

**Purification par chromatographie liquide à haute performance de la neurohormone cérébrale d'*Eisenia foetida* Sav. (Annélide, Oligochète). Essai sur la régénération et la clitellogenèse**

R. MARCEL, C. CARDON

avec la collaboration technique de B. LEÜ, M. MASSON, G. MONTAGNE  
et M. C. SLOMIANNY

*Laboratoires de Biologie animale et de Chimie biologique III  
L.A. n° 148 : Endocrinologie comparée des Invertébrés,  
Université des Sciences et Techniques de Lille,  
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.*

---

**Summary.** *Purification of the brain neurohormone of Eisenia foetida Sav. (Annelida, Oligochaeta) by high-pressure liquid chromatography. Bioassays on regeneration and clitellogenesis.*

A very pure fraction was isolated by high-pressure liquid chromatography (HPLC) with ion-pairing reagents. This fraction corresponding to the brain neurohormone of *Eisenia foetida* had a twofold action : to inhibit cephalic regeneration and to maintain clitellum turgidity.

---

Chez les Annélides Oligochètes Terricoles, il a été montré expérimentalement que les ganglions cérébroïdes interviennent par voie humorale sur la différenciation des caractères sexuels somatiques au moment de la reproduction (Avel, 1929 ; Herlant-Meewis, 1958-1959 ; Berjon, 1965) ainsi que sur la régénération antérieure (Marcel, 1967) et peut-être sur la régénération caudale (Hubl, 1956).

La question se posait de savoir si ces effets biologiques étaient sous la dépendance d'une ou de plusieurs hormones. C'est pourquoi nous avons entrepris des recherches pour élucider ce problème.

Dans une note précédente (Marcel et Cardon, 1982) nous avons apporté des arguments en faveur de l'existence d'une seule neurohormone responsable à la fois des activités clitellogène et inhibitrice de la régénération céphalique chez *Eisenia foetida* Sav. En effet, ces deux activités se retrouvaient dans la même fraction (D, fig. 1) après chromatographie liquide à haute performance. Cependant, cette

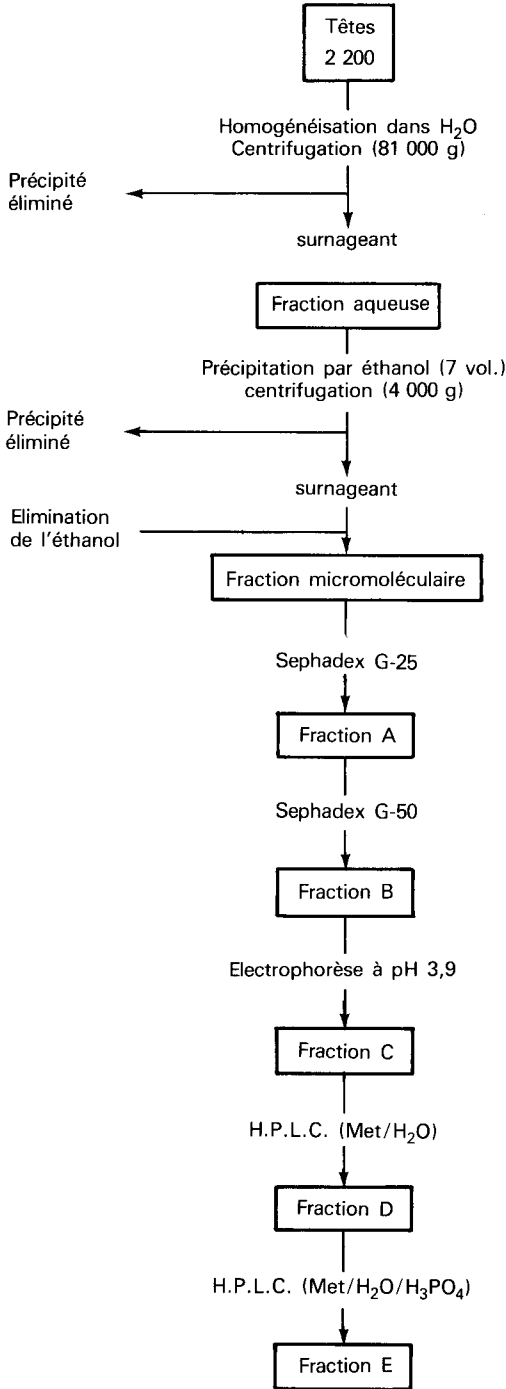


FIG. 1. — Purification de l'hormone cérébrale à partir d'un homogénat de têtes d'Eisenia foetida.

fraction s'est révélée complexe à la suite d'un fractionnement chromatographique (HPLC) par appariement d'ions. C'est pourquoi nous avons examiné l'activité biologique des nouvelles fractions obtenues par cette technique au cours d'une chromatographie préparative.

## Techniques.

2 200 têtes d'*E. foetida* sont homogénéisées dans de l'eau distillée. Après centrifugation, le surnageant est fractionné suivant le protocole habituel (fig. 1) jusqu'à obtention de la fraction D (Marcel et Cardon, 1979, 1982). Cette fraction lyophilisée nous a servi de point de départ pour la suite de la purification. Le lyophilisat est repris par 2 ml du mélange : méthanol, eau, acide phosphorique (50 : 50 : 0,1 V/V) qui sert de phase mobile pour la chromatographie HPLC par appariement d'ions (Hearn, Hancock et Bishop, 1978). Les caractéristiques du chromatographe « Waters associate » ont été précisées antérieurement (Marcel et Cardon, 1982). L'enregistrement à 254 nm sur papier est réalisé par un « omniscrite recorder » (Houston instrument). La colonne chromatographique est une « Radial pak » C 18 (Hancock *et al.*, 1978) utilisée à l'aide d'un module RCM 100 (Waters associate). Le débit est de 1,4 ml/min. La pression en tête de colonne est de 350 p.s.i. La chromatographie est réalisée à la température du laboratoire (environ 20 °C.). Avant leur injection dans l'appareil, les échantillons sont filtrés sur filtre Millipore de 0,5 µm. A l'issue de la chromatographie, toutes les fractions sont recueillies puis lyophilisées avant d'être essayées en culture organotypique sur milieu gélosé. Les explants sont constitués soit de tronçons de 5 segments en régénération céphalique, provenant de vers immatures, soit de fragments d'épiderme clitellaire dorsal prélevés sur des animaux sexuellement mûrs. Les cultures de clitellum sont arrêtées au bout de 7 jours, les cultures de tronçons après 3 semaines.

## Résultats.

L'enregistrement à 254 nm de l'analyse de la fraction D, biologiquement active, est représenté sur la figure 2. Il montre 5 pics : un majeur (n° 2), deux moyens (1 et 3) et deux très petits (4 et 5). Après chromatographie préparative, 4 fractions sont récoltées séparément, correspondant aux pics 1, 2, 3 et 4 + 5. Elles sont essayées sur la régénération céphalique et sur la turgescence du clitellum.

*1° Inhibition de la régénération céphalique.* — Quatre lots, d'une vingtaine d'explants chacun, sont préparés pour essayer l'activité des quatre fractions ; un cinquième, cultivé sur milieu normal, sert de témoin. Les résultats sont reportés sur le tableau 1.

Dès les premiers jours de la culture, les 3/4 des explants cultivés en présence de la fraction contenant les pics 4 et 5 meurent. Cette fraction, correspondant à des produits élués tardivement, présente donc une toxicité élevée. Les quatre autres lots, au contraire, montrent une excellente survie (supérieure à 95 %) au bout de 3 semaines de culture. Les explants cultivés en présence de la fraction

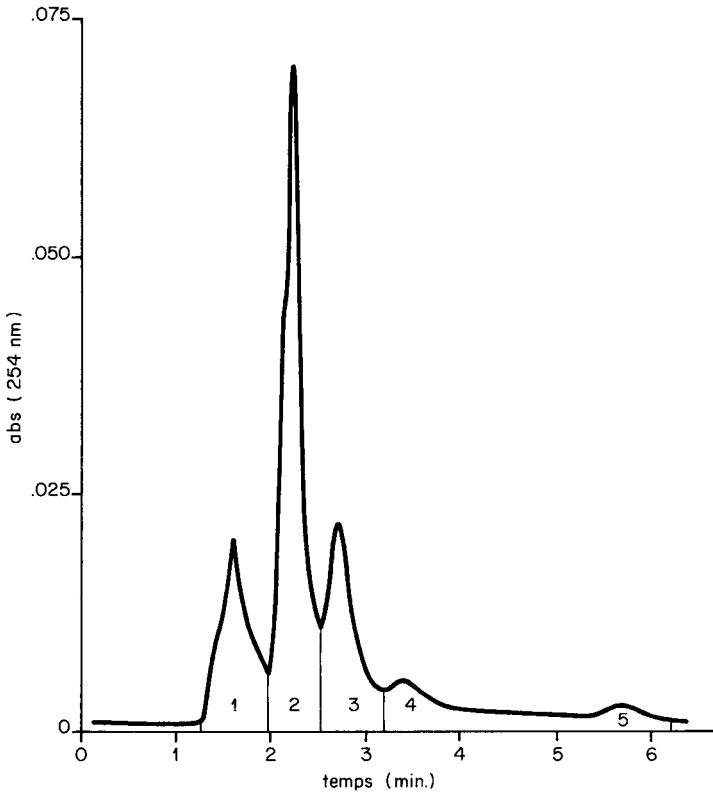


FIG. 2. — Diagramme d'éluion de la fraction D après chromatographie liquide à haute performance. Phase mobile : méthanol/eau/H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> (50 : 50 : 0,1, V/V) ; débit : 1,4 ml/min ; pression 350 p.s.i. ; absorbance mesurée à 254 nm ; volume injecté : 50 µl ; vitesse de déroulement du papier : 2,5 cm/min.

TABLEAU 1

*Chromatographie liquide à haute performance  
de la fraction D. Essais sur la régénération céphalique.*

Fractions	Pics	Nombre d'explants survivants	Nombre de régénérats	% de régénération
1	1	19	14	74
2	2	21	5	24
3	3	20	15	75
4	4 + 5	5 (1)	4	(80)
Témoins		21	16	76

(1) Fraction toxique à 75 %. Les autres fractions permettent une survie au moins égale à 90 %.

TABLEAU 2

*Chromatographie liquide à haute performance de la fraction D.  
Essais sur le maintien de la turgescence du clitellum.*

Fractions	Pics	Nombre d'explants survivants	Nombre de clitellums turgescents	% de clitellums turgescents
1	1	18	2	11
2	2	19	15	79
3	3	16 (1)	1	6
4	4 + 5	4 (2)	0	(0)
Témoins		20	1	5

(1) Contamination accidentelle.

(2) Fraction toxique à 80 %. Les autres fractions permettent une survie au moins égale à 80 %.

contenant le pic 2 n'ont régénéré que dans 24 % des cas. Par contre, toutes les autres séries de culture présentent un régénérat normal dans environ 75 % des cas, même celle qui a été victime de la fraction toxique (pics 4 + 5). Ce pourcentage est tout à fait comparable à celui observé chez les témoins. Ceux-ci, en effet, ont reformé une tête dans 76 % des cas.

Par conséquent, l'inhibiteur céphalique est situé au niveau du pic 2.

2° *Stimulation de la clitellogénèse.* — Les quatre fractions précédentes sont essayées sur quatre lots d'explants de clitellum mûr ; un cinquième lot sert de témoin, cultivé sur milieu an hormonal (tabl. 2).

La fraction contenant les pics 4 + 5 a présenté la même toxicité que dans l'expérience précédente : 20 % seulement des explants ont survécu. Tous les autres lots sont, pour plus de 80 %, en excellent état à l'issue de la culture (7 jours). Dans ces conditions, seul le pic 2 permet le maintien de la turgescence clitellaire dans 79 % des cas. Les explants cultivés en présence des trois autres fractions, tout comme les témoins, présentent une hypoplasie de l'épiderme clitellaire caractéristique de la culture sur milieu an hormonal.

C'est donc dans la fraction contenant le pic 2 que se trouve le facteur clitellogène.

## Discussion et conclusion.

La toxicité de la fraction 4, aussi bien envers les clitellums que vis-à-vis des tronçons en régénération, pose un problème. C'est la première fois que nous observons, dans les essais biologiques de fractions, une mortalité des explants : la survie est d'ordinaire supérieure à 90 %, mises à part quelques contaminations accidentelles, bactériennes ou fongiques. La série de fragments clitellaires cultivés en présence de la fraction 3 montre ainsi l'incidence d'une telle contamination. Néanmoins, la survie y est encore de 80 %. D'où provient cet effet toxique ? La fraction incriminée renferme les produits collectés en fin d'éluion, au niveau des pics 4 et 5. La toxicité n'est peut-être pas due à ces produits absorbant très peu à

254 nm, mais plutôt à des résidus détachés de la colonne à la fin de l'éluion. De toute façon, aucun des quatre fragments clitellaires survivants n'a conservé sa turgescence, ce qui indique que cette fraction ne doit pas posséder d'effet clitello-gène.

Ainsi donc, la fraction contenant le pic n° 2, appelée *fraction E*, est simultanément clitello-gène et inhibitrice de la régénération céphalique. A ce stade de la purification, elle ne paraît pas contenir d'impuretés en quantité décelable. L'allure presque symétrique du pic 2 (fig. 2) semblerait l'indiquer, malgré une légère irrégularité de la branche ascendante. Ce décrochement pourrait correspondre à une contamination par des produits non peptidiques ou à un artefact dû, peut-être, à une aggrégation de molécules du peptide, hypothèse formulée par Kirschbaum, Perlman et Poet (1982) pour expliquer certaines anomalies des chromatogrammes H.P.L.C. Une analyse en spectrographie de masse permettra de s'assurer de la complète pureté de la fraction E.

Les présentes observations confirment l'hypothèse que les propriétés clitello-gène et inhibitrice de la régénération appartiennent à la même substance, l'hormone cérébrale, agissant sur des récepteurs différents, ce qui est conforme à ce que l'on connaît chez d'autres animaux (batraciens, insectes ou polychètes) : une même hormone peut être stimulatrice ou inhibitrice selon le moment où elle agit et selon l'état physiologique des cellules cibles.

On sait, par ailleurs, (Lattaud, 1974) que chez *Eisenia*, l'androgène testiculaire doit être stimulé par une sécrétion des ganglions cérébroïdes. Des expériences préliminaires ont montré que ce facteur cérébral se trouvait dans la fraction A (fig. 1), en même temps que la substance clitello-gène et morphoinhibitrice (Lattaud et Marcel, à paraître).

S'il est confirmé, au fur et à mesure de la purification, que cette activité gonadotrope se retrouve toujours associée aux effets clitello-gène et inhibiteur de la régénération céphalique, l'explication des mécanismes hormonaux chez *Eisenia foetida* s'en trouvera simplifiée. Une seule hormone cérébrale, neurohormone peptidique, contrôlerait la différenciation testiculaire et le développement des caractères sexuels secondaires ainsi que la morphogenèse céphalique.

En conclusion, il convient de préciser nos résultats en déterminant la séquence des acides aminés du peptide et de rechercher, si possible, les mécanismes d'action de la neurohormone au niveau des cellules cibles.

Reçu en mars 1983.

Accepté en juin 1983.

## Références

- AVEL M., 1929. Recherches expérimentales sur les caractères sexuels somatiques des Lombriciens. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **63**, 149-318.
- BERJON J. J., 1965. Application de la culture organotypique sur milieux artificiels à la discrimination des fonctions endocrines des ganglions cérébroïdes du Lombricien *Eisenia foetida* (Sav). *C.r. Acad. Sci. Paris.*, **260**, 6212-6214.

- HANCOCK W. S., BISHOP C. A., PRESTIDGE R. L., HARDING D. R. K., HEARN M. T. W., 1978. Reversed — phase high — pressure liquid chromatography of peptides and proteins with ion-pairing reagents. *Science*, **200**, 1168-1170.
- HEARN M. T. W., HANCOCK W. S., BISHOP C. A., 1978. High pressure liquid chromatography amino-acids, peptides and proteins. V. Separation of thyroidal iodo-amino-acids by hydrophilic ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **157**, 337-344.
- HERLANT-MEEWIS H., 1958-1959. Evolution des caractères sexuels au cours de la croissance et de la reproduction chez *Eisenia foetida*. *Ann. Soc. roy. Zool. Belg.*, **89**, 281-336.
- HUBL H., 1956. Über die Beziehungen der Neurosekretion zum Regenerationsgeschehen bei Lumbriciden nebst Beschreibung eines neuartigen neurosekretorischen Zelltyps im unter-schlundganglion. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **149**, 73-87.
- KIRSCHBAUM J., PERLMAN S., POET R.B., 1982. Anomalies in H.P.L.C. *J. chromatogr. Sci.*, **20**, 336-340.
- LATTAUD C., 1974. Etude en culture organotypique du contrôle du sexe des gamétogenèses chez l'Annélide Oligochète *Eisenia foetida* f. *typica* Sav. ; mise en évidence d'une action androgène des tissus testiculaires en présence du système nerveux central. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. D*, **279**, 935-938.
- LATTAUD C., MARCEL R. Stimulation *in vitro* de la sécrétion de l'androgène testiculaire par une fraction provenant de la purification d'un homogénat de régions céphaliques d'*Eisenia foetida* f. *typica* (Annélide, Oligochète). *Can. J. Zool.* (sous presse).
- MARCEL R., 1967. Rôle du système nerveux dans l'inhibition de la régénération antérieure chez *Eisenia foetida* f. *typica* Sav. (Annélide, Oligochète). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **265**, 693-694.
- MARCEL R., CARDON C., 1979. Partial purification and characterization of the peptide which inhibits cephalic regeneration in *Eisenia foetida* Sav. (Oligochaeta, Annelida). *Comp. Biochem. Physiol.*, **63 B**, 233-237.
- MARCEL R., CARDON C., 1982. Régénération céphalique et clitellogenèse sont-elles gouvernées par la même neurohormone chez le lombricien *Eisenia foetida* Sav. ? *J. Physiol.*, **78**, 574-578.
-