

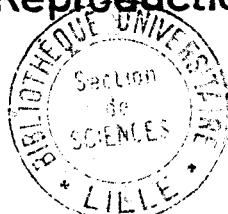
THESE

présentée par

Mauricette DEPRET

pour obtenir

le Diplôme de Doctorat de III^{ème} Cycle
de Biologie de la Reproduction et du Développement



RECHERCHES BIOCHIMIQUES ET BIOLOGIQUES SUR
LES GONADES ET LE SANG DE DEUX MOLLUSQUES

CEPHALOPODES : *SEPIA OFFICINALIS*

ET *LOLIGO VULGARIS*

soutenue le 13 Décembre 1979
devant la commission d'examen

MM	M. DURCHON	Président
	M. PORCHET	Rapporteur
	A. RICHARD	} Examineurs
	A. DHAINAUT	

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION page 1

MATERIEL ET METHODES

I . <u>Le matériel biologique</u>	2
A . Méthodes d'observation	
B . Cultures	
II . <u>Les techniques biochimiques de préparation</u>	
<u>du matériel</u>	4
A . Fractionnement	
B . Fractionnement par chromatographie sur gel	
III . <u>Les techniques biochimiques d'analyses</u>	6
A . Les analyses colorimétriques	
B . La chromatographie en phase gazeuse	
IV . <u>Les techniques de radioactivité</u>	9

Chapitre I : ETUDE CYTOLOGIQUE ET CYTOCHIMIQUE DE L'OVAIRE

I . <u>Cytologie</u>	11
A . Ovogonie (Stade I)	
B . Ovocyte primaire	
II . <u>Cytochimie</u>	14

Chapitre II : ETUDE BIOCHIMIQUE DES GONADES ET DU SANG

I . <u>Analyse biochimique du vitellus</u>	18
A . Préparation du matériel	
B . Dosage colorimétrique	
C . Dosages par la chromatographie en phase gazeuse	

II . <u>Etude biochimique des gonades jeunes (femelles)</u>	27
A . Préparation du matériel	
B . Dosages colorimétriques	
C . Dosages par chromatographie en phase gazeuse	
III . <u>Les différents tissus, les différents genres</u>	35
A . Testicule de Seiche (<i>sepia officinalis</i>)	
B . Testicule et ovaire de Calmar (<i>loligo vulgaris</i>)	
C . Le sang	
IV . <u>Le sang chez les mâles et chez les femelles</u>	42
A . Fractionnement du sang	
B . Dosages	
C . Fractionnement des fractions "surnageants" par chromatographie sur gel de Sephadex et dosages des sous-fractions	
<u>Conclusion</u>	49

Chapitre III : ETUDE *IN VITRO* DE L'ACTION DE L'HORMONE GONADOTROPE

I . <u>Recherches sur la mise au point d'un milieu de culture</u>	55
A . Données antérieures	
B . Investigations personnelles	
II . <u>Mesures de l'action de l'hormone gonadotrope</u>	57
A . Résultats antérieurs	
B . Résultats expérimentaux	

<u>RESUME ET CONCLUSION</u>	60
-----------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La complexité des corrélations hormonales découvertes en 1959 par WELLS et WELLS chez *Octopus* ouvrait un nouveau domaine dans celui de l'endocrinologie des Invertébrés.

Chez les Céphalopodes, O'DOR et WELLS (1973, 1974) ont montré par l'incorporation de ^{14}C -leucine que les protéines du vitellus sont synthétisées directement par l'ovaire. Ce processus de vitellogenèse est très différent de celui des Arthropodes et des Vertébrés, où les protéines ovariennes sont synthétisées en majeure partie hors de la gonade et n'y parviennent que par l'intermédiaire du courant sanguin. Il est connu d'autre part que chez les Céphalopodes, les processus de gamétogenèse sont soumis à un contrôle endocrine faisant intervenir notamment les glandes optiques (WELLS et WELLS, 1959, 1975 ; DURCHON et RICHARD, 1967 ; RICHARD 1971 b). Cependant les modalités du contrôle hormonal posent encore de nombreux problèmes liés à la complexité de l'évolution des organes-cibles (glandes génitales) dans les conditions naturelles. Pour tenter d'établir une corrélation entre les phénomènes sécrétoires et les différentes phases de l'ovogenèse nous nous sommes donc proposés :

- dans un premier temps de faire une étude cytologique et cytochimique pour essayer de mettre en évidence des composés caractéristiques de l'ovocyte en cours de prévitellogenèse et vitellogenèse ;
- puis, dans un second temps, d'étudier plus particulièrement ces constituants, d'un point de vue biochimique ;
- enfin, dans un troisième temps, de mettre à profit ces résultats pour trouver un test biologique de l'hormone gonadotrope. Cette troisième étape exigeait la recherche de la mise au point d'un milieu de culture pour une étude *in vitro*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE

A - METHODES D'OBSERVATION

B - CULTURES

II - LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES DE PREPARATION DU MATERIEL

A - FRACTIONNEMENT

1) précipitation par l'alcool

2) précipitation saline

B - FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR GEL

III - LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES D'ANALYSES

A - LES ANALYSES COLORIMETRIQUES

1) principe

2) les dosages

a - méthode à l'orcinol

b - méthode au carbazol

c - méthode d'ELSON et MORGAN (modifiée)

d - méthode de Lowry

B - LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

1) principe

2) protocole expérimental

3) caractéristiques de l'appareil utilisé

IV - LES TECHNIQUES DE RADIOACTIVITE

1) principe

2) moyens de détection de la radioactivité

3) protocoles expérimentaux

MATERIEL et METHODES

I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE

La Seiche est très commune dans la Manche entre le mois d'avril et le mois de juillet. C'est pendant cette période que les Seiches adultes sont récoltées par chalutage. Pendant la saison froide elles disparaissent de nos côtes pour gagner des eaux plus chaudes.

Ces migrations nécessitent, pour disposer en permanence de matériel vivant, de réaliser des élevages de Seiches au laboratoire.

Nous avons bénéficié pour cela, de l'expérience de RICHARD (1966, 1967, 1968, 1971 a, 1971 b) qui a réalisé au laboratoire de Wimereux l'installation nécessaire à ces élevages. Les pontes récoltées par chalutage ou émises par des Seiches en captivité, sont déposées dans des aquariums en eau de mer courante, brassée par de l'air comprimé. Après une incubation pouvant varier selon la température de l'eau, des petites Seiches de 7 mm environ, éclosent. Elles s'enfoncent alors dans la couche de sable prévue à cet effet.

Nous avons ainsi pu travailler sur divers stades d'évolution.

A - METHODES D'OBSERVATION

Les gonades d'animaux d'âges différents sont prélevées sur le vivant et aussitôt fixées au Bouin Hollande. Après passages dans l'alcool butylique, le toluène, et inclusions à la paraffine, les coupes (5 μ) sont traitées par diverses méthodes cytologiques : Cleveland-Wolf, hémalum de Masson, et cytochimiques : Ninhydrine - Schiff (pour les groupements -NH₂ des protéines), P.A.S. (pour les polysaccharides neutres), bleu alcian (polysaccharides acides), bleu de toluidine pH 4,6 (acides nucléiques) et Fuchsine d'Altmann (lipides).

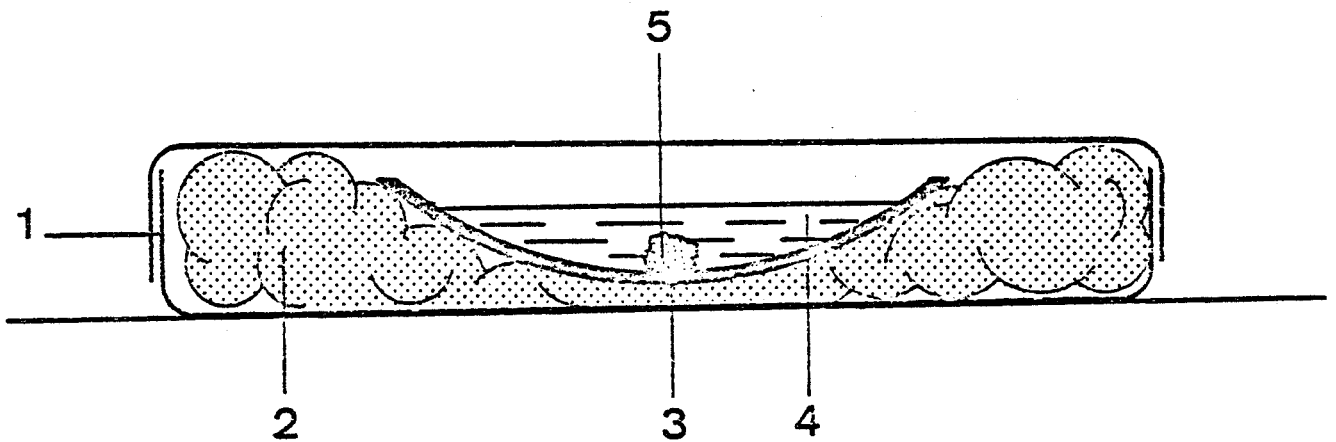
Les observations au microscope sont faites en contraste de phase sur un appareil Leitz orthomat.

B - CULTURES

Nous avons testé des milieux de culture cellulaire liquides pour nos fragments d'organes. Toutes les manipulations (dissections, prélèvements d'organes) sont réalisées près d'un bec Bunsen dans une stalle stérile sous U.V., les organes prélevés sont aussitôt plongés dans de l'eau de mer stérile pendant 15 minutes puis aseptisés ou non pendant 10 à 15 minutes dans une solution d'antibiotiques dont la composition est la suivante, adaptée de QUIOT (1975) et COUSSERANS (1975) :

FIGURE A : Schéma du dispositif de culture.

- 1-boîte de Pétri
- 2-coton hydrophile
- 3-verre de montre
- 4-milieu de culture liquide
- 5-explant



chloramphenicol	:	20 mg
Streptomycine	:	100 mg
Polymyxine	:	2 mg
Pénicilline	:	100 000 UI
Mycostatine	:	5 mg (facultatif)
Eau de mer	:	100 ml

Les gonades ainsi prélevées sont ensuite découpées à l'aide de ciseaux de Pachev en petits fragments et placés dans les divers milieux de culture.

Les contenants utilisés furent à la fois :

- le verre de montre à l'intérieur d'une boîte de Pétri (figure A)
- la boîte Falcon.

Les milieux de culture testés ont été les suivants (BLOOM-OLIN, 1977) :

- l'eau de mer,
- le Tc medium Eagle BS5 (Difco) dissout dans l'eau de mer,
- le MEM (Eurobio) avec 2,65 g NaCl/100 ml pour ajuster le milieu selon NECCO et MARTIN (1963),
- le Tc 199 (Difco) dissout dans l'eau de mer,
- Milieu X de COUSSERANS (1975) composé selon le principe de standardisation des milieux de culture pour Invertébrés (VAGO et QUIOT, 1969) :

Fraction A :	solution organique du Tc 199 x 5 (Eurobio)	40 ml
Fraction B :	Antibiotiques et antifongiques	
	(non obligatoire)	
	Pénicilline	12 mg/100 ml
	Streptomycine	5mg / 100 ml
	Mycostatine	2 mg/100 ml
Fraction C :	sérum de veau foetal	10 ml
Fraction D :	Eau de mer ultrafiltrée	100 ml
Fraction E :	Hydrolysate de lactalbumine	500 mg
	Glucose	100 mg
Indicateur de pH :	rouge de phénol	2 mg/100 ml

Chez la Seiche adulte, le sang a un pH de 7,2 et une pression de 1180 m.Osmol/l et le milieu X de COUSSERANS a été adapté en conséquence.

Les cultures sont gardées à la température du laboratoire et à l'obscurité. Il n'est généralement pas nécessaire de renouveler le milieu, pour les durées de nos expériences allant de quelques heures (incorporation de précurseur radioactif) à une dizaine de jours (fixation pour l'étude cytologique).

II - LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES DE PREPARATION DU MATERIEL A ANALYSER

A - FRACTIONNEMENT PAR PRECIPITATION

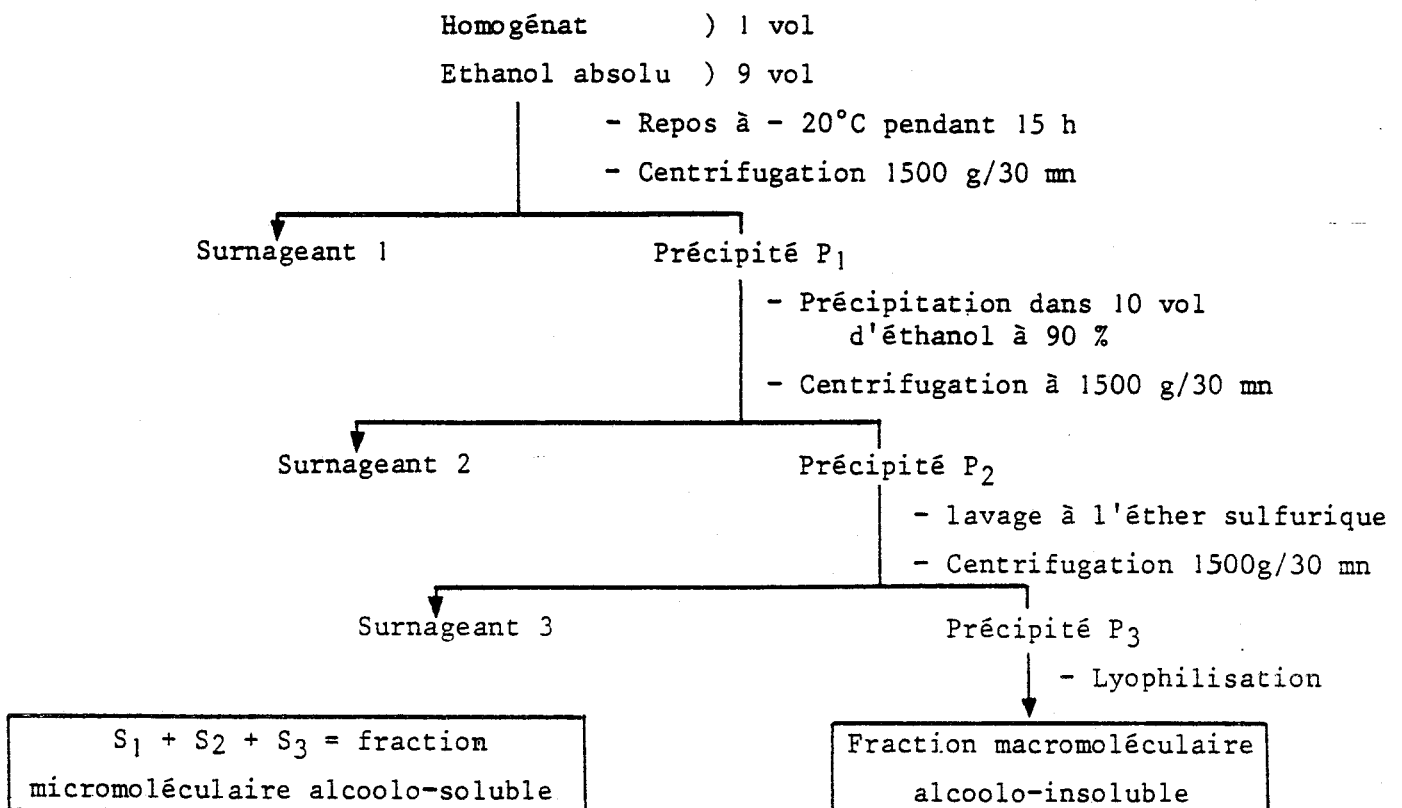
Le matériel biologique est préalablement broyé au "polytron" et les homogénats obtenus sont ensuite utilisés tels quels pour les manipulations suivantes ou centrifugés pour ne travailler que sur le surnageant ou surnageant et culot.

1) Précipitation par l'alcool (PORCHET, 1974)

L'homogénat (\approx 20 g de poids frais dans 50 ml d'eau distillée) est ajusté à pH 4,6, la précipitation est faite avec de l'éthanol absolu refroidi préalablement à -20°C . Le processus de fractionnement est indiqué en figure B

Le précipité final est repris dans de l'eau, évaporé jusqu'à élimination totale de l'éthanol, puis lyophilisé. Nous lui avons donné le nom de fraction macromoléculaire alcoolo-insoluble. Les surnageants successifs sont rassemblés, séchés sous un vide poussé et constituent la fraction micromoléculaire alcoolo-soluble

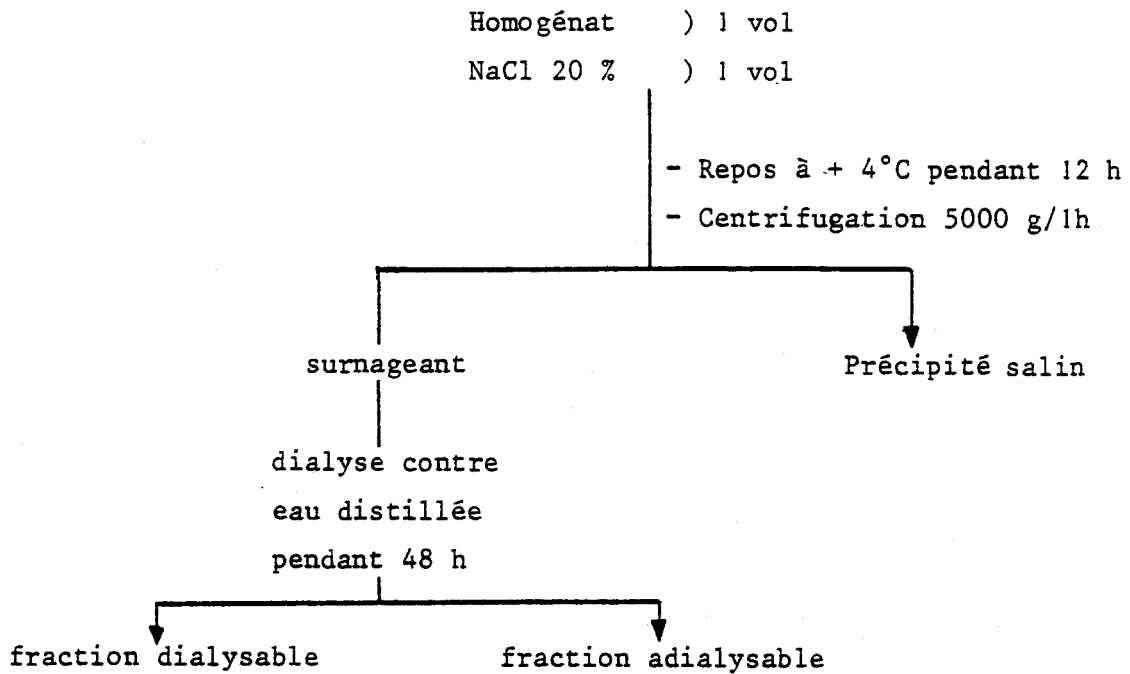
Figure B - Représentation schématique de la précipitation à l'éthanol des homogénats (ou de leurs surnageants seuls) des tissus étudiés.



2) Précipitation saline

L'homogénat (≈ 1 g de poids frais dans 200 ml d'eau distillée) ou son surnageant sont précipités par une solution saline de NaCl 20 % selon le protocole décrit en figure C .

Figure C - Schéma de la précipitation saline des homogénats (ou de leurs surnageants seuls) des tissus étudiés.



Nous obtenons ainsi trois fractions : un précipité salin, une fraction adialysable et une fraction dialysable.

B - FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR GEL

Cette technique permettra de sous-fractionner les différentes fractions obtenues précédemment (alcoolo-soluble/insoluble, adialysable/dialysable).

Les molécules quittent un gel de Sephadex ou Ultrogel placé dans une colonne de verre dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes. L'élution est réalisée par de l'eau distillée préalablement dégazée.

Le passage de la solution dans la colonne de gel est réalisé par aspiration à l'aide d'une pompe péristaltique. Un dispositif permettant la lecture à 254 nm, suit l'élution des protéines après leur passage dans la colonne de gel. Un collecteur de fractions complète notre appareillage. Nous avons utilisé un Ultrogel et deux gels de Sephadex G 25, G 50, pour les divers fractionnements.

III - LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES D'ANALYSES

A - LES ANALYSES COLORIMÉTRIQUES

1) Principe

Il s'agit de développer une coloration sous l'influence de réactifs chimiques et de lire la densité optique (D.O.) au spectrophotomètre moléculaire. La loi de Beer-Lambert nous permet de connaître la concentration recherchée en fonction de la D.O. lue, donc de l'intensité de coloration obtenue.

2) Les dosages

Les résidus secs étudiés sont des milieux complexes : ils renferment des glucides, des protéines et des lipides. Les méthodes colorimétriques seront appliquées pour la recherche des glucides seuls.

Pour les glucides nous avons utilisé les techniques de dosages colorimétriques décrites par MONTREUIL et SPIK (1963, 1968).

a - Méthode à l'orcinol (dosage des oses neutres)

C'est la méthode de TILLMANS et PHILIPPI (1929) modifiée par RIMINGTON (1931).

L'orcinol ou orcine (3,5-dihydroxytoluène) donne avec les oses en milieu sulfurique et à chaud, une coloration brun-orangé.

Le mécanisme de la réaction est mal connu. Il semble que la coloration soit provoquée par la condensation de l'orcinol avec les dérivés du furfural qui ont été caractérisés parmi les produits de la dégradation des oses par l'acide sulfurique. L'action de l'acide sulfurique et les réactions de condensation de l'orcinol s'effectuent par de nombreux intermédiaires puisque la coloration varie et se fixe enfin au brun-orangé.

La lecture se fait à 510 nm, et bien que le maximum d'absorption se situe à 420 nm, on évite à 510 nm l'interférence due à la présence des protéines.

b - Méthode au carbazol (dosage des acides uroniques)

C'est la méthode de DISCHE (1927).

Le carbazol ou dibenzopyrrole donne avec les acides uroniques en milieu sulfurique et à chaud une coloration violacée spécifique.

C'est l'acide 5-formyl-furoïque qui est responsable de la coloration.

La mesure des absorbances est effectuée à 530 nm.

Les protéines n'interfèrent qu'à partir de la concentration de 200 µg/ml et provoquent alors une diminution de l'intensité de coloration.

c - Méthode d'Elson et Morgan modifiée (dosages des hexosamines)

Le chauffage en milieu alcalin d'un mélange d'acétyl-acétone et d'hexosamines conduit à la formation de plusieurs chromogènes que l'on condense ensuite avec le réactif d'Ehrlich au p-diméthylamino-benzaldéhyde pour donner une coloration rouge violacé.

La coloration est due au 2-méthyl-pyrrole (SCHLOSS, 1951) et au 3-acétyl-2-méthyl-5-tétrahydroxybutyl-pyrrole (GOTTSCHALK, 1958). La mesure des absorbances est lue à 520 nm.

Les protéines n'interfèrent pas dans le dosage des osamines.

d - Méthode de Lowry (1951) (dosage des protéines)

Cette méthode associe le dosage du biuret (dosage du nombre de liaisons peptidiques par formation d'un complexe coloré en bleu avec un sel de cuivre) à une réaction colorée des phénols, la tyrosine (réactif de Folin-Ciocalteu).

La lecture se fait à 750 nm.

Inconvénient : il y a notamment interférence avec les glucides (P. KAMOUN, 1977).

B - LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

1) Principe

C'est une chromatographie de partage. L'une des phases est fixe (phase stationnaire), l'autre est mobile. La phase stationnaire est un solide, la phase mobile un gaz.

Les substances à chromatographier sont dissoutes dans un solvant n'ayant aucune affinité pour la phase stationnaire et la solution est introduite dans la colonne par la chambre d'injection (ou chambre de vaporisation) qui a été préchauffée à une température élevée. Les substances et leur solvant sont volatilisés et le flux de gaz vecteur les entraîne dans la colonne.

Chacun des constituants est plus ou moins retardé dans sa migration selon son affinité pour la phase stationnaire : les produits sortent de la colonne successivement dans l'ordre d'affinité croissante (ceux qui n'ont aucune affinité pour la phase stationnaire sortent les premiers).

A la sortie de la colonne les vapeurs passent dans un détecteur relié à un système d'enregistrement. Ce dernier fournit un tracé sur papier. C'est une technique très sensible (figure D).

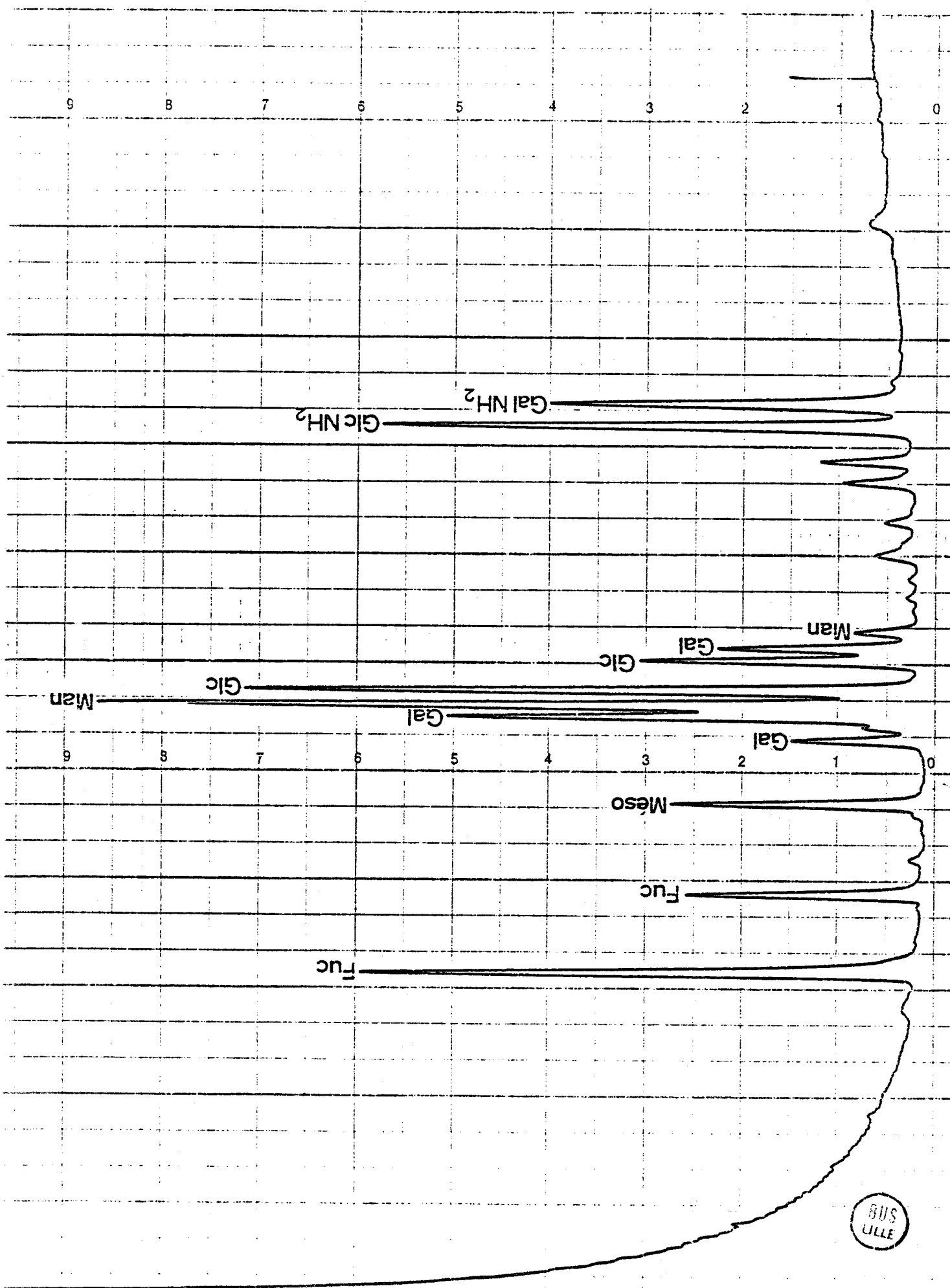
La chromatographie en phase gazeuse a ici été utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des oses.

2) Protocole expérimental

C'est celui habituellement utilisé pour les sucres, avec en plus, à un moment donné, extraction des acides gras :

FIGURE D :

Un exemple d'enregistrement obtenu en chromatographie en phase gazeuse montrant la localisation des pics de monosaccharides.
Fuc : fucose; Gal : galactose; Man : mannose; Glc : glucose;
GalNH₂ : galactosamine; GlcNH₂ : glucosamine; Méso : témoin
mésoinositol (45 µg).



- après y avoir ajouté un témoin (le mésoinositol), la fraction à étudier est séchée 24 heures sous P_2O_5 et sous vide poussé ;
- méthanolyse par addition du mélange méthanol/acide chlorhydrique 0,5 N à $80^\circ C$ pendant 24 heures ;
- extraction des acides gras par 2 fois 1 ml d'heptane ;
- séchage sous azote de la fraction inférieure (débarassée des acides gras) ;
- trifluoroacétylation par addition de 200 μl de dichlorométhane (CH_2Cl_2) et 200 μl d'anhydride trifluoroacétique $(CF_3COO)_2O$. Le tube étant alors bien fermé chauffer pendant 2 fois 5 minutes à $150^\circ C$ dans un bain de sable.

Cette deuxième solution est alors prête pour son injection.

3) Caractéristiques de l'appareil utilisé

Chromatographie des sucres : chromatographie sur colonne de verre (0,3 x 300 cm). Phase OV 210 à 5 % sur Chromosorb W (HP). Gaz vecteur : azote à 15 ml/mn. Température du four programmée de $100^\circ C$ à $200^\circ C$ à raison de $2^\circ C/mn$. Température de l'injecteur et du détecteur : $220^\circ C$.

IV - LES TECHNIQUES DE RADIOACTIVITE

1) Principe

Nous bénéficions de techniques déjà utilisées lors d'un travail précédent (DEPRET, 1977).

L'utilisation d'isotopes marqués présente un grand intérêt : les précurseurs marqués sont incorporés dans des macromolécules qui pourront être ainsi repérées.

Il nous a fallu choisir un précurseur intéressant pour le métabolisme à étudier : l'étude biochimique précédente nous a permis d'orienter notre choix sur le mannose marqué à 1^3H .

L' 3H émet un rayonnement β "mou" (c'est-à-dire faiblement énergétique) et sa période est de 12,26 ans.

2) Moyens de détection de la radioactivité

Actuellement on n'utilise pratiquement plus que les compteurs à scintillations, appareils très sensibles pouvant détecter les rayonnements β mous de très faible énergie.

Deux types de liquides scintillants sont utilisés dans nos expériences selon que le comptage de la radioactivité doit être effectué sur un élément liquide ou solide, ce qui nous amène à décrire les protocoles expérimentaux.

3) Protocoles expérimentaux

Nous avons repris les techniques de O'DOR et M.J. WELLS (1973 et 1974) qui ont montré que des extraits de glandes optiques contrôlent *in vitro* :

- l'absorption par les ovocytes d'acides aminés marqués par le ^{14}C Carbone, et par conséquent la synthèse des protéines marquées.

Nous utilisons un monosaccharide marqué à $^1\text{H}^3$: le mannose plutôt que l'acide aminé leucine marqué au ^{14}C .

- l'absorption par les ovocytes du monosaccharide marqué est contrôlée par mesure de la radioactivité soluble, restant dans le milieu de culture après injection dans celui-ci, quelques temps auparavant.

Il suffit alors de prendre, chaque fois, une aliquote de 5 à 10 μl de milieu et de la dissoudre dans 8 ml de liquide scintillant PCS.

- La synthèse de protéines marquées est contrôlée par mesure de la radioactivité insoluble contenue dans les compartiments cellulaires que sont les fragments de gonades mis en culture en présence de cet ose marqué.

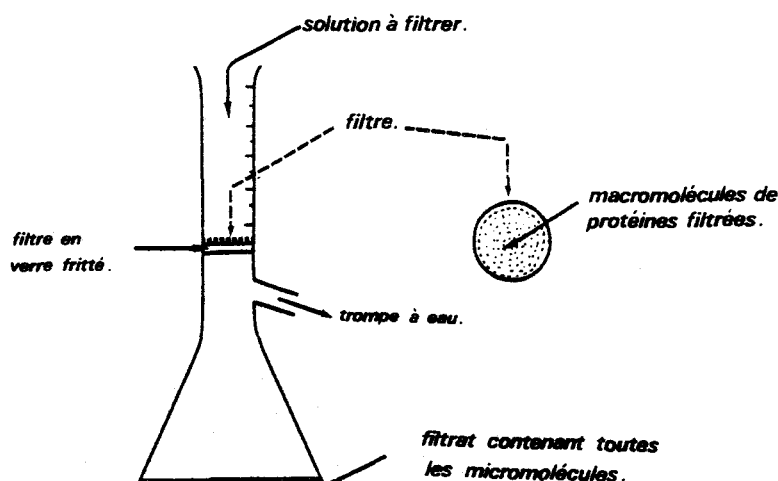
Ces fractions cellulaires sont broyées et leurs protéines précipitées durant deux à trois heures, dans 100 ml d'acide trichloracétique. Une aliquote de 10 ml est aussitôt prélevée et lyophilisée, elle servira à mesurer le poids sec de référence. Le volume restant est filtré dans l'appareil schématisé en figure E.

Les filtres sont ensuite lavés et déshydratés dans le même appareil, par les solutions successives :

- ATCA 10 %
- Alcool 96°
- Acétone
- Ether

Enfin, les filtres sont recueillis et séchés en étuve et c'est parfaitement secs qu'ils sont introduits dans les piluliers de comptage contenant 8 ml de POPOP.

FIGURE E - Appareil utilisé dans la filtration des molécules de protéines marquées.



CHAPITRE I

ÉTUDE CYTOLOGIQUE ET CYTOCHIMIQUE DE L'OVAIRE

I - CYTOLOGIE

A - OVOGONIE (STADE I)

B - OVOCYTE PRIMAIRE

- 1) phase de petit accroissement (Stade II)
- 2) phase de grand accroissement
 - a - prévitellogenèse
 - α - stade III a
 - β - stade III b
 - b - vitellogenèse (Stade IV)
 - c - fin de vitellogenèse (Stades V et VI)

II - CYTOCHIMIE

- 1) données antérieures
- 2) résultats personnels

Les études cytologiques et cytochimiques ont essentiellement porté sur la gonade femelle de *Sepia officinalis*.

L'ovaire est suspendu à la paroi dorsale du coelome postérieur, contrairement au testicule, il n'occupe pas une position terminale. Les follicules ovariens, très bien vascularisés, libèrent les ovocytes dans le coelome où s'achève la maturation. A la maturité, la quantité d'ovocytes accumulés (150 à 500) est telle que les organes (poche à encre, estomac, sacs urinaires...) se trouvent comprimés et plus ou moins reportés vers la partie antérieure de l'animal.

La différenciation ovocytaire débute dès l'éclosion mais les processus de maturation prennent une telle importance chez cette espèce que l'évolution s'étend sur de nombreux mois. La maturité sexuelle des femelles n'est atteinte, dans la nature, qu'à l'âge moyen d'un an : celles-ci se reproduisent au cours de leur seconde année (12 à 18 mois d'âge) (RICHARD, 1970).

I - CYTOLOGIE

L'étude cytologique des différents stades de la maturation ovarienne nécessite la fixation de gonades d'animaux d'âges différents.

Les observations de cytologie photonique nous ont permis de décrire à nouveau l'évolution sexuelle scindée en six stades (Tableau A), selon la classification proposée par RICHARD en 1971 (b). Celui-ci s'était référé essentiellement à YUNG KO CHING (1930) dont les travaux rectifiaient les erreurs ou omissions des auteurs du début du siècle (VIALLETON, 1888 ; BERGMAN, 1903 ; SCHWEICKART, 1904 et LOYEZ, 1905)

TABLEAU A - Critères physiologiques utilisés pour la détermination des stades de croissance ovocytaire

Etapes de l'évolution du gamète femelle et des cellules folliculaires		Stades	
Ovogenie	: Mitoses goniales	I	
Ovocyte I	Phase de petit accroissement : Prophase de méiose ovocytaire	II	
	Phase de grand accroissement	Prévitellogénèse	III a
			III b
	Vitellogénèse	IV	
	Fin de Vitellogénèse	V	
Ovocyte II		VI	

A - OVOGONIE (STADE I)

A l'éclosion, l'ovaire est une masse réniforme dont le hile est occupé par une importante vascularisation. Il contient à ce stade des ovogonies (stade I) difficiles à distinguer des protogonies embryonnaires.

Elles ont le même noyau ovoïde plus ou moins échancré, contenant un ou plusieurs nucléoles. Le stade ovogonial qui affecte l'ensemble des gonocytes est de courte durée. Très vite, corrélativement au déclenchement de l'ovogenèse, on assiste à un remaniement de la structure ovarienne. Les mitoses ovogoniales entraînent la formation de groupes isogéniques de cellules germinales séparées par des trames de conjonctif lâche (Pl. I, fig. a).

Le début de l'évolution du gamète femelle est donc conforme à ce qui s'observe chez les autres invertébrés.

B - OVOCYTE PRIMAIRE

1) Phase de petit accroissement (Stade II)

Puis dans un îlot isogénique (Pl. I, fig. a) on assiste à toutes les étapes de la prophase classique (c'est le stade II). A la suite du dernier stade on assiste à une désagrégation des gémini chromosomiques. La substance chromatique se résout alors en nodules et filaments (Pl. I, fig. b). Cette transformation progressive du noyau marquée par la fusion de la chromatine, correspond au stade de l'interphase qui se retrouve pratiquement chez tous les ovocytes (RAVEN, 1961).

L'ovocyte qui ne mesurait que 8 à 10 microns se transforme pendant ce temps en cellule qui atteint 50 microns avec un noyau sensiblement sphérique de 30 microns de diamètre. Toutefois, pendant cette première phase d'accroissement, le cytoplasme reste homogène. L'ensemble du contenu cytoplasmique est relativement dense et basophile (Pl. I, figs b, c). C'est pendant ce stade II, alors que l'animal mesure de 2 à 4 cm de longueur, que les cellules folliculaires s'immiscent entre les îlots des cellules germinales. Un grand nombre de divisions (début de la phase de multiplication de LOYEZ, 1905) entraîne la formation de travées qui viennent enserrer les ovocytes.

2) Phase de grand accroissement

a - Prévitellogenèse

α - Stade III a

Le stade III débute par l'accolement de quelques cellules folliculaires à la périphérie de l'ovocyte (Pl. I, fig. b) ; on note qu'elles sont placées tangentielllement aux bords de celui-ci. Ces cellules forment ensuite une enveloppe

PLANCHE I

Ovogenèse en microscopie optique.

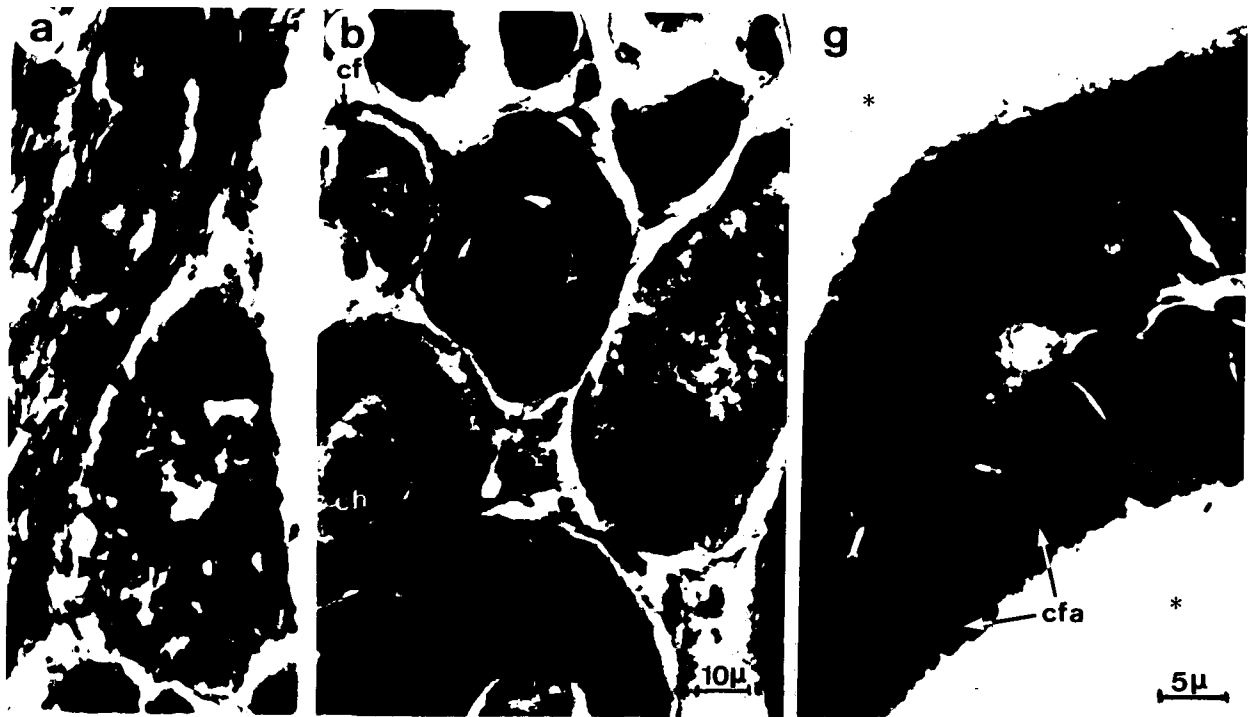
a, b, c, f : bleu alcian ; e, g : bleu de toluidine ; d : fuchsine d'Altman selon Volkonsky.

a, b, c, d : ovaire de jeune seiche (L = 8 cm).

- a - détail d'un îlot isogénique d'ovogonies (ov ►) en prophase de méiose. Après la méiose, l'ovocyte I (ov 1) entre en phase d'accroissement (Stade III a) ; le noyau augmente de diamètre.
- b - A côté des stades jeunes existent des ovocytes dont l'accroissement de taille est considérable. Ils s'entourent de quelques cellules folliculaires (cf) d'abord ; puis celles-ci se divisent pour former un revêtement périphérique continu : la thèque folliculaire (th f). Le cytoplasme de l'ovocyte est homogène (cyt ov) ; dans le noyau, la chromatine se résout en nodules.
- c - Puis les cellules folliculaires inactives (cfi) se multiplient encore ; elles forment des cordons, des replis (rf) qui pénètrent dans le cytoplasme ovarien ; celui-ci devient hétérogène (*) c'est le stade III b ; on note entre les ovocytes une trame de cellules conjonctives (cc).
- d - détail d'un ovocyte I de stade III b coloré à la fuchsine d'Altman, qui met en évidence les noyaux des péricytes (p) des vaisseaux sanguins (vs) irriguant les cordons folliculaires (rf).
- e, f, g : seiche un peu plus âgée (L = 10 cm).
- e, f - La vitellogenèse débute, c'est le stade IV. Le vitellus s'est dissout dans le liquide d'inclusion (*). Noter la différence de taille entre les cellules folliculaires actives (cfa) sécrétrices (fig. f) et les cellules folliculaires inactives (cfi) (fig. e).
- g - Cellules folliculaires (cfa) hautes, à très gros noyau, intensément coloré, montrant une grande activité de synthèse.

NB : * Nombreuses sont les lacunes de vitellus, cela peut indiquer une richesse en lipides (solubles dans les solvants organiques de déshydratation et le milieu d'inclusion à la paraffine).

Abréviations utilisées : cc : cellule conjonctive ; cf : cellule folliculaire ; cfa : cellule folliculaire active ; cfi : cellule folliculaire inactive ; ch : chromatine ; cyt ov : cytoplasme ovarien ; N : noyau ; ov : ovogonie ; Ov 1 : ovocyte primaire ; p : péricyte ; rf : repli ou cordon de cellule folliculaire ; th f : thèque folliculaire ; vs : vaisseau sanguin.



continue autour de l'ovocyte (Pl. I, figs b, c) qui a été dénommée capsule de LANKESTER (1875) et *theca folliculi* (th.f) par USSOW (1881). Ces cellules sont étroitement accolées au cytoplasme de l'ovocyte, disposition dont on trouve de nombreux exemples chez d'autres Mollusques (SELWOOD, 1970), chez les Amphibiens (HOPE et Coll., 1963) et chez des poissons (YAMAMOTO, 1963).

Le noyau ou vésicule germinative est encore à ce moment au centre de l'ovocyte ovoïde qui atteint 200 à 400 microns de diamètre (Pl. I, fig. c).

β - Stade III b

Au cours du stade III b, les cellules folliculaires, après s'être disposées en deux couches autour de l'ovocyte, se multiplient encore et repoussent le cytoplasme ovocytaire ; elles forment ainsi des replis ou cordons folliculaires (rf) à l'intérieur de l'ovocyte (Pl. I, fig. c). Lamise en place des cordons, qui constitue la caractéristique majeure de l'ovogenèse des Céphalopodes, n'avait pas échappé aux examens effectués antérieurement en microscopie photonique (LOYEZ, 1905 ; YUNG KO CHING, 1930 ; COWDEN, 1968). Même sur le vivant, la disposition des cordons folliculaires confère à l'ovocyte un aspect strié.

Ce processus s'accompagne de divers remaniements morphologiques. Dans l'ovaire l'ovocyte oriente son grand axe perpendiculairement à l'épithélium ovarien. La vésicule germinative (N) repoussée à une extrémité de l'ovocyte entraîne la polarisation de celui-ci (Pl. I, fig. e). Le pôle animal correspond le plus souvent à l'extrémité la plus aiguë de l'ovule, tandis qu'au pôle opposé, végétatif, une abondante vascularisation engainée de conjonctif, vient couvrir les cellules folliculaires.

On assiste, en effet, à une réorganisation du conjonctif. Ces cellules s'orientent pour former de véritables travées nourricières parcourues par des vaisseaux sanguins (Vs ; pl. I, fig. d). Des capillaires s'engagent entre les cellules folliculaires. Par la fuchsine d'Altman (coloration de Volkonsky), mettant en évidence les lipides, notons que ce sont surtout les noyaux sphériques des péricytes (p) (cellules des parois des vaisseaux sanguins) qui sont visualisés (Pl. I, fig. d). On peut considérer qu'autour de cet ovocyte relié à l'ovaire par un pédoncule conjonctif, les couches folliculaires, réalisent la formation d'un "placenta" dont le rôle pourrait être celui d'une couche sécrétrice participant à l'évolution ovocytaire. Les deux fonctions sont d'ailleurs attribuées généralement aux cellules folliculaires des Mollusques par RAVEN (1966).

Durant ce stade, le cytoplasme ovocytaire, d'homogène qu'il était (Pl. I, figs a, b) devient hétérogène et de très nombreux globules gras souvent dissous dans les milieux d'inclusions à la paraffine sont marqués par des lacunes (*) (Pl. I, figs c, d, e). A la fin du stade III b, les cellules

folliculaires jusque là de forme cubique (environ 10 μ de côté) augmentent considérablement de hauteur et prennent des formes cylindriques : leur hauteur atteint 30 à 40 μ tandis que la largeur ne varie guère (10 à 15 μ).

b - Vitellogenèse (stade IV)

Le stade IV, qui fait suite à la période de multiplication des cellules folliculaires (LOYEZ, 1905), a été dénommé phase de sécrétion par cet auteur. C'est en effet le caractère dominant de ce stade de l'ovogenèse. Les cellules folliculaires participent étroitement à l'élaboration du vitellus. D'inactives (cfi) dans les stades précédents, elles deviennent intensément actives (cfa). Ce stade IV est caractérisé par trois séries d'évènements :

- les cellules folliculaires présentent un accroissement spectaculaire de la taille du noyau et de son nucléole (Pl. I, fig. g) et de la basophilie de son cytoplasme,
- apparition entre les cellules folliculaires et le cytoplasme ovocytaire d'une mince couche hyaline interprétée comme zone pellucide,
- dépôt de vitellus. A l'exception de la zone périnucléaire, tout le cytoplasme ovocytaire s'étendant entre les cordons folliculaires est envahi par du vitellus.

c - Fin de vitellogenèse (Stades V et VI)

Ensuite les stades V et VI, non inclus dans la présente étude, ont les caractéristiques suivantes :

- pour le stade V, la régression et la dégénérescence des cellules folliculaires et l'élaboration d'un chorion (au cours de ce stade, l'ovocyte qui faisait saillie à la périphérie de l'ovaire finit par rompre l'épithélium ovarien et se trouve libéré dans le coelome) qui marquent la fin de la phase de grand accroissement de l'ovocyte ;
- pour le stade VI, par la poursuite de la méiose, donc par l'émission des globules polaires (HOADLEY, 1930 ; ARNOLD, 1971) (ce processus étant induit par la pénétration des spermatozoïdes dans le micropyle).

Nous avons ensuite mené une étude cytochimique de la vitellogenèse.

II - CYTOCHIMIE

1) Données antérieures

Des études cytochimiques précédentes de l'ovocyte et de ses cellules folliculaires, avaient eu pour but de montrer l'étroite contribution de ces dernières à la formation du matériel vitellin.

- YUNG (1930) montre qu'il existe dans les ovocytes de *Sepia officinalis*, deux types de vitellus qui se succèdent dans le temps. Un vitellus primaire formé

essentiellement de polysaccharides neutres, puis un vitellus secondaire de nature protéinique, quand les cellules folliculaires entrent en phase de sécrétion.

- KONOPACKI (1933) montre, dans les ovocytes de *Loligo vulgaris*, la part que prennent les cellules folliculaires dans la synthèse du prévitellus et décrit la formation du vitellus dans les différentes phases.
- COWDEN en 1968, étudie chez *Loligo brevis* les différents stades de l'ovogenèse. Dans cette espèce, l'auteur démontre que le cytoplasme du jeune ovocyte est riche en acides ribonucléiques alors que ce même cytoplasme, à des stades plus avancés, s'enrichit en polysaccharides et en protéines. Les cellules folliculaires voient leur taux d'acides nucléiques augmenter avec la croissance de l'ovocyte.
- Plus tard, RICHARD et DHAINAUT (1973) montrent à un niveau ultrastructural, l'importance du rôle des cellules folliculaires dans l'ovogenèse ; la richesse de celles-ci en dictyosomes prouve leur sécrétion d'un matériel riche en glycoprotéines. (*Sepia officinalis*).
- La même année, O'DOR et WELLS (1973) dans des études d'incorporation de ^{14}C -leucine *in vivo* et *in vitro* par les gonades d'*Octopus vulgaris*, semblent révéler que les cellules folliculaires sont probablement indispensables aux synthèses vitellines.
- En 1976, BOLOGNARI et al. reprennent des études cytochimiques sur les ovocytes d'*Octopus vulgaris*. Ils décrivent à nouveau les divers stades de l'ovogenèse, et démontrent la richesse du vitellus en glycoprotéines neutres, mais cette fois ils prouvent une absence totale de glycogène par le maintien d'une réaction positive au PAS après action de l' α -amylase ; ils notent aussi une absence de polysaccharides à caractère acide.

C'est pourquoi il nous a semblé intéressant de reprendre une telle étude sur *Sepia officinalis*.

2) Résultats personnels

Nous avons choisi les colorations cytochimiques recommandées par GABE (1968) et PEARSE (1968) :

- révélation des groupements $-\text{NH}_2$ des protéines par la Ninhydrine-Schiff (YASUMA et ICHIKAWA, 1952) ;
- révélation des groupements glycol par le PAS (réaction de HOTCHKISS, 1948 ; Mac MANUS 1948)
 - . avec témoin sans acide périodique,
 - . et témoin après action de l' α -amylase (SPICER *et al.*, 1967)
- révélation des glucides à caractère acide (bleu alcian) (technique de BENSLEY-COWDRY)

PLANCHE II

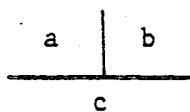
Vitellogenèse : Etude cytochimique en microscopie optique des glycoprotéines.

Ovocyte I, Stade IV

a : P.A.S. ; b : P.A.S. témoin sans oxydation périodique ; c : témoin après action de l' α -amylase.

Une réaction négative au niveau (—>) de la figure c et plus au moins au niveau de la figure b démontre une existence de polysaccharides au niveau des éléments colorés en pourpre par la réaction de Hotchkiss ► de la figure a.

La figure c indiquant une digestion par l' α -amylase nous pouvons conclure à la présence d'un polymère du glucose. Est-ce du glycogène ?



- révélation des lipides par la fuchsine d'Altman selon Volkonsky (GABE, 1968).

Les résultats sont regroupés dans le tableau B

TABLEAU B : Résultats des techniques cytochimiques sur les stades II à IV, des ovocytes de *Sepia officinalis*.

	stade II	stade IIIa		stade IIIb		stade IV	
	ovocyte	Ø foll.	cyt.ov.	Ø foll.	cyt.ov.	Ø foll.	Vitellus
Ninhydrine-Schiff	+	+	+	+	+	++	++
P.A.S.	±	±	±	±	±	+	+
P.A.S. sans oxydation périodique	-	-	-	-	-	-	-
P.A.S. après action de l' α -amylase	-	-	-	-	-	-	-
Bleu alcian	-	-	-	-	-	-	-
Bleu de toluidine	++	++	++	++	++	+++	+
Fuchsine d'Altman	±	±	±	±	±	±	±

- réaction négative ; + réaction positive ; Ø foll. : cellule folliculaire ; cyt. ov. : cytoplasme ovocytaire.

Ce tableau montre une différence nette de composition cytochimique entre les stades IIIb et IV. En effet, le début du stade IV est marqué par le déclenchement de la vitellogenèse.

Cela se traduit :

- par une légère augmentation du taux des protéines dans les cellules folliculaires et le vitellus ;
- par un accroissement du taux d'acides nucléiques dans les cellules folliculaires traduisant donc une augmentation de leurs synthèses (Pl. I, fig. e) ;
- par une nette augmentation du taux de matériel P.A.S. positif dans les cellules folliculaires ; l'accumulation de ce matériel (►) dans la zone apicale de ces cellules (Pl. II, fig. a) leur donne une polarité fonctionnelle. De plus, ce matériel est aussi plus abondant au niveau du vitellus juxtaposé aux cellules folliculaires ; ce qui semble prouver qu'il est bien synthétisé par elles (Pl. II, fig. a).

D'autre part, une réaction négative (—►) au P.A.S. après digestion par l' α -amylase (Pl. II, fig. c) tend à démontrer la nature "polymère de glucose" de ce matériel coloré, précédemment cité. Est-ce du glycogène ? BOLOGNARI(1976) en avait prouvé l'absence totale, à tous les stades, et à tous les niveaux, dans les ovocytes d'*Octopus vulgaris*. Par contre, nos résultats quant à l'absence de poly-

saccharides à caractère acide concordent avec les siens.

CONCLUSION

Le stade IV est donc caractérisé cytochimiquement par une nette augmentation des synthèses par les cellules folliculaires (augmentation du taux des acides nucléiques et du taux du matériel P.A.S. positif dans la zone apicale de ces cellules). Il y a aussi augmentation du taux de protéines et de polysaccharides neutres dans le vitellus juxtaposé aux cellules folliculaires, cela tend à prouver que le matériel vitellin est bien synthétisé par ces dernières.

C'est pourquoi nous nous sommes orientés, dans une seconde étape, vers une étude plus approfondie et biochimique de ces polysaccharides.

En remarque, on peut noter dans la planche I, figs c, d, e, f, g, de nombreuses lacunes (*) dans le cytoplasme ovocytaire et plus encore dans le vitellus, ces lacunes étant la conséquence d'une dissolution du matériel dans les solvants organiques de déshydratation et dans le milieu d'inclusion à la paraffine cela tendrait à montrer la nature lipo-glycoprotéinique du vitellus.

CHAPITRE II

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES GONADES ET DU SANG

I - ANALYSE BIOCHIMIQUE DU VITELLUS

A - PREPARATION DU MATERIEL

- 1) ultracentrifugation
- 2) fractionnement par précipitation
 - a - précipitation par l'alcool
 - b - précipitation saline
- 3) fractionnement par chromatographie sur gel de sephadex

B - DOSAGE COLORIMETRIQUE

- 1) dosage des oses neutres
- 2) dosage des acides uroniques
- 3) dosage des osamines
- 4) dosage des protéines
- 5) dosages de toutes les fractions résultant de la précipitation par de l'eau de mer d'un homogénat d'ovocytes mûres

C - DOSAGES PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

CONCLUSION

I - ANALYSE BIOCHIMIQUE DU VITELLUS

Il nous a fallu tout d'abord fractionner la substance apparemment homogène que représente le vitellus de l'ovocyte de Seiche.

A - PREPARATION DU MATERIEL

1) ultracentrifugation

Un homogénat d'ovocytes mûres de Sepia (20 g dans 100 ml de solution de sucrose 0,5 M) subit une ultracentrifugation (100.000 g). L'ensemble se sépare en fonction soluble (cytosol) et culot. Le cytosol renfermant la totalité des éléments hydrosolubles est ensuite chromatographié sur gel.

2) fractionnement par précipitation

Ce type de fractionnement permet la séparation de l'homogénat en plusieurs ensembles selon le poids moléculaire des substances ou leur affinité vis à vis de l'alcool ou du NaCl.

a - précipitation par l'alcool.

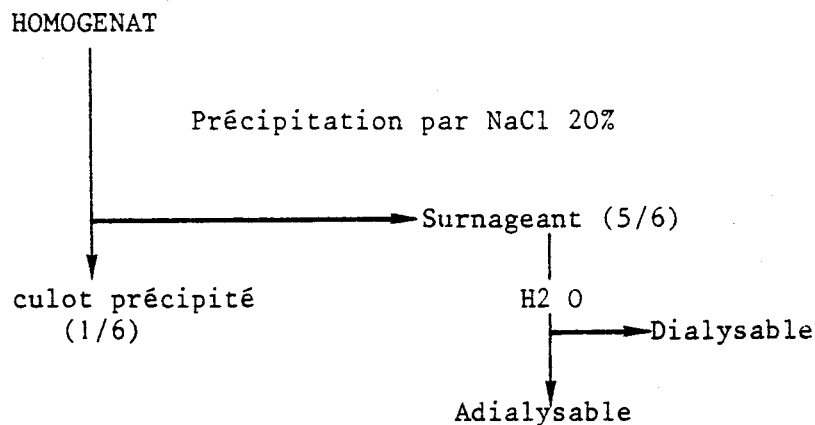
Elle sépare le vitellus en deux fractions très inégales une fraction macromoléculaire alcoolo-insoluble très peu abondante (1/10 de l'ensemble) par rapport à un surnageant ou fraction micromoléculaire alcoolo-soluble (qui occupe les 9/10).

b - précipitation saline

Elle nécessite de moins grandes quantités de matériel au départ, mais il y a là aussi, une très grande différence entre le culot (1/6 de l'ensemble) et le surnageant (5/6) après une précipitation par une solution de NaCl 20 %. Le surnageant homogène est mis en dialyse contre de l'eau distillée (en fin de manipulation, notons que cette fraction adialysable reprécipite). Nous obtenons donc trois fractions :

- un précipité salin
- une fraction dialysable
- une fraction adialysable

FIGURE 1 : Schéma de la précipitation saline



Les diverses fractions obtenues après précipitation (alcoolo-soluble/insoluble, d'une part; précipité salin/dialysat/adialysat, d'autre part) sont alors sous-fractionnées par chromatographie sur gel de Sephadex.

3) fractionnement par chromatographie sur gel de Sephadex

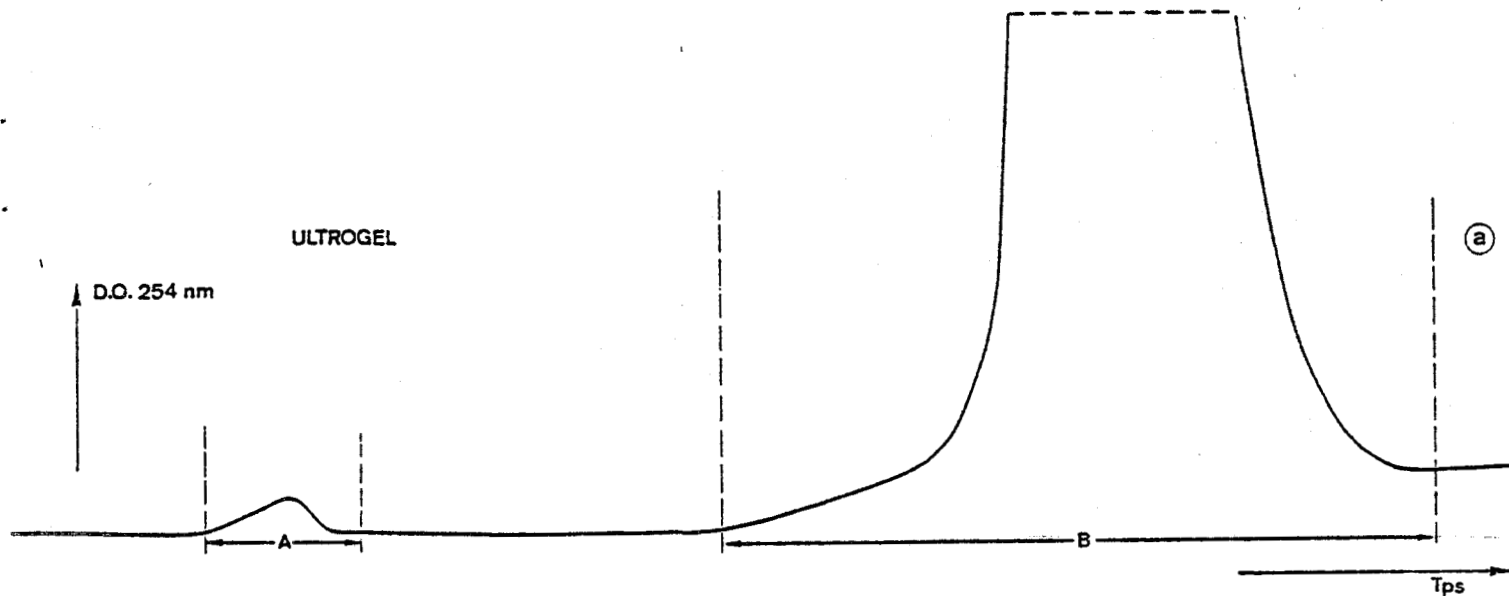
Nous avons repris la technique déjà utilisée au cours d'un travail précédent sur le liquide coelomique de l'Annélide Polychète, *Perinereis cultrifera* (DEPRET, 1977). L'élution est réalisée par passage d'eau distillée préalablement dégazée dans des colonnes de chromatographie de 120 x 1,5 cm pour une sephadex G 25 et de 60 x 2 cm pour une Sephadex G 50 ou un Ultrogel.

L'absorbance de l'éluat est lue à 254 nm

- cytosol sur Ultrogel (fig.2)

- fraction alcoolo-soluble/insoluble et dialysable/adialysable (fig.3)

FIGURE 2 : Chromatographie sur Ultrogel. d'un cytosol d'ovocytes mûres de Seiche.



Reprise du pic B et passage de celui-ci sur Sephadex G 25.



FIGURE 3 : Chromatographie sur Sephadex G 25 des 4 fractions alcoolosoluble/
insoluble, adialysable/dialysable.

D.O. 254 nm

fraction alcool insoluble

D.O. 254 nm

fraction alcool soluble

D.O. 254 nm

fraction adialysable

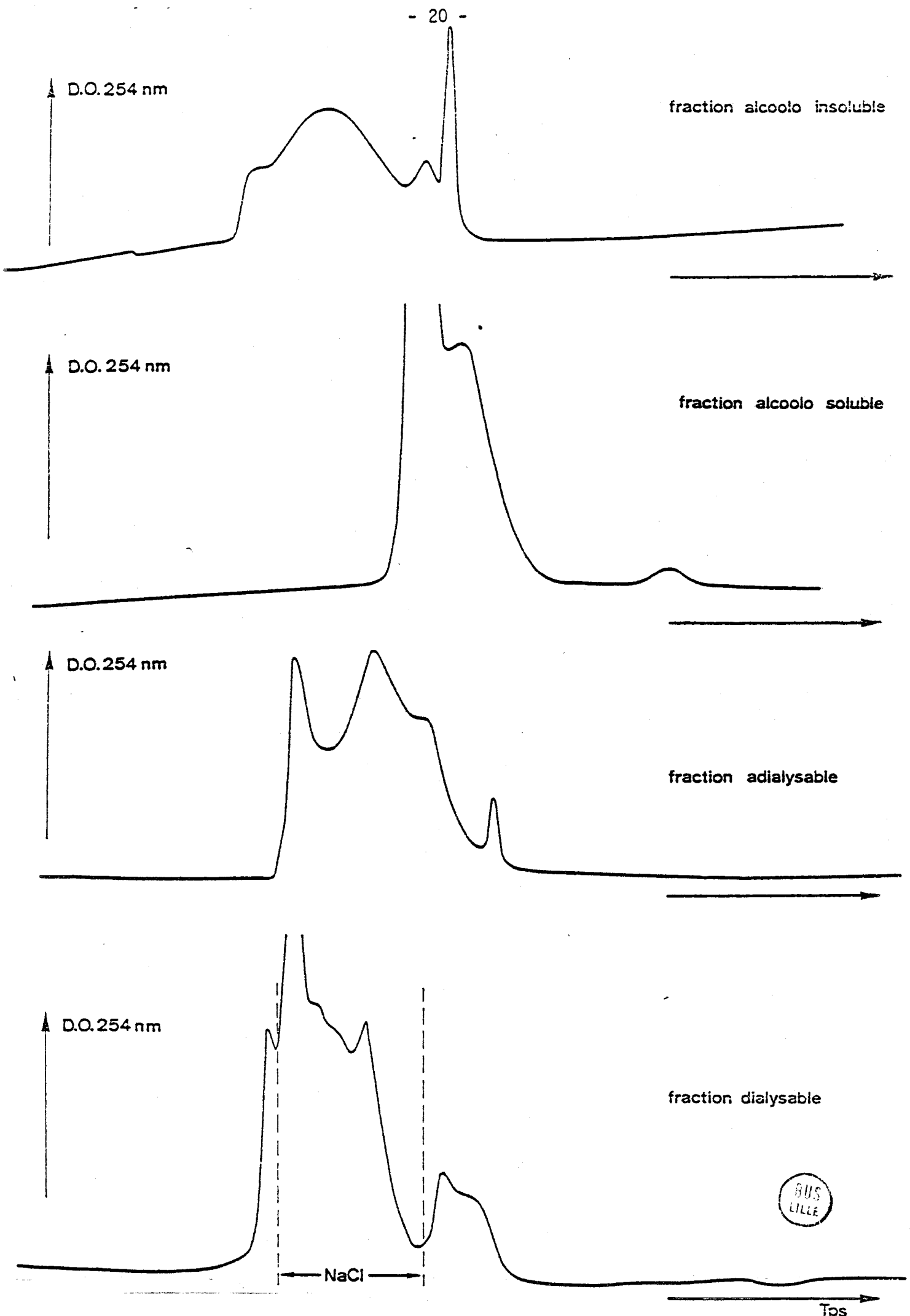
D.O. 254 nm

fraction dialysable

NaCl



Tps

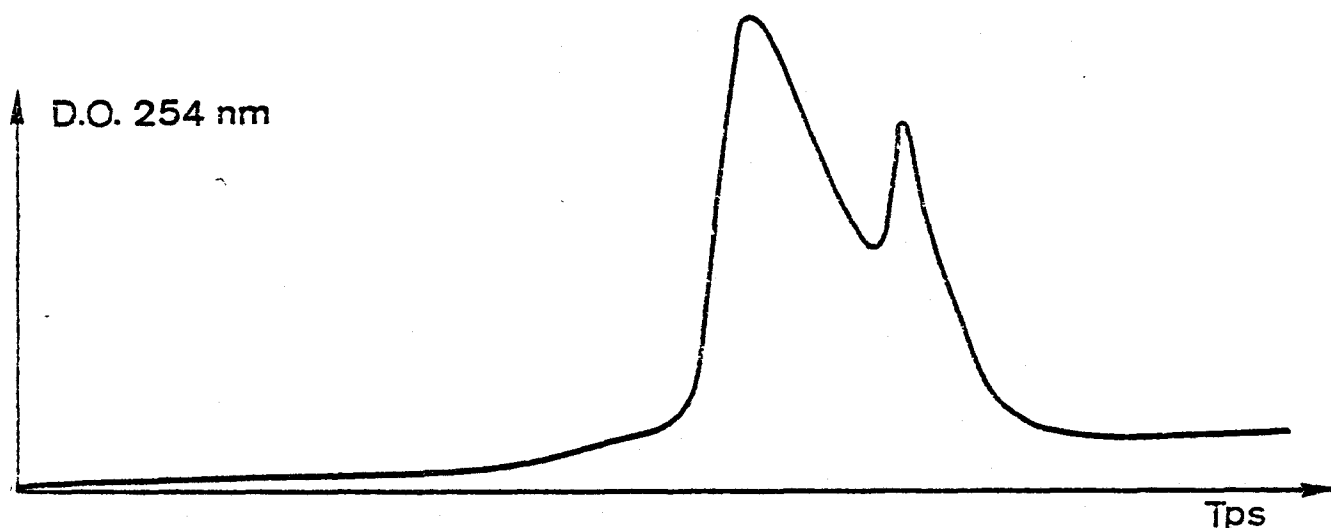


De la figure 3 nous pouvons tirer plusieurs conclusions :

1° - en ce qui concerne les fractions alcoolo-insoluble et adialysable nous notons que les pics, bien que de hauteurs différentes, sortent au même niveau. Le problème se pose cependant de savoir si ces macromolécules sont réellement semblables.

2° - par contre les fractions alcoolo-soluble et dialysable apparaissent nettement différentes. Le NaCl contaminant la fraction dialysable est éliminé par précipitation alcoolique. Le surnageant, après évaporation, est chromatographié à nouveau sur G-25 superfine (fig.4).

FIGURE 4 : Chromatographie du pic salé de la fraction dialysable sur Sephadex G.25 superfine.



Ce sont donc toutes ces différentes sous-fractions obtenues après chromatographie sur gel de Sephadex et Ultrogel que nous avons entrepris d'analyser par diverses techniques de dosages.

B - DOSAGES COLORIMÉTRIQUES

Nous avons entrepris la recherche des oses neutres, des acides uroniques des osamines et des protéines par diverses techniques biochimiques d'analyses colorimétriques.

Le dosage des oses totaux se fait à l'orcinol, celui des acides uroniques au carbozol, celui des osamines par la réaction d'Elson-Morgan et celui des protéines par la méthode de Lowry. Nous avons montré précédemment que la précipitation avec une solution de NaCl permettait de séparer la masse du vitellus en deux constituants. Nous avons cherché à préciser l'importance de la concentration en sel sur la nature du matériel précipitant. Pour cela, le dosage colorimétrique des divers constituants biochimiques a été réalisé sur les fractions

adialysables, avec des solutions allant de l'eau de mer à 20 % de NaCl

- eau de mer
- solution NaCl 5 %
- solution NaCl 10 %
- solution NaCl 20 %

Les résultats des dosages sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche donc en p.1000

1) dosage des oses neutres (orcinol)

TABLEAU I : Les oses dans la fraction adialysable obtenue après précipitation par différentes concentrations salines d'un homogénat d'ovocytes mûres (en p.1000)

	Eau de mer	NaCl 5 %	NaCl 10 %	NaCl 20 %
Ovocytes mûres (fraction adialysable).	192	218	210	203

Quelle que soit la concentration saline précipitant les molécules de protéines, la fraction adialysable semble toujours identique et contenir environ 20 % d'oses totaux.

2) dosage des acides uroniques (carbazol)

Nous avons procédé de façon identique et nous avons ainsi obtenu les résultats suivants :

TABLEAU 2 : Les acides uroniques dans la fraction adialysable obtenue après précipitation, par diverses concentrations salines d'un homogénat d'ovocytes mûres (en p.1000).

	Eau de mer	NaCl 5 %	NaCl 10 %	NaCl 20 %
Ovocytes mûres (fraction adialysable).	5	3	1,5	0

Ici la concentration en sel semble plus ou moins intervenir mais le pourcentage est toujours inférieur à 1 %

3) osamines (réaction d'Elson Morgan)

Nous n'avons effectué ce dosage que pour l'adialysat résultant de la précipitation par une solution de NaCl à 5 % et ici encore la quantité d'osamines est inférieure à 1 %.

4) protéines (Lowry)

Dans une remarque préliminaire nous indiquerons que la méthode de Lowry utilisée donne rarement des résultats reproductibles d'un dosage à l'autre donc difficilement interprétables pour notre matériel.

TABLEAU 3 : Les protéines dans la fraction adialysable obtenue après précipitation, par diverses concentrations salines, d'un homogénat d'ovocytes mûres (en p.1000).

	Eau de mer	NaCl 5 %	NaCl 10 %	NaCl 20 %
Ovocytes mûres fraction adialysable)	400	224	348	90

Cependant on peut conclure que cette fraction est relativement riche en protéines 40 à 50 % du poids sec.

5) dosages de toutes les fractions résultant de la précipitation par de l'eau de mer, d'un homogénat d'ovocytes mûres

Sachant donc ce vitellus riche en glycoconjugués nous avons essayé de déterminer quelle était la part, des culots : c'est pourquoi nous avons refait une expérience complète de précipitation par de l'eau de mer mais cette fois en dosant surnageant (non dialysé) et culots résultants ainsi que l'homogénat total de départ .

TABLEAU 4 : Oses totaux, acides uroniques, protéines dans les diverses fractions d'un homogénat d'ovocytes mûres après précipitation par l'eau de mer (p.1000)

	<p style="text-align: center;">HOMOGENAT D'OVOCYTES MATURES précipitation eau de mer ↓ Total Surnageant Culot</p>		
Oses totaux	268	152	38
Acides uroniques	23	15	9
Protéines	539	371	79

De ces dosages, nous pouvons conclure que les fractions "surnageants" sont toujours nettement plus riches en glucides et protéines que les fractions "culots". Ce résultat justifie nos analyses qui portent essentiellement sur les surnageants.

En conclusion de ces divers dosages colorimétriques, le vitellus des oeufs mûres, prêts à être pondus, est riche en protéines et en oses neutres, donc riche en glycoprotéines neutres : cela confirme les résultats cytochimiques de YUNG (1930) sur *Sepia officinalis*, de COWDEN (1968) sur *Loligo brevis* et de RICHARD et DHAINAUT (1976) sur *Sepia officinalis*, avec en plus, dans ce dernier cas, l'appui de résultats d'ultrastructure sur les cellules folliculaires.

Sachant donc ce vitellus riche en composés glucidiques, nous avons essayé de déterminer la nature exacte de ces monosaccharides : cela fait l'objet d'une troisième partie qui traite de l'analyse des différentes fractions par chromatographie en phase gazeuse .

C - DOSAGES PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Nous avons essentiellement analysé les différentes sous-fractions résultant :

- de la chromatographie sur ultrogel puis Sephadex G 25 du cytosol (fig.5).
- de la chromatographie sur Sephadex G 25 des 4 fractions alcool-soluble/insoluble, dialysable et adialysable (fig.6).

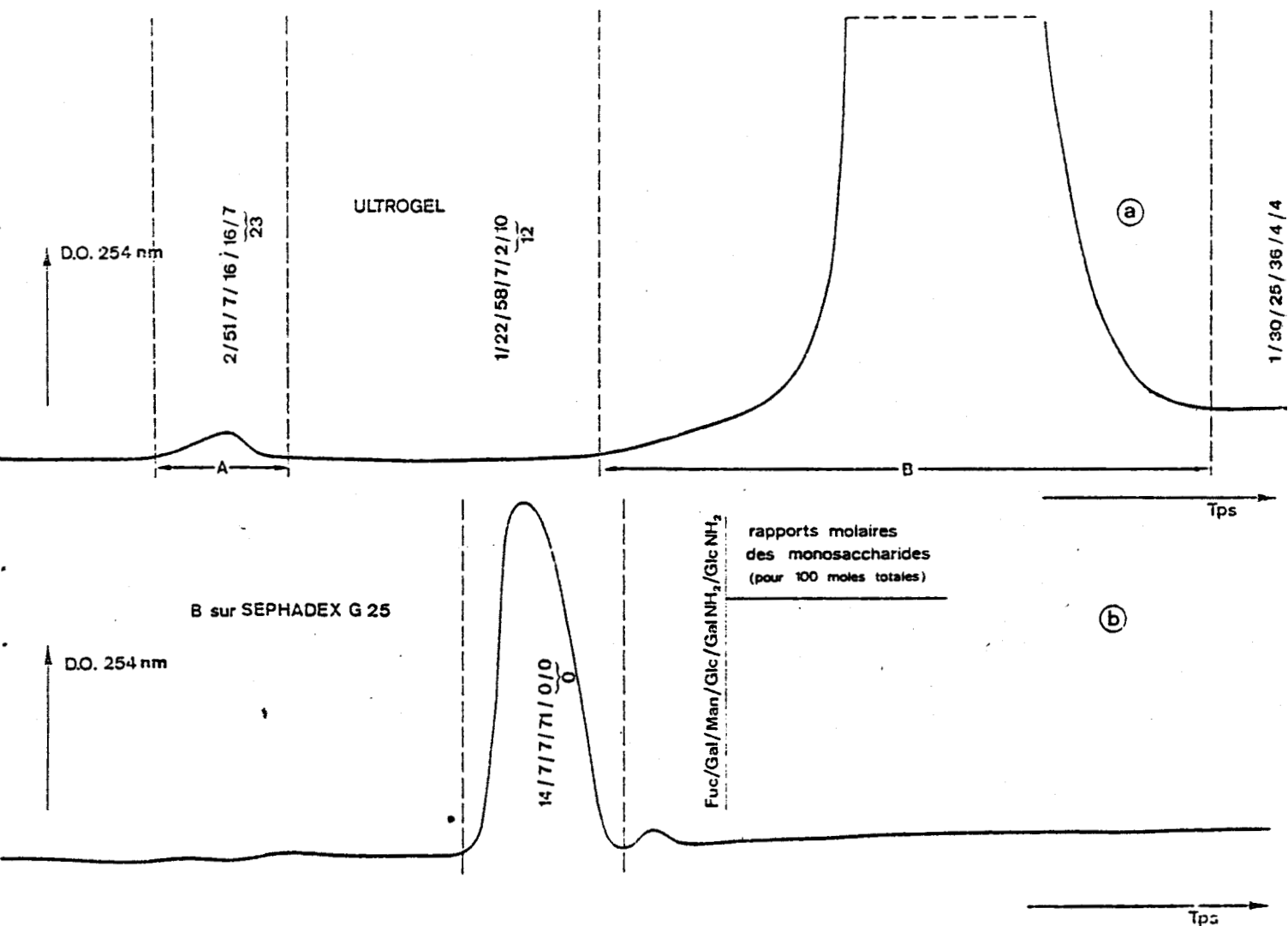
- Qualitativement on note la présence générale des mêmes monosaccharides suivants : fucose, mannose, galactose et glucose pour les oses neutres ainsi que gluco et galactosamine pour les osamines. Nous n'avons pas trouvé d'acides uroniques (bien que le dosage colorimétrique en détecte) ni d'acides sialiques.

- d'un point de vue quantitatif, pour doser les différents glucides contenus dans ces diverses sous-fractions, nous avons introduit 45 µg de mésoinositol. Le mésoinositol n'existe pas dans nos solutions. Il n'interfère donc pas avec les glucides présents et ne contamine pas les pics de sucres étudiés.

De la figure 5 nous pouvons conclure que dans la fraction macromoléculaire du cytosol, nous avons tout d'abord un premier pic avec surtout galactose et osamines dans un rapport 50/25; puis un palier qui montre une plus grande quantité de mannose toujours associé aux osamines dans un rapport 60/12; et enfin un pic B très important repris et repassé sur Sephadex G 25 qui montre, lui, une apparition du fucose et du glucose, alors que galactose et mannose diminuent beaucoup et que les osamines ne se retrouvent plus.

Dans la figure 6, nous notons une abondance à peu près constante du mannose, souvent associé aux osamines dans un rapport 40-60/20-10; ceci est très net et général et ce, pour toutes les quatre fractions alcool-soluble/insoluble, dialysable et adialysable.

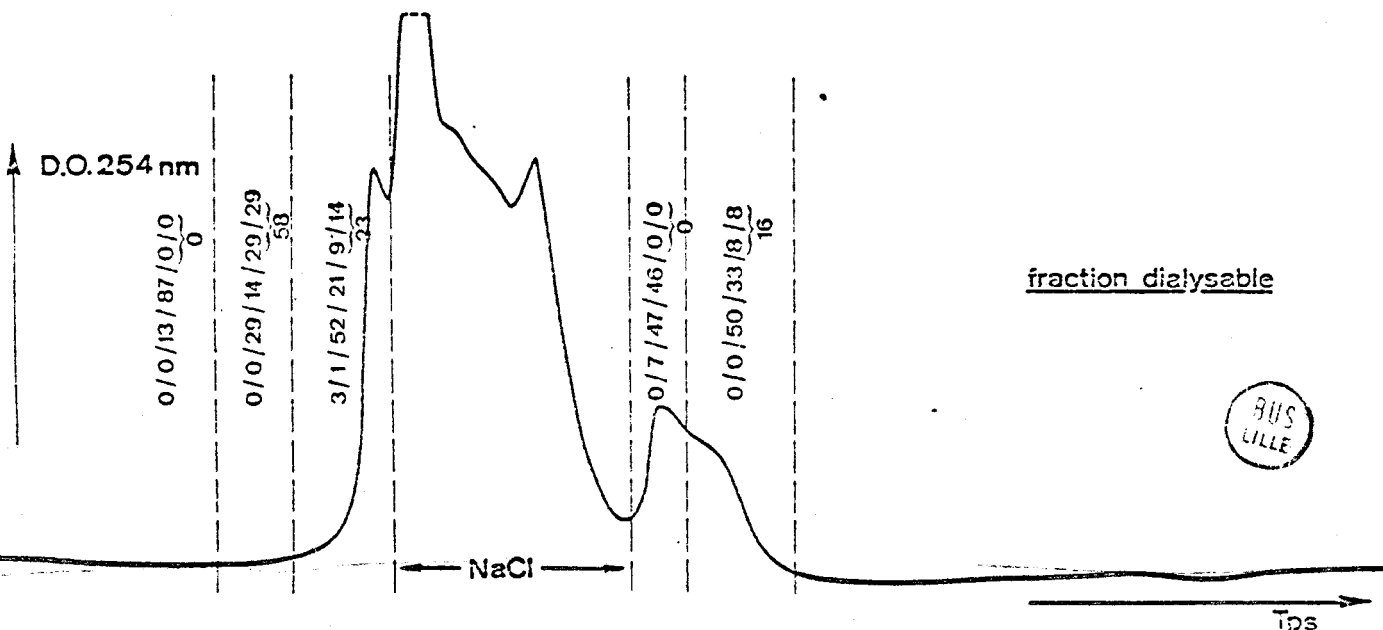
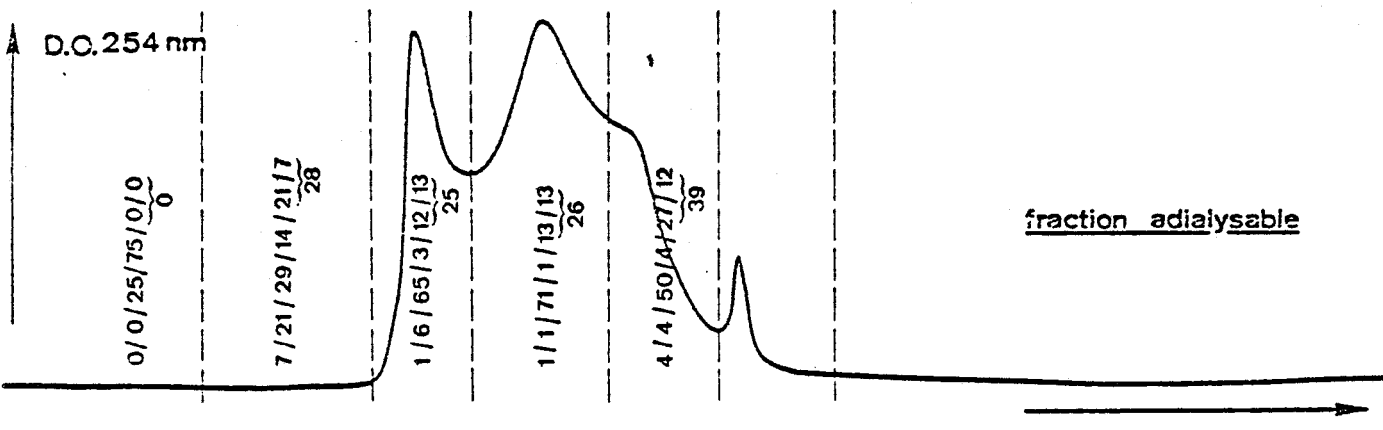
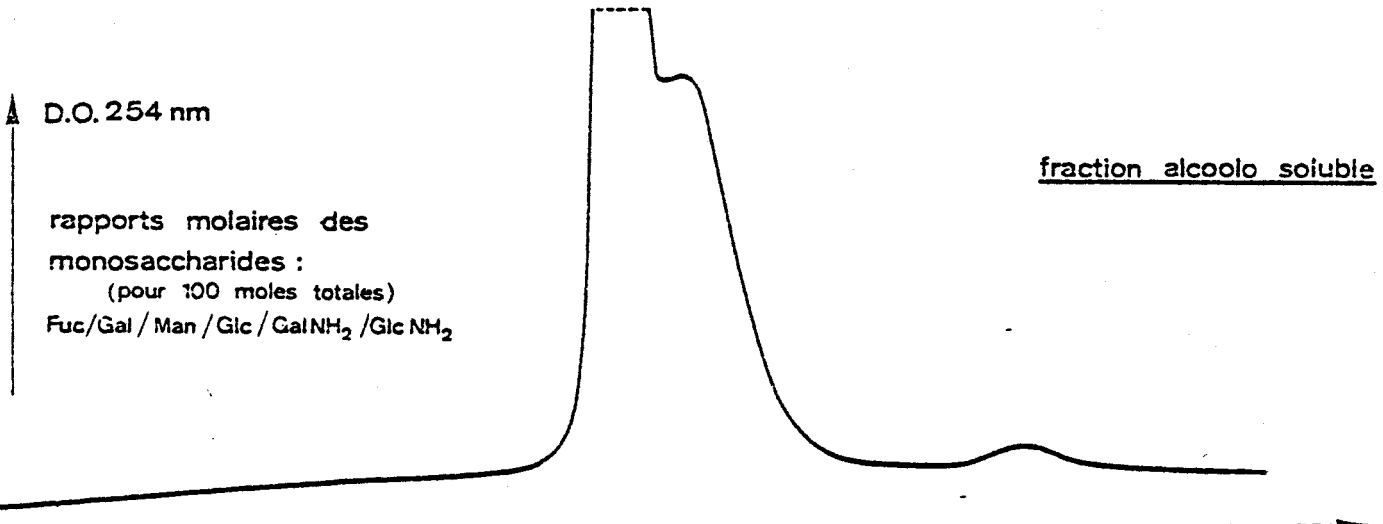
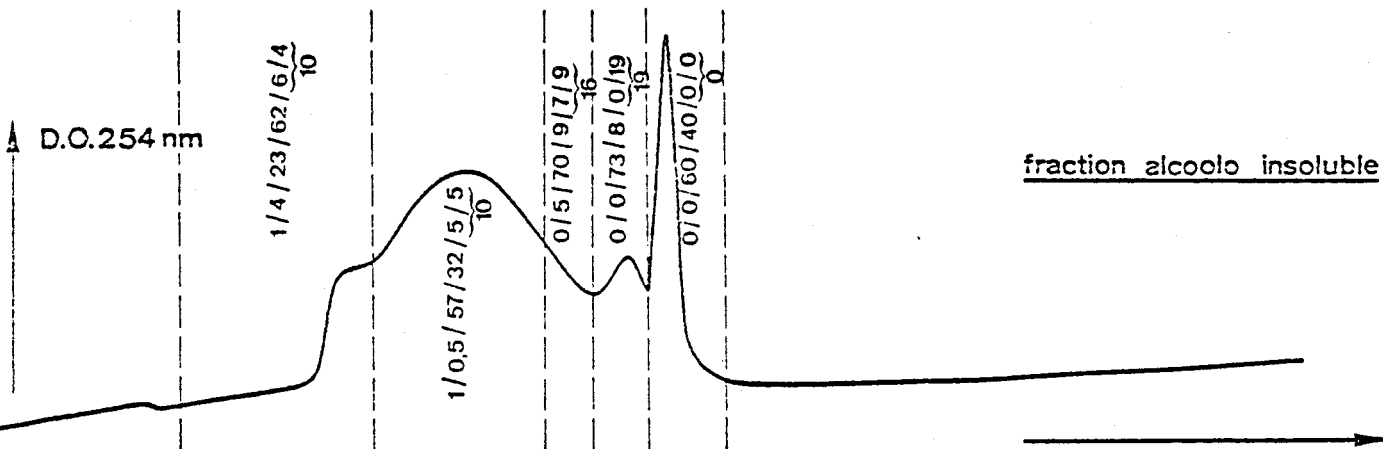
FIGURE 5 : Dosages des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse des différentes sous-fractions du cytosol du vitellus des ovocytes mûres de Seiche



CONCLUSION

L'étude biochimique du vitellus nous a donc d'abord confirmé sa richesse en sucres puis une étude plus approfondie qualitative et quantitative des divers monosaccharides nous montre une présence quelque peu constante du mannose associé aux osamines, ce qui nous a amenés à comparer ces résultats avec ceux que pouvaient donner l'étude de gonades jeunes. Y-a-t-il une évolution dans la composition qualitative et quantitative en sucres au cours de la maturation des ovocytes ?

FIGURE 6 : Détermination des rapports molaires en monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse des diverses sous-fractions du vitellus des ovocytes mûres de Seiche



II - ETUDE BIOCHIMIQUE DES GONADES JEUNES (FEMELLES)

A - PREPARATION DU MATERIEL

- 1) fractionnement par précipitation
- 2) fractionnement par chromatographie sur gel

B - DOSAGES COLORIMETRIQUES

- 1) dosages colorimétriques de la fraction adialysable totale
- 2) dosages colorimétriques des sous-fractions de l'adialysat

C - DOSAGES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

- 1) dosages dans la fraction adialysable totale
- 2) dosages dans les sous-fractions de l'adialysat

CONCLUSION

II - ETUDE BIOCHIMIQUE DES GONADES JEUNES (FEMELLES)

A - PREPARATION DU MATERIEL

Elles ont été prélevées sur des animaux très jeunes (5 cm < longueur < 8 cm) et dans ce cas le problème de la quantité de matériel s'est posé. Ce sont plusieurs gonades entières prélevées sur des animaux vivants qui ont été broyées ensemble dans de l'eau distillée. Nous avons travaillé sur le surnageant de cet homogénat et nous lui avons fait subir les deux types de précipitation des protéines.

1) Fractionnement par précipitation

- précipitation par l'alcool
- précipitation par une solution saline à diverses concentrations depuis l'eau de mer jusqu'à une solution de NaCl 20 % en passant par une concentration en NaCl 5 % et 10 %.

Comme pour les ovocytes mûres nous avons obtenu les quatre fractions finales :

- fraction alcool-soluble
- fraction alcool-insoluble
- fraction adialysable
- fraction dialysable.

2) Fractionnement par chromatographie sur gel

Le protocole expérimental est identique à celui suivi pour les ovocytes mûres :

- élution par de l'eau distillée dégazée,
- Sephadex G 25, Ultrogel,
- absorbance lue à 254 nm.

Nous obtenons de la même manière, les quatre courbes de la figure 7.

La fraction adialysable fut même sous-fractionnée, d'abord sur Ultrogel, puis le palier B repris et repassé sur Sephadex G 25 (figure 8).

Puis le même protocole expérimental des divers dosages fut suivi :

- dosages colorimétriques,
- dosages par chromatographie en phase gazeuse.

FIGURE 7 - Chromatographie sur gel de Sephadex G 25 des 4 fractions alcool-soluble/insoluble, adialysable et dialysable.

D.O. 254 nm

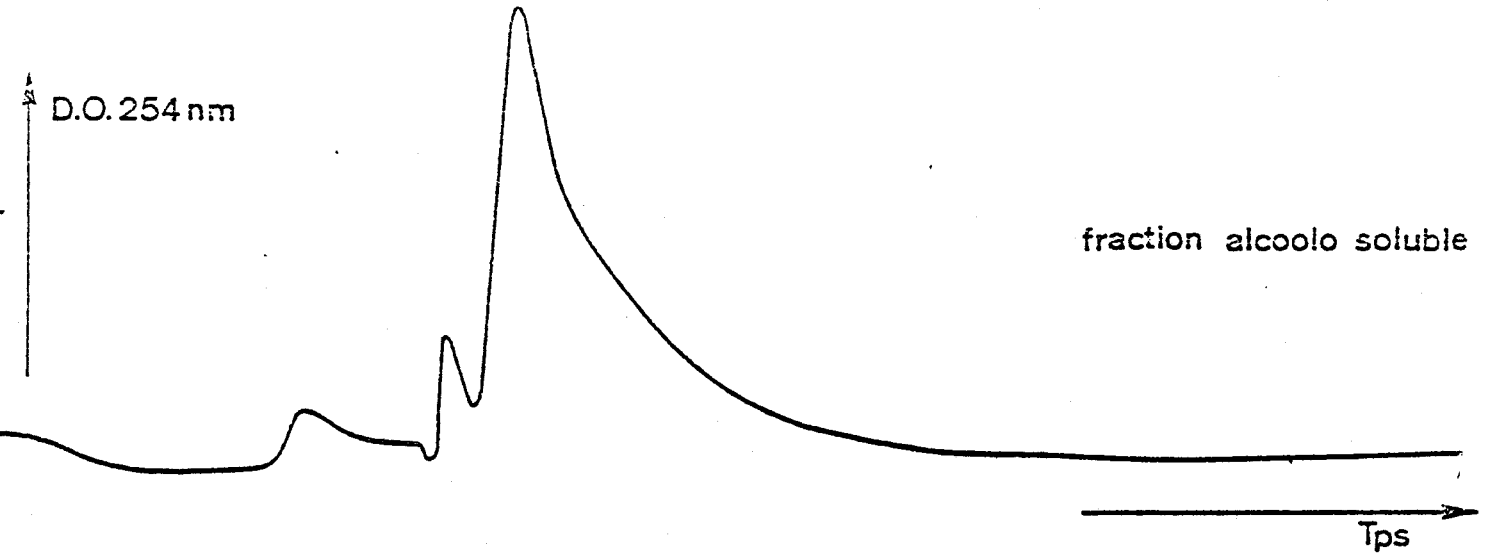
- 28 -

fraction alcool insoluble



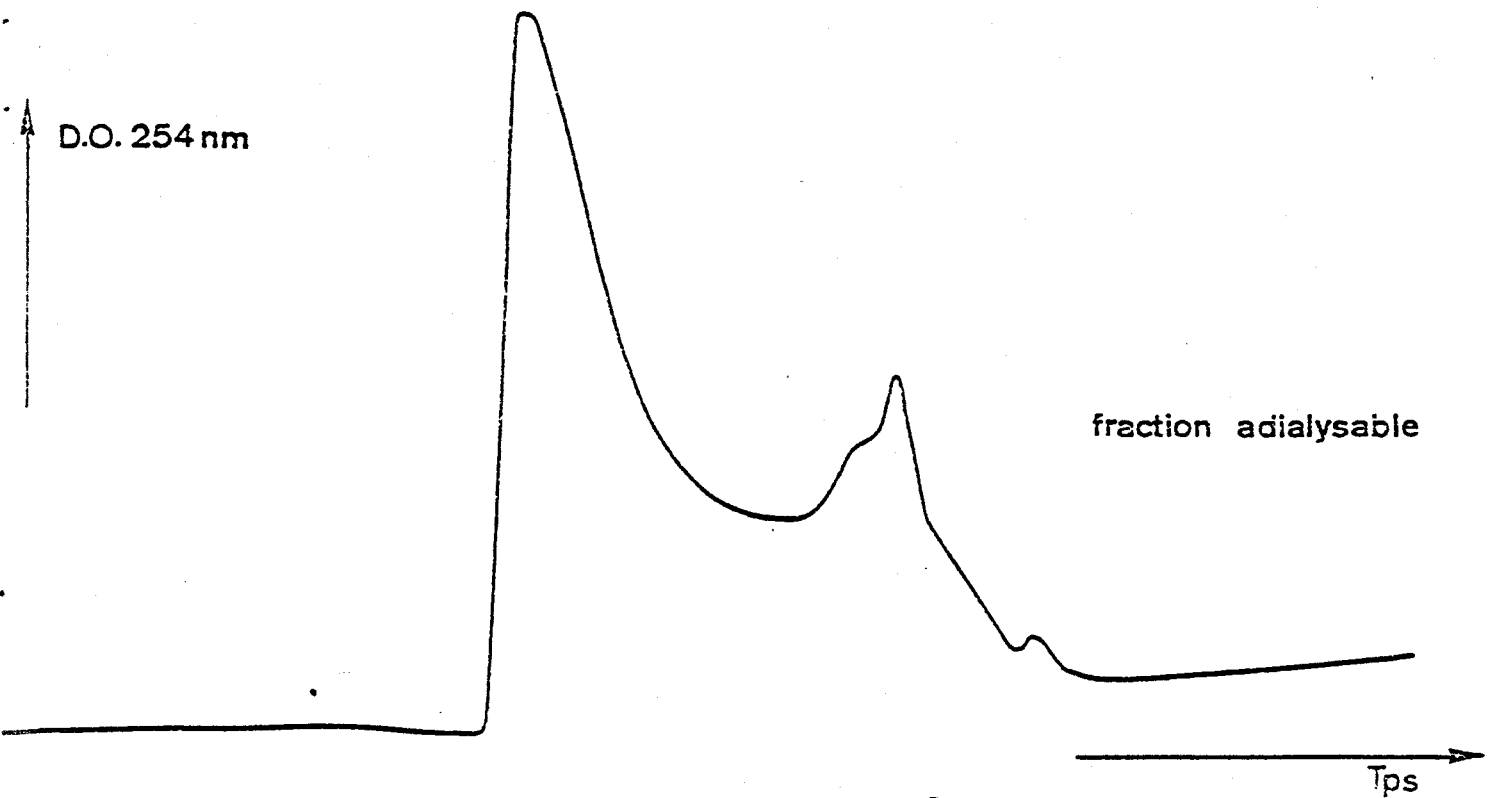
D.O. 254 nm

fraction alcool soluble



D.O. 254 nm

fraction adialysable

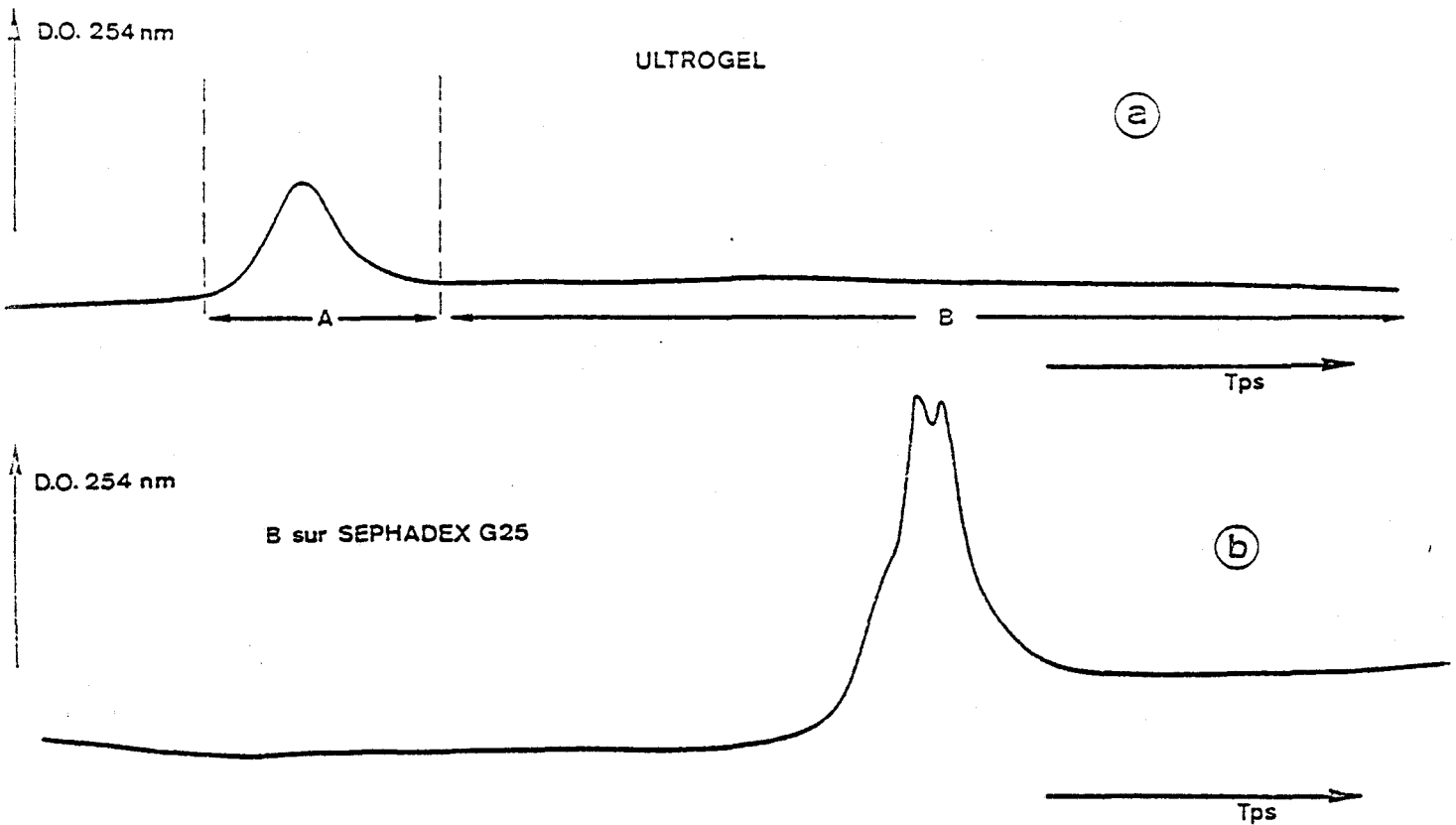


D.O. 254 nm

fraction dialysable



FIGURE 8 - Chromatographie sur Ultrogel de la fraction adialysable (a) (NaCl 10 %) et le palier B repassé sur Sephadex G 25 (b).



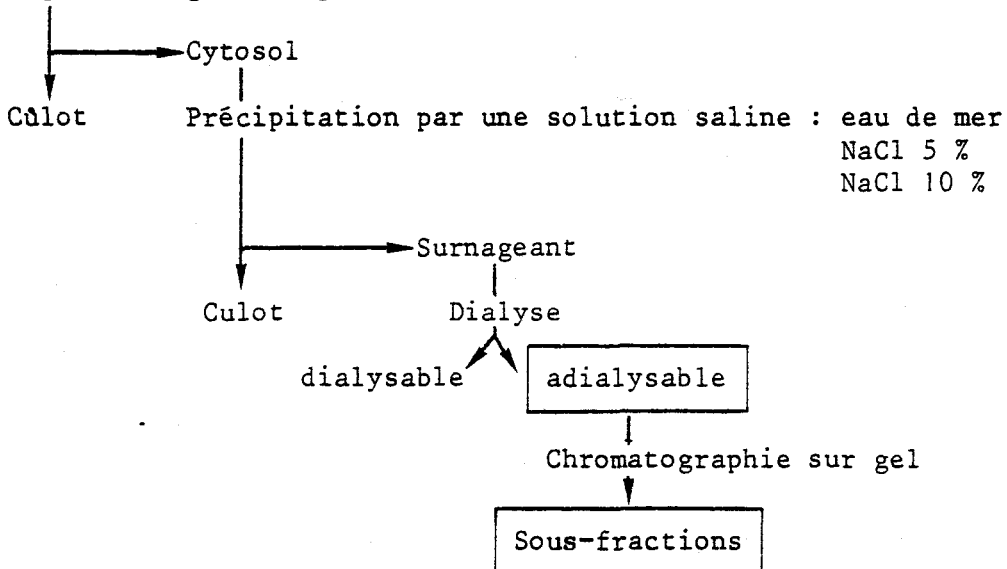
B - DOSAGES COLORIMETRIQUES

Nous avons donc entrepris le dosage des oses neutres totaux, des acides uroniques, des osamines et des protéines et ce :

- essentiellement sur la fraction adialysable brute tout d'abord,
- puis sous-fractionnée sur Sephadex G 25.

Schéma du fractionnement des gonades jeunes :

Homogénat de gonades jeunes



1) Dosages colorimétriques de la fraction adialysable totale

TABLEAU 5 - Dosages colorimétriques des protéines, oses totaux, acides uroniques et osamines sur la fraction adialysable (p1000).

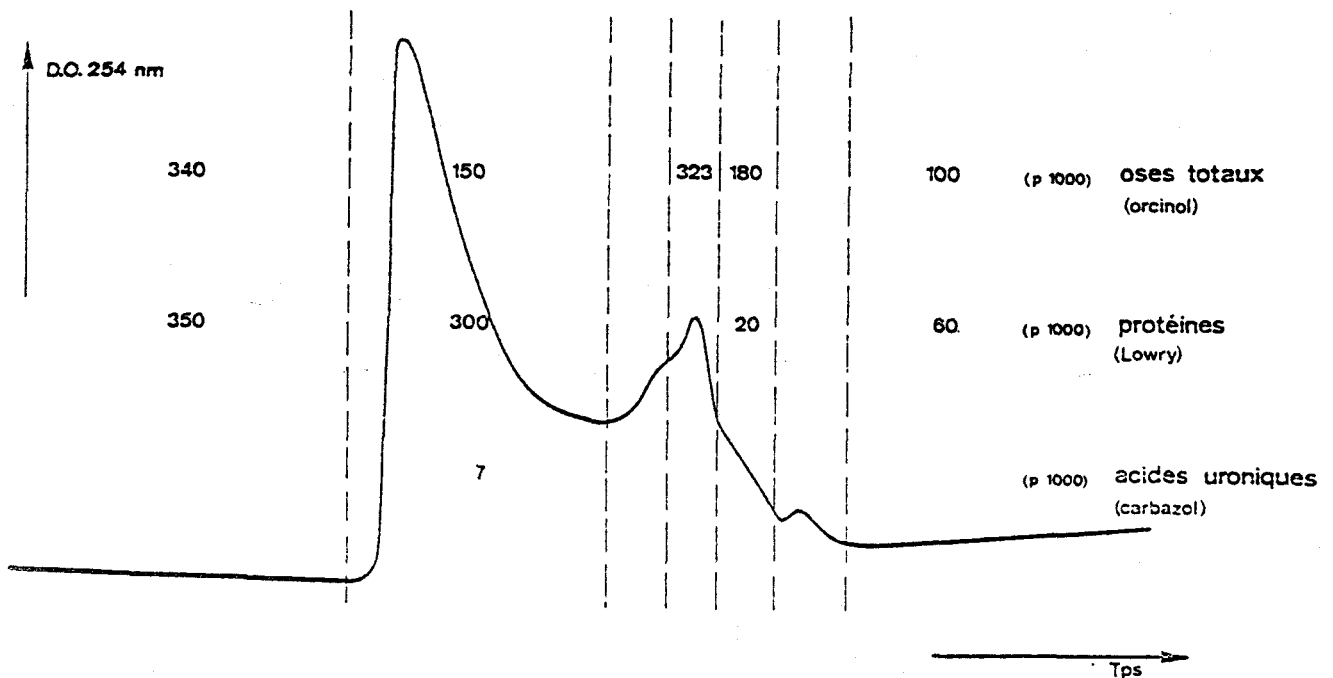
	Protéines	Sucres totaux	Acides uroniques	Osamines
eau de mer	40	39	0	
NaCl 5 %		44		0,3
NaCl 10 %		45		

Le peu de matériel explique le peu de dosages, mais en ce qui concerne les oses neutres, où pour toutes les concentrations, il y a eu dosage, on peut conclure, ici encore, que la concentration en NaCl a peu d'importance sur la masse de glycoprotéines précipitées et non précipitées : cette masse de sucres est d'environ 4 à 5 % dont nettement inférieure à celle rencontrée pour les ovocytes matures ($\approx 20\%$).

Puis nous avons entrepris de doser les diverses sous-fractions de cet adialysat après chromatographie sur gel de Sephadex G 25.

2) Dosages colorimétriques des sous-fractions de l'adialysat

FIGURE 9 : Dosages colorimétriques en oses totaux, en acides uroniques et en protéines des sous-fractions de l'adialysat après chromatographie sur gel de Sephadex G 25.



Après ce passage sur gel de Sephadex G 25, on observe un enrichissement en glucides de la majorité des sous-fractions.

Nous avons ensuite entrepris de déterminer qualitativement et quantitativement la nature des divers monosaccharides de la fraction adialysable et de ses sous-fractions.

C - DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Qualitativement, on rencontre toujours les mêmes sucres : fucose, galactose, mannose, glucose, galactosamine et glucosamine.

Quantitativement, voyons comment se répartissent les divers sucres dans cette fraction adialysable.

1) Dosage dans la fraction adialysable totale

TABLEAU 6 - Les monosaccharides de la fraction adialysable. Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Man : mannose ; Glc : glucose ; GalNH₂ : galactosamine ; GlcNH₂ : glucosamine.

a - pour 1 mole de galactose

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂ + GlcNH ₂	Masse totale (p1000)
eau de mer	2	1	5	2	12	32
NaCl 5 %	2		5	1	10	19
NaCl 10 %	1	1	3	1	7	36
NaCl 20 %	3	1	8	4	30	?

b - pour 10 moles de mannose

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂ + GlcNH ₂
eau de mer	4	2	10	4	24
NaCl 5 %	4		10	2	20
NaCl 10 %	3	3	10	3	23
NaCl 20 %	4	1,25	10	5	38

c - pour 100 moles totales

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂ + GlcNH ₂
eau de mer	9	5	23	9	55
NaCl 5 %	11		28	6	56
NaCl 10 %	8	8	23	8	54
NaCl 20 %	7	2	17	9	65

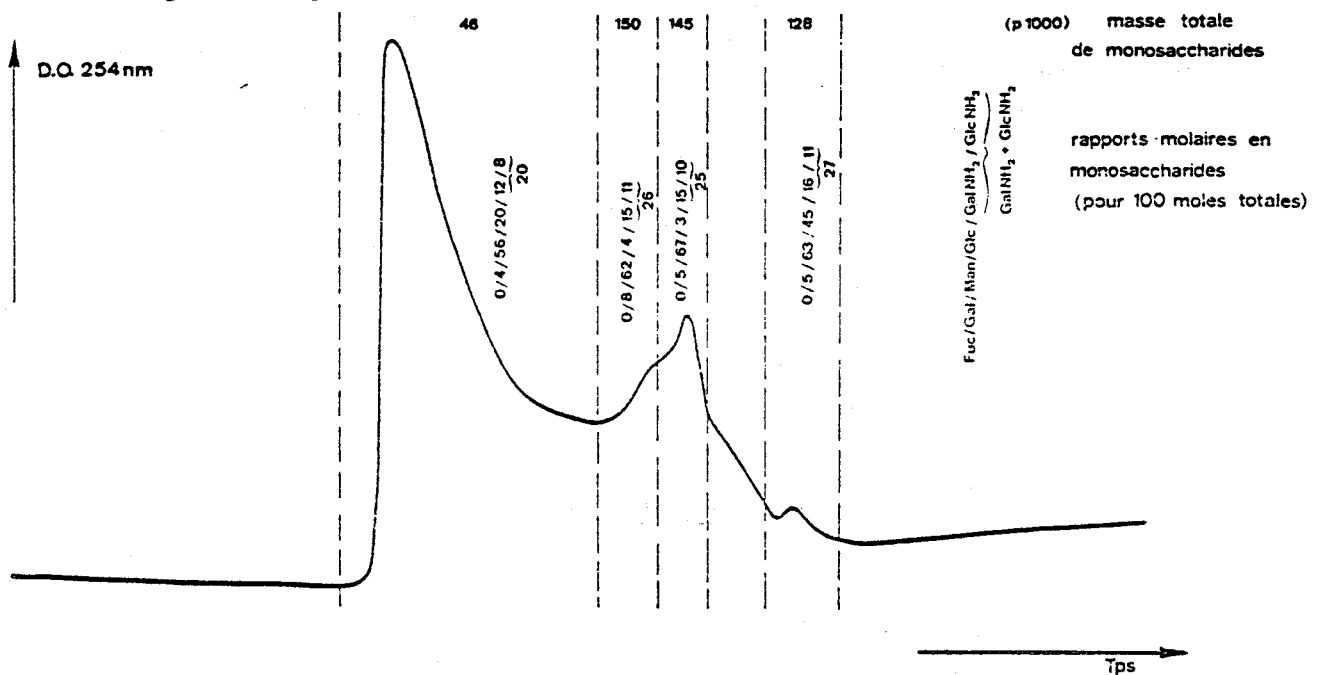
Le calcul de la masse totale des sucres donne, par cette méthode (addition de toutes les masses) un résultat presque identique, bien que légèrement inférieur à celui donné par les dosages colorimétriques (environ 3 à 4 % au lieu de 4 à 5 % donnée dans le tableau 5).

D'après ces divers tableaux, on peut déduire une prépondérance générale des sucres : mannose et osamines ; et cette fois encore, les rapports molaires étant à peu près similaires dans les quatre cas de concentration saline, on peut à nouveau conclure que cette concentration en sel influe peu sur la qualité et la quantité des masses glycoprotéiniques précipitantes.

Ensuite nous avons fait ces dosages sur les sous-fractions de l'adialysat.

2) Dosage dans les sous-fractions de l'adialysat

FIGURE 10 - Dosages des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse sur les sous-fractions de l'adialysat (après chromatographie sur gel de Sephadex G 25).



Dans ce cas encore, on constate un enrichissement général des différentes sous-fractions en monosaccharides totaux (idem figure 9).

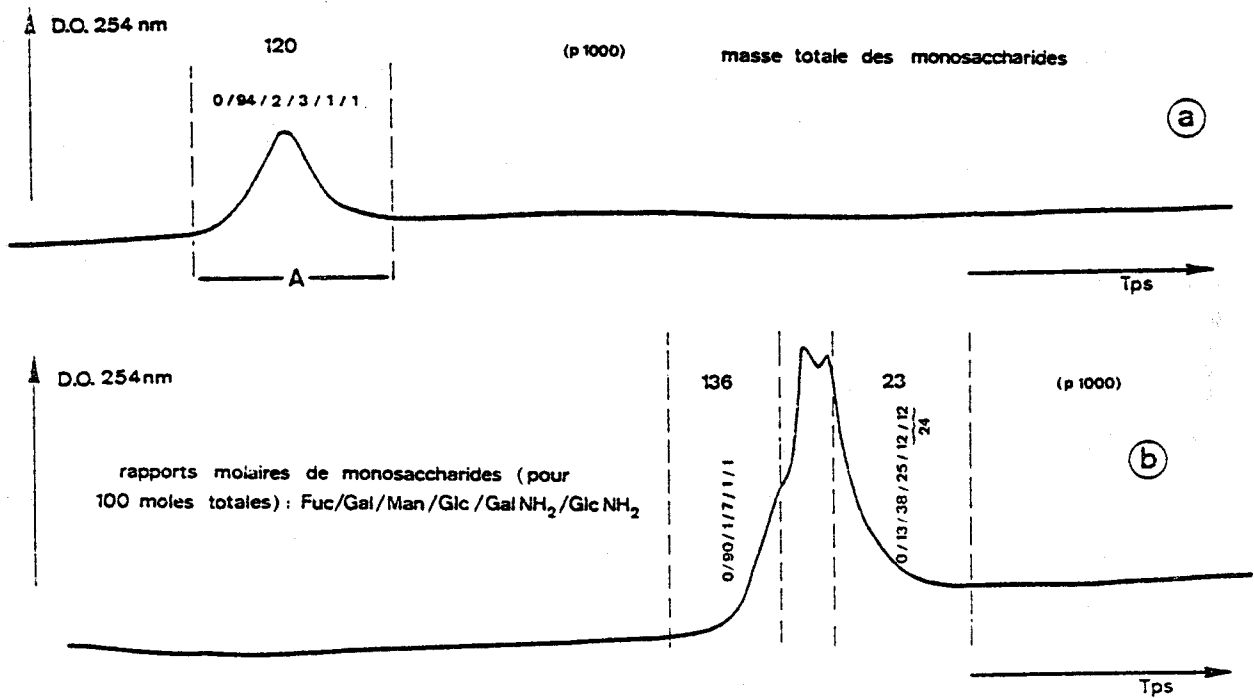
Il y a donc purification après sous-fractionnement par chromatographie sur gel de Sephadex G 25 ; cette purification va dans le sens d'un enrichissement en mannose (50-70 moles au lieu de 20-30 dans l'adialysat total) et d'un appauvrissement en osamines (30-20 moles au lieu de 55-65 dans l'adialysat total).

Donc ces gonades femelles jeunes présentent une grande richesse en mannose associé aux osamines dans le rapport (50-70/30-20). Ce rapport est identique à celui trouvé lors d'un même dosage effectué dans les mêmes conditions pour les ovocytes ^âmûres (figure 6).

Remarque

Nous avons également dosé les sous-fractions de l'adialysat (NaCl 10 %) après chromatographie sur Ultrogel puis Sephadex G 25.

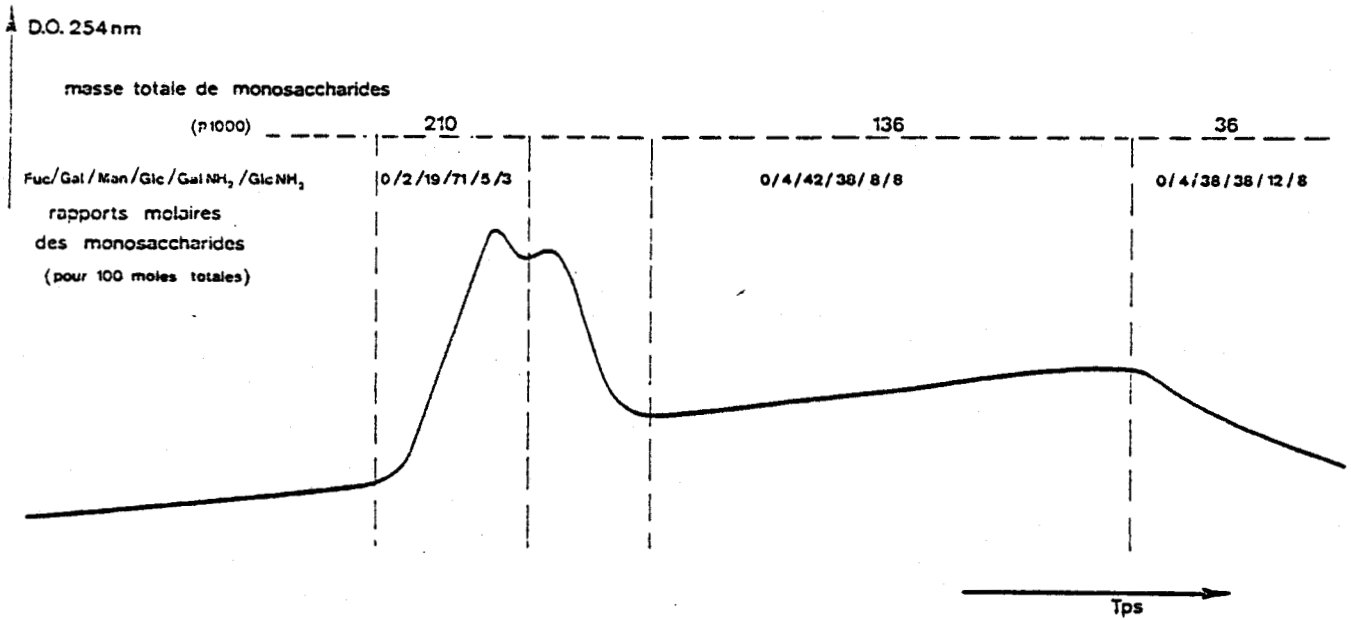
FIGURE 11 - Rapports molaires en monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse des sous-fractions de l'adialysat (NaCl 10 %) après chromatographie sur Ultrogel (a) puis Sephadex G 25 (b).



Dans ce dernier cas se pose le problème du galactose que l'on ne retrouve dans un tel rapport (90 % des moles totales) partout ailleurs.

Des recherches ultérieures demandent à être poursuivies, surtout que cette même fraction adialysable purifiée cette fois sur Séphadex G 50 donne, elle, des doses considérables de glucose (Figure 12).

FIGURE 12 - Rapports molaires en monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse des sous-fractions de l'adialysat (NaCl 10 %) après chromatographie sur gel de Sephadex G 50.



CONCLUSION

Globalement les gonades jeunes semblent un peu moins riches en sucres que les gonades âgées, si on considère tout au moins, la fraction adialysable totale.

Par contre, les sous-fractions obtenues après chromatographie sur gel de Sephadex semblent enrichies en monosaccharides et en mannose en particulier : même rapport molaire (mannose/osamines) que celui trouvé pour les sous-fractions correspondantes des ovocytes mûres. Le mannose n'est-il donc pas spécifique du sexe femelle, ni même du tissu germinal, ni même enfin du genre *Sepia* ? C'est pourquoi, nous avons entrepris une étude parallèle sur le testicule de Seiche, tout d'abord, ensuite sur les testicule et ovaire de Calmar, et enfin sur le sang mâle et femelle de Seiche.

III - LES DIFFERENTS TISSUS, LES DIFFERENTS GENRES

A - TESTICULE DE SEICHE (SEPIA OFFICINALIS)

1) dosages colorimétriques

a - sur toutes les fractions résultant de la précipitation
à l'eau de mer.

b - sur l'adialysat de la fraction "surnageant"

2) dosages des monosaccharides par chromatographie en phase
gazeuse

B - TESTICULE ET OVAIRE DE CALMAR (LOLIGO VULGARIS)

1) dosages colorimétriques

2) dosages par chromatographie en phase gazeuse

C - LE SANG

1) dosages colorimétriques

2) dosages par chromatographie en phase gazeuse

CONCLUSION

III - LES DIFFERENTS TISSUS, LES DIFFERENTS GENRES

A - TESTICULE DE SEICHE (SEPIA OFFICINALIS)

Cette richesse en mannose est-elle spécifique du sexe ? Pour répondre à cette question, nous nous sommes orienté vers des dosages effectués sur du testicule de Seiche :

- sur toutes les fractions résultant d'une précipitation saline à l'eau de mer,
- et sur l'adialysat de la fraction "surnageant".

1) Dosages colorimétriques

a - Sur toutes les fractions résultant de la précipitation à l'eau de mer (schéma)

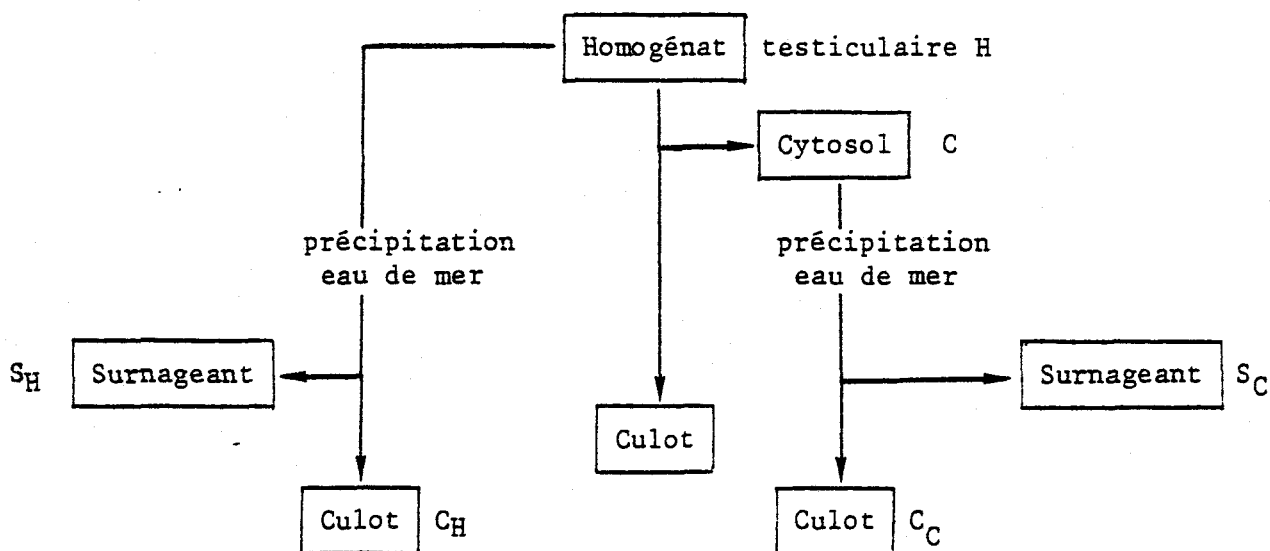


TABLEAU 7 - Dosages colorimétriques des protéines, oses totaux, acides uroniques effectués sur les fractions résultant d'une précipitation à l'eau de mer (p.1000)

	Homogénat testiculaire			Cytosol			Culot
	H	S _H	C _H	C	S _C	C _C	
Protéines	545	300	17	365	332		175
Oses totaux	190	85	0	36	35		40
Acides uroniques	3	20	0	6	20		27

Ce tableau nous amène à conclure que les culots sont pauvres en glycoprotéines alors que les surnageants et le cytosol en sont riches.

b - Sur l'adialysat de la fraction "surnageant"
(schéma)

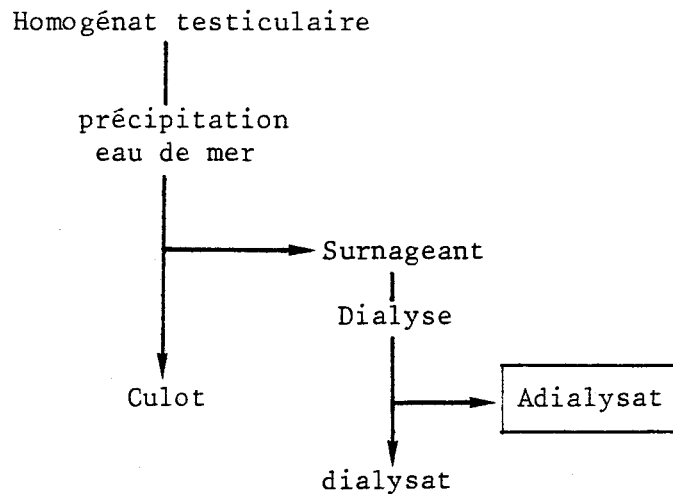


TABLEAU 8 - Dosages colorimétriques des protéines, oses totaux, acides uroniques et osamines effectués sur l'adialysat de la fraction "surnageant" (p. 1000).

	Adialysat de la fraction "surnageant"
protéines	167
oses totaux	50
Acides uroniques	9
Osamines	0,4

La fraction adialysable contient un assez faible pourcentage en sucres (5 %), en protéines (environ 17 %) ainsi qu'en acides uroniques et osamines (moins de 1 %).

Si on compare les deux tableaux, on note une plus grande richesse de la fraction "surnageant" total S_H (tableau 7) en tous les constituants, par rapport à sa fraction adialysable (tableau 8). En effet, cette fraction

"surnageant" regroupe toutes les glycoprotéines contenues dans la fraction adialysable (dosées dans le tableau 8) et celles contenues dans la fraction dialysable (non dosées). Nous sommes donc amenés à conclure que cette fraction dialysable contient beaucoup de ces petites molécules.

2) Dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse

TABLEAU 9 - Rapports molaires en monosaccharides de la fraction adialysable, résultant de deux précipitations salines (eau de mer, NaCl 20 %).

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Man : mannose ; Glc : glucose ; GalNH₂ : galactosamine ; GlcNH₂ : glucosamine.

a - pour 10 moles de mannose.

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂
adialysat (eau de mer)	10		10	60	20	10	30
adialysat (NaCl 20 %)	10		10	5	5	5	10

b - pour 100 moles totales

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂	Masse totale (p1000)
eau de mer	9		9	54	18	9	27	32
NaCl 20 %	29		29	14	14	14	28	22

Le dosage total (2 à 3 %) confirme le dosage colorimétrique des oses totaux (environ 5 %).

Qualitativement il y a présence de tous les monosaccharides rencontrés déjà dans les gonades femelles, notamment mannose et osamines. Ces sucres ne sont donc pas spécifiques du sexe. Le sont-ils du genre *Sepia* ?

C'est pourquoi, nous avons étudié le Calmar (*Loligo vulgaris*).

B - TESTICULE ET OVAIRE DE CALMAR (*LOLIGO VULGARIS*)

Le protocole expérimental est semblable à celui suivi pour le testicule de Seiche : nous avons fractionné ces tissus par précipitation saline (NaCl à diverses concentrations) ; puis nous avons effectué les dosages sur les adialysats seuls, ceux-ci n'ayant jamais été sous-fractionnés par chromatographie sur gel.

1) Dosages colorimétriques

TABLEAU 10 - Dosages colorimétriques en protéines, oses totaux, acides uroniques et osamines sur la fraction adialysable résultant de précipitations salines à diverses concentrations (p 1000) (eau de mer, NaCl 5 %, NaCl 20 %).

		protéines	oses	acides uroniques	osamines
ovaire	eau de mer	181	81	7	
	NaCl 5 %		102		2,5
	NaCl 20 %		88		
Testicule	eau de mer	218	48	0	
	NaCl 5 %		50		0,8
	NaCl 20 %		61		

De ce tableau, il ressort aussitôt une plus grande richesse de l'ovaire en sucres totaux (8-10 %) par rapport au testicule (5-6 %), par contre ce dernier paraît plus riche en protéines : 22 % au lieu de 18 % pour l'ovaire.

Dans les deux cas, le taux en acides uroniques et osamines est toujours faible < 1 %.

Voyons maintenant la nature de ces sucres.

2) Dosages par chromatographie en phase gazeuse

TABLEAU 11 - Rapports molaires en monosaccharides de la fraction adialysable résultant de précipitations salines à diverses concentrations (eau de mer, NaCl 5 %, NaCl 20 %).

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Man : mannose ; Glc : glucose ; GalNH₂ : galactosamine ; GlcNH₂ : glucosamine.

a - pour 1 mole de galactose

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂
ovaire	eau de mer	1	1	24	1	5	6	11
	NaCl 5 %	1	2	21	1	9	6	15
	NaCl 20 %	1	1	39	1	14	14	28
testicule	eau de mer	2	1	3	1	2	2	4
	NaCl 5 %	8	1	4	2	2	2	4
	NaCl 20 %	5	1	5	4	5	4	9

b - pour 10 moles de mannose

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂
ovaire	eau de mer	0,4	0,4	10	0,4	2	2,5	4,5
	NaCl 5 %	0,5	1	10	0,5	4	3	7
	NaCl 20 %	0,26	0,26	10	0,26	4	4	8
testicule	eau de mer	7	3	10	3	7	7	14
	NaCl 5 %	20	2,5	10	5	8	5	13
	NaCl 20 %	10	2	10	8	10	8	18

c - pour 100 moles totales

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂	Masse totale p 1000
ovaire	eau de mer	3	3	63	3	13	16	29	49
	NaCl 5 %	2,5	5	53	2,5	23	15	38	86
	NaCl 20 %	1	1	56	1	20	20	40	74
testicule	eau de mer	18	9	27	9	18	18	36	78
	NaCl 5 %	42	5	21	10	10	10	20	22
	NaCl 20 %	21	4	21	17	21	17	38	27

Donc chez le Calmar on retrouve exactement les mêmes monosaccharides que chez la Seiche ; le mannose n'est donc pas spécifique du genre.

Bien que mannose et osamines se retrouvent dans les deux sexes, il ressort nettement de ces tableaux que les deux monosaccharides se retrouvent en plus grande quantité dans l'ovaire.

Le caractère sexuel ne se trouve pas être la qualité mais la quantité.

Mais si ce mannose n'est pas spécifique ni du sexe, ni du genre, il ne doit pas l'être non plus du tissu, c'est pourquoi nous nous sommes tournés vers l'étude du sang, milieu transporteur.

C - LE SANG

Dans une première étape, nous avons fractionné du sang mâle (débarassé des éléments cellulaires par centrifugation) par précipitation saline et ce, aux diverses concentrations (eau de mer, NaCl 5 %, NaCl 20 %) et ce sont sur les adialysats résultants que nous avons dosé globalement les protéines, les oses totaux, les acides uroniques et les osamines, puis plus particulièrement qualitativement et quantitativement, les divers monosaccharides.

1) Dosages colorimétriques

TABLEAU 12 - Dosages colorimétriques des protéines, oses totaux, acides uroniques et osamines sur la fraction adialysable résultant de précipitations salines à diverses concentrations (eau de mer, NaCl 5 %, NaCl 20 %) (p.1000).

	protéines	oses totaux	acides uroniques	osamines
eau de mer	25	37	2	
NaCl 5 %		64		0,5
NaCl 20 %		44		

Dans ce cas encore, on retrouve toutes les catégories chimiques décrites précédemment : cela est normal car le sang est le milieu interne transporteur ; il y a peu de glucides (4 à 6 %), très peu de protéines et encore moins d'osamines et acides uroniques.

Voyons maintenant la nature des divers monosaccharides.

2) Dosages par chromatographie en phase gazeuse

TABLEAU 13 - Rapports molaires en monosaccharides de la fraction adialysable résultant de précipitations salines à diverses concentrations (eau de mer, NaCl 5 %, NaCl 20 %).

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Man : mannose ; Glc : glucose ; GalNH₂ : galactosamine ; GlcNH₂ : glucosamine.

a - pour 1 mole de galactose

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂
eau de mer	3	2	13	1	33		33
NaCl 5 %	6	2	25	1	6	16	22
NaCl 20 %	4	1	16	6	4	11	15

b - pour 10 moles de mannose

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂
eau de mer	2	1,5	10	0,8	25		25
NaCl 5 %	2,4	0,8	10	0,4	2,4	7	10
NaCl 20 %	2,5	0,6	10	4	2,5	7	10

c - pour 100 moles totales

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂	Masse totale p 1000
eau de mer	6	4	25	2	63		63	132
NaCl 5 %	11	2	45	2	11	29	40	38
NaCl 20 %	10	2	38	14	10	26	36	38

De tous ces tableaux, notons la présence constante de tous les oses rencontrés déjà dans les autres tissus, avec un rapport mannose/osamines qui domine toujours ; mais en plus notons la présence de fucose en quantité à peu près identique à celle trouvée chez les gonades femelles jeunes (tableau 6), inférieure à celle des testicules de Seiche et de Calmar mais supérieure à celle des ovocytes mûres. Quant à la masse totale, elle confirme les résultats trouvés par la méthode des dosages colorimétriques.

CONCLUSION

Donc, cette toute première approche confirme la présence du mannose partout dans l'animal. Etudions de façon plus précise ce milieu transporteur qu'est le sang et voyons si la différence des dosages quant aux rapports molaires notés dans le testicule et les ovocytes mûres se reflète dans les sexes mâle et femelle du sang, milieu de transport de ces divers éléments.

Nous avons approfondi l'étude biochimique du sang chez les mâles et les femelles de *Sepia officinalis*.

IV - LE SANG CHEZ LES MÂLES ET CHEZ LES FEMELLES

A - FRACTIONNEMENT DU SANG

- 1) précipitation des protéines par congélation
- 2) précipitation des protéines par une solution d'eau de mer

B - DOSAGES

- 1) colorimétrie
- 2) dosages par chromatographie en phase gazeuse

C - FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS "SURNAGEANTS" PAR CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHADEX ET DOSAGES DES SOUS-FRACTIONS

- 1) le mâle
- 2) la femelle

CONCLUSION

IV - LE SANG CHEZ LES MÂLES ET CHEZ LES FEMELLES

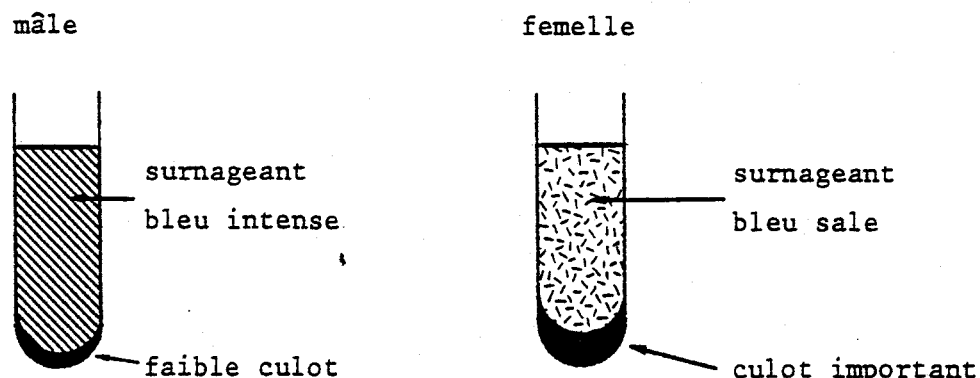
Le sang, bien que débarassé de ses éléments cellulaires, présente après décongélation, un trouble qui traduit une précipitation de certaines protéines par congélation.

A - FRACTIONNEMENT DU SANG

1) Précipitation des protéines par congélation

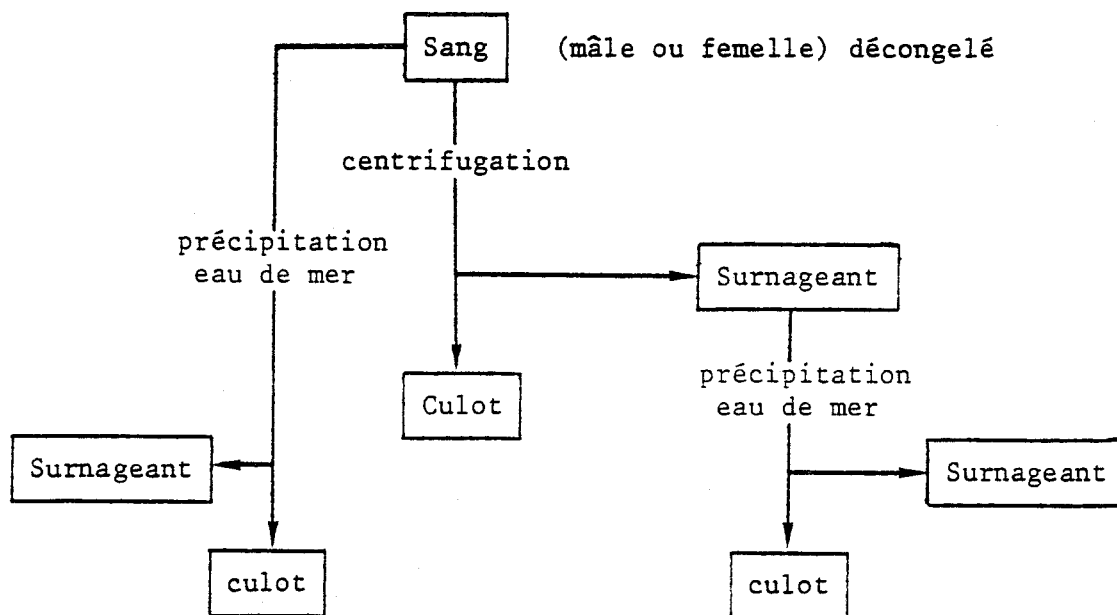
Le sang décongelé est centrifugé 20 minutes à 5000 tours/minute.

FIGURE 13 - Schéma des résultats de centrifugation des sangs mâle et femelle décongelés



2) Précipitation des protéines par une solution d'eau de mer

Nous pratiquons donc une précipitation par de l'eau de mer sur du sang total (mâle et femelle) et sur le surnageant obtenu après centrifugation (schéma).



Nous avons donc, dans chaque cas, culot et surnageant que nous dosons systématiquement par colorimétrie et chromatographie en phase gazeuse.

B - DOSAGES

1) Colorimétrie

TABLEAU 14 - Dosages colorimétriques en protéines, oses totaux et acides uroniques des différentes fractions du sang (p. 1000).

	SANG DECONGELE						
	Total	précipitation eau de mer		Total	centrifugation		
		surnageant	culot		surnageant	culot	
		précipitation eau de mer			précipitation eau de mer		
		surnageant	culot		surnageant	culot	
chez le mâle							
protéines	490	450	8	350	330	X	130
oses totaux	40	22	0	36	20	X	0
acides uroniques	4	8	0	4	29	X	0
chez la femelle							
protéines	485	400	13	290	250	X	180
oses totaux	70	23	0	66	64	X	0
acides uroniques	5	8	0	4	26	X	1

décongelés

Les deux sangs mâle et femelle sont également riches en protéines. Mais la congélation altère plus de protéines chez la femelle, celles-ci précipitant sous forme de culot plus important que chez le mâle (figure 13). Par contre, chez le mâle, le surnageant est plus riche en protéines solubles : serait-ce l'hémocyanine donnant sa couleur bleu intense au surnageant mâle ? (figure 13).

En ce qui concerne les sucres, le sang femelle est généralement plus riche surtout en sucres solubles surnageants (6 à 7 % chez la femelle au lieu de 3 à 4 % chez le mâle).

Ensuite nous avons dosé qualitativement et quantitativement par chromatographie en phase gazeuse, les divers monosaccharides sur les fractions les plus abondantes : surnageant et culot de sangs préalablement congelés.

2) Dosages par chromatographie en phase gazeuse

TABLEAU 15 - Rapports molaires en monosaccharides des fractions "surnageant" et "culot" des sangs préalablement congelés.

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Man : mannose ; Glc : glucose ; GalNH₂ : galactosamine ; GlcNH₂ : glucosamine.

a - pour 1 mole de galactose

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂
sang mâle	surnageant	11	1	40	5	8	21	29
	culot	4	1	16	2	3	8	11
sang femelle	surnageant	2		6	1	2	3	5
	culot	4	1	17	2	4	8,5	12,5

b - pour 10 moles de mannose

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂
sang mâle	surnageant	3	0,25	10	1,25	2	5	7
	culot	2,5	0,625	10	1,25	2	5	7
sang femelle	surnageant	3		10	2	3	5	8
	culot	2	0,6	10	1	2	5	7

c - pour 100 moles totales

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂	Masse totale p 1000
sang mâle	surnageant	13	1	47	6	9	24	33	26
	culot	12	3	47	6	9	24	33	27
sang femelle	surnageant	14		43	7	14	21	35	27
	culot	11	3	47	6	11	22	33	26

Si on compare les masses totales de glucides (culot et surnageant) on constate qu'elles sont à peu près équivalentes pour les deux sexes ; par contre le surnageant femelle est légèrement plus riche en monosaccharides totaux que son culot, alors que chez le mâle c'est le contraire.

Qualitativement il y a exactement les mêmes oses dans les deux fractions "culot" et "surnageant" et ce pour les deux sexes.

Quantitativement il y a très peu de différence :

- le surnageant femelle est plus riche en fucose que le surnageant mâle (14 moles au lieu de 13) et le rapport mannose/osamines y est de 43/35 chez la femelle alors qu'il est de 47/33 chez le mâle.
- les culots sont dans ce cas presque identiques : sauf chez le mâle où celui-ci est plus riche d'une mole de fucose par rapport à la femelle.

Donc il ressort de ces tableaux (14 a, b, c) que les sangs ont des compositions en monosaccharides similaires chez les deux sexes.

C - FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS "SURNAGEANTS" PAR CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHADEX ET DOSAGES DES SOUS-FRACTIONS

Notus avons ensuite fractionné les fractions "surnageants" mâle et femelle sur gel de Sephadex G 50 et nous avons dosé les différentes sous-fractions par colorimétrie et chromatographie en phase gazeuse.

Notons tout d'abord que quel que soit le sexe, les résultats ne sont pas toujours répétitifs et qu'il existe une variabilité d'un fractionnement à l'autre. Rassemblons les résultats dans un ensemble de figures.

1) Le mâle (figure 14 : a, b, c, d)

Quelle que soit la courbe, notons que dans l'ensemble :

- chaque sous-fraction est pauvre en sucres (< 5 %),
- il y a une apparition générale du fucose et le maintien du couple mannose-osamines
- il y a une abondance de glucose dans les fractions initiale et finale qui sont elles-mêmes très riches en oses totaux (10 à 20 %) : ce glucose pourrait cependant être une contamination due au gel lui-même.

En figure 14 d, notons un pic qui sort très isolé en fin de fractionnement ; il est, lui aussi, riche en glucides (20 %) et spécialement en glucose (94 % des moles totales).

Nous avons également fait un fractionnement sur Sephadex G 25 (figure 15).

FIGURE 14 - Dosages colorimétriques (en protéines, oses totaux et acides uro-
niques) et par chromatographie en phase gazeuse des sous-fractions
d'un surnageant de sang mâle après chromatographie sur Séphadex G 50.

a, b : sur des appareils différents

b, c : sur le même appareil, mêmes paramètres.

c, d : sur le même appareil, un seul paramètre différent : le
débit (plus rapide en d)

* masse totales des monosaccharides p.1000

** masse d'oses totaux p.1000 (orcinol)

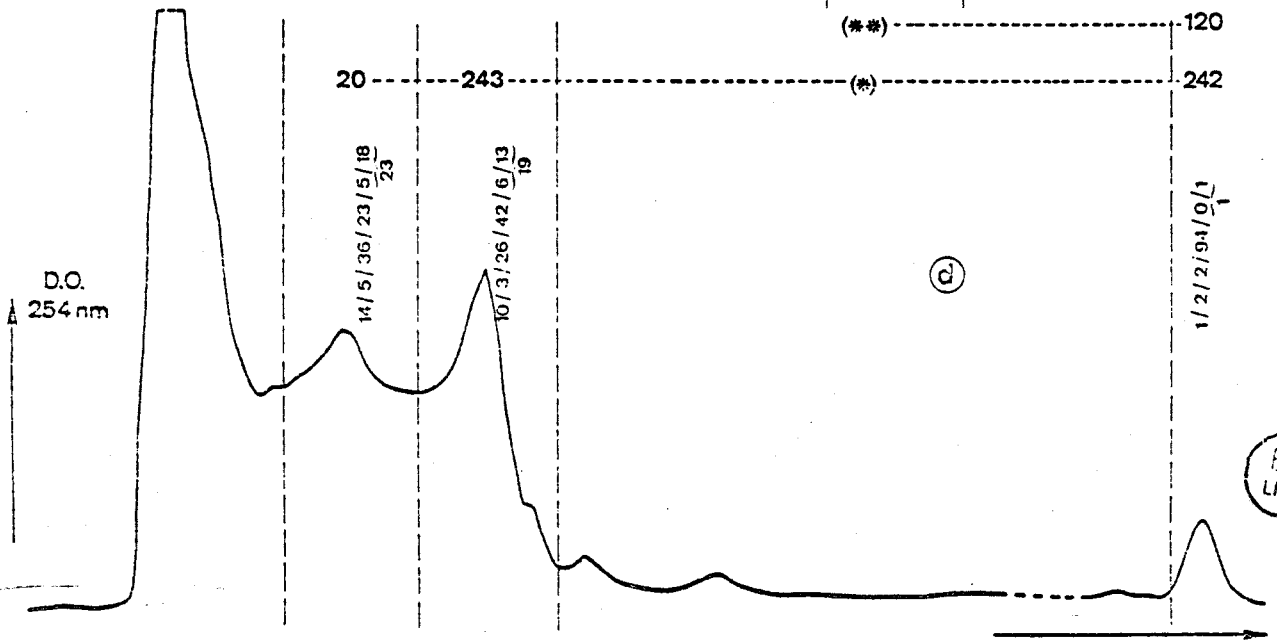
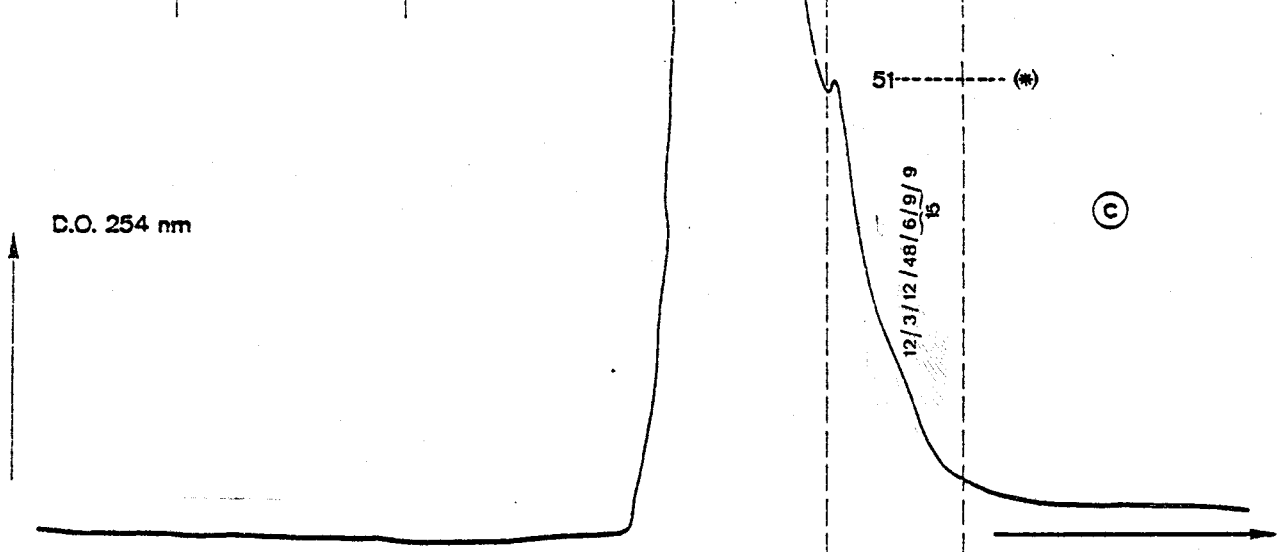
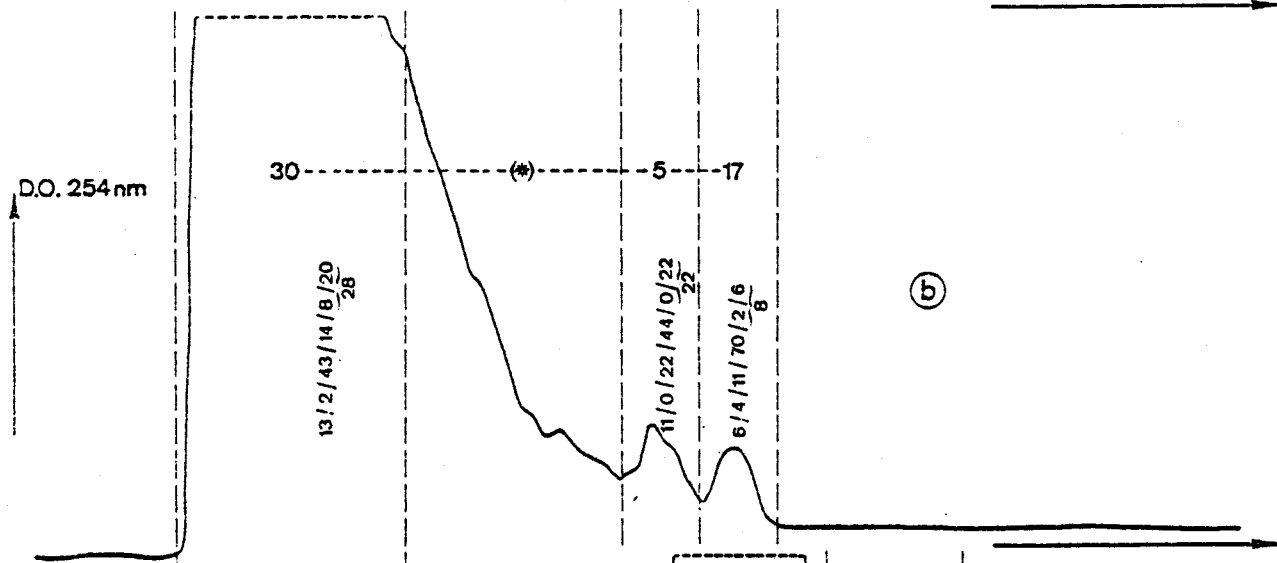
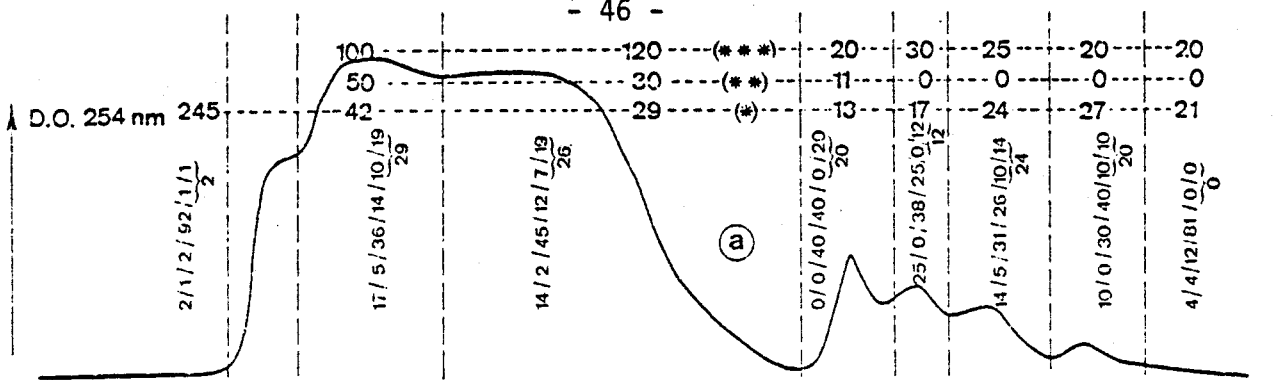
*** masse de protéines p.1000 (Lowry)

Rapports molaires des monosaccharides pour 100 moles totales.

Fuc/Gal/Man/Glc/GalNH₂ / GlcNH₂/A.S.

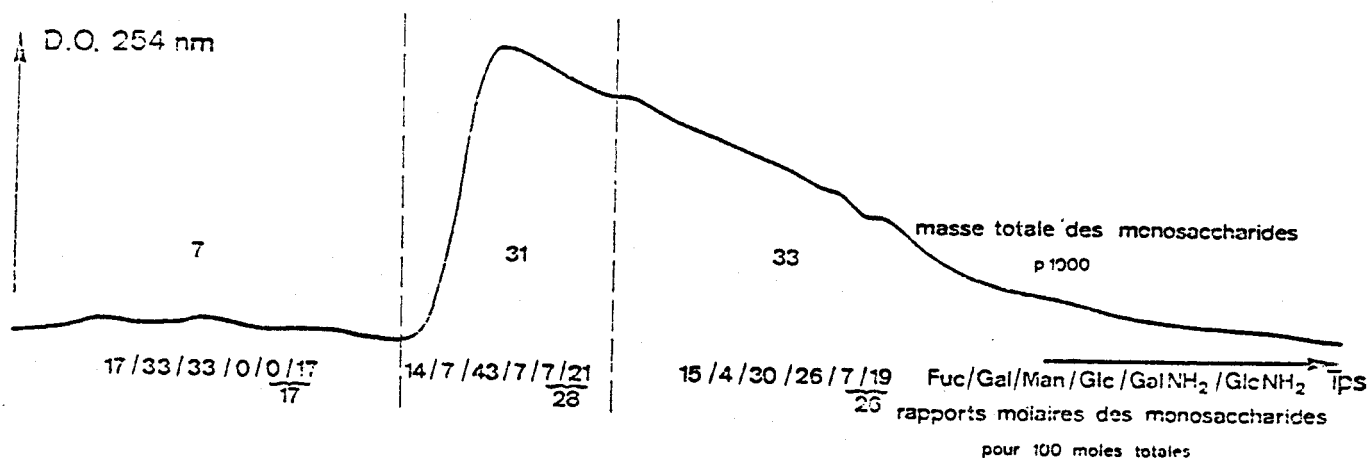
GalNH₂ + GlcNH₂

A.S. : Acides sialiques



BUS LILLE

FIGURE 15 - Dosages des monosaccharides effectués sur les sous-fractions résultant d'une chromatographie sur Sephadex G 25 d'un surnageant de sang mâle.



Nous observons beaucoup moins de glucose ce qui pourrait indiquer que le glucose détecté dans les fractionnements précédents est en grande partie une contamination due au gel de Sephadex G 50.

On constate toujours la présence de l'association fucose/mannose/osamines.

Comparons à présent ces résultats avec ceux donnés pour le sang de la femelle.

2) La femelle

Les fractionnements sont effectués dans les conditions standards (figure 16).

On peut tirer les mêmes conclusions que précédemment, à savoir :

- grande richesse, en début et en fin de fractionnement, en oses totaux et surtout en glucose ;
- un pic très tardif identique à celui vu chez le mâle.

Plus particulièrement on peut noter :

dans la première courbe (a) - une grande abondance de fucose (25 % à presque 100 %) dans la fraction macromoléculaire,

- un peu plus de fucose (12 à 25 %) et surtout de glucose (60 à 75 %) dans les autres fractions, et donc moins de mannose (8 à 12 %) et moins encore d'osamines (zéro à 1 %).

FIGURE 16 - Dosages colorimétriques de protéines et oses totaux et dosages par chromatographie en phase gazeuse des sous-fractions résultant de chromatographies sur gel de Sephadex G 50 d'un surnageant de sang femelle.

a , b : sur le même appareil; un seul paramètre différent le débit (plus rapide en b).

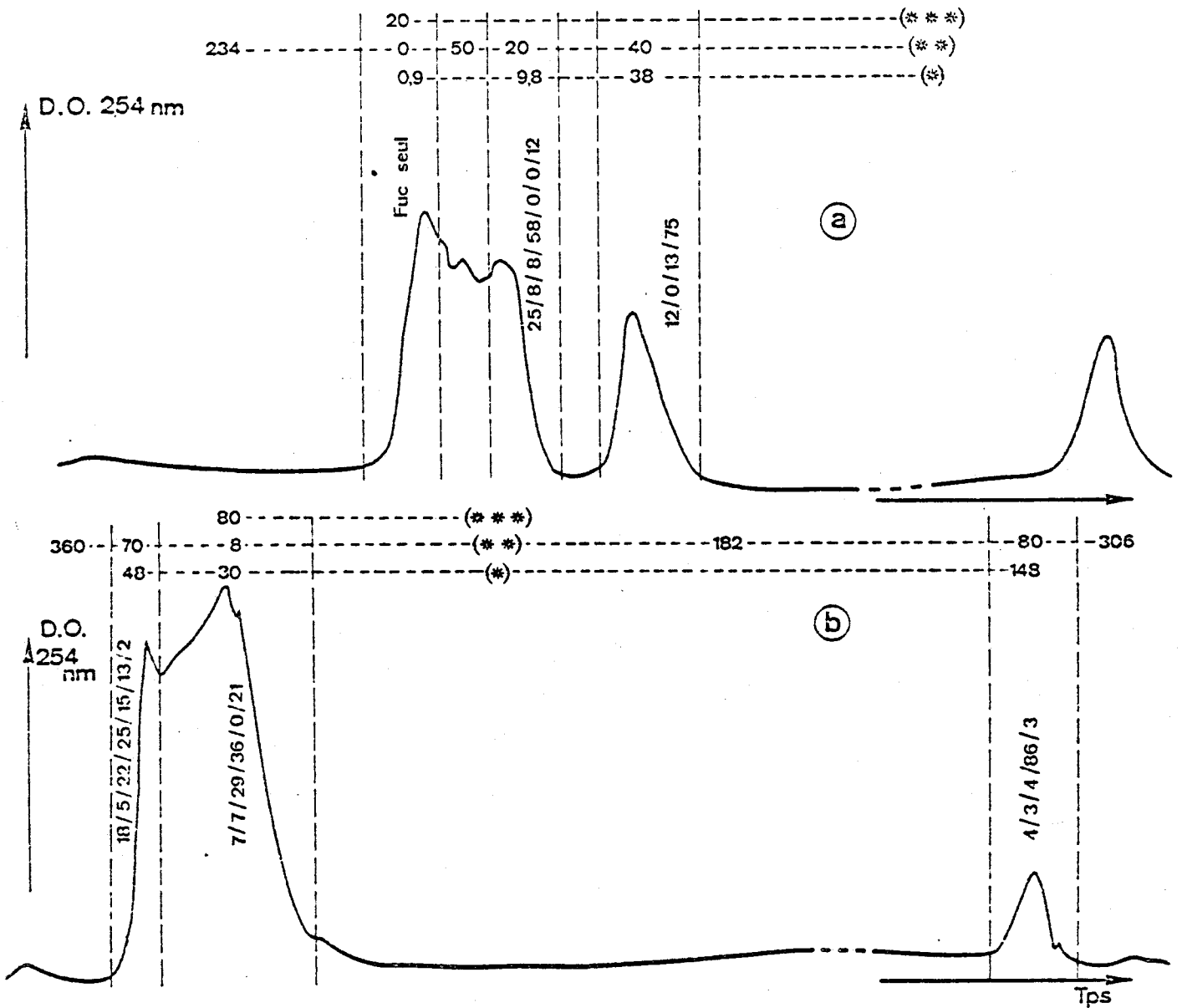
* masse totale de monosaccharide p.I000

** masse d'oses totaux p.I000 (orcinol)

*** masse de protéine p.I000 (Lowry)

Rapports molaires des monosaccharides pour 100 moles totales

Fuc/Gal/Man/Glc/ $\frac{\text{GalNH}_2}{\text{GalNH}_2 + \text{GlcNH}_2} / \frac{\text{GlcNH}_2}{\text{GalNH}_2 + \text{GlcNH}_2}$



Par contre un second fractionnement (Figure 14 b) effectué dans les mêmes conditions sauf pour de débit (plus rapide) montre une plus grande similitude avec le mâle fucose/mannose/osamines dans le rapport 15-20/30/30-20.

Ces deux courbes a et b assez peu semblables confirment donc le peu de répétitivité d'un fractionnement à l'autre.

CONCLUSION

Tous ces divers fractionnement et dosages concourent à montrer une grande similitude de composition des sangs mâle et femelle.



CONCLUSIONS GENERALES

Nous nous sommes proposé d'étudier dans un premier temps la constitution biochimique du vitellus puis nous avons étendu notre étude à d'autres tissus (testicule, sang) ainsi qu'à d'autres genres (*Loligo vulgaris*), tout ceci nous a amenés à constater que le mannose n'était pas le sucre spécifique de la gonade femelle mûre.

Nous avons donc fractionné les tissus de diverses manières : précipitation par l'alcool, puis par une solution saline (nous n'avons pas retenu ce premier type de fractionnement car les organes étaient en fait très riches en lipides, il convenait moins que le second type). De plus cette précipitation saline nous parut intéressante surtout par le fait que nous pouvions comparer divers types de concentrations en ce sel : les tableaux récapitulatifs confirment que cette même concentration influe peu sur la nature et les masses finales des fractions micro et macromoléculaires.

Nous nous sommes donc intéressés, dans la majorité des cas, à la fraction adialysable résultant de précipitations par une solution saline et c'est cette dernière qui fut souvent sous-fractionnée par chromatographie sur Sephadex G 50 et G 25 ou Ultrogel. Enfin par colorimétrie ou chromatographie en phase gazeuse nous avons dosé qualitativement et quantitativement les divers constituants biochimiques de tous les compartiments cellulaires résultants. Les résultats sont donnés dans deux tableaux récapitulatifs (tableaux 16 et 17)

Nous pouvons noter aussitôt une grande différence dans la composition générale des divers tissus; les gonades mûres femelles paraissent beaucoup plus riches en protéines et en oses totaux que ces mêmes gonades mais beaucoup plus jeunes, et que les autres tissus : testicule et sang.

D'autre part, la constitution en monosaccharides est qualitativement identique dans les tissus des deux sexes ainsi que dans les deux genres étudiés. Par contre la différence apparaît au niveau des rapports molaires.

L'association mannose-osamines paraît être un caractère femelle : il est plus riche en mannose dans le cas de la gonade mûre (rapport 55-65/40-25) alors que ce même rapport s'enrichit en osamines (20-40/55-60) dans le cas de la gonade femelle jeune. Dans tous les autres tissus ce rapport est beaucoup plus faible et oscille entre 20-30/30-20 et 30-40/30-20.

TABLEAU 16 - Dosages colorimétriques en protéines, oses totaux, acides uroniques et osamines des fractions adialysables résultant de précipitations salines des divers tissus (p1000).

		Protéines (Lowry)	sucres totaux (orcinol)	Acides uroniques (carbazol)	osamines (Elson Morgan)
gonade jeune femelle	eau de mer	40	39	0	
	NaCl 5 %		44		0,3
	NaCl 10 %		45		
ovocytes mûtures	eau de mer	405	190	5	
	NaCl 5 %	224	218	3	4
	NaCl 10 %	348	210	1,5	
	NaCl 20 %	88	203	0	
ovocytes mûtures (ultracentrifugation)	NaCl 20 %	486	260		
ovaire calmar	eau de mer	181	81	7	
	NaCl 5 %		102		2,5
	NaCl 20 %		88		
testicule Seiche	eau de mer	167	40	9	
	NaCl 5 %		60		0,4
	NaCl 20 %		47		
testicule Calmar	eau de mer	218	48	0	
	NaCl 5 %		50		0,8
	NaCl 20 %		61		
sang de Seiche mâle	eau de mer	25	37	2	
	NaCl 5 %		64		0,5
	NaCl 20 %		44		

TABLEAU 17 - Rapports molaires en monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse des mêmes fractions adialysables.

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Man : mannose ; Glc : glucose ; GalNH₂ : galactosamine ; GlcNH₂ : glucosamine.

a - pour 1 mole de galactose

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂
gonade jeune femelle	eau de mer	2	1	5	2	3	9
	NaCl 5 %	2		5	1	10	
	NaCl 10 %	1	1	3	1	7	
	NaCl 20 %	3	1	8	4	30	
testicule Calmar	eau de mer	2	1	3	1	2	2
	NaCl 5 %	8	1	4	2	2	2
	NaCl 20 %	5	1	5	4	5	4
testicule Seiche	eau de mer	1		1	6	2	1
	NaCl 20 %	2		2	1	1	1
ovaire Calmar	eau de mer	1	1	24	1	5	6
	NaCl 5 %	1	2	21	1	9	6
	NaCl 20 %	1	1	39	1	14	14
sang de Seiche mâle	eau de mer	3	2	13	1	33	
	NaCl 5 %	6	2	25	1	6	16
	NaCl 20 %	4	1	16	6	4	11



b - pour 10 moles de mannose

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂
gonade femelle jeune	eau de mer	4	2	10	4	6	18
	NaCl 5 %	4		10	2	20	
	NaCl 10 %	3	3	10	3	23	
	NaCl 20 %	4	1,25	10	5	38	
testicule Calmar	eau de mer	7	3	10	3	7	7
	NaCl 5 %	20	2,5	10	5	5	5
	NaCl 20 %	10	2	10	8	10	8
testicule Seiche	eau de mer	10		10	60	20	10
	NaCl 20 %	10		10	5	5	5
ovaire Calmar	eau de mer	0,4	0,4	10	0,4	2	2,5
	NaCl 5 %	0,5	1	10	0,5	4	3
	NaCl 20 %	0,26	0,26	10	0,26	4	4
sang de Seiche mâle	eau de mer	2	1,5	10	0,8	25	
	NaCl 5 %	2,4	0,8	10	0,4	2,4	7
	NaCl 20 %	2,5	0,6	10	4	2,5	7



c - pour 100 moles totales

		Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂	GlcNH ₂	GalNH ₂ + GlcNH ₂	Masse totale p 1000
gonade femelle jeune	eau de mer	9	5	23	9	14	41	55	32
	NaCl 5 %	11		28	6	56		56	19
	NaCl 10 %	8	8	23	8	54		54	36
	NaCl 20 %	7	2	17	9	65		65	?
testicule Calmar	eau de mer	18	9	27	9	18	18	36	78
	NaCl 5 %	42	5	21	10	10	10	20	22
	NaCl 20 %	21	4	21	17	21	17	38	27
testicule Seiche	eau de mer	9		9	54	18	9	27	32
	NaCl 20 %	29		29	14	14	14	28	22
ovaire Calmar	eau de mer	3	3	63	3	13	16	29	49
	NaCl 5 %	2,5	5	53	2,5	23	15	38	56
	NaCl 20 %	1	1	56	1	20	20	40	74
sang de Seiche mâle	eau de mer	6	4	25	2	63		63	132
	NaCl 5 %	11	2	45	2	11	29	40	38
	NaCl 20 %	10	2	38	14	10	26	36	38



En ce qui concerne les autres sucres : le galactose et le glucose sont toujours présents tandis que le fucose, en très faible quantité dans la gonade femelle mûre est un peu plus abondant dans le sang et la gonade femelle jeune et beaucoup plus dans le testicule.

C'est pourquoi nous nous sommes proposés dans une troisième étape, de choisir le ^3H -mannose comme précurseur de la synthèse des ^{glyco-}protéines vitellines en culture *in vitro*.

CHAPITRE III

ETUDE *IN VITRO* DE L'ACTION DE L'HORMONE GONADOTROPE

I - RECHERCHES SUR LA MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE

- 1) Données antérieures
- 2) Investigations personnelles

II - MESURES DE L'ACTION DE L'HORMONE GONADOTROPE

- 1) Résultats antérieurs
- 2) Résultats expérimentaux

Avant d'étudier ce test biologique, nous nous étions proposé de mettre au point un milieu de culture.

I - RECHERCHES SUR LA MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE

1) Données antérieures

Le milieu de culture que DURCHON et RICHARD (1967) et RICHARD (1971 b) avaient utilisé était un milieu solide gélosé dont la composition était identique à celle mise au point par DURCHON et SCHALLER (1963). RICHARD (1970 a) améliore la survie des explants en ajoutant du vitellus ou du broyat frais de jeune Seiche. Il obtient ainsi, en salière, de bons résultats de culture organotypique, de glande optique isolée, de gonade isolée et de chimères gonade-glande optique. Il peut ainsi tirer quelques conclusions quant aux principes d'action de l'hormone dans la glande optique :

Cette hormone paraît agir indépendamment du sexe du donneur; elle semble nécessaire à la stimulation des mitoses de renouvellement spermatogonial et ovogonial. Elle n'agirait pas directement sur la méiose bien que vraisemblablement, elle régularise les divisions germinales mâles en les freinant. Son action sur l'ovaire ne porte pas sur les premiers stades (prévitellogénèse) : l'ovaire jeune poursuit sa croissance indépendamment de la glande optique. L'influence endocrine de la glande optique devient nécessaire à partir du stade de multiplication des cellules folliculaires, étape préalable à leur phase de sécrétion. La glande optique est l'organe responsable de la vitellogénèse.

D'autre part, pendant la phase de jeunesse, l'ovaire est insensible à l'action de la glande optique, il ne réagit que lorsque le seuil somatique est franchi. Celui-ci, repéré par une certaine taille de l'animal, est probablement délimité par un niveau de compétence de réponse des tissus germinaux ; cette étape franchie, l'hormone agit en stimulant les mitoses folliculaires.

2) Investigations personnelles

RICHARD (1971 b) avait noté qu'à partir d'un certain stade (stade III b, stade IV) des ovocytes associés à une glande optique ne survivaient guère plus d'une à deux semaines. Ce manque de longévité semblait imputable à la technique utilisée : les besoins nutritifs des ovocytes de cette taille sont énormes et certainement hors de proportion avec la capacité de réserve d'une salière.

C'est pourquoi nous nous sommes proposés d'essayer des milieux de culture liquides dans lesquels l'explant baignerait totalement.

Les milieux ont été décrits dans matériel et méthodes.

Résultats

Très vite, au bout de 1 à 2 jours, on note une bonne cicatrisation des explants qui ont alors un aspect bosselé. Les cultures se maintiennent ainsi sans renouvellement de milieu jusqu'à deux à trois semaines. Des fixations ont lieu régulièrement et un examen cytologique contrôle la bonne survie du fragment de gonade cultivé (testicule, ovaire jeune).

Nous avons reporté ces résultats sur la planche III (exemples de cultures fixées au bout de 10 jours : nous n'avons pas noté de différence entre les milieux) ; ils traduisent en fait, en dépit d'un aspect extérieur convenable, une mauvaise survie de l'explant : en bordure les cellules conjonctives (cc) (Pl. III, figs b et c) se multiplient : ce sont elles qui très vite forment les bourrelets de cicatrisation ; ces cellules très proches du milieu profitent de ses apports ainsi que certaines spermatogonies de cystes dans la même situation (sp en figure a de la planche III : on note la forme, lobée de leur noyau ; certaines mêmes sont en métaphase de mitose ou de division I de méiose).

En ce qui concerne les cultures d'ovaires (Pl. III, figs b et c), les mêmes remarques peuvent être citées :

- bonne cicatrisation réalisée par les cellules conjonctives (cc) au taux élevé de mitoses ;
- mauvaise survie de l'explant vers l'intérieur de la culture (→ noyaux en pycnose).

A quoi est due cette mauvaise survie ?

- à la durée trop longue (10 jours) ? Pourtant RICHARD (1971 b) avait obtenu de bons résultats bien au delà (1 à 2 Mois quelquefois) ;
- à ce milieu de culture liquide asphyxiant ?
- aux explants trop gros ?

La question reste dans ce cas sans réponse, nos expériences ayant été trop limitées dans le temps.

Une remarque :

Les cellules conjonctives se multiplient chaque fois dans de bonnes conditions. Or, les cellules folliculaires sont d'origine conjonctive. Pourrait-on isoler une souche pure de ces cellules ?

C'est pourquoi nous avons fait quelques essais de trypsinisation (BLOMOLIN, 1977) suivis de culture en boîte Falcon. Mais jamais nous n'avons observé de cellules folliculaires ou même conjonctives isolées sur le fond du récipient. Des études ultérieures demandent à être poursuivies.

PLANCHE III

Cultures. Résultats au bout de 10 jours.

a, b, c : bleu alcian.

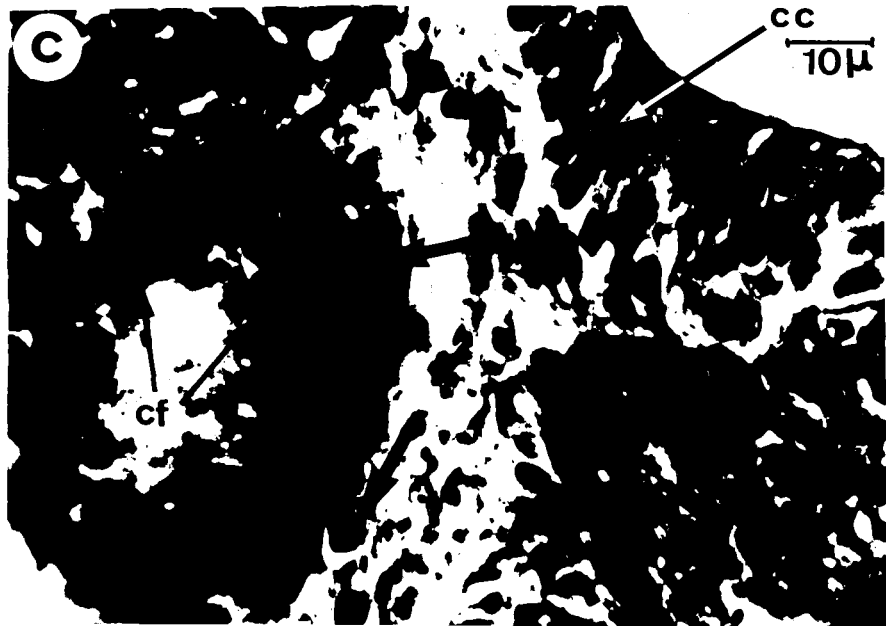
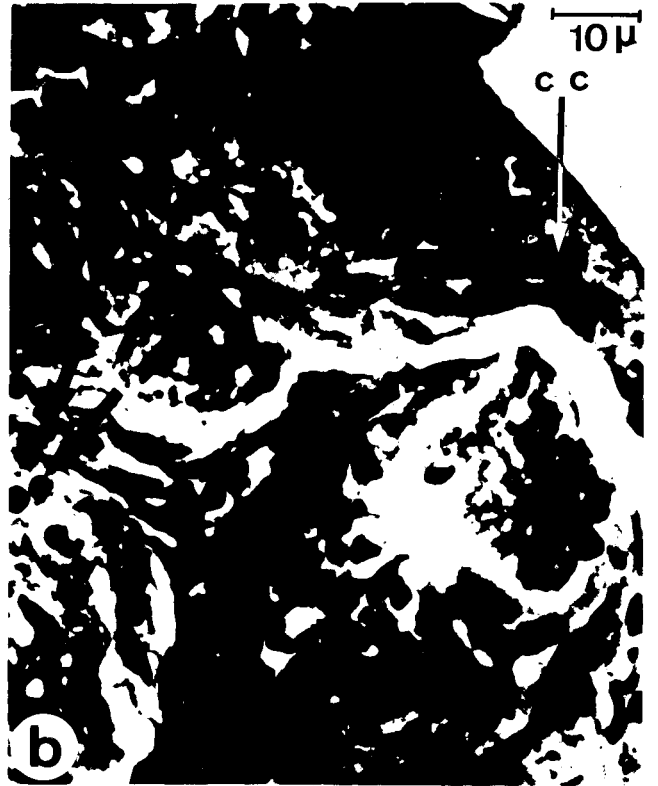
a - Culture de testicule (L = 5 cm).

- . spermatogonies (Sp) avec noyau lobé (◄) ; certaines sont en cours de division (noter la plaque métaphasique).
- . noyaux en pycnose (◄) vers l'intérieur de la culture. On reconnaît cependant les cellules conjonctives, aux noyaux allongés, entre les cellules germinales.

b et c - Cultures d'ovaires jeunes (L = 5 cm).

Il faut noter les cellules conjonctives (cc) qui se multiplient bien en bordure de l'explant ; elles profitent des apports du milieu et elles contribuent ainsi très rapidement à une bonne cicatrisation.

A l'intérieur de l'organe : Noyaux en pycnose ◄ dont des cellules folliculaires (cf).



Toutefois pour les essais suivants d'incorporation de ^3H -mannose, nous avons gardé ces milieux de culture liquides, en verre de montre ; en effet, les cultures sont limitées dans le temps à quelques heures, de plus, cela facilite l'addition du précurseur au milieu et la mesure de l'absorption de celui-ci par les ovocytes par comptage de la radioactivité soluble restante.

II - MESURES DE L'ACTION DE L'HORMONE GONADOTROPE

Nous avons repris des expériences antérieures de O'DOR et WELLS (1973, 1974) sur *Octopus vulgaris* et de ROWE et IDLER (1977) sur *Illex illecebrosus*.

1) Résultats antérieurs

O'DOR et WELLS (1973) constatent que les précurseurs du vitellus sont synthétisés à l'intérieur de l'ovaire lui-même. Viennent à l'appui de ces affirmations des expériences *in vivo* (par transfusion de sang d'animaux ovariectomisés à des animaux hôtes, ils constatent qu'il n'y a pas de protéines sanguines incorporées dans les ovaires) et *in vitro* (par incubation de fragments de gonades dans milieu Tc 199 avec ^{14}C -leucine, ils constatent, cette fois, une synthèse de protéines marquées par l'ovaire). Ils en déduisent le taux de synthèse protéinique qui est de 1,7 mg de protéines/g de tissus/jour.

Ces mêmes auteurs en 1974 reprennent leurs expériences *in vitro* et essayent de définir un test biologique de l'hormone gonadotrope de glande optique chez les Céphalopodes.

ROWE et IDLER (1977) adaptent les expériences précédentes à un autre Céphalopode : *Illex illecebrosus* et constatent, eux aussi, que des extraits de glande optique des deux sexes, ajoutés au milieu de culture, stimulent la synthèse de protéines marquées à la ^3H -leucine par l'ovaire.

C'est pourquoi nous avons repris cette étude sur *Sepia officinalis*.

2) Résultats expérimentaux

Des petits fragments de gonades prélevées sur des animaux de 8 cm de longueur, sont préincubés deux à trois heures dans 2 ml de milieu "froid" en présence ou non de glande optique entière ou de son homogénat. Puis on injecte dans le milieu du ^3H -mannose (1 mCi/ml, Radiochemical Center, Amersham) à raison de 2,5 $\mu\text{l/ml}$.

Au bout de une, deux, trois et sept heures, une aliquote de 10 μl de milieu est prélevée et ajoutée à 8 ml de liquide scintillant PCS (on mesure ainsi par différence, l'incorporation du monosaccharide par le tissu).

- Les fragments de gonades ayant ainsi incorporé sont aussitôt,
- pour une moitié, homogénéisés dans de l'acide trichloracétique 10 % (mesure de la radioactivité insoluble incorporée dans les protéines vitellines synthétisées ; cette mesure est ramenée au mg de poids sec ;
 - pour l'autre moitié, replacée dans 2 ml d'un second milieu froid; au bout de 3 h d'échanges (et de rejet du surplus de radioactivité incorporée), on mesure ainsi, en valeur réelle, l'incorporation du monosaccharide marqué à l'³H par le tissu et la synthèse des protéines marquées.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 18.

TABLEAU 18- Action de la glande optique sur la synthèse des protéines par l'ovaire de *Sepia officinalis*.

Temps d'incorporation T _i		Radioactivité soluble			Radioactivité insoluble	
		T ₀	au temps T _i	au temps T _{post}	au temps T _i cpm/mg pds sec	au temps T _{post} cpm/mg pds sec
1 h	GO +	86 070	85 000	500	352	330
	H	85 100	83 900	610	420	110
	GO -	84 900	83 800	450	388	290
2 h	GO +	83 980	82 700	530	522	158
	H	85 700	82 900	640	485	269
	GO -	84 310	82 300	670	476	160
3 h	GO +	88 900	87 020	250	540	434
	H	87 540	86 030	340	501	310
	GO -	83 800	82 500	720	532	230
7 h	GO +	84 700	83 610	240	742	350
	H	85 590	84 430	540	723	403
	GO -	84 020	83 000	550	641	330

T_i : temps d'incorporation (1 h, 2 h, 3 h, 7h).

T₀ : moment de l'injection du ³H-mannose dans le milieu.

T_{post} : moment de la fin de l'expérience, c'est-à-dire T_i + 3 h de post incubation.

GO + : fragments de gonades incubés en présence de glande optique.

H : fragments de gonades incubés en présence d'un homogénat de glandes optiques (environ 5 glandes optiques dans 1 ml d'eau distillée).

GO - : fragments de gonades incubés en l'absence de glande optique.

Les conclusions que l'on peut tirer de ces résultats sont certainement moins tranchées que les données de WELLS et O'DOR (1974) sur *Octopus vulgaris*.

Il est toutefois possible de dire qu'il n'y a pas d'incorporation de ^3H -mannose par les gonades, qu'elles soient stimulées ou non par les glandes optiques.

Ces résultats sont contraires à ceux de O'DOR et WELLS (1974) qui utilisaient de la ^{14}C -leucine sur *Octopus vulgaris*.

Par contre, RICHARD et DHAINAUT ont fait des études histoautoradiographiques d'incorporation de leucine marquée par des ovaires de *Sepia officinalis* et ils n'ont jamais retrouvé de marquage à leur niveau (éliminé par les lavages successifs ?) : il n'y a donc pas d'incorporation de cet acide aminé marqué (RICHARD et DHAINAUT, inédit). Ces résultats rejoignent les nôtres qui avons pourtant utilisé un précurseur différent.

Què peut-on dire ?

- 1 - La Seiche réagit-elle différemment ?
- 2 - Est-ce le choix du précurseur qui est mauvais ? Cependant RICHARD et DHAINAUT utilisent la leucine, et en ce qui nous concerne nous avons choisi un monosaccharide en fonction de son abondance dans les glycoprotéines du vitellus.
- 3 - Est-ce que les conditions d'expériences sont mauvaises et non adaptées à la Seiche ?
 - le temps d'incubation avec le précurseur (maximum 7 h) suffisait-il ? Au temps 7 h y a-t-il une très légère augmentation de la radioactivité insoluble ?
 - Le temps de préincubation était-il lui aussi assez long, pour que d'une part la glande optique aie le temps de bénéficier de la levée de l'inhibition (du fait de son isolement des centres nerveux supérieurs) (WELLS et WELLS, 1959 ; RICHARD, 1971 b) et d'autre part pour que les gonades aient le temps elles-aussi de répondre à la stimulation ou non des glandes optiques ?
 - Le milieu intervient-il ? ROWE (1977) avait démontré que les gonades préincubées ou incubées dans l'eau de mer répondaient mieux à la stimulation que les gonades placées dans un milieu nutritif.
 - La maturité de la gonade intervient-elle ? RICHARD (1971 b) avait montré que la gonade devait acquérir un certain seuil somatique en dessous duquel elle était incapable de répondre à toute stimulation hormonale.
 - Enfin, l'état de l'animal, avant l'expérience, a-t-il une importance ? En effet ROWE (1976, 1977), ROWE et MANGOLD (1975) montrent que des animaux élevés en laboratoire présentent histologiquement un état de plus grande activité au niveau des gonades par rapport à des témoins.

ROWE et IDLER (1977) avaient déjà présenté une nécessité d'adaptation des conditions d'expériences à leur matériel (*Illex illecebrosus*).

De nouvelles expériences demandent à être refaites pour essayer d'éclaircir ce problème.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

RESUME ET CONCLUSION

Les résultats cytologiques et cytochimiques apportent peu d'éléments nouveaux. Tous les auteurs s'accordent pour montrer une augmentation du taux de synthèses (notamment de polysaccharides) au cours de la vitellogenèse. Toutefois, en ce qui concerne le glycogène, BOLOGNARI (1976) semble affirmer qu'il n'y a jamais de glycogène quel que soit le niveau cellulaire de l'ovocyte et quel que soit son stade d'évolution. Cependant un P.A.S. négatif après digestion par l' α -amylase nous permet de penser à un polymère de glucose.

Cette étude cytochimique de polysaccharides nous a amenés tout naturellement vers une étude biochimique des glucides au cours de l'ovogenèse. Nous avons effectué cette étude d'un point de vue quantitatif et qualitatif.

- Le taux d'oses totaux augmente avec la maturation des ovocytes ;
- d'autre part, qualitativement, on rencontre toujours les mêmes monosaccharides : ils sont au nombre de six : le fucose, le galactose, le mannose, le glucose, la galactosamine, la glucosamine.

Lesquels sont plus caractéristiques d'une des phases de l'ovogenèse ? C'est en étudiant les rapports molaires que l'on constate une variation selon les stades et les tissus (tableau 19)

TABLEAU 19- Résumé de l'évolution des rapports molaires en monosaccharides selon les stades d'évolution de l'ovocyte et selon les tissus.

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Man : mannose ; Glc : glucose ; GalNH₂ : galactosamine ; GlcNH₂ : glucosamine.

	Fuc	Gal	Man	Glc	GalNH ₂ + GlcNH ₂
ovaires jeunes	+	+	++	+	++++
ovocytes matures	±	+	++++	+	++
testicule	++	+	++	+	++
sang	+	+	++	+	++

On constate qu'il n'y a pas de spécificité entre le mâle et la femelle, cependant il y a une plus grande abondance de mannose dans le stade mature des ovocytes. C'est pourquoi nous avons choisi le ³H-mannose comme précurseur pour un test biologique de l'hormone gonadotrope. Nous pensions en effet que le mannose aurait été plus caractéristique de la synthèse des glycoprotéines qu'un simple acide aminé tel que la leucine choisie par O'DOR et WELLS (1973, 1974) et qui devrait marquer toutes les protéines.

Existe-t-il une incorporation directe (gonade/précurseur) ? Dans nos expériences *in vitro*, elle est quasiment nulle, rapportée au poids sec; existe-t-il donc une véritable vitellogenèse endogène ? On ne peut pas conclure, en général, mais elle n'existe probablement pas pour les synthèses glycoprotéiques du vitellus (à l'appui : les études histoautoradiographiques de RICHARD et DHAINAUT, inédit).

Il y a donc mise en doute du test d'incorporation (leucine, mannose), de l'action de l'hormone gonadotrope de la glande optique.

Existe-t-il une vitellogenèse exogène ?

1) Rôle des cellules folliculaires ? il est fondamental; mais elles étaient présentes dans nos cultures.

Devaient-elles être stimulées par l'hormone gonadotrope de la glande optique (O'DOR et WELLS, 1973, 1974); pourtant certaines de nos cultures la contenaient.

Des problèmes restent donc en suspens : le temps d'incubation, l'état de l'animal, l'état des gonades (seuil somatique atteint ou non).

2) Possibilité d'existence d'un autre centre de synthèse de précurseurs des glycoprotéines vitellines ? (Rôle du sang transporteur et de l'hémocyanine ?)

Conclusion : il existe un dilemme.

a - il y a du mannose dans l'ovocyte,

b - celui-ci n'est pas directement incorporé ;

. l'est-il ailleurs ?

. ne l'est-il jamais ? Ceci pouvant résulter d'une inversion métabolique du glucose en mannose dans l'ovocyte ou la cellule folliculaire : P.A.S. révélant cytochimiquement un polymère du glucose (BOLOGNARI, 1976, avait noté l'absence totale de glycogène dans l'ovocyte d'*Octopus vulgaris*) ; une étude biochimique révélant la présence du glucose.

Ce mécanisme pourrait se rapprocher de celui observé dans l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* par PORCHET, SPIK et DHAINAUT (1977) et DHAINAUT et PORCHET (1977).

Remarque - Nos études cytochimiques et biochimiques ont révélé un vitellus riche en glyco-lipo-protéines (en cytologie : beaucoup de lacunes, dues à la dissolution dans la paraffine ; en biochimie surnageant alcool-soluble très abondant).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ARNOLD J.M., 1971 - *In* Experimental embryology of marine and fresh-water invertebrates. North-Holland Publ. Co., Reverberi, Edit. : 265-311.
- BERGMAN W., 1903 - Ueber den Bau des Ovariums bei Cephalopoden und einige Nachträge zu Eibildung derselben. Arch. f. Naturges., 69.
- BLOM-OLIN C., 1977 - Mise au point des techniques utilisables pour l'étude de la Coccidie *Aggregata eberthy* en culture cellulaire. D.E.S. Lille.
- BOLOGNARI A. *et al.*, 1976 - A cytochemical analysis of the follicular cells and the yolk in the growing oocytes of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Mollusca). Acta Histochem. Bd., 55 S, 167-175.
- COUSSERANS F., 1975 - Recherches sur la culture de cellules de Mollusques marins et sur l'emploi de ces systèmes cellulaires en pathologie marine. Thèse Doct. Spé. Université du Languedoc.
- COWDEN R.R., 1968 - Cytological and cytochemical studies of oocyte development and development of the follicular epithelium in the squid, *Loligo brevis*. Acta embryologiae et Morphologiae experimentalis 10, 160-173.
- DEPRET M., 1977 - Recherches sur le métabolisme du soufre chez *Perinereis cultrifera* et *Arenicola marina* (Annélides Polychètes). D.E.A., Lille.
- DHAINAUT A. et RICHARD A., 1976 - Vitellogenèse chez les Céphalopodes Décapodes. Evolution de l'ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale. Arch. Anat. Micro., 65, 3, 183-208.
- DHAINAUT A. et RICHARD A., inédit - Etude autoradiographique de l'incorporation de la ¹⁴C-leucine par les ovocytes de *Sepia officinalis*.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1977 - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. II. Etude autoradiographique. Biol. Cell., 28, 3, 233-240.
- DISCHE Z., 1927 - Cité par MONTREUIL J. et SPIK G., 1963. Bioch. Z. 189, 77.
- DURCHON M. et SCHALLER F., 1963 - Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. C. R. Acad. Sc. Paris, 256, 5615-5617.
- DURCHON M. et RICHARD A., 1967 - Etude en culture organotypique du rôle endocrine de la glande optique dans la maturation ovarienne chez *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). C. R. Acad. Sc. Paris, 264, D, 1497-1500.
- GABE M., 1968 - Techniques histologiques. Masson et Cie, Paris.
- GOTTSCHALK, 1958 - Cité par MONTREUIL J. et SPIK G., 1968 (Communication personnelle), 1901, 273-279.

- HOADLEY L., 1930 - Polocyte formation and cleavage of the polar body in "*Loligo*" and "*Chaetopterus*". Biol. Bull., 58, 256-264.
- HOPE J. et Coll., 1963 - Ultrastructural studies on developing oocytes of the salamander "*Triturus viridescens*". I. The relationship between follicles cells and developing oocytes. J. Ultrastruct. Res., 9, 308-339.
- HOTCHKISS, 1948 - Cité par PEARSE, 1968, Arch. Biochem., 16, 131.
- KAMOUN, 1977 - Appareils et méthodes en biochimie. Flammarion.
- KONOPACKI M., 1933 - Mikrometabolizm podelae owagenezy u *Loligo vultaris*. Kosmos Warsz A 58, 133-156.
- LANKESTER E.R., 1875 - Observations of the development of the Cephalopoda. Quart. J. Micro. Sci., 15.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARE A.L., RANDALL K., 1951 - Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275
- LOYEZ M., 1905 - Recherches sur le développement ovarien des oeufs méroblastiques à vitellus nutritif abondant. Arch. Anat. Micr., 8, 239 p.
- Mac MANUS, 1948 - Cité par PEARSE, 1968, Stain Tech., 23, 99.
- MONTREUIL J. et SPIK G., 1963 - Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Monographie, Lille.
- MONTREUIL J. et SPIK G., 1968 - Méthodes chromatographiques et électrophorétiques de dosage des glucides constituant les glycoprotéines. Monographie, Lille.
- NECCO A. et MARTIN R., 1963 - The mitotic activity of the white body cells of *Octopus vulgaris in vitro*. Ann. Epiphyties 14, n° hors série III, 23-25.
- O'DOR R.K. et WELLS M.J., 1973 - Yolk protein synthesis in the ovary of *Octopus vulgaris* and its control by the optic gland gonadotropin. J. exp. Biol., 59, 665-674.
- PEARSE A.G., 1968 - Histochemistry (theoretical and applied). J. et A. Churchill Ltd.
- PORCHET M., 1974 - Activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. Thèse de Doctorat d'Etat, Lille.
- PORCHET M., SPIK G. et DHAINAUT A., 1977 - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. I. Etude biochimique. Bio. Cell., 28, 3, 225-232.
- QUIOT J.M., 1975 - Recherches sur la culture *in vivo* de cellules d'insectes et l'action de germes entomopathogènes en culture cellulaire. Thèse de Doctorat, Université du Languedoc.
- RAVEN C.P., 1961 - Oogenesis : the storage of development information. Mac Millan (Pergamon) New York, 274 p.
- RAVEN C.P., 1966 - Morphogenesis : the analysis of molluscan development. Pergamon Oxford.

- RICHARD A., 1966 a - La température, facteur externe essentiel de croissance pour le Céphalopode *Sepia officinalis* L.C. R. Acad. Sc. Paris, 263, D, 1138-1141.
- RICHARD A., 1966 b - Action de la température sur l'évolution génitale de *Sepia officinalis* L.C. R. Acad. Sc. Paris, 263 D, 1998-2001.
- RICHARD A., 1967 - Rôle de la photopériode dans le déterminisme de la maturation génitale femelle du Céphalopode *Sepia officinalis*. C. R. Acad. Sc. Paris, 264 D, 1315-1318.
- RICHARD A., 1968 a - Ultrastructure des cellules de la glande branchiale de la Seiche (*Sepia officinalis* L.). J. Microscopie, 7, 53a.
- RICHARD A., 1968 b - Mise en évidence de l'action de la lumière dans le déterminisme de la ponte chez le Céphalopode *Sepia officinalis* L. C. R. Acad. Sc. Paris, 267, D, 2360-2363.
- RICHARD A., 1970 a - Différenciation sexuelle des Céphalopodes en culture "in vitro". Ann. Biol., 9, 409-415.
- RICHARD A., 1970 b - Analyse du cycle sexuel chez les Céphalopodes : mise en évidence d'un rythme conditionné par les variations des facteurs externes et internes. Bull. Soc. Zool. Fr., 95, 461-469.
- RICHARD A., 1970 c - Rythmes sexuels chez les Céphalopodes : Etude expérimentale du cycle biologique chez la Seiche (*Sepia officinalis* L.). Colloque sur la sexualité des Mollusques. Congrès de la Soc. Fr. de Malacologie, Caen, 7/12, sept. 1970.
- RICHARD A., 1971 a - Action qualitative de la lumière dans le déterminisme du cycle sexuel chez le Céphalopode *Sepia officinalis* L. C. R. Acad. Sc. Paris, 272, 106-109.
- RICHARD A., 1971 b - Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Thèse Doctorat Etat, Université de Lille.
- RICHARD A. et DHAINAUT A., 1973 - Evolution des cellules folliculaires au cours de l'ovogenèse de *Sepia officinalis* (Céphalopode). C. R. Acad. Sc. Paris, 277, 2185-2188.
- RIMINGTON C., 1931 - Cité par MONTREUIL J. et SPIK G., 1963. Biochem. J., 25, 1062.
- ROWE V.L. et MONGOLD K., 1975 - An effect of starvation on sexual maturation in *Illex illecebrosus* (Lesueur) (Céphalopoda Tenthoidea). J. exp. Mar. Biol. Ecol., 17, 157-163.
- ROWE V.L., 1976 - Reproductive development as a function of growth and physiology in the squid *Illex illecebrosus* (Lesueur). Ph. D. Thesis Memorial, Univ. of Newfoundland.

- ROWE V.L. et IDLER D.R., 1977 - *In vitro* stimulation of protein synthesis in squid ovary by optic gland extract.
- SCHLOSS B., 1951. - Cité par MONTREUIL J. et SPIK G., 1968, Anal. Chem., 23, 1321.
- SCHWEICKART A., 1904 - Beiträge zur Morphologie und Genese der Eitrüllen der Cephalopoden und Chitonen. Zool. Jahrb., suppl. 6, 33.
- SELWOOD L., 1970 - The role of the follicle cells during oogenesis in the Chiton "*Sypharochiton septentriones*" Ashby (Polyplacophora, Mollusca). Z. Zellforsch., 104, 178-192.
- SPICER *et al.*, 1967 - Cité par FEARSE, 1968, J. Histochem. Cytochem., 13, 211.
- TILLMANS J. et PHILLIPI K., 1929 - Cité par MONTREUIL J. et SPIK G., 1969, Bioch. Z., 1, 215, 36.
- USSOW M., 1881 - Untersuchungen über die Entwicklung der Cephalopoden. Arch. Biol. 2.
- VAGO C. et QUIOT J.M., 1969 - Recherches sur la composition des milieux de culture de cellules d'Invertébrés. Ann. Zool. Ecol. anim., 1, 281-288.
- VIALLETON L., 1888 - Recherche sur les premières phases du développement de la Seiche (*Sepia officinalis*). Ann. Sci. Nat. Zool., 6, 165-280.
- WELLS M.J. et WELLS J., 1959 - Hormonal control of sexual maturity in *Octopus*. J. exp. Biol., 36, 1-33.
- WELLS M.J. et O'DOR R.K., 1974 - An *in vitro* bioassay for a molluscan gonadotropin. J. exp. Biol., 62, 433-446.
- WELLS M.J. et WELLS J., 1975 - Optic gland implants and their effect on the gonads of *Octopus*. J. exp. Biol., 62, 579-588.
- YAMAMOTO M., 1963 - Electron microscopy of fish development. II. Oocyte follicle cell relationship and formation of chorion in "*Oryzias latipes*". J. Fac. Sci. Tokyo Univ., 10, 124-126.
- YASUMA A. et ICHIKAWA T., 1952 - In PEARSE A.G.A., 1968, Nagoya D. med. Sci., 15-96
- YUNG KO CHING M., 1930 - Contribution à l'étude cytologique de l'ovogenèse du développement et de quelques organes chez les Céphalopodes. Ann. Inst. Océan. 7, 301-364.