

Immunologie

MODULATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE CHEZ LES INVERTÉBRÉS ET LES VERTÉBRÉS MAMMALIENS PAR LES PEPTIDES OPIOÏDES ET LES SUBSTANCES OPIACÉES

par

C. LEFEBVRE, A. TASIEMSKI

et M. SALZET*

Les peptides opioïdes et les substances opiacées interviennent, soit dans l'initiation, soit dans l'inhibition de la réponse immunitaire. Chez les invertébrés et les vertébrés, il existe d'une part de grandes similitudes concernant les précurseurs des peptides opioïdes, leur processus de maturation et les peptides qui en sont issus. Ces derniers interviennent comme médiateurs de la réponse immunitaire. D'autre part, l'action des substances opiacées comme inhibiteurs de la réponse inflammatoire est fortement conservée. Ces analogies constatées entre invertébrés et vertébrés mettent en évidence l'apparition dès le début de l'évolution d'une stratégie immunitaire efficace, perfectionnée et conservée au cours du temps. Les boucles de régulation impliquant les peptides opioïdes et les substances opiacées, correspondent à un héritage vieux de 600 millions d'années particulièrement performant puisque conservé jusqu'à l'homme. Toutefois, la complexité des système nerveux et immunitaire chez les mammifères rend l'étude de ces mécanismes fondamentaux particulièrement difficile. C'est pourquoi, une approche alternative consiste à développer des modèles d'étude invertébrés plus simples, afin de mieux comprendre les processus mis en jeu lors de la réponse innée, dont les signaux sont à l'origine de la réponse adaptative chez les vertébrés.

Opioids and Opiates : immune response moderation in both Invertebrates and Mammals

Opioids and opiates are involved both in the initiation and the inhibition of immune responses. Similarities concerning opioids precursors, their processing and the subsequent peptides have been shown in invertebrates and vertebrates. The subsequent peptides are involved in moderation of the immune system through their antibacterial activity and/or their capacity to induce inflammatory response. The inhibition of immune response by opiates is highly conserved in the course of evolution.

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

The analogies between vertebrates and invertebrates underline an efficient and sophisticated immune strategy in which opioids and opiates play an important role. They appeared in invertebrate mechanisms which evolved at least 600 millions years ago. However, the complexity of nervous and immune systems makes difficult the study in mammals. Therefore, another approach consists of developing invertebrates models. They are appropriate to delineate innate response mechanisms. These processes are all the more important since vertebrate adaptive responses are generated from them.

Introduction

Jusqu'au XIX^e siècle, toutes les fonctions et toutes les manifestations physiologiques, y compris les réactions immunitaires étaient considérées comme étant sous le contrôle du cerveau, assurant l'homéostasie de l'organisme, face aux maladies. L'immunologie a connu un essor considérable par les découvertes d'Elie Metchnikoff sur la phagocytose et par celles de Louis Pasteur sur la vaccination. Dès lors, chercheurs et médecins ont compris l'importance du système immunitaire et l'ont perçu comme seul intervenant dans la réponse de l'organisme aux agressions étrangères. Il a fallu attendre la seconde moitié de notre siècle pour que les questions relatives aux interconnexions possibles entre système nerveux et immunitaire soient remises au goût du jour.

Depuis ces quinze dernières années, différents travaux ont montré d'une part que des changements de l'état mental (stress, hypnose) influencent les réponses immunes et ainsi la résistance de l'organisme aux maladies (Fig. 1), et d'autre part que le système immunitaire active des voies périphériques (ex : nerf vague) et centrales afin, par exemple, de produire l'état fébrile qui accompagne une infection (DANTZER, 1994, ELMQUIST *et al.*, 1997, HANSEN *et al.*, 1998). Ces relations font intervenir différentes voies nerveuses, l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien, la voie sanguine (Fig. 1) et différentes molécules comme des peptides (CRH, ACTH), des monoamines (noradrénaline, adrénaline et dopamine), des glucocorticoïdes, des cytokines (IL1, IL6, TNF α), des peptides opioïdes, des substances opiacées (morphine, anandamide) et des radicaux libres médiateurs comme le NO (OTTAVIANI *et al.*, 1996). SMITH *et al.* (1992) ont confirmé l'existence d'un échange bidirectionnel d'informations entre les systèmes neuroendocrine et immunitaire via des messagers intercellulaires. De plus, ils ont été les premiers à montrer que des peptides comme l'ACTH étaient également exprimés par des cellules immunitaires (BLALOCK et SMITH, 1985). De la même manière, certaines cytokines sont exprimées par les cellules du système nerveux (neurones, astrocytes, microglie) à la suite d'infections centrale ou périphérique, d'ischémie ou de maladies neurodégénératives (MERRILL et BENVENISTE, 1996).

De l'ensemble de ces travaux émerge un nouveau domaine de recherche chez les mammifères résultant de l'interdisciplinarité entre l'immunologie, la neurobiologie, l'endocrinologie et même la psychiatrie que l'on nomme la neuroimmunologie, voire chez l'homme la psychoneuroimmunologie (MAIER *et al.*, 1994). Cependant, la complexité des systèmes nerveux et immunitaire chez les mammifères rend l'étude approfondie de ces interactions neuroimmunitaires particulièrement difficile. Une approche alternative est de développer un modèle d'étude invertébré plus simple, qui partage néanmoins les mécanismes fondamentaux des mammifères. Les nombreux travaux réa-

Modulation de la réponse immunitaire

lisés à partir de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Aplysia californica* ou *Hirudo medicinalis* ont démontré l'intérêt des modèles invertébrés dans des thématiques aussi variées que le développement, l'immunité, l'apoptose, le vieillissement ou différents champs d'étude en neurobiologie. Dans cette revue nous nous attacherons à préciser l'intérêt respectif des modèles invertébrés et vertébrés dans l'étude de la modulation du système immunitaire par les messagers endocriniens.

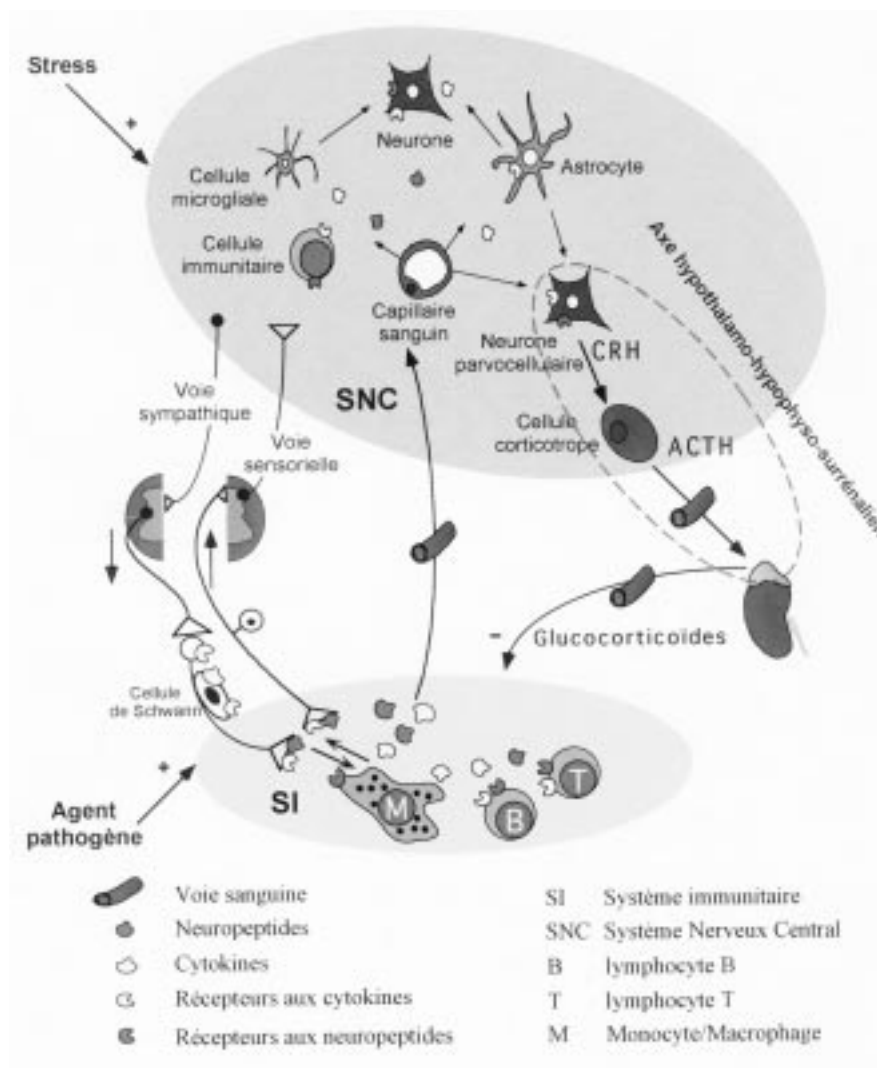


Figure 1

Interactions entre systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire chez les mammifères (modifié par WEIHE *et al.*, 1998).

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

Mécanisme inné de la réponse immunitaire : implication des peptides opioïdes

Les messagers chimiques de type hormonal libérés par les cellules immunitaires sont nombreux (WEIGENT et BLALOCK, 1997, STEFANO *et al.*, 1996a). Parmi ceux-ci, nous nous sommes focalisés sur les peptides opioïdes et les substances opiacées (STEFANO *et al.*, 1996a, 1996b, STEFANO et SALZET, 1999¹, SALZET et STEFANO, 1999).

La dénomination peptides opioïdes regroupe trois substances : les enképhalines, les dynorphines et les endorphines. Ces molécules présentes chez les vertébrés (PATEY et ROSSIER, 1986) sont également présentes chez les invertébrés (HARRISON *et al.*, 1994) (Tableau 1). Elles sont issues de trois précurseurs inactifs *i.e.* la proenképhaline, la prodynorphine et la pro-opiomélanocortine (POMC) (Fig.2).

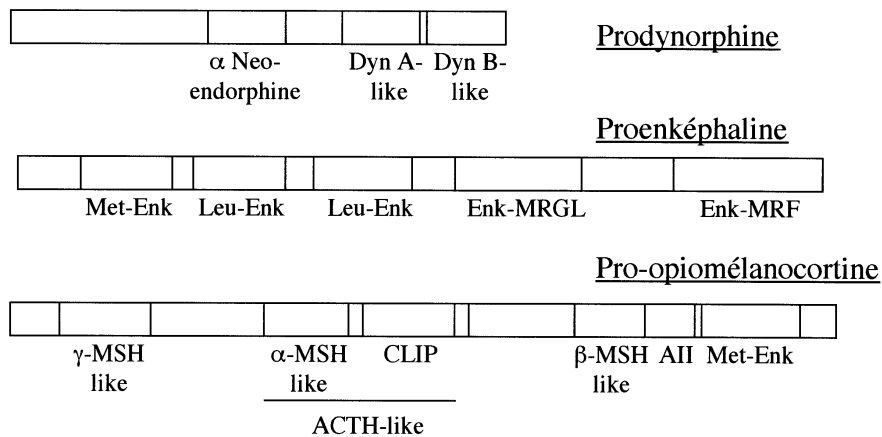
Tableau 1

Peptides opioïdes chez les invertébrés (HARRISON, 1994).

Espèces	Peptides	Méthode de détection
PROCARYOTES <i>Staphylococcus aureus</i>	ME.	RIA
EUCARYOTES Protozoaires <i>Tetrahymena</i>	ACTH, β endorphine et dynorphine.	ICC
Plathelminthes Planaires <i>Schistosoma mansoni</i>	α -MSH. ME β endorphine, ACTH, α -MSH	Northern blot ICC RIA, HPLC
Insectes <i>Calliphora vomicata</i> <i>Drosophila drosophila</i>	ME, LE MERGL, α -néoendorphine, ME & LE	ICC ICC ICC
<i>Locusta migratoria</i> <i>Leucophaea madera</i>	ME, ACTH et α -MSH ME, LE et MERGL.	HPLC, RIA ICC
Mollusques <i>Mytilus edulis</i> <i>Lymnaea stagnalis</i> <i>Aplysia californica</i>	ME, LE et MERF ME, LE, MERF, MERGL, dynorphine, ACTH et α -MSH. ME et MERF.	Microséquence et HPLC Microséquence HPLC ICC, HPLC
Annélides <i>Lumbricus terrestris</i> <i>Theromyzon tessulatum</i>	β endorphine, LE et ME. ME, LE, α -néoendorphine, γ -MSH, ACTH et dynorphine	ICC Microséquence

ICC, Immunocytochimie ; RIA , radioimmunoassay ; HPLC, High performance liquid chromatography ; ME, Méthionine-enképhaline ; LE, Leucine-enképhaline ; MERF, Méthionine-enképhaline [Arg6, Phe7].

Modulation de la réponse immunitaire



(Dyn A-like: dynorphine A-like; Dyn B-like: dynorphine B-like; Met-Enk: Methionine-enképhaline; Leu-Enk: Leucine-enképhaline; Enk-LRGL: enképhaline-Methionine Arginine Glycine Leucine; Enk-MRF: enképhaline-Methionine Arginine Phenylalanine; AII: Angiotensine II.)

Figure 2

Structure des précurseurs d'opioïdes chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* (SALZET *et al.*, 1997b).

De multiples travaux chez les vertébrés comme chez les invertébrés (STEFANO *et al.*, 1996a) montrent que les peptides opioïdes et notamment les enképhalines et les endorphines possèdent la faculté de moduler la réponse immune (STEFANO *et al.*, 1989, 1996a, SCHARRER et STEFANO, 1994). Chez les vertébrés, de nombreuses données concernent la POMC (WEIGENT et BLALOCK, 1997) et la proenképhaline (STEFANO *et al.*, 1996a) (Tableau 2). La POMC contient deux molécules capables de moduler le système immunitaire : la β -endorphine et l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). Leurs modalités d'action sont différentes voire opposées. En effet, la β -endorphine est immunostimulatrice alors que l'ACTH et surtout son produit de maturation : l'hormone mélanostimulante (α -MSH ou ACTH(1-13)) sont immunosupresseurs (LIPTON et CATANIA, 1997). La β -endorphine est libérée par de nombreuses cellules immunitaires telles que les lymphocytes et les macrophages. Son action rejoint celle d'un autre peptide opioïde, la méthionine enképhaline (Met-enk) produit issu de la maturation de la proenképhaline. Ces deux peptides possèdent la capacité de stimuler *in vitro* la migration des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes T (STEFANO *et al.*, 1996a). *In vivo*, des injections chroniques de ces deux opioïdes entraînent la migration de ces mêmes cellules vers le site d'injection (STEFANO *et al.*, 1996a). L'action de ces deux neuropeptides passe par des récepteurs $\delta 2$ qui ont été caractérisés tout d'abord chez les invertébrés (STEFANO *et al.*, 1989) puis chez les vertébrés au niveau des neutrophiles, des lymphocytes, des monocytes et plus récemment au niveau de l'endothélium des veines saphènes humaines (STEFANO *et al.*, 1989, 1998a). Ils entraînent à la fois la migration des cellules qui deviennent amiboïdes et la libération de cytokines proinflammatoires (SMITH, 1997). De récents travaux ont par ailleurs montré une augmentation des taux

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

d'ARN messagers codant pour la pré-proenképhaline au niveau des monocytes de sang périphérique humain lorsque ceux ci sont mis en présence de cytokines de type Th2 (Il6) (KAMPHUIS *et al.*, 1998). Par conséquent on peut penser que la présence simultanée de certaines cytokines et de certains opioïdes au niveau d'un site d'infection favoriserait et maintiendrait l'inflammation (WEIGENT et BLALOCK, 1997). Ce mécanisme est régulé par une métalloprotéase : l'endopeptidase neutre (NEP 24.11)/CD10/enképhalinase (SHIPP *et al.*, 1990). Cette enzyme, localisée sur la membrane plasmique des cellules inflammatoires humaines, assure en effet le catabolisme de la Met-enk. Il est intéressant de noter que cette enzyme intervient aussi au niveau du système nerveux comme enképhalinase (TURNER *et al.*, 1994).

Tableau 2

Action des messagers endocriniens sur les cellules immunitaires de Vertébrés.
(WEIGENT et BLALOCK, 1997, STEFANO, 1996a, KLEIN, 1998).

Type cellulaire	Fonction	Messenger	Effet
Lymphocyte T	Prolifération	Anandamide, Morphine	-
		Enképhalines	+
		ACTH (1-24) et β endorphine	+
		ACTH (1-19), MSH	-
Lymphocyte B	IgE	Anandamide, Morphine	+
	IgG	Enképhalines	-
		Anandamide, Morphine	-
		Enképhalines	+
		ACTH (1-39), MSH	-
Macrophage	Phagocytose	Anandamide, Morphine	-
		Enképhalines	+
		ACTH (1-24)	-
		ACTH (1-39), MSH	-
Natural Killer	Cytotoxicité	Anandamide, Morphine	SE
		Enképhalines	+
		ACTH (1-39), MSH	-
		ACTH (1-24)	+
		β-endorphines	+

(+ : activateur ; - : inhibiteur ; SE : sans effet.)

La proenképhaline : précurseur de médiateurs de la réponse inflammatoire

Les précurseurs d'opioïdes sont présents à la fois chez les vertébrés (PATEY et ROSSIER, 1986) et chez les invertébrés (SALZET et STEFANO, 1999, STEFANO et SALZET, 1999¹) (Tableaux 3a, 3b, 3c). Récemment, une protéine apparentée à la proenképhaline a été caractérisée chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*, mais également chez la moule *Mytilus edulis* (SALZET et STEFANO, 1997a, STEFANO *et al.*, 1998b). Celle-ci contient des peptides opioïdes dont la Met-enk et de la leucine enképhaline (Leu enk) dans les proportions 1/2, de la méthionine enképhaline arginine

Modulation de la réponse immunitaire

Tableau 3a

Pourcentage d'identité de séquence entre la proenképhaline de *Mytilus edulis* et ses peptides dérivés avec celles de sangsues et de vertébrés (SALZET et STEFANO, 1999, STEFANO et SALZET, 1999¹).

Mytilus	Sangsue (%)	Xénope (%)	Cochon d'Inde (%)	Homme (%)
Proenképhaline	15	25.4	50	39
Met-Enképhaline	100	100	100	100
Leu-enképhaline	100	100	100	100
Met-Enk R G L	100	100	100	100
Met-Enk R F	100	100	100	100
Synenképhaline	10	15	20	20
Peptide B, Enkélytine	95	92	98	96
Amidorphine	10	70	65	70

Tableau 3b

Pourcentage d'identité de séquence entre la POMC de *Mytilus edulis* et ses peptides dérivés avec celles de sangsues et de vertébrés (SALZET et STEFANO, 1999, STEFANO et SALZET, 1999¹).

Mytilus	Sangsue (%)	Xénope (%)	Cochon d'Inde (%)	Homme (%)
POMC	51.3	31.6	40.26	35.3
ACTH	91.2	92.2	93.3	94.7
γ -MSH	32	92	95	93
α -MSH	80	87	90	100
CLIP	90	88	95	95
γ -LPH	38	8	5	5
β -endorphine	25	21	20	18
Met-enképhaline	100	100	100	100

Tableau 3c

Pourcentage d'identité de séquence entre la prodynorphine de *Mytilus edulis* et ses peptides dérivés avec celles de sangsues et de vertébrés (SALZET et STEFANO, 1999, STEFANO et SALZET, 1999¹).

Mytilus	Sangsue (%)	Xénope (%)	Homme (%)
Prodynorphine	21.8	55	35
β -Néo-endorphine	100	100	100
α -Néo-endorphine	100	100	100
Dynorphine A	100	70.5	70.5
Dynorphine B	100	85.7	85.7

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

glycine leucine (Met-enk arg gly leu) et de la méthionine enképhaline arginine phénylalanine (Met-enk arg phe) (Tableau 3a). Tous ces peptides sont flanqués de sites dibasiques qui sont des sites potentiels de clivage. La proenképhaline de sangsue présente une homologie de séquence relativement faible avec la proenképhaline humaine. En revanche, les principes actifs sont très conservés (tableau 3a). On peut également noter une forte conservation du coté C-terminal des pro-enképhalines au cours de l'évolution (Tableau 4). Elles possèdent toutes des molécules apparentées au peptide B et à l'enkélytine bovine avec une identité de séquence de l'ordre de 90% (SALZET et STEFANO, 1997a, STEFANO *et al.*, 1998b, GOUMON *et al.*, 1996). Ces deux molécules possèdent des activités antibactériennes spécifiquement contre les bactéries Gram+ lorsqu'elles sont sous des formes bi-phosphorylées (GOUMON *et al.*, 1996, 1998). La partie N-terminale est moins conservée entre les vertébrés et les invertébrés (SALZET et STEFANO, 1997a). Le peptide antibactérien, synenképhaline (fragment 1-72) présente 15% d'homologie avec celui présent chez la moule et 45% avec la partie C-terminale du peptide présent chez la sangsue (STEFANO et SALZET, 1999¹, STEFANO *et al.*, 1998b) (Tableau 4). L'amidorphine (fragment 80-105 de la proenképhaline bovine) (SEIZINGER *et al.*, 1985) présente 40% d'identité avec ceux apparentés présents chez les invertébrés (STEFANO et SALZET, 1999¹, STEFANO *et al.*, 1998b) (Tableau 3a).

Tableau 4

Séquence du peptide B de différentes espèces d'invertébrés et de vertébrés : Sangsue, Moule, Souris, Rat, Cochon d'Inde, Cochon, Bœuf et Homme (les astérisques indiquent les acides aminés conservés quelle que soit l'espèce ; la partie soulignée correspond à la séquence de l'enkélytine).

<u>Espèces :</u>	** *** * * * * * * * * * * * * *
Sangsue	FAEFLPSEEEGESYSKEVPEMERRYGGFMRF
Moule	FAEFLPSEEEGESYSKEVPEMEKYYGGFMRF
Souris	FAEELPSDEEGENYSKEVPEIEKRYGGFMRF
Rat	FAESLPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF
Cochon d'Inde	FAEFLPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF
Cochon	FADSLPSDEEGEGYSKEVPEMEKXYGGFMRF
Boeuf	FAEPLPSEEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF
Homme	<u>FAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF</u>

Chez les vertébrés, la synenképhaline et ses produits de dégradation sont synthétisés et sécrétés par les lymphocytes humains quand ils sont activés (PADROS *et al.*, 1989). Ils participeraient à la réponse proliférative de ces cellules. La Met-enk stimule *in vitro* la migration des immunocytes chez les vertébrés (STEFANO *et al.*, 1989). KOWALSKI *et al.* (1998) ont démontré que la Met-Enk stimule la prolifération des cellules B et T. SIZEMORE *et al.* (1991) ont par contre montré que la leucine-enképhaline (Leu-enk) et ses produits de dégradation stimulent la prolifération de cellules cytotoxiques T et de lymphocytes T auxiliaires. Récemment, GOUMON *et al.* (1998) ont mis en évidence la libération de proenképhaline, peptide B, enkélytine, des fragments (1-68, 1-17, 116-117) de la proenképhaline dans les fluides d'infections.

Modulation de la réponse immunitaire

Ces résultats ont suscité l'étude de la cinétique de maturation de la proenképhaline lors de différents stress *i.e.* injection de lipopolysaccharides, lésion tégumentaire et chocs électriques au niveau du système nerveux chez les invertébrés (TASIEMSKI et SALZET, 1997, 1998). Les résultats ont montré une maturation du côté C-terminal (Fig. 3) avec libération dans le liquide coelomique dès les premières minutes qui suivent le stimulus, du peptide B sous forme active et de la Met-Enk (maximum à 15 minutes). Cette libération s'exerce dans les trois types de traitement. Cet effet est dose-dépendant.

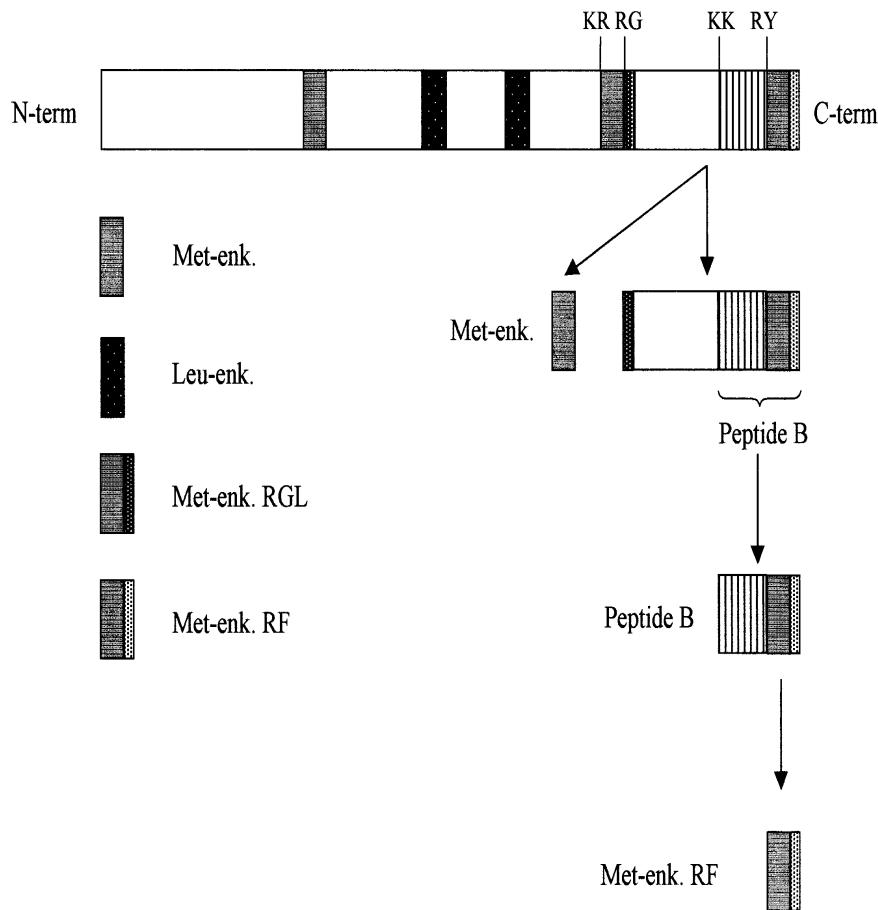


Figure 3

Schéma de maturation de la pro-énképhaline de la sangsue *Theromyzon tessulatum*.

Sous l'influence des LPS, la proenképhaline de sangsue subit une maturation dans les quinze premières minutes qui suivent la stimulation, pour libérer de la Met-enk ainsi qu'un fragment de 5,4 kDa renfermant le peptide B. Ce fragment est ensuite clivé pour libérer le peptide B. Le catabolisme de ce peptide antibactérien va alors assurer la formation de Met-enk.RF: peptide opioïde qui présente, tout comme la Met-enk., la faculté d'activer et de recruter les immunocytes de sangsue.

La maturation de la proenképhaline entraîne la libération de Met-Enk. Ce peptide opioïde est capable d'activer les cellules immunitaires d'invertébrés (STEFANO *et al.*, 1989, 1991a, 1996a) en agissant sur les récepteurs $\delta 2$ présents à la surface de ces cellules (STEFANO *et al.*, 1989). Il agit comme un signal chimiotactique qui assure, en plus de leur activation, le recrutement des cellules immunitaires. Ce mécanisme nécessite un certain laps de temps pendant lequel la protection antibactérienne est notamment assurée par le peptide B et son produit dérivé, l'enkélytine. La co-libération de peptide antibactérien et de Met-enk pourrait donc représenter une réponse neuroimmune unifiée face à une agression extérieure (Fig. 4). De la même façon, le peptide B de sangsue est ensuite clivé pour libérer la Met-enk arg phe, présente à son extrémité C-terminale. Le peptide B a une durée de vie relativement longue (d'au moins 4 heures) ce qui permet donc un apport étalé dans le temps de cet heptapeptide. La Met-enk arg phe assure l'activation des cellules immunitaires d'invertébrés et des granulocytes humains (STEFANO *et al.*, 1991b, 1999). Les cellules inactives et rondes deviennent amiboïdes et suivent le gradient de chémotaxie établi par la Met-enk arg phe. Le peptide B possède donc un double rôle dans la réponse immunitaire des invertébrés puisqu'il assure dans l'immédiat son action bactéricide puis son produit de dégradation permet le recrutement des cellules immunitaires (Fig. 4).

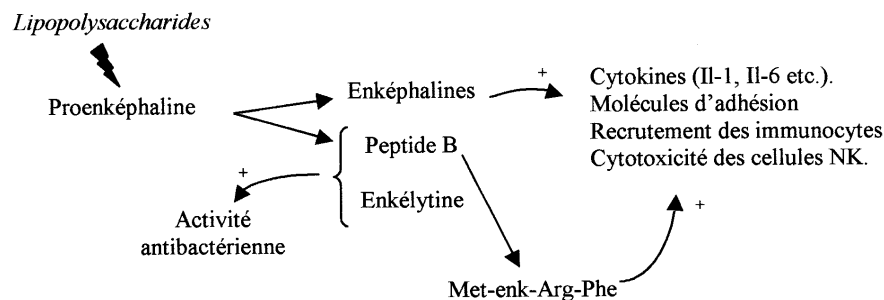


Figure 4

Schéma hypothétique de l'initiation de la réponse inflammatoire :
mécanismes de la réponse immunitaire innée.

Son clivage en Met-enk arg phe est dû à des métalloenzymes (la NEP et l'ACE), présentes à la fois au niveau de la membrane plasmique de cœlomocytes et dans le liquide cœlomique (SALZET et STEFANO, 1999, STEFANO et SALZET, 1999, LAURENT *et al.*, 1998). Ces deux enzymes sont connues pour être des peptidases mais pourraient également intervenir dans le processus de maturation de la pro-enképhaline en coopération avec des pro-hormones convertases de type PC1/PC3, enzymes récemment mises en évidence au niveau des leucocytes humains (LAMENDOLA *et al.*, 1997, JOHANNING *et al.*, 1998). Ces résultats nouveaux sont en accord avec ceux obtenus par ISAAC *et al.* (1998) chez l'insecte, montrant qu'*in vitro* l'ACE d'insecte peut cliver de longs peptides au niveau de sites dibasiques. De plus, cette enzyme est co-localisée avec des précurseurs de neuropeptides à la fois chez l'insecte (ISAAC *et al.*, 1998,

Modulation de la réponse immunitaire

SCHOOF *et al.*, 1998, VEELAERT *et al.*, 1999) et chez la sangsue (VANDEN-BULCKE *et al.*, 1997).

Ce processus semble généralisable à d'autres espèces. En effet, lors d'opérations à cœur ouvert, la proenképhaline est clivée pour libérer du peptide B, de l'enkelytine et de la Met-enk (TASIEMSKI et SALZET, 1997, 1998). On peut penser que cette maturation est assurée par les PC1/PC3 présentes au niveau des monocytes et des lymphocytes (LAMENDOLA *et al.*, 1997, JOHANNING *et al.*, 1998). La cinétique effectuée montre la libération immédiate de peptide B et d'enkelytine humaine et de la Met-enk après l'incision du patient. Si l'on corrèle ces résultats à ceux de NISSEN *et al.* (1997) montrant que les enképhalines sont présentes au niveau des macrophages tissulaires, on peut émettre l'hypothèse suivante : après l'incision, les cellules immunitaires libèreraient de la Met-enk et des peptides antibactériens issus de la proenképhaline. La Met-enk va activer et recruter des cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes. Pendant ce temps, ces peptides antibactériens vont agir comme première barrière face à une infection bactérienne potentielle. Le peptide B, présent également au niveau du sang humain, laisse supposer que tout comme celui de la sangsue, il sera clivé par la NEP afin de libérer la Met-enk arg phe. L'action de cette dernière sur les cellules immunitaires de vertébrés est semblable à celle de la Met-enk.

Les molécules dérivées de la proenképhaline peuvent par conséquent être considérées comme des molécules proinflammatoires lors d'une opération à cœur ouvert. Des travaux récents ont de plus montré que la Met-enk augmentait les taux d'ARN messagers codant pour l'Il-6 des macrophages péritonéaux de souris (ZHONG *et al.*, 1998). L'Il-6 est une cytokine proinflammatoire dont le taux augmente lors des opérations à cœur ouvert. Elle interviendrait entre autres dans la réaction systémique de phase aiguë lors de ce type d'opération. Le rôle de la Met-enk comme molécule proinflammatoire va plus loin car récemment STEFANO *et al.* (1999) ont montré que la Met-enk, en agissant au niveau des récepteurs $\delta 2$ présents à la surface de l'endothélium des veines saphènes augmente l'adhérence des granulocytes et donc favorise leur migration vers les tissus. Tous ces éléments tendent à montrer que la Met-enk est un initiateur de la réponse inflammatoire des malades opérés à cœur ouvert. De plus, l'action de la Met-enk arg phe est identique en tout point à celle de la Met-enk. ce qui implique que le peptide B par son clivage en Met-enk arg phe joue un rôle important dans l'entretien de la réaction inflammatoire.

Ces résultats permettent donc de supposer que certains mécanismes présents chez les invertébrés ont été conservés au cours de l'évolution jusqu'à l'homme. Ce type de recherche i.e. la compréhension fine de mécanismes de l'immunité chez les invertébrés applicables aux vertébrés est en plein essor. Les éléments majeurs de l'immunité chez les invertébrés reposent sur l'existence d'une panoplie de peptides antibactériens (LEMAITRE *et al.*, 1997, MEISTER *et al.*, 1997, HOFFMANN *et al.*, 1996). Ces mêmes peptides sont également présents chez les vertébrés *e.g.* défensine (NICOLAS *et al.*, 1992). La présence de ces molécules antimicrobiennes chez ces deux modèles a cependant plus qu'une signification vestigiale. Si l'on considère en effet qu'une bactérie se multiplie cinquante fois plus vite qu'une cellule B productrice d'anticorps et le fait que ces peptides diffusent plus vite et plus facilement qu'un anticorps, on se rend compte que ces molécules à coût faible et à spectre d'action étendu permettent une

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

réponse défensive dont la vitesse est très supérieure à la vitesse de multiplication des microorganismes (NICOLAS *et al.*, 1992). Ils paraissent donc bien adaptés pour offrir une première ligne de défense efficace contre les agents infectieux. Ce système de défense chimique offre de plus une possibilité de secours partiel en cas de défaillance momentanée ou prolongée du système immunitaire « classique » telle celle observée chez les patients immunodéprimés.

En conclusion, la compréhension des mécanismes de la réponse immunitaire chez les invertébrés paraît très informative pour l'étude de l'immunité innée chez les vertébrés. Ceci est appuyé par les travaux de MEDZHITOV *et al.* (1997) qui ont montré récemment chez l'homme l'existence d'un récepteur découvert au préalable chez les insectes : Toll (LEMAITRE *et al.*, 1997). Chez les invertébrés, l'activation de ce récepteur entraîne la synthèse de peptides antibactériens. Chez les vertébrés, il s'avère homologue au récepteur à l'interleukine 1 et entraîne une augmentation de l'expression de B 7.1, Il-6 et Il-8. Ces auteurs montrent que l'immunité innée a été préservée chez les vertébrés non seulement pour résister aux infections avant que l'immunité adaptative ne soit induite mais aussi pour produire des signaux qui vont informer le système immunitaire de la présence de pathogènes dans le milieu intérieur.

Les substances opiacées : inhibiteurs de la réponse inflammatoire

En ce qui concerne les opiacés, les études sur les propriétés pharmacologiques de la morphine et des molécules apparentées ont été pendant longtemps exclusivement consacrées aux effets des opiacés exogènes, famille de drogues analgésiques et anti-douleur. Toutefois nous savons que la morphine et les peptides opioïdes endogènes peuvent se fixer aux mêmes récepteurs (LORD *et al.*, 1977) et qu'il existe des opiacés endogènes dans différents tissus de vertébrés, y compris le système nerveux (DONNERER *et al.*, 1987). Les opiacés apparaissent comme des composés normaux du tissu nerveux de nombreux vertébrés et invertébrés (STEFANO *et al.*, 1989). L'intérêt s'est ainsi déplacé pour étudier les rôles possibles de ce nouveau groupe de messagers endogènes, dans les conditions physiologiques normales ou pathologiques (FRICCHIONE et STEFANO, 1994, STEFANO et SCHARRER, 1994a).

Bien que l'existence d'une morphine endogène suscite encore des désaccords, son existence au niveau du cerveau aurait été mise en évidence depuis plus de dix ans (GOLDSTEIN *et al.*, 1985). STEFANO *et al.* (1993) ont proposé la dopamine comme précurseur présumé de cette substance. Cette dernière pourrait provenir de certains neurones catécholaminergiques (STEFANO et SCHARRER, 1994a). Une voie possible de biosynthèse de la morphine pourrait impliquer la tyrosine qui génère la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline et également la morphine (Fig. 5). La synthèse de cette substance n'a pas encore été mise en évidence au niveau des cellules immunitaires. Par contre, le lien entre la morphine et la réaction inflammatoire a récemment pu être montré chez les invertébrés (SALZET et STEFANO, 1999). De plus, STEFANO *et al.* (1996a) ont déterminé une action inhibitrice de cet alcaloïde opiacé sur l'activité des immunocytes, la vélocité cellulaire et la phagocytose des immunocytes d'invertébrés et de mammifères (Tableau 2). Il augmente également la présence de la NEP et de l'ACE sur les granulocytes (SALZET *et al.*, 1997b), inhibe l'expression de certains marqueurs

Modulation de la réponse immunitaire

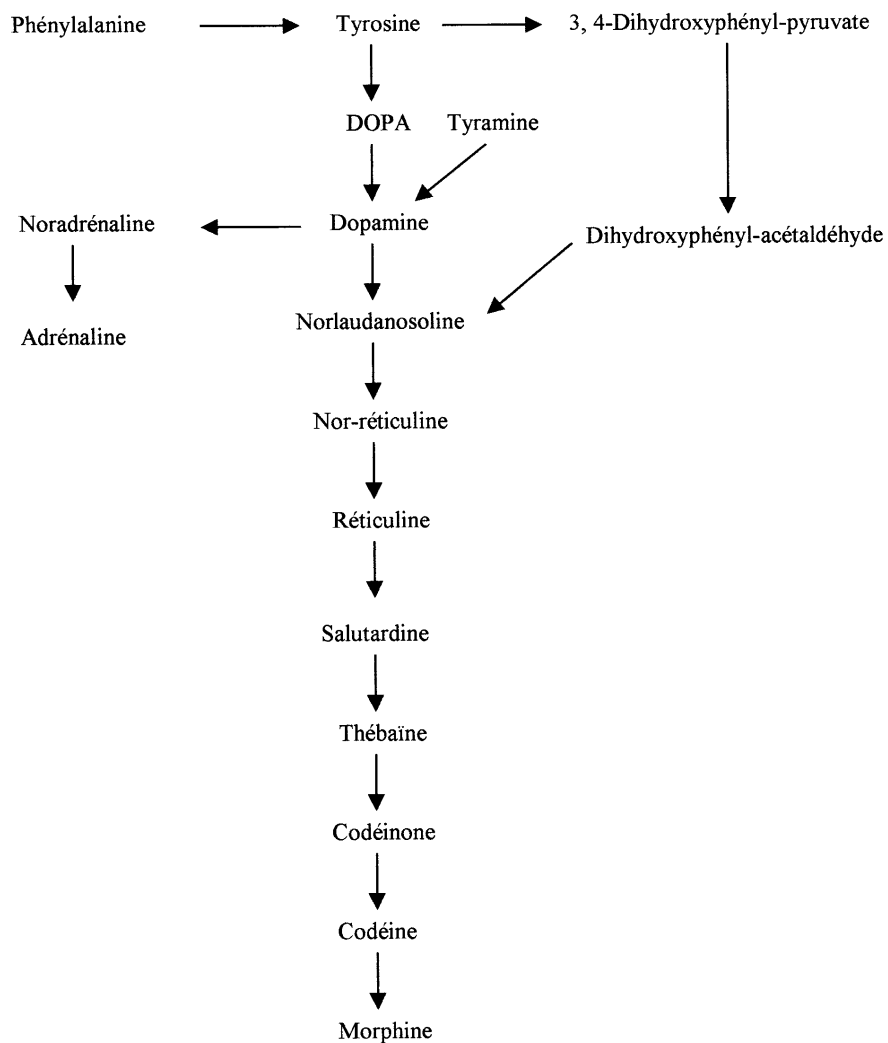


Figure 5

Voie de biosynthèse théorique de la morphine.

STEFANO *et al.* (1993) ont proposé la dopamine comme précurseur présumé de la morphine endogène, qui pourrait provenir de certains neurones catécholaminergiques.

antigéniques sur les lymphocytes CD4 et CD8 et augmente la sécrétion de corticotropin releasing hormone (CRH) (STEFANO *et al.*, 1994b, 1996a), d'ACTH et d' α -MSH (SALZET *et al.*, 1997b). Son action au niveau des immunocytes s'effectue par un nouveau sous-type de récepteur à la morphine : $\mu 3$ (STEFANO *et al.*, 1993, 1996a, DOBRENIS *et al.*, 1995, MAKMAN *et al.*, 1994) liant des alcaloïdes opiacés et insensible aux peptides opioïdes. Il est présent au niveau des immunocytes d'invertébrés, des granulocytes humains (STEFANO *et al.*, 1996c) et de l'endothélium des vaisseaux sanguins humains (STEFANO *et al.*, 1998a). Le récepteur $\mu 3$ dérive d'un épissage alternatif du récepteur $\mu 1$ (FIMIANI *et al.*, 1999). Il est couplé à la libération du calcium interne (Fig. 6) qui active la production du monoxyde d'azote (NO) aussi bien chez les invertébrés (STEFANO *et al.*, 1996c, NIETO-FERNANDEZ *et al.*, 1999) que chez l'homme (FIMIANI *et al.*, 1999, STEFANO *et al.*, 1998c). Le NO bloque lui-même sa production par les NO synthétases inducibles (iNOS) au niveau des cellules immunitaires (cellules gliales et cœlomocytes) *via* une action directe sur l'adénylate cyclase se traduisant ainsi par une inhibition du taux d'AMPC (STEFANO *et al.*, 1998d, FIMIANI *et al.*, sous presse).

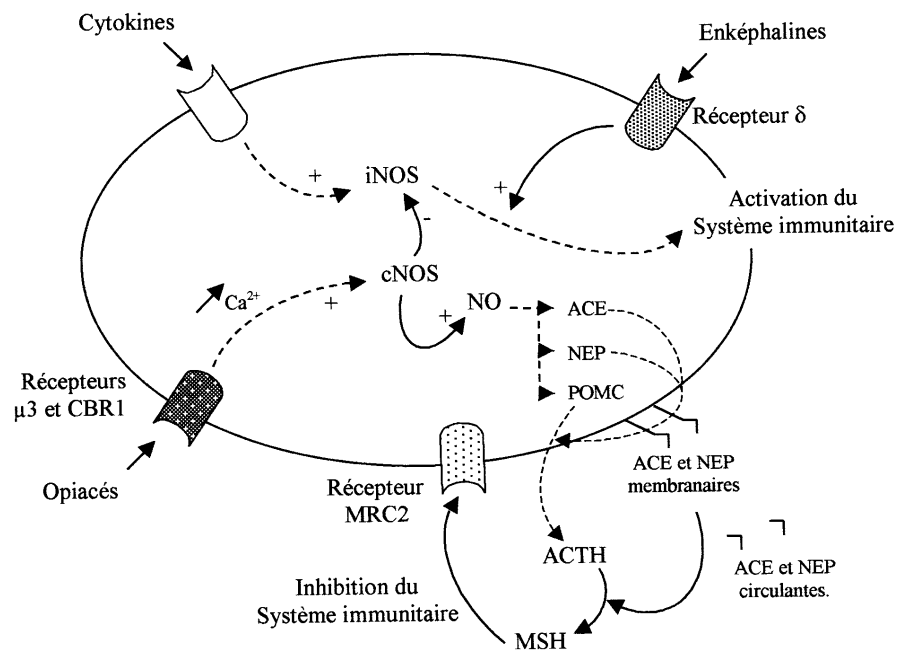


Figure 6

Modulations impliquées dans les processus moléculaires d'une cellule immunitaire :
voie activatrice et voie inhibitrice.

Modulation de la réponse immunitaire

À côté de cet alcaloïde que certains supposent endogène (la morphine), un cannabinoïde endogène a pu être mis en évidence au niveau des systèmes nerveux (STEFANO *et al.*, 1997) et immunitaire des invertébrés comme des mammifères (STEFANO *et al.*, 1996a). L'utilisation de ligands radio-marqués et de la RT-PCR a permis de cloner chez la sangsue le cDNA codant un récepteur aux cannabinoïdes (STEFANO *et al.*, 1997) et possédant 60% d'identité avec le CB1 humain (MATSUDA *et al.*, 1990). L'utilisation d'anticorps spécifiques des différents sous-types de récepteur CB (CB1, CB1a et CB2) et du ligand spécifique (l'anandamide) chez les invertébrés confirme l'origine très ancienne des cannabinoïdes (STEFANO *et al.*, 1997, 1998e). De plus, la mise en évidence de ce système au niveau des cellules immunitaires (cellules gliales et immunocytes) d'invertébrés confirme les récents travaux réalisés par KLEIN (1997) sur les macrophages humains et ceux de BILFINGER *et al.* (1998) au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Comme pour le récepteur μ_3 , CB1 est couplé à la libération du monoxyde d'azote via la NO synthétase constitutive (cNOs) après libération du calcium interne (MATTOCKS *et al.*, 1997).

En conclusion, l'ensemble de ces travaux met en évidence l'existence d'un rétrocontrôle du système immunitaire par les opiacés. Leurs effets au niveau du système immunitaire engendrent une inhibition des réactions inflammatoires déclenchées par un stress (Tableau 2) et impliquent un autre précurseur d'opioïde : la POMC (STEFANO *et al.*, 1996a, SALZET *et al.*, 1997b). La maturation de ce dernier conduit à la libération de l'ACTH (1-39) qui est ensuite clivée en ACTH(1-13) par la NEP et l'ACE (Fig. 6). L' α -MSH (ACTH(1-13)) se fixe ensuite sur son récepteur (MC-R2) et conduit à une inhibition de la réponse immunitaire (LIPTON et CATANIA, 1997). Cette voie de la modulation par les opiacés du système immunitaire peut être un moyen de contrôle efficace contre l'emballement de la réaction inflammatoire chez l'homme. Son étude chez les invertébrés présente deux intérêts indéniables. Le premier est lié au fait que certains parasites (endo- ou exo-parasites) utilisent cette panoplie de molécules comme leurres pour le système immunitaire de l'hôte (ACTH, MSH, opiacés) (SALZET et STEFANO, 1999 ; DUVAUX-MIRET *et al.*, 1992). L'étude de la relation hôte-parasite via le détournement du système immunitaire de l'hôte par ces opiacés s'avère une voie d'étude fructueuse. Le deuxième est phylogénétique. En effet, les Annélides sont les premiers cœlomates et la mise en évidence d'un tel mécanisme de contrôle du système immunitaire par des messagers hormonaux chez des êtres dits « primitifs » apporte un éclairage nouveau sur l'évolution de ce système. Ceci est d'autant plus vrai qu'il s'y ajoute un rétrocontrôle par les messagers du système immunitaire. En effet, les cytokines (Interleukines, TNF) et des molécules de la superfamille des immunoglobulines (isolées chez les mollusques et les insectes) sont tout autant conservées au cours de l'évolution (BECK et HABICHT, 1996) que les neurotransmetteurs et les neurohormones.

Ainsi chez des animaux « primitifs » pouvant vivre une ou plusieurs années comme *Hirudo medicinalis*, le système immunitaire apparaît plus complexe et plus évolué qu'on ne le supposait. La communication entre les deux systèmes apparaît comme la clef de voûte de la co-évolution des systèmes endocrinien et immunitaire, des invertébrés les plus primitifs jusqu'à l'homme.

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, UPRES A 8017, SN3,
 Université des Sciences et Technologies de Lille
 59650 Villeneuve d'Ascq, France.

Correspondance : Professeur Michel Salzet,
 Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, UPRES A 8017 CNRS, SN3,
 Université des Sciences et Technologies de Lille,
 59650 Villeneuve d'Ascq. Tel : 33 3 2043 6839,
 Fax : 33 3 2004 1130, e-mail : salzet@pop.univ-lille1.fr

RÉFÉRENCES

- BECK, G. & HABICHT, G.S. (1996).- Immunity and the Invertebrates. *Sci. Am.*, **275** (5), 60-66.
- BILFINGER, T.V., SALZET, M., FIMIANI, C., DEUTSCH, D., TRAMU, G. & STEFANO, G.B. (1998).- Pharmacological evidence for anandamide amidase in human cardiac and vascular tissues. *Int. J. Cardiol.*, **64** (suppl 1), S15-S22.
- BLALOCK, J.E. & SMITH, E.M. (1985).- A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine systems. *Fed. Proc.*, **44** (1pt1), 108-111.
- DANTZER, R. (1994).- Neurotropic effects of cytokines : at the limits of immunology and neurobiology. *Pathol. Biol.*, **42** (9), 826-829.
- DOBRENIS, K., MAKMAN, M.H. & STEFANO, G.B. (1995).- Occurrence of the opiate alkaloid-selective mu3 receptor in mammalian microglia, astrocytes and kupffer cells. *Brain Res.*, **686**, 239-248.
- DONNERER, J., CARDINALE, G., COFFEY, J., LISEK, C.A., JARDINE, I. & SPECTOR, S. (1987).- Chemical characterization and regulation of endogenous morphine and codeine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **242**, 583-587.
- DUVAUX-MIRET, O., STEFANO, G.B., SMITH, E.M., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1992).- Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 778-781.
- ELMQUIST, J.K., SCAMMEL, T.E. & SAPER, C.B. (1997).- Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci.*, **20** (12), 565-570.
- FIMIANI, C., ARCURI, E., SANTONI, A., RIALAS, C.M., BILFINGER, T.V., PETER, D., SALZET, B. & STEFANO, G.B. (1999).- MU3 opiate receptor expression in lung and lung carcinoma: ligand binding and coupling to nitric oxide release. *Cancer Lett.*, **146**, 45-51.
- FIMIANI, C., CAVANI, F., WELTER, I., SALZET, M., BILFINGER, T.V. & STEFANO, G.B. (sous presse).- Antagonism of LPS and IFN- γ induced iNOS expression in human atrial endothelia by morphine and anandamide coupling to cNOS. *Anal. Anesthetics*.
- FRICCHIONE, G.L. & STEFANO, G.B. (1994).- The stress response and autoimmunoregulation. *Adv. Neuroimmunology*, **4**, 13-28.
- GOLDSTEIN, A., BARRETT, R.W., JAMES, I.F., LOWNEY, L.I., WEITZ, C.J., KNIPMEYER, L.L. & RAPOPORT, H. (1985).- Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** (15), 5203-7.
- GOUMON, Y., STRUB, J.M., MONIATTE, M., NULLANS, G., POTEUR, L., HUBERT, P., VAN DORSSELAER, A., AUNIS, D. & METZ-BOUTIGUE, M.H. (1996).- The C-terminal biophosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *Eur. J. Biochem.*, **235**, 516-525.

Modulation de la réponse immunitaire

- GOUMON, Y., LUGARDON, K., KIEFFERS, B., LEFEVRE, J.F., VAN DOSSELAER, A., AUNIS, D. & METZ-BOUTIGUE, M.H. (1998).- Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluid. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29847-29856.
- HANSEN, M.K., TAISHI, P., CHEN, Z. & KRUEGER, J.M. (1998).- Vagotomy blocks the induction of interleukin-1b (IL-1b) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1b. *J. Neuroscience*, **18** (6), 2247-2253.
- HARRISON, L.M., KASTIN, A.J., WEBER, J.T., BANKS, W.A., HURLEY, D.L. & ZADINA, J.E. (1994).- The opiate system in Invertebrates. *Peptides*, **15** (7), 1309-1329.
- HOFFMANN, J.A., REICHART, J.M., HETRU, C. (1996).- Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 8-13.
- ISAAC, R., SCHOOF, L., WILLIAMS, T.A., VEELAERT, D., SAJID, M., CORVOL, P. & COATES, D. (1998).- A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme): the hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. *Biochem. J.*, **330**, 61-65.
- JOHANNING, K., JULIANO, M.A., JULIANO, L., LAZURE, C., LAMANGO, N.S., STEINER, D.F. & LINDBERG, I.J. (1998).- Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates. *J. Biol. Chem.*, **273** (35), 22672-22680.
- KAMPHUIS, S., ERIKSSON, F., KAVELAARS, A., ZIJLSTRA, J., VAN de POL, M., KUIS, W. & HEIJNEN, C.J. (1998).- Role of endogenous pro-enkephalin a derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production. *J. Neuroimmunol.*, **84** (1), 53-60.
- KLEIN, J. (1997).- Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist? *Scand. J. Immunol.*, **46**, 558-564.
- KLEIN, T.W. (1998).- Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol. Today*, **19** (8), 373-381.
- KOWALSKI, J. (1998).- Immunologic action of [Met5]enkephalin fragments. *Eur. J. Pharmacol.*, **347**, 95-99.
- LAMENDOLA, J., MARTIN, S.K. & STEINER, D.F. (1997).- Expression of PC3, carboxypeptidase E and enkephalin in human monocyte-derived macrophages as a tool for genetic studies. *FEBS Lett.*, **404** (1), 19-22.
- LAURENT, V., STEFANO, G.B. & SALZET, M. (1998).- Leech angiotensin converting enzyme. *Trends in Comparat. Endocrinol. and Neurobiol.*, **839**, 501-503.
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHART, J.M. & HOFFMANN, J.A. (1997).- The dorsal regulator gene cassette spätzle/Toll.cactus controls potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**, 973-983.
- LIPTON, J.M. & CATANIA, A. (1997).- Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator α -MSH. *Immunol. Today*, **40**, 140-145.
- LORD, J.A.H., WATERFIELD, A.A., HUGHES, J. & KOSTERLITZ, H.W. (1977).- Endogenous opioid peptides: Multiple agonists and receptors. *Nature*, **267**, 495-499.
- MAIER, S.F., WATKINS, L.R. & FLESHNER, M. (1994).- Psychoneuroimmunology. The interface between behavior, brain, and immunity. *Am. Psychol.*, **49** (12), 1004-1017.
- MAKMAN, M.H. (1994).- Morphine receptors in immunocytes and neurons. *Adv. Neuroimmunol.*, **4**, 69-82.
- MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C. & BONNER, T.I. (1990).- Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**, 561-564.
- MATTOCKS, D., SALZET, M., SALZET, B. & STEFANO, G.B. (1997).- Anandamide-induced conformational changes in leech and mussel immunocytes are mediated by nitric oxide. *Animal Biol.*, **6**, 73-77.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HULBURT, P. & JANEWAY, C.A. (1997).- A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**, 394-397.

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

- MEISTER, M., LEMAITRE, B. & HOFFMANN, J. (1997).- Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays*, **19**, 1019-1026.
- MERRILL, J.E. & BENVENISTE, E.N. (1996).- Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci.*, **19** (8), 331-338.
- NICOLAS, P., MOR, A. & DELFOUR, A. (1992).- Les peptides de la défense antimicrobienne des vertébrés. *Med. Sci.*, **5**, 423-431.
- NIETO-FERNANDEZ, F.E., MATTOKS, D., CAVANI, F., SALZET, M. & STEFANO, G.B. (1999).- Morphine coupling to invertebrate immunocyte Nitric oxide release is dependant on intracellular calcium transients. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **123**, 295-9.
- NISSSEN, J.B., LUND, M., STENGAARD-PEDERSEN, K. & KRAGBALLE, K. (1997).- Enkephalin-like immunoreactivity in human skin is found selectively in a fraction of CD68-positive dermal cells : increase in enkephalin-positive cells in lesional psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.*, **289** (5), 265-271.
- OTTAVIANI, E. & FRANCESCHI, C. (1996).- The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog. in Neurobiol.*, **48**, 421-440.
- PADROS, M.R., VINDROLA, O., ZUNSZAIN, P., FAINBOIN, L., FINKIELMAN & NAHMOD, V.E. (1989).- Mitogenic activation of the human lymphocytes induces the release of proenkephalin derived peptides. *Life Sci.*, **45**, 1805-1811.
- PATEY, G. & ROSSIER, J. (1986).- Découverte, anatomie et biosynthèse des différentes familles de peptides opioïdes endogènes. *Ann. Endocrinol.*, **47**, 71-87.
- SALZET, M., & STEFANO, G.B. (1997a).- Invertebrate proenkephalin: Delta opioid binding sites in leech ganglia and immunocytes. *Brain Res.*, **768**, 232-242.
- SALZET, M., SALZET, B., COCQUERELLE, C., VERGER-BOCQUET, M., PRYOR, S., LAURENT, V. & STEFANO, G.B. (1997b).- Biochemical and molecular characterization of ACTH, its precursor and receptor in the leech *Theromyzon tessulatum* : morphine increases ACTH levels. *J. Immunol.*, **159**, 5400-5411.
- SALZET, M. & STEFANO, G.B. (1999).- Evidence for an invertebrate neuroendocrine system : neuropeptide processing in leech-host communication. *Trends in Comparat. Biochem. and Physiol.*, **5**, 85-98.
- SCHARRER, B. & STEFANO, G.B. (1994).- Neuropeptides and autoregulatory immune processes. In: *Neuropeptides and immunoregulation*, eds. B. Scharrer, E.M. Smith and G.B. Stefano ; pp.1-18. Springer-Verlag.
- SCHOOF, L., VEELAERT, D., DE LOOF, A., HUYBRECHTS, R. & ISAAC, R.E. (1998).- Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects. *Brain Res.*, **785**, 215-227.
- SEIZINGER, B.R., LIEBISH, D.C., GRAMSCH, C., HERZ, A., WEBER, E., EVANS, C.J., ESCH, F.S. & BOHLEN, P. (1985).- Isolation and structure of a novel C-terminally amidated opioid peptide, amidorphin, from bovine adrenal medulla. *Nature*, **313**, 57-59.
- SHIPP, M.A., STEFANO, G.B., D'ADAMIO, L., SWITZER, S.N., HOWARD, F.D., SINISTERRA, J., SCHARRER, B. & REINHERZ, E. (1990).- Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/ neutral endopeptidase. *Nature*, **247**, 394-396.
- SIZEMORE, R.C., DIENGLIEWICZ, R.L., PECUNIA, E. & GOTTLIED, A.A. (1991).- Modulation of concanavalin A induced antigen-non specific regulatory cell activity by leu-enkephalin and related peptides. *Clin. Immunol. Immunop.*, **60**, 310-318.
- SMITH, E.M., HUGHES, T.K., HASHEMI, F. & STEFANO, G.B. (1992).- Immunosuppressive effects of ACTH and MSH and their possible significance in human immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 782-786.
- SMITH, E.M. (1997).- Hormonal activities of cytokines. *Neuroimmunoendocrinology*, **69**, 185-202.
- STEFANO, G.B., CADET, P. & SCHARRER, B. (1989).- Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: Evidence for a subtype of delta receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6307-6311.

Modulation de la réponse immunitaire

- STEFANO, G.B., SMITH, E.R., & HUGHES, T.K. (1991a).- Opioid induction of immunoreactive interleukin-1 in *Mytilus edulis* and human immunocytes : and interleukin-1-like substance in invertebrate neural tissue. *J. Neuroimmunol.*, **32**, 29-34.
- STEFANO, G.B., SHIPP, M.A. & SCHARRER, B. (1991b).- A Possible Immunoregulatory Function for Met.-Enkephalin-Arg6-Phe7 Involving Human and Invertebrate Granulocytes. *J. Neuroimmunol.*, **31**, 97-103.
- STEFANO, G.B., DIGENIS, A., SPECTOR, S., LEUNG, M.K., BILFINGER, T.V., MAKMAN, M.H., SCHARRER, B. & ABUMRAD, N.N. (1993).- Opiate-like substances in an invertebrate, a novel opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11099-11103.
- STEFANO, G.B. & SCHARRER, B. (1994a).- Endogenous morphine and related opiates, a new class of chemical messengers. *Adv. Neuroimmunol.*, **4**, 57-68.
- STEFANO, G.B., KUSHNERIK, V., RODRIQUEZ, M., & BILFINGER, T.V. (1994b).- Inhibitory effect of morphine on granulocyte stimulation by tumor necrosis factor and substance P. *Int. J. Immunopharm.*, **16**, 329-334.
- STEFANO, G.B., SCHARRER, B., SMITH, E.M., HUGHES, T.K., MAGAZINE, H.I., BILFINGER, T.V., HARTMAN, A., FRICCHIONE, G.L., LIU, Y. & MAKMAN, M.H. (1996a).- Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit. Rev. In Immunol.*, **16**, 109-144.
- STEFANO, G.B., SCHARRER, B., BILFINGER, T.V., SALZET, M. & FRICCHIONE, G.L. (1996b).- A novel view of opiate tolerance. *Adv. Neuroimmunol.*, **6**, 265-277.
- STEFANO, G.B., LIU, Y. & GOLIGORSKY, M.S. (1996c).- Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J. Biol. Chem.*, **271** (32), 19238-19242.
- STEFANO, G.B., SALZET-RAVEILLON, B. & SALZET, M. (1997).- Leech CNS Cannabinoid receptor is coupled to nitric oxide release : high sequence homology with mammals. *Brain Res.*, **753**, 219-224.
- STEFANO, G.B., SALZET, M., HUGUES, T.K. & BILFINGER, T.V. (1998a).- Delta2 opioid receptor subtype on human vascular endothelium uncouples morphine stimulated nitric oxide release. *Int. J. Cardiol.*, **64** (suppl 1), S43-S51.
- STEFANO, G.B., SALZET, B & FRICCHIONE, G. (1998b).- Enkelytin and Opioid Peptide Association in Invertebrates and Vertebrates : Immune Activation and Pain. *Immunol. Today*, **19**, 243-289.
- STEFANO, G.B., SALZET, M., RIALAS, C.M., MATTOCKS, D., FIMIANI, C. & BIFINGER, T.V. (1998c).- Macrophage behavior associated with acute and chronic to HIV GP120, Morphine and Anandamide : Endothelial implications. *Int. J. Cardiol.*, **64** (suppl 1), S3-S13.
- STEFANO, G.B., SALZET, M., MAGAZINE, H. & BILFINGER, T.V. (1998d).- Anandamide or morphine stimulate saphenous vein endothelium cNOs nitric oxide release which downregulates LPS and IFN- γ INOs by inhibiting acenylate cyclase. *J. Cardiol. Pharmacol.*, **31** (6), 813-820.
- STEFANO, G.B., RIALAS, C.M., DEUTSCH, D.G. & SALZET, M. (1998e).- Anandamide amidase inhibition enhances anandamide-stimulated nitric oxide release in invertebrate neural tissues. *Brain Res.*, **793** (2), 341-345.
- STEFANO, G.B. & SALZET, M. (1999).- Invertebrate opioid precursors : Evolutionary conservation and the significance of enzymatic processing. *Intern. Rev. Cytol.*, **187**, 261-86.
- STEFANO, G.B., SONETTI, D. & SALZET, M. (1999²).- Methionine enkephalin may serve as a proinflammatory signal molecule : evidence in Invertebrate Immune Processes. Ed. Roubos, E., Bonga, N., Vaudry, R. and De Loof, A., in *Recent Developments in comparative endocrinology and neurobiology*. Shaker Publishing, Amsterdam, The Netherlands, 329-334.
- TASIEWSKI, A. & SALZET, M.- Peptide antibactérien issu de la maturation de la proenképhaline de sangsue, l'enkélytine. *1ère journée de LARC, Rouen* (oct. 1997).
- TASIEWSKI, A. & SALZET, M.- Peptide antibactérien issu de la maturation de la proenképhaline de sangsue, l'enkélytine : application à l'homme. *Colloque d'immunologie des Invertébrés*, Brest (mars 1998).

Bulletin de la Société zoologique de France 124 (4)

- TURNER, A., LEUNG, M.K., & STEFANO, G.B. (1994).- Peptidases of significance in neuroimmunoregulation in *Neuropeptides in Neuroimmunology*. Scharrer B., Smith E.M. and Stefano G.B. eds, Springer-Verlag ; pp. 152-169.
- VANDENBULCKE, F., LAURENT, V., VERGER-BOCQUET, M., STEFANO, G.B. & SALZET, M. (1997).- The leech angiotensin-converting-like enzymes : cellular localization and biochemical identifications of a membranar and a soluble forms. *Mol. Brain. Res.*, **49**, 229-237.
- VEELAERT, D., SCHOofs, L., MACOURS, N., VANDINGENEN, A., DE LOOF, A., ISAAC, R.E., SALZET, M. & HUYBRECHT, R. (1999).- Immunocytochemical distribution of angiotensin-I converting enzyme in the central nervous system of Insects and speculations abouts its possible function. *Eur. J. Entomol.*, **96**, 323-326.
- WEIGENT, D.A. & BLALOCK, J.E. (1997).- Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. *Neuroimmunoendocrinology*, **69**, 1-30.
- WEIHE, E., ZIMMERMANN, M., WIESENFELD-HALLIN, Z. & WESTERMANN, R. (1998).- Neuropeptides for neuroimmune, endocrine, developmental and pain control : new ligands, new receptors and the 'knock out connection'. 7th annual meeting of the European Neuropeptide club (ENC), May 21-24, 1997, Marburg, Germany. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **106**, 89-91.
- ZHONG, F., LIU, X.Y., YANG, S.L., STEFANO, G.B., FIMIANI, C. & BILFINGER, T.V. (1998).- Methionine-enkephalin stimulates interleukin 6 mRNA expression human plasma levels in coronary artery by-pass grafting. *Int. J. Cardiol.*, **64** (1), S53-S59.

(reçu le 18/12/98 ; accepté le 26/01/99)