

LA NEUROENDOCRINOLOGIE DES CRUSTACES: EVALUATION
DES PROGRES OBTENUS CES DERNIERES ANNEES

VAN HERP F.

RESUME - Dans les recherches neuroendocrines chez les crustacés, l'application des méthodes modernes (chimie microanalytique, immunocytochimie, électrophysiologie et récemment aussi la biologie moléculaire) est de plus en plus fréquente et contribue à éclaircir la complexité du contrôle neuroendocrine de différents processus physiologiques. Une attention particulière est accordée à l'hormone hyperglycémisante (CHH), à l'hormone inhibitrice (VIH) et stimulatrice (VSH) de la vitellogenèse, à l'hormone inhibitrice (MIH) de la mue et aux hormones peptidiques apparentées à certaines hormones de Vertébrés et d'Insectes. Les interactions réciproques de tous ces facteurs et la coordination avec des amines biogènes et des stéroïdes sont signalées en relation avec le contrôle du métabolisme, de la reproduction et de la mue.

mots-clés : neuroendocrinologie, crustacés, progrès récent

ABSTRACT - The application of modern methods (microanalytical chemistry, immunocytochemistry, electrophysiology and recently also molecular biology) becomes more and more frequent in the study of the crustacean neuroendocrinology and contributes to the elucidation of the complexity of the neuroendocrinological control of different physiological processes. Particular attention is given to the crustacean hyperglycemic hormone (CHH), to the gonad inhibiting (GIH) and stimulating hormone (GSH), to the moult inhibiting hormone (MIH) and to the peptidergic factors related to some hormones from Vertebrates and Insects. The interactions of these factors as well as the coordination with biogenic amines and steroids in the control of the metabolism, reproduction and moulting are postulated.

key-words : neuroendocrinology, crustaceans, recent progress

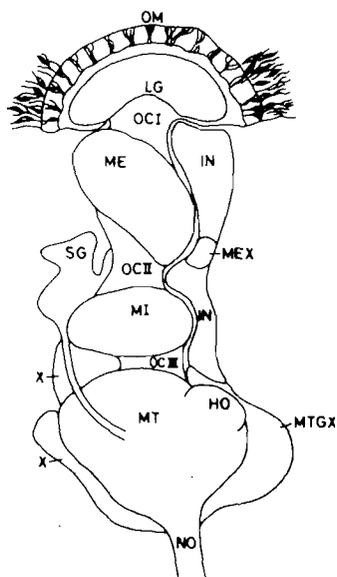
De nombreuses recherches morphologiques et physiologiques sur le système neuroendocrine du pédoncule oculaire ont mis en évidence sa fonction régulatrice sur plusieurs processus vitaux (Cooke & Sullivan, 1982; Keller, 1983; Kleinholz, 1985; Quackenbush, 1986). Déjà en 1928, Hanström étudiait pour la première fois la morphologie et la cytologie du pédoncule oculaire des Crustacés décapodes.

En général, le système neuroendocrine du pédoncule oculaire contient plusieurs régions de cellules neuroendocrines, les organes X et un organe neurohémal, la glande du sinus où les terminaisons axonales de ces cellules accumulent et libèrent les neurohormones.

Figure 1 donne une impression de la composition de l'axe nerveux avec ses quatre ganglions optiques du pédoncule oculaire indiquant ces centres neuroendocrines (MTGX, MEX, X et SG).

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences,
Université Catholique, Toernooiveld,
6525 ED Nimègue, Pays-Bas

Malgré plusieurs études en microscopie photonique et électronique de ces centres neuroendocrines, la localisation exacte des sites de synthèse des neurohormones, ne pouvait être donnée (Andrew, 1983; Chaigneau, 1983).



ABBREVIATIONS

- HO = organe hémipellusoïdale
- IN = neurones
- LG = lamina ganglionaris
- ME = medulla externa
- MEX = organe X de la ME
- MI = medulla interna
- MT = medulla terminalis
- MTGX = organe X de la MT
- NO = nerf optique
- OC = chiasma optique
- OM = ommatides
- SG = glande du sinus
- X = organe X

Fig. 1. Schéma des ganglions optiques du pédoncule oculaire de l'écrevisse indiquant les centres neuroendocrines

Grâce à deux antisérums du lapin, l'un développé par Jaros et Keller (Jaros & Keller, 1979) contre l'hormone hyperglycémiant (CHH) du crabe, *Carcinus maenas*, et l'autre produit dans notre laboratoire (Van Herp & Van Buggenum, 1979; Kallen, 1985) contre la CHH de l'écrevisse, *Astacus leptodactylus*, le système neuroendocrine synthétisant ce neuropeptide pouvait être localisé.

Des études combinées en immunocytochimie et microscopie électronique complétaient l'identification de ce système chez l'écrevisse (Gorgels-Kallen & Van Herp, 1981; Gorgels-Kallen & Voorter, 1984). Un groupe de cellules, caractérisées par une accumulation du matériel immunoréactif, est situé dans la partie distale de l'MTGX. Les complexes de Golgi sont entourés par des granules positifs. Les fibres nerveuses immunopositives peuvent être suivies dans le tractus de l'MTGX vers la glande du sinus. Dans cette région neurohémale des gouttelettes immunoréactives sont dispersées de façon homogène et abondante. En ultrastructure, l'immunoréaction est seulement concentrée dans le type de granule le plus grand (type 5-143 nm).

En outre, les cellules neuroendocrines, produisant l'hormone hyperglycémiant, sont injectées avec le "Jaune Lucifer" pour étudier la possibilité de communication de ces cellules de CHH entre elles-mêmes où avec les autres cellules du système nerveux du pédoncule oculaire. La micro-injection de "Jaune Lucifer" dans les péricaryons des cellules de CHH chez l'écrevisse a montré que les axones transportant le facteur hormonal, sont ramifiées dans la médulla terminalis (Gorgels-Kallen, 1985).

L'étude en microscopie électronique a révélé des figures synaptiques sur ces ramifications. Les terminaisons sont abondamment pourvues de granules CHH et montrent des contacts synaptiques. Les axones présynaptiques sont en contact avec plusieurs embranchements de l'axone CHH. Dans les terminaisons de ces axones présynaptiques se trouvent deux types d'inclusions: a) des corps denses aux électrons d'environ 67 nm; b) des vésicules transparentes avec un diamètre de 32 nm.

N'ayant jamais détecté des figures synaptiques dans les autres régions, nous supposons que ces ramifications sont responsables de la communication entre les cellules nerveuses et les cellules de CHH.

A la suite d'analyses immunocytochimiques, en utilisant des anticorps contre des neuropeptides et des amines biogènes, une réaction immunopositive était obtenue pour deux anticorps contre le Met-enképhaline et un anticorps contre la sérotonine au niveau de la microscopie électronique. En microscopie photonique, des produits apparentés à la sérotonine (Elofsson, 1983) et à l'enképhaline (cf. références dans le Tab. 1) étaient déjà localisés dans le pédoncule oculaire d'autres Crustacés en utilisant des anticorps spécifiques.

Les résultats de cette étude immunocytochimique et des effets physiologiques de la sérotonine et de l'enképhaline sur l'activité du système CHH et sur l'hyperglycémie sont illustrés dans le résumé de ma collègue Kallen (cf. communication dans cette édition). Notre hypothèse de travail est que l'activité des cellules CHH est contrôlée par un facteur inhibiteur: l'enképhaline, d'une part et un facteur stimulant: la sérotonine, d'autre part.

En conclusion, par les travaux immunocytochimiques entrepris ces dernières années par plusieurs chercheurs (Gorgels-Kallen et al., 1982; Martin et al., 1984; Van Herp et al., 1984; Keller et al., 1985) en utilisant l'anti-CHH du crabe et l'anti-CHH de l'écrevisse, il a été possible d'étudier en détail la localisation du système neuroendocrine responsable de la synthèse de l'hormone hyperglycémisante chez différentes espèces de Crustacés comme généralisé dans le schéma de la localisation (Fig. 2).

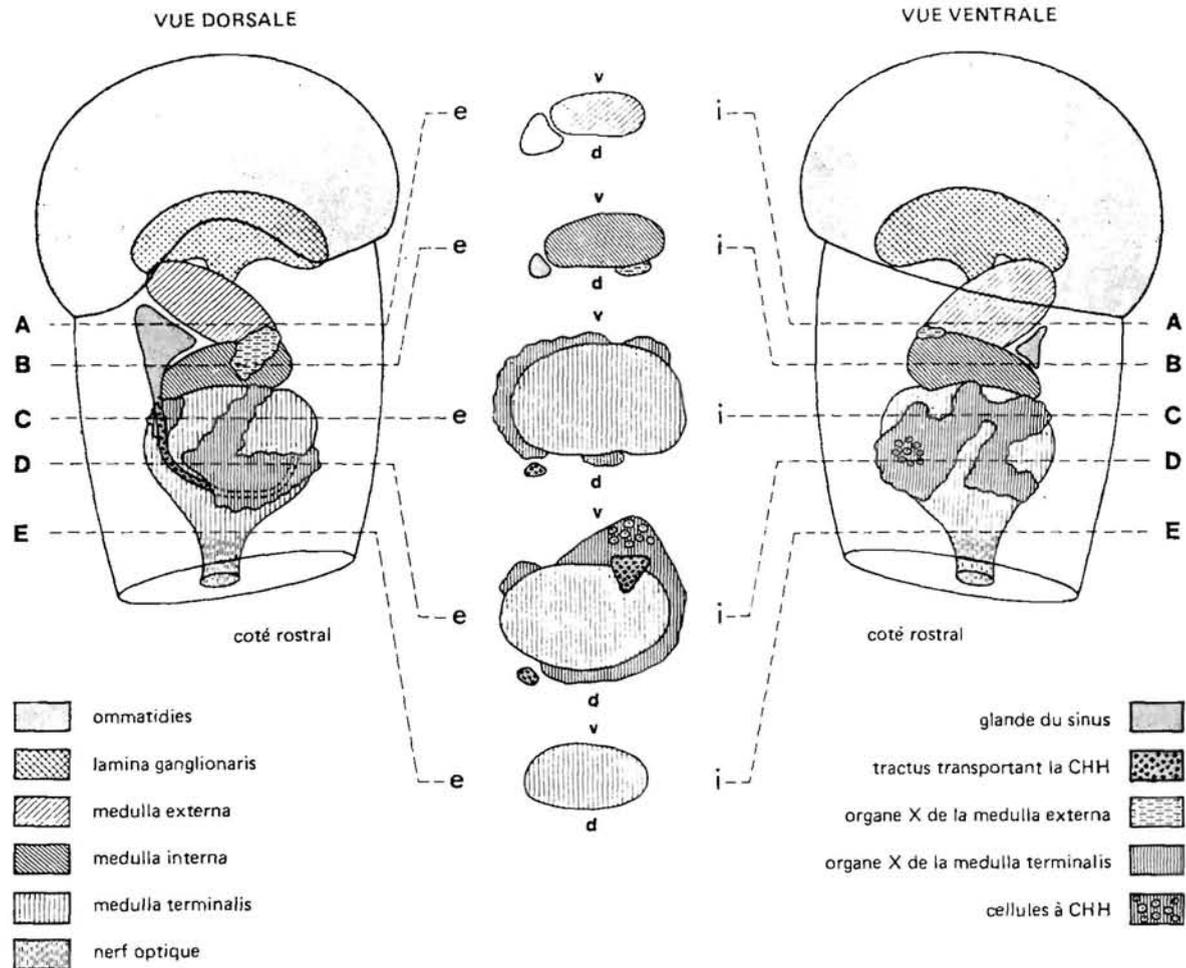


Fig. 2. Schéma des ganglions optiques du pédoncule oculaire et la localisation du système hyperglycémiant.

Ces dernières années, l'emploi d'antisérums contre des neuropeptides de Vertébrés a mis en évidence chez les Invertébrés la présence de substances antigéniques apparentées, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de recherche sur les relations entre ces produits et leur fonction.

Le pédoncule oculaire assure différents contrôles hormonaux chez les Crustacés: c'est dans cet organe qu'on a principalement recherché la présence éventuelle de neuropeptides apparentés aux hormones de Vertébrés et d'Invertébrés. Un résumé de ces études est donné dans le Tableau 1.

Quelques résultats que notre laboratoire a obtenus dans le pédoncule oculaire de l'écrevisse (Van Deijnen et al., 1985) sont décrits pour illustrer les implications possibles pour le fonctionnement neuronale des ganglions optiques.

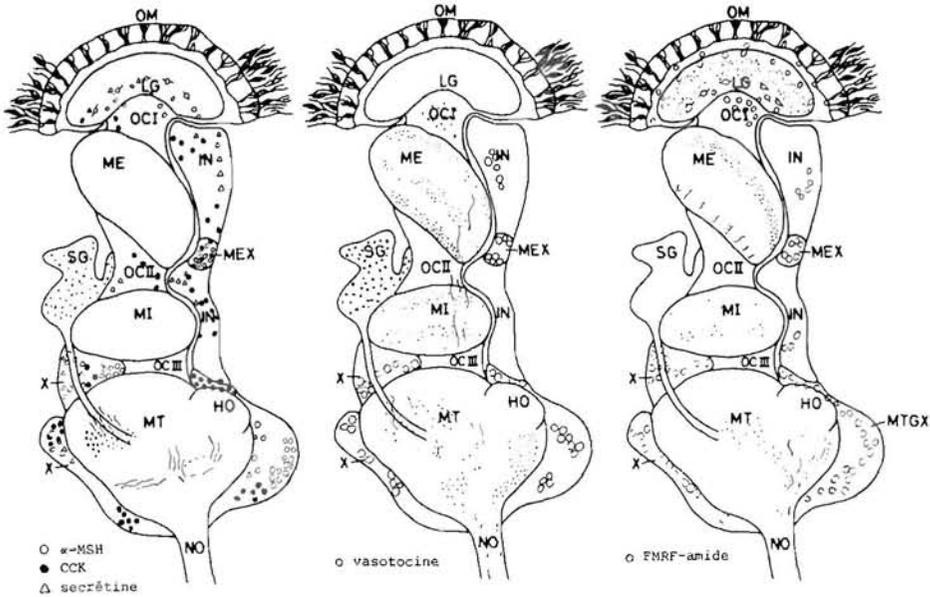


Fig. 3 a,b,c. Schéma du pédoncule oculaire de l'écrevisse indiquant la localisation des substances apparentées à l' α -MSH, CCK, sécrétine, vasotonine et FMRF-amide

Des substances apparentées à l' α -MSH, CCK et sécrétine sont localisées en abondance dans les organes X. Quelques cellules nerveuses, qui ne furent pas identifiées jusqu'ici comme peptidergiques sont mises en évidence avec les mêmes anticorps dans le lamina ganglionaris, le chiasme optique et les interneurons. Des fibres axonales semblent constituer la connexion entre les cellules neuroendocrines et la glande du sinus, étant également positive pour les trois anticorps (Fig. 3a). L'antivasotocine reconnaît approximativement les mêmes sites, mais le grand nombre de fibres est surprenant. La glande du sinus est aussi immunopositive (Fig. 3b). Les immunoréactions après l'usage de l'anti-FMRF-amide donnent la même impression. Des cellules et des axones peptidergiques sont localisées dans les différentes régions. La glande du sinus reste négative (Fig. 3c).

En conclusion: l'utilisation des anticorps contre différents peptides est favorable pour étudier la complexité du système peptidergique dans le pédoncule oculaire des Crustacés. En plus, cette approximation donne aussi

Tableau 1 : Hormones peptidiques apparentées aux hormones de Vertébrés et d'Invertébrés.

<u>peptide "like"</u>	<u>activité biologique</u>	<u>localisation</u>	<u>méthode de détection</u>
calcitonine	métabolisme du calcium?	pédoncule oculaire	cyto (1)*
		intestin/hépatopancréas	RIA/recept.(5)
enkephalin	neuromodulations?	pédoncule oculaire	cyto/phys (4,7,9)
gastrin/CCK	cycle de mue?	l'estomac	cyto/ RIA/ (3,8,17)
		pédoncule oculaire	isolation
GIP	?	pédoncule oculaire	cyto (17)
glucagon	?	pédoncule oculaire	cyto (17)
insuline	glycogénèse	hépatopancréas	RIA (13)
α MSH	?	pédoncule oculaire	cyto (17)
neurophysine	?	pédoncule oculaire	cyto (18)
oxytocine	?	pédoncule oculaire	cyto (17)

Tableau 1 : (Suite)

<u>peptide "like"</u>	<u>activité biologique</u>	<u>localisation</u>	<u>méthode de détection</u>
secrétine	?	pédoncule oculaire	cyto (17)
substance P	?	pédoncule oculaire	cyto (3)
somatostatine	?	cerveaux	cyto (11)
vasotocine	?	pédoncule oculaire	cyto (17)
vasopressine	?	pédoncule oculaire	cyto (18)
AKH (hormone adipokinétique)	activité "RPCN" neuromodulateur?	pédoncule oculaire	cyto/ phys/ isolation (2,10, 12,14)
FMRF	neuromodulateur?	pédoncule oculaire	cyto (4,6,17)
proctoline	effets musculaires	organe péricardiale	RIA/isolation cyto (15,16)

* Références : (1) Bellon et al., 1984 ; (2) Bellon et al., 1986 ; (3) Favrel et al., 1987 ; (4) Fingerman et al., 1985 ; (5) Fouchereau-Peron et al., 1987 ; (6) Jacobs et Van Herp, 1984 ; (7) Jaros et al., 1985 ; (8) Larson et Vigna, 1983 ; (9) Mancillas et al., 1981 ; (10) Mangerich et al., 1986 ; (11) Martin et Dubois, 1981 ; (12) Mordue et Stone, 1976 ; (13) Sanders, 1983 ; (14) Schooneveld et al., 1987 ; (15) Stangier et al., 1986 ; (16) Sullivan, 1979 ; (17) Van Deijnen et al., 1985 ; (18) Van Herp et Bellon, 1982.

l'impression qu'il existe une différence fonctionnelle entre ces cellules neuroendocrines des organes X et les cellules, principalement localisées dans les régions des interneurones. Nous supposons que ces dernières cellules ont une fonction dans la neuromodulation ou la neurotransmission.

Des résultats comparables sont obtenus chez d'autres espèces de Crustacés (références dans le Tab. 1).

On a récemment trouvé, que la communication entre les cellules peptidergiques se déroule par différents mécanismes de relais. Il paraît que les messagers ne sont pas seulement transférés par des synapses ou par le sang, mais aussi par les espaces intercellulaires.

Les trajets qui peuvent être suivis par les messagers dans le pédoncule oculaire des Crustacés, sont actuellement inconnus.

Il y a quelques années que Van Deijnen étudiait la vascularisation des ganglions optiques chez l'écrevisse par perfusion avec l'encre de Chine. En combinaison avec quelques résultats de l'ultrastructure du pédoncule oculaire, il pouvait postuler que les trois mécanismes de relais ne peuvent pas être exclus chez les Crustacés (Van Deijnen et al., 1984).

Dans le neuropile du medulla externa, par exemple, plusieurs régions contiennent des terminaisons axonales pleines de granules et montrent régulièrement des figures d'exocytose, supposant une communication synaptique.

D'autre part, dans la région des interneurones du même medulla, on retrouve des terminaisons axonales entourées d'espaces dont on suppose que ce sont des espaces sanguins. Par immunocytochimie, une réaction positive est détectée avec l'anti-FMRF dans les mêmes sites.

De plus, l'arrangement du système vasculaire, comme illustré dans la Figure 4, indique qu'une partie des terminaisons axonales dans la région supérieure des ganglions optiques est connectée avec la glande du sinus de manière neuro-hémo-neurale et que la libération de neuropeptides accumulés dans ce centre, peut être contrôlée par ce système.

Par contre, la perfusion du système sanguin du pédoncule oculaire et une étude microscopique de la région du medulla externa ont montré des espaces intercellulaires non pénétrés par l'encre de Chine (Van Deijnen, 1986).

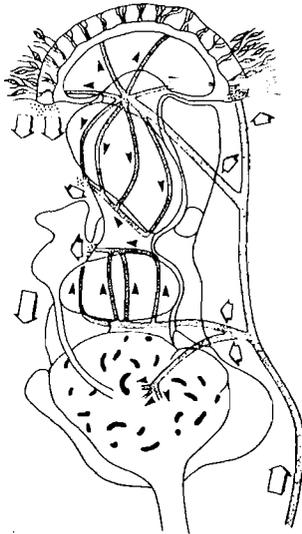


Fig. 4. Arrangement du système vasculaire dans le pédoncule oculaire de l'écrevisse

La signification de ces dernières structures pour l'intégration neuroendocrine du pédoncule oculaire est inconnue, mais elle entraîne plusieurs remarques d'ordre morphologique et fonctionnelle. C'est intéressant de signaler que ces structures sont localisées dans les mêmes régions où nous retrouvons les réactions immunocytochimiques pour différents antisérums de peptides. Ceci indique que plusieurs de ces peptides pourraient être libérés de manière non-synaptique dans l'espace intercellulaire.

Comme fut signalé dans l'introduction, plusieurs démarches sont actuellement suivies pour étudier les hormones peptidiques chez les Crustacés. Outre les études immunologiques, plusieurs laboratoires ont introduit les techniques de chromatographie liquide à haute pression (l'HPLC) pour isoler les peptides de la glande du sinus (Keller & Kegel, 1984). Une attention particulière a été accordée, entre autres, à quelques hormones typiques de Crustacés comme l'hormone hyperglycémiant (CHH), à l'hormone inhibitrice de la mue (MIH) et à l'hormone inhibitrice de la vitellogenèse (VIH). Un autre point d'intérêt est l'étude des substances apparentées aux hormones de Vertébrés comme la calcitonine et les gastrines, par des techniques biochimiques (références dans le Tab. 1).

L'hormone hyperglycémiant des Crustacés a fait l'objet d'un certain nombre de travaux concernant sa séparation et sa purification comme ceux de Kleinholz (Kleinholz, 1976), Keller (Keller, 1981; et al., 1985), Huberman (Huberman & Aguilar, 1986), Newcomb (Newcomb, 1983) et Martin (Martin et al., 1984). Ainsi on dispose, actuellement, d'informations précises sur l'isolement et la composition en acides aminés.

L'hormone inhibitrice de la mue a été récemment étudiée par Webster et Keller (1986) chez *Carcinus* et par Chang et al. (1987) chez *Homarus* en utilisant l'HPLC.

Avec la même technique, l'isolement de l'hormone inhibitrice de la vitellogenèse est entrepris par deux équipes françaises, celle de Poitiers et celle de Paris. En collaboration avec la dernière, notre laboratoire a mis au point une méthode d'HPLC en phase inverse pour la séparation simultanée de plusieurs activités biologiques comme la MIH, RPCH, CHH et VIH à partir du même matériel de glande du sinus de homard (Soyez et al., 1982; Van Deijnen et al., 1984).

Récemment une approche nouvelle a été développée dans notre groupe de recherche pour purifier et étudier chez le homard, la CHH, la VIH et le facteur VSH, dont on présume qu'il stimule la vitellogenèse. La séparation en HPLC est basée sur les caractères d'ionocité des molécules. Les essais "classiques" sont utilisés pour détecter les activités biologiques. Des essais hétérologues sont effectués en utilisant l'écrevisse *Orconectes* pour l'activité hyperglycémiant et la crevette *Palaemonetes* pour les activités contrôlant la vitellogenèse secondaire (VIH et VSH). En outre des essais nouveaux sont développés. Les fractions sont analysées en ELISA par usage des antisérums: l'anti-CHH de l'écrevisse et l'anti-VIH de homard. Ce dernier anticorps fut préparé par Meusy et collègues (Meusy et al., sous presse).

Les résultats après la première phase de séparation, basée sur l'ionocité, sont montrés dans la Figure 5. Les fractions les plus importantes au point de vue de l'activité biologique sont localisées dans la deuxième partie du chromatogramme. L'activité hyperglycémiant est concentrée dans le double pic I et les pics VI/VII. Ces deux zones ont aussi une activité immunologique pour l'anti-CHH. Le polymorphisme de la CHH n'est pas surprenant, puisqu'il est décrit par plusieurs auteurs. L'existence d'une activité stimulatrice de la vitellogenèse est, par contre, remarquable parce que cette activité est localisée dans la même zone que le deuxième pic hyperglycémiant. Cet effet, direct ou indirect, reste à étudier.

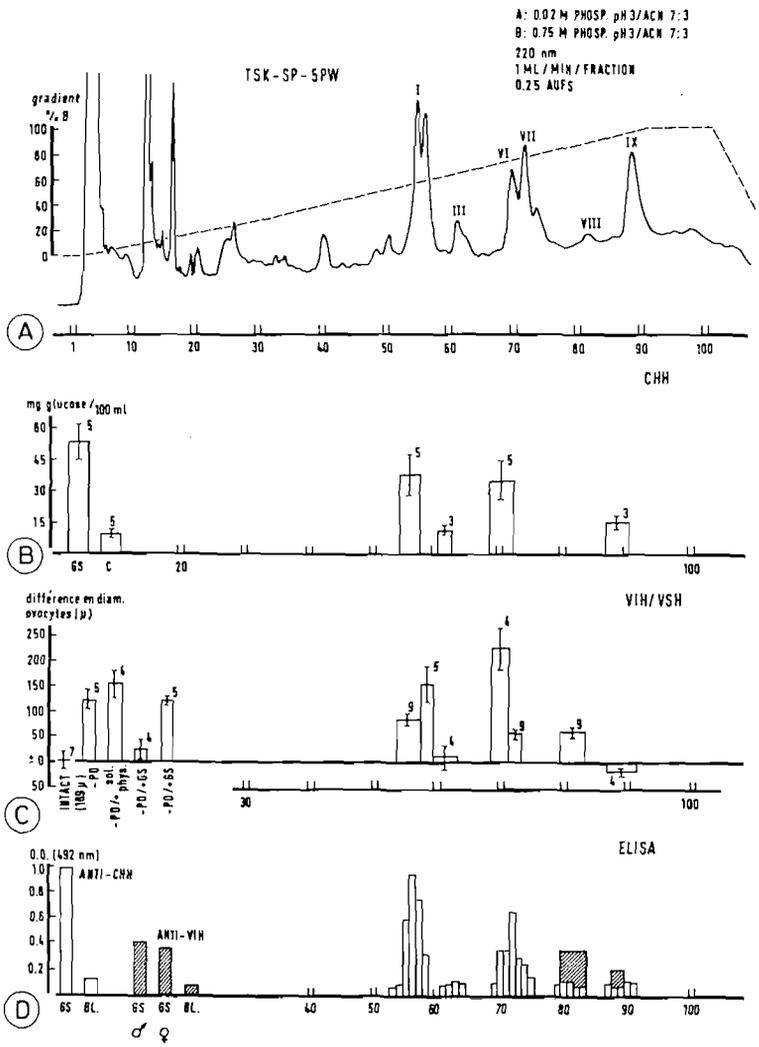


Fig. 5. Séparation des neuropeptides de la glande du sinus de homard et analyse des activités biologiques et immunologiques (A: séparation en HPLC/colonne TSK-SP-5PW; B: activité hyperglycémique (CHH); C: activité ovocytaire (VIH/VSH); D: activité immunologique (anti-CHH/anti-VIH)

Les résultats différents dans le bio-essai VIH/VSH pour les extraits bruts de la glande du sinus peuvent être expliqués par l'interaction de l'effet stimulatrice/inhibitrice ainsi que par la variabilité du matériel, inclus le lot des glandes et les animaux utilisés dans l'expérience. L'activité VIH est plutôt retrouvée dans deux zones dont une possède aussi une immunoréactivité pour l'anti-VIH. Pour le moment, on ne peut pas expliquer exactement pourquoi les zones VIII et IX réagissent avec l'anticorps. Pour quelle raison la zone III ne réagit pas avec l'anti-VIH, reste à étudier. C'est important de noter ici que cette zone inhibe aussi la liaison de la vitellogénine aux récepteurs membranaires de l'ovocyte vue l'essai "in vitro", décrit par Jugan et Soyez (1985).

Pour le moment des expériences additives pour séparer les produits actifs, p.ex. basées sur les caractères d'hydrophobicité des molécules sont en cours. Les plus amples informations sur ces dernières recherches seront publiées dans un journal spécialisé.

Pour le moment, on peut dire que le matériel du double pic de la première phase (Fig. 5) a les mêmes caractères d'hydrophobicité, mais que l'effet de température pendant l'extraction est remarquable. A 4°C, par exemple, le matériel se sépare en deux pics majeurs. Les deux ont une activité immunologique, mais l'activité hyperglycémiant est seulement accordée au produit de poids moléculaire de 7.5 kDa après une électrophorèse en SDS-urée. Jusqu'à maintenant nous ne pouvons pas accorder aucune activité biologique à l'autre pic. Que ce produit de 6.7 kDa ait une signification biologique ou soit plutôt un artéfact, reste à étudier. L'influence de la méthode d'extraction est minimale pour les zones VI/VII de la première colonne. Les deux contiennent un produit prédominant ayant une hydrophobicité identique. Ce matériel est immunoréactif pour l'anti-CHH, hyperglycémiant et a aussi un effet stimulateur sur la vitellogenèse. La pureté de ce matériel reste à vérifier, car après électrophorèse nous retrouvons deux fractions très voisines avec un poids moléculaire de 8.4 et 7.4 kDa. L'étude de leur rôle dans les deux activités biologiques est en cours. Il est frappant de constater que Chang et collègues (Chang et al., 1987) ont récemment corrélié une activité inhibitrice de la mue à un peptide de 8.7 kDa chez le homard et que Webster et Keller (1986) signalent que la MIH et la CHH de crabe sont très voisines. La zone IX de la première colonne, ayant une activité biologique et immunologique pour la VIH, ne montre aucune différence par rapport à la méthode d'extraction et correspond à un peptide de poids moléculaire de 7 kDa. Soyez et Van Deijnen (Soyez et al., 1982; Van Deijnen et al., 1984) ont rapporté environ le même poids moléculaire pour la VIH du même matériel, mais séparé sur une colonne en phase inverse. Le matériel du pic VIII, qui est immunoréactif pour l'anti-VIH, ressemble au pic IX par la fraction à poids moléculaire de 29.8 kDa. La possibilité que les fractions de 7 et de 29.8 kDa aient des relations peptide-précurseur, reste à étudier.

Pour consolider les résultats présentés ici et pour étudier les interactions de VIH et de CHH/VSH en détail, il nous semblait nécessaire de développer des essais plus précis que l'essai "in vivo". Ainsi nous sommes actuellement en train de développer des méthodes qui devront nous permettre d'éviter la variabilité entre les animaux expérimentaux, d'examiner dans des systèmes homologues et d'exploiter les interactions possibles de ces facteurs hormonaux dans le cycle complet de l'ovocyte.

Puisque la VIH inhibe la liaison de la vitellogénine aux récepteurs membranaires de l'ovocyte, bloquant ainsi la première phase de l'endocytose de cette lipoprotéine, nous avons développé deux essais basés sur ce résultat. Le premier essai utilise la vitellogénine marquée à la peroxydase pour étudier le "UPTAKE". Le deuxième est mis au point à partir d'un

anticorps contre le récepteur membranaire. Les détails de l'antisérum produit et les perspectives concernant son utilisation sont notés dans le résumé de Jugan et Van Herp (cf. communication dans cette édition).

Comme conclusion générale, les données concernant les quatre neuropeptides qui retiennent l'attention de plusieurs laboratoires et qui sont très proches par rapport à leurs caractères biochimiques sont rassemblées dans la Figure 6. Ce schéma résume les interactions réciproques de ces neuropeptides et la coordination avec d'autres facteurs dans le contrôle de la mue et de la reproduction.

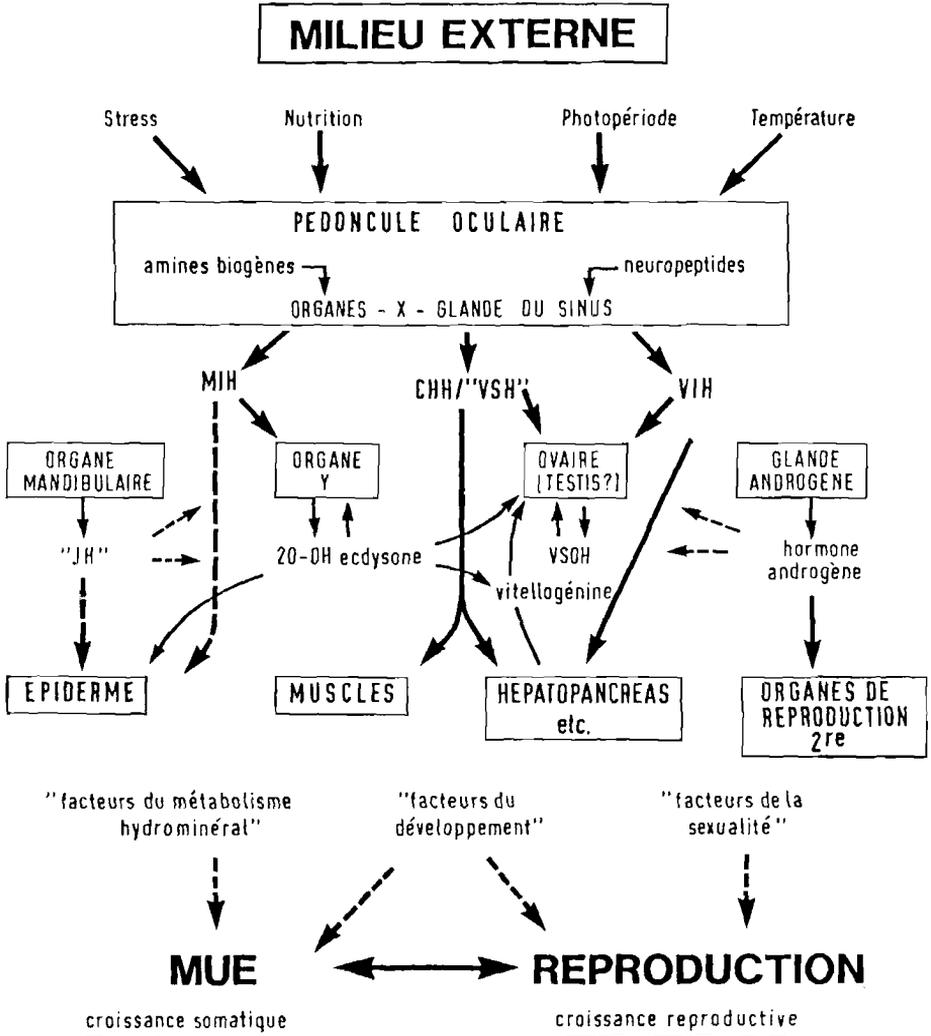


Fig. 6. Schéma résumant les interactions réciproques de MIH, CHH/'VSH' et de VIH et la coordination avec d'autres facteurs dans le contrôle de la mue et de la reproduction

- ANDREW R.D., 1983. Neurosecretory pathways supplying the neurohemal organs in Crustacea, in : *Neurohemal organs of Arthropods*, édité par A.P. Gupta, Charles C. Thomas Publishers, Springfield, 90-117.
- BELLON-HUMBERT C., VAN HERP F., SCHOONEVELD H., 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.
- BELLON C., VAN HERP F., VAN WORMHOUDT A., 1984. Localisation immunocytochimique de neuropeptides et d'amines biogènes dans le pédoncule oculaire de la crevette *Palaemon serratus* (Pennant), *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 114, 164.
- CHAIGNEAU J., 1983. Neurohemal organs in Crustacea, in : *Neurohemal organs of Arthropods*, édité par A.P. Gupta, Charles C. Thomas Publishers, Springfield, 53-89.
- CHANG E.S., BRUCE M.J., NEWCOMB R.W., 1987. Purification and amino acid composition of a peptide with molt-inhibiting activity from the lobster, *Homarus americanus*, *Gen. Comp. Endocr.*, 65, 56-64.
- COOKE E.M., SULLIVAN R.E., 1982. Hormones and neurosecretion, in : *The Biology of Crustacea*, édité par D.E. Blios, H.L. Atwood, D.C. Sandeman, Academic Press, Inc., New York, Vol. 3, 205-290.
- ELOFSSON R., 1983. 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, *Cell Tissue Res.*, 232, 221-236.
- FAVREL P., VAN WORMHOUDT A., STUDLER J.M., BELLON C., 1987. Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinin-like peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda): intermoult variations, *Gen. Comp. Endocr.*, 65, 363-372.
- FINGERMAN M., HANUMANTE M.M., KULKARNI G.K., IKEDA R., VACCA L.L., 1985. Localization of substance P-like, leucine-enkephalin-like, methionine-enkephalin-like, and FMRF amide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*, *Cell Tissue Res.*, 241, 473-477.
- FOUCHEREAU-PERON M., ARLOT-BONNEMAINS Y., MILHAUD G., MOUKHTAR M.S., 1987. Immunoreactive salmon calcitonin-like molecule in Crustaceans: high concentrations in *Nephrops norvegicus*, *Gen. Comp. Endocr.*, 65, 179-183.
- GORGELS-KALLEN J.L., 1985. Appearance and innervation of CHH-producing cells in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus* examined after tracing with Lucifer Yellow, *Cell Tissue Res.*, 240, 385-391.
- GORGELS-KALLEN J.L., VAN HERP F., 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.*, 50, 347-355.
- GORGELS-KALLEN J.L., VAN HERP F., LEUVEN R.S.E.W., 1982. A comparative immunocytochemical investigation of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the eyestalks of some decapod crustacea, *J. Morphol.*, 174, 161-168.
- GORGELS-KALLEN J.L., VOORTER C.E.M., 1984. Secretory stages of individual CHH-producing cells in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*, determined by means of immunocytochemistry, *Cell Tissue Res.*, 237, 291-298.
- HANSTRÖM B., 1928. Vergleichende Anatomie des Nervensystems der Wirbellosen Tiere, Springer, Berlin.
- HUBERMAN A., ANGUIJAR M.B., 1986. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann) I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone, *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B, 197-203.
- JACOBS A.A.C., VAN HERP F., 1984. Immunocytochemical localization of a substance in the eyestalk of the prawn *Palaemon serratus*, reactive with an anti-FMRF-amide rabbit serum, *Cell Tissue Res.*, 235, 601-605.

- JAROS P.P., DIRCKSEN H., KELLER R., 1985. Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab, *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda), *Cell Tissue Res.*, 241, 111-117.
- JAROS P.P., KELLER R., 1979. Immunocytochemical identification of hyperglycemic hormone-producing cells in the eyestalk of *Carcinus maenas*, *Cell Tissue Res.*, 204, 379-385.
- JUGAN P., SOYEZ D., 1985. Démonstration "in vitro" de l'inhibition de la croissance ovocytaire par un extrait de glande du sinus chez la crevette, *Macrobrachium rosenbergii*, *C.R. Acad. Sc.*, 300, 705-709.
- KALLEN J.L., 1985. The hyperglycemic hormone producing system in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*, *Thèse Doct. Sci., Univ. Nijmegen*, 127 p.
- KELLER R., 1981. Purification and amino acid composition of the hyperglycemic neurohormone from the sinus gland of *Creconectes limosus* and comparison with the hormone from *Carcinus maenas*, *J. Comp. Physiol.*, 141, 445-450.
- KELLER R., 1983. Biochemistry and specificity of the neurohemal hormones in Crustacea, in : *Neurohemal organs of Arthropods*, édité par A.P. Gupta, Charles C. Thomas Publishers, Springfield, 118-148.
- KELLER R., JAROS P.P., KEGEL G., 1985. Crustacean hyperglycemic neuropeptides, *Amer. Zool.*, 25, 207-221.
- KELLER R., KEGEL G., 1984. Studies on crustacean eyestalk neuropeptides by use of high performance liquid chromatography, in : *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones*, édité par J. Hofmann, M. Porchet, Springer-Verlag, Berlin, 146-154.
- KLEINHOLZ L.H., 1976. Purified hormones from the crustacean eyestalk and their physiological specificity, *Nature*, 258, 256-257.
- KLEINHOLZ L.H., 1985. Biochemistry of Crustacean Hormones, in : *The Biology of Crustacea*, édité par D.E. Bliss, L.H. Montel, Academic Press, Inc., New-York, Vol. 5, 464-522.
- LARSON B.A., VIGNA S.R., 1983. Gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive peptides in the Dungeness crab, *Cancer magister* (Dana): immunochemical and biochemical characterization, *Regul. Pept.*, 7, 155-170.
- MANCILLAS J.R., Mc GINTY J.F., SELVERSTON A.I., KARTEN H., BLOOM F.E., 1981. Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurones of lobster, *Nature*, 293, 576-578.
- MANGERICH S., KELLER R., DIRCKSEN H., 1986. Immunocytochemical identification of structures containing putative red pigment-concentrating hormone in two species of decapod crustaceans, *Cell Tissue Res.*, 245, 377-386.
- MARTIN G., DUBOIS P., 1981. A somatostatin-like antigen in the nervous system of an isopod, *Porcellio dilatatus*, *Gen. Comp. Endocr.*, 45, 125-130.
- MARTIN G., KELLER R., KEGEL G., BESSE G., JAROS P.P., 1984. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. I. Isolation and characterization, *Gen. Comp. Endocr.*, 55, 208-216.
- MARTIN G., JAROS P.P., BESSE G., KELLER R., 1984. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. II. Immunocytochemical demonstration in neurosecretory structures of the nervous system, *Gen. Comp. Endocr.*, 55, 217-226.
- MEUSY J.J., MARTIN G., VAN DEIJNEN J.E., SOYEZ D., GALLO J.M., 1987. Immunochemical and immunocytochemical study of the crustacean vitellogenine-inhibiting hormone (VIH), *Gen. Comp. Endocr.*, sous presse.
- MORDUE W., STONE J.V., 1976. Comparison of the biological activities of an insect and a crustacean neurohormone that are structurally similar, *Nature*, 264, 287-289.
- NEWCOMB R.W., 1983. Peptides in the sinus gland of *Cardisoma carnifex*: isolation and amino acid analysis, *J. Comp. Physiol.*, 153, 207-221.
- QUACKENBUSH L.S., 1986. Crustacean endocrinology, a review, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 2271-2282.

- SANDERS B., 1983. Insulin-like peptides in the lobster, *Homarus americanus*. I. Insulin immunoreactivity, *Gen. Comp. Endocr.*, 50, 366-373.
- SCHOONEVELD H., VAN HERP F., VAN MINNEN J., 1987. Demonstration of substances immunologically related to the identified arthropod neuropeptides AKH/RPCH in the CNS of several invertebrate species, *Brain Research*, 406, 224-232.
- SOYEZ D., FEYEN J., VAN DEIJNEN J.E., 1982. Preliminary results on the separation of *Homarus americanus* (L.) neuropeptides by high performance liquid chromatography using four bioassays, *J. Endocr.*, 94, 23.
- STANGIER J., DIRCKSEN H., KELLER R., 1986. Identification and immunocytochemical localization of proctolin in pericardial organs of the shore crab, *Carcinus maenas*, *Peptides*, 7, 67-72.
- SULLIVAN R.E., 1979. A proctolin-like peptide in crab pericardial organs, *J. exp. Zool.*, 210, 543-552.
- VAN DEIJNEN J.E.M., 1986. Structural and biochemical investigations into the neuroendocrine system of the optic ganglia of decapod Crustacea, *Thèse Doct. Sci., Univ. Nijmegen*, 201 p.
- VAN DEIJNEN J.E., SOYEZ D., VAN HERP F., 1984. Purification simultanée et caractérisation préliminaire de quelques hormones: CHH, RPCH, GIH et MIH de la glande du sinus du homard, *Homarus americanus* (Edwards), *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 114, 176-177.
- VAN DEIJNEN J.E., VAN DER STAPPEN J., RULAND M., 1984. Une étude ultra-structurale des ganglions optiques chez l'écrevisse *Astacus leptodactylus*: nouvelles données concernant le système neuroendocrine, *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 114, 177.
- VAN DEIJNEN J.E., VEK F., VAN HERP F., 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 Tissue Res.*, 240, 175-183.
- VAN HERP F., BELLON-HUMBERT C., 1982. Localisation immunocytochimique de substances apparentées à la neurophysine et la vasopressine dans le pédoncule oculaire de *Palaemon serratus* (Pennant) (Crustacé Décapode Natantia), *C.R. Acad. Sci.*, 295, 97-102.
- VAN HERP F., VAN BUGGENUM H.J.M., 1979. Immunocytochemical localization of hyperglycemic hormone (HGH) in the neurosecretory system of the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*, *Experientia*, 35, 1527-1528.
- VAN HERP F., VAN WORMHOUDT A., VAN VENROOY W.A.J., BELLON-HUMBERT C., 1984. Immunocytochemical study of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the eyestalks of the prawn *Palaemon serratus* (Pennant) and some other Palaemonidae, in relation to variations in blood glucose level, *J. Morphol.*, 182, 85-94.
- WEBSTER S.G., KELLER R., 1986. Purification, characterization and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea Decapoda), *J. Comp. Physiol.*, 156B, 617-624.