

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

François CANER

CONTRIBUTION A L'ETUDE BIOCHIMIQUE DE L'OVOGENESE DE PERINEREIS CULTRIFERA (ANNELIDE POLYCHETE)



Membres du Jury :

MM.	J. MONTREUIL	Président
	J. KREMBEL	Rapporteur
	M. DURCHON	} Examineurs
	A. DHAINAUT	

Présenté le 4 juillet 1981

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale

M.	BOUGHON Pierre	Algèbre
M.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M.	CELET Paul	Géologie Générale
M.	COEURE Gérard	Analyse
M.	CONSTANT Eugène	Electronique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOCT Jacques	Génie Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	CHAPOTON Alain	Electronique

M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme	CORSIN Paule	Paléontologie
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M.	CROSNIER Yves	Electronique
Mle	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DEMUNTER Paul	Sociologie
M.	DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M.	DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mle	DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme	DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M.	DORMARD Serge	Sciences Economiques
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertziennne
M.	DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertziennne
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
Mme	EVRRARD Micheline	Chimie Appliquée
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M.	FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M.	GERVAIS Michel	Gestion
M.	GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M.	JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M.	JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertziennne
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mme	LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mle	LEGRAND Solange	Algèbre
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertziennne
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M.	LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	LOUAGE Francis	Electronique
M.	MACKE Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M ^{lle} MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M ^{me} N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^{lle} PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{lle} SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie Biologique
III de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, sous la direction du
Professeur J. KREMBEL.

Les travaux décrits dans ce mémoire ont fait l'objet des publications suivantes :

Isolement et purification de fractions membranaires chez les ovocytes de *Perinereis cultrifera* Grube (Annélide Polychète).

F. CANER, M. PORCHET, A. DHAINAUT et C. DISSOUS
C. R. Acad. Sci. (1977), 284, série D, 2019-2022.

Development of the nuclear structure and metabolism during oogenesis of *Perinereis cultrifera* (Annelida, Polychaeta).

M. BERTOUT, F. CANER, A. DHAINAUT et J. KREMBEL
Intern. J. Invert. Reprod. (1981), 3, 121-132.

Action of the brain hormone on the synthesis of "stable" oocyte RNA in *Nereidae* (Annelida, Polychaeta).

F. CANER, M. BERTOUT, J. KREMBEL et A. DHAINAUT
Comp. Biochem. Biophys. (1981), sous presse.

et d'une présentation par affiche :

Dosages biochimiques et préparation des membranes des ovocytes de *Perinereis cultrifera*.

F. CANER, M. PORCHET, C. DISSOUS et A. DHAINAUT
Centenaire de la Société de Zoologie, Paris 1976.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	p. 3
INTRODUCTION	p. 4
GENERALITES	p. 6
I - Description sommaire de l'animal	p. 6
II - Comportement et reproduction	p. 6
III - Activité endocrine cérébrale	p. 9
IV - Développement ovocytaire	p. 10
TRAVAUX PERSONNELS	p. 12
DOSAGES CHIMIQUES DES CONSTITUANTS CELLULAIRES DES OVOCYTES	p. 13
I - Introduction	p. 13
II - Matériel et méthodes	p. 13
A - Récolte des animaux et conservation au laboratoire	p. 13
B - Opération des animaux	p. 13
C - Préparation des ovocytes	p. 14
D - Dosages chimiques	p. 14
1 - Dosages des Acides Nucléiques et des protéines	p. 14
2 - Dosages des lipides et des glucides	p. 16
E - Expression des résultats	p. 16
III - Résultats et discussion	p. 17
A - Ovogenèse naturelle	p. 17
B - Ovogenèse expérimentale	p. 21
IV - Conclusion	p. 22
ETUDE DU METABOLISME DES RNA STABLES OVOCYTAIRES	p. 24
I - Introduction	p. 24
II - Matériel et méthodes	p. 24
A - Marquage des animaux	p. 24
1 - Caractéristiques du précurseur	p. 24
2 - Lots d'animaux	p. 25
3 - Temps d'incorporation	p. 25
4 - Technique de marquage	p. 25

B - Extraction des RNA totaux	p. 25
1 - Choix de la méthode	p. 25
2 - Protocole expérimental	p. 27
C - Contrôle des fractions	p. 29
1 - Contrôles qualitatif et quantitatif	p. 29
2 - Rendement d'extraction	p. 29
D - Fractionnement des RNA sur gradient de densité	p. 29
III - Résultats et discussion	p. 30
A - Traitement des ovocytes	p. 30
B - Analyse des RNA	p. 30
1 - Contrôle des fractions	p. 30
2 - Fractionnement des RNA sur gradient de densité	p. 31
a - Ovogenèse naturelle	p. 31
b - Ovogenèse expérimentale	p. 34
IV - Conclusion	p. 40
PREPARATION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DES OVOCYTES	p. 41
I - Introduction	p. 41
II - Matériel et méthodes	p. 41
A - Solutions	p. 41
B - Eclatement des ovocytes	p. 41
C - Préparation des fractions	p. 41
D - Purification des fraction	p. 42
1 - Fraction de l'interphase 1,15/1,80 M	p. 42
2 - Fraction de l'interphase 1,80/1,89 M	p. 42
3 - Fraction du culot	p. 42
E - Examen des fractions	p. 43
III - Résultats	p. 43
A - Isolement de l'appareil de Golgi et des membranes intraovocytaires	p. 44
B - Isolement des alvéoles corticaux	p. 44
C - Isolement des enveloppes ovocytaires	p. 46
IV - Conclusion	p. 46
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p. 47
BIBLIOGRAPHIE	

ABREVIATIONS

r RNA	: Acide ribonucléique ribosomal
Hn RNA	: Acide ribonucléique hétérodisperse
m RNA	: Acide ribonucléique messenger
Tris	: 2 Amino - 2 Hydroxymethyl - 1,3 Propanediol
SDS	: Dodecylsulfate de Sodium
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique
cpm	: coups par minute
rpm	: rotations par minute
$g R_{av}$: accélération au rayon moyen
Unité DO ₂₆₀	: équivalent à environ 30 µg de RNA par ml

INTRODUCTION

L'existence de cellules neurosécrétrices chez les Annélides Polychètes a été révélée par SCHARRER (1) en 1936 et c'est en 1948 que DURCHON (2) a rapporté ses premières observations sur l'épitoque expérimentale.

Depuis, de nombreux travaux ont été publiés sur l'endocrinologie des Néréidiens. Citons comme référence de base, les ouvrages de DURCHON (3), DURCHON et JOLY (4) et la revue générale de PORCHET (5) sans omettre les mises au point de HAUENSCHILD (6) et de CLARK (7) qui font également autorité en la matière.

Les recherches réalisées avec des techniques biologiques diversifiées ont fait appel à l'autoradiographie, à la microchirurgie (ablations, greffes) comme aux cultures organotypiques. Elles ont apporté une masse d'informations qui ont permis de démontrer le phénomène hormonal des Invertébrés, longtemps contebattu et de définir le mode d'action de l'hormone cérébrale.

En dehors des travaux sur les tissus somatiques, en particulier ceux de DEFRETIN (8) et de WISSOCQ (9) sur la musculature au cours de l'épitoque et ceux de BOILLY (10), BOILLY et BOILLY-MARER (11) relatifs à la régénération de la région caudale, les recherches ont été multipliées sur l'activité endocrine du cerveau et la gamétogenèse. Les cellules sexuelles ont, en effet, une compétence particulière vis-à-vis de l'hormone.

C'est ainsi que des analyses de plus en plus fines ont conduit à l'étude détaillée des ganglions cérébroïdes [DHAINAUT-COURTOIS (12), GOLDING (13), CLARK (7)], à un examen cytologique précis de l'ovogenèse [DHAINAUT (14)], à la description de l'évolution ultrastructurale du nucléole des ovocytes [BERTOUT (15)], pour ne citer que les faits les plus saillants.

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'activité hormonale, il a fallu recourir aux techniques biochimiques, pour isoler les principes actifs et démontrer sur quel constituant ou sur quel organe cellulaire ils agissent.

Très tôt, l'isolement de l'hormone est entrepris [DURCHON et Coll. (16)] que poursuit CARDON (17, 18).

Une substance "feed-back", capable de réguler l'activité endocrine cérébrale, est également extraite des ovocytes [PORCHET et CARDON (19)].

PORCHET (20) réalise une étude très complète des composés glucidiques au cours de l'ovogenèse.

Peu de choses ont cependant été effectuées dans le domaine des Acides nucléiques. Citons l'étude réalisée par GOULD et SCHROEDER (21) sur le nucléole et la synthèse des RNA ribosomiaux ovocytaires. Elle est à relier avec les observations de BERTOUT et DHAINAUT (22) et BERTOUT (15) qui établissent une étroite relation entre les variations du taux d'hormone et l'évolution du nucléole.

L'hormone cérébrale peut-elle exercer un contrôle de l'ovogenèse par l'intermédiaire des RNA ribosomiaux du nucléole ? C'est sur cette hypothèse que nous avons entrepris nos travaux.

Les éléments que nous apportons pour tenter de répondre à cette question, constituent le deuxième chapitre de nos Travaux personnels et s'intitulent "Etude du métabolisme des RNA "stables" ovocytaires". Ils sont précédés par les "Dosages chimiques des constituants cellulaires" qui se sont avérés indispensables pour situer le cadre de l'action de l'hormone, et suivis de la "Préparation des fractions membranaires des ovocytes" qui constitue le premier résultat des tentatives de fractionnement cellulaire.

Préalablement, nous présentons dans des "Généralités", quelques données biologiques de *Perinereis cultrifera* auxquelles nous aurons à nous référer au cours de notre exposé.

GÉNÉRALITÉS

I - DESCRIPTION SOMMAIRE DE L'ANIMAL

Perinereis cultrifera est un Ver marin de la famille des *Nereidae* (voir figure 1, p. 7). C'est une Annélide Polychète Errante.

Ce Ver est caractérisé par des segments ou métamères répétant, sauf en ce qui concerne les premiers et le dernier, les mêmes traits d'organisation et présentant de nombreuses soies chitineuses et polymorphes.

Le corps de *P. cultrifera*, allongé et cylindrique, atteint une taille d'environ 15 cm à l'état adulte. Il se compose du prostomium ou lobe céphalique, du segment buccal ou péristome, de nombreux segments ordinaires et du segment terminal ou pygidium.

Le prostomium porte les yeux, les antennes et les palpes, innervés par les ganglions cérébroïdes. Le segment buccal porte des cirres tentaculaires. La bouche s'ouvre entre le prostomium et le segment buccal.

Les segments ordinaires sont pourvus chacun d'une paire d'organes locomoteurs : les parapodes, qui sont des pieds biramés porteurs de soies (voir figure 2, p. 8).

Le pygidium porte deux longs cirres entre lesquels s'ouvre l'anus.

Les Annélides sont des Coelomates dont la cavité générale est vaste. Le coelome est revêtu intérieurement d'un endothélium péritonéal garni localement de cils vibratiles provoquant des courants dans le liquide coelomique. Ce liquide, très complexe, renferme des sels, une substance albuminoïde, des corps figurés appelés coelomocytes et les produits génitaux qui y sont abondants. Ces derniers s'y développent après s'être détachés très tôt du revêtement péritonéal, à l'état de spermatogonies ou d'ovogonies, suivant le sexe.

II - COMPORTEMENT ET REPRODUCTION

Perinereis cultrifera est comme les Polychètes Errantes, plutôt carnassière ; elle dévore de petits crustacés, des mollusques, des vers, grâce à sa trompe garnie de dents.

C'est un Ver cavernicole qui creuse des galeries, notamment dans les sédiments calcaires qui affleurent, à marée basse, sur la plage de Luc-sur-Mer (Calvados), où nous le récoltons habituellement.

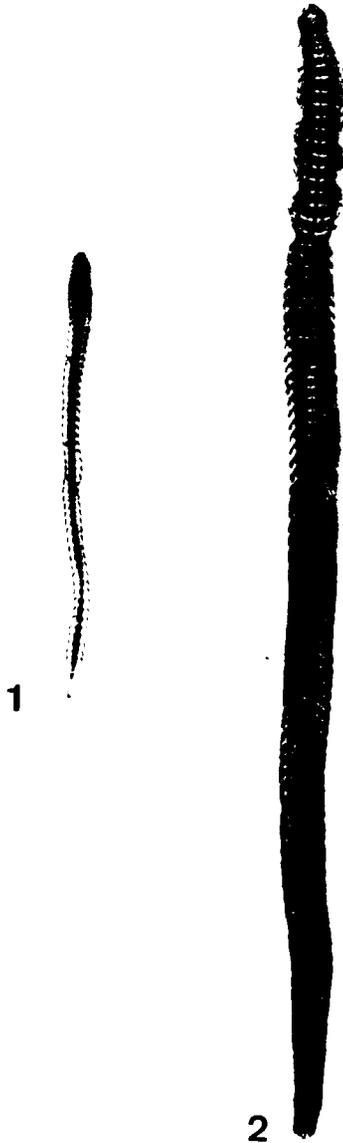


Figure 1 - Formes atoque (1 an) (1) et épitoque (3 ans) (2) de *P. cultrifera*.

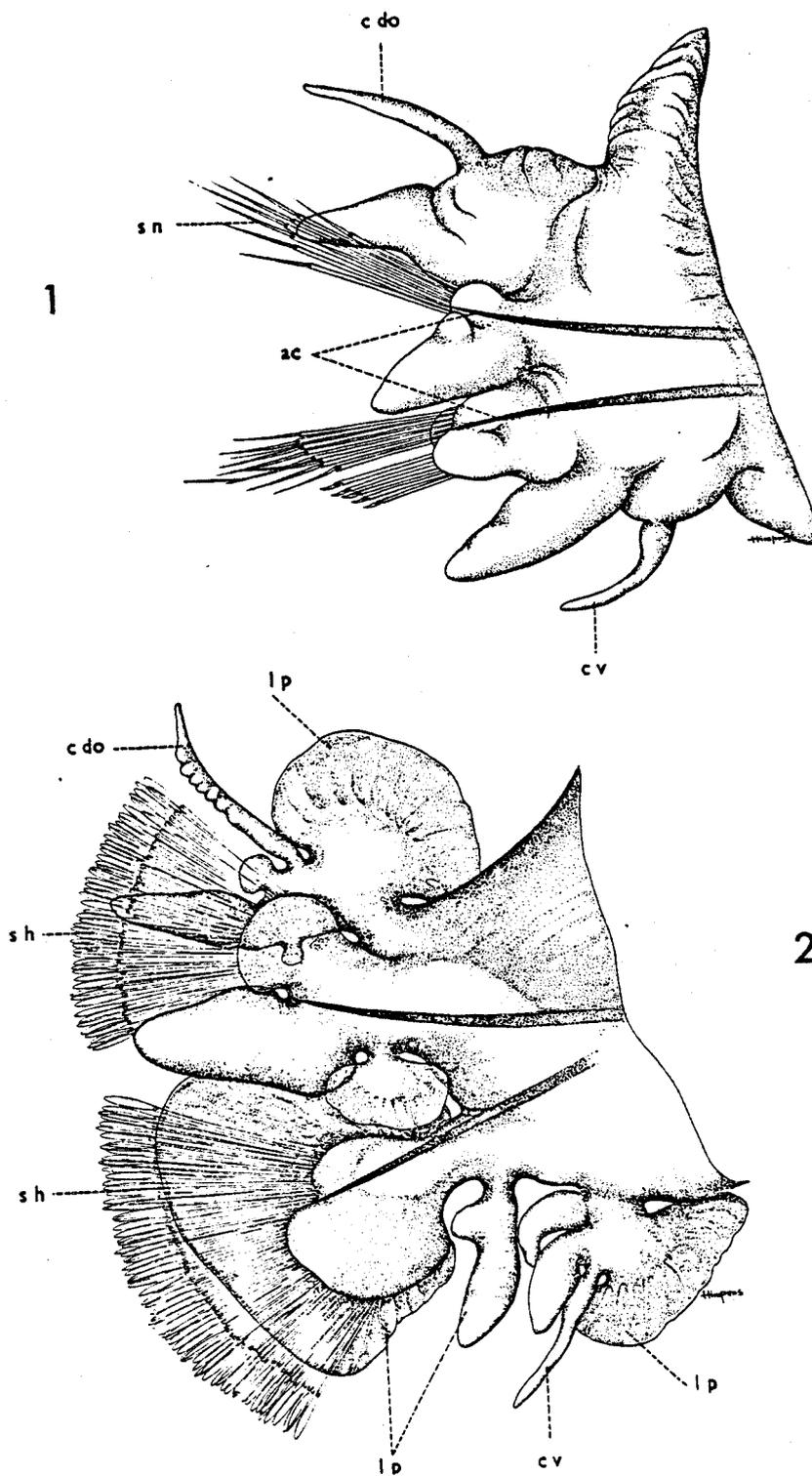


Figure 2 - Parapodes de *P. cultrifera* atoque (1) et épitoque (2) d'après DURCHON (réf. 3).

ac : acicules ; c do : cirre dorsal ; c v : cirre ventral ;
s n : soies néréidiennes ; s h : soies hétéronéréidiennes ;
l p : lamelles parapodiales.

Perinereis cultrifera, comme tous les Néréidiens, ne se reproduit qu'une seule fois. Elle ne survit pas à l'émission de ses produits génitaux. Comme de nombreuses espèces de *Nereis*, elle subit, au moment de la maturité génitale, l'épitoquie. Celle-ci se traduit par des transformations de la musculature et par le développement, sur les parapodes, de palettes natatoires (figure 2, p. 8).

Au terme d'un cycle biologique sédentaire de trois ans, l'épitoquie permet à l'animal de mener une vie pélagique. Mâles et femelles se retrouvent en de véritables essaims et au cours d'une "danse nuptiale" rejettent leurs gamètes.

Fécondation et développement embryonnaire s'opèrent ainsi en pleine mer.

III - ACTIVITE ENDOCRINE CEREBRALE

L'endocrinologie des Néréidiens est liée à la présence de cellules neurosécrétrices, signalées pour la première fois par SCHARRER (1).

L'hormone du cerveau, principe unique confirmé par GOLDING (13), ne présente pas la complexité de la fonction hormonale des Vertébrés, en raison de la relative simplicité d'organisation des Vers. Elle ne s'en traduit pas moins par une grande variété de manifestations que l'on peut résumer comme suit :

- . inhibition de la gamétogenèse et des transformations somatiques de l'épitoquie ;
- . stimulation de la régénération caudale.

L'activité endocrine cérébrale n'est pas constante tout au long de la vie du Ver : importante durant la phase juvénile, elle décroît régulièrement pour s'annuler au moment de la maturité sexuelle [PORCHET (20)].

L'hormone est identique pour les deux sexes, mais on a pu constater que, chez une même espèce, son activité est de deux à quatre fois plus faible pour les mâles que pour les femelles d'âge correspondant.

Des études en cours tendent à prouver qu'elle serait de nature protéique mais sa structure est loin d'être établie.

Cet état de fait explique que l'activité endocrine cérébrale soit étudiée surtout par ses effets au niveau de cellules "cibles", en particulier les gamètes.

IV - DEVELOPPEMENT OVOCYTAIRE

Les ovocytes de *P. cultrifera* que nous avons choisis comme matériel biologique le mieux adapté à nos travaux ont l'avantage de représenter une fraction importante du corps de l'animal : de 10 p. 100 pour le stade juvénile à 36 p. 100 du poids total du stade adulte.

De plus, la taille des ovocytes (diamètre exprimé en μ) sert de critère d'âge et de degré de maturité du Ver [DURCHON (23), HAUENSCHILD (24)].

En contrepartie, il est pratiquement impossible d'obtenir en quantité suffisantes pour une étude biochimique, des ovocytes d'un diamètre inférieur à 80 μ . C'est la raison pour laquelle nos études ne portent que sur le grand accroissement ovocytaire (diamètre compris entre 80 et 250 μ).

Les travaux cytologiques réalisés par DHAINAUT (14) permettent de distinguer trois grandes étapes au cours de ce grand accroissement (voir figure 3, p. 11) :

. Stade 1 - synthèse du vitellus ou vitellogenèse (diamètre ovocytaire inférieur à 120 μ) qui se traduit par l'édification, dans le cytoplasme, de réserves lipidiques et de globules vitellins.

. Stade 2 - synthèses de substances muqueuses ou élaboration des alvéoles corticaux (diamètre ovocytaire supérieur à 130 μ). Ces alvéoles corticaux apparaissent comme des inclusions à structure fibreuse intractyoplasmiques.

. Stade 3 - maturité génitale qui voit s'opérer un profond remaniement au sein de l'ovocyte. Des couches concentriques s'organisent à partir de l'enveloppe nucléaire :

1. les ribonucléoprotéines et les mitochondries (internes),
2. les réserves lipidiques et les globules vitellins,
3. les alvéoles corticaux (périphériques).

Après fécondation, c'est le contenu de ces alvéoles corticaux qui sera expulsé pour former la gelée protectrice de l'oeuf (voir figure 3, p 11).

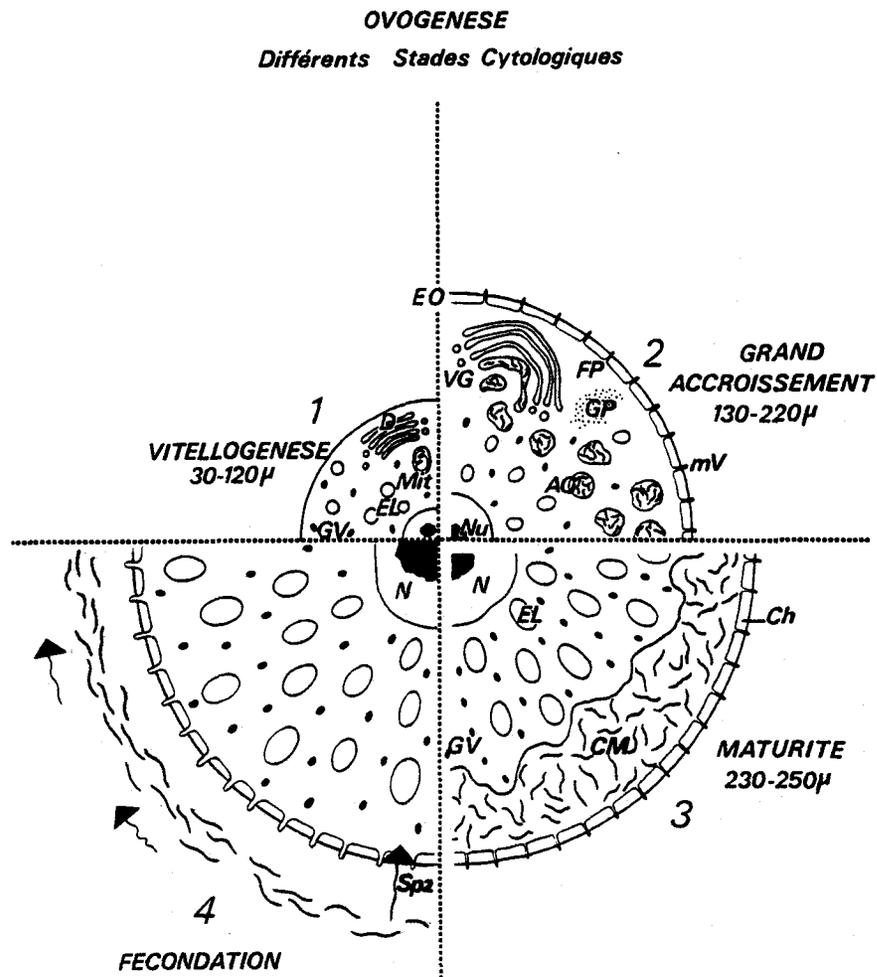


Figure 3 - Représentation schématique des différentes étapes de l'ovogenèse chez *P. cultrifera* d'après PORCHET (5).
AC : alvéoles corticaux ; CM : couche muqueuse ; Ch : chorion ; D : dictyosome ; EL : enclave lipidique ; EO : enveloppe ovocytaire ; FP : face proximale du dictyosome ; GP : glycogène particulaire ; GV : globule vitellin ; Mit : mitochondrie ; mV : microvillosité ; N : noyau ; Nu : nucléole ; Spz : spermatozoïde ; VG : vésicule golgienne.



TRAVAUX PERSONNELS

Les travaux personnels que nous présentons ont pour but de contribuer à la connaissance des mécanismes moléculaires responsables de l'action de l'hormone cérébrale et plus particulièrement au niveau du métabolisme des Acides nucléiques.

Nos travaux se subdivisent en trois chapitres :

- . Dosages chimiques des constituants cellulaires des ovocytes.
- . Etude du métabolisme des RNA "stables" ovocytaires.
- . Préparation des fractions membranaires des ovocytes.

Ces trois chapitres sont bâtis sur un plan identique. Leur enchaînement constitue une progression dans la mise en oeuvre des techniques biochimiques et de biologie moléculaire, mais chacun est conçu pour être examiné séparément.

DOSAGES CHIMIQUES DES CONSTITUANTS CELLULAIRES DES OVOCYTES

I - INTRODUCTION

Lorsque nous avons entrepris l'étude biochimique de l'action de l'hormone cérébrale sur le métabolisme des Acides nucléiques au cours de l'ovogenèse, il nous est immédiatement apparu nécessaire de doser les DNA et RNA pour connaître globalement leurs taux et déceler d'éventuelles variations de ces constituants.

Il s'est rapidement avéré indispensable d'y adjoindre les dosages des principales substances plastiques : protéines, lipides, glucides.

Ces dosages nous ont permis de nous familiariser avec ce matériel biologique particulier. Il nous ont conduit à choisir des méthodes adaptées aux modifications qu'entraîne l'accroissement des ovocytes et ne nécessitant qu'une quantité minimale de substrat frais (de l'ordre de 1 gramme).

II - MATERIEL ET METHODES

A - RECOLTE DES ANIMAUX ET CONSERVATION AU LABORATOIRE

Les animaux, récoltés dans la Station de Biologie Marine de Luc-sur-Mer (Calvados), sont, dès leur arrivée au laboratoire, séparés en deux lots : mâles et femelles, par examen des produits génitaux au microscope photonique.

Les femelles sont, pour leur part, réparties en catégories selon le diamètre moyen de leurs ovocytes (de 20 en 20 μ).

Les animaux sont ensuite placés dans des cuves individuelles, maintenues à l'obscurité et à une température constante de 15°C.

L'eau de mer des cuves est renouvelée journallement.

Le maintien des animaux dans ces conditions est habituellement de 10 à 30 jours.

B - OPERATION DES ANIMAUX

Un certain nombre d'animaux, groupés par lots, sont soumis à une déprostomisation (ablation du cerveau) qui supprime l'influence de l'hormone cérébrale.

Ces animaux sont conservés, dans les conditions ordinaires décrites précédemment.

C - PREPARATION DES OVOCYTES

Le liquide coelomique de chaque individu est prélevé à l'aide d'une micropipette et immédiatement transféré dans une très faible quantité d'eau de mer filtrée et maintenue à 4°C.

Ce prélèvement, dont le volume est compris entre 0,5 et 1 ml pour un animal de 2 g, entraîne la mort de celui-ci.

Les ovocytes sont soumis à une série de courtes centrifugations (500 g pendant 1 mn) et de remises en suspension dans de l'eau de mer filtrée (20 volumes environ) qui élimine successivement le liquide coelomique et les coelomocytes.

Des contrôles au microscope photonique, si nécessaires, permettent de suivre le degré de purification des cellules.

Les culots d'ovocytes sont finalement conservés à - 20°C.

D - DOSAGES CHIMIQUES

Les dosages effectués selon le protocole expérimental de la figure 4 (p. 15), sont réalisés d'après les techniques de BURTON (25) pour le DNA, WILSON et HOAGLAND (26) pour le RNA, LOWRY et Coll. (27) pour les protéines, TILLMANS et PHILIPPI (28) pour les glucides, FOLCH et Coll. (29) pour les lipides.

On dose les acides nucléiques et protéines d'une part et les lipides et glucides d'autre part.

1 - Dosages des Acides nucléiques et des protéines

0,5 g d'ovocytes décongelés sont homogénéisés à l'homogénéiseur de Dounce avec 5 ml de tampon TKM (Tris/HCl 50 mM pH 7,5 - KCl 25 mM - MgCl₂ 5 mM).

Les dosages du DNA, du RNA et des protéines sont effectués à partir de fractions aliquotes de 1 ml d'homogénat. Une autre fraction sert de référence "poids sec", après lyophilisation et dessiccation (cf. figure 1) et à la suite d'un calcul de correction tenant compte de la composition en sels du tampon.

Les dosages du RNA et des protéines sont réalisés sur une même fraction, selon un procédé similaire à celui de DAVIS et WILT (30) et qui est le suivant :

1 ml d'homogénat est précipité et lavé 2 fois par de l'HClO₄ 0,5 N à 4°C. Le précipité est repris par 2,5 ml de KOH 0,5 N, dissous et porté au bain-marie à 37°C 1 heure pendant laquelle les RNA sont hydrolysés.

Les 2,5 ml sont alors répartis en 2 fractions de 2,3 et 0,2 ml respectivement.

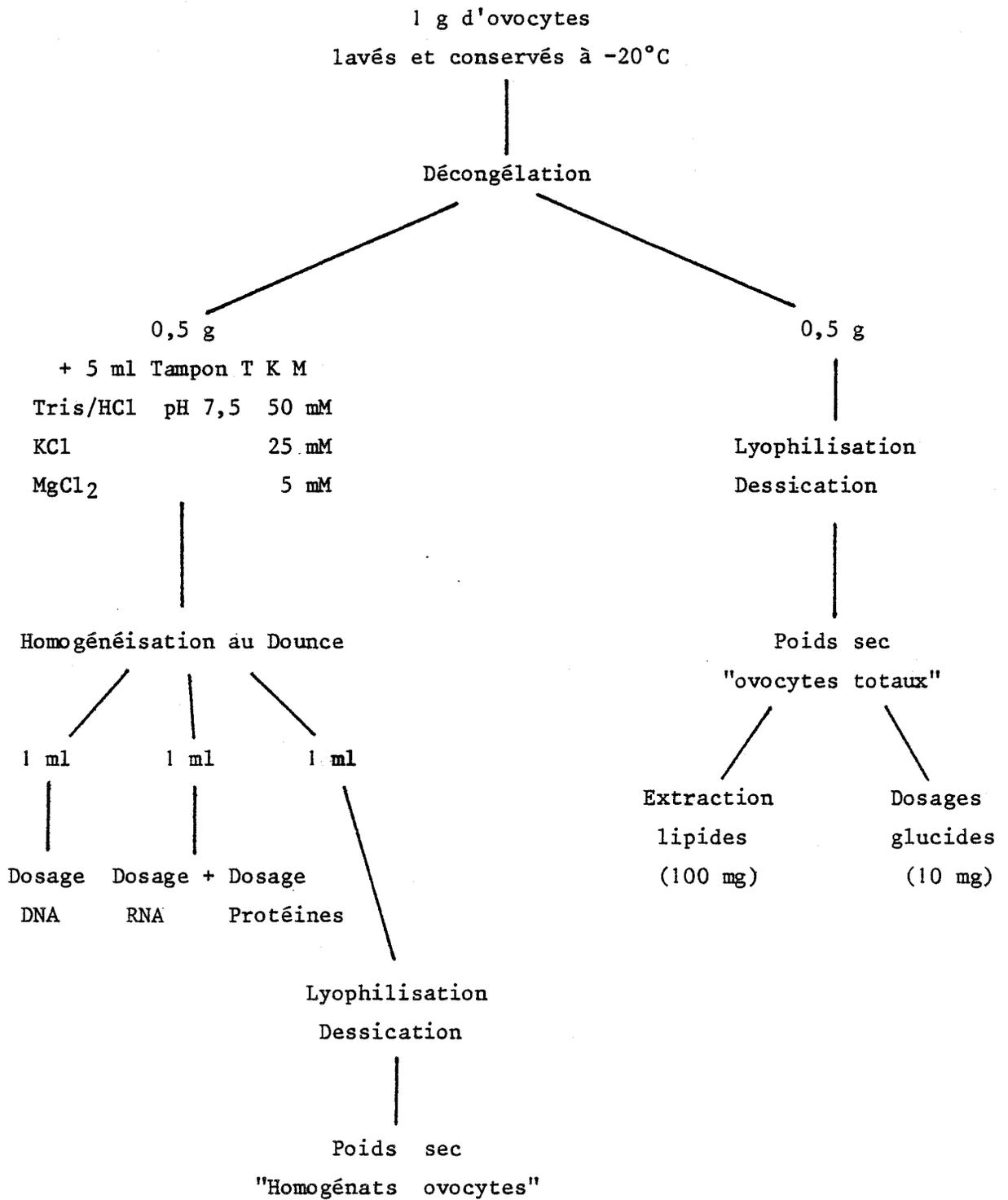


Figure 4 - Schéma général des dosages chimiques effectués sur les ovocytes de *P. cultrifera*.

La première est additionnée de 0,46 ml d'HCl 4 N en vue du dosage spectrophotométrique des nucléotides des RNA.

La deuxième est additionnée de 1,8 ml de NaOH 0,5 N fournissant une solution mère diluée 10 fois pour le dosage des protéines.

Cette solution mère est généralement diluée à son tour de 2 à 8 fois, ce qui élimine complètement l'interférence de l'ion K^+ qui est incompatible avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Le couplage du dosage du RNA et du dosage des protéines sur une même fraction permet ainsi l'établissement d'un rapport protéines/RNA rigoureux.

2 - Dosages des lipides et des glucides

Les lipides et les glucides (monosaccharides neutres libres et conjugués) sont dosés directement à partir d'un échantillon d'ovocytes lyophilisés dont on prélève respectivement 100 mg et 10 mg. Cet échantillon confirme par ailleurs le poids sec des ovocytes déjà obtenu à partir de l'homogénat.

Les lipides sont déterminés par pesée après une triple extraction au chloroforme/méthanol (2v/1v) suivie d'une évaporation à sec.

Le dosage des glucides a été réalisé par M. PORCHET selon le procédé de TILLMANS et PHILIPPI (28) décrit par MONTREUIL et SPIK (31).

E - EXPRESSION DES RESULTATS

Les dosages donnent lieu dans un premier temps, à des résultats exprimés en p. 100 par rapport à un poids sec d'ovocytes.

L'énorme variation du volume des ovocytes au cours du grand accroissement - le volume d'un ovocyte de 250 μ de diamètre est 30 fois plus grand que celui d'un ovocyte de 80 μ - nous a incité, en collaboration avec M. PORCHET, à exprimer ces résultats en nanogrammes/ovocytes. Ceci facilite, d'une certaine façon, la compréhension de l'évolution biologique des constituants cellulaires.

Pour cela, il a fallu, pour diverses catégories d'ovocytes, en faire une suspension homogène dans de l'eau de mer, déterminer statistiquement le nombre de cellules par unité de volume, lyophiliser une fraction représentative des ovocytes de cette suspension en vue de relier le nombre des ovocytes au poids sec.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

A - OVOGENESE NATURELLE

Nous présentons sur le tableau I (p. 18) et la figure 5 (p. 19) les résultats des dosages effectués sur des ovocytes au cours du grand accroissement de l'ovogenèse naturelle.

Les ovocytes ont été regroupés en 4 grandes catégories, selon leur diamètre moyen : 100-120 μ , 130-170 μ , 180-220 μ , 250 μ .

Ces catégories sont celles retenues par PORCHET et Coll. (32) en relation avec la variation du taux de l'hormone cérébrale (voir figure 5).

Nous avons cependant envisagé au départ de subdiviser les catégories 2 et 3 pour réaliser les dosages sur des ovocytes dont le diamètre croît de 20 en 20 μ .

Il est important de constater que la subdivision de la 3ème catégorie fait apparaître des différences significatives aux alentours de 200 μ .

De l'ensemble de ces résultats, il ressort que :

- le pourcentage de DNA reste très faible et ses variations sont du domaine de l'erreur technique.
- Le RNA tend à croître jusqu'à la submaturité (2,40 p. 100) avant de se stabiliser à un taux de 1,55 p. 100.
- Les protéines évoluent brutalement au cours de la submaturité pour atteindre un taux de 45,0 p. 100, ce qui correspond à un accroissement de 25 % par rapport au stade 1 (36,4 p. 100).
- Les glucides (monosaccharides neutres libres et conjugués) passent de 6,6 à 20,5 p. 100, soit une augmentation de 210 %.
- Les lipides totaux, en contrepartie, voient leur taux réduit de moitié au moment de la maturité ovocytaire.
- Le rapport protéines/RNA varie pratiquement du simple au double au cours de la submaturité, ce qui correspond au moment où la sécrétion hormonale n'est plus décelable par dosage biologique (voir tableau 1).

Lorsque l'on exprime les résultats précédents en nanogrammes/ovocyte, on obtient les données du tableau II (p. 18) et de la figure 6 (p. 20).

Il est nécessaire de les interpréter avec réserves, compte tenu du fait qu'ils ne sont que l'expression d'une transposition (voir Matériel et Méthodes, § E, p. 16).

La figure 6 montre, en particulier, la croissance exponentielle des protéines et des glucides, ce qui est en rapport avec une abondante synthèse de glycoprotéines qui constituent la fraction majeure des alvéoles corticaux.

Tableau I - Résultats des dosages effectués sur les ovocytes de *P. cultrifera*.

Catégories ovocytaires	1		2		3 Submaturité		4 maturité
	100-120 μ	130-140 μ	150-170 μ	180-200 μ	200-220 μ	250 μ	
Diamètre moyen des ovocytes	100-120 μ	130-140 μ	150-170 μ	180-200 μ	200-220 μ	250 μ	
DNA ⁽¹⁾	0,23	0,27	0,24	0,20	0,15	0,17	
RNA ⁽¹⁾	2,05	2,00	2,25	2,40	1,55	1,55	
Protéines ⁽¹⁾	36,4	36,2	36,5	36,6	42,3	45,0	
Lipides ⁽¹⁾	46,0	46,0	42,0	33,0	23,0	23,0	
Monosaccharides neutres ⁽¹⁾	6,6	12,3		18,4		20,5	
Protéines/RNA	17,8	18,1	16,2	15,2	27,3	29,0	

(1) Les résultats des dosages sont exprimés en p. 100 par rapport au poids sec.

Tableau II - Résultats des dosages effectués sur les ovocytes de *P. cultrifera*, exprimés en nanogrammes par ovocyte.

Catégories ovocytaires	1		2		3 Submaturité		4 maturité
	100-120 μ	130-140 μ	150-170 μ	180-200 μ	200-220 μ	250 μ	
Diamètre moyen des ovocytes	100-120 μ	130-140 μ	150-170 μ	180-200 μ	200-220 μ	250 μ	
DNA	2	4	7	10	10	21	
RNA	16	27	62	114	107	194	
Protéines	287	496	1014	1743	2917	5625	
Lipides	362	630	1167	1571	1586	2875	
Monosaccharides neutres	52	303		1150		2562	



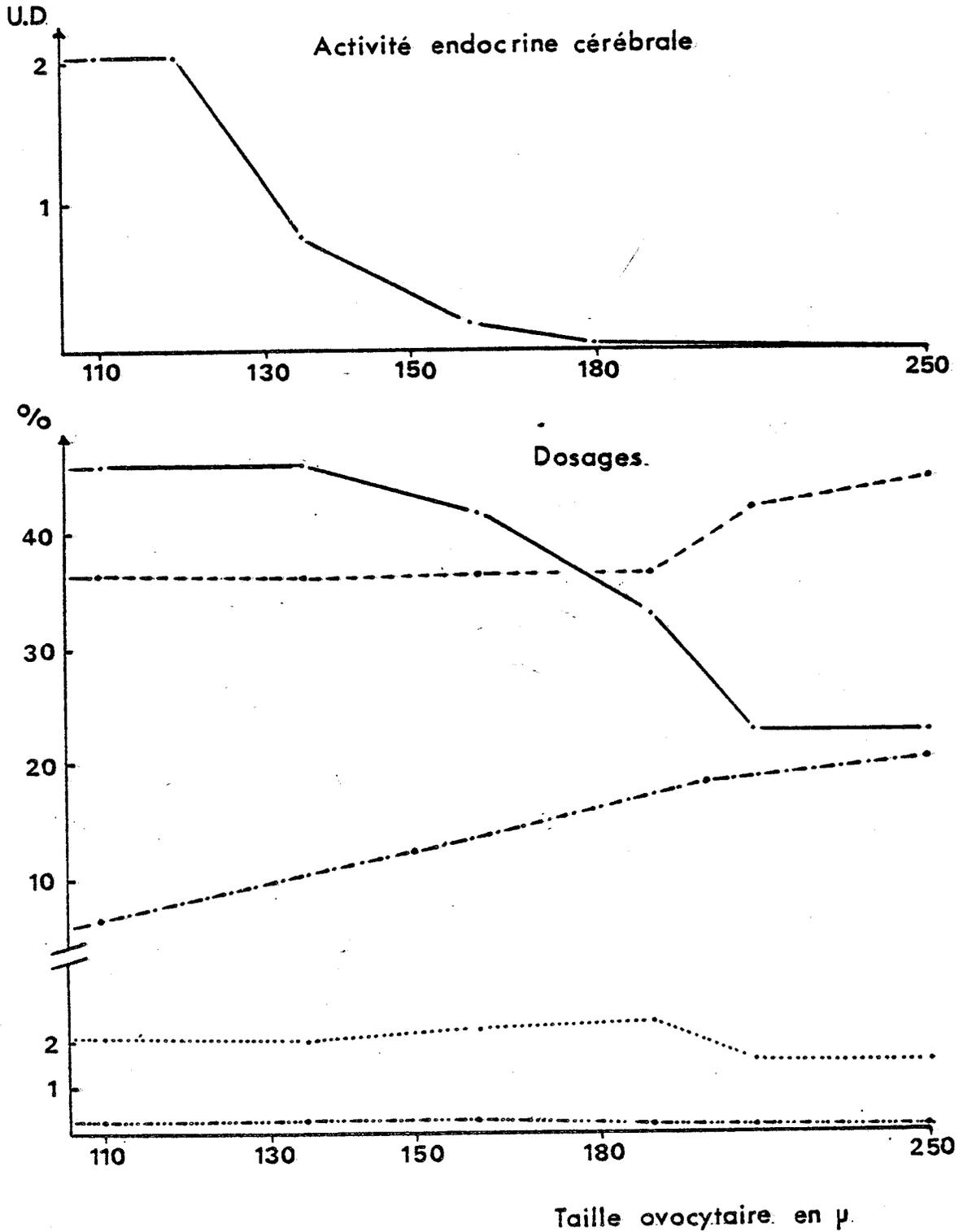


Figure 5 - Résultats des dosages effectués sur les ovocytes de *P. cultrifera*, exprimés en p. 100 du poids sec.

-...- DNA ; RNA ; ----- Protéines ; ——— lipides ;
-.-.- glucides.

La courbe de l'activité endocrine cérébrale, en référence, est réalisée selon PORCHET (5) (U.D. : Unité Diversicolor).



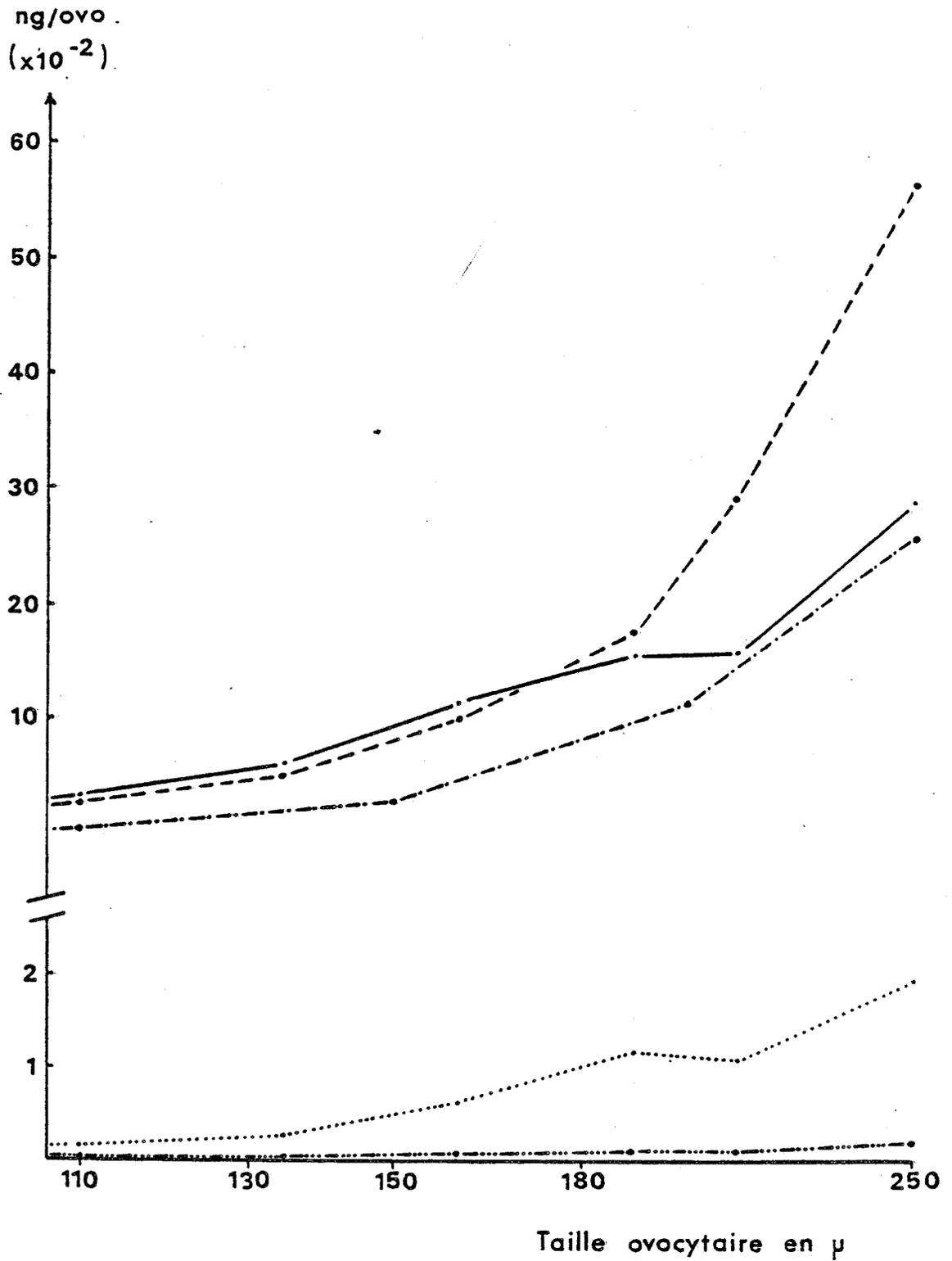


Figure 6 - Résultats de dosages effectués sur les ovocytes de *P. cultrifera*, exprimés en nanogrammes par ovocyte.

--- DNA ; RNA ; --- protéines ; — lipides ;
- - - glucides.



La courbe des lipides montre que la synthèse se poursuit avec, apparemment, un ralentissement entre 130 et 220 μ . Ce résultat peut surprendre si on le compare à celui acquis antérieurement (voir tableau I et figure 5). Il tend à montrer qu'une baisse même importante en pourcentage peut n'être qu'une moindre croissance par rapport à celle d'autres constituants.

Le RNA n'attire pas de remarques particulières. On peut, en contre partie se poser des questions sur l'apparente croissance du DNA qui est contraire à la stabilité du génome.

Il semble bon de rappeler à ce propos qu'une quantité aussi faible de DNA (0,2 p. 100) nous conduit à la limite de fiabilité du dosage, surtout dans un homogénat aussi complexe.

B - OVOGENESE EXPERIMENTALE

Le tableau III (p. 22) présente des résultats partiels concernant 3 catégories de Vers référencés 90 E, 110 E, 130 E.

Le nombre précédant la lettre "E" (pour Expérimental) correspond au diamètre des ovocytes des animaux avant déprostomisation.

Nous comparons les résultats d'une part avec les témoins désignés 90 N, 110 N, 130 N et d'autre part avec ceux des ovocytes 150-170 μ et 180-200 μ de l'ovogenèse naturelle car le diamètre moyen des ovocytes mesuré 12 jours après déprostomisation correspond à peu près à ces valeurs, même si les écarts à la moyenne sont plus grands.

Si le taux des protéines subit des fluctuations (de 33,6 à 38,3 p. 100) compatibles avec la moyenne des animaux témoins (36,5 p. 100) et qui ne sont peut-être pas étrangères aux conditions de survie des animaux déprostomisés, il est intéressant de remarquer l'abaissement important du taux du RNA (jusqu'à près de 50 %). Le pourcentage compris entre 1,15 et 1,25 p. 100 est en tout état de cause inférieur au plus faible pourcentage enregistré lors de l'ovogenèse naturelle : 1,55 p. 100 à l'approche de la maturité (voir tableau I, p. 18).

Ceci entraîne un relèvement artificiel du rapport protéines/RNA au niveau de celui de la maturité génitale naturelle.

Cette variation nette du taux de RNA, constatée sur des animaux mis en expérimentation en fin de vitellogenèse, est la première "indication chiffrée" d'une possible action de l'hormone cérébrale sur le métabolisme des Acides nucléiques posée comme hypothèse de départ.

Elle rejoint les multiples constatations faites par les biologistes sur les anomalies de développement des ovocytes lorsqu'ils sont soustraits, aux stades juvéniles, à l'influence de l'hormone cérébrale. Rappelons

en particulier les travaux de BERTOUT et DHAINAUT (22) qui ont démontré l'arrêt de l'élaboration des globules vitellins chez *N. diversicolor* après décérébration et de PORCHET (20) qui a apporté la preuve de la nécessité d'un taux faible et stable d'hormone pour l'élaboration des alvéoles corticaux chez *P. cultrifera*.

Tableau III - Résultats des dosages des RNA et protéines effectués sur les ovocytes de *P. cultrifera*. Comparaison des valeurs de "l'ovogenèse expérimentale" et de celles de "l'ovogenèse naturelle"

Catégories d'ovocytes	Ovogenèse naturelle			Ovogenèse expérimentale			Ovogenèse naturelle	
	90 N	110 N	130 N	90 E	110 E	130 E	150-170 μ	180-200 μ
RNA (1)	2,10	2,25	2,00	1,15	1,25	1,25	2,25	2,40
Protéines (1)	36,2	36,6	40,8	33,6	38,3	34,4	36,5	36,6
Protéines/RNA	17,1	16,1	20,4	29,0	31,1	28,0	16,2	15,2

(1) Les résultats des dosages sont exprimés en p. 100 par rapport au poids sec.

IV - CONCLUSION

Des données biochimiques présentes, nous pouvons dire que l'influence de l'activité endocrine cérébrale se manifeste nettement au niveau des substances de réserve de l'ovocyte mais de manière opposée suivant qu'il s'agit des lipides ou des protéines et glucides.

La concentration en lipides est "parallèle" à la courbe de l'évolution hormonale, un niveau élevé de l'activité hormonale étant corrélatif d'une synthèse lipidique importante.

Protéines et glucides augmentent tous deux. Ils sont abondants au moment de la maturité génitale, c'est-à-dire lorsque l'hormone a cessé d'être secrétée par le cerveau.

Les dosages de ces substances viennent donc confirmer que l'hormone cérébrale des Néréidiens stimule la synthèse des lipides et inhibe celle des glycoprotéines constitutives des alvéoles corticaux. Mais l'ovogenèse se présente comme un processus harmonieux, une maturation lente dont la finalité précise est la reproduction. Aussi est-il plus juste de parler de régulation hormonale, puisque chaque phase du développement s'enchaîne sans à-coup à la précédente.

A côté de ces résultats notables, ceux obtenus sur les acides nucléiques paraissent modestes. Leur taux est faible, varie peu. Heureusement, le rapprochement des données de l'ovogenèse expérimentale et de celles de l'ovogenèse naturelle laisse entrevoir la possibilité de caractériser l'action de l'hormone au niveau des RNA. C'est l'objet des travaux que nous présentons au chapitre suivant.

ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES RNA STABLES OVOCYTAIRES

I - INTRODUCTION

Notre étude porte sur le métabolisme des RNA "stables" (4-5 S, 18 S et 28 S) au cours du grand accroissement ovocytaire. Cette restriction a deux raisons :

- les contraintes techniques déjà évoquées (faible quantité de matériel disponible, difficulté de purification) nous empêchent d'accéder aux ovocytes d'un diamètre inférieur à 80 μ .
- nous ne maîtrisons pas encore actuellement, pour une étude biochimique, les techniques de marquage "*in vitro*" indispensables pour la mise en évidence du métabolisme des "Hn RNA" (heterodisperse RNA) qui recouvrent en particulier les RNA messagers.

Sans négliger l'intérêt que présentera ultérieurement l'analyse de ces derniers, il est bon de rappeler la prépondérance du métabolisme des RNA "stables" au cours de l'ovogenèse, comme l'ont soulignée DAVIS et WILT (30) chez un autre Ver marin : *Urechis caupo*.

Dans le but de caractériser l'action de l'hormone soit au niveau d'une catégorie soit au niveau de l'ensemble des RNA "stables", nous nous sommes arrêté à une stratégie qui consiste en une analyse systématique en gradient de densité des RNA totaux après marquage "*in vivo*". Tenant compte des indications fournies par les dosages chimiques, nous l'avons appliquée aux ovocytes des principaux stades de l'ovogenèse naturelle et aux ovocytes d'animaux déprostimés à des stades d'activité endocrine de niveaux différents (ovogenèse expérimentale).

Ceci nous a conduit, en collaboration avec A. DHAINAUT et M. BERTOUT, à mettre au point un procédé que nous présentons maintenant.

II - MATERIEL ET METHODES

A - MARQUAGE DES ANIMAUX

1 - Caractéristiques du précurseur

L'uridine que nous utilisons est l'³H-uridine 5-6 (55Ci par millimole/Solution de 1 mCi dans 0,5 ml) provenant du C.E.A.

Nous la diluons au tiers avec de l'eau de mer stérile de façon à ce que les quantités injectées aux animaux soit facilement mesurables.

2 - Lots d'animaux

Les animaux sélectionnés et maintenus en aquarium individuel, sont regroupés en lots d'une dizaine d'individus.

3 - Temps d'incorporation

Nous nous sommes fixé deux temps d'incorporation :

- . un temps court (TC) de 15 à 17 heures
- . un temps long (TL) de 5 à 6 jours.

Toutefois, nous ne les appliquons pas d'une façon identique lors des expériences d'ovogénèse naturelle ou d'ovogénèse expérimentale comme le montrent les schémas de la figure 7, p. 26.

Il est en effet nécessaire, dans le deuxième cas, de tenir compte d'un autre facteur "temps", celui qui s'écoule entre la déprostitution et le sacrifice. C'est la raison pour laquelle nous avons, dans certaines manipulations, procédé à deux temps longs d'incorporation : TL₁ et TL₂.

Il est important de rappeler, à ce propos, qu'il est difficile de maintenir en survie, sans risques, des lots importants d'animaux opérés au delà de 12 à 15 jours, ce qui limite le champ des investigations.

4 - Technique de marquage

Le protocole de marquage de nos animaux est le suivant : Chaque animal est rapidement essoré avec du papier filtre, placé dans une boîte de Pétri et pesé.

Après anesthésie au MS 222 à 1 p. 1000 dans l'eau de mer stérile, il reçoit dans la cavité coelomique, une injection d'uridine diluée au tiers. Cette injection est réalisée délicatement avec une seringue Hamilton de façon à éviter tout rejet accidentel de la solution d'isotope, lorsque l'animal est replacé dans l'eau de mer.

Le volume de la dose injectée est rapporté à un poids frais d'animal pour tenir compte de la variété de taille, donc de poids, des animaux d'un même lot (les poids s'étagent couramment de 1 à 2,5 g).

Nous l'avons fixé à 25 µl/g, ce qui correspond à 18 µCi/g.

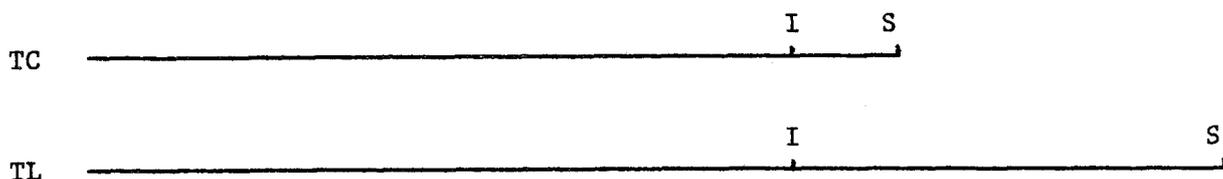
B - EXTRACTION DES RNA TOTAUX

1 - Choix de la méthode

C'est après de nombreuses tentatives que nous avons adopté la méthode au perchlorate de Sodium de WILCOCKSON (33).

Les méthodes classiques au Phénol se sont révélées totalement

OVOGENESE NATURELLE



OVOGENESE EXPERIMENTALE

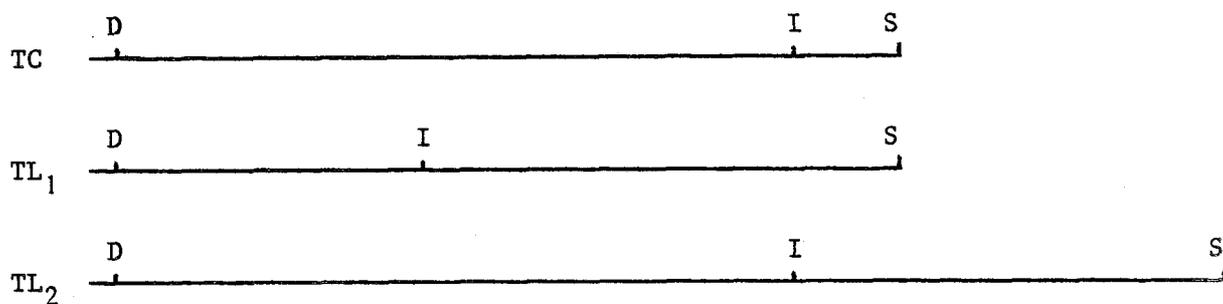


Figure 7 - Comparaison des conditions de marquage lors des expériences d'ovogenèse naturelle et d'ovogenèse expérimentale.

- D : Déprostomisation
- I : Injection du précurseur
- S : Sacrifice des animaux



inefficaces, en raison de l'abondance des fractions polysaccharidiques, par ailleurs non hydrolysables par voie enzymatique.

La tentative d'adaptation de la méthode de SPITNIK-ELSON (34) à l'urée 8 M/Chlorure de Lithium 6 M, conçue originellement pour l'isolement des protéines ribosomales, ne nous a conduit qu'à une purification partielle.

La technique au Perchlorate de Sodium, utilisable pour le matériel végétal, lui aussi riche en réserves polysaccharidiques, s'est avérée en tous points adaptée à nos besoins.

2 - Protocole expérimental

0,1 g d'ovocytes fraîchement préparés, sont repris par 10 ml de tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4 - NaCl 0,1 M - SDS 0,5 p. 100 - EDTA 1 mM et homogénéisés dans un homogénéiseur de Dounce à 4°C.

L'homogénat est transféré dans un tube à centrifugation en nitrate de cellulose et ramené à température ambiante. Il est immédiatement additionné de 2,5 ml de SDS à 25 p. 100, mélangé et laissé en contact quelques instants.

L'addition de 3 volumes d'une solution de Perchlorate de Sodium à 100 p. 100 provoque une abondante précipitation. Après une agitation par deux ou trois renversements du tube, on procède à une centrifugation à 1000 g environ, pendant 10 minutes.

Le précipité de SDS - sur lequel se sont adsorbés les protéines et les polysaccharides - apparaît comme une épaisse croûte blanchâtre en surface de la solution de Perchlorate de Sodium - dans laquelle les RNA restents solubles.

Il suffit alors de percer le tube à sa partie inférieure et de recueillir la solution qui contient les RNA.

Nous prenons la précaution de filtrer cette solution sur laine de verre de façon à éviter sa contamination par des fragments de la croûte de SDS.

Après retour à 4°C, la solution est additionnée, par petites fractions, de 2 volume d'Ethanol absolu, préalablement stocké à -20°C.

A la suite d'un séjour d'une durée minimale de 24 heures à -20°C, les RNA ont précipité et forment un dépôt blanc parfaitement visible.

Nous avons résumé l'extraction des RNA sur le schéma de la figure 8, p. 28.

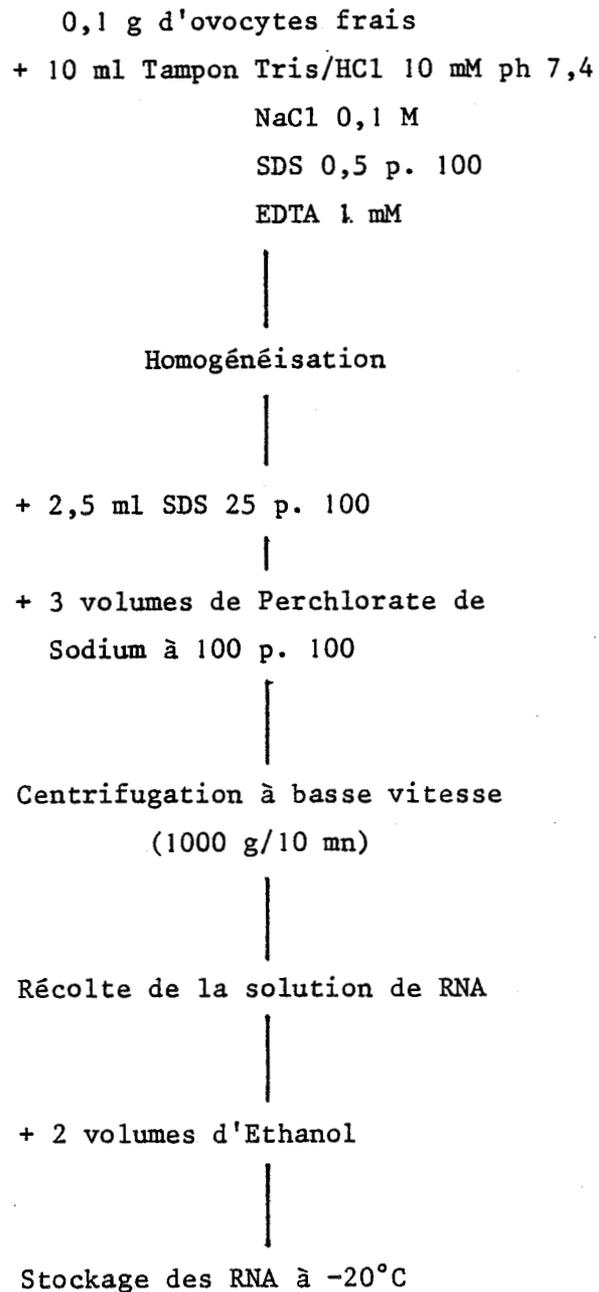


Figure 8 - Schéma d'extraction des RNA totaux d'ovocytes de *P. cultrifera* selon WILCOCKSON (33).



C - CONTROLE DES FRACTIONS

1 - Contrôles qualitatif et quantitatif

Le précipité provenant de 15 ml de suspension de RNA dans la solution de Perchlorate de Sodium - Ethanol est lavé à l'Ethanol absolu et repris par 0,5 ml de tampon Acétate de Sodium 10 mM pH 5 - NaCl 0,1 M - EDTA 1 mM.

Une prise d'essai de 20 μ l est utilisée pour la mesure de la radioactivité de l'échantillon en scintillation liquide. Le reste sert à la mesure de la densité optique à 260 nm et à 280 nm, ce qui permet d'évaluer le degré de pureté des RNA extraits.

Les deux mesures de la radioactivité et de la densité optique permettent d'établir la radioactivité spécifique globale de l'échantillon (exprimée en Cpm/DO 260) et de chiffrer la quantité de matériel disponible pour chaque préparation.

2 - Rendement d'extraction

Les RNA purifiés sont dosés par la méthode de WILSON et HOAGLAND (26) (cf. chapitre I p. 14).

Le rendement d'extraction est calculé par rapport au RNA total de l'homogénat dosé par la même méthode.

D - FRACTIONNEMENT DES RNA SUR GRADIENT DE DENSITE

Les RNA en suspension dans la solution de Perchlorate de Sodium - Ethanol sont traités comme lors des contrôles décrits au paragraphe précédent.

Après vérification de la densité optique et de la radioactivité, la concentration de l'échantillon est modifiée, si nécessaire, de façon à ce qu'elle soit voisine de 1,5 Unité DO₂₆₀ par 0,3 ml.

Ces 0,3 ml sont alors déposés sur un gradient linéaire de Saccharose 5 p. 100 - 20 p. 100 réalisé dans le tampon précédent additionné de Sarkosyl à 0,1 p. 100. La centrifugation est réalisée dans le Rotor SW 40 d'une ultracentrifugeuse Beckman L5-65, à 40 000 rpm pendant 5 heures à 4°C (202 000 g R_{av}).

Le gradient est alors analysé sur un Fractionneur automatique ISCO modèle 640. Tandis que l'on obtient directement l'enregistrement à 260 nm du profil des RNA, des fractions de 0,3 ml sont collectées dans des fioles contenant 5 ml de liquide scintillant Aqua Luma.

Les mesures de radioactivité sont réalisées sur un compteur Inter-technique SL 30. Les valeurs obtenues sont ensuite reportées sur l'enregistrement en densité optique fourni par le Fractionneur automatique.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

A - TRAITEMENT DES OVOCYTES

Les conditions dans lesquelles nous traitons les ovocytes et que nous avons définies précédemment, appellent deux remarques de notre part.

Si le marquage à l'uridine s'est avéré satisfaisant quelque soit le stade ovocytaire, notamment en ce qui concerne le nombre de coups par minutes mesurés par fraction, les temps d'incorporation peuvent paraître stupéfiants, surtout si on les compare avec ceux de cellules somatiques de Mammifères telles que l'hépatocyte de Rat.

Ils confirment combien l'ovocyte est un gamète au métabolisme lent dans sa phase de grand accroissement.

Le deuxième point est relatif au prélèvement des ovocytes qui précède immédiatement les opérations d'isolement des RNA.

L'absence de conditions stériles est sans importance au regard de la durée des prélèvements sur une dizaine d'animaux et du stockage temporaire des ovocytes avant traitement.

B - ANALYSE DES RNA

1 - Contrôle des fractions

Nous présentons sur le tableau IV (p. 31) les données caractéristiques des RNA totaux extraits des différentes catégories d'ovocytes.

On constate tout d'abord que l'on extrait des quantités de RNA assez voisines en ce qui concerne les animaux non opérés (ovogenèse naturelle). La moyenne de 15 Unités DO_{260} par 100 mg d'ovocytes frais semble légèrement supérieure à celle des animaux déprostités (ovogenèse expérimentale) qui se situe aux alentours de 12 Unités, mais ce résultat est difficilement interprétable en raison du faible nombre de valeurs disponibles.

Les rapports $DO_{260}/280$ des RNA extraits évoluent entre 1,93 et 2,06, ce qui est l'indice d'une absence de contamination protéique et donc d'une très grande pureté des RNA.

Enfin, la radioactivité spécifique de chaque échantillon donne, dès ce stade, un aperçu de l'évolution globale des marquages. Nous y reviendront ultérieurement.

En ce qui concerne le rendement de l'extraction, nous donnons, à titre d'exemple, celui que nous avons établi pour des ovocytes de 90 μ . Le rendement est de 89 % sur la base des valeurs des densités optiques à 260 nm. L'échantillon de départ étant marqué à l'uridine tritiée, il est intéressant

Tableau IV - Données et caractéristiques des RNA totaux extraits de différentes catégories d'ovocytes.

Temps d'incorporation	Ovogenèse naturelle						Ovogenèse expérimentale		
	Temps court		Temps long				Temps long		
Diamètre moyen des ovocytes	130 μ	220 μ	80 μ	130 μ	160 μ	220 μ	90 μ	160 μ (TL ₁)	160 μ (TL ₂)
Poids d'ovocytes frais (mg)	93 ^u	104	-	122	96	107	-	122	227
Unités DO ₂₆₀ extraites	12,8	14,6	7,6	18,3	15,2	14,8	8,3	14,9	26,1
Unités DO ₂₆₀ extraites / 100 mg ovocytes frais	13,8	14,1	-	15,0	15,7	13,8	-	12,2	11,5
DO 260/280 du RNA extrait	2,05	1,98	1,94	2,03	1,93	2,00	2,00	1,99	2,06
Radioactivité spécifique (cpm/DO)	9 300	4 420	44 530	25 720	20 310	12 610	14 420	16 940	27 720

d'utiliser le rapport des mesures de radioactivité. On obtient dans ce cas un rendement de 82 %. Nous ne lui attribuons qu'une valeur de confirmation en raison du volume des prises d'essai (25 μ l) qui amplifie les causes d'erreur.

2 - Fractionnement des RNA sur gradient de densité

a - Ovogenèse naturelle

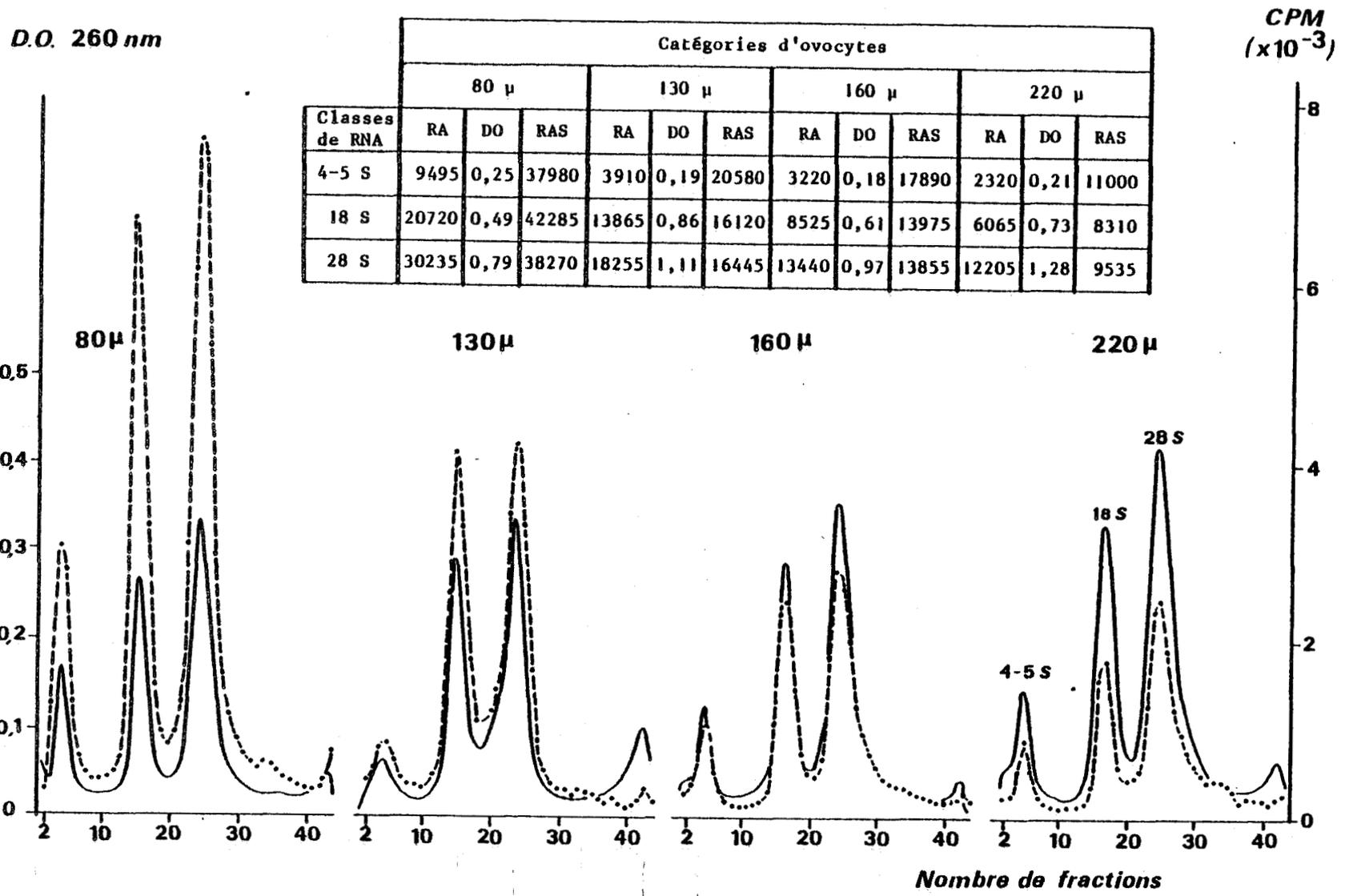
Nous présentons sur la figure 9 p. 32 les profils des RNA des ovocytes de 80 μ à 220 μ de diamètre, en densité optique et en radioactivité et sur le tableau V p. 32 les valeurs de la radioactivité spécifique des 3 classes de RNA "stables", à la suite d'un marquage long (TL).

Il en ressort que l'incorporation du précurseur diminue au fur et à mesure de la croissance de l'ovocyte. La chute est importante à la fois pour les RNA 4-5 S, 18 S et 28 S. Toutefois la radioactivité spécifique décroît d'avantage pour le RNA 18 S (80 %) que pour le RNA 28 S (75 %) et le RNA 4-5 S (-70 %), sans que nous puissions y apporter une explication satisfaisante.

Ovogenèse naturelle. Ovocytes de 80, 130, 160, 220 μ . Marquage long (TL).

Tableau V - Radioactivité spécifique des 3 principales classes de RNA. RA : Radioactivité ; DO : absorbance à 260 nm ; RAS : radioactivité spécifique (cpm/DO).

Figure 9 - Profils de sédimentation des RNA totaux extraits. (—) Absorbance à 260 nm ; (---) Radioactivité.



BIOS
LILLE
508

Il est important de noter la très grande similitude des profils en densité optique, ce qui atteste d'une grande stabilité du stock des RNA "stables", tout au long du grand accroissement ovocytaire.

L'examen des profils en radioactivité indique une diminution mais non un arrêt de la synthèse des RNA à l'approche de la reproduction, ce qu'avaient observé GOULD et SCHROEDER (21) chez *Nereis grubei*.

Nous pouvons ajouter que la synthèse se poursuit même quand toute activité de l'hormone cérébrale a disparu (cf. Profil des ovocytes de 220 μ de diamètre).

Les marquages courts (TC) représentés sur les deux graphiques de la figure 10 p. 33 n'apportent rien de très significatif. Le faible marquage confirme la lenteur des processus métaboliques. Des pics, vraisemblablement de précurseurs de RNA ribosomiaux, apparaissent discrètement en radioactivité. Une radioactivité importante se manifeste en surface du gradient pour les ovocytes de 130 μ de diamètre. On peut émettre l'hypothèse qu'elle résulte de la dégradation de mRNA dont la synthèse serait plus abondante, à ce stade. Cette hypothèse s'appuie également sur le fait que le profil, en densité optique, des RNA "stables" n'est pas modifié.

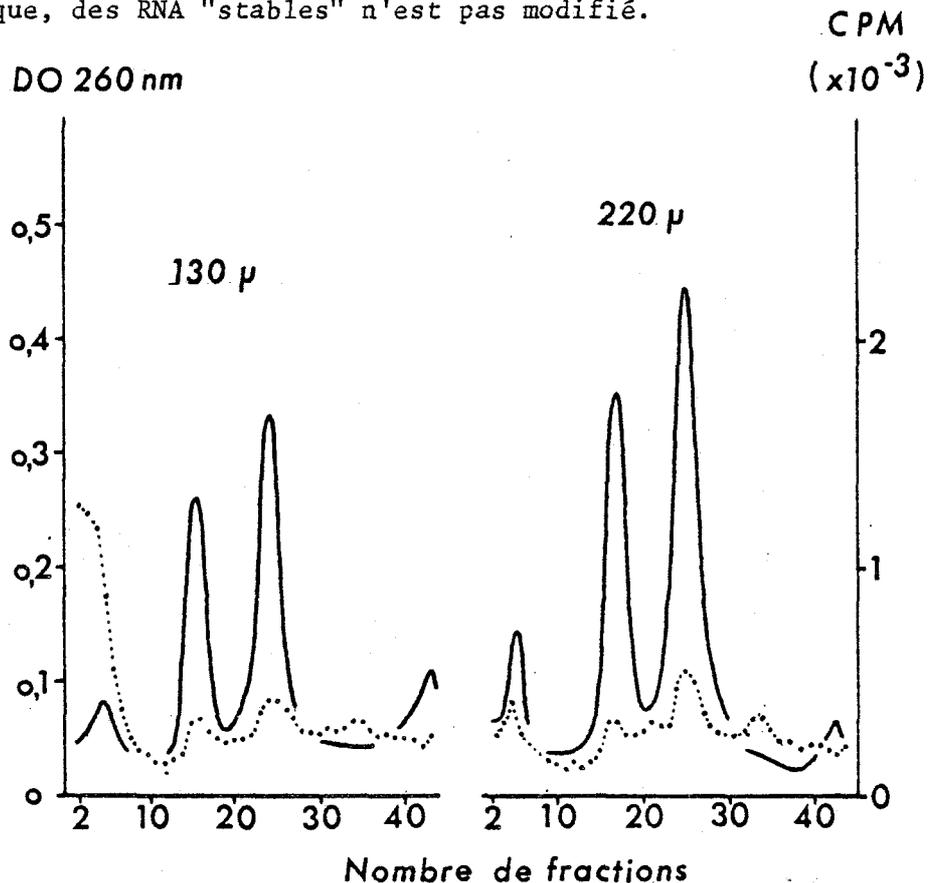


Figure 10 - Ovogenèse naturelle. Profils de sédimentation des RNA totaux extraits de 2 catégories d'ovocytes (diamètre 130 et 220 μ) après un marquage court (TC). (—) Absorbance à 260 nm ; (----) Radioactivité.

Nos résultats sont à rapprocher de ceux de BERTOUT et Coll. (35). BERTOUT a réalisé, parallèlement à nos travaux, une étude morphologique et une étude autoradiographique, tout au long de l'ovogenèse.

Nous présentons sur la Planche I p. 35, le résultat des observations faites en microscopie électronique sur le nucléole, de façon à montrer les remaniements structuraux dont il est l'objet.

Les techniques autoradiographiques, dont nous présentons une illustration sur la planche II p. 37, apportent par les marquages *in situ* et la diversité des temps d'incorporation (de 1 heure à 6 jours), une moisson d'informations qui couvrent la totalité de l'ovogenèse.

Sans vouloir analyser en détail la totalité des résultats du tableau VI p. 36, il est intéressant de constater que, dans les ovocytes en prévitellogenèse (20-40 μ), la synthèse des RNA nucléoplasmiques est plus importante que celle des rRNA d'origine nucléolaire. Cette prépondérance s'atténue dans les ovocytes en vitellogenèse (60-100 μ) pour disparaître dans les ovocytes en phase d'élaboration des alvéoles corticaux. Ces observations sont en accord avec les études effectuées chez les Vertébrés inférieurs [voir revue générale de DENIS (36)] et en opposition avec les résultats obtenus chez *Urechis caupo* par DAVIS et WILT (30) et DAS (37).

La diminution de la synthèse des rRNA au niveau du nucléole et la diminution simultanée de l'apparition de ces derniers au niveau du cytoplasme, de la vitellogenèse à la maturité, viennent appuyer nos résultats.

b - Ovogenèse expérimentale

Les figures 11 et 12, les tableaux VII et VIII montrent les résultats obtenus après un marquage long, avec des animaux déprostomisés de 90 μ et de 160 μ , comparés à des témoins évoluant dans des conditions hormonales naturelles.

Nous constatons les faits suivants :

- Lorsque l'ablation du prostomium est réalisée chez des animaux dont les ovocytes se trouvent au stade de la vitellogenèse (90 μ), on observe une diminution très importante de la radioactivité spécifique des RNA, qui devient très nettement inférieure à celle des ovocytes témoins (figure 11 p. 38). La baisse de la radioactivité spécifique intéresse les trois classes de RNA séparés en gradient de saccharose mais elle est plus importante pour le RNA 18 S (86% de diminution par rapport aux témoins) que pour le RNA 28 S (77 %) et les RNA 4 et 5 S (58 %) (Tableau VII p. 39). En outre, les profils de radioactivité (figure 11) montrent deux pics supplémentaires, constitués vraisemblablement par des produits intermédiaires du processus de maturation du précurseur 45 S des rRNA.

PLANCHE I

EVOLUTION DU NUCLEOLE DE *P. CULTRIFERA* AU COURS DE L'OVOGENESE
[d'après BERTOUT et Coll. (35)]

- 1 - Nucléole d'un ovocyte de 90 μ (vitellogenèse). x 9 000.

- 2 - Nucléole d'un ovocyte de 130 μ (élaboration des alvéoles corticaux).
x 8 000.

- 3 - Nucléole d'un ovocyte de 180 μ (fin de l'élaboration des alvéoles
corticaux). x 18 000.

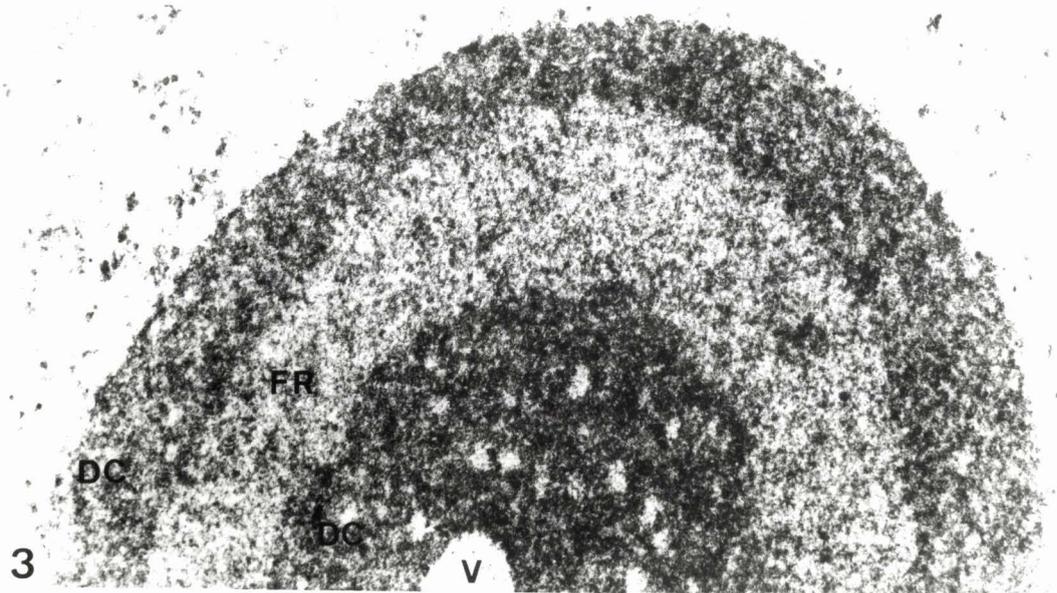
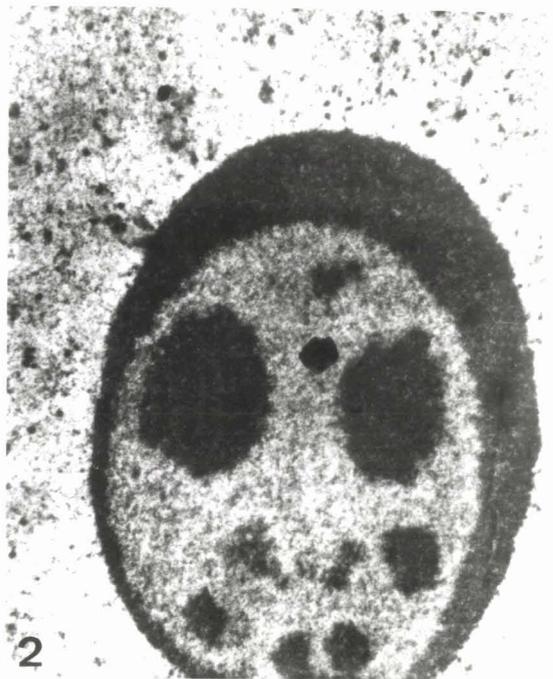
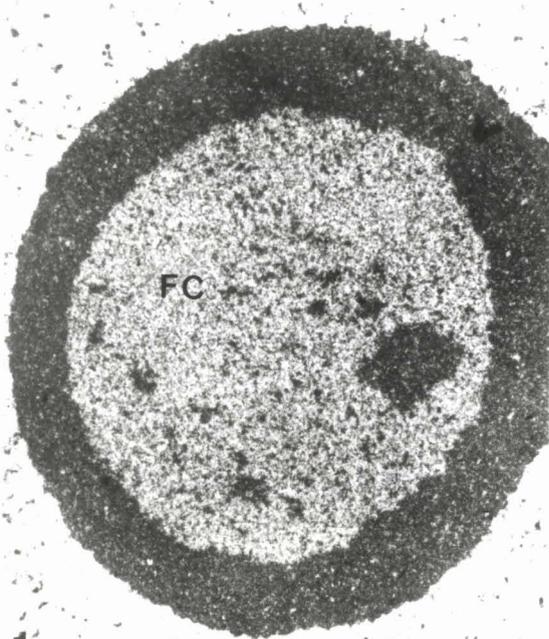
FC (fibrillar core) : Zone fibrillaire

FR (fibrillar ring) : Anneau fibrillaire

DC (dense component) : Composant fibrillo-granulaire dense

V : vacuole





BUS
LILLE

Tableau VI - Etude cinétique de l'incorporation d'uridine-³H *in vivo* au cours de l'ovogenèse naturelle (*P. cultrifera*).

ZF : zone fibrillaire ; ZG : zone granulaire

a - Stade de prévitellogenèse (20-40 μ)

	Nucléole		Nucléoplasme	Cytoplasme
	ZF	ZG		
1 heure	-	-	++	-
6 heures	+	-	+++	-
24 heures	++	++	+++	+
3 jours	++	++	++	+++

b - Stade de vitellogenèse (60-100 μ)

	Nucléole		Nucléoplasme	Cytoplasme
	ZF	ZG		
1 heure	++	-	++	-
6 heures	+++	+++	+++	-
24 heures	+++	+++	++	++
3 jours	++	++	++	+++
6 jours	+	+	+	++++

c - Stade d'élaboration des alvéoles corticaux (130-180 μ)

	Nucléole		Nucléoplasme	Cytoplasme
	ZF	ZG		
1 heure	+	-	-	-
6 heures	++	+	+	-
24 heures	++	++	+	+
3 jours	++	++	++	++
6 jours	++	++	++	+++

d - Stade de maturité (220-240 μ)

	Nucléole		Nucléoplasme	Cytoplasme
	ZF	ZG		
1 heure	+	-	-	-
6 heures	+	+	-	-
24 heures	++	+	+	-
3 jours	++	++	++	+
6 jours	++	++	++	+

- : marquage nul ;

+ : marquage plus ou moins intense selon le nombre de +.



PLANCHE II

ILLUSTRATION DES TECHNIQUES D'AUTORADIOGRAPHIE

D'après BERTOUT (Thèse de Doctorat, 1981)

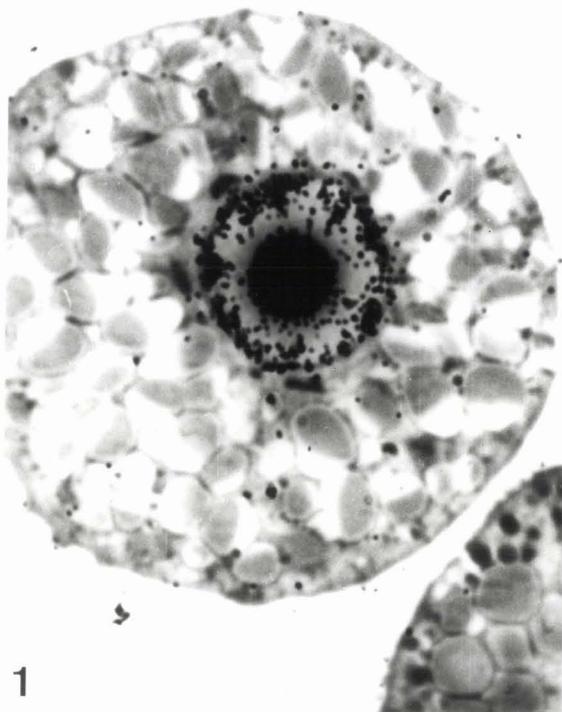
- 1 - Ovocyte de 60 μ (vitellogenèse). Incorporation d'uridine- ^3H *in vitro* pendant 1 h 30. Marquage du nucléole et des granulations nucléoplasmiques disposées le long de l'enveloppe nucléaire. Coupe semi-fine colorée par le bleu Azur B. Temps d'exposition : 8 jours. x 1 500.

- 2 - Ovocytes de 60 μ . Incorporation d'uridine- ^3H *in vitro* pendant 1 h 30. Chasse : 4 heures. Le nucléole et l'ensemble du nucléoplasme sont marqués. Coupe semi-fine colorée par le bleu Azur B. Temps d'exposition : 8 jours. x 1 500.

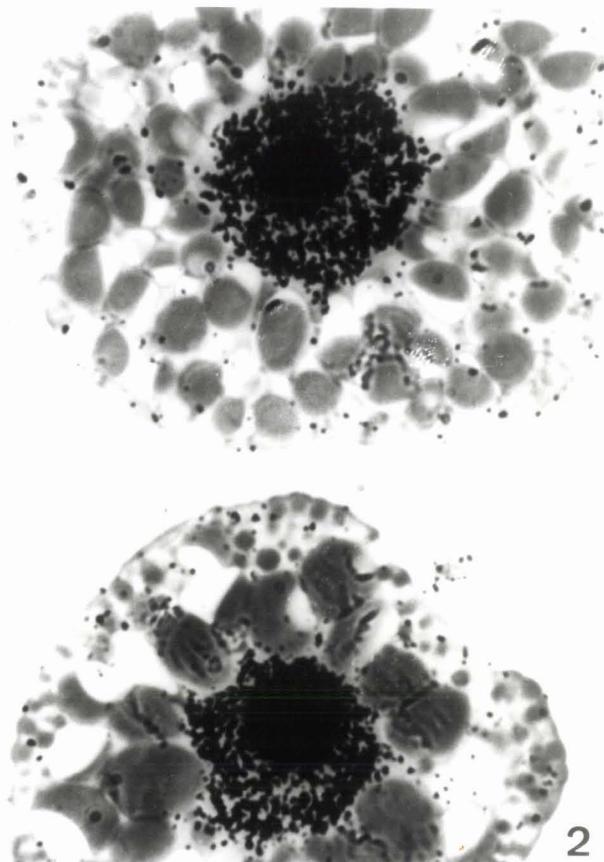
- 3 - Ovocyte de 170 μ (élaboration des alvéoles corticaux). Incorporation d'uridine- ^3H *in vivo* pendant 6 heures. Le nucléole est bien marqué. Quelques grains d'argent dans le nucléoplasme. Coupe après inclusion à la paraffine. Temps d'exposition : 15 jours. x 1 200.

- 4 - Ovocyte de 170 μ . Incorporation d'uridine- ^3H *in vivo* pendant 3 jours. Les grains d'argent sont nombreux dans le cytoplasme. Le marquage du nucléole et du nucléoplasme a augmenté par rapport à celui de la figure 3. Coupe après inclusion à la paraffine. Temps d'exposition : 15 jours. x 1 200.

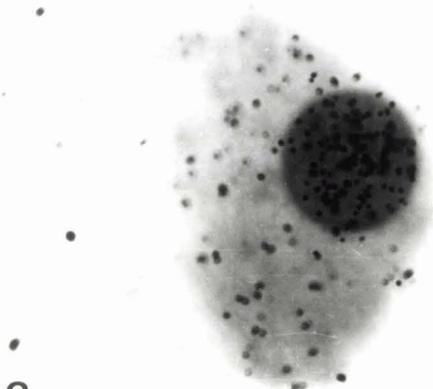




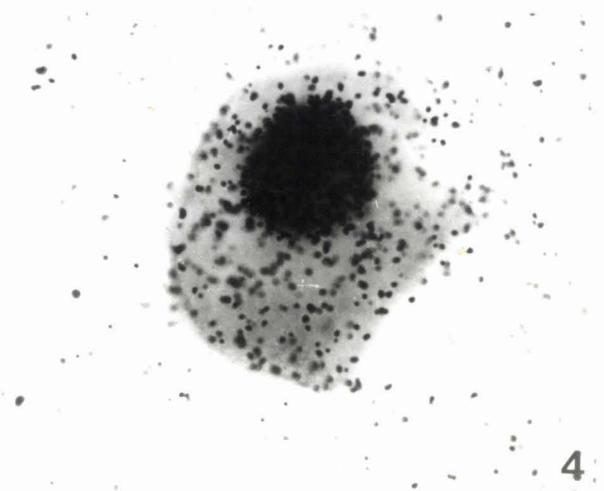
1



2



3



4

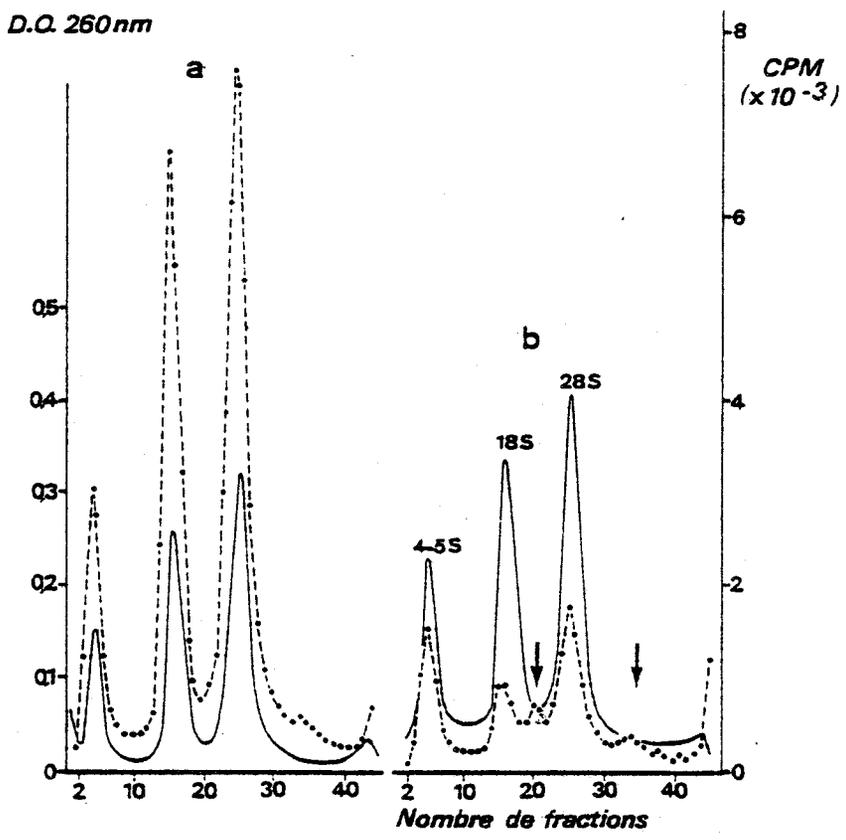


Figure 11 - Ovogenèse expérimentale.
Profils de sédimentation des RNA totaux extraits d'ovocytes de 90 μ après un marquage long (TL).
a - Ovocytes d'animaux témoins.
b - Ovocytes d'animaux déprostomisés.
— Absorbance à 260 nm ; --- Radioactivité

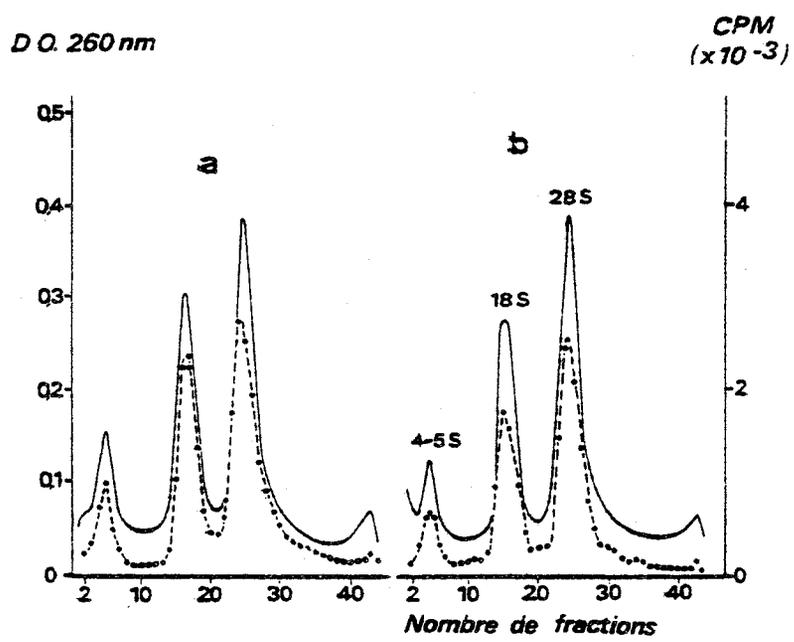


Figure 12 - Ovogenèse expérimentale.
Profils de sédimentation des RNA totaux extraits d'ovocytes de 160 μ après un marquage long (TL).
a - Ovocytes d'animaux témoins.
b - Ovocytes d'animaux déprostomisés.
— Absorbance à 260 nm ; --- Radioactivité



Tableau VII - Ovogenèse expérimentale.

Valeurs de la radioactivité spécifique des 3 principales classes de RNA pour les ovocytes de 90 μ après un marquage long (TL).

Classes de RNA	Animaux témoins			Animaux déprostomisés		
	RA	DO	RAS	RA	DO	RAS
4-5 S	9495	0,25	37980	4590	0,29	15830
18 S	20720	0,49	42285	3740	0,62	6030
28 S	30235	0,79	38270	6760	0,78	8665

RA : radioactivité ; DO : absorbance à 260 nm ; RAS : radioactivité spécifique.

Tableau VIII - Ovogenèse expérimentale.

Valeurs de la radioactivité spécifique des 3 principales classes de RNA pour les ovocytes de 160 μ après un marquage long (TL).

Classes de RNA	Animaux témoins			Animaux déprostomisés		
	RA	DO	RAS	RA	DO	RAS
4-5 S	3220	0,18	17890	2135	0,16	13345
18 S	8525	0,61	13975	6255	0,59	10600
28 S	13440	0,97	13855	9990	0,88	11350

RA : radioactivité ; DO : absorbance à 260 nm ; RAS : radioactivité spécifique.



- Pendant le stade d'élaboration des alvéoles corticaux (ovocytes de 160 μ), l'ablation des ganglions cérébroïdes ne provoque pas d'effets comparables à ceux observés dans les ovocytes plus jeunes : les profils de sédimentation sont sensiblement identiques à ceux des témoins (figure 12 p. 38) et les radioactivités spécifiques diminuent mais dans des proportions moindres (18 à 25 %) (Tableau VIII p. 39). Les résultats d'un deuxième temps long (TL₂) confirment cette analyse.

Les données obtenues en ovogenèse expérimentale montrent que l'hormone cérébrale joue un rôle stimulateur dans la synthèse des RNA "stables". Le peu de modifications des synthèses de RNA provoqué par l'ablation du cerveau à l'approche de la maturité sexuelle, s'explique aisément par le très faible taux hormonal enregistré à ce stade [DURCHON et PORCHET (38)].

Il en va tout autrement chez les jeunes animaux dont l'activité cérébrale est intense et où la décérébration a un double effet vis-à-vis des RNA "stables" (diminution de l'incorporation de l'uridine tritiée, altération du profil de radioactivité). Ce résultat se trouve conforté par une étude autoradiographique qui révèle, en particulier, une accumulation anormale dans le noyau des RNA synthétisés et un blocage de leur transfert dans le cytoplasme [CANER et Coll. (39)] et par les dosages chimiques qui décèlent une diminution du taux des RNA ovocytaires (cf. chapitre I p. 22).

IV - CONCLUSION

Nous disposons d'une méthode d'extraction des RNA, après marquage *in vivo*, fiable et adaptée au matériel biologique que nous étudions. Elle nous a permis de contribuer à éclaircir le rôle que joue l'hormone cérébrale dans le développement ovocytaire. Celle-ci intervient vraisemblablement au niveau des processus de maturation du précurseur des rRNA.

Nous continuons d'accumuler des données sur les EFFETS que provoque l'hormone sur les cellules "cibles" et qui sont nombreux. Il nous reste à espérer, qu'à brève échéance, la connaissance de la nature et de la structure du principe hormonal nous permettra de déterminer directement à quel niveau moléculaire et selon quelles modalités l'activité endocrine s'exerce.

PRÉPARATION DES FRACTIONS MEMBRANAIRES DES OVOCYTES

I - INTRODUCTION

Dans le but de déterminer le rôle de l'hormone au niveau subcellulaire, nous avons entrepris de fractionner l'ovocyte.

Compte tenu des caractéristiques de cette cellule, c'est essentiellement au niveau des fractions membranaires et du contenu des alvéoles corticaux que nous avons obtenu, en collaboration avec C. DISSOUS et M. PORCHET, les premiers résultats [CANER et Coll. (40)].

Ces différents constituants cellulaires, bien que n'ayant aucune relation directe avec le métabolisme des RNA, présentent par contre un intérêt évident pour celui des glycoconjugués auxquels certains d'entre nous ont consacré de très nombreux travaux [voir en particulier PORCHET, SPIK et DHAINAUT (32) et DHAINAUT et PORCHET (41)].

C'est donc dans cette direction que nous a conduit la mise au point du procédé original que nous allons décrire.

II - MATERIEL ET METHODES

A - SOLUTIONS

Toutes les solutions de saccharose utilisées sont préparées dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4.

Aucune addition d'ions (en particulier de cations bivalents tels que Mg^{++} , Mn^{++} ...) n'est effectuée en raison d'essais enzymatiques réalisés ultérieurement sur les fractions.

B - ECLATEMENT DES OVOCYTES

Les ovocytes fraîchement préparés (1 g environ) sont maintenus à 4°C, température à laquelle sont réalisées toutes les opérations suivantes. Ils sont additionnés de 10 ml de solution de saccharose 0,25 M, transférés dans un homogénéiseur de Dounce où ils sont soumis à un éclatement complet.

C - PRÉPARATION DES FRACTIONS

L'homogénat est amené à une concentration finale en saccharose de 1,89 M par addition de 4 volumes de saccharose 2,30 M. 15 ml sont déposés

au fond de tubes à centrifugation de 60 ml et recouverts successivement de 25 ml de saccharose 1,80 M et 10 ml de saccharose 1,15 M.

Après centrifugation en rotor SW 25-2 d'une ultracentrifugeuse Beckman L₅-65 à 18 000 rpm pendant 90 minutes (39 000 g R_{av}), le matériel ovocytaire se répartit en trois fractions :

- . l'interphase des solutions de saccharose 1,15/1,80 M,
- . l'interphase des solutions de saccharose 1,80/1,89 M,
- . le culot,

plus une fraction surnageante, de nature lipidique, qui est éliminée (voir figure 13 p. 43).

D - PURIFICATION DES FRACTIONS

Le matériel visible aux interphases est délicatement prélevé à la seringue au niveau 1,15/1,80 M puis 1,80/1,89 M.

Le reste du contenu des tubes est décanté, ce qui permet la récupération des culots.

1 - Fraction de l'interphase 1,15/1,80 M

7 ml de cette fraction dont la molarité moyenne en saccharose est de 1,50 M, sont déposés au fond de tubes à centrifugation de 34 ml. Trois couches de solutions de saccharose (1,25 M ; 1,15 M ; 0,90 M), de même volume, sont alors déposées.

Après 120 minutes de centrifugation à 18 000 rpm en rotor SW 25-1 (33 000 g R_{av}), on obtient quatre sous-fractions : M₁, M₂, M₃ et M_c (voir figure 13 p. 43).

2 - Fraction de l'interphase 1,80/1,89 M

Cette fraction homogène dès la séparation initiale des constituants cellulaires, est concentrée par centrifugation (voir Examen des fractions).

3 - Fraction du culot

Le culot de la première centrifugation est repris par du saccharose 0,90 M et homogénéisé à nouveau.

7 ml de cette suspension sont déposés sur un gradient discontinu composé de 5 ml de 2,30 M, 10 ml de 1,80 M et de 5 ml de 1,15 M en saccharose.

La fraction purifiée sédimente au cours d'une centrifugation de 150 minutes à 25 000 rpm (63 500 g R_{av}) dans le rotor SW 25-1.

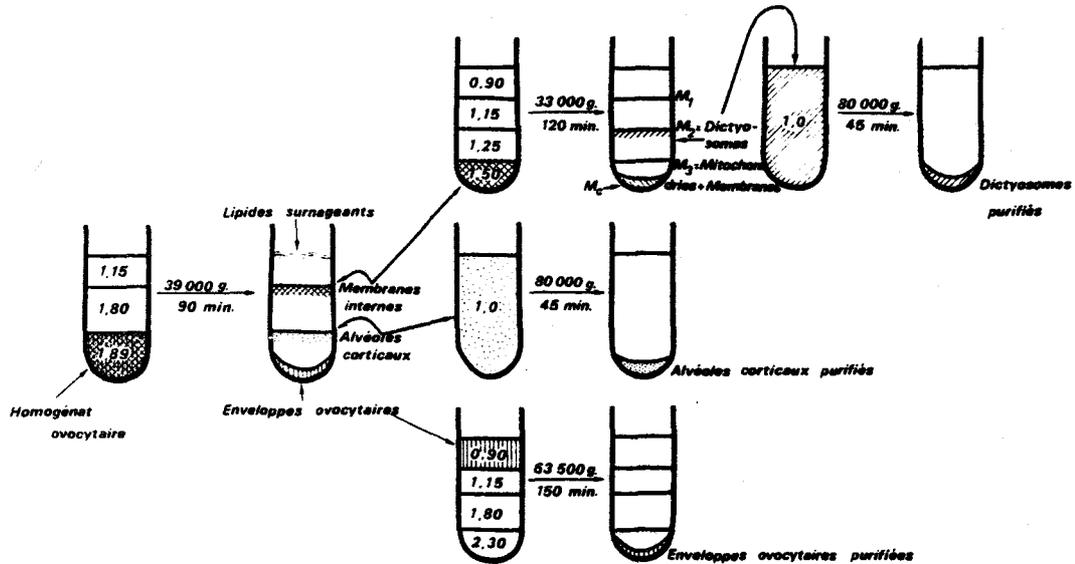


Figure 13 - Schéma de fractionnement de quelques constituants cytoplasmiques des ovocytes de *P. cultrifera*.

E - EXAMEN DES FRACTIONS

Toutes les fractions à examiner qui ne sont pas obtenues directement sous forme de culots lors des opérations de préparation ou de purification, sont ajustées à une concentration en saccharose de 1 M et sédimentées à 25 500 rpm (80 000 g R_{av}) pendant 45 minutes dans le rotor SW 40.

Les culots sont alors fixés pour la microscopie électronique, par la glutaraldéhyde à 3 p. 100 (dans un tampon phosphate 0,2 M pH 7,2) puis par l'Osmium.

III - RESULTATS

La bonne connaissance de la morphologie *in situ* des ovocytes (14, 41, 42) a permis de retenir comme seul critère de mise au point du fractionnement, l'examen en microscopie des fractions, réalisé par A. DHAINAUT.

Les conditions d'utilisation des enzymes marqueurs ne sont, en effet, pas définies pour ce matériel.

A - ISOLEMENT DE L'APPAREIL DE GOLGI ET DES MEMBRANES INTRAOCYTAIRES

L'ensemble des membranes internes de l'ovocyte (dictyosomes, réticulum, vésicules...) migre à l'interphase des solutions de saccharose 1,15/1,80 M lors de la centrifugation initiale.

C'est une fraction hétérogène, contaminée par des mitochondries, quelques alvéoles corticaux et parfois des lobules de vitellus (voir Planche III-1, p. 45). La purification de l'ensemble conduit aux 4 sous-fractions : M₁, M₂, M₃ et M_c (voir Matériel et méthodes et figure 13).

- La sous-fraction M₁, très pauvre en éléments, n'a pas été analysée.
- La sous-fraction M₂, située à l'interphase 1,15/1,25 M est riche en dictyosomes et en membranes. Pratiquement dépourvue de substances muqueuses, elle est contaminée par de rares mitochondries et par de petites inclusions (0,5 à 1 µm) de densité moyenne aux électrons.
 - . Les dictyosomes (Planche III-2 et 3, p. 45) ne subissent pas de fragmentation et conservent leur taille d'origine qui est considérable, le plus souvent de 10 µm pour les ovocytes dont le diamètre dépasse 140 µ. Leur structure est comparable à celle des dictyosomes *in situ*, c'est-à-dire qu'ils sont constituée par l'empilement de 5 à 6 saccules dont les modifications sont très réduites.
 - . Les membranes sont agencées en formations circulaires dont le diamètre varie entre 0,3 et 0,9 µm. Ces éléments sont vides.
- La sous-fraction M₃, à l'interphase 1,25/1,50 M, est très homogène. Totale-ment dépourvue de dictyosomes mais légèrement contaminée par quelques alvéoles corticaux, elle renferme deux catégories d'organites (Planche III-5), distribués de façon uniforme :
 - . des mitochondries dont la matrice est dense et les crêtes dilatées. Ces modifications traduisent l'influence de l'environnement hypertonique des différentes solutions de saccharose ;
 - . des membranes en formation circulaire, vides de tout contenu.
- La sous-fraction M_c est plus hétérogène. En plus de quelques enveloppes ovocytaires, elle renferme les parois membranaires des alvéoles corticaux ayant éclaté lors de l'homogénéisation. Le culot présente, dans certains cas, du matériel alvéolaire incomplètement expulsé.

B - ISOLEMENT DES ALVEOLES CORTICAUX

Les alvéoles corticaux ont, *in situ*, une structure très caractéristique. Morphologiquement, ils apparaissent entourés par une membrane limitant un contenu muqueux de texture fibrillaire.

PLANCHE III

- 1 - Centrifugation initiale. Organites de l'interphase 1,15/1,80 M. La fraction est déjà très enrichie en dictyosomes (G) mais divers contaminants, notamment du mucus (mc) persistent encore. x 15 000.

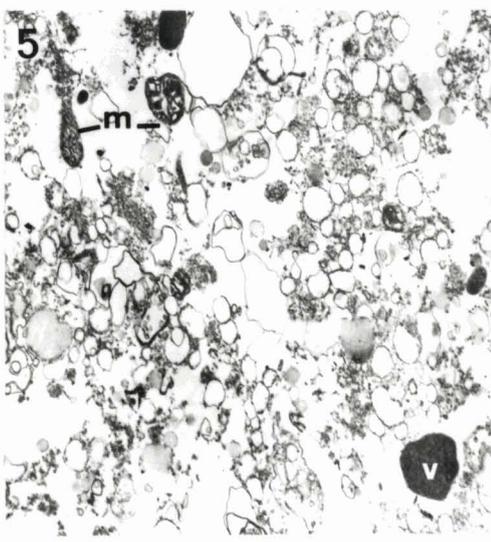
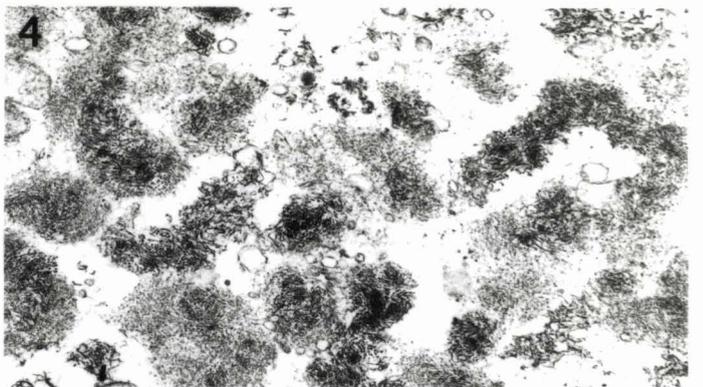
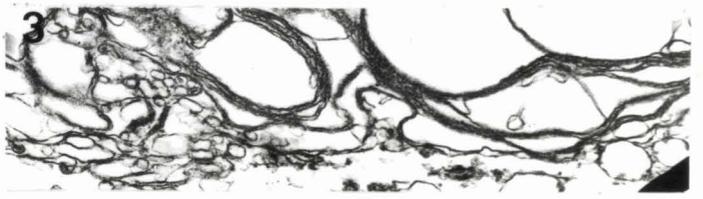
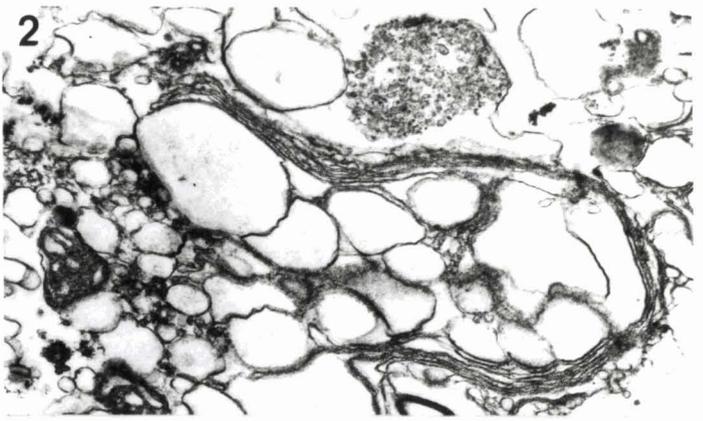
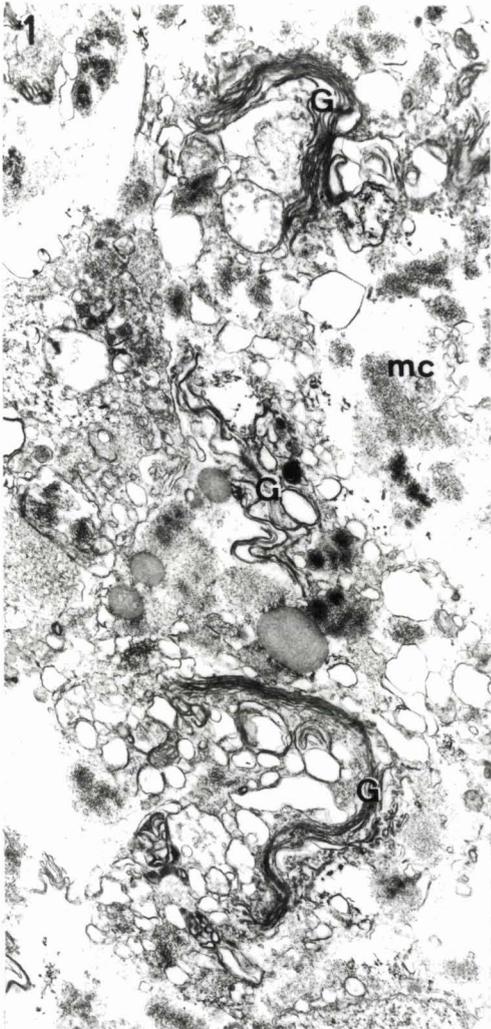
- 2 et 3 - Dictyosomes de la sous-fraction M_2 à l'interphase 1,15/1,25 M. x 32 000.

- 4 - Couche formée par le contenu des alvéoles corticaux. La nature fibrillaire du matériel muqueux reste inchangée. x 14 000.

- 5 - Composition de la sous-fraction membranaire M_1 à l'interphase 1,25/1,50 M. La paroi des vésicules est dépourvue de ribosomes, ceux-ci étant libres dans l'ooplasme. Quelques mitochondries à matrice très dense (m) et de rares fragments de lobules vitellins (v) sont présents. x 9 500.

- 6 - Enveloppes ovocytaires. Les structures apparaissent bien conservées, notamment lorsqu'elles sont examinées en section tangentielle (flèche). x 11 000.





Après la centrifugation initiale, les substances muqueuses se concentrent dans la zone de saccharose 1,89 M. Elles conservent leur nature fibrillaire mais ont perdu leur individualité d'alvéoles (Planche III-4).

Les membranes limitantes migrent à d'autres niveaux : soit dans la sous-fraction M_c , soit avec les enveloppes ovocytaires.

C - ISOLEMENT DES ENVELOPPES OVOCYTAIRES

Les enveloppes ovocytaires sont d'une remarquable solidité et résistent parfaitement aux opérations d'homogénéisation.

Matériel très dense, ces enveloppes constituent systématiquement le culot de toutes les centrifugations, même lorsque la couche de saccharose est de 2,30 M, ce qui reste surprenant.

Leur structure (Planche III-6) est peu modifiée par rapport aux enveloppes *in situ*. Sous le chorion bien conservé et d'épaisseur constante, la membrane plasmique est, par endroits, fragmentée. Les microvillosités persistent partout et conservent leur disposition en quinconce (voir détail en coupe tangentielle de la Planche III-6).

IV - CONCLUSION

La technique de fractionnement que nous venons de décrire aboutit à la purification de fractions membranaires des ovocytes de *P. cultrifera*.

Elle ne permet pas d'obtenir d'autres fractions cellulaires. Les noyaux ou vésicules germinatives, qui sont de grande taille (30 à 40 μ m), ne peuvent pas, en particulier, résister aux opérations d'homogénéisation des cellules.

L'obtention des fractions membranaires oriente la recherche dans deux directions.

La première consiste à vérifier l'hypothèse du contrôle, par l'hormone cérébrale, de l'activité des glycosyltransférases du réticulum ou de l'appareil de Golgi [DHAINAUT et PORCHET (41), PORCHET et SPIK (43)].

La seconde envisage, à plus long terme, la localisation et l'isolement des récepteurs membranaires de l'hormone.

Dans les deux cas, la tâche s'annonce ardue mais elle s'avère indispensable pour comprendre le mécanisme de l'action de l'hormone au niveau sub-cellulaire.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les travaux personnels que nous venons de présenter sur l'ovogenèse de *P. cultrifera*, se divisent en trois parties :

. Les dosages chimiques nous permettent d'établir une première relation entre le taux de l'hormone cérébrale et l'évolution des constituants cellulaires des ovocytes.

- A un niveau élevé de l'activité endocrine cérébrale correspond une synthèse importante de lipides alors que protéines et glucides sont abondants lorsque l'hormone cesse d'être secrétée par le cerveau, à l'approche de la maturité génitale.
- Des acides nucléiques, seul le RNA présente un taux significatif qui est affecté lorsque des ovocytes en vitellogenèse sont soustraits à l'influence de l'hormone.

. L'étude du métabolisme des RNA "stables" nous conduit à démontrer que :

- leur synthèse décroît régulièrement au cours du grand accroissement ovocytaire (80 à 220 μ), sans s'annuler au moment de la maturité.
- l'absence du facteur hormonal se traduit, au cours de la vitellogenèse, par une perturbation de la synthèse des RNA "stables" notamment celle des RNA ribosomiaux.

. La préparation des fractions membranaires est une première application du fractionnement cellulaire. Elle ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes moléculaires de l'action de l'hormone.

A cet ensemble déjà réalisé, nous pouvons envisager des prolongements dont les orientations principales sont les suivantes :

. Etudier le métabolisme des RNA "stables" des ovocytes de *Nereis diversicolor* dont l'évolution du nucléole est plus marquée que chez *Perinereis cultrifera*, aussi bien en ovogenèse naturelle qu'en ovogenèse expérimentale.

. Mettre au point le marquage des RNA *in vitro* de façon à explorer le métabolisme des Hn RNA, en particulier.

. Isoler d'autres organites cellulaires : vésicules germinatives, polysomes,.... de manière à augmenter les moyens d'investigation du mode d'action de l'hormone cérébrale au niveau subcellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- | | Pages |
|---|----------|
| 1. SCHARRER B., Uber Drüsenervenzellen im Gehirn von <i>Nereis virens</i> Sars.
Zool. Anz. (1936), <u>113</u> , 299-302. | 4, 9 |
| 2. DURCHON M., Epitoquie expérimentale chez deux Polychètes : <i>P. cultrifera</i>
et <i>N. irrorata</i> . C. R. Acad. Sci. (1948), <u>227</u> , 157-158. | 4 |
| 3. DURCHON M., L'endocrinologie des Vers et des Mollusques. Masson Ed. Paris
(1967), 237 p. | 4, 8 |
| 4. DURCHON M. et JOLY P., L'endocrinologie des Invertébrés. Presses Universi-
taires de France Eds. Paris (1978), 235 p. | 4 |
| 5. PORCHET M., Données actuelles sur le contrôle endocrine de la maturation
génitale des Néréidiens (Annélides Polychètes). Ann. Biol. (1976),
<u>XV</u> , 330-377. | 4, 11 |
| 6. HAUENSCHILD C., Der hormonale Einfluss des Gehirns auf die sexuelle Ent-
wicklung bei dem Polychaeten <i>Platynereis dumerilii</i> . Gen. comp. Endo-
crinol. (1966), <u>6</u> , 26-73. | 4 |
| 7. CLARK R.B., Endocrine influence in Annelids. Gen. comp. Endocrinol. (1969),
<u>2</u> , 572-581. | 4(2fois) |
| 8. DEFRETIN R., Recherches sur la musculature des Néréidiens au cours de l'E-
pitoquie, sur les glandes parapodiales et sur la spermiogenèse. Ann.
Inst. Océanogr. (1949), <u>24</u> , 117-257. | 4 |
| 9. WISSOCQ J.-C., Contribution à l'étude de la musculature et de son évolution
au cours de la stolonisation des Syllidiens et de l'épitoquie des
Néréidiens. Thèse de Doctorat, Lille (1971). | 4 |
| 10. BOILLY B., Mode d'action du cerveau sur la régénération caudale de <i>Nereis</i>
<i>diversicolor</i> (Annélide Polychète). Wilhelm Roux' Archiv. (1974),
<u>174</u> , 195-209. | 4 |
| 11. BOILLY B. et BOILLY-MARER Y., Rôle des contacts tissulaires dans le déclen-
chement de la morphogenèse régénératrice chez la <i>Nereis</i> . Bull. Soc.
Zool. Fr. (1972), <u>97</u> , 296-308. | 4 |
| 12. DHAINAUT-COURTOIS N., Etude histologique et ultrastructurale des cellules
nerveuses du ganglion cérébral de <i>Nereis pelagica</i> L. Comparaison en-
tre les types cellulaires I-IV et ceux décrits antérieurement chez
les <i>Nereidae</i> . Gen. comp. Endocrinol. (1968), <u>11</u> , 414-443. | 4 |
| 13. GOLDING D.W., Studies in the comparative neuroendocrinology of Polychaete
reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. (1972), suppl. n°3, 580-590. | 4, 9 |

	Pages
14. DHAINAUT A., Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution oocytaire de <i>Nereis pelagica</i> . I. Ovogenèse naturelle. II. Evolution expérimentale en l'absence d'hormone cérébrale. Z. Zellforsch. (1970) <u>104</u> , 375-389 et 390-404.	4, 10, 40
15. BERTOUT M., Relations entre l'évolution du nucléole et l'activité endocrine cérébrale au cours de l'ovogenèse de <i>Nereis diversicolor</i> dans les conditions naturelles et expérimentales. Wilhelm Roux' Archiv. (1973), <u>173</u> , 183-207.	4, 5
16. DURCHON M., MONTREUIL J. et BOILLY-MARER Y., Résultats préliminaires sur la nature chimique de l'hormone inhibitrice du cerveau des Néréidiens. C. R. Acad. Sci. (1963), <u>257</u> , 1807-1808.	4
17. CARDON C., Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de <i>Nereis diversicolor</i> O.F. Müller en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation. Bull. Soc. Zool. Fr. (1970), <u>95</u> , 543-549.	4
18. CARDON C., DURCHON M. et PORCHET M., Purification par chromatographie liquide de haute pression (HPLC) de l'hormone cérébrale chez <i>N. diversicolor</i> et <i>P. cultrifera</i> (Annélides Polychètes). Reprod. Nutr. Dévelop. (1981), <u>21</u> , 383-390.	4
19. PORCHET M. et CARDON C., The inhibitory feed-back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in <i>Nereis</i> . Gen. Comp. Endocrinol. (1976), <u>30</u> , 378-390.	4
20. PORCHET M., Activité endocrine cérébrale chez les <i>Nereidae</i> . Thèse de Doctorat, Lille (1974).	4, 9, 22
21. GOULD M.C. et SCHROEDER P.C., Studies on oogenesis in the Polychaeta Annelid <i>Nereis grubei</i> . I. Some aspects of RNA synthesis. Biol. Bull. (1969), <u>136</u> , 216-225.	5, 33
22. BERTOUT M. et DHAINAUT A., Etude cytochimique et autoradiographique de l'ovogenèse de <i>N. diversicolor</i> dans les conditions naturelles et en absence d'hormone cérébrale. Gen. Comp. Endocrinol. (1971), <u>17</u> , 371-387.	5, 22
23. DURCHON M., Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoque chez les Néréidiens. Ann. Sc. Nat. Zool. et Biol. Anim. (1956), <u>18</u> , 269-273.	10
24. HAUENSCHILD C., Hormonale Hemmung der Geschlechtsreife und Metamorphose bei dem Polychaeten <i>Pl. dumerilii</i> . Naturforsch. (1956), <u>11b</u> , 125-132.	10
25. BURTON K., Studies of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. (1956), <u>62</u> , 315-323.	14

	Pages
26. WILSON J.H. et HOAGLAND M.D., Physiology of Rat liver polysomes. The stability of messenger ribonucleic acid and ribosomes. <i>Biochem. J.</i> (1967), <u>103</u> , 556-566.	14, 29
27. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. <i>J. Biol. Chem.</i> (1951), <u>193</u> , 265-275.	14
28. TILLMANS J. et PHILIPPI K., Über den Gehalt der wichtigen protein der nahrungsmittel an Kohlehydrat and über ein Kolorimetrisches verfahren zür quantitativen bestimmung von stickstoffreim zucker in Eiweiss. <i>Biochem. Z.</i> (1929), <u>215</u> , 36-60.	14, 16
29. FOLCH J., LEES A.M., MEATH J.A. et LEBARON F.N., Preparation of lipid extracts from brain tissues. <i>J. Biol. Chem.</i> (1951), <u>191</u> , 833-841.	14
30. DAVIS F.C. et WILT F.H., RNA synthesis during oogenesis in the Echiuroid worm <i>Urechis caupo</i> . <i>Develop. Biol.</i> (1972), <u>27</u> , 1-12.	14, 24, 34
31. MONTREUIL J. et SPIK G., Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Monographies du Laboratoire de Chimie Biologique, Fasc. 1, Fac. Sci. Lille (1963).	16
32. PORCHET M., SPIK G. et DHAINAUT A., Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de <i>Perinereis cultrifera</i> (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. I. Etude biochimique. <i>Biol. Cellulaire</i> (1977), <u>28</u> , 225-232.	17, 41
33. WILCOCKSON J., The use of Sodium perchlorate in deproteinization during the preparation of Nucleic Acids. <i>Biochem. J.</i> (1973), <u>135</u> , 559-561.	25, 28
34. SPITNIK-ELSON P., The preparation of Ribosomal protein from <i>Escherichia coli</i> with Lithium Chloride and urea. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> (1965), <u>18</u> , 557-562.	27
35. BERTOOUT M., CANER F., DHAINAUT A. et KREMBEL J., Development of the nuclear structure and metabolism during oogenesis of <i>Perinereis cultrifera</i> (Annelida, Polychaeta). <i>Intern. J. Invert. Reprod.</i> (1981), <u>3</u> , 121-132.	34, 35
36. DENIS H., Accumulation du RNA dans les ovocytes des Vertébrés inférieurs. <i>Biol. Cellulaire</i> (1977), <u>28</u> , 87-92.	34
37. DAS N.K., Cytochemical and biochemical analysis of development of <i>Urechis</i> oocytes. <i>Amer. Zool.</i> (1976), <u>16</u> , 345-362.	34
38. DURCHON M. et PORCHET M., Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. <i>Gen. Comp. Endocrinol.</i> (1971), <u>16</u> , 555-565.	40
39. CANER F., BERTOOUT M., KREMBEL J. et DHAINAUT A., Action of the brain hormone on the synthesis of "stable" oocyte RNA in <i>Nereidae</i> . <i>Comp. Biochem. Physiol.</i> (1981), sous presse.	40

40. CANER F., PORCHET M., DHAINAUT A. et DISSOUS C., Isolement et purification de fractions membranaires chez les ovocytes de *Perinereis cultrifera* Grube (Annélide Polychète). C. R. Acad. Sci. (1977), 284, Série D, 2019-2022. 41
41. DHAINAUT A. et PORCHET M., Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. II et III. Etudes autoradiographiques des ovocytes jeunes et submatures. Biol. Cellulaire (1977), 28, 233-240 et 241-250. 41, 43, 46
42. DHAINAUT A., Etude par autoradiographie à haute résolution de l'élaboration des mucopolysaccharides acides au cours de l'ovogenèse de *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète). J. Microscopie (1968), 7, 1075-1080. 43
43. PORCHET M. et SPIK G., Actualités sur les hormones d'Invertébrés. Colloque "Endocrinologie des Invertébrés", C.N.R.S. Ed. (1976), 79-84. 46

