunoreactive elements for vertebrate neuropeptides and 5-HT.

substances	c FP-	cnv FP- FP+	épid FP- FP+	i FP-	ov FP- FP+	gvc FP+	par FP- FP+	ph FP-	t FP- FP+	v FP-	
Leu-enk	+	+	-	-	+	+	-	±	+	±	-
Mét-enk	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
α-néo-end	+	-	-	-	-	+	-	-	+	±	-
β-end	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Dyn 1-17	-	-	-	±	-	-	+	-	±	+	-
SRIF	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
GRF	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCK-8s	+	+	-	±	-	±	+	-	+	+	-
Subst P	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
5-HT	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+

+ : IR franche. ± : IR plus faible. - : IR négative.

+ : strong IR. ± : moderate IR. - : negative IR.



Figure 9. Immunoréaction (IR) avec l'Anticorps (Ac) anti-β-endorphine dans la région antérieure de *P. lobata* montrant des éléments marqués dans le groupe de cellules du parenchyme (gvc) (grosse flèche) situé ventralement par rapport au cerveau, dans l'ovaire (tête de flèche) et dans le parenchyme, près de l'extrémité antéro-ventrale (petite flèche). x 180.

Figure 9. Immunoreaction (IR) with an antibody to β-endorphin in the anterior part of *P. lobata* showing immunostained elements in the group of parenchymal cells (gvc) (thick arrow) located under the brain, the ovary (arrow head) and the parenchyma, near the antero-ventral end of the planarian (small arrow). x 180.

Figures 10-11. IR avec l'Ac anti-dynorphine 1-17 chez *P. lobata*.

Figure 10. Dans la région antérieure, le cerveau (c) n'est pas marqué ; par contre, des IR de moyenne importance sont visibles (grosse flèche) au niveau de cellules du parenchyme situées autour de la section du caecum intestinal. D, côté dorsal. x 180.

Figure 11. IR nette au niveau de l'ovaire (ov) (tête de flèche). x 180.

Figures 10-11. IR with an antibody to dynorphin 1-17 in *P. lobata*.

Figure 10. In the anterior part of the body the brain (c) is not stained while moderate immunoreactions are seen (thick arrow) in the parenchymal cells surrounding the intestinal section. D, dorsal side. x 180.

Figure 11. Strong IR in the ovary (ov) (arrow head). x 180.

Figure 12. IR avec l'Ac anti-β-endorphine chez *P. lobata*. La réponse est positive dans les gamètes mâles (flèche), testicules (t) et négative dans les glandes vitellogènes (v). x 290.

Figure 12. IR with an antibody to β-endorphin in *P. lobata*. The reaction is positive in the male gametes (arrow), testes (t) and negative in the vitellaria (v). x 290.

Figures 13 - 17. IR avec l'Ac anti-somatostatine (SRIF) dans une coupe parasagittale de la région antérieure de *P. lobata*.

Figure 13. Un marquage est visible dans le cerveau et l'ovaire (têtes de flèches). x 180.

Figures 14-15. Marquage dans le gvc (grosse flèche) (Fig. 14). Après élution et coloration de Clark (Fig. 15), les cellules sont FP+ (grosse flèche). Fig. 14 : x 180, Fig. 15 : x 290.

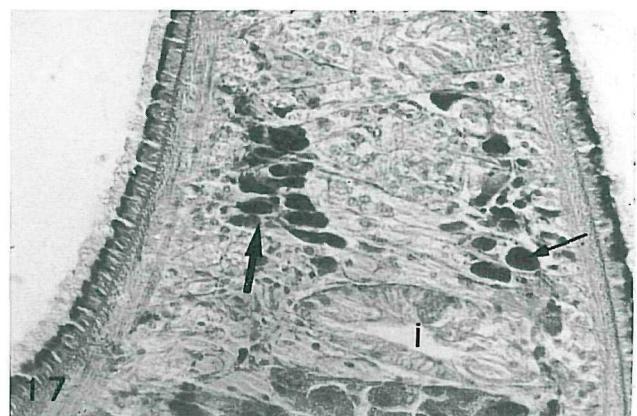
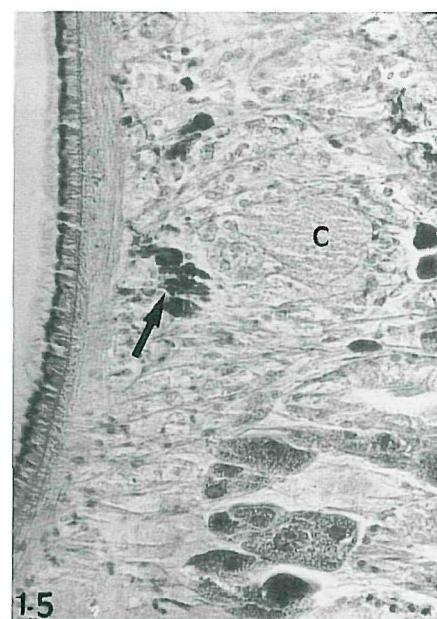
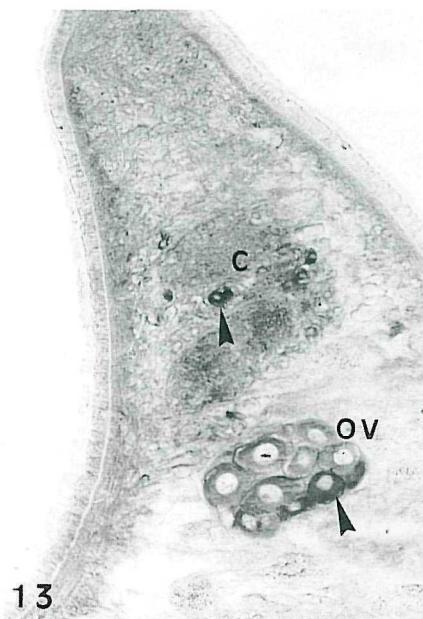
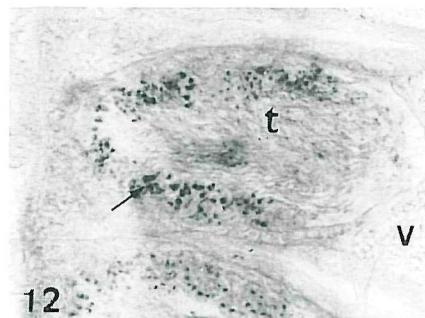
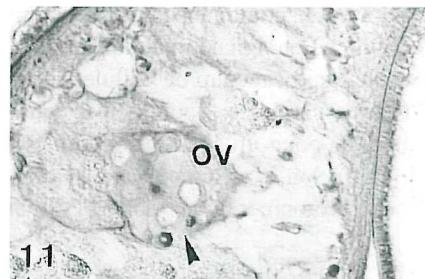
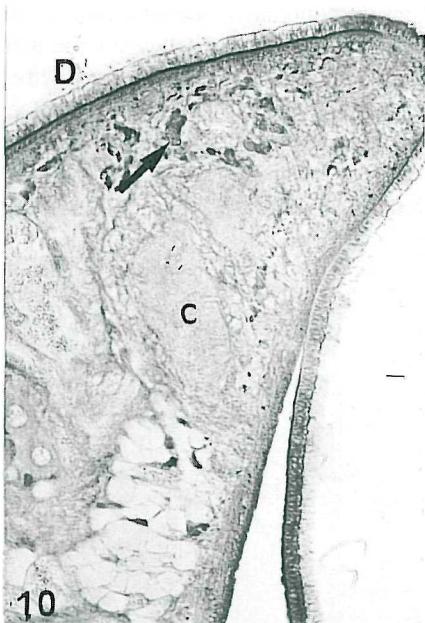
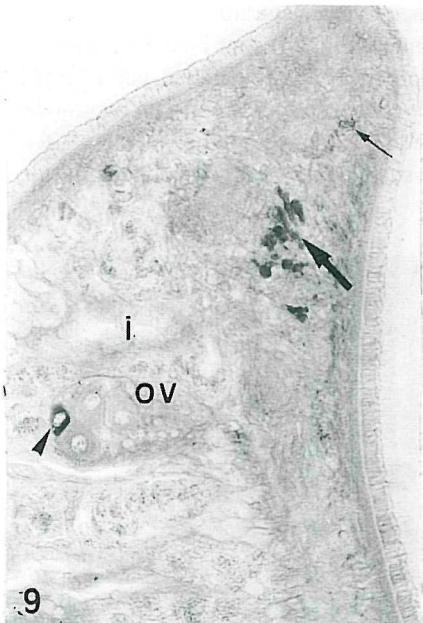
Figures 16-17. IR dans les cellules du gvc (grosse flèche) mais non dans d'autres cellules du parenchyme (petite flèche). Après élution et coloration de Clark, tous les éléments immunoréactifs sont FP+. A noter que certaines cellules non immunomarquées sont aussi FP+. i, intestin. x 290.

Figures 13 - 17. IR with an antibody to somatostatin (SRIF) in a parasagittal section through the anterior region of *P. lobata*.

Figure 13. An immunostaining is visible in the brain and the ovary (arrow heads). x 180.

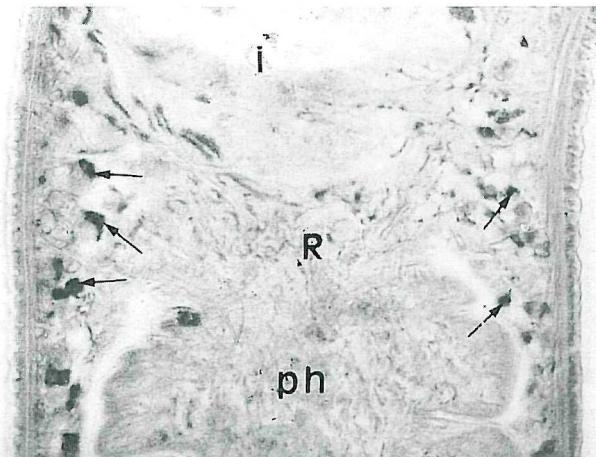
Figures 14-15. Immunostaining in the gvc (thick arrow) (Fig. 14). After destaining and Clark's staining (Fig. 15), immunoreactive cells are FP+ (thick arrow). Fig. 14: x 180, Fig. 15: x 290.

Figures 16-17. IR in the gvc (thick arrow) but not in the other parenchymal cells (small arrow). After destaining and Clark's staining, all the immunoreactive elements are FP+. i, gut. x 290.

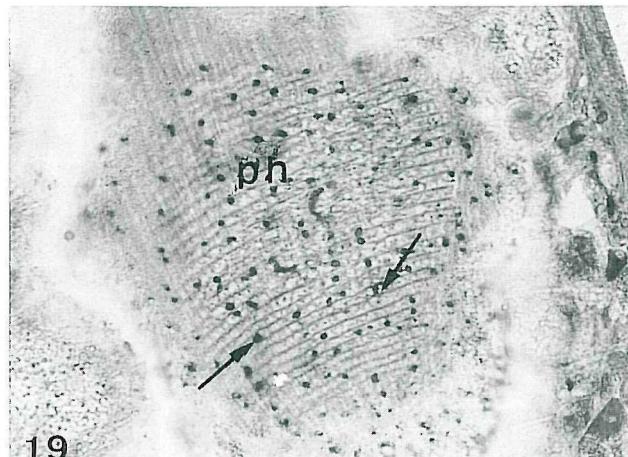


Grâce à la combinaison des deux techniques immunohistochimique et signalétique des neurosécrétions, il a pu être détecté que beaucoup de cellules immunoréactives ne sont pas fuchsinophiles. Toutefois, il convient d'insister sur le fait que, pour un même anticorps, les résultats peuvent différer selon le tissu envisagé. A titre d'exemple, les neurones sérotoninergiques sont FP- mais certains éléments

cellulaires des cordons nerveux ventraux, ou mieux, les flagelles des spermatozoïdes (Fig. 24) sont FP+. Ces observations peuvent être rapprochées de celles faites, par exemple, chez une annélide polychète où il a été constaté de grandes variations des caractères de fuchsinophilie, même au sein d'un même organe (le système nerveux) (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985a).



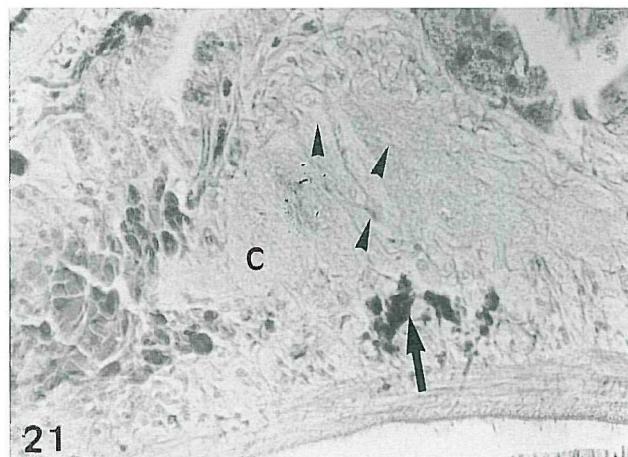
18



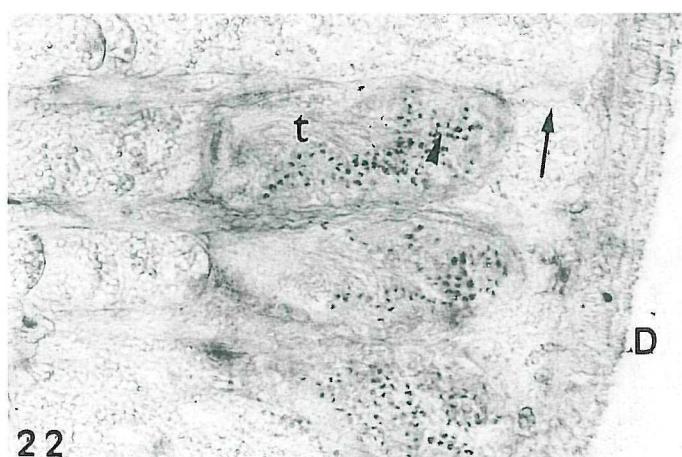
19



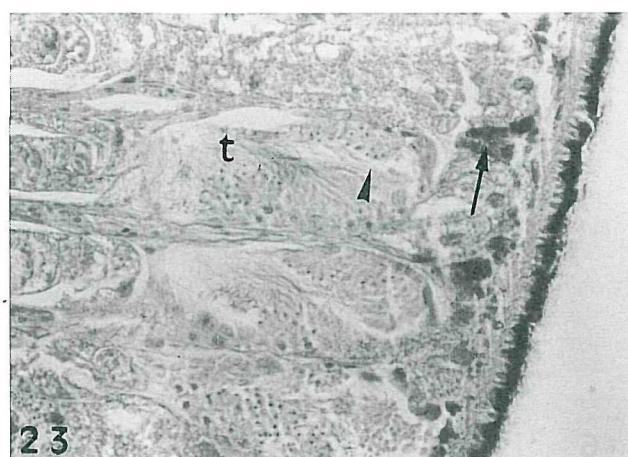
20



21



22



23

N'ayant pu, lors de cette étude immunohistochimique, disposer des nombreux antigènes qui auraient permis d'effectuer des contrôles complémentaires (tels qu'une pré-absorption du premier anticorps avant application de la technique), nous sommes bien évidemment conscients que les résultats présentés ici ne peuvent être considérés comme définitifs.

Toutefois, la confrontation de nos observations avec les données recueillies sur d'autres vers, chez lesquels il a pu être établi que la plupart des IR obtenues correspondaient à la présence effective d'un produit appartenant aux familles peptidiques recherchées (Dhainaut-Courtois & Golding, 1988 ; Reuter *et al.*, 1988, 1995a, b ; Fewou & Dhainaut-Courtois, 1995 ; Salzet *et al.*, 1995), semble autoriser les quelques hypothèses formulées ci-dessous.

Par exemple, la comparaison entre nos propres résultats et ceux qui ont été décrits par divers auteurs chez le cnidaire *Hydra attenuata* (Grimmelikhuijen, 1983), et chez des plathelminthes (Reuter *et al.*, 1988, 1995a, b) met quelques données en exergue.

Les familles du FMRF-amide et de la substance P, déjà détectées chez l'hydre et tous les plathelminthes testés (Acoela, Proseriata, Tricladida et Rhabdocoela) se rencontrent également chez les planaires marines.

Les familles de la mét-enképhaline, du SRIF, du GRF et de la 5-HT, dont la présence a été démontrée chez tous les plathelminthes étudiés, existent aussi chez les planaires marines.

La famille de la leu-enképhaline, détectée chez les plathelminthes Triclades et Rhabdocoèles mais non chez les Acoèles, se trouve chez les planaires marines.

En ce qui concerne les familles de l' α -néo-endorphine, la β -endorphine, la dynorphine 1-17 et de la CCK/gastrine, nous ne disposons pour l'instant que des données recueillies chez *Procerodes lobata*. Compte tenu des IR observées, il est possible d'émettre l'hypothèse que si les familles de l' α -néo-endorphine et de la CCK/gastrine sont déjà bien exprimées dans le système nerveux des planaires marines, il n'en est pas de même pour celles de la β -endorphine et de la dynorphine.

Des recherches complémentaires pour conclure définitivement sur l'absence ou la présence dans le tissu nerveux de planaires marines de ces deux dernières familles seraient d'autant plus intéressantes que leur existence dans le système nerveux des annélides est maintenant établie (Dhainaut-Courtois & Golding, 1988 ; Porchet & Dhainaut-Courtois, 1988 ; Salzet, communication personnelle).

Il est évident que cette comparaison qui relève de la phylogénie moléculaire gagnerait en précision si les données immunohistochimiques, obtenues avec l'utilisation d'anticorps et de groupes animaux plus variés, étaient plus nombreuses.

Par ailleurs, les résultats recueillis après examen de l'ensemble des tissus de *Procerodes lobata* dévoilent une autre facette de l'expression génomique. En effet, si les glandes vitellogènes ne sont jamais immunoréactives et que les anti-



Figures 18-19. Immunoréaction (IR) avec l'Anticorps (Ac) anti-CCK-8s chez *P. lobata*.

Figure 18. Coupe parasagittale passant au niveau de la racine (R) du pharynx (ph). Beaucoup de cellules du parenchyme sont immuno-réactives (flèches). i, intestin. x 180.

Figure 19. IR au niveau du pharynx (flèches). x 290.

Figures 18-19. Immunoreaction (IR) with an antibody to CCK-8s in *P. lobata*.

Figure 18. Parasagittal section through the root (R) of the pharynx (ph). Many parenchymal cells are immunoreactive (arrows). i, gut. x 180.

Figure 19. IR in the pharynx (arrows). x 290.

Figures 20-23. IR avec l'Ac anti-substance P chez *P. lobata*.

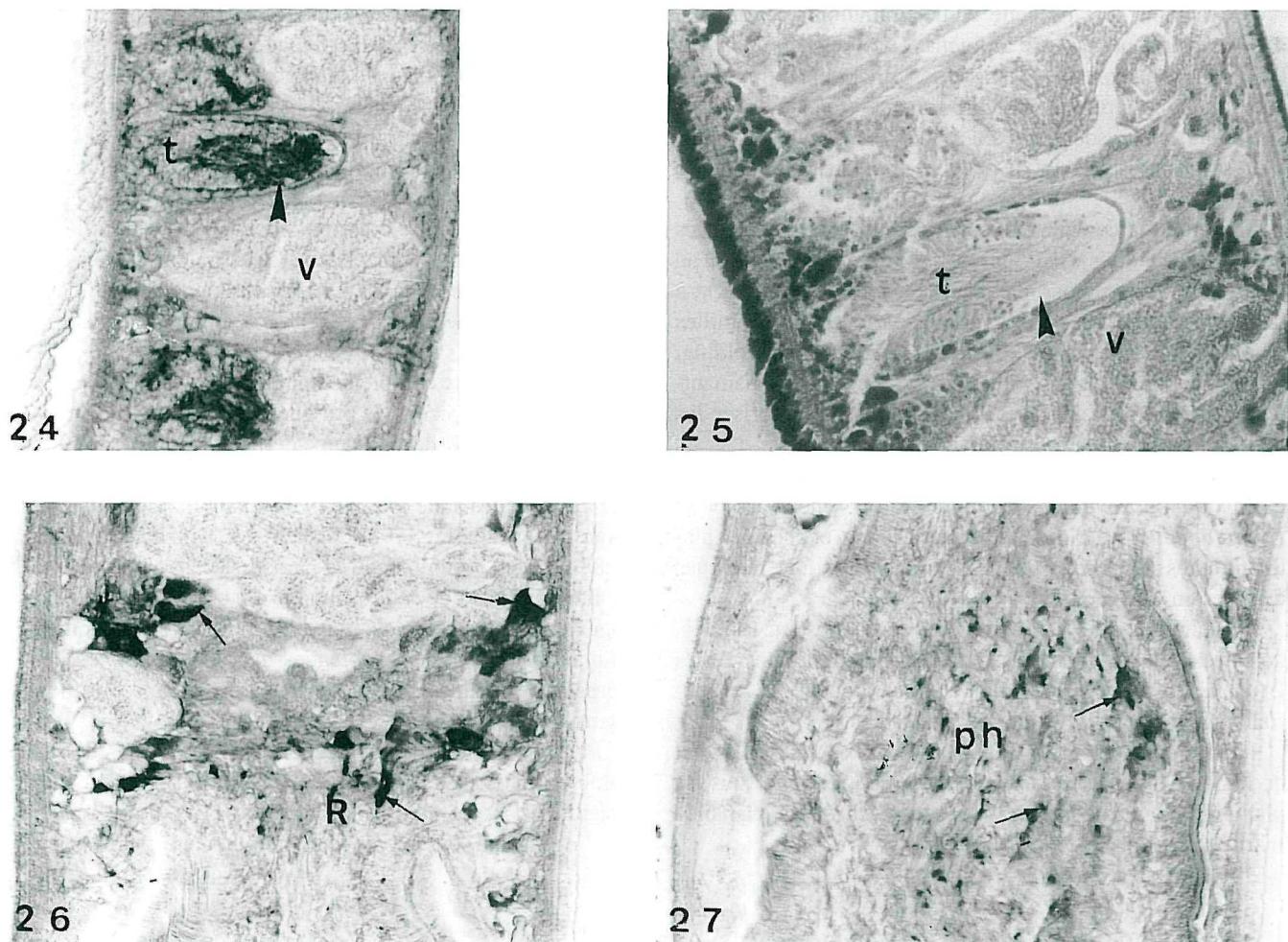
Figures 20-21. Coupe parasagittale passant par le cerveau (c) et le gvc (grosse flèche) respectivement après traitement immunohistochimique (Fig. 20) et coloration de Clark (Fig. 21). Les éléments marqués dans le cerveau sont FP- (têtes de flèches) tandis que les cellules immunoréactives du gvc sont FP+. Fig. 20 : x 180, Fig. 21 : x 290.

Figures 22-23. Région moyenne du corps de la planaire avec trois testicules (t). Dans ces derniers, les gamètes sont immunoréactifs (têtes de flèches) (Fig. 22). On remarquera qu'après élution et coloration de Clark (Fig. 23), des cellules parenchymateuses non marquées de la Fig. 22 sont FP+ (flèche). D, côté dorsal. x 180.

Figures 20-23. IR with an antibody to substance P in *P. lobata*.

Figures 20-21. Parasagittal section through the brain (c) and the gvc (thick arrows) respectively after immunohistochemical (Fig. 20) and Clark's (Fig. 21) stainings. The labelled elements in the brain are FP- (arrow heads), while the gvc immunoreactive cells are FP+. Fig. 20: x 180, Fig. 21: x 290.

Figures 22-23. Middle region of the planarian body with 3 testes (t). The gametes are immunoreactive (arrow head, fig 22). Note that after destaining and Clark's staining (Fig. 23), the parenchymal cells not immunostained on Fig. 22, are FP+ (arrow). D, dorsal side. x 180.



Figures 24-27. Immunoréaction (IR) avec l'Anticorps (Ac) anti-5-hydroxytryptamine chez *P. lobata*.

Figures 24-25. IR (Fig. 24) puis élution et coloration de Clark (Fig. 25) d'une coupe parasagittale passant par trois testicules. Des réactions négatives sont à mentionner dans les glandes vitellogènes (v) tandis que des spermatozoïdes sont marqués (têtes de flèches) (Fig. 24). Ces derniers sont FP- (Fig. 25). Fig. 24 : x 180, Fig. 25 : x 290.

Figure 26. Coupe au niveau de la région prépharyngienne et de la racine (R) du pharynx. Le parenchyme prépharyngien présente une forte concentration en éléments marqués (flèches). x 180.

Figure 27. Coupe sagittale passant par la région moyenne du pharynx (ph) dont la paroi comporte de nombreux éléments marqués (flèches). x 180.

Figures 24-27. Immunoreaction with an antibody to 5-HT in *P. lobata*.

Figures 24-25. IR (Fig. 24) followed by destaining and Clark's staining (Fig. 25) of a parasagittal section through 3 testes. Note negative reactions in the vitellaria (v) while spermatozoa are immunolabelled (arrow head Fig. 24) and FP-. Fig. 24 : x 180, Fig. 25 : x 290.

Figure 26. Section through the prepharyngeal region and the root (R) of the pharynx. Prepharyngeal parenchyma shows a high concentration of labelled elements (arrows). x 180.

Figure 27. Sagittal section through the middle region of the pharynx (ph), the wall of which shows many immunostained elements (arrows). x 180.

corps anti- β -endorphine et -dynorphine 1-17 donnent des IR uniquement en dehors du tissu nerveux, nous avons vu que tous les autres anticorps provoquent des réponses à la fois dans le système nerveux central et, parfois aussi, dans d'autres organes (glandes génitales et intestin en particulier). Ces données peuvent être comparées à celles qui ont

été décrites pour les annélides, *Nereis* en particulier (Dhainaut-Courtois & Golding, 1988 ; Porchet & Dhainaut-Courtois, 1988), chez laquelle, par exemple, des IR ont été repérées à la fois dans le système nerveux et les ovocytes pour la leu-enképhaline et la somatostatine et dans le système nerveux et l'intestin pour la CCK/gastrine.

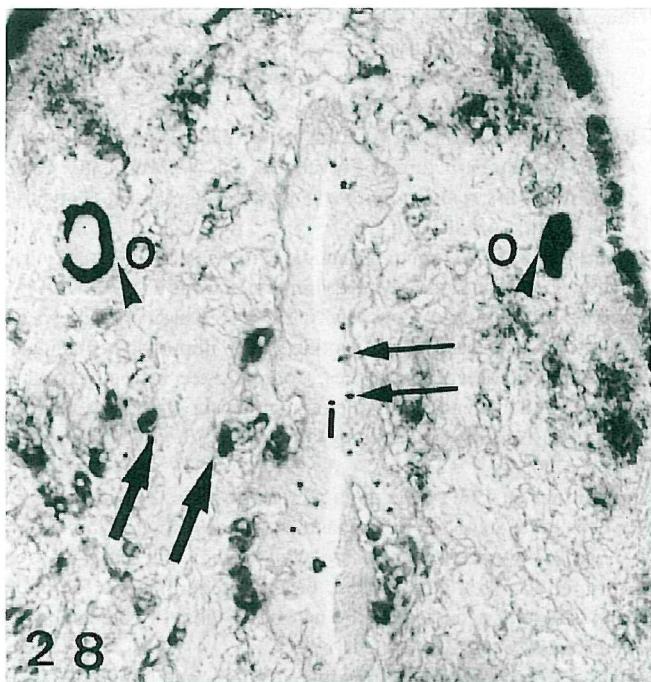


Figure 28. Immunoréaction (IR) avec l'Anticorps (Ac) anti-FMRF-amide sur une coupe frontale de la région antérieure, passant par les yeux (o), de *Sabussowia dioica* femelle. Des cellules sont marquées dans l'intestin (i) (petites flèches) et dans le parenchyme (grosses flèches). x 180.

Figure 28. Immunoreaction (IR) with an antibody to FMRF-amide on a frontal section through the anterior region, with eyes (o), of a female specimen of *Sabussowia dioica*. Labelled cells are localized in the gut (i) (small arrows) and in the parenchyma (thick arrows). x 180.

En ce qui concerne le parenchyme, structure plus diffuse, les différentes IR observées à son niveau sont plus difficilement interprétables à l'échelle de la microscopie photonique. En effet, en pratiquant la technique immunohistochimique à l'aide de l'anticorps anti-neuropeptide F (NPF), Reuter *et al.*, (1995a) ont démontré la complexité du système nerveux périphérique de la planaire marine, *Procerodes littoralis*. Il n'est pas douteux que si chez *Procerodes lobata* certaines IR, telles que celles relevées par exemple au niveau du gvc, concernent effectivement le parenchyme, d'autres au contraire sont en fait localisées sur des plexus nerveux. Pour établir avec certitude l'origine de toutes les IR, il conviendrait donc d'effectuer d'autres recherches soit en microscopie photonique avec utilisation successive, après décoloration intermédiaire (Tramu *et al.*, 1978), d'anticorps dirigés contre différents peptides puis le NPF, soit en microscopie électronique, avec ou sans double marquage (Dhainaut-Courtois & Golding, 1988).

Quant aux rôles joués par le matériel détecté par voie immunohistochimique, il est impossible pour l'instant de faire un pronostic pour la plupart des substances représentées. Plusieurs hypothèses peuvent néanmoins être avancées avec quelque certitude. Compte tenu des IR obtenues sur notre modèle biologique et des conclusions tirées par divers auteurs pour d'autres groupes d'invertébrés, il est très vraisemblable que le FMRF-amide (d'abord décrit comme peptide agissant sur le cœur de certains mollusques) et la sérotonine exercent une action sur la musculature (revues *in* Dhainaut-Courtois & Golding, 1988 ; Reuter *et al.*, 1988 ; Baratte *et al.*, 1990, 1991). A ceci, il convient d'ajouter que la sérotonine et des molécules immunologiquement apparentées à la somatostatine et à la substance P pourraient également jouer un rôle dans les processus de régénération. Rappelons à ce sujet que non seulement l'influence de phénomènes neurosécrétoires sur la scissiparité de la planaire *Dugesia gonocephala* (Dugès) a été établie (Lender & Zghal, 1969 ; Zghal, 1973) mais que des auteurs tels que Franquinet (1979), Bautz & Schilt (1986) et Salò & Baguñà (1986) ont pu démontrer respectivement le rôle de la sérotonine et de peptides apparentés à la somatostatine et à la substance P chez plusieurs planaires d'eau douce.

En ce qui concerne la famille de la CCK/gastrine, il est intéressant de noter qu'elle est détectée à la fois dans le système nerveux et dans le tube digestif chez *Procerodes lobata*, comme chez les vertébrés (Vanderhaeghen *et al.*, 1975 ; Dockray, 1976) ou d'autres invertébrés tels que les annélides polychètes (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1985a).

Par ailleurs, l'abondance et la variété des IR observées dans le parenchyme apporte des arguments en faveur d'activités endocrines importantes à ce niveau. Soulignons à nouveau que le parenchyme, tissu fort complexe, assure des fonctions variées (respiration, excrétion, glycogenèse, adipogenèse, etc.) (Beaumont & Cassier, 1981). Comme il a déjà été souligné ci-dessus, il conviendrait toutefois, pour conclure définitivement, d'opérer à l'aide de travaux complémentaires la distinction entre cette structure diffuse et les plexus nerveux qui y sont intriqués.

Enfin, nous insisterons aussi sur la similitude d'IR obtenues avec quelques anticorps sur le système nerveux et les glandes génitales qui laissent présager la présence à ces deux niveaux d'un matériel identique ou immunologiquement apparenté. Les observations analogues ont été faites chez d'autres invertébrés. A titre d'exemple, rappelons le cas de *Nereis* chez laquelle leu-enképhaline et somatostatine ont été décrites à la fois dans le système nerveux et dans les ovocytes (Porchet & Dhainaut-Courtois, 1988). Ces résultats posent tout particulièrement le problème de l'expression génomique.

En conclusion, bien qu'encore très préliminaires, ces travaux d'immunohistochimie menés sur des planaires marines, représentants primitifs des planaires, apportent des

résultats originaux qui ouvrent des perspectives pour de nouvelles explorations dans les domaines de l'expérimentation, de la biochimie, voire de la biologie moléculaire.

Références

- Baratte B., van Minnen J., Masson M. & 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*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, **311** : 495-500.
- Baratte B., Gras-Masse H., Ricart G., Bulet P. & 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*. *European Journal of Biochemistry*, **198** : 627-633.
- Bautz A., Schilt J., Richoux J.-P. & Dubois M.-P.** 1980. Détection immunocytologique, dénombrement et localisation des cellules à somatostatine (SRIF) chez deux espèces de Planaires, *Dugesia lugubris* et *Dendrocoelum lacteum* (Turbellariés, Triclades). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, **291** : 833-836.
- Bautz A. & Schilt J.** 1986. Somatostatin-like peptide and regeneration capacities in Planarians. *General and Comparative Endocrinology*, **64** : 267-272.
- Beauchamp P. (De)** 1961. Classe des Turbellariés. In *Traité de Zoologie IV*. (944 p) Ed. P.-P. Grassé. Masson et Cie, Paris, 35-212.
- Beaumont A. & P. Cassier** 1981. Biologie Animale : Des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens. Tome 1 (484 p) Dunod, Bordas, Paris, 155-169.
- Clark R.B.** 1955. The posterior lobes of the brain of *Nephrys* and the mucus glands of the prostomium. *Quartely Journal of Microscopical Sciences*, **96** : 545-565.
- Dei-Cas E., Dhainaut-Courtois N., Dhainaut A. & Vernes A.** 1980. Contribution à l'étude du système nerveux des formes adultes et larvaires de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda Digenea). I. Aspects morphologiques : anatomie, histologie et ultrastructure chez la forme adulte. *Annales de Parasitologie (Paris)*, **55** : 69-86.
- Dei-Cas E., Dhainaut-Courtois N. & Biguet J.** 1981. Contribution à l'étude du système nerveux des formes adultes et larvaires de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda Digenea). II. Rôle de la sérotonine et de la dopamine. *Annales de Parasitologie (Paris)*, **56** : 271-284.
- Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Marcel R., Malecha J., Verger-Bocquet M., Andries J.-C., Masson M., Selloum L., Belemtougri C. & Beauvillain J.-C.** 1985a. Cholecystokinin in the nervous systems of invertebrates and protostomes. Immunohistochemical localization of a cholecystokinin 8-like substance in annelids and insects. *First. Int. Conf. Neuronal Cholecystokinin*, July 3-6, 1984, Brussels, Belgium, *Annals New York Academy of Sciences*, **448** : 167-187.
- Dhainaut-Courtois N., Dubois M.-P., Tramu G. & Masson M.** 1985b. Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annelida Polychaeta) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. *Cell and Tissue Research*, **242** : 97-108.
- Dhainaut-Courtois N., Tramu G., Beauvillain J.-C. & Masson M.** 1986. A qualitative approach of the *Nereis* neuropeptides by use of antibodies to several vertebrates peptides. *Neurochemistry International*, **8**, n° 3, 327-338.
- Dhainaut-Courtois N. & 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.
- Dockray G.J.** 1976. Immunochemical evidence of cholecystokinin-like peptide in brain. *Nature (London)* **264** : 568-570.
- Fewou J. & Dhainaut-Courtois N.** 1995. Research on polychaete annelid 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. *Biology of the Cell*, **85** : 21-33.
- Franquinet R.** 1979. Rôle de la sérotonine et des catécholamines dans la régénération de la Planaire *Polyclad tenuis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **57**, **7** : 85-95.
- Grimmelikhuijen C.J.P.** 1983. FMRF-amide immunoreactivity is generally occurring in the nervous system of coelenterates. *Histochemistry* **78** : 361-381.
- Lender Th. & Zghal F.** 1969. Influence des conditions d'élevage et de la neurosécrétion sur les rythmes de scissiparité de la race asexuée de *Dugesia gonocephala*. *Annales d'Embryologie et de Morphogenèse*, **2**, **3** : 379-385.
- Martin G.** 1980. Contribution à l'étude cytologique et fonctionnelle des systèmes de neurosécrétion des Crustacés Isopodes. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université de Poitiers, France.
- Porchet M. & Dhainaut-Courtois N.** 1988. Neuropeptides and monoamines in annelids. M.C. Thorndyke and G.J. Goldsworthy (eds). *Neurohormones in invertebrates. Society for experimental biology seminar series*. Vol. 33. Cambridge University Press., 219-233.
- Reuter M., Lehtonen M. & Wikgren M.** 1988. Immunocytochemical Evidence of Neuroactive Substances in Flatworms of Different Taxa. A Comparison. *Acta Zoologica (Stockh)*, **69** : 29-37.
- Reuter M., Gustafsson M.K.S., Sahlgren C., Halton D.W., Maule A.G. & Shaw C.** 1995a. The nervous system of Tricladida.I. Neuroanatomy of *Procerodes littoralis* (Maricola, Procerodidae) : an immunocytochemical study. *Invertebrate Neuroscience*, **1** : 113-122.
- Reuter M., Gustafsson M.K.S., Sheiman I.M., Terenina N., Halton D.W., Maule A.G. & Shaw C.** 1995b. The nervous system of Tricladida II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Paludicola, Dugesiidae) : an immunocytochemical study. *Invertebrate Neuroscience*, **1** : 133-143.
- Salò E. & Baguñà J.** 1986. Stimulation of cellular proliferation and differentiation in the intact and regenerating planarian *Dugesia (g) tigrina* by neuropeptide substance P. *Journal of Experimental Zoology*, **237** : 129-135.
- Salzet M., Bulet P., Wattez C., Verger-Bocquet M. & Malecha J.** 1995. Structural characterization of a diuretic peptide from the central nervous system of the leech *Erpobdella octoculata* : Angiotensin II-amide *The Journal of Biological Chemistry*, **270** (4) 1575-1582.

- Scharrer B.** 1978. Peptidergic neurons : Facts and trends. *General and Comparative Endocrinology*, Vol. 34, n° 1, 50-62.
- Tramu G., Pillez A. & Leonardelli J.** 1978. An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry*, **26** : 322-324.
- Vanderhaeghen J.J., Signneau J.C. & Gepts W.** 1975. New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature (London)*, **257** : 604-605.
- Zghal F.** 1973. Influence de la neurosécrétion sur la scissiparité de la Planaire *Dugesia gonocephala* (Dugès). Interaction de la neurosécrétion et des synthèses biochimiques. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université de Paris Sud, centre d'Orsay.