

Recherches immunocytochimiques au niveau du pédoncule oculaire et de chaîne nerveuse ventrale de *Palaemonetes punicus* (Crustacé Décapode).

Atf Azzouna

Laboratoire de Biologie Animale, École Normale Supérieure de Bizerte,
7021 Zarzouna, Bizerte Tunisie

Résumé : Le pédoncule oculaire et la chaîne nerveuse ventrale de la crevette d'eau douce, *Palaemonetes punicus*, ont été le sujet d'investigations immunocytochimiques par le microscope fluorescent, utilisant des anticorps contre : l'hormone hyperglycémiant du crabe *Carcinus* (CHH), l'hormone adipokinétique des insectes (AKH), la sérotonine (5HT), la substance P et la bombésine du commerce.

Une réaction positive avec l'antisubstance P est faible au niveau de la glande du sinus et du neuropile de la medulla terminalis. Par contre, aucune réaction n'a été observée avec l'anti-bombésine.

CHH-like peptide a été observé mais faiblement dans un groupe de cellules neurosécrétrices de la medulla terminalis (Medulla Terminalis Ganglionic X-organ = MTGX), dans les fibres reliant la MTGX à la glande du sinus, et dans la majorité des terminaisons axonales de la glande de sinus.

AKH-like a été observé dans la région proximale de la glande du sinus et dans deux grosses cellules de la MTGX2 région supposée de synthèse de l'hormone qui concentre le pigment rouge dans les chromatophores (RPCH). Le résultat positif explique la similitude entre l'AKH des corpora cardica des insectes *Locusta migratoria* et la RPCH des Crustacés.

Des résultats positifs ont été aussi obtenus avec l'anti-5HT sur la chaîne nerveuse ventrale de *Palaemonetes punicus*.

Recherches immunocytochimiques au niveau du pédoncule oculaire et de la chaîne nerveuse ventrale de *Palaemonetes punicus* (Crustacé Décapode).

Abstract : The eyestalk and the ventral nerve cord of the prawn *Palaemonetes punicus* have been the subject of immunocytochemical investigations by fluorescent microscop. Five antibodies have been used against : the Hyperglycemic Hormone of the crab *Carcinus maenas* (CHH), the Adipokinetic Hormone of Insects (AKH), the Substance P Hormone, the Bombesin Hormone and the Serotonin Hormone.

The Substance P-like was observed in little quantities in the sinus gland and the Medulla Terminalis X Organ (MTGX).

Any positive reaction was observed by using anti-Bombesin.

Using anti-CHH of *Carcinus maenas*, immuno-positive staining was obtained in some neurosecretory cells of the MTGX, and in the major part of the sinus gland and in the nerve joining the MTGX to the neurohemal gland.

Using the antiserum produced against the Insect adipokinetic Hormone (AKH), it was possible to detect adipokinetic hormone-reactive peptides in some neurosecretory cells of MTGX, of MEX and in the lower part in the sinus gland.

The anti-5HT was used only on the ventral nerve cord of the prawn. The results are positives.

INTRODUCTION

CONCEPT DE NEUROSECRETION

Les études des Crustacés ont contribué sérieusement à établir le concept de neurosécrétion. Ces études ont commencé depuis les années 1820 par la description morphologique des centres nerveux des Crustacés et particulièrement des Décapodes. Par la suite, les chercheurs se sont intéressés à l'étude des cellules neurosécrétrices découvertes depuis les

années 30 par Scharrer chez les Vertébrés. Ces cellules, d'abord appelées cellules "neuro-glandulaires" dans le système hypothalamo-neurohypophysaire, ont été retrouvées un peu plus tard, par Hanström en 1931 chez les Crustacés Décapodes. C'est cet auteur qui a décrit une "voie neurosécrétrice protocéphalique" comportant : des cellules sécrétant le produit de neurosécrétion, des axones pour le cheminement de ce produit, et des lieux de stockage de ce produit que Carlisle et Knowles en 1953, appelèrent organes neurohémaux. Gabe, en 1967, a donné une définition à la cellule neurosécrétrice ressemblant à celle de Hanström :

"De point de vue morphologique, le schéma de la cellule neurosécrétrice est simple, le péricaryone d'un neurone multi, bi ou unipolaire est le siège d'un processus de sécrétion. Cette dernière se déplace le long des axones, parvient aux terminaisons et s'y accumule pour être libérée. Cette zone d'accumulation se trouve au contact de vaisseaux et de lacunes sanguines."

Les premières investigations des systèmes de neurosécrétion ont été réalisées avec les techniques de microscopie photonique. Ainsi, depuis 1951 à nos jours, un grand nombre de chercheurs ont décrit chez les Décapodes des cellules neurosécrétrices dans le cerveau, les pédoncules oculaires, le ganglion sous œsophagien et le ganglion commissural (Bressac, 1978). Toutefois, ces descriptions et des essais de comparaison de ces cellules chez différents groupes de Décapodes restent aléatoires.

En parallèle, ces auteurs se sont intéressés aux organes neurohémaux qui sont formés par des terminaisons nerveuses n'innervant aucun muscle, et localisés le long ou dans les parois des vaisseaux, ou dans des cavités sanguines. Comme organes neurohémaux la glande du sinus était le premier organe étudié en détail par Hanström (1933). C'est un lieu de stockage pour les hormones sécrétées dans les cellules neurosécrétrices localisées au niveau du ganglion optique proximal ou medulla terminalis dans les pédoncules oculaires des Crustacés Décapodes. Ce groupe cellulaire, appelé d'abord organe de Hanström par Gabe (1967) en l'honneur à cet auteur qui l'a décrit le premier, porte actuellement le nom d'organe X de la medulla terminalis (MTGX). Les organes péricardiques forment le deuxième type de système neurohemal. Reconnu comme tel par Alexandrowitz et Carlisle (1953), ils sont localisés dans la cavité péricardique. Des variations considérables de leur anatomie existent chez les malacostracés et une spécialisation de leur structure où les terminaisons nerveuses viennent en contact du système circulatoire est très bien décrite par cet auteur.

Le troisième système neurohémal, les organes postcommissuraux, ont une structure ressemblant à celle de la glande du sinus. Carlisle et Knowles (1959) les ont décrits chez les Caridea (*Penaeus brasiliensis* et *Palaemon serratus*) et chez le stomatopode *Squilla mantis*. Les nerfs de ces organes surgissent de la commissure tritocérébrale qui lie les deux connectifs perioesophagiens.

Un peu plus tard, en 1959, Fingerman et Aoto ont commencé l'étude ultrastructurale de la voie neurosécrétrice en s'intéressant à *Cambarellus shuffeldti*. Hisano (1976) a étudié les cellules neurosécrétrices du pédoncule oculaire de *Palaemon paucidens*. Chez les isopodes, des études ultrastructurales ont été suivies par Martin (1972), Chataignier, Martin et Juchault (1978). Chez les amphipodes une étude sur *Gammarus oceanicus* a été faite par Brodie et Halckrow en 1977.

L'étude ultrastructurale de la glande du sinus a retenu l'attention d'un plus grand nombre de chercheurs depuis 1958 jusqu'à nos jours (Strolenberg, 1979). Par contre, l'ultrastructure des organes péricardiques a fait l'objet d'un nombre réduit de publications (Bressac, 1978). L'étude ultrastructurale des organes post-commissuraux est l'œuvre de Knowles (1958) qui confirma leur fonction neurohémale.

Un trait commun a été révélé grâce à l'ultrastructure de la voie neurosécrétrice, c'est l'existence des granules de neurosécrétion, denses aux électrons, de taille et de forme variables, dans le cytoplasme des cellules neurosécrétrices ou dans la lumière des terminaisons des organes neurohémaux. Ces granules (Martin, 1980) sont synthétisés dans l'ergastoplasme, empaquetés en une prohormone par l'appareil de Golgi d'où ils sortent en sacculs golgiens par bourgeonnement (Planche I. Fig. 2, 3, 4).

Pour établir les critères de la fonction endocrine, les chercheurs en plus de ces recherches histologiques et cytologiques, ont fait des expériences d'ablation, de réimplantation ou d'injection d'extraits d'organes. Toutefois, ces expériences restent insuffisantes car l'ablation d'un organe entraîne l'ablation inévitable d'organes voisins. Pour cela, les chercheurs tendent à utiliser des méthodes indirectes comme :

- l'identification d'une substance dans la circulation, la détermination de son taux et de ses variations.
- la culture des tissus *in vitro* et la recherche des principes libérés par stimulation,
- la séparation et la purification de l'hormone, la détermination de sa structure chimique, le test de son activité avec des hormones synthétiques et l'altération des molécules pour voir le changement de leur activité physiologique (Kleinholz & Keller, (1979).

Plusieurs techniques sont utilisées :

La technique histochimique de Falck et Hillarp (1962) a permis de localiser des substances contenant des cathécolamines (dopamine, noradrénaline) ou indolamines (sérotonine). En les traitant par des vapeurs de formaldéhyde, ces produits forment des fluorophores. L'utilisation de drogues comme la réserpine permet de tester cette fluorescence.

La technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (High Performance Liquid Chromatography) est devenue largement utilisée pour le fractionnement, la purification des neuropeptides contenus dans la glande du sinus (Stuenkel, 1983 ; Keller & Kegel, 1984 ; Martin *et al.*, 1984 a ; Newcomb *et al.*, 1985 ; Schooneveld *et al.*, 1985).

Les méthodes immunocytochimiques en microscopie photonique ou électronique sont utilisées en fabriquant des anticorps contre ces principes hormonaux purifiés. Ces méthodes permettent de localiser, d'une part les sites de synthèses, et d'autre part de mesurer le taux de l'hormone circulante.

Enfin, ces techniques immunocytochimiques, utilisant des anticorps contre des hormones propres aux Crustacés, peuvent s'étendre à l'utilisation d'anticorps contre des peptides d'autres invertébrés ou de vertébrés. En effet, il est établi qu'il y a une "parenté immunologique" entre les neurofacteurs de vertébrés et d'invertébrés (Martin, 1980). En plus, les études biochimiques ont montré que les peptides détectés immunologiquement ou biologiquement sont structuralement identiques ou très intimement apparentés chez les deux

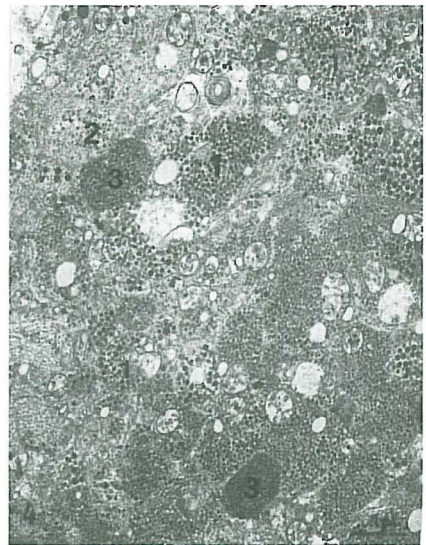
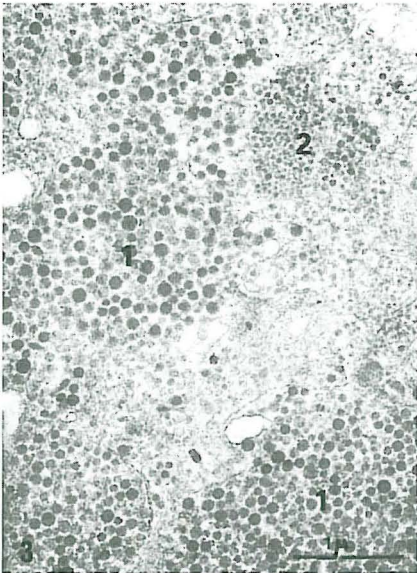
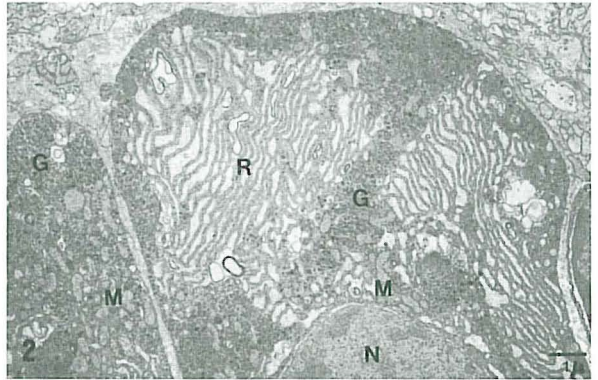
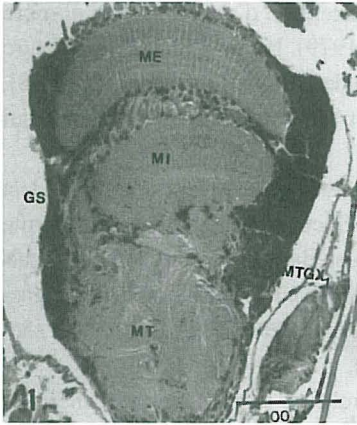


PLANCHE I

Fig. 1 : Pédoncule oculaire en coupe longitudinale montrant la medulla externa ME, la medulla interna MI, la medulla terminalis MT, la glande du sinus GS, et l'organe-X de la medulla terminalis MTGX.

Fig. 2 : Ultrastructure d'une cellule neurosécrétrice montrant le noyau N, le réticulum endoplasmique R, les mitochondries M, et les granules de neurosécrétion G.

Fig. 3 : Ultrastructure de la glande du sinus avec deux types de terminaisons 1 et 2.

Fig. 4 : Ultrastructure de la glande du sinus montrant les trois types de terminaisons. Les plus nombreuses celles du type 1 et ayant les granules les plus gros semblent être à CHH.

groupes. Ces données suggèrent l'évolution longue des molécules dans le monde animal (Scharrer, B., 1978).

Après avoir vu les nouvelles techniques utilisées, il est important de rappeler les différentes catégories d'hormones. En effet, selon le rôle qu'elles jouent et la région où elles sont secrétées on distingue :

- Des neurones ordinaires qui communiquent avec leurs cellules cibles (autres neurones, cellules musculaires...) par des zones de contact bien différenciées, les synapses. Ces jonctions synaptiques entre les neurones dans la glande du sinus ont été bien visualisées par Hisano (1978). Elles sont caractérisées par le contact intime de la membrane de deux terminaisons axonales qui restent séparées par des pores. Une autre caractéristique de ces jonctions est le rangement important des granules et des petites vésicules de part et d'autre de chaque membrane au niveau de ces synapses (Zampighi *et al*, 1978).

Dans ce type de neurones, l'information est véhiculée par petites quantités. La substance, appelée Neurotransmetteur, est libérée dans les fentes synaptiques. Elle a la caractéristique, d'agir rapidement (millisecondes), d'agir à faible distance (millimètres) et d'être rapidement inactivée par dégradation enzymatique ou capture (uptake).

- Des neurones à activité sécrétoire extrêmement spécialisée. Ils libèrent leur message chimique (peptide, amine) dans le système circulatoire par exocytose. Ces principes actifs sont appelés neurohormones et sont transportés par la circulation à des longues distances vers les organes cibles dont ils modifient l'activité physiologique. Ces neurohormones agissent lentement (heures) et de façon plus durable car plus stables.

- Un intermédiaire, des neurones ayant des caractères de neurohormones et des caractères de neurotransmetteurs. Ces neurones libèrent des neuromodulateurs. Des cellules neurosécrétrices innervant directement des organes comme le tégument, l'oviducte, le cœur peuvent libérer des neuromodulateurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

L'espèce *Palaemonetes punicus* est récoltée à l'aide d'un haveneau dans les cours d'eau de Tozeur dans le sud-ouest de la Tunisie, transportée à Tunis dans un seau plein d'eau douce et muni d'un système d'oxygénation. Au laboratoire, les animaux sont installés dans des aquariums à une température et une photopériode normale.

Expériences

Nous avons utilisé la méthode de l'immunofluorescence indirecte ou Sandwich selon De Mey (1983).

- Les pédoncules oculaires disséqués, sont fixés dans le Bouin Hollande sans acide acétique ajouté de 10 % de sublimé saturé dans H₂O. Après déshydratation, l'inclusion est faite

à la paraffine. Des coupes sériées de 5 μ d'épaisseur sont effectuées. Elles sont étalées sur des lames propres à l'alun de chrome gélatiné contenant 0,5 g de gélatine, 0,5 g d'alun de chrome dans 100 cc de H₂O. Les coupes déparaffinées, hydratées, tannées et blanchies sont rincées au Phosphate-Buffer-Saline PBS ou tampon phosphate (0,1 M + 8 g/l de NaCl) ; elles sont passées au Normal-Goat-Serum NGS ou sérum de chèvre normal 1/20 dans PBS pendant une heure à température ambiante pour saturer les sites non spécifiques. Rincées au PBS les coupes sont passées au premier anticorps qui se fixe sur l'hormone existante dans l'organe quand il la reconnaît et cette hormone est un peptide-like ou apparenté parce qu'elle peut ne ressembler à l'anticorps que par quelques séquences d'acides aminés. Les anticorps utilisés sont :

- Rabbit antisubstance P du commerce d 1/40 dans PBS 24 h à 4°C et dans une chambre humide.

- Rabbit anti-bombésine du commerce dans les mêmes conditions que pour le 1^{er} anticorps.

- Rabbit anti-CHH du crabe *Carcinus maenas* (Jaros & Keller, 1979) 1/250

- Rabbit anti-AKH₁₋₄ de *Locusta migratoria* (de Schooneveld *et al*, 1985) 1/4000. Les deux derniers anticorps sont utilisés dans une chambre humide à 4°C et pendant 24 h.

Pour les témoins l'anticorps est remplacé par du Normal-Mouse-Serum (NMS) ou sérum de souris non immunisé dilué au 1/40 dans PBS + Acide + Albumine. Après lavage au PBS les coupes sont passées au 2^e anticorps qui reconnaît le 1^{er} anticorps, c'est le Goat-Anti-Rabbit (GAR) ; il est couplé à l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) qui est fluorescent en lumière ultra-violette et peut donc être visible au microscope fluorescent ; la dilution est au 1/35, la durée est d'une heure. Après lavage les coupes sont contrastées par du Bleu Evans 1/5000 pendant 10 mn puis montées dans du citifluor.

- La chaîne nerveuse ventrale, disséquée, est fixée pendant une nuit en chambre froide dans 2 g de para formaldéhyde dans 100 cc de cacodylate de Na 0,4 M à pH 7,5, lavée dans PBS salé à 8,5 % à pH 7, 4, déshydratée dans plusieurs bains d'alcool 50°, 75°, réhydratée dans l'alcool 50°, PBS+Triton X-100 0,3 %. La déshydratation-réhydratation permet la perforation des parois et une pénétration meilleure de l'anticorps. Deux anticorps sont utilisés, le Rabbit antisérotonine 1/1000 et le rabbit antibombésine 1/500 dans PBS+Triton X-100 pendant 48 h. Après lavage, les échantillons sont passés dans le 2^e anticorps qui est le GAR/FITC 1/100 pendant 24 h. Les tissus rincés sont éclaircies par du salicylate de méthyle qui sert aussi de liquide de montage. L'observation s'effectue en UV.

Les témoins sont gardés dans du PBS+Triton X-100.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le pédoncule oculaire

Rappel : Le pédoncule oculaire est formé de zones ganglionnaires distinctes qui sont : sous les ommatidies la lamina ganglionaris, la medulla externa, la medulla interna et la

medulla terminalis suivie du nerf optique. Trois groupes de cellules neurosécrétrices semblent exister : la MEX (medulla externa x-organ), la MTGX1 (medulla terminalis X-organ1), et la MTGX2 (medulla terminalis X-organ2). La glande du sinus est située dorsalement à la hauteur de la MEX (Planche I, Fig. 1).

SUBSTANCE P (Planche IV, Fig. 4)

C'est un neuropeptide de vertébrés. Elle est visualisée en faible quantité dans la glande du sinus et le neuropile de la medulla terminalis. Ces résultats joignent ceux de Mancillas *et al* (1981) chez *Panulirus interruptus*. Ces auteurs étaient les premiers à trouver ce peptide apparenté dans des photorécepteurs tels que les cellules rétinienne. Cette hormone était visualisée en grande quantité dans les quatre neuropiles et dans la glande du sinus de *Panulirus interruptus*. Par contre, chez *Uca pugilator* Fingerman *et al.* (1985), n'ont pas signalé d'immunoréactivité au niveau de la medulla terminalis. Cette différence de réaction entre les trois animaux peut suggérer des différences moléculaires entre les peptides biologiquement actifs retrouvés chez les trois groupes : crevettes, brachyours, et astacours (Van Deijnen, 1986 ; Van Deijnen *et al.*, 1985). La présence de cette substance en faible quantité dans la glande du sinus et le neuropile suggère aussi que ce neuropeptide peut fonctionner comme neurorégulateur dans la libération des neurohormones de la glande du sinus ou partage-t-il des séquences avec les peptides présents dans cette glande (Fingerman *et al.*, 1985).

Dhainaut-Courtois *et al.* (1985) ont essayé ce neuropeptide sur le système nerveux d'un annélide polychète, *Nereis diversicolor*. Le fort marquage de leur système nerveux central laisse ces auteurs suggérer que cette hormone transmettrait des stimuli externes aux centres neurosécréteurs.

BOMBESINE

C'est un tétradécapeptide retrouvé chez la grenouille et agissant comme agent modulateur du système nerveux central. Son injection à des rats à des basses températures provoque une hypothermie ; par contre, il entraîne une hyperglycémie sans égard à température ambiante (Moody *et al.*, 1982). Agissant par faible quantité, cette hormone est considérée comme un neurotransmetteur. Tenté sur la glande du sinus et la chaîne nerveuse ventrale de *Palaemonetes punicus*, aucune réaction positive n'a été observée avec l'anti-bombésine.

CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE CHH (Planche II, Fig. 1, 2, 3, 4)

C'est une hormone native des Crustacés (Greenberg, Price, 1983) c'est-à-dire trouvée uniquement chez les Crustacés. Au début appelée facteur diabétogène, puis HyperGlycemic Hormone HGH et enfin Crustacean Hyperglycemic Hormone CHH, elle a reçu l'attention de nombreux chercheurs. Kleinholz (1975) l'a isolée et purifiée et a déterminé sa composition en acides aminés chez *Cancer magister*. Keller, dès 1976, soupçonnait la spécificité de cette molécule peptidique selon les groupes de Crustacés. En 1977, il a évalué son taux dans la glande du sinus, principal organe de stockage de cette hormone, à 10-20 % du taux total des protéines de glande. En 1978, Keller et Wunderer ont obtenu l'hormone pure à

partir d'extraits de la glande du sinus de *Carcinus maenas* et ont déterminé sa composition en acides aminés. Cette hormone injectée à *Uca pugilator* augmente le taux de son glucose sanguin de 150 %. Van Herp et Van Buggenum (1979) ont purifié l'hormone chez *Astacus leptodactylus* et ont fabriqué un antiserum contre cette hormone, à l'aide duquel ils ont pu

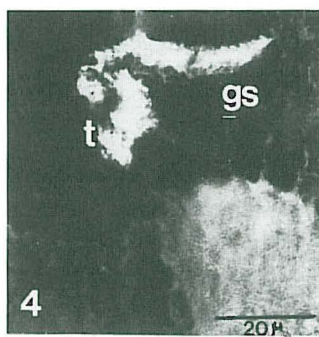
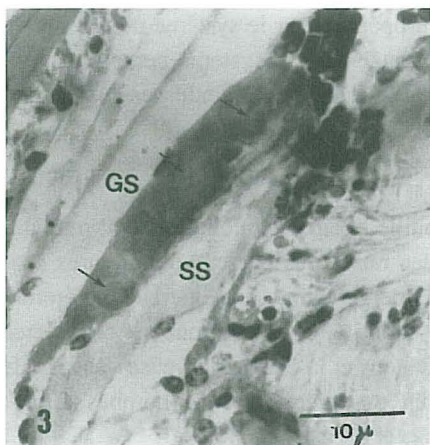
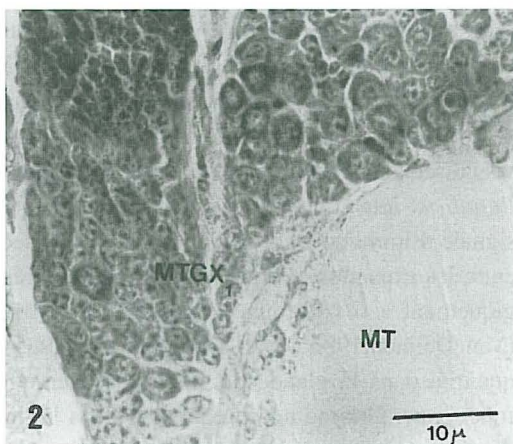


PLANCHE II

Fig. 1 : Marquage à l'anti-CHH du crabe *Carcinus maenas* des cellules neurosécrétrices de la MTGX1, vue au microscope fluorescent.

Fig. 2 : Les mêmes cellules colorées à l'éosine bleu de toluidine.

Fig. 3 : Histologie de la glande du sinus colorée à la fuschine paraldéhyde montrant les terminaisons (flèches) et son contact avec un sinus sanguin SS.

Fig. 4 : La même glande du sinus après marquage à l'anti-CHH de *Carcinus maenas*. t = tractus nerveux reliant la glande à la MTGX1. La fluorescence est intense.

localiser les différents sites de synthèse et de stockage de cette hormone. Un autre anticorps a été fabriqué contre la CHH du crabe *Carcinus maenas* en injectant l'hormone à des lapins par Jaros et Keller (1979).

La CHH des isopodes a été purifiée et sa composition en acides aminés déterminée par Martin *et al.* (1984 a) chez *Porcellio dilatatus*. Martin *et al.* (1984 b), ont essayé l'anti-CHH du crabe sur *Porcellio* et ont déterminé la voie de synthèse de cette hormone ; il a montré d'autre part que CHH du crabe est sans effet sur le cloporte, ce qui représente un autre indice de la spécificité de cette hormone. Gorgels-Kallen et Van Herp (1981), dans la même voie ont décrit le chemin suivi par cette hormone chez *Astacus leptodactylus*. Ces études sont confirmées par Gorgels-Kallen (1985) qui a montré que les axones donnés par les péricaryones parcourent le neuropile de la medulla terminalis, atteignent la glande du sinus où ils se divisent en plusieurs terminaisons. L'auteur conclut à un contact postsynaptique à CHH et suggère une neuromodulation aminergique dans les jonctions présynaptiques et il pense à la sérotonine comme amine biogène puisqu'elle a été trouvée par Falck et Hillarp dans tout le pédoncule oculaire.

Plus d'un type de molécules hyperglycémiantes a été isolé dernièrement chez *Homarus americanus* (Van Deijnen, 1986 ; Soyez *et al.*, 1990) et chez *Cardisoma carnifex* (Newcomb *et al.*, 1985). Différentes hypothèses sont émises pour expliquer ce polymorphisme (Soyez *et al.*, 1990) :

- Substitution d'un acide aminé par un autre de même poids moléculaire.
- Différence dans l'hydrophobicité qui résulte du taux différent d'amidation en résidus acides. Ce polymorphisme peut expliquer les différentes actions de cette hormone) car non seulement elle agit sur le glycogène, elle libère aussi l'amylase, diminue le taux d'ecdystéroïdes circulants et inhibe le phénomène de mue. D'autres faits suggèrent un changement évolutif de ce peptide hormonal, ce qui peut expliquer les différences dans la composition en acides aminés selon les animaux et la spécificité de cette hormone. Certains auteurs pensent à l'existence d'une prohormone précurseur qui subit une maturation lors de son transport axonal ce qui peut expliquer l'augmentation de la taille des granules à CHH en allant des péricaryones à la glande du sinus.

Récemment, la séquence complète en acides aminés de la CHH du crabe *Carcinus maenas* a été obtenue par Kegel *et al.* (1989). Ce peptide contient 72 acides aminés, 3 ponts disulfures et N- et C- terminal bloqués.

Dans nos essais de localisation de CHH, nous avons pu trouver une réaction positive au niveau de la MTGX1 zone reconnue de synthèse de cette hormone, une réaction forte au niveau de la glande de sinus et du tractus qui la relie à la MTGX1.

ADIPOKINETIC HORMONE : AKH (Planche III Fig. 1, 2, 3, 4, 5)

Le système pigmentaire des Crustacés est formé par des chromatophores dans le tégument (mélanophores, xanthophores, érythrophores et leucophores) et par les pigments rétiens associés aux ommatidies qui montrent des changements de position selon la lumière. Il y a deux séries d'hormones chromatophorotropiques, les unes dispersant les pigments (Pigment Dispersing Hormon : PDH), les autres les concentrant (Pigment Concentrating

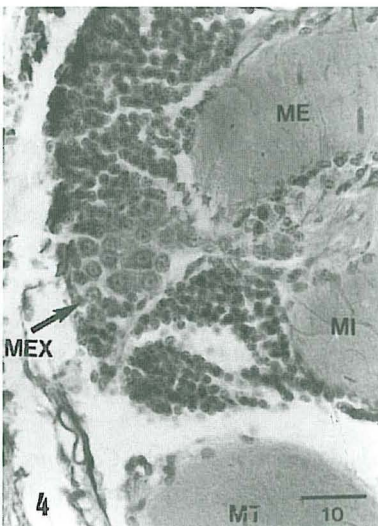
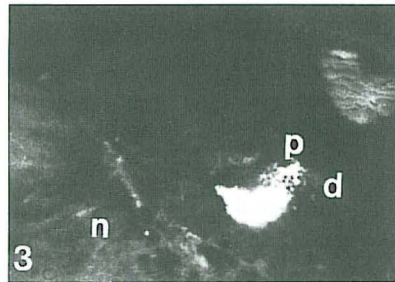
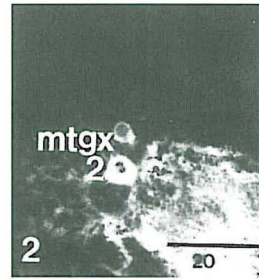
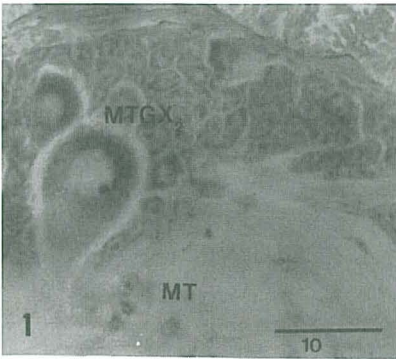


PLANCHE III

Fig. 1 : Cellules de la MTGX2 colorées à l'éosine bleu de toluidine.

Fig. 2 : Les mêmes cellules marquées à l'anti-AKH.

Fig. 3 : La portion proximale de la glande du sinus marquée à l'anti-AKH (p). La portion distale restant sombre (d). n = neuropile.

Fig. 4 : Coloration histologique de l'organe-X de la medulla externa MEX zone de synthèse de RPCH. ME = medulla externa ; MI = medulla interna ; MT = medulla terminalis.

Fig. 5 : La même zone MEX marquée par l'anti-AKH. AKH est apparenté à RPCH (red-pigment-concentrating-hormone).

Hormon : PCH). Dans les extraits crus de pédoncules oculaires de *Crangon crangon* les PCH inhibent les PDH (Skarkowski, 1971). Cet aperçu se limitera à l'hormone qui concentre le pigment rouge dans les érythrophores (Red Pigment Concentrating Hormon : RPCH = Erythrophore Concentrating Hormon : ECH). Cette hormone est le premier neuropeptide des crustacés déterminé biochimiquement en 1972 chez *Pandalus borealis* ; c'est un octopeptide (pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-NH₂) (in Keller & Kegel, 1984). Fingerman, en 1976, a montré l'action inhibitrice de la colchicine et de la cytochalasine B sur la RPCH. Quackenbush et Fingerman (1984), par des excitations électriques de pédoncules oculaires isolés de *Uca pugilator*, ont essayé de voir le seuil d'excitation pour la libération des différentes chromatophorotropines et ont trouvé le seuil le plus bas pour la RPCH.

En parallèle, il s'est avéré que les corpora cardiaca des insectes *Locusta migratoria* et *Schistocerca americana* contiennent un décapeptide (pGlu-Leu-Asn,-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH₂) qui est une hormone adipokinétique AKH qui entraîne la libération des lipides diglycérides (diacylglycérol) à partir des corps gras durant le vol (Schooneveld *et al.*, 1985). La structure moléculaire de ce décapeptide est très proche de celle de RPCH. Des tests-cross, utilisant ces hormones sur les Crustacés et les insectes locustes donnent des résultats positifs. Deux AKH synthétiques et leur antisérum ont été fabriqués ; ce sont (Tyr)-AKH code 241 où pGlu est remplacé par Tyr et AKH₁₋₄ code 433 qui est un tétrapeptide (pGlu-Leu-Asn-Phe) (Schooneveld *et al.*, 1987). Ces antisérums ont été testés immunologiquement sur différents Invertébrés (Schooneveld *et al.*, 1983, Schooneveld *et al.*, 1985 ; Schooneveld, 1986 ; Bellon-Humbert *et al.*, 1986). L'antisérum 241 ne reconnaît que les locustes alors que l'autre a une plus large étendue (Schooneveld & Van Herp & Van Mirlen, 1987) ce qui suggère pour ces chercheurs une évolution phylogénétique de cette hormone à partir d'un précurseur. L'existence de l'immunofluorescence dans les neuropiles peut suggérer un rôle neurorégulateur de cette hormone en plus de son rôle neurohormonal. Nos marquages immunocytochimiques ont donné les mêmes résultats que ceux de Bellon-Humbert *et al.*, 1986, chez *Palaemon serratus*. En effet, la réaction positive a été observée dans la MEX qui semble être l'organe de synthèse de cette hormone, dans les grosses cellules neurosécrétrices de la MTGX2 et dans la partie proximale de la glande du sinus. Puisque la séquence de AKH₁₋₄ forme une portion de RPCH, il est possible que l'anti-AKH₁₋₄ réagisse avec toute la famille des PCH.

LA SÉROTONINE : 5 HT (Planche IV, Fig. 1, 2, 3).

L'action de la sérotonine sur différents facteurs hormonaux, depuis longtemps étudiée, nous a incité pour essayer son anticorps sur la chaîne nerveuse ventrale, d'autant plus que cette amine biogène est reconnue avoir une grande distribution aussi bien dans la glande du sinus que dans les organes péricardiques. En effet, les organes péricardiques sont spécialisés dans la production et le stockage des cathécolamines et des indolamines dont la sérotonine. La synthèse de la sérotonine retrouvée aussi bien dans les organes péricardiques que dans le pédoncule oculaire, se fait à partir d'un précurseur le tryptophane qui subit une 5hydroxylation pour donner 5HTP lequel subit une décarboxylation pour aboutir à la sérotonine (in Cooke & Sullivan, 1982).

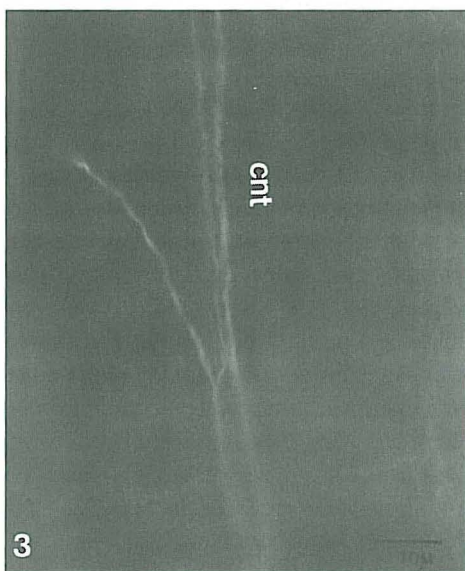
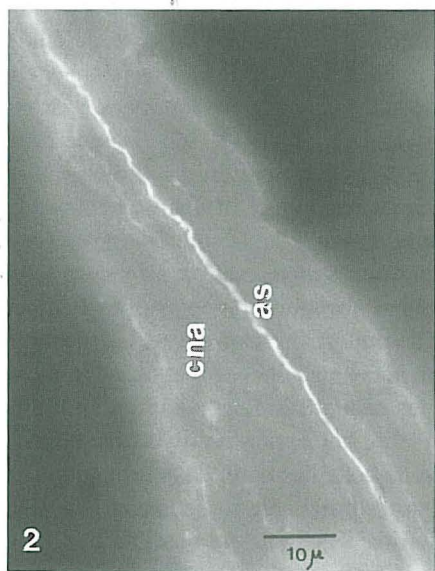
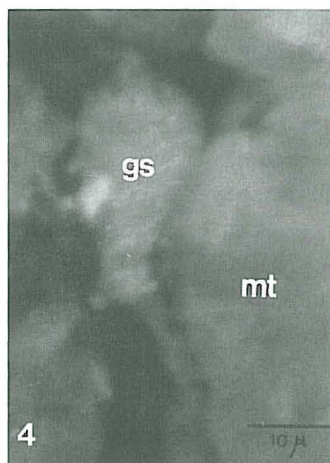
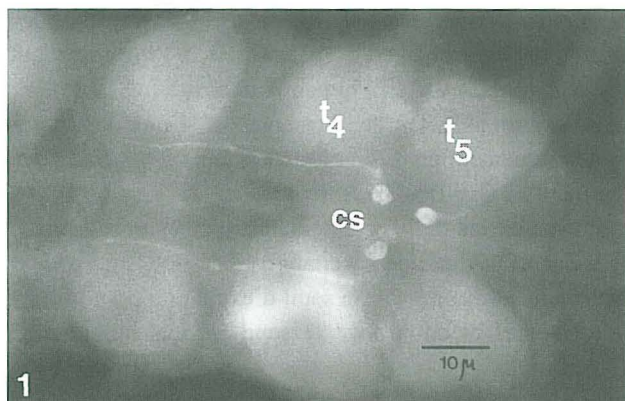


PLANCHE IV

Fig. 1 : Chaîne nerveuse thoracique marquée à l'anti sérotonine t4, t5 = ganglions thoraciques 4 et 5 ; cs = Cellules sérotonergiques.

Fig. 2 : Chaîne nerveuse abdominale (cna) montrant un tronc d'axones sérotonergiques.

Fig. 3 : Au niveau de la chaîne nerveuse thoracique (cnt) on observe des axones présentant des ramifications allant probablement aux nerfs segmentaires des organes péricardiques.

Fig. 4 : Glande du sinus faiblement marquée à l'antisubstance P. mt = medulla terminalis gs = glande du sinus.

La sérotonine est considérée comme une "neurohormone circulante" d'une étendue importante ; c'est un cardioexcitateur du cœur. Le rôle neurorégulateur de la sérotonine au niveau des jonctions présynaptiques neuromusculaires chez les Décapodes est bien connue aussi. Cette action entraîne la libération des ions calcium des zones intracellulaires dans les terminaisons présynaptiques. Son action dispersante du pigment rouge des érythrophores est aussi démontrée, et c'est une action neurorégulatrice comme pour les muscles, parce que le taux nécessaire pour produire la dispersion du pigment rouge est très faible. D'autre part, l'existence de la sérotonine dans les neuropiles du cerveau et des pédoncules oculaires confirme son côté neurotransmetteur ou neuro modulateur synaptique. C'est un "Releasing factor" des hormones peptidiques (Martin, 1980). Ces conclusions sont affirmées par la découverte du rôle hyperglycémiant de la sérotonine chez *Orconectes limosus* (Keller & Beyer, 1968) par augmentation de libération de la CHH, chez l'écrevisse (Strolenberg & Van Herp, 1977) par stimulation du phénomène d'exocytose dans la glande du sinus. Cette action hyperglycémiante a été retrouvée aussi par Martin (1978) chez l'isopode *Porcellio dilatatus*. Cette neurorégulation sérotonergique dans les jonctions présynaptiques a été aussi suggérée par Gorgels-Kallen en 1985 chez *Astacus leptodactylus*.

D'autres expériences immunocytochimiques dans la chaîne nerveuse ventrale du homard (Beltz & Kravitz, 1987) ont permis de trouver des neurones sérotonergiques avec leurs projections centrales et périphériques et leurs ramifications terminales. Ces neurones ayant des potentiels d'action dans leur corps cellulaire sont spontanément actifs. Ils forment l'origine des fibres neurosécrétrices des deuxième racines des ganglions thoraciques appelées populairement nerfs segmentaires (Cooke & Sullivan, 1982). Ces fibres neurosécrétrices sortent dorsalement par paire de chaque ganglion thoracique chez les macroures et les brachyours, se projettent dans la cavité péricardique où ils s'anastomosent formant les organes péricardiques. Siwiki *et al.* (1987) reportent que les neurones des 5^e ganglion thoracique et 1^{er} ganglion abdominal contiennent en même temps que la sérotonine un neuropeptide, la proctoline, dont la formule est retrouvée et déterminée en HPLC par Stangier, Dirksen & Keller (1986) dans les organes péricardiques.

Nous avons essayé l'anti sérotonine sur la chaîne nerveuse ventrale de *Palaemonetes punicus*. Nos expériences nous ont permis de localiser deux paires de cellules sérotonergiques au niveau des 4^e et 5^e ganglions thoraciques, une paire projette ses axones vers l'avant, l'autre paire vers l'arrière. Ce sont des neurones unipolaires donnant des ramifications latérales allant probablement aux deuxième racines motrices pour joindre les organes péricardiques. D'autres axones moins visibles parcourent la chaîne nerveuse ventrale ; ces axones latéraux et médians ne montrent pas de corps cellulaires. Ces recherches doivent être poursuivies pour montrer toute la voie des neurones sérotonergiques.

CONCLUSION

Toutes les données auparavant signalées nous ont permis de faire ces conclusions :

Une intime relation entre les systèmes aminergiques et peptidergiques est devenue très

apparente. Ces systèmes sont en contact étroit voire entremêlés : l'exemple de l'existence de la proctoline comme peptide et de la sérotonine comme aminé dans les mêmes corps cellulaires ainsi que leur impact commun suffit pour arriver à cette conclusion.

Van Deijen (1986) a remarqué une réaction immunologique très restreinte dans le système nerveux central des Décapodes. Ceci est en contradiction avec toutes les descriptions faites auparavant des cellules neurosécrétrices du cerveau aussi bien en microscopie photonique qu'électronique. Aussi peut-on conclure à l'insuffisance des méthodes histologiques et cytologiques, bien que préliminaires, dans l'acquisition des connaissances précises sur la neurosécrétion.

Les neurones décrits auparavant comme neurosécréteurs sont actuellement considérés comme des motoneurones ou interneurones. Mais ceci n'exclut pas l'activité peptidergique de quelques-uns.

Ainsi, les centres neurosécréteurs du pédoncule oculaire, plus particulièrement les cellules de la medulla terminalis (MTGX1), leurs prolongements axonaux et leurs terminaisons formant la glande du sinus, restent les centres endocrines majeurs qui contrôlent l'activité physiologique des Crustacés. Ce complexe MTGX-SG a été même comparé au système hypothalamoneurohypophysaire des vertébrés surtout après avoir démontré les similitudes importantes qui existent entre les hormones des vertébrés et des invertébrés.

Le nombre peu élevé des cellules neurosécrétrices décrites en microscopie photonique et électronique ne coïncide pas avec l'innombrable variété d'hormones isolées jusqu'à nos jours, ce qui rejoint encore une fois les résultats aléatoires donnés en microscopie. Les recherches cytochimiques ont montré qu'une même cellule peut contenir différents peptides puisque réagissant positivement avec différents antisérums. De même un peptide peut avoir différents effets et différents organes cibles. Il suffit de se rappeler par exemple le rôle hyperglycémiant de CHH, son rôle dispersant du pigment rouge des érythrocytes, les différents effets et organes cibles de la sérotonine...

Beaucoup de questions sont posées quant à l'origine des hormones, l'évolution de leur structure avec les différents groupes d'animaux. L'existence d'une hormone précurseur ou prohormone a été suggérée depuis Andrew et Saleudin (1979). Ce précurseur subit différents processus tels que des clivages protéolytiques d'un ou de plusieurs sites ou des modifications non protéolytiques. Newcomb, Stuenkel et Cooke (1985) ont décrit chez *Cardisoma carnifex* deux groupes peptidiques dans la glande du sinus. Ces deux groupes, l'un hyperglycémiant, l'autre de rôle inconnu, ont d'après Stuenkel (1986) un même précurseur. L'existence de six types de terminaisons chez *Cardisoma* est contradictoire avec la découverte de ce précurseur qui recouvre 90 % des peptides de la glande du sinus. Ce qui laisse suggérer que les différences morphologiques ne sont que des différences dans la maturation des granules neurosécréteurs ou du taux de rassemblement dans le granule.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de physiologie et génétique des Crustacés de Poitiers sous l'assistance et conseils de Monsieur Gilbert Martin. Je tiens à le remercier vivement pour l'aide qu'il m'a procurée.

Je remercie également Messieurs Juchault et Mocquard pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ALEXANDROWICZ, J.S. & D.B. CARLISLE, 1953. Some experiments on the function of the pericardial organs in Crustacea. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 32 : 175-192.
- ANDREW, R.D. & A.S.M. SALEUDIN, 1979. Two dimensional gel electrophoresis of neurosecretory peptides in crustacean eyestalk. *J. Comp. Physiol. B*, 134 : 303-313.
- BELLON-HUMBERT, C., F. VAN HERP & H. SCHOONEVELD, 1986. Immunocytochemical study of the red pigment concentrating material in the eyestalk of the prawn *Palaemon serratus* Pennant using Rabbit antisera against the Insect Adipokinetic hormone. *Biol. Bull.* 171 : 647-659.
- BELTZ, B.S. & E.A. KRAWITZ, 1987. Physiological identification, Morphological analysis and Development of identified serotonin-proctolin containing neurons in the lobster ventral nerve cord. *J. Neuroscience*, 7 (2) : 533-546.
- BRESSAC, Cl., 1978. Études cytologiques et ultrastructurales des organes neuroendocrines et endocrines de *Pachygrapsus marmoratus* (Fabricius, 1787) Crustacé Décapode. *Thèse Doctorat d'État Montpellier*.
- BRODIE, D.A. & K. HALKROW, 1977. The ultrastructure of the sinus gland of *Gammarus oceanicus* (Crustacé Amphipode). *Cell. Tiss. Resc.* 182 : 557-564.
- CARLISLE, D.B. & K. KNOWLES, 1959. Neurochemical organs in Crustaceans. *Nature (London)* 172 : 404-405.
- CARLISLE, D.B. & F.G.W. KNOWLES, 1959. Endocrine control in Crustaceans. *Cambridge University Press, London and New York*.
- CHATAIGNIER, J.P., G. MARTIN & P. JUCHAULT, 1978. Étude histologique, cytologique et expérimentale des centres neurosécréteurs céphaliques du Flabellifère *Sphaeroma serratum* (Crustacé Isopode). *Gen. Comp. Endocrinol.* Vol. 35 : 52-69.
- COOKE, I.M. & R.E. SULLIVAN, 1982. Hormones and neurosecretion. The Biology of Crustacea. *D.E. Bliss ed. in chef, Vol. 3, Neurobiology, Structure and function, Ed. Harold, L. Atwood, D.C. Sandeman. Academic press.*
- DE MEY, J., 1983. A critical review of light and electron microscopic immunocytochemical techniques used in neurobiology. *J. Neuroscience Methods*, 7 : 1-18.
- DHAINAUT-COURTOIS, N., M.P. DUBOIS, G. TRAMU & M. MASSON, 1985. Occurrence and coexistence in *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annelida Polycheta) of substances immunologically related to vertebrate neuropeptides. *Cell. Tiss. Resc.* 242 : 97-108.
- ENAMI, M. 1951. The sources and activities of two chromatophoretic hormones in crabs of the genus *Sesarma*. *Biol. Bull.* Vol. 101 : 241-258.
- FALCK, B., N. HILLARP, G. THIEME & A. TORP, 1962. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensates with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.*, Vol. 10 : 348-354.
- FINGERMAN, M. 1976. Further studies of the actions of the red pigment-concentrating and pigment-dispersing hormones in the prawn *Palaemonetes vulgaris* at the cellular level using colchicine and cytochalasin B. *Colloques internationaux C.N.R.S. n° 251. Actualités sur les hormones d'Invertébrés*.
- FINGERMAN, M. & T. AOTO, 1959. The neurosecretory system of the drawf crayfish *Cambarellus shuffeldti*, revealed by electron and light microscopy. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 78 : 305-317.
- FINGERMAN, M., M.M. HANUMANTE, G.K. KULKARNI, R. IKEDA & L.L. VACCA, 1985. Localization of substance P-like, leucine-enkephalin-like, methionine-enkephalin-like and F.M.R.F. amide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Cell. Tiss. Resc.* 241 : 473-477.
- GABE, M. 1967. Neurosecretion. *Gauthier-Villars, Paris*.
- GORGELS-KALLEN, J.L., 1985. Appearance and innervation of CHH-producing cells in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus* examined of tracing with Lucifer Yellow. *Cell. Tiss. Resc.*, 240 : 385-391.

- GORGELS-KALLEN, J.L. & F. VAN HERP, 1981. Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the X-organ Sinus Gland complex in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842). *J. Morphol.* 170 : 347-355.
- GREENBERG, M.J. & D.A. PRICE 1983. Invertebrate neuropeptides : native and naturalized. *Ann. Rev. Physiol.*, 45 : 271-288.
- HANSTROM, B., 1931. Neue Untersuchungen über sinnesorgane und nervensystem der Crustaceen. I. *Z. Morphol. Ökol. Tiere*, 23 : 80-236.
- HANSTROM, B. 1933. Neue Untersuchungen über sinnesorgane und nervensystem der Crustaceen. II. *Zool. Jhbch. Anat.* 56 : 387-520.
- HISANO, S., 1976. The ultrastructure of the sinus gland of the freshwater prawn *Palaemon paucidens*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser.VI, Zool.* 20 : 167-174.
- HISANO, S., 1978. Synaptic junctions in the sinus gland of the freshwater prawn *Palaemon Paucidens*. *Cell. Tiss. Resc.*, 189 : 435-440.
- JAROS, P.P. & R. KELLER, 1979. Immunocytochemical identification of Hyperglycemic-hormone-producing cells in the eyestalk of *Carcinus maenas*. *Cell. Tiss. Resc.*, 204 : 379-385.
- KEGEL, G., B. REICHWEIN, S. WEESE, G. GAUS, J. PETER-KATALINIE & R. KELLER, 1989. Amino acid sequence of the crustacean-hyperglycemic-hormon (CHH) from the shore crab *Carcinus maenas*. *FEBS. Lett.* 255 : 10-14.
- KELLER, R. 1976. Electrophoretic analysis of neurosecretory substances from the sinus gland of Decapod Crustacea. *Colloques internationaux C.N.R.S. n° 251, Actualités sur les hormones d'Invertébrés.*
- KELLER, R. 1977. Comparative electrophoretic studies of Crustacean neurosecretory hyperglycemic and melanophore-stimulating hormones from isolated sinus glands. *J. Comp. Physiol.*, 122 : 359-373.
- KELLER, R. & J. BEYER, 1968. Zur hyperglykämischen Wirkung von serotonin und augestielextrakt beim flubkrebis *Orconectes limosus*. *Z. Vergl. Physiol.*, 59 : 78-85.
- KELLER, R. & G. WUNDERER, 1978. Purification and amino acid composition of the neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the shore crab *Carcinus maenas*. *Gen. comp. Endocrinol.*, 34 : 328-335.
- KELLER, R. & G. KEGEL, 1984. Studies on crustacean neuropeptides by use of high performance liquid chromatography. In J.A. Hoffmann, and M. Porchet (eds) *Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate hormones*. Springer Heidelberg, 145-154.
- KELLER, R., P.P. JAROS & G. KEGEL, 1985. Crustacean hyperglycemic neuropeptides. *Amer. Zool.*, 25 : 207-221.
- KLEINHOLZ, L.H., 1975. Purified hormones from the crustacean eyestalk and their physiological specificity. *Nature*, Vol. 258, n° 5532 : 256-257.
- KLEINHOLZ, L.H. & R. KELLER, 1979. Endocrine regulation in Crustacea. Hormones and evolution. Vol. 1, Ed by E.J.W. Barrington, Academic press London, New York. San Francisco, p 160-213.
- KNOWLES, F.G.W., 1958. Electron microscopy of a crustacean neurosecretory organ. In *International symp. Neurosecretion*. W. Burgman et al (eds), Springer Berlin.
- MANCILLAS, J.R., J.F. MC GINTY, A.I. SILVERTORN, H. KARTEN & F.E. BLOOM, 1981. Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurons of lobster. *Nature*, Vol. 293 : 576-578.
- MARTIN, G., 1972. Analyse ultrastructurale des cellules neurosécrétrices du protocérébron de *Porcellio dilatatus* (Brandt) (Crustacé Isopode Oniscoïde). *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 274 : 243-246.
- MARTIN, G., 1978. Action de la sérotonine sur la glycémie et sur la libération des neurosécrétions contenues dans la glande du sinus de *Porcellio dilatatus* (Brandt) (Crustacé Isopode Oniscoïde). *C.R. Soc. Biol.*, T. 172, n° 2 : 304-308.
- MARTIN, G., 1980. Contribution à l'étude cytologique et fonctionnelle des systèmes de neurosécrétion des crustacés Isopodes. *Thèse Doctorat Es Sciences. Université de Poitiers.*
- MARTIN, G., R. KELLER, G. KEGEL, G. BESSE & P.P. JAROS, 1984 a. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial Isopod, *Porcellio dilatatus*. I - Isolation and characterization. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 55 : 208-216.
- MARTIN, G. P.P. JAROS, G. BESSE, & R. KELLER, 1984 b. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial Isopod, *Porcellio dilatatus*. II - Immunocytochemical demonstration in neurosecretory structures of the nervous system. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 55 : 217-226.
- MOODY, T.W., J.N. CRAWLEY & R.T. JENSEN, 1982. Pharmacology and neurochemistry of bombesin-like peptides. *Peptides*, Vol. 3 : 559-563.
- NEWCOMB, R., E. STUENKEL & I. COOKE, 1985. Characterization, biosynthesis and release of neuropeptides from X-organ-sinus gland system of the crab *Cardisoma carnifex*. *Amer. Zool.*, 25 : 157-171.
- QUACKENBUSH, L.S. & M. FINGERMAN, 1984. Regulation of the release of chromatophorotropic neurohormones from the isolated eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Biol. Bull.*, 166 : 237-250.
- SCHARRER, B. 1978. Peptidergic neurons : Facts and trends. *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 34, n° 1 : 50-62.

- SCHARRER, E., 1930, Ueber sekretorisch tätige Zellen im thalamus von fundulus heteroclitus. 2 Untersuchungen über das Zwischenhirn der fische. *Z. Vergl. Physiol.*, 11 : 757-763.
- SCHOONEVELD, H., 1986. Localization of AKH/RPCH related peptides in *Insects and other Invertebrates*. *Insect Neurochem. Neuophysiol.* Ed. A.B. Borkovec and D.B. Gelman. The Humana press, 443-446.
- SCHOONEVELD, H., H.M. ROMBERG-PRIVEE & J.A. VEENSTRA, 1985. Adipokinetic hormone-immunoreactive peptide in the endocrine and central nervous system of several Insect species : a comparative immunocytochemical approach. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57 : 184-194.
- SCHOONEVELD, H., H.M. ROMBERG-PRIVEE & J.A. VEENSTRA, 1987. Phylogenetic differentiation of glandular cells in corpora cardiaca as studied immunocytochemically with region-specific antisera to adipokinetic-hormone. *J. Insect Physiol.* Vol. 33, n° 3 : 167-176.
- SCHOONEVELD, H., G. TESSER, J.A. VEENSTRA & H.M. ROMBERG-PRIVEE, 1983. Adipokinetic-hormone and AKH-like peptide demonstrated in the corpora cardiaca and the nervous system of *Locusta migratoria* by immunocytochemistry. *Cell. Tiss. Resc.*, 230 : 67-76.
- SCHOONEVELD, H., F. VAN HERP, & J. VAN MINNEN, 1987. Demonstration of substances immunologically related to the identifies arthropod neuropeptides AKH/RPCH in the CNS of several Invertebrate species. *Brain Resc.*, 406 : 224-232.
- SIWIKI, K.K., B.S. BELTZ & E.A. KRAWITZ, 1987. Proctolin in identified serotonergic, dopaminergic and cholinergic neurons in the lobster, *Homarus americanus*. *J. Neuroscience*, 7 (2) : 522-532.
- SKARKOWSKI, E.F., 1971. Isolation of three chromatophorotropic hormones from the eyestalk of the shrimp *Crangon crangon*. "Marine Biology". *J. Life in oceans and coastal waters*, Vol. 8 n° 3 : 220-223.
- SOYEZ, D., P.Y. NOEL, J.E. DEIJNEN, M. MARTIN, A. MOREL & G.G. PAYEN, 1990. Neuropeptides from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus* : characterization of hyperglycemic peptides. *Gen. comp. Endocrinol.*, 79 : 261-274.
- STANGIER, J., H. DIRCKSEN & R. KELLER, 1986. Identification and immunocytochemical localization of proctolin in pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. *Peptides*, Vol. 7 : 67-72.
- STROLENBERG, G.E., 1979. Functional aspects of the sinus gland in the neurosecretory system of the crayfish *Astacus leptodactylus*. An ultrastructural approach. *Thesis Thoben Offset Nijmegen*.
- STROLENBERG, G.E.C. & F. VAN HERP, 1977. Mise en évidence du phénomène d'exocytose dans la glande du sinus d'*Astacus leptodactylus* (Nordmann) sous l'influence d'injections de sérotonine. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 284 : 57-59.
- STUENKEL, E., 1983. Biosynthesis and axonal transport of proteins and identified peptide hormones in the X-organ-sinus gland neurosecretory system. *J. Comp. Physiol. b*, 207 : 191-205.
- STUENKEL, E. 1986. A common precursor of two major crab neurosecretory peptides. *Peptides*, Vol. 7 : 397-406.
- VAN DEIJNEN, J.E., 1986. Structural and biochemical investigations into the neuroendocrine system of the optic ganglia of Decapod Crustaced. *Thèse d'état*.
- VAN DEIJNEN, J.E., F. VEK & F. VAN HERP, 1985. An immunocytochemical study of the optic ganglia of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842) with antisera against biologically active peptides of Vertebrates and Invertebrates. *Cell. Tiss. Resc.*, 240 : 175-183.
- VAN HERP, F. H.J.M. VAN BUGGENUM, 1979. Immunocytochemical localization of hyperglycemic hormone (HGH) in the neurosecretory system of the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Experimentia* 35 : 1527-1528.
- ZAMPIGHI, G., F. RAMON & W. DURAN, 1978. Fine structure of the electronic synapse of the lateral giant axons in a crayfish *Procambarus clarkii* *Tiss. Cell.*, 10 (3) : 413-426.