

**Localisation par immunofluorescence de peptides analogues à l' $\alpha$ -endorphine dans les ganglions infra-œsophagiens du lombricide *Dendrobaena subrubicunda* Eisen**  
 **$\alpha$ -Endorphin-like cells in the infra-oesophageal ganglions of the earthworm *Dendrobaena subrubicunda* Eisen.**  
**Immunocytological localization**

Ch. Rémy et M. P. Dubois

Laboratoire de Biologie animale B, Université de Bordeaux I, F-33405 Talence (France), et Station de Physiologie de la reproduction I.N.R.A. Nouzilly, F-37380 Monnaie (France), 12 juin 1978

**Summary.** Using an  $\alpha$ -endorphin antiserum in brain and infra-oesophageal ganglions of *Dendrobaena* (Lumbricidae), positive immunoreaction was found in 4 cells of the infra-oesophageal ganglions: a pair of conic perikarya in the anterior region and a pair of pear-shaped elements close to the origin of the last nerve of the ganglion. No reaction was observed with  $\beta$ -endorphin, or neurophysin or vasopressin antisera.

Des recherches immunocytologiques récentes ont permis de localiser dans l'encéphale des vertébrés des sites producteurs de peptides analogues à la  $\beta$ -lipotropine (mouton<sup>1</sup>) ou à l' $\alpha$ -endorphine (carpe et poisson rouge<sup>2</sup>). Une substance ayant les mêmes propriétés antigéniques que l' $\alpha$ -endorphine est également présente dans le système nerveux central de certains invertébrés. En effet, nous avons dernièrement pu localiser dans le ganglion sous-œsophagien d'un lépidoptère larvaire deux îlots cellulaires réagissant positivement avec un anticorps (Ac.) anti- $\alpha$ -endorphine<sup>3</sup>.

Nous avons recherché la présence éventuelle de tels peptides dans une autre classe d'invertébrés et notamment chez l'annélide oligochète *Dendrobaena*. Nous avons utilisé une trentaine de vers pubères fixés au Bouin-Hollande sublimé sans acide acétique (fin janvier, début février), disséqué la chaîne nerveuse et, après inclusion à la paraffine, débité en coupes sériées (7  $\mu$ m) les ganglions cérébroïdes et infra-œsophagiens. Les réactions d'immunofluorescence, de type indirect<sup>4</sup>, ont été réalisées avec différents Ac. anti-neurohormones ou anti-hormones hypophysaires de vertébrés: anti-neurophysine, anti-vasopressine, anti- $\alpha$ - ou  $\beta$ -endorphine, anti- $\alpha$ - ou  $\beta$ -MSH. L'antisérum anti- $\alpha$ -endorphine a été préparé sur lapin par l'un d'entre nous à partir d' $\alpha$ -

endorphine porcine purifiée (due à l'obligeance de R. Guillemin, The Salk Institute, San Diego, USA) couplée à la sérum albumine humaine<sup>2</sup>. Les réactions immunocytologiques ont été effectuées sur coupes déparaffinées et réhydratées. Les Ac. dilués au 1:40 dans du tampon véronal, 0,1 M, pH 7,2 (+0,4% de sérum albumine humaine pour l'Ac. anti- $\alpha$ -endorphine), sont appliqués sur les coupes pendant 4 h à la température ambiante et en atmosphère humide. Après lavage dans le tampon véronal, les sites de fixation des Ac. sont révélés par des  $\gamma$ -globulines de mouton anti-lapin conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (Institut Pasteur, France). Les coupes histologiques sont colorées au bleu d'Evans (0,01%) pour accentuer le contraste puis examinées avec un microscope équipé pour la fluorescence (Leitz «Ortholux», lampe HBO 200, filtres d'excitation BG 12 et filtre d'arrêt K 530). En présence de réactions immunocytologiques positives, nous avons pratiqué sur coupes adjacentes des tests de contrôle et d'inhibition:

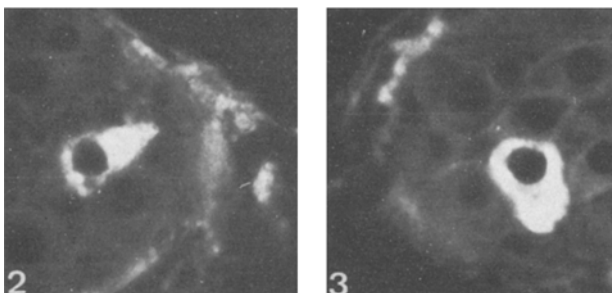
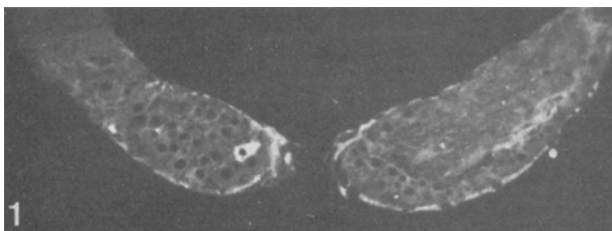


Fig. 1. Ganglions infra-œsophagiens. Coupe transversale (au niveau de la zone de pénétration des connectifs périœsophagiens) traitée par l'Ac. anti- $\alpha$ -endorphine. Une des deux cellules antérieures est visible.  $\times 130$ .

Fig. 2. Portion gauche de la figure 1 à un fort grossissement.  $\times 450$ .

Fig. 3. Coupe voisine de celle de la figure 1 traitée par l'Ac. anti- $\alpha$ -endorphine montrant la 2<sup>e</sup> cellule antérieure.  $\times 450$ .

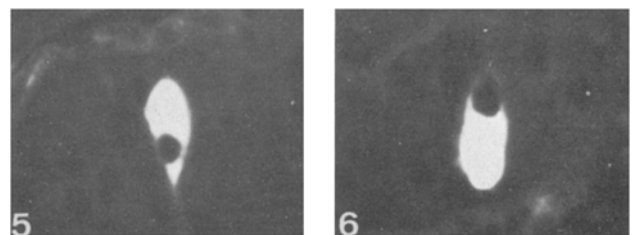
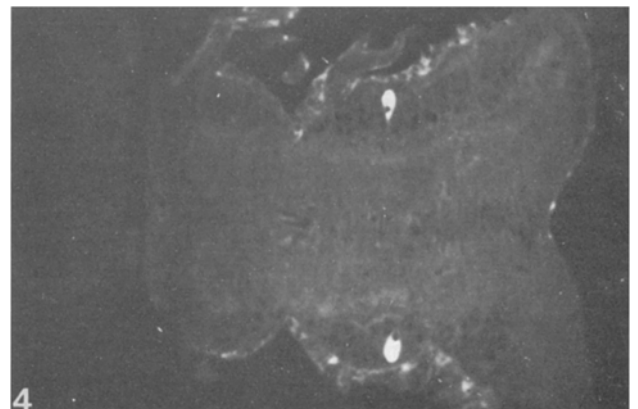


Fig. 4. Ganglions infra-œsophagiens. Coupe frontale traitée par l'Ac. anti- $\alpha$ -endorphine. Les 2 cellules postérieures sont parfaitement visibles.  $\times 130$ .

Fig. 5. Portion supérieure de la figure 4 à un fort grossissement.  $\times 450$ .

Fig. 6. Portion inférieure de la figure 4 à un fort grossissement.  $\times 450$ .

omission du premier temps de la réaction, utilisation d'un simple sérum de lapin ou enfin, application de l'Ac. préalablement saturé par l'antigène correspondant.

**Résultats.** Parmi tous les Ac. utilisés, seul l'Ac. anti- $\alpha$ -endorphine nous a permis d'observer une immunofluorescence positive au niveau de 4 cellules des ganglions infra-œsophagiens: a) 2 cellules coniques très antérieures, symétriques et situées au point de pénétration des connectifs périœsophagiens ( $30\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ , figures 1-3). b) 2 cellules piriformes postérieures, latérodorsales, symétriques et situées en avant du dernier nerf ganglionnaire ( $40\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ , figures 4-6). La partie proximale de leur axone, très fine, est parfois visible en fluorescence sur une longueur de  $20\ \mu\text{m}$  environ. Le nombre, la position de ces cellules, ainsi que leur affinité pour l'Ac. anti- $\alpha$ -endorphine ont été rigoureusement identiques chez tous les animaux examinés. La taille relativement importante des péricaryons nous a permis, sur des coupes contiguës de la même

cellule, de comparer les réactions avec les différents Ac. ou de s'assurer de la spécificité de cette réaction, et notamment qu'un Ac. anti- $\alpha$ -endorphine saturé par  $\alpha$ -endorphine ne provoque aucune fluorescence (figures 7 et 8). En montant des coupes voisines sur 2 lames distinctes, nous avons réalisé différentes colorations classiques. Les 4 cellules décrites ne présentent aucune affinité tinctoriale remarquable: elles sont fuchsine-paraldéhyde et hématoxyline chromique négatives, elles se colorent en violet avec l'azan comme de nombreuses autres cellules de ces ganglions. Ces cellules ne semblent donc correspondre à aucune des cellules neurosécrétrices décrites à ce jour dans le système nerveux central de *Dendrobaena* ou d'autres lombricidés<sup>5-7</sup>. Les nombreux sites fuchsine paraldéhyde positifs des ganglions cérébroïdes et infra-œsophagiens de *Dendrobaena* ne présentent aucune réaction croisée avec des Ac. anti-neurophysine et anti-vasopressine, contrairement à ce que nous avons pu observer chez certains insectes<sup>8</sup>.

Un neuropeptide comparable à l' $\alpha$ -endorphine est donc présent dans un nombre très limité de cellules du système nerveux central de certaines annélides. Il est intéressant de noter que, comme chez les lépidoptères, ces cellules sont localisées dans les ganglions sous-œsophagiens et absentes des ganglions cérébroïdes. Des études physiologiques doivent permettre de déterminer le rôle de ce neuropeptide chez les invertébrés.

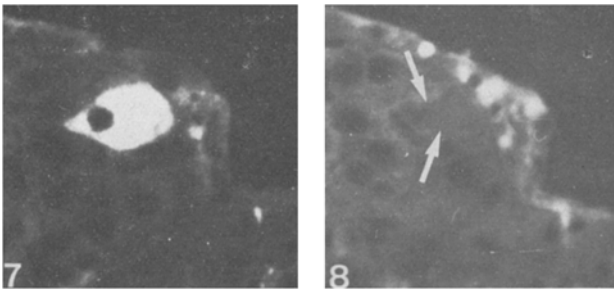


Fig. 7. Ganglions infra-œsophagiens. Coupe transversale traitée par l'Ac. anti- $\alpha$ -endorphine. Fluorescence très nette au niveau de la cellule postérieure droite.  $\times 450$ .

Fig. 8. Coupe voisine ( $7\ \mu\text{m}$ ) de celle de la figure 7 traitée par l'Ac. anti- $\alpha$ -endorphine saturé par  $\alpha$ -endorphine. Absence de fluorescence au niveau de la cellule postérieure droite.  $\times 450$ .

NB. La fluorescence observée au niveau des bordures est une fluorescence non-spécifique.

- 1 E. A. Zimmermann, A. Liotta et D. T. Krieger, *Cell Tissue Res.* 186, 393 (1978).
- 2 E. Föllénus et M. P. Dubois, *C. r. Acad. Sci.* 285, 1065 (1977).
- 3 Ch. Rémy, J. Girardie et M. P. Dubois, *C. r. Acad. Sci.* 286, 651 (1978).
- 4 M. Goldman, dans: *Fluorescent antibody methods*, p. 157, Academic Press, New York 1978.
- 5 J. Michon et F. Alaphilippe, *C. r. Acad. Sci.* 249, 835 (1959).
- 6 H. Herlant-Meewis et N. Van Damme, *C. r. Acad. Sci.* 255, 2291 (1962).
- 7 H. Herlant-Meewis, *Z. Zellforsch.* 69, 319 (1966).
- 8 Ch. Rémy, J. Girardie et M. P. Dubois, *C. r. Acad. Sci.* 285, 1495 (1977).

## PRO LABORATORIO

### A rotating bottle culture method with continuous replacement of the gas phase

D. A. T. New and D. L. Cockroft<sup>1</sup>

*Physiological Laboratory, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EG (England), 5 May 1978*

**Summary.** A 'rotator' culture method is described which provides a continuous flow of oxygenating gas to cultures in rotating bottles. The system maintains constant  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  levels in the culture medium throughout the incubation period. It also provides a more stable pH than systems with sealed culture bottles.

Satisfactory growth of tissue in culture requires that all the constituent cells can obtain an adequate supply of oxygen and nutrients and can lose carbon dioxide and waste products. When the tissue is very thin, as in an epithelium or cell monolayer, these requirements can be met by diffusion through a static (non-flowing) culture medium and gas phase, as in the standard petri dish type of culture. But growth of tissues more than about 1-2 mm thick, or of bulk cell suspensions, usually requires a continuously flowing medium. Many systems have been devised for circulating and oxygenating the medium<sup>2-4</sup>. Among the simplest and most widely used are methods for growing the tissues

in sealed rotating bottles<sup>2,5,6</sup>. Usually about  $\frac{1}{5}$  or less of each bottle is filled with the medium and explants, and the remainder with the required  $\text{O}_2/\text{N}_2/\text{CO}_2$  gas mixture. The rotation of the bottle promotes oxygenation of the medium by continuously exposing a fresh layer to the gas phase, and maintains a flow of medium over all surfaces of the tissue. The rotating bottle methods have often given excellent results<sup>7-10</sup>. However, they have the disadvantage that the oxygen and carbon dioxide levels in each bottle may alter during the culture as a result of the respiration of the cultured tissue<sup>10</sup>, and may vary from one bottle to another. Although such changes can be minimized by enclosing only