

N° d'ordre : 958

50376
1982
167

50376
1982
167

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE DE 3^{ème} CYCLE

Biologie du Développement et de la Reproduction

par

François FONTAINE

LES LIPIDES COELOMIQUES

chez *Perinereis cultrifera* Grube.

**Les relations métaboliques entre le liquide coelomique,
les coelomocytes et les ovocytes chez les Annélides Polychètes.**

Etude comparative avec les autres Invertébrés.



Membres du Jury :

MM. M. DURCHON Président
 M. DEMINATTI
 M. PORCHET
 J. KREMBEL
Mme E. BOUCAUD

Présenté le 30 MARS 1982

Je dédie cette thèse à mes Parents dont
le souvenir a toujours été présent tout
au cours de ce travail.

Que Chantal, mon épouse, et mes enfants,
trouvent ici le témoignage de toute mon
affection.

Que Monsieur le Professeur DURCHON trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. Je le remercie vivement d'accepter de présider mon jury de Thèse.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur DEMINATTI de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir permis de poursuivre mes recherches et de finir la Thèse que je présente aujourd'hui.

Monsieur PORCHET m'a fait profiter de son expérience, de sa compétence et m'a prodigué de précieux conseils. Je lui en suis très reconnaissant.

Monsieur KREMBEL a accepté de faire partie de ce jury : je le remercie pour l'intérêt qu'il porte à mon travail.

Madame BOUCAUD a accepté aussi de venir jusqu'ici : qu'elle en soit grandement remerciée.

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.	FOOT 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	LENDBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LHONNE 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.	SEGNIER 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.	BOSCO 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
Mlle 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
Mlle 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 EVRARD 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 LECLERCO Ginette	Catalyse
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertziennne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LERDY 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 ^{le} MARCHET Simone	Probabilités
M. DESJOURS 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} NGUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^{le} PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON 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. RAULT 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. SCHANDS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIVA Henri	Chimie Organique
M. SCHNE Jean	Géographie
M ^{le} 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

ABREVIATIONS UTILISEES

AGL	Acides Gras Libres.
C	Coelomocytes.
CCM	Chromatographie sur Couche Mince.
DG	Diglycérides.
EE	Diéthyl éther.
EP	Ether de Pétrole.
GLC	Chromatographie gaz-liquide.
HDL	High Density Lipoproteins (lipoprotéines de haut poids moléculaire)
JH	Hormone Juvénile.
LC	Liquide Coelomique.
LDL	Low Density Lipoproteins (lipoprotéines de faible poids moléculaire)
LN	Lipides Neutre.
MG	Monoglycérides.
O	Ovocytes.
PC	Phosphatidylcholine.
PE	Phosphatidyléthanolamine.
PL	Phospholipide.
PS	Phosphatidylsérine.
SI	Substance inconnue (tâche non identifiée sur nos chromatogrammes)
St	Stérols.
StE	Stérols Estérifiés.
TG	Triglycérides.
VLDL	Very Low Density Lipoproteins (Lipoprotéines de très faible poids moléculaire)
VSOH	Vitellogenin Stimulating Ovarian Hormone.

TRAVAUX ET PUBLICATIONS AUXQUELS J'AI PARTICIPE

Interrelations métaboliques entre liquide Coelomique, Coelomocytes et Ovocytes chez *Perinereis cultrifera* Grübe (Annélide Polychète).
F.FONTAINE, diplôme d'études approfondies.

Etude de quelques fonctions du milieu intérieur chez les invertébrés Coelomates.

Travail de synthèse effectué en complément du DEA.

Identité immunologique et métabolique entre le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète).

A.DHAINAUT, M.PORCHET et F.FONTAINE.

International Journal of Invertebrate Reproduction, 2 (1980), pages 285 à 296.

La vitellogenèse chez les Néréidiens (Annélides Polychètes).

A.DHAINAUT, M.PORCHET et F.FONTAINE.

Bulletin de la Société Zoologique de France.

Tome 105, n°3, 1980, pages 395 à 400.

Metabolism and role of coelomic fluid in oocyte growth in Nereidae.

A.DHAINAUT, F.FONTAINE et M.PORCHET.

U.K. Meeting of International Society of Invertebrate Reproduction (Newcastle - upon - Tyne, 7-10 Sept. 1981).

Rôle de l'ARN dans l'inactivation du chromosome lors de la Métaphase.

F.VASSEUR, F.FONTAINE, F.STROZYK et M.DEMINATTI

Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris.

Sous presse.

(Acceptée le 21 Décembre 1981).

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p.	1
LES LIPIDES - INTERET DE LEUR ETUDE	p.	6
MATERIEL ET METHODES	p.	10
BILAN PONDERAL	p.	36
ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES	p.	46
LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DU MILIEU INTERIEUR DE PERINEREIS CULTRIFERA	p.	66
LES PHOSPHOLIPIDES ET LEURS ACIDES GRAS	p.	83
L'INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS : ESSAI D'ETUDE DYNAMIQUE DU METABOLISME LIPIDIQUE CHEZ PERINEREIS CULTRIFERA ..	p.	92
CONCLUSION	p.	109
BIBLIOGRAPHIE		

INTRODUCTION

Chez les Annélides Polychètes, la cavité générale, ou coelome, est spacieuse. Elle est tapissée intérieurement, ainsi que tous les organes qu'elle renferme, par un endothélium péritonéal, très mince membrane à cellules aplaties. Cette membrane péritonéale forme un mésentère dorsal et un mésentère ventral soutenant le tube digestif. Elle présente des régions plus ou moins abondamment garnies de cils vibratiles qui déterminent des courants dans la lymphe périviscérale (ou liquide coelomique).

La cavité générale est distincte de l'appareil circulatoire qui est clos, sang et liquide coelomique ne se mélangeant pas.

C'est dans cette cavité générale que va s'accomplir la maturation des produits génitaux qui, se détachant précocement, y flottent en grande quantité. Mais outre les gamètes, on trouve aussi d'autres cellules : des Protozoaires parasites et surtout une catégorie de cellules coelomiques particulièrement intéressante, les éléocytes.

Ces éléocytes se sont vus attribués différents noms : lymphocytes, leucocytes, amibocytes, phagocytes, granulocytes, cellules chloragogènes ... (voir P.FAUVEL, 1959). Mais on a pu montrer, notamment chez *Sabella spallanzani* et *Amphitrite johnstoni* (R.P.DALES, 1961, 1964), que ces cellules constituent les étapes de la vie d'un même type cellulaire. D'après A.DEHORNE (1930) c'est M.ROMIEU (1923) qui a employé le premier le terme d'éléocytes, car il avait observé dans ces cellules des gouttelettes de 2 à 3 μ colorables au Soudan III et au Tetroxyde d'osmium, donc riches en graisses non saturées. Dans notre étude il serait plus correct de parler de coelomocytes, terme plus général qualifiant tous les éléments libres du coelome autres que les gamètes.

Le milieu intérieur des Annélides Polychètes n'a suscité que peu d'études biochimiques, sans doute les premiers auteurs ont-ils dédaigné ces animaux de petite taille. Sans doute aussi, leur petitesse était-elle un handicap pour les premiers chercheurs qui ne possédaient pas encore les techniques permettant aujourd'hui de faire des microdosages.

Selon M.DURCHON et M.LAFON (1951) c'est ThE.BRAND qui en 1927 a le premier tenté une étude de la composition chimique de différentes espèces d'Annélides.

C.G.WILBER et W.M.BAYORS (1947) ont aussi fait une étude globale de quelques Annélides marines, étude qui ne concerne que la composition en lipides.

Bien plus tard, M.E.CLARK (1963 a et b, 1964) a entrepris l'exploration systématique des acides aminés et de quelques glucides du liquide coelomique de *Nephtys hombergi* et, en 1968, elle fait une étude comparée des acides aminés chez différents Polychètes.

F.B.DE JORGE et J.A.PETERSEN (1968) font aussi une étude biochimique globale, selon la maturité du ver, de différentes parties de *Chaetopterus variopedatus*.

M.L.KARNOVSKY (1969) qui remarque qu'il y a fort peu de travaux sur les composants et le métabolisme lipidiques des Annélides, cite A.C.GIESE qui a effectué en 1966 une analyse globale de la composition en acides gras de plusieurs invertébrés marins.

C.G.N. DE VOOYS (1975) dose la teneur en glycogène et en lipides totaux chez *Arenicola marina*

F.RAHEMTULLA et S.LØVTRUP présentent en 1975 une étude biochimique globale sur les Annélides.

Outre ces exemples de travaux qui concernent donc la recherche des glucides, lipides, acides aminés, de l'animal en entier ou de son milieu intérieur, ces dernières années on a recherché quels pouvaient être le rôle et les rapports entre les différents éléments hébergés par ce milieu intérieur.

Le milieu intérieur c'est, chez les Annélides Polychètes, comme il a été dit plus haut, à peu près exclusivement le liquide coelomique, c'est à dire le milieu où se fait la maturation des gamètes.

Comme a pu l'écrire M.PORCHET (1974) au moment de la reproduction, le corps des *heteronereis* est presque réduit à l'état d'un sac bourré de produits génitaux mûrs. Ainsi, remarque-t-il, chez les *Perinereis cultrifera* épitoques le contenu coelomique des femelles (ovocytes, liquide coelomique et coelomocytes) représente plus de la moitié du poids total de l'animal, alors que le "coelome" du ver sexuellement indifférencié n'en constitue que 10% environ.

D'autre part, comme le souligne A.FISCHER (1974) l'ovogenèse est "diffuse" chez les *Nereis* dans le sens où les ovocytes croissent dans la cavité coelomique partout de la même façon sans contact permanent avec d'autres cellules. Ces ovocytes croissent ainsi de façon à peu près synchrone et sont donc un système test valable pour évaluer le degré de maturation sexuelle du ver.

Comme l'ont montré M.DURCHON et M.PORCHET (1971), M.PORCHET (1974) chaque taux hormonal est caractéristique d'une étape déterminée de l'évolution génitale, et l'activité endocrine du cerveau influence directement la teneur en glucides du liquide coelomique et des ovocytes.

Chez les Néréidiens, les ovocytes, libres dans la cavité du coelome vont donc y puiser le matériel qui servira à l'élaboration de leurs réserves. Cela pose deux problèmes :

- . quelle est l'origine du matériel nutritif contenu dans le liquide coelomique ?
- . quelles sont les modalités d'absorption de ce matériel par les ovocytes ?

On pense depuis longtemps que les éléocytes jouent un rôle important dans l'élaboration des réserves ovocytaires, mais cela n'a jamais été démontré de façon formelle.

Dès 1885, W.KÜKENTHAL considère que les cellules de la cavité coelomique des annélides sont en relation avec le développement des cellules germinales femelles, notamment avec l'élaboration du vitellus. W.C.MAC INTOSH (1907) parle aussi d'"ovigerous tissue". A.DEHORNE (1922 a et b, 1930) étudie aussi ces éléocytes et remarque leur rôle dans l'histolyse et la phagocytose musculaire dans le coelome de *Hediste diversicolor*, à la fin de la maturation des ovocytes, mais remarque cet auteur (A.DEHORNE, 1930), c'est EdCLAPAREDE (1868) qui aurait été le premier à s'intéresser à ces cellules.

M.DURCHON et M.LAFON (1951) notent que la multiplication et la maturation des cellules germinales, aux dépens des éléocytes, s'accompagnent de changements importants dans la composition chimique du liquide coelomique.

R.P.DALES (1957) estime aussi que ces cellules coelomiques jouent un rôle dans le stockage et le transport de nourriture chez certains Polychètes.

R.P.DALES (1961, 1963, 1967) étudie plusieurs Polychètes Sabellidés et affirme : les cellules coelomiques constituent un dépôt pour la maturation des gamètes.

R.P.DALES (1964), à propos du Polychète Terebellidae *Amphitrite johnstoni* dit que les éléocytes accumulent huile et glycogène destinés aux gamètes.

A.DHAINAUT (1966 a) a fait l'étude ultrastructurale des éléocytes de *Nereis pelagica* à l'approche de la maturité sexuelle et il montre aussi (1966 b) que la membrane des ovocytes de *Nereis pelagica* en cours de vitellogenèse est souvent en contact avec les éléocytes. Cette membrane des ovocytes est traversée de microvillosités tubulaires et rectilignes dont l'extrémité est en contact avec des rosettes de glycogène des éléocytes.

R.P.DALES (1968) note que le glycogène et l'huile des coelomocytes, bien que présents en grande quantité, semblent être inutilisables, alors que le glycogène des muscles peut être réduit : les coelomocytes de *Sabella spallanzani* peuvent contenir près de la moitié de leur poids total de matière sèche sous forme de lipides et 1/5 sous forme de glycogène, mais tandis que ces vers peuvent survivre en conditions anaérobies pendant 25 heures, ces réserves ne sont pas affectées. Du glycogène est utilisé, mais pas celui des coelomocytes. Les réserves des coelomocytes semblent, pense-t-il, destinées aux gamètes.

R.T.HESS (1970) fait l'étude ultrastructurale des éléocytes de l'Annélide *Enchytraeus fragmentosus* et pense que ces cellules jouent un rôle dans la synthèse de protéines dans la régénération, ainsi que dans le transport de matériel nutritif et d'excrétion.

R.L.PRESTON (1971) sur *Glycera dibranchiata*: les coelomocytes accumulent certains amino-acides.

P.C.SCHROEDER (1971) note l'existence de contacts entre ovocytes et éléocytes à différentes étapes de l'ovogenèse (chez *Nereis grubei*) comme cela a déjà été montré chez d'autres annélides tels que *N.pelagica* (A.DHAINAUT, 1966). A.FISCHER fera en 1974 la même observation chez *Platynereis dumerilii*.

K.J.ECKELBARGER (1974) travaille sur le Polychète Terebellidae *Nicolea zostericola* : l'ovocyte, écrit-il, absorbe des substances dans le liquide coelomique. D'autre part : chez les coelomocytes deux types de cellules se succèdent; dans le premier type présence de lipides et de glycogène, dans le deuxième type apparition d'une synthèse de protéines, matériel destiné à l'ovocyte.

Notons qu'aucune étude ultrastructurale, pas plus celles de A.DHAINAUT, P.C.SCHROEDER ou K.J.ECKELBARGER, n' a pu démontrer le transfert de matériel des coelomocytes vers les ovocytes. Dans tous les cas on ne relève que des rapports de contiguité entre ces deux catégories cellulaires. D'autre part, le nombre peu important de vésicules de pinocytose observé au niveau de l'enveloppe ovocytaire laisse penser que seul un matériel de faible poids moléculaire peut pénétrer dans l'ovocyte. Ainsi l'ovocyte peut réaliser ses synthèses de vitellus et d'alvéoles corticaux à partir de précurseurs simples : acides aminés et monosaccharides notamment (A.DHAINAUT, 1967; A.DHAINAUT et M.PORCHET, 1977).

Les résultats obtenus en immunologie (A.DHAINAUT, M.PORCHET et F.FONTAINE, 1980) montrent chez *Perinereis cultrifera* qu'il existe dans le liquide coelomique une substance présentant une identité antigénique avec les coelomocytes et les ovocytes. Cette substance est absente chez les ♂ ou les très jeunes ♀. A.FISCHER (1979) a fait une observation semblable chez

Nereis virens = l'existence d'une substance antigénique commune aux ovocytes et au liquide coelomique. A.FISCHER va jusqu'à assimiler cette substance à une vitelliné.

L'étude de cette substance a débuté , après fractionnement du liquide coelomique, des extraits de coelomocytes et d'ovocytes (A.DHAINAUT, M.PORCHET et F.FONTAINE, 1980) : on observe une même fraction macromoléculaire dans les trois milieux étudiés. Cette fraction est riche en sucre et en protéines. Dans notre D.E.A. (F.FONTAINE, 1979) nous avons aussi été amené à étudier sa constitution en acides gras .

Les recherches biochimiques qui ont été faites ces dernières années contribuent ainsi à appuyer la thèse faisant des coelomocytes les responsables de la synthèse de cette fraction moléculaire: les variations que nous avons pu observer du point de vue qualitatif et quantitatif des monosaccharides, des protéines, et des acides gras vont dans ce sens (A.DHAINAUT, M.PORCHET et F.FONTAINE, 1980)

Dans notre D.E.A. nous avons écrit que les coelomocytes pouvaient être un lieu important de stockage et de biosynthèse d'acides gras, leur évolution se faisant souvent parallèlement avec le liquide coelomique. Dans les ovocytes nos résultats étaient insuffisants. Aussi il nous a semblé utile de poursuivre cette étude. Sous quelles formes les lipides se présentent-ils dans le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes ? Quelle évolution subissent-ils au cours de l'ovogenèse ? Pouvons-nous mettre en évidence l'existence d'un transport de substances lipidiques entre les coelomocytes et les ovocytes ? Ce sont là quelques questions auxquelles nous essaierons de répondre. Au cours de cette étude, nous comparerons nos résultats avec ce que nous savons chez les autres invertébrés. Cela nous permettra de resituer les problèmes de stockage des lipides, de leur transfert et de leur rôle dans l'ovogenèse, dans un contexte plus général. Enfin nous débiterons notre travail par une mise au point sur la notion de "lipides", afin de voir l'hétérogénéité des substances que l'on groupe sous ce vocable, et donc la multiplicité et la richesse des problèmes qui s'y rattachent. Nous n'aurons ici d'ailleurs nullement la prétention d'épuiser un thème de recherches, mais simplement d'apporter notre contribution à l'étude de quelques problèmes importants.

LES LIPIDES - INTERET DE LEUR ETUDE

Ces dernières années de nombreux travaux ont été consacrés à la biochimie des lipides des microorganismes, des Oiseaux et des Mammifères. D'ailleurs, depuis les années 60, des revues apparaissent, uniquement consacrées aux lipides : "Journal of lipid research", lipid section of "Biochimica Biophysica Acta", "Steroids", "Advances in Lipid research"... Cependant si les recherches se sont bien développées chez les Vertébrés, chez les Invertébrés elles sont le plus souvent fragmentaires. Ainsi les Insectes sont le seul groupe où les travaux ont été particulièrement importants. Ensuite c'est chez les Crustacés que l'on trouve un assez grand nombre de publications. Chez les Invertébrés qui nous intéressent ici, les Annélides, les travaux restent rares.

Outre les rappels concernant la classification des lipides, par quelques exemples nous voyons ici l'intérêt de leur étude chez les Invertébrés où les voies métaboliques, la nature et le rôle de ces lipides sont souvent différents de ce que nous savons chez les Vertébrés.

Les lipides constituent un groupe hétérogène où l'on trouve surtout des esters d'acides gras à poids moléculaire élevé et accessoirement des amides d'acides gras. Leurs propriétés de solubilité dans les "solvants des graisses" sont caractéristiques. On appellera ainsi lipide tout composé soluble ou partiellement soluble dans les solvants organiques tels que : alcool, acétone, éther, chloroforme, benzène.

Selon R.AZERAD et E.LEDERER (1974) on pourrait ainsi les classer :

- Lipides simples ou homolipides (ne contenant que carbone, hydrogène et oxygène)
 - . glycérides : esters d'acides gras et de glycérol
 - . cires : esters d'acides gras et de monoalcools (alcools aliphatiques ou stérols).
 - . glycolipides : lipides contenant des sucres.
- Lipides composés ou hétérolipides
 - . glycéro-phospholipides (lipides contenant une molécule de glycérol et d'acide phosphorique).
 - . sphingolipides (lipides contenant une molécule de sphingosine).
 - . sulfolipides (ou sulfatides) : lipides contenant du soufre (seulement dans les plantes et les microorganismes).
 - . glycolipides azotés : lipopolysaccharides bactériens.
- Complexes lipidiques (lipoprotéines et membranes).

Les mêmes auteurs les classent aussi selon leur fonction biologique :

- . Lipides de réserves = glycérides
- . Lipides de membranes cellulaires = phospholipides, stérols,
(et dans les plantes = galactolipides, sulfolipides).
- . Lipides de revêtement : (protection extracellulaire =cires).

Ces classifications montrent bien leur hétérogénéité. Néanmoins, comme nous l'avons dit plus haut, ils sont tous plus ou moins solubles dans les solvants organiques. Ce caractère de solubilité leur est conféré par les longues chaînes paraffiniques d'acides gras qu'ils contiennent.

LES ACIDES GRAS

Dans notre D.E.A. nous en avons étudié certains chez *Perinereis cultrifera*. Ceux que nous avons pu identifier étaient à chaîne linéaire :

- . Certains étant saturés (le plus souvent à nombre pair d'atomes de carbone).
- . D'autres étant non saturés : à une (monoinsaturés) ou plusieurs doubles liaisons (polyinsaturés ou polyéthyléniques)

- les monoinsaturés = les principaux sont :

L'acide Palmitoléique 16 C (16 carbones) Δ 9-10 (=double liaison entre les carbones 9 et 10)

L'acide Oléique 18 C Δ 9 - 10

L'acide Vaccénique 18 C Δ 11 - 13

L'acide Erucique 22 C Δ 13-14

= les Polyéthyléniques

l'acide linoléique (ou cis - 9, 12 - octadécadiénoïque)

l'acide linoléique (ou cis - 9, 12, 15 octadécatriénoïque)

l'acide arachidonique (ou cis 5, 8, 11, 14 éicosatétraénoïque)

Ces derniers acides gras polyinsaturés sont appelés acides gras essentiels : leur absence dans la nourriture des animaux supérieurs entraîne un grand nombre de troubles. Les Insectes aussi ne peuvent ajouter une deuxième ou une troisième double liaison à un acide gras (S.TURUNEN, 1979).

Cependant pour aucune espèce de Diptère (ou d'Aphide, dont les symbiotes peuvent fournir tous les lipides nécessaires) les acides gras polyinsaturés ou autres ne sont essentiels. Une exception cependant parmi ces Diptères: *Culex pipiens* est le seul Diptère connu exigeant un acide gras polyinsaturé et le premier Insecte pour lequel une exigence en acide gras essentiel n'est pas satisfaite par l'acide linoléique et / ou l'acide linoléique, mais est tributaire de l'acide arachidonique (R.H.DADD et J.E.KLEINJAN, 1979).

On sait aussi que d'autres Invertébrés, tels que les Crustacés, ne peuvent synthétiser les acides linoléique et linoléinique à partir d'acétate et de palmitate, comme les Mammifères (A.KANAZAWA, S.I. TESHIMA et K.ONO, 1979).

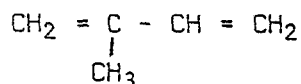
Les GLYCERIDES c'est à dire les esters du glycérol, représentent une catégorie importante de lipides. Selon le nombre d'acides gras fixés sur la molécule de Glycérol, on parlera de Mono -, Di - ou Triglycérides. Les Triglycérides sont habituellement considérés comme les lipides de réserve = ils prédominent largement en effet dans les Adipocytes de Mammifères. Les Triglycérides dominent aussi dans le plasma des Mammifères, où ils entrent dans la constitution des macromolécules (les lipoprotéines).

Si les Triglycérides sont aussi chez les Invertébrés une forme de stockage, chez les Insectes ce sont les Diglycérides qui dominent dans l'hémolymphe (où ils entrent dans la constitution de lipoprotéines vitellogènes ou vitellogénines).

Autre catégorie importante de LIPIDES dont nous parlerons ici : les STEROLS et STEROIDES.

Le CHOLESTEROL, se présente sous forme libre ou sous forme estérifiée par des acides gras.

Depuis les travaux de K.E.BLOCH sur le foie de rat, on sait que le cholestérol peut se former à partir de squalène. Ce squalène est un triterpène : c'est à dire qu'il contient trois fois la molécule d'isoprène :



Ainsi, dans une cellule animale de vertébré l'acétate peut :

- 1° se condenser en un dérivé de l'isoprène.
- 2° ensuite se polymériser en squalène.
- 3° puis se cycliser en stérol.

D'après K.E.BLOCH, après la cyclisation du squalène, les étapes sont : lanostérol → zymostérol → cholestérol.

Les Insectes sont incapables de synthétiser de stérols de novo (E.N.LAMBREMONT, 1965, 1972; D.R.NELSON et D.R.SUKKESTAD, 1968; S.TURUNEN, 1973; M.WILLIAMS et Coll., , 1974; R.G.DOWNER, 1978).

Toute la voie de synthèse des stérols est ainsi délaissée chez les Insectes, et le cholestérol supporte entièrement le processus de développement = il ne peut être remplacé par un intermédiaire tel que le lanostérol (H.J.CLARK et K.BLOCH, 1959). Le cholestérol est donc entièrement

fourni par l'alimentation, et l'injection d'acétate marqué montre l'absence de radioactivité dans la fraction stérolique des tissus d'Insectes (on a chez certains Insectes trouvé de la radioactivité, mais la biosynthèse de cholestérol est dans ces cas l'oeuvre de symbiotes et ne provient pas du métabolisme propre de l'animal).

Le fait que les insectes ne puissent faire leur propre synthèse du cholestérol n'est d'ailleurs pas un cas unique chez les Invertébrés = on a constaté le même phénomène chez les Crustacés, les Diplopedes et les Arachnides (B.DELAGE, 1969).

Pourtant le cholestérol a une importance prépondérante dans la biosynthèse des hormones stéroïdes et en particulier de l'ecdysone.

Enfin, les PHOSPHOLIPIDES sont surtout considérés comme les constituants habituels des membranes cellulaires. Ils ont été très peu étudiés chez les Invertébrés.

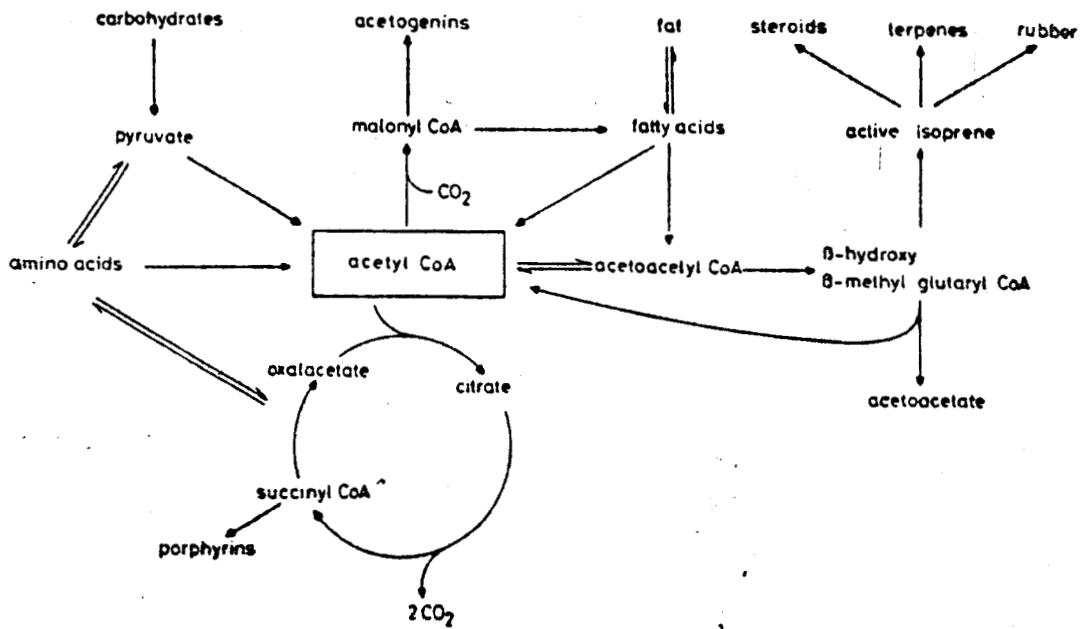
La phosphatidylcholine est le principal phospholipide chez la plupart des cellules animales (mais elle est absente des Bactéries), et sa première fonction dans la cellule semble être structural (D.E.VANCE et P.C.CHOY, 1979). Mais comme le remarquent ces derniers auteurs, des espèces de phosphatidylcholines sont connues pour moduler l'activité de certains enzymes et ce lipide peut jouer un rôle dans la régulation cellulaire.

Des travaux récents vont d'ailleurs dans le même sens. On a montré le rôle de la molécule de phosphatidylcholine dans les processus de désaturation de l'acide oléique en acide linoléique chez des champignons = *Aspergillus ochraceus* (L.CHAVANT et coll, 1978) et *Mucor mucedo* (L.CHAVANT et coll., 1979).

Parmi les rares travaux effectués chez les Invertébrés, une étude de E.N.LAMBREMONTE et P.F.DIAL (1980) montre chez *Acheta domesticus* que les phospholipides diffèrent selon les tissus et qu'il peut exister des différences avec ce que l'on sait chez les Vertébrés, quant à la nature et à la position des acides gras.

Enfin, comme chez les Mammifères, chez les Invertébrés, le métabolisme lipidique n'est pas un système indépendant, et des interrelations, en particulier avec le métabolisme des sucres, ont été mises en évidence : le tréhalose jouerait ainsi un rôle important chez les Insectes (H.CHINO et L.I.GILBERT, 1965 b).

Dans notre D.E.A. nous avons montré l'importance de la concentration en glucose chez les individus jeunes : ce glucose peut être métabolisé aussi bien en sucres qu'en acides gras.



Metabolic pathways of acetyl-CoA.

F. LYNEN

Fatty acid biosynthesis and its regulation

Perspectives in Inherited Metabolic Diseases, Volume 3, 1979



MATERIEL ET METHODES

I - LA PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

- 1° - Le matériel biologique
- 2° - La séparation des constituants coelomiques.

II - L'EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX

III - LA SEPARATION DES LIPIDES NEUTRES ET DES PHOSPHOLIPIDES

IV - LA SEPARATION DES DIFFERENTES CLASSES DE LIPIDES NEUTRES

- 1° - La chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique
- 2° - La chromatographie sur couche mince
 - a) La préparation des plaques
 - b) Le dépôt de l'échantillon
 - c) Le choix du système solvant
 - d) La localisation des différents lipides neutres
 - e) L'identification des taches.

V - ETUDE DES LIPIDES NEUTRES SEPARES SUR COUCHE MINCE

- 1° - Etude quantitative des lipides neutres
 - a) Principe des dosages colorimétriques
 - b) Dosage des lipides selon AMENTA (1964)
- 2° - Etude qualitative des acides gras des différents lipides neutres
 - a) La saponification
 - b) La Méthanolyse
 - c) La chromatographie des méthyl esters d'acide gras
 - Protocole expérimental
 - Identification des acides gras
 - . Comparaison des temps de rétention
 - . Relations entre les temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone
 - . La spectrographie de masse.
- 3° - Etude quantitative des acides gras entrant dans la constitution des lipides neutres
 - . La Triangulation
 - . La mesure de la largeur du pic à mi-hauteur, que l'on multiplie par la hauteur.

VI - ETUDE DES PHOSPHOLIPIDES

- 1° - La séparation des différentes classes de phospholipides
 - a) Le papier Whatmann SG 81
 - b) La chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique
 - c) La chromatographie d'échange ionique sur colonne de DEAE cellulose
 - d) La chromatographie sur couche mince de gel de silice G
 - Le choix du système solvant
 - La localisation des phospholipides
 - L'identification des taches
- 2° - L'étude qualitative et quantitative des acides gras des phospholipides
- 3° - Le dosage des phospholipides

VII - TECHNIQUES DE RADIOACTIVITE

- 1° - Principe
- 2° - Moyens de détection de la radioactivité
- 3° - Protocole expérimental

VIII - LA FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX OU DE POLYACRYLAMIDE

- 1° - Le gel filtration sur Sephadex
- 2° - La filtration sur gel de Polyacrylamide.

MATERIEL ET METHODES

I - LA PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

1° - Le matériel biologique

Nous travaillons ici principalement sur une espèce de *Nereidae* : *Perinereis cultrifera* (Grübe).

En effet toute étude biochimique est d'abord conditionnée par la quantité de matériel disponible. Le plus souvent chaque type de dosage nécessite 1 milligramme de substance sèche. Parmi les espèces de *Nereidae* les plus aisément disponibles, seule *Perinereis cultrifera* pouvait nous fournir des quantités suffisantes de matériel.

Ces *Perinereis* ont été récoltées à Luc-sur-Mer (Calvados).

Au Laboratoire, tous les animaux sont isolés et leur état génital déterminé par examen microscopique et mensuration à l'oculaire micrométrique, des ovocytes issus d'une ponction coelomique.

Une trentaine d'ovocytes sont ainsi mesurés. La moyenne détermine le diamètre ovocytaire de l'individu.

Les vers sont élevés à l'obscurité presque totale, dans de l'eau de mer filtrée, sans aucune nourriture, la température étant maintenue constante entre 12° et 14°C.

Deux autres espèces d'Annélides ont aussi été partiellement étudiées : *Nereis diversicolor* et *Arenicola marina*.

2° - La séparation des constituants coelomiques

Toutes les opérations portant sur l'animal sont faites selon les techniques de M.DURCHON (1952).

Le contenu coelomique de *P.cultrifera* de même état génital, est prélevé par ponction intracoelomique.

Les ponctions sont effectuées par des micropipettes (pipettes Pasteur). La pipette Pasteur, dont nous veillons à ce que l'extrémité soit suffisamment effilée, est introduite dans le coelome. Le contenu coelomique monte de lui même dans notre micropipette, tant par capillarité que sous l'effet de la pression intracoelomique.

Le contenu coelomique ainsi prélevé est constitué du liquide coelomique, d'ovocytes, d'éléocytes et d'autres cellules (protozoaires). Il nous faudra donc séparer ces différents éléments.

Nous avons utilisé la méthode de séparation des constituants coelomiques décrite par M.PORCHET (1974).

Une première centrifugation nous donne un culot constitué par les éléments figurés, le surnageant étant le liquide coelomique.

Nous recueillons ce liquide coelomique.

Le culot subit ensuite 4 lavages à l'eau de mer. A chaque lavage on effectue une légère centrifugation : chaque fois le surnageant est recueilli.

Finalement on obtient un culot d'ovocytes. Un examen cytologique peut nous permettre de nous assurer que le culot ovocytaire est débarrassé de tout autre élément figuré = c'est la "fraction ovocytaire" ou "ovocytes"

Les surnageants successifs obtenus contiennent tous les autres éléments figurés. Les éléocytes en sont l'élément dominant.

Nous parlerons de "fraction coelomocytaire" ou simplement "coelomocytes".

La solution coelomique qui surnage après la première centrifugation du contenu coelomique est appelée "liquide coelomique". Il s'agit d'un liquide totalement dépourvu d'éléments cellulaires ou de précipités organiques.

On a pu ainsi obtenir 3 fractions qui peuvent être conservées une fois congelées à - 70°C.

Remarque : toutes les centrifugations se font à + 4 °C.

II - L'EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX

Coelomocytes et ovocytes sont préalablement broyés au Polytron.

Puis, liquide coelomique, coelomocytes et ovocytes sont lyophilisés avant d'en extraire les lipides.

Les techniques d'extraction de lipides totaux varient d'un auteur à l'autre.

E.G.BLIGH et W.J.DYER (1959) utilisent le mélange chloroforme-méthanol - eau (2 : 2 : 1).

Travaillant sur l'hémolymphe de *Periplaneta americana*, D.BOLLADE et Ph.BOUCROT (1973) extraient par le chloroforme - méthanol 3/1 (v/v) pendant une nuit à 20°C.

J.Mac LAUGHLIN(1971) travaillant sur *Eisenia foetida* modifie la technique de E.G.BLIGH et W.J.DYER (1959) : une solution d'ammoniaque à 2% remplaçant l'eau lors de l'extraction finale.

H.CHINO et coll.(1979), sur de l'hémolymphe d'insecte, pour n'extraire que les lipides neutres, utilise le mélange isopropanol - heptane (4 : 1) . Après déphasage et lavage à l'eau distillée, on obtient une phase heptanoïque contenant les lipides recherchés.

Quand il s'agit de matériel végétal, les techniques d'extraction sont souvent plus drastiques.

J.BARAUD et coll. (1973) sur les membranes protoplasmiques et les mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae* = les lipides sont extraits à chaud successivement par le chloroforme, le mélange chloroforme - méthanol (2 : 1) (v/v) et le méthanol pur. Les trois extraits sont lavés et repris par le chloroforme selon la technique de Folch (1951), exposée plus loin.

K.KABATA et coll. (1979) sur *Chlorella ellipsoidea* font agir le méthanol chaud sur les cellules, à ébullition pendant 5 mn. Cette extraction est répétée une deuxième fois. Après refroidissement et centrifugation, le résidu est à nouveau extrait au chloroforme - méthanol (2 : 1, v/v). Après centrifugation, les extraits lipidiques sont lavés à l'eau afin d'en extraire les contaminants non-lipidiques. La fraction chloroformique est alors concentrée à l'évaporateur rotatif.

Z.DUBINSKY et S.AARONSON (1979) travaillant sur les algues, notent une meilleure extraction si on ajoute au mélange chloroforme - méthanol (2:1), 2 à 3 gouttes d'HCl 11 M.

Par ces quelques exemples, nous voyons donc que les techniques d'extraction des lipides totaux sont assez variées, certaines se faisant à chaud, d'autres à froid.

Les solvants utilisés varient eux aussi :

Méthanol

ou Chloroforme-Méthanol (2 : 1, 3 : 1)

ou Chloroforme-Méthanol-eau (2:2:1)

ou Chloroforme-Méthanol-Ammoniaque (2:2:1)

etc ...

Après essais, le solvant classique de J.FOLCH (1951, modifié en 1957) nous a semblé satisfaisant.

C'est sans doute le système solvant le plus utilisé, tout au moins pour le matériel animal.

C'est un mélange de chloroforme-méthanol dans les proportions 2 : 1 (v/v).

Dans ce solvant = le méthanol dénature les protéines

le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux

Certains l'utilisent à + 4°C (G.G.BARTSCH, 1970, Jr.P.O. KWITEROVICH et coll., 1970; M.SUGITA et coll., 1974 ...) mais aussi à température élevée pour des cellules végétales (J.L.HARWOOD, A.T.JAMES, 1975; K.A.KARLSSON, 1973, 1969; S.S.RAGHAVAN, 1974).

Nous l'utilisons ici à + 4°C (ce qui atténue l'évaporation du solvant, et empêche l'activité des lipases).

Protocole d'extraction (voir planche 1)

Le liquide coelomique et les broyats de coelomocytes et d'ovocytes sont lyophilisés et pesés.

Réactifs :

- solvant d'extraction : chloroforme / méthanol (2:1,v/v)
- solution de NaCl à 9 %.

L'extraction :

- chaque extrait sec obtenu après lyophilisation est placé une nuit, sous agitateur magnétique, à + 4°C dans le système solvant d'extraction (il faut environ 20 ml de solvant par gramme de tissu sec).

- on filtre sur verre fritté, sous vide → extrait 1

- l'insoluble est repris, pendant 1 h, dans le $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2 : 1 (environ 10 ml de solvant par gramme de tissu sec).

- on filtre à nouveau sur verre fritté → extrait 2

- l'insoluble est repris une dernière fois dans le $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1. Après une 3ème filtration → extrait 3.

Pour éliminer les substances non lipidiques solubilisées dans le $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3 \text{OH}$, cet extrait lipidique total subit un déphasage selon la technique de FOLCH. On ajoute un volume de NaCl à 9 %, pour 5 volumes de solvant .

Ce déphasage se fait pendant une nuit, à + 4°C.

Après déphasage = les substances hydrosolubles passent dans la phase hydroalcoolique supérieure.

La phase chloroformique renferme les lipides totaux.

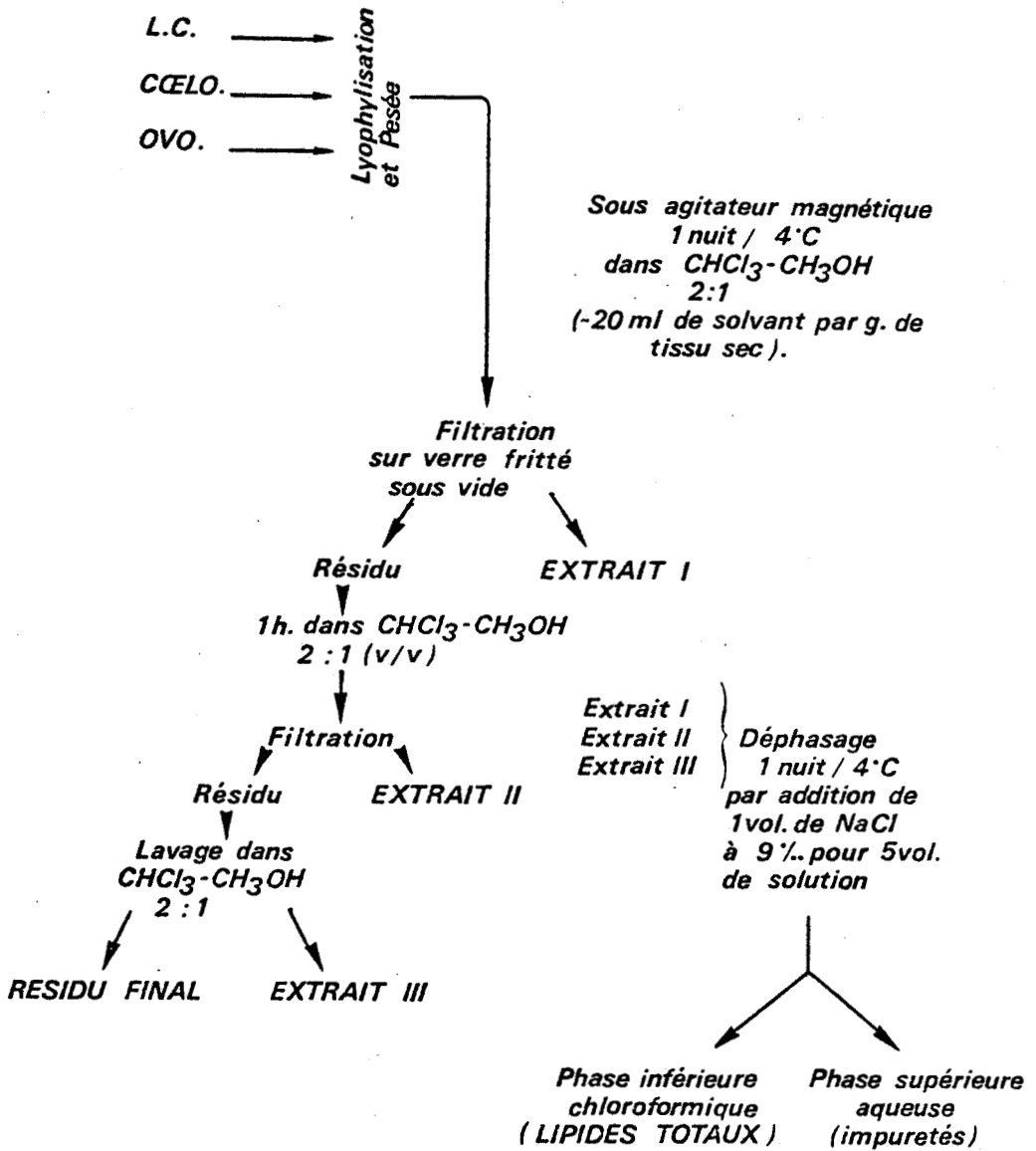
III - LA SEPARATION DES LIPIDES NEUTRES ET DES PHOSPHOLIPIDES

Les lipides totaux renferment deux grandes catégories de lipides

- Les "lipides neutres" :
 - Monoglycérides
 - Diglycérides
 - Triglycérides

Planche 1:

PROTOCOLE D'EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX.



- Stérols
- Stérols estérifiés
- Acides gras libres
- Les phospholipides

R.F.LEE et D.L.PUPPIONE (1978), A.KANAZAWA et S.I.TESHIMA (1979) séparent lipides neutres et lipides polaires sur colonne d'acide silicique (Kieselgel 60, 70 - 230 mesh de Merck). Les lipides neutres peuvent être en effet élués au chloroforme. Les lipides polaires le sont au méthanol.

J.KATZ et M.KEENEY (1967) les séparent aussi par chromatographie d'adsorption sur colonne de 25 g d'acide silicique. Les lipides neutres, sont élués avec 400 ml de chloroforme - méthanol (99 : 1), les phospholipides avec 300 ml de chloroforme - méthanol (15 : 85), suivis de 300 ml de méthanol - eau (98 : 2).

Pour G.BERTHILLIER, R.LETOUBLON et R.GOT (1977) le résidu lipidique sec est repris par l'acétone (100 ml de solvant/ g.de lipide) qui solubilise les lipides neutres et les glycolipides. L'insoluble est récupéré par centrifugation.

La séparation sur colonne d'acide silicique ayant le désavantage d'utiliser de grandes quantités de solvants, nous avons ici utilisé une technique de précipitation des phospholipides à l'acétone.

Protocole expérimental

On obtient le résidu sec de lipides totaux par séchage sous azote. Ce résidu sec est solubilisé dans une petite quantité de solvant de FOLCH (0,5 à 1 ml au maximum, selon la quantité de lipides totaux).

On ajoute ensuite une grande quantité d'acétone (6 à 8 fois plus). Les phospholipides sont insolubles dans l'acétone et vont alors précipiter.

On fait une centrifugation énergique, pendant 10 mn.

Dans le surnageant on a les lipides neutres que l'on prélève à la pipette Pasteur.

Le culot est constitué de phospholipides que l'on s'applique à débarrasser entièrement des lipides neutres qu'il peut encore contenir, par deux lavages à l'acétone. Après chacun de ces lavages on agite violemment, puis on centrifuge.

Les trois surnageants acétoniques contenant tous les lipides neutres sont rassemblés, en partie séchés sous courant d'azote et stockés avant d'en faire l'analyse.

Le culot de phospholipides est redissout dans le Folch et est lui aussi stocké (sous azote).

Les échantillons traités et stockés de cette façon sont stables (H.Y.YEE et coll., 1980).

IV - LA SEPARATION DES DIFFERENTES CLASSES DE LIPIDES NEUTRES

Nous nous sommes principalement intéressés aux lipides neutres.

Leur séparation en différentes classes peut se faire par chromatographie sur couche mince de Gel de Silice G ou par chromatographie sur colonne de gel de silice.

1° - La chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique

Au cours de la chromatographie d'adsorption, les composés sont liés à l'adsorbant solide par des forces polaires et ioniques, et, plus faiblement par des forces non polaires ou de VAN DER WAALS. La séparation des mélanges lipidiques dépend de la polarité relative de chaque lipide = cette polarité est déterminée par le nombre et le type de groupements polaires de la molécule, et également par le nombre et le type de groupements non polaires ou hydrophobes. L'élution de la colonne par des solvants de polarité croissante permet la séparation du mélange lipidique en classes dont la polarité augmente également (G.V.MARINETTI, 1967).

On observe que la séparation complète des lipides en classes n'est en général pas obtenue en une seule chromatographie en raison des chevauchements de polarité. Un fractionnement ultérieur sur couche mince ou sur un autre type de colonne est souvent nécessaire pour isoler à l'état pur, les diverses classes de lipides.

La préparation du gel est faite selon G.ROUSER, G.KRITCHEVSKY, A.YAMAMOTO(1967)

L'acide silicique est mis en suspension dans le méthanol (1 kg/3l de CH₃ OH).

Après un contact de 30 mn, les particules les plus fines sont éliminées par aspiration.

Ce lavage est répété 3 fois. Finalement le solvant est laissé à évaporer à température ambiante du laboratoire. L'acide silicique est ensuite activé une nuit à 120°C avant l'emploi.

Le chloroforme et le méthanol utilisés sont distillés avant l'emploi.

10 ou 20 g d'acide silicique activé à 120°C est remis en suspension dans 50 à 100 ml de chloroforme, et équilibrés 30 mn à la température du laboratoire. Le mélange acide silicique/ chloroforme est dégazé sous vide, puis transvasé dans la colonne munie d'un bouchon de laine de verre et remplie de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 2 : 1 (v/v).

La hauteur de gel dans la colonne est de 12 à 16 cm. La colonne est ensuite équilibrée en chloroforme par passage de 200 ml de ce solvant.

Quand le solvant est à 2 mm au dessus du niveau de l'acide silicique, l'échantillon lipidique repris dans 5 ml de CHCl_3 est déposé au sommet de la colonne à l'aide d'une pipette Pasteur. Après pénétration du dépôt dans la colonne, les solutions de rinçage sont également déposées avec précaution au sommet de la colonne.

L'éluion des différentes fractions est effectuée avec des proportions croissantes de méthanol dans le chloroforme.

Chaque fraction est ensuite étudiée par chromatographie sur couche mince de gel de silice G.

Si les colonnes d'acide silicique sont abondamment utilisées, notons que certains auteurs utilisent d'autres supports pour séparer les lipides neutres = les colonnes de FLORISIL (60-100 mesh, Floridin Co., USA) selon la technique de K.K.CARROL (1961) ou l'acide silicique UNISIL (Technique de M.L.VORBECK et G.V.MARINETTI, 1965).

2° - La chromatographie sur couche mince

Nous avons utilisé les plaques de Gel de silice G (Kieselgel 60, Art.11845, Merck). Plusieurs problèmes devront être résolus :

- Le choix du système solvant
- La localisation des différents lipides neutres
- L'identification de ces lipides

a) La préparation des plaques

Afin de les débarrasser de tout contaminant, on fait migrer sur la plaque le système solvant utilisé, pendant une nuit. Ce n'est qu'après séchage que l'on dépose nos échantillons.

D'autre part, puisque les couches minces sont préparées par étalement d'une suspension aqueuse, on doit les placer à l'étuve pendant au moins une heure pour les activer et les rendre utilisables en chromatographie d'adsorption (J.M. BOBBIT et coll., 1972). Une fois activées les plaques doivent être conservées en atmosphère sèche, si elles ne sont pas immédiatement utilisées.

b) Le dépôt de l'échantillon

La modification du solvant servant à redissoudre l'échantillon

pour l'appliquer sur la couche mince ayant selon R.L.DE ANGELIS et coll.(1960), un effet sur la migration, pour l'étude des lipides neutres nous sommes mis dans les mêmes conditions de travail : chaque fois l'échantillon est dissout dans le $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3 \text{OH}, 2 : 1$ (v/v).

Pour que l'aire de la tâche soit aussi petite que possible nous avons parfois opté pour l'utilisation de capillaires en verre très étroits obtenus par étirage au bec bunsen et dont le diamètre interne est de l'ordre de 1/10 de mm. Le diamètre d'une tâche est alors d'environ 1 mm. L'application de l'échantillon s'effectue en mettant en contact le capillaire et le gel de silice, et une légère pression fait descendre le liquide. Connaissant la section du tube et en mesurant l'abaissement du niveau du liquide on détermine la quantité d'échantillon appliquée (technique recommandée par A.SIOUFFI et G.GUIOCHON, 1976).

Pour les échantillons destinés aux dosages, nous avons fait des dépôts linéaires et non plus ponctuels, en chromatographie préparative.

Une technique que nous n'avons pas ici utilisée, mais qui pourrait être utile ultérieurement : comme le préconise Haleem J.ISSAQ (1960), dans le cas où on n'a que très peu d'échantillon, on peut faire une chromatographie sur couche mince triangulaire (on dépose l'échantillon sur la base. la migration s'effectue en augmentant la concentration des différents constituants de notre échantillon).

c) Le choix du système solvant

Nous l'avons fait empiriquement selon la méthode préconisée par J.M.BOBBITT et coll. (1972).

On prépare quatre petites plaques de chromatographie en y déposant chaque fois le même échantillon de lipides neutres.

Selon W.TRAPPE (1940), la série éluotopique des solvants par polarité croissante, est la suivante :

- Hydrocarbures "légers" (éther de pétrole, hexane, heptane, etc...)
- Cyclohexane
- Tétrachlorure de carbone
- Trichloroéthylène
- Toluène
- Benzène
- Dichlorométhane
- Chloroforme

- Ether éthylique
- Acétate d'éthyle
- Acétone
- n-propanol
- Ethanol
- Méthanol
- Eau

On développe nos 4 couches minces dans les 4 solvants soulignés. On révèle et on compare les résultats. On peut ainsi généralement voir un solvant qui déplace les taches trop bien et un autre qui ne les déplace pas assez. On pourra alors utiliser des mélanges de ces deux solvants ou bien les solvants intermédiaires. En général les meilleures séparations sont obtenues dans la moitié inférieure ou les 2/3 inférieurs de la plaque développée.

D'autre part l'addition de certaines substances entraîne une diminution des traînées et améliore les séparations. On a ainsi ajouté une goutte d'acide acétique glacial (environ 1 %) au solvant de développement.

d) La localisation des différents lipides neutres

Différentes techniques ont été mises en oeuvre :

. Par vaporisation d' H₂SO₄ à 5 %, puis chauffage à 100° pendant 15 minutes.

Intérêt : la coloration des taches se fait différemment. Ainsi , les stérols apparaissent rapidement, dès le début du chauffage, sous forme d'une tache rouge vif, qui devient ensuite violacé.

Inconvénient : ce révélateur est destructif et les lipides sont alors inutilisables pour des analyses ultérieures.

. Les vapeurs d'iode = les plaques séchées, afin de les débarrasser du solvant qui les imprègnent, sont mises dans une cuve saturée en vapeur d'iode. L'iode se fixe au niveau des doubles liaisons des acides gras. Les lipides apparaissent sous forme de taches brunes.

Cette méthode est rapide si la cuve est bien saturée en vapeurs d'iode. Mais les lipides ne sont plus utilisables pour des analyses ultérieures.

. La rhodamine a aussi été utilisée :

- Rhodamine 6 G de chez Sigma
- ou rhodamine préparée par nos soins (selon Ch.DELBART, 1978).

Le réactif est obtenu par dilution extemporanée de 1 volume d'une solution mère de Rhodamine 6 G à 50 mg/litre d'eau avec 1 volume de NaOH 4N.

Après pulvérisation et examen sous lumière ultraviolette des plaques encore humides, les lipides neutres apparaissent en jaune - orange. Lorsque les plaques sont sèches, les lipides apparaissent en jaune.

La visualisation se fait sous lumière UV de 365 nm.

Le solvant d'éluion varie d'un auteur à l'autre. Citons : J.BARAUD (1973) qui utilise pour tous les lipides le mélange chloroforme-méthanol - eau (6,5 : 2,5 : 4,5, v/v/v). D.BOLLADE et Ph.BOUCROT (1973) utilisent le chloroforme-méthanol 1/1 (v/v). A.C.TURNER et W.F.HUTCHISON (1979) prennent le mélange solvant : chloroforme - méthanol 2:1, (v/v) pour tous les lipides. C'est aussi ce dernier solvant (qui est le solvant universel des lipides, le solvant de Folch) que nous utiliserons. La localisation des taches sur la couche mince sera différente selon l'utilisation que l'on fera ultérieurement des lipides élués.

1° - Etude quantitative des lipides neutres

La localisation des lipides neutres obtenus par chromatographie sur couche mince préparative, se fait aux vapeurs d'iode. Cependant l'iode va interférer avec notre solution de dosage : aussi la couche mince est-elle partiellement recouverte d'une feuille de papier d'aluminium.

On localise ainsi nos lipides neutres. On gratte le gel et on dose selon la technique de J.S.AMENTA (1964).

a) Principe des dosages colorimétriques

Il s'agit de développer une coloration sous l'influence de réactifs chimiques et de lire la densité optique (D.O) au spectrophotomètre d'absorption moléculaire.

Si on fait traverser par un faisceau lumineux (d'une lumière monochromatique, c'est-à-dire d'une lumière à longueur d'onde fixe et définie) une cuve à base carrée contenant une solution d'un produit dans l'eau, une partie de la lumière incidente va être absorbée par les molécules de la substance dissoute.

Si l'énergie lumineuse de la lumière incidente est I_0 et celle de la lumière émergente ou transmise I , la loi de BEER-LAMBERT indique que $I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot C \cdot l}$.

En notation logarithmique (logarithme népérien) :

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot C \cdot l = D.O$$

C = concentration de la substance en moles par litre dans le solvant
 l = longueur du trajet optique, c'est-à-dire longueur de la cuve
 ϵ = coefficient d'absorption moléculaire, spécifique de la substance pour la longueur d'onde choisie

Ainsi, l est une constante.

ϵ = cette valeur à une longueur d'onde donnée est une constante physique caractéristique d'une substance donnée. On utilise comme longueur d'onde celle produisant la densité optique la plus élevée (pic d'absorption maximum d'une substance).

C'est la valeur recherchée.

b) Dosage des lipides selon AMENTA (1964)

Les lipides séparés sur couche mince sont oxydés dans une solution acide de Dichromate (2,5 g. de $K_2 Cr_2 O_7$ ont été dissouts dans 1 litre d' H_2SO_4 36 N).

La réduction à l'absorbance 350 nm est proportionnelle à la quantité de lipides.

Le gel de silice correspondant aux différents lipides est transféré dans de petits tubes où on a placé le réactif au dichromate.

Un blanc de gel de silice contenant une surface de gel de silice égale à celle portant les lipides est aussi mis dans le dichromate.

Remarque : On peut aussi préalablement éluer le gel de silice avec le $CHCl_3/CH_3 OH$ 2:1 , obtenir le résidu sec, et faire réagir le réactif au dichromate sur ce résidu sec.

On fait 2 témoins d'une quantité connue de lipides standards. Il est bien sûr important que le même volume de réactif soit utilisé pour le blanc de gel de silice et les lipides inconnus.

La quantité de lipide inconnu est donnée par la formule :

$$\frac{\text{Absorbance du blanc de gel de silice} - \text{Absorbance de l'inconnu}}{\text{Absorbance du blanc de gel de silice} - \text{Absorbance du standard}} = \frac{\mu\text{g de lipides dans l'inconnu}}{\mu\text{g de lipides dans le standard}}$$

Les résultats varieraient, selon J.S.AMENTA, de ± 3 à $\pm 6\%$

Les quantités de réactif que nous utiliserons vont varier selon l'importance des lipides à doser = 0,25ml pour 20 à 100 μg de lipides à doser et 0,5 ml pour 100 à 600 μg de lipides à doser.

Des quantités supérieures étaient rarement trouvées.

En dessous de 50 μg , nos résultats sont de moins en moins fiables. Les variations des résultats restent aux environs de $\pm 3\%$, comme l'a observé J.S.AMENTA.

2°-Etude qualitative des acides gras des différents lipides neutres

Si les variations des taux de monoglycérides, diglycérides, triglycérides, stérols, stérols esterifiés, acides gras libres, sont intéressants, on a aussi cherché à voir quels étaient les acides gras que certains de ces lipides neutres pouvaient contenir, et comment ils variaient dans liquide coelomique, coelomocytes et ovocytes, et cela durant l'ovogenèse.

a) La saponification

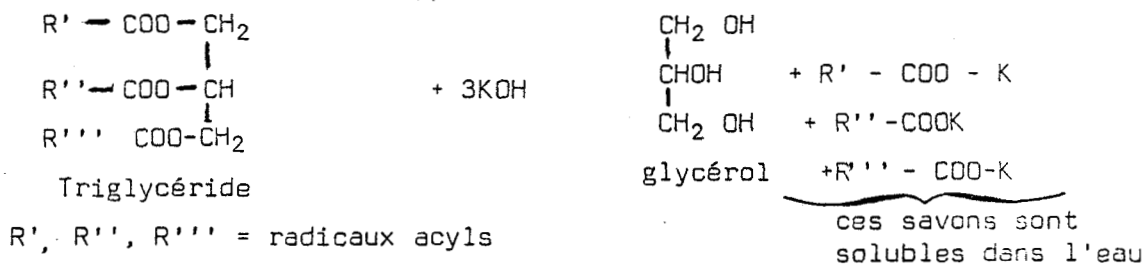
Après migration des lipides totaux sur couche mince de gel de silice, avec le système solvant Ether de pétrole/diéthyléther/acide acétique 80 : 20 : 1 (v/v/v), les taches sont visualisables à la rhodamine. Elles sont alors localisées d'un trait de crayon.

Ensuite on gratte le gel de silice dans un tube. On verse environ 1 ml de chloroforme / méthanol 2 : 1 (v/v). On agite violemment, on fait une centrifugation. On prélève le solvant contenant les lipides en solution. On fait deux autres lavages du gel de silice (avec chaque fois agitation, suivie d'une centrifugation). Trois surnageants sont ainsi rassemblés et stockés. Ces solutions renferment nos lipides isolés sur couche mince, et de la rhodamine.

On sèche ces solutions sous azote. Le résidu sec est alors repris dans un peu de benzène, puis on mélange avec KOH/CH₃ OH 2N afin de faire la saponification (elle se fait à 80°C, sous reflux, pendant 3 heures).

En effet les lipides neutres, peuvent être ainsi hydrolysés sous l'influence des alcalis tels que la potasse. Les acides gras deviennent alors des savons, tandis que le glycérol est libéré.

Exemple :



Une fois la saponification terminée, on ajoute de l'éther et de l'eau. On fait ainsi un déphasage dans une ampoule à décanter :

- dans la phase étherée on obtient l'insaponifiable (stérols notamment)

- dans la phase aqueuse basique : les acides gras sont sous forme de savons. On acidifie cette phase aqueuse et on fait à nouveau un déphasage à l'éther. Dans l'éther, on obtient les acides gras qui étaient au paravant liés au glycérol ou aux stérols, et qui sont maintenant libres.

En effet, les savons sont dissociables, et dans l'eau nous avons l'équilibre : $R - COO^- + K^+ + H_2O \rightleftharpoons R-COOH + K^+ + OH^-$
Une solution de savon est donc basique et l'addition d'acide transforme le savon en acide gras insoluble.

b) La Méthanolyse.

Pour obtenir les méthyl esters nécessaires pour permettre l'étude des acides gras en chromatographie en phase gazeuse, on procède de la façon suivante :

Les Acides gras obtenus après saponification, puis acidification subissent une méthanolyse dans le Méthanol-Acide Sulfurique-Benzène (100 : 5 : 5, v/v/v), à 70 ° pendant 3h.

Si les techniques d'obtention des Méthyl-esters d'Acides gras varient selon les auteurs, la technique que nous avons utilisée est assez classique et a notamment été utilisée par R.F. LEE (1978), directement à la fois sur les glycérides et les phospholipides.

Les méthyl-esters obtenus sont extraits à l'heptane pour être chromatographiés en phase gazeuse.

D. BOLLADE (1971) travaillant sur l'hémolymphe de *Periplaneta americana*, prépare, lui, des esters butyliques d'acides gras.

D'autres auteurs, effectuent leurs méthanolyses à température ambiante : J. KATZ et M. KEENEY (1967) les préparent en dissolvant les lipides dans l'H₂SO₄ - Méthanol à 1 %, et en laissant cette solution à température du laboratoire pendant 14h.. Après addition d'eau les esters sont extraits à l'hexane.

Citons enfin une technique de nos jours très utilisée pour les analyses de routine, car très rapide : L.D. METCALFE et A.A. SCHMITZ (1961) utilisent le mélange Trifluorure de Bore-Méthanol qui transforme les Acides gras en leurs méthyl esters en environ deux minutes. La publication de cette technique est d'ailleurs devenue une "Citation Classic" ("Current Contents", Number 2, 12-1-81).

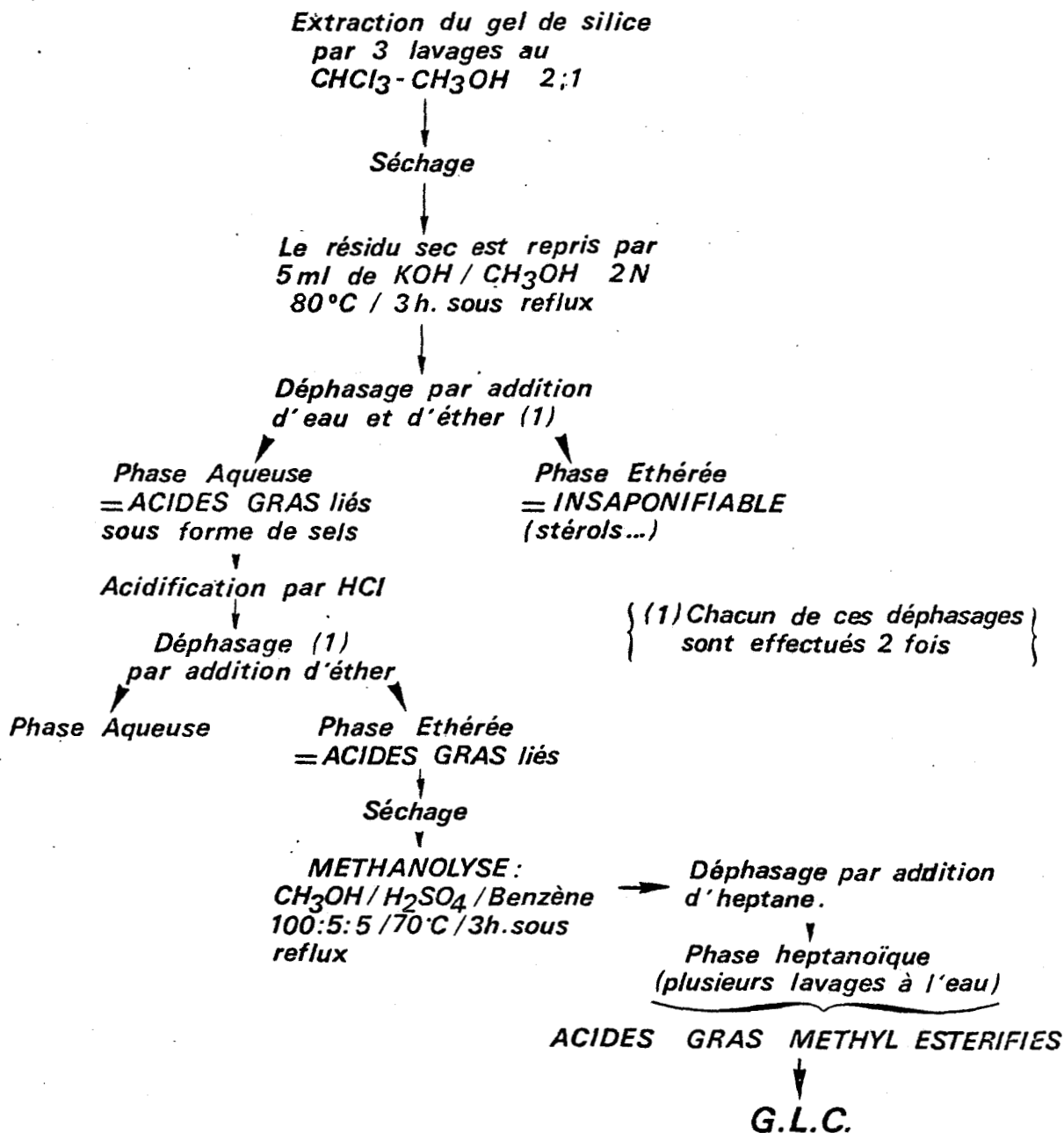
c) La chromatographie des Méthyl esters d'acides gras.

Protocole expérimental

La technique de chromatographie gaz-liquide, après sa mise au point par A.T. JAMES et A.J.P. MARTIN (1952) s'est développée avec une extraordinaire rapidité, notamment grâce à d'importantes améliorations : détection par ionisation (J.E. LOVELOCK, 1958), introduction de phases stationnaires polaires (C.H. ORR et J.E. CALLEN, 1958 ; LIPSKY et LANDOWNE, 1958 ; M. J. E. GOLAY, 1957) ; utilisation de colonnes capillaires (S.R. LIPSKY et coll., 1959 a et b ; R.A. LANDOWNE et S.R. LIPSKY, 1961).

Planche 2 :

L'ÉTUDE DES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES



Appliquée à l'étude de mélanges complexes d'acides gras, la chromatographie gaz-liquide est une méthode d'analyse qualitative et quantitative remarquablement précise et rapide. La séparation est effectuée après méthylation des acides gras, et ne présente pas de grosses difficultés pour la majorité des lipides qui contiennent surtout des acides gras à poids moléculaire élevé.

Il est à noter que si l'emploi des esters méthyliques est d'un emploi courant, G. CLEMENT et J. BEZARD (1961) préconisent l'utilisation d'esters butyliques qui leur permettent de séparer des acides gras à chaîne plus courte (ils séparent ainsi les acides gras du C₁₀ au C₂₀, alors que la méthylation ne nous a permis de séparer que les acides gras à plus de 14 carbones).

La transméthylation n'étant jamais complète, un faible pourcentage d'acides gras ne sont pas méthylés puisqu'il s'agit d'un équilibre. Il est donc préférable d'éliminer ces composants ainsi que les éventuels contaminants provenant des solvants utilisés.

Pour ces raisons, il convient de purifier les esters méthyliques par chromatographie sur couche mince.

Les plaques de gel de silice G, activées 10 mn à 110°C, sont préalablement "nettoyées" par passage du solvant de migration. Après une nuit, puis séchage, les esters méthyliques en solution dans l'heptane, sont déposés sur le gel de silice.

Le solvant de migration est le Benzène.

Après migration, les fractions sont révélées par pulvérisation d'une solution de Rhodamine 6 G. Le spot correspondant aux esters méthyliques, repéré grâce à l'utilisation d'un témoin (l'acide nonadécanoïque méthyl estérifié, de chez SIGMA, réf. N 5377) est gratté.

Le gel de silice déposé dans un petit tube, subit trois lavages successifs à l'heptane (une centrifugation suit chaque lavage). L'heptane surnageant le gel de silice renferme donc les méthyl-esters d'acides gras, purifiés.

Ceux-ci sont alors prêts pour être injectés.

La solution de méthyl esters est introduite dans la colonne par la chambre d'injection (ou chambre de vaporisation) qui a été préchauffée à une température élevée. Les Méthylesters et l'heptane sont volatilisés et le flux de gaz vecteur (l'azote) 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.

Caractéristiques de l'appareil utilisé :

Appareil GIRDEL Série 300.

Chromatographie sur colonne capillaire OV 101 de 85 m de long et 0,35 mm de diamètre intérieur.

Injecteur : type ROS.

Gaz Vecteur : azote . Pression d'entrée : 0,4 bar.

Température du four : 130°C pendant 10 mn, puis élévation de la température jusqu'à 240°C, à raison de 3°C par mn. Stabilisation à 240°C/20 mn.

Température de l'injecteur : 240° à 250°C.,

Température du détecteur : 220° à 225° c.,

- Identification des acides gras.

L'identification de tous les acides gras est un problème délicat :

- Comparaison des temps de rétention :

Cette méthode est rapide et classique. Il suffit de comparer les temps de rétention des pics inconnus, avec ceux obtenus pour les esters méthyliques d'acides gras témoins commerciaux.

Pour le même type de phase stationnaire, de température et de débit d'azote, le temps de rétention relatif est constant.

Cette méthode a été ici utilisée de façon routinière, dès que les pics des différents acides gras ont été parfaitement identifiés.

- Relations entre les temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone (fig. A1).

Il existe pour les acides gras homologues d'une même série une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone des molécules.

Sur une feuille de papier semi-logarithmique on porte en abscisse le nombre de carbones de la chaîne (échelle logarithmique). Ainsi pour chaque série homologue d'acides gras, nous obtenons une droite, et les droites tracées sont parallèles.

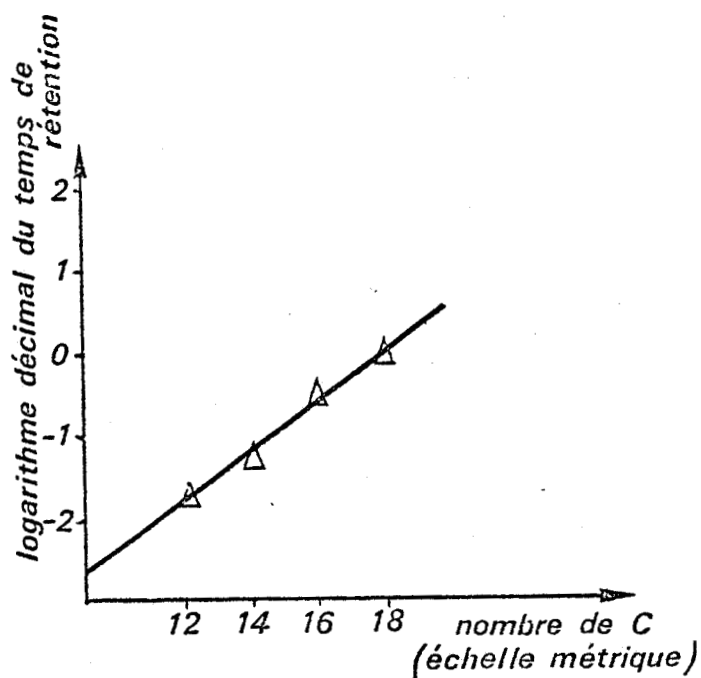


Figure A1 : Relation entre les temps de rétention et le nombre d'atomes de Carbone (graphe obtenu pour une série homologue d'Acides gras).

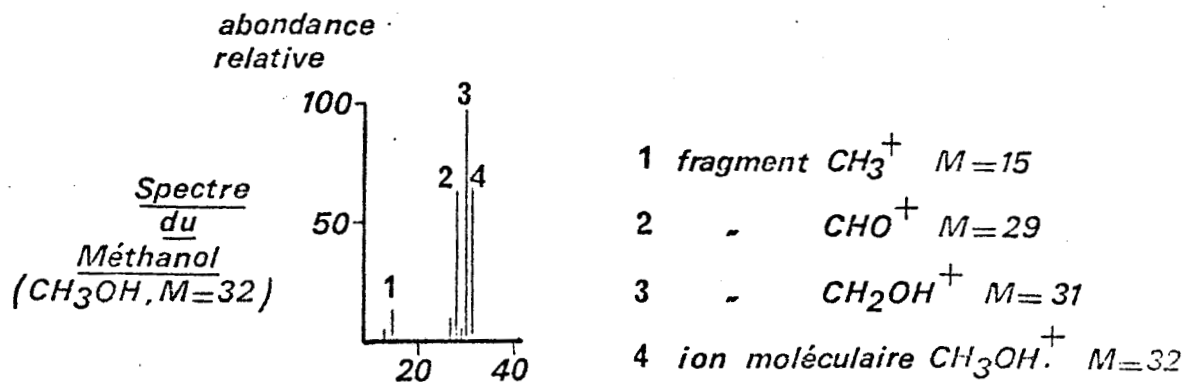


Figure A2 : Exemple de spectre simple obtenu en Spectrométrie de masse. (Extrait de Fred W. Mc LAFFERTY, 1969)



On peut ainsi, à l'aide des temps de rétention de deux acides gras connus sur un chromatogramme et appartenant à la même série homologue, tracer une droite et ensuite déterminer les temps de rétention théorique des autres acides gras de la série et les comparer à ceux des pics inconnus.

- La spectrographie de masse.

Ces dernières années, la spectrométrie de masse a connu un grand développement. Un spectre de masse, tiré à partir de moins d'un milligramme d'échantillon, foisonne de renseignements analytiques et structuraux. Le spectre indique les masses de la molécule ionisée et de ses fragments, et ces masses sont simplement la somme de celles des atomes entrant dans leur composition.

Un spectrographe de masse convertit ainsi un échantillon inconnu en un certain nombre de produits identifiables, caractéristiques de la molécule initiale. La réaction de conversion est un faisceau d'électrons de forte énergie (de l'ordre de 70 électrons volts). Les produits formés sont des ions positifs à l'état gazeux dont les masses et les abondances relatives sont donnés par le spectre de masse.

Les molécules d'échantillons et les produits résultant de l'impact électronique sont continuellement éliminés de la source d'ions par des pompes à vide.

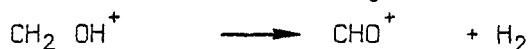
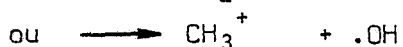
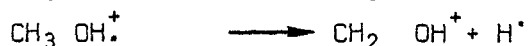
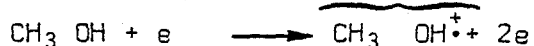
Les ions positifs qui arrivent au collecteur d'ions produisent un courant d'électrons proportionnel à l'abondance de chaque ion .

En dépit du fait que l'efficacité de l'ionisation et la transmission dans le spectrographe de masse ne permettent d'obtenir qu'un seul ion pour 10^6 molécules d'échantillon, on pourra obtenir d'excellents spectres à partir de quantités d'échantillons inférieures au microgramme.

Le premier résultat de l'interaction des électrons avec la molécule est la formation de l'ion moléculaire par éjection d'un autre électron.

Une partie (quelquefois la totalité) de l'ion moléculaire est ensuite décomposée pour donner les ions fragments visibles dans le spectre.

exemple du Méthanol: ion moléculaire



L'ion moléculaire détermine la masse moléculaire de la molécule. La nature des ions-fragments indique les morceaux qui composent la molécule.

On peut alors essayer de déduire comment ces morceaux sont assemblés dans la structure de la molécule initiale (de telles corrélations ont été établies ces dernières années pour les spectres d'un grand nombre de molécules complexes).

La masse (plus exactement m/e , rapport de la masse à la charge) est portée en abscisse et l'abondance relative (qui est, pour un pic quelconque, le rapport en pourcentage de sa hauteur à celle du pic le plus intense trouvé dans le spectre) est portée en ordonnée.

La spectrométrie de masse a été utilisée dans notre étude pour confirmer les résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse.

Caractéristique de l'appareil utilisé :

Ensemble de couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de Masse quadripolaire RIBER MAG R 10-10, associé au système informatique SYDAR 121.

Chromatographe GIRDEL, série 30, équipé d'une colonne capillaire (25m X 0,25 mm) garnie de SE X 30 - Injecteur de type ROS.

Température du four : 220°C.

Température de l'injecteur : 280°C.

Gaz vecteur : Hélium (pression : 1 bar, débit : 0,4 ml/mn).

Gamme de masse balayée 70 - 350 en 400 ms.

A partir du spectre de masse obtenu, des dictionnaires nous permettent de retrouver la nature de la molécule. Ces dictionnaires sont les "Registry of Mass spectral data" de E.STENHAGEN, S. ABRAHAMSSON et F.W. Mc LAFFERTY. Les spectres y sont classés par poids moléculaires et formules moléculaires.

3° Etude quantitative des acides gras entrant dans la constitution des lipides neutres.

L'évaluation du pourcentage de chaque acide gras peut être faite par plusieurs méthodes :

. La Triangulation :

Les courbes de GAUSS de notre enregistrement, peuvent être assimilées à des triangles en utilisant les tangentes au point d'inflexion (Triangles ABC et DEF), la surface du pic est exprimée par la formule :

$$\frac{\text{hauteur du triangle} \times \text{base}}{2}$$

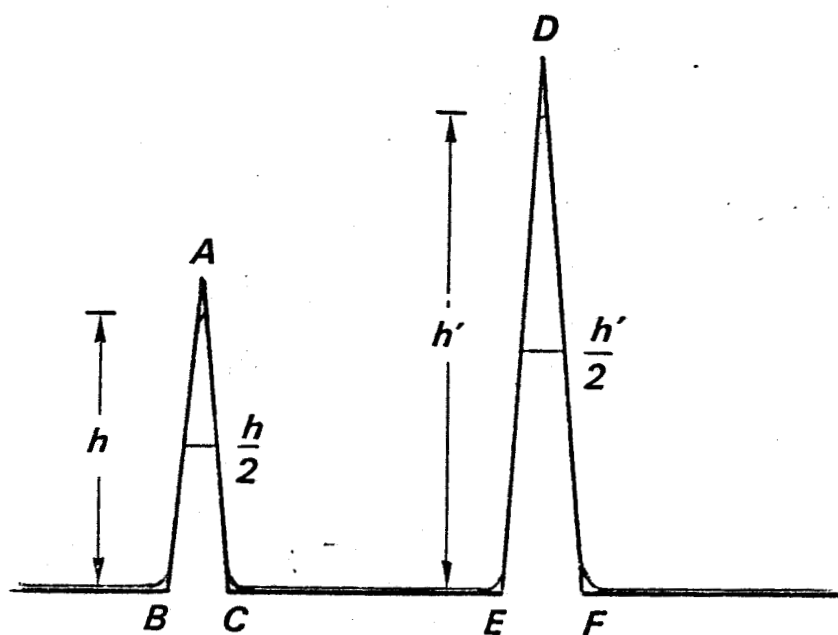


figure A₃ : Paramètres pour l'évaluation de la surface
des pics en G.L.C.

. La mesure de la largeur du pic à mi-hauteur, que l'on multiplie par la hauteur. (figure A3)

On mesure la hauteur du pic (h et h') et on note la mi-hauteur ($\frac{h}{2}$ et $\frac{h'}{2}$).

La largeur du pic à la mi-hauteur est mesurée en millimètre.

Surface du pic = hauteur du pic X largeur à mi-hauteur

. L'utilisation de l'intégrateur rattaché à l'enregistreur de notre chromatographe. C'est la technique que nous avons la plus couramment utilisée. L'appareil associe un nombre à chaque pic. Il nous suffira de faire la somme de ces nombres pour tous les pics identifiés, et de calculer ensuite l'importance relative de chacun de ces pics.

Quelle que soit la méthode utilisée, les proportions relatives des différents acides gras identifiés sont exprimées en calculant le pourcentage des surfaces de chaque pic par rapport à la surface totale des pics retenus.

VI - ETUDE DES PHOSPHOLIPIDES.

Il s'agit plus précisément de la fraction acétono insoluble de nos lipides totaux. Nous n'avons fait qu'une étude succincte, qui nous a permis d'essayer plusieurs techniques.

1° - La séparation des différentes classes de phospholipides.

a) Nous avons principalement utilisé le papier imprégné de gel de silice (papier Whatman SG 81). Ce support a aussi été utilisé par divers auteurs, tels que J. BARAUD et Coll. (1973) ; M.R. STEINER et R.L. LESTER (1972).

Nous avons travaillé par chromatographie bidimensionnelle, avec les deux systèmes solvants suivants :

1ère dimension : CH Cl₃ - CH₃ OH - NH₄ OH - H₂O
66 : 23 : 3 : 0,9 (v/v/v/v)

2ème dimension : CH Cl₃ - CH₃ OH - CH₃COOH - H₂O
33 : 4 : 5 : 1 (v/v/v/v)

Notons que le papier imprégné de gel de silice, est une technique mise au point dès 1962, par G.V. MARINETTI.

b) On a pu aussi utiliser la chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique : technique déjà utilisée pour les lipides neutres. Cependant après équilibrage de la colonne dans du chloroforme pur, l'élution est effectuée par des volumes égaux à 10 fois le volume d'adsorbant,

successivement de chloroforme, et de mélanges chloroforme-méthanol comportant des proportions croissantes de méthanol (technique de fractionnement utilisée par G. BERTHILLIER et Coll., 1977).

c) Enfin la chromatographie d'échange ionique sur colonne de DEAE cellulose peut aussi être utilisée pour la séparation des phospholipides.

En fait, deux types de support pour la chromatographie d'échange ionique sont possibles : la DEAE cellulose (: Diéthylaminoéthyl-cellulose) et le TEAE cellulose (: Triéthylaminoéthyl-cellulose). La première est généralement utilisée pour la séparation des lipides en classes, tandis que la seconde permettra la séparation des lipides ne possédant que des groupements carboxyles comme seuls groupements ionisés (ex. : les acides biliaires et gangliosides).

Préparation de la DEAE cellulose selon KARAN-ROBERT (1975).

La DEAE cellulose (DE 11 Whatman) de haute capacité d'échange est mise à gonfler dans l'eau distillée. Après deux lavages à l'eau distillée et élimination des particules trop fines, la DEAE cellulose est mise en contact avec de la soude à 5 % pendant 30 mn (60g de DEAE pour 300 ml de Na OH à 5 %), puis elle est lavée par passage d'eau distillée jusqu'à obtention de la neutralité. La DEAE cellulose est ensuite convertie sous forme d'acétate par un contact de 30 mn avec l'Acide Acétique à 10 %. L'excès d'acide est éliminé par lavage à l'eau distillée et au méthanol. La DEAE cellulose est alors équilibrée dans le mélange solvant CHCl_3 - CH_3OH dans les proportions 2/1 (v/v).

Montage de la colonne :

On utilise une colonne à chromatographie de 1,5 cm de ϕ et 60 cm de haut. Le mélange de DEAE-cellulose et de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ est versé dans la colonne jusqu'à l'obtention d'une colonne d'environ 20 cm de haut. Elle est équilibrée par passage de 200 ml de CHCl_3 - CH_3OH 2/1.

L'échantillon, repris dans 5 ml de solvant CHCl_3 - CH_3OH 2/1 (v/v) est déposé à la partie supérieure de la colonne.

L'élution est assurée par le passage successif de :

1 - CHCl_3 - CH_3OH 2/1 (v/v) à raison de 100 ml par gramme de cellulose.

2 - CH_3OH à raison de 25 ml par gramme de cellulose. Au cours de l'élution, des aliquots sont déposés sur couche mince, et peuvent être étudiés selon la technique suivante.

d) Les phospholipides ont aussi été séparés par chromatographie

sur couche mince de gel de silice G.

Pour la préparation des plaques et le dépôt de l'échantillon voir ce qui a déjà été dit pour la chromatographie sur couche mince des lipides neutres.

- Le choix du système solvant.

Nous avons essayé différents systèmes solvants :

. $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$ 90 : 10

. $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ 80 : 25 : 4

ou successivement :

1er système solvant : Acétone-Ether de Petrole 98 : 2

afin d'enlever les lipides neutres pouvant subsister dans nos phospholipides.

2ème système solvant : $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{COOH}$ 60 : 30 : 6 : 1

afin de séparer les phospholipides.

- La localisation des phospholipides.

Pour certaines techniques déjà utilisées pour les lipides neutres, on pourra se reporter à ce qui a déjà été dit .

. Vaporisation d' H_2SO_4 à 5 %

. Vapeurs d'iode

. Rhodamine 6 G

Pour les phospholipides on a aussi pulvérisé des révélateurs spécifiques

. Réactif de S.M. PARTRIDGE (1949) pour les sucres réducteurs

0,93 g d'Aniline

1,66 g d'Acide phtalique

90 ml du Butanol

10 ml d' H_2O

. Réactif de C.S. SHANES et F.A. ISHERWOOD (1949), modifié par BURROWS et coll. (1952) pour les composés phosphorylés.

1 g de molybdate d'ammonium dans 8 ml d'eau

3 ml d' HCl concentré

3 ml d' HClO_4 à 70 %

On complète à 100 ml avec de l'acétone.

Séchage quelques minutes à 85° ; la plaque est ensuite soumise aux rayons UV, selon R.S. BANDURSKI et B. AXELROD (1951), ce qui accélère l'apparition de taches bleues foncées sur fond clair.

. Réactif de J.C. DITTMER et R.L. LESTER (1964) pour les groupements phosphates

On prépare 2 solutions.

Solution I : On ajoute 40,11 g de MoO_3 à un litre d' H_2SO_4 25 N, jusqu'à dissolution à chaud.

Solution II : A 500 ml de solution I, on ajoute 1,78 g de Molybdène (on chauffe pendant 15 mn).

On mélange des volumes égaux de solutions I et II, et la solution obtenue est elle-même mélangée à 2 volumes d'eau. Après vaporisation de la solution finale sur la plaque, les phospholipides apparaissent immédiatement sous forme de spots bleus sur fond blanc ou légèrement gris bleu.

. Réactif à la ninhydrine spécifique des bases libres : la solution est ainsi constituée : Ninhydrine 0,20 g

dans { Butanol 95 ml
Pyridine 5 ml

Après pulvérisation des plaques les bases à longues chaînes libres apparaissent en rose (coloration instable).

On peut aussi vaporiser une solution de 0,2 % de ninhydrine dans le Butanol-Pyridine (99 : 1, v/v), puis chauffer à 100° jusqu'à apparition d'une coloration bleue.

. Réactif à α -naphtol révélateur des glycolipides. (relevé dans CH. DELBART, 1978).

Les plaques sont pulvérisées avec une solution d' α -naphtol à 0,5 % dans le mélange $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v), puis après séchage à l'air libre, avec un mélange $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ (95 : 5, v/v). Les plaques sont ensuite chauffées à 110°

Les glycolipides apparaissent sous forme de taches pourpre-violacé sur fond blanc, les lipides polaires apparaissent en jaune et le cholestérol en rose gris.

- L'identification des tâches

Elle est faite avec des témoins (et confirmée par les réactifs spécifiques, vaporisés sur la couche mince).

Témoins utilisés (produits SIGMA)

L- α - Phosphatidyl choline (L- α -Lécithine) réf. P-6263

L- α - Phosphatidyl-L-Sérine réf. P-6641 ou P-8518

L- α - Phosphatidyl Ethanolamine réf. P-3511

Phosphatidyl Inositol réf. 6636.

De nombreuses tâches, correspondant principalement à des formes lyso n'ont pas été identifiées.

2° - L'étude qualitative et quantitative des acides gras des phospholipides.

Les acides gras sont obtenus par hydrolyse acide.

Réactif d'hydrolyse : 8,6 ml d'HCl concentré

9,4 ml d'H₂O distillée

100 ml de Méthanol

On ajoute à nos phospholipides 1 à 2 ml de réactif d'hydrolyse. L'hydrolyse se fait à 70°C, pendant 24 heures, sous Azote. On refroidit à température ambiante et on extrait les acides gras par 3 fois 3 ml d'heptane.

Les techniques de préparation des acides gras pour la chromatographie en phase gazeuse, leur identification et leur quantification se font selon les processus précédemment exposés pour les acides gras des lipides neutres.

3° - Le dosage des Phospholipides.

Après leur séparation sur couche mince, des essais de dosage des phospholipides ont été faits; selon la méthode de P.S.CHEN, T.Y.TORIBARA et H.WARNE (1954). Cette technique est souvent utilisée du point de vue clinique chez la femme pour apprécier la maturité foetale, par dosage des lécithines et sphingomyélines (méthode de GLUCK).

Réactifs : Acide sulfurique 6 N

Réactif A : Molybdate d'ammonium à 2,5 %

Réactif B : Acide ascorbique à 10 %

Réactif C : $\left\{ \begin{array}{l} \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 6N} \quad 1 \text{ volume} \\ \text{Réactif A} \quad 1 \text{ volume} \\ \text{Réactif B} \quad 1 \text{ volume} \\ \text{H}_2\text{O} \quad \quad 2 \text{ volume} \end{array} \right.$

Après évaporation du solvant, un volume de 0,5 ml d'acide perchlorique pur est introduit dans chacun des tubes contenant les différents phospholipides.

La minéralisation se fait 2 heures, à 180°C, au bain de sable.

Le volume est ajusté à 4 ml avec de l'eau distillée, puis on ajoute 4 ml de réactif C (préparé extemporanément).

Après mélange des réactifs, les tubes sont incubés 1h30, à 37°C. La lecture au spectrophotomètre se fait à 820 nm. Les D.O. sont comparées à celles d'une gamme étalon préparée à partir d'une solution de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, à 5 µg/ml.

VII - TECHNIQUES DE RADIOACTIVITE

1° - Principe

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

Un élément radioactif est un isotope instable qui a tendance à se transformer spontanément en isotope stable : cela s'accompagne d'une émission de particules ou rayonnement, et c'est cette émission d'énergie qui est détectable.

Dans un ensemble de noyaux instables de même nature les désintégrations surviennent au hasard et la loi des désintégrations est une loi statistique.

A chaque instant le nombre dN de désintégrations pendant l'intervalle de temps dt est proportionnel au nombre N d'atomes présents dans l'échantillon :

$$dN = \lambda \cdot N \cdot dt$$

λ est la constante radioactive, caractéristique du radio-élément considéré.

Par intégration de cette équation différentielle, on obtient :

$$N = N_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

N = nombre d'atomes instables
au temps t

N_0 = Nombre d'atomes instables
au temps 0

On appelle période d'un radioélément le temps T au bout duquel la moitié des atomes instables se sont désintégrés, c'est à dire le temps au bout duquel $N = \frac{N_0}{2}$

Nous avons choisi l'Acétate et le Glycérol, tous deux marqués au C^{14} .

Le C^{14} émet un rayonnement β "mou" (c'est-à-dire faiblement énergétique) et sa période est de 5760 ans.

Acétate et Glycérol sont conservés à $- 20^\circ C$.

2° - Moyens de détection de la radioactivité.

On a utilisé un compteur à scintillations (), appareil très sensible pouvant détecter des rayonnements β mous de très faible énergie.

Il faut une substance pouvant émettre un rayonnement électromagnétique quand elle interagit avec la radioactivité émise. Cette matière est fluorescente et peut donner une scintillation transformée par un spectrophotomètre ou un photomultiplicateur, en impulsion électrique détectable.

La substance fluorescente doit être soluble dans un solvant lui-même fluorescent : le toluène. Quand un rayonnement β vient frapper ce solvant, il émet une lumière fluorescente à une longueur d'onde de 3000 \AA . Or les spectrophotomètres et les photomultiplicateurs ne sont actuellement sensibles, au minimum, qu'autour de 4000 \AA . Par conséquent il faut combler ce trou entre émetteur et récepteur par des multiplicateurs qui joueront le rôle de modificateur de longueur d'onde : le scintillateur primaire qui fait passer de 3000 \AA à 3600 \AA et le scintillateur secondaire de 3600 \AA à 4000 \AA , longueur d'onde décelable par les appareils.

Les liquides scintillants sont donc complexes et sont le plus souvent désignés par leurs initiales.

On utilise ici le POPOP :

le solvant est le toluène

le scintillateur primaire est le PPO (5g/l)

(réémet les photons à 3600 Å°)

le scintillateur secondaire est le POPOP (0,5g/l)

(réémet les photons à 4000 Å°)

Remarque : lorsqu'on passe du toluène au scintillateur I puis II, la cible de la molécule étant de plus en plus grande, la quantité nécessaire sera de plus en plus faible.

3° - Protocole expérimental.

Les lipides totaux sont déposés sur couche mince de gel de silice. On fait migrer avec le système solvant utilisé pour les Lipides Neutres. Les tâches intéressantes sont identifiées et localisées avec des témoins. Ces témoins sont visualisés, par exemple aux vapeurs d'iode (le restant de la plaque étant recouvert d'une feuille de papier d'aluminium, afin d'éviter une coloration de notre solution, quand les lipides étudiés sont passés au compteur à scintillations).

Le gel de silice contenant les différents lipides étudiés est chaque fois gratté dans un petit tube. Le gel est "lavé" par agitation énergique dans une quantité connue de Chloroforme-Méthanol 2/1(v/v).

On centrifuge, et le gel de silice, débarrassé de ses lipides se retrouve au fond du tube.

Dans le surnageant de chaque tube on prend une aliquote de 50 µl que l'on dépose dans des fioles standards de polyéthylène. On ajoute 6 ml de liquide scintillant et on agite afin d'obtenir une solution homogène.

On dispose les fioles dans le compteur à scintillations.

Remarque : le bruit de fond ("background") devra être retranché de la mesure de radioactivité donnée par notre appareil. Pour les fioles en polyéthylène pleines, il est d'environ 30 cpm, pour la voie C¹⁴ (P.KAMOUN, 1977).

VIII - LA FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX OU DE POLYACRYLAMIDE.

1° - La gel filtration sur Séphadex.

Dans notre étude dynamique par les techniques de Radioactivité, nous avons fractionné le liquide œlomique, les œlomocytes et les ovocytes.

œlomocytes et ovocytes sont préalablement broyés au "Polytron" : les broyats obtenus sont alors centrifugés afin d'en extraire les substances

insolubles. Seul le surnageant sera conservé et utilisé pour le passage sur colonne de Séphadex.

Le liquide cœlomique, dépourvu d'éléments cellulaires, pourra directement être passé sur notre colonne.

Les Séphadex (nom déposé par la firme Pharmacia) sont des gels formés de dextran modifié et se présentent sous forme de perles qui gonflent considérablement dans l'eau.

Les molécules dont la taille est supérieure à celle des plus gros pores du gel, ne peuvent y pénétrer, migrent dans la phase aqueuse qui entoure les grains du gel et quittent les premières la colonne où est placé ce gel. Par contre les molécules plus petites pénètrent dans le gel et leur migration est ainsi retardée.

Les molécules quittent donc un gel Séphadex placé dans une colonne de verre dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

Plusieurs types de Séphadex existent : ils diffèrent les uns des autres par leur capacité de gonflement.

L'indice de rétention, ou volume d'eau en ml absorbé par gramme de Séphadex sec, est donné par la numérotation des Séphadex. Nous utilisons un Séphadex G 25, qui possède donc un indice de rétention de 2,5 ml/g. Son domaine de fractionnement est de 1000 à 5000.

Les Séphadex des séries G- peuvent être utilisés avec d'autres solvants que l'eau. Nous n'avons utilisé que l'eau bidistillée dégazée. Le "dégazage" se fait dans une fiole fermée reliée à une trompe à vide (l'opération dure environ 1 heure).

Le passage de notre solution dans la colonne de Séphadex se fait 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 Séphadex.

Un collecteur de fractions complète notre appareillage.

2° - La filtration sur gel de polyacrylamide.

Une importante radioactivité se trouvant dans l'un des pics obtenus après passage sur Séphadex, nous avons cherché à fractionner ce pic. Nous avons ainsi utilisé le Bio-gel P2 (Bio-Rad Laboratories).

Le dispositif expérimental est le même que pour l'utilisation des gels de Séphadex.

Le Biogel, comme le Séphadex, permet de réaliser des gel-filtrations.

Le Biogel P (gel de Polyacrylamide) est un support inerte, très hydrophile. Le Biogel P2 est utilisé pour la séparation de molécules de poids moléculaires de 100 à 1800.

BILAN PONDERAL

I - IMPORTANCE RELATIVE DES TROIS CONSTITUANTS DU MILIEU INTERIEUR DE PERINEREIS CULTRIFERA

II - EVOLUTION DE LA TENEUR EN LIPIDES AU COURS DE L'OVOGENESE

- 1° - Importance des lipides totaux par rapport à la masse totale de substance sèche (liquide coelomique + coelomocytes + ovocytes)
 - a) Les lipides totaux du milieu intérieur de *P. cultrifera*
 - b) Les lipides totaux du liquide coelomique
 - c) Les lipides totaux des coelomocytes
 - d) Les lipides totaux des ovocytes
 - e) Conclusion
- 2° - Importance des lipides totaux dans le liquide coelomique, les coelomocytes ou les ovocytes, au cours de l'ovogenèse
 - a) Dans le liquide coelomique
 - b) Dans les coelomocytes
 - c) Dans les ovocytes
 - d) Conclusion

III - L'IMPORTANCE DES LIPIDES CHEZ LES INDIVIDUS MALES

IV - LES LIPIDES ET L'OVOGENESE CHEZ LES INVERTEBRES

BILAN PONDERAL

I - IMPORTANCE RELATIVE DES TROIS CONSTITUANTS DU MILIEU INTERIEUR DE PERINEREIS CULTRIFERA.

Après prélèvement et fractionnement du milieu intérieur de nos vers (voir la préparation du matériel biologique dans le chapitre "Matériel et Méthodes"), chacun de ses constituants (liquide coelomique, coelomocytes et ovocytes) est lyophilisé. Le résidu sec obtenu est pesé.

Tableau B1

Diamètres Ovocytaires	Liquide coelomique	Coelomocytes	Ovocytes
70 μ	7	← 93 →	
115 μ	17	30	53
140 μ	14	39,5	46,5
155 μ	11	51	38
170 μ	12	41	47
180 μ	12,5	34	53,5
200 μ	8	49	43
220 μ	9	36,5	54,5
225 μ	7,5	46	46,5
230 μ	8	58	34
245 μ	8	43	49

Evolution de l'importance relative des 3-fractions du milieu intérieur de *P. cultrifera* (les résultats sont exprimés en % de la masse totale de matière sèche représentée par les 3 fractions).

Nos résultats (voir tableau B1) indiquent que le liquide coelomique constitue 7 à 17 % de la masse totale de matière sèche représentée par tout le milieu intérieur.

Les coelomocytes en constituent 30 à 58 %, et les ovocytes 34 à 54,5 %.

Les éléments figurés (coelomocytes et ovocytes) représentent donc l'essentiel du milieu intérieur de nos vers, en masse de substance sèche.

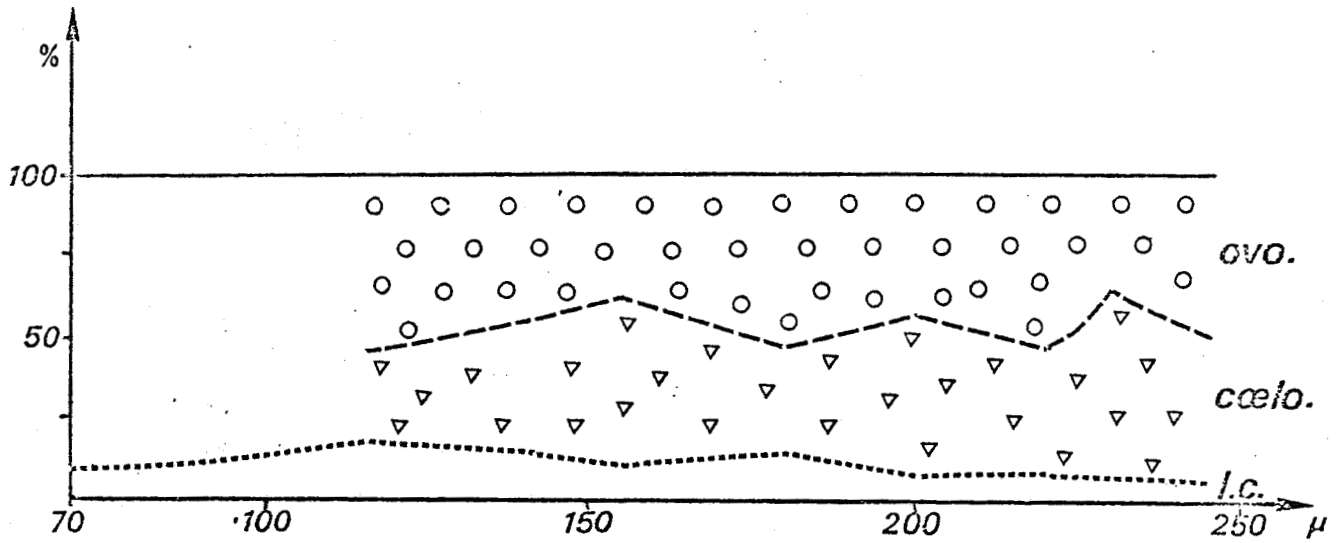


Figure B1 : Evolution de l'importance relative des trois fractions du milieu intérieur de *P. Cultrifera* (cf Tableau B1)

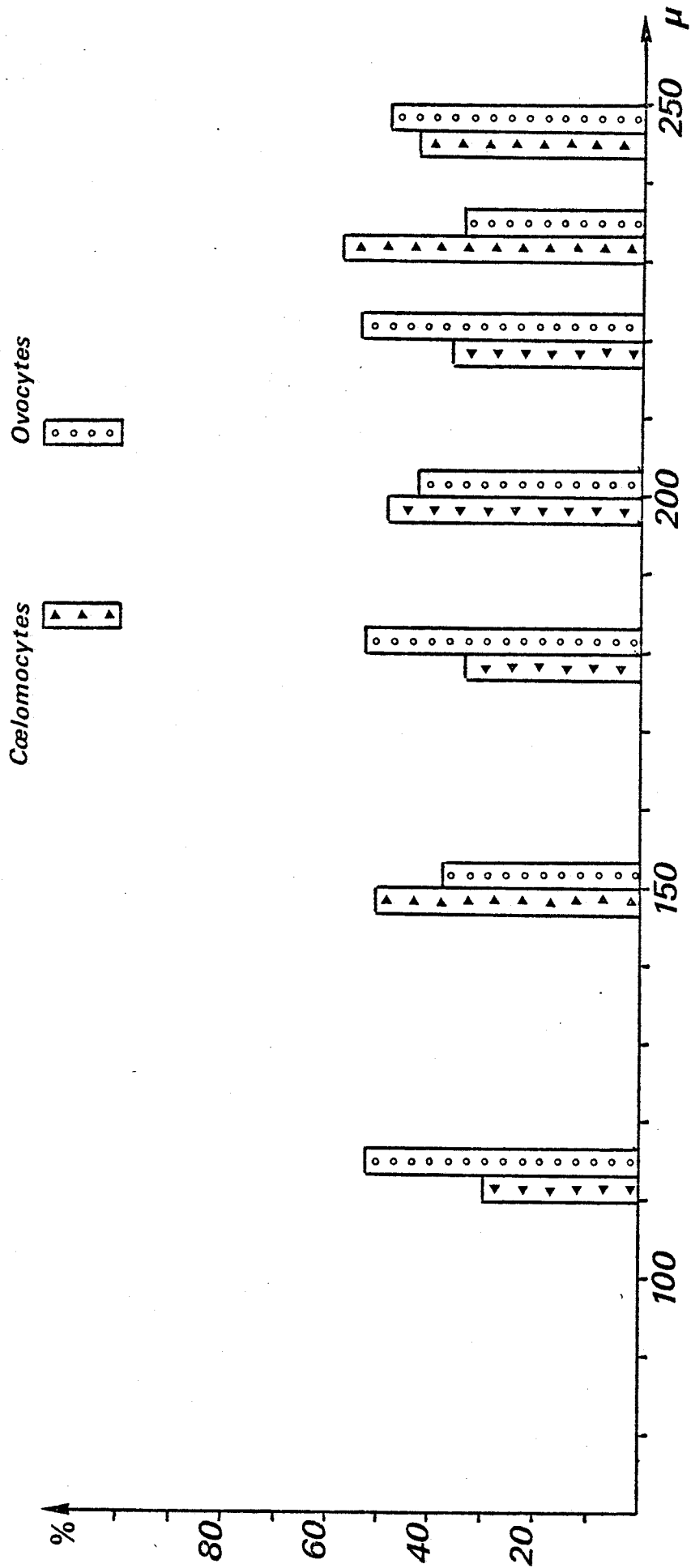


fig. B2: Importance de la masse de matière sèche des Cœlomocytes et des Ovocytes, selon les stades étudiés.

Cependant, au cours de l'ovogenèse l'importance de chaque fraction va évoluer. La figure B1 montre que l'importance du liquide coelomique diminue, au bénéfice des éléments figurés.

L'importance des coelomocytes est par contre assez variable, leur masse de matière sèche étant particulièrement importante à 150-160 μ , 200 μ et 230 μ .

La figure B2 montre l'importance relative des coelomocytes et des ovocytes pour certains stades (résultats exprimés pour 100 % de matière sèche).

II - EVOLUTION DE LA TENEUR EN LIPIDES AU COURS DE L'OVOGENESE.

Les résidus secs obtenus après lyophilisation sont extraits de leurs substances lipidiques (= Lipides totaux) par le mélange chloroforme/méthanol 2 : 1 et lavage selon FOLCH (1951, 1957). Le protocole d'extraction est exposé en détail dans "Matériel et Méthodes" (§ n° II). Les lipides ainsi obtenus sont séchés et pesés.

1° - Importance des lipides totaux par rapport à la masse totale de substance sèche (liquide coelomique + coelomocytes + ovocytes).

Nos résultats sont exposés dans le tableau B2 et représentés dans la figure B3. Il s'agit ici de la masse de lipides totaux par rapport à la masse totale de substance sèche.

Tableau B2

Diamètres Ovocytaires	Liquide Cœ lomique	Cœ lomocytes	Ovocytes	Lipides totaux
70	0,5	3	15	18,5
100	1,2	2	16,2	19,4
115	1,2	1	11,8	14
140	0,5	2	10	12,5
155	0,3	5,6	7,8	13,7
180	0,8	1,8	12,2	14,8
195	0,8	2,2	24,7	27,7
205	0,1	4	14,3	18,4
225	4,7	4,3	11,6	20,6
230	0,4	4	22,1	26,5
245	0,5	0,7 ?	0,7 ?	1,9

Importance des Lipides totaux par rapport à la masse totale de matière sèche (liquide coelomique + coelomocytes + Ovocytes).

a) Les lipides totaux du milieu intérieur de *P. cultrifera*
(liquide cœlomique + cœlomocytes + ovocytes) : ces lipides totaux ne
présentent pas de grande variation jusqu'au stade 180 μ . Leur importance double
ensuite vers 190-200 μ . Après une légère chute, ils se retrouvent importants
vers 230 μ . En se reportant aux résultats exposés précédemment, on observe que
la masse de matière sèche des cœlomocytes s'élève aussi à 190-200 μ , puis
230 μ , cette augmentation est donc en grande partie due à une augmentation
du taux de lipides.

b) Les lipides totaux du liquide cœlomique.

Leur importance par rapport à la masse totale de matière sèche du
milieu intérieur, reste faible et tend même à décroître, sauf au stade 225 μ .

c) Les lipides totaux des cœlomocytes : leur taux est parti-
culièrement élevé à 150-160 μ , et entre 200 et 230 μ . C'était aussi pendant ces
périodes que la masse totale de matière sèche des cœlomocytes était particu-
lièrement importante.

d) Les lipides totaux des ovocytes : sont surtout importants
à 190-200 μ et à 230 μ , zones où pourtant la masse de substance sèche qu'ils
représentent est faible par rapport à la masse totale de substance sèche de
tout le milieu intérieur de nos vers (liquide cœlomique + éléments figurés).

e) Conclusion :

Les lipides constituent une part importante du résidu sec de tout
le milieu intérieur de *P. cultrifera* surtout vers 180 μ (de 15-20 % du
résidu sec jusque 180 μ , ils en représentent près de 30 % à 190-200 μ). Le
taux en lipides reste ainsi important entre 190 et 240 μ , avec 2 pics
(à 190-200 μ et 230 μ), puis chute ensuite brutalement en fin de maturité
génitale.

Ces lipides semblent d'abord se situer dans les cœlomocytes entre
140-170 μ et entre 200-230 μ et dans les ovocytes entre 170 et 210 μ et entre
225-235 μ . On remarque ainsi que chaque fois un taux élevé en lipides dans
les cœlomocytes précède un taux élevé en lipides dans les ovocytes.

Nous venons d'étudier l'importance des lipides par rapport à la masse
totale de substance sèche représentée par le milieu intérieur de *P. cultrifera*,
voyons maintenant qu'elle est l'importance des lipides au sein de chaque frac-
tion de ce milieu intérieur (liquide cœlomique, cœlomocytes ovocytes).

2° - Importance des lipides totaux dans le liquide cœlomique,
les cœlomocytes ou les ovocytes, au cours de l'ovogenèse (voir tableau B3 et
figure B4).

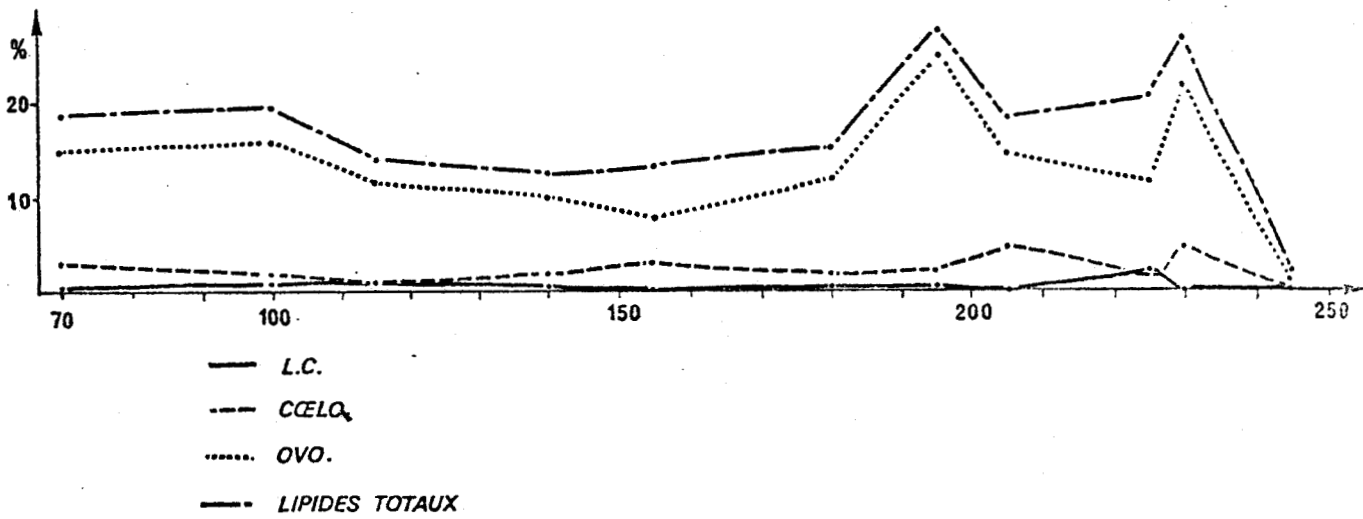


Figure B3 : Importance de la teneur en Lipides Totaux par rapport à la masse totale de matière sèche. (cf. Tableau B2).



Tableau B3

Diamètres Ovocytaires	Liquide Coelomique	Coelomocytes	Ovocytes
70 µ	8,5	90,8	28,2
100 µ	17,3	4,5	33,7
115 µ	7,4	4	19,7
140 µ	2,2	5,6	19
155 µ	2,2	11	20
180 µ	7,7	6,2	20,3
195 µ	—	11,3	31,7
205 µ	2	9,1	28
220 µ	1	—	13
225 µ	—	12,1	21
230 µ	6,1	13	32,2
245 µ	6	1,5 ?	1,5

Evolution de la teneur en lipides totaux dans le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes, au cours de l'ovogenèse de *Perinereis cultrifera*. (Résultats exprimés en % de la masse de matière sèche représentée par chaque fraction).

a) Dans le liquide coelomique les lipides sont importants à 100 µ, puis chutent de façon importante (de 17,3 % du résidu sec à 100 µ, ils n'en représentent plus que 2,2 % à 150 µ).

La teneur en lipides augmente ensuite vers 160 µ, pour rechuter à 190 µ. Elle augmente à nouveau à partir de 220 µ, puis reste à une valeur constante à l'approche de la maturité génitale.

b) Dans les coelomocytes : chez les animaux très jeunes on obtient une valeur extrêmement élevée qui chute brutalement, pour ne plus représenter que 4 % du résidu sec des coelomocytes. Le taux de lipides des coelomocytes augmente ensuite vers 130 µ, atteint un pic entre 150-160 µ, puis chute. Les lipides voient leur importance à nouveau accrue à partir de 180 µ, avant de chuter à l'approche de la maturité génitale.

c) Dans les ovocytes la teneur en lipides oscille entre 20 et 40 % du Résidu sec total. Deux pics sont particulièrement importants : entre 180 et 210 µ, et entre 220 et 240 µ. Comme pour les coelomocytes, la teneur chute à l'approche de la maturité génitale.

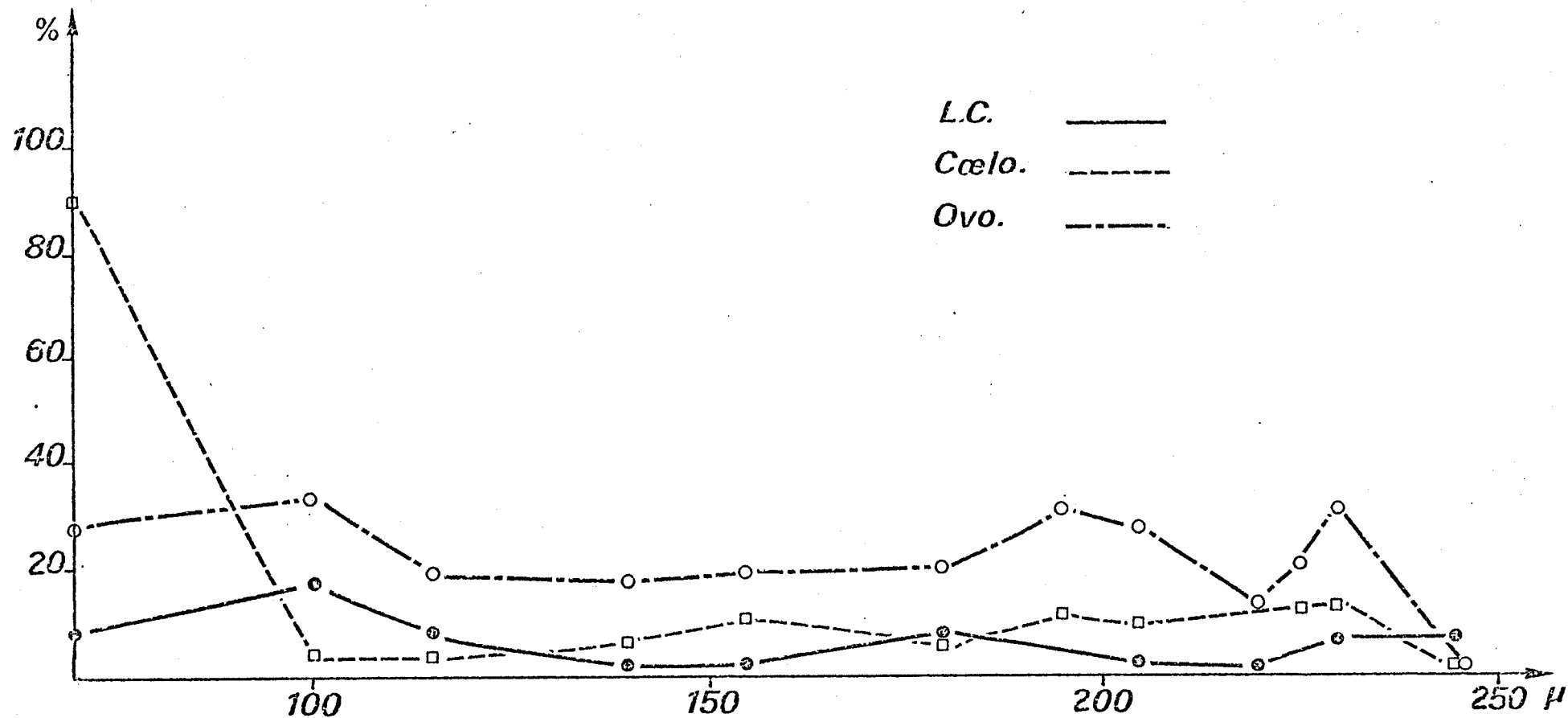


Figure B 4 : Evolution de la teneur en lipides totaux dans le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes, au cours de l'ovogenèse de *Perinereis cultrifera*.

Les résultats sont exprimés en % de la masse de matière sèche représentée par chaque fraction.



d) Conclusion

Ce sont les ovocytes qui concentrent une grande partie des lipides. Les cœlomocytes en sont aussi particulièrement riches, bien qu'à un moindre taux. Ovocytes et cœlomocytes voient leur teneur en lipides diminuer à l'approche de la maturité génitale, ceux-ci se trouvant alors en grande partie dans le liquide cœlomique.

Il est intéressant de constater que chaque fraction du milieu intérieur possède des teneurs importantes qui se succèdent :

- entre 140 et 170 μ : taux important de lipides dans les cœlomocytes.

- entre 180 et 190 μ : taux important de lipides dans le liquide cœlomique.

- entre 180 et 210 μ : taux important dans les ovocytes.

Dès 1957, R.P. DALES estimait que les cellules cœlomiques (plus précisément les éléocytes qui constituent une partie importante de ces cellules cœlomiques) jouaient un rôle dans le stockage et le transport de nourriture chez certains Polychètes.

Etudiant plusieurs espèces de Polychètes Sabellidés, il voit dans les éléocytes, un dépôt utilisable pour la maturation des gamètes. (R.P. DALES, 1961, 1963). Le même auteur, chez le Polychète Terebellidae *Amphitrite johnstoni* fait une observation semblable (1964).

Enfin, il va plus loin dans son raisonnement quand il note (R.P. DALES, 1968) que glycogène et les lipides des cœlomocytes, bien que présents en grande quantité, semblent être inutilisables, alors que le glycogène des muscles peut être réduit : les cœlomocytes de *Sabella spallanzani* peuvent contenir près de la moitié de leur poids total de matière sèche sous forme de lipides et 1/5 sous forme de glycogène, mais tandis que ces vers peuvent survivre en conditions anaérobies pendant 25 heures, ces réserves ne sont pas affectées. Les réserves des cœlomocytes semblent, pense-t-il, destinées prioritairement aux gamètes en cours de maturation.

Dans une précédente étude (F. Fontaine, DEA 1979) nous avons étudié par les techniques biochimiques les rapports métaboliques existant entre cœlomocytes - liquide cœlomique - ovocytes.

Analysant les teneurs en acides gras, nous avons observé que les premiers acides gras de certaines séries métaboliques, apparaissaient d'abord dans les cœlomocytes. Cette constatation nous amenait à considérer les cœlomocytes comme d'importants lieux de stockage et de biosynthèse des lipides, qui seraient ensuite consommés par les ovocytes en cours de maturation.

La dernière observation exposée plus haut va aussi dans ce sens. C'est dans les cœlomocytes que l'on trouve les teneurs importantes en lipides, avant de les retrouver dans le liquide cœlomique, puis les ovocytes.

III - L'IMPORTANCE DES LIPIDES CHEZ LES INDIVIDUS MALES.

Nous avons fractionné le milieu intérieur de *P. cultrifera* mâles, en, d'une part le liquide cœlomique, d'autre part les éléments figurés (cœlomocytes + gamètes).

Tableau B4 : Étude des lipides totaux du milieu intérieur de *P. cultrifera* mâles.

	Liquide Cœlomique	Cœlomocytes + gamètes
Importance relative de chaque fraction	27 %	73 %
Importance des lipides totaux par rapport à la masse totale de matière sèche.	4,1 %	12,4 %
Teneur en lipides de chaque fraction	18,2 %	16,1 %

La masse de matière sèche du liquide cœlomique constitue ainsi chez les mâles une part importante du milieu intérieur (beaucoup plus importante que chez les femelles).

Les lipides totaux sont concentrés dans les éléments figurés. Le liquide cœlomique en possède néanmoins une quantité importante.

Enfin, le liquide cœlomique dont le résidu sec renferme plus de 18 % de lipides, est plus riche en substances lipidiques que les éléments figurés (les deux valeurs sont cependant très proches). Jamais on ne trouve dans les gamètes mâles, autant de lipides que dans les ovocytes.

Chez les individus mâles d'une autre espèce d'Annélide, *Nereis diversicolor*, nous avons fait une étude identique :

Tableau B5 : Etude des lipides totaux du milieu intérieur de *Nereis diversicolor* mâles.

	Liquide Cœlomique	Cœlomocytes + Gamètes
Importance relative de chaque fraction	36 %	64 %
Importance des lipides totaux par rapport à la masse totale de matière sèche	3,6 %	8,1 %
Teneur en lipides de chaque fraction	11,8 %	11,7 %

Comme pour les *P. cultrifera* mâles le liquide cœlomique constitue une fraction importante de la masse totale de matière sèche du milieu intérieur.

D'autre part, si les lipides se retrouvent surtout dans les éléments figurés (cœlomocytes + gamètes), le liquide cœlomique en contient une part importante.

Enfin les teneurs en lipides du liquide cœlomique et des éléments figurés sont semblables.

Finalement, chez les mâles de *P. cultrifera* et de *N. diversicolor*, on trouve des résultats comparables.

IV - LES LIPIDES ET L'OVOGENESE CHEZ LES INVERTEBRES.

Les lipides constituent une importante source d'énergie et l'augmentation de leur taux ou au contraire leur diminution n'est pas sans relation avec les grands phénomènes métaboliques qui peuvent se produire chez l'animal. Ce principe, bien connu chez les Vertébrés, existe aussi chez les Invertébrés.

Chez les INSECTES Wigglesworth avait dès 1958 mis en évidence l'importance du rôle métabolique du tissu adipeux et H.Chino et L.I. Gilbert (1965) ont montré que le contenu lipidique du corps gras de l'adulte *cecropia* est presque trois fois plus important que le corps gras pupal.

L.I. Gilbert (1967) affirme que chez la plupart des Insectes, la femelle contient plus de lipides que le mâle puisqu'ils constituent le principal substrat intervenant dans le développement des œufs (sauf pour les Lépidoptères). Ainsi Strong (1963 a, b, 1964) montre qu'environ 14 % du poids frais d'œuf d'Aphid est de nature lipidique.

De même, des travaux chez une espèce ovovivipare, *Leucophaea maderae* (L.I. Gilbert, 1967), ont montré une augmentation importante du contenu lipidique de l'ovaire chez une femelle adulte avant l'ovogenèse (environ 0,5 mg) jusqu'à environ 80 mg dans un ovaire contenant des œufs matures juste avant l'ovulation. Cela correspond, fait remarquer l'auteur, à une diminution du contenu lipidique du corps gras indiquant un transport des lipides vers l'ovaire. Notons que nous avons fait chez l'Annélide *Perinereis cultrifera* une observation analogue avec augmentation du contenu lipidique dans les ovocytes, faisant suite à une diminution de la teneur en lipides dans les œlomocytes.

Chez les MOLLUSQUES, M.L. SWIFT, D. WHITE et M.B. GHASSEMIEH (1980) font des observations semblables sur les tissus de l'huître *Crassostrea virginica* : les lipides, disent-ils, semblent servir d'unique rôle dans les tissus des gonades en maturation, puisque les femelles de certaines espèces de Mollusques contiennent plus de lipides dans la totalité du corps que les mâles.

Enfin, chez un ver acœlomate, tel que le NEMATODE *Romanomermis culcivoxax*, P.I. ITTYCHERIAH, R. GORDON et W.J. CONDON (1977) ont pu montrer, par des recherches histochimiques, que des produits de stockage s'accumulent dans le trophosome, à partir du quatrième jour de développement parasitaire : les lipides constituent le principal métabolite de stockage, le glycogène venant ensuite .

Mais si des lipides s'accumulent dans les ovocytes ou les œufs en voie de développement de nombreux Invertébrés, d'où proviennent-ils ?

On a cru longtemps que les constituants de l'ovocyte à maturité étaient élaborés à partir d'éléments simples prélevés dans l'hémolymphe, ou le liquide œlomique. Cette notion s'appliquait particulièrement aux groupes les moins évolués, mais à partir de 1950 les études concernant les Vertébrés non-mammaliens et les Arthropodes commencèrent (cf W. TELFER, 1954, sur le ver à soie). Ces travaux s'intensifièrent à partir de 1960.

Chez les Myriapodes, les Crustacés, les Insectes, les Poissons, les Amphibiens et les Oiseaux, on a pu montrer qu'un complexe lipoprotéique (ou vitellogénine) était nécessaire pour la constitution du vitellus, et que cette vitellogénine était souvent associée avec d'autres groupements prosthétiques, et synthétisée en dehors de l'ovaire, véhiculée par le sang et

séquestrée par les ovocytes pendant la vitellogenèse par un mécanisme d'endocytose (micropinocytose). Cette vitellogénine est employée par les ovocytes pour constituer le vitellus (d'où le nom : vitellogénine : participation à la "genèse du vitellus").

C'est chez les Insectes que les travaux sont dans ce domaine les plus avancés.

La vitellogénine d'insecte est synthétisée par le corps gras des femelles (M.L. PAN, W.J. BELL et W.H. TELFER, 1969) et est ensuite transportée par l'hémolymphe vers la surface de l'ovocyte où elle est prise par micropinocytose (T.F. ROTH et K.R. PORTER, 1964 ; R.G. KESSEL et L.R. GANION, 1979).

Après sa concentration dans les ovocytes, la vitellogénine reste généralement immunologiquement et électrophorétiquement indistinguable de son précurseur de l'hémolymphe.

Une partie lipidique d'environ 10 % du poids total de protéines a été montrée chez *Leucophaea maderae* (R.K. DEYMAL et V.J. BROOKS, 1972), *Hyalophora cecropia* (K.K. THOMAS et L.I. GILBERT, 1968), *Aedes aegypti* (H.H. HAGEDORN et P.L. JUDSON, 1972) et *Manduca sexta* (E.C. MUNDALL et J.J. LAW, 1979). Cependant, chez le ver à soie, *Philosomia cynthia*, H. CHINO et coll. (1969) ont montré que la lipoprotéine la plus active de l'hémolymphe contient 44 % de lipides.

Ainsi, sur la base de leur contenu lipidique, les vitellogénines d'insectes peuvent être classées comme "Very High Density Lipoproteins" (VHDL), en employant la terminologie des lipoprotéines du sérum de Vertébrés (E.C. MUNDALL et J.H. LAW, 1979). Chez *Manduca sexta*, ces derniers auteurs trouvent précisément 11,4 % de lipides totaux dans la vitellogénine de l'œuf, et 11,2 % de lipides totaux dans celle de l'hémolymphe.

Chez les CRUSTACES, c'est M.S. KERR (1969) qui a montré pour la première fois, chez le crabe *Callinectes sapidus*, que la lipoprotéine constituant la plupart du vitellus était immunologiquement indistinguable d'une lipoprotéine du sérum, une vitellogenine. La même chose a été montrée chez *Orchestric gannarella* (J.J. MEUSY, 1972 ; Y. CROISILLE et coll., 1974). Ces résultats ont été étendus à des décapodes : *Libinia emarginata* (E.M. WOLIN, H. LAUFER et D. FALBERTINI, 1973)... et à des Isopodes : *Porcellio dilatatus* (J.L. PICAUD, 1978).

Selon les auteurs et les espèces, les lipovitellines de crustacés contiennent 28 à 35 % de lipides (J.J. MEUSY, 1980).

Chez l'ANNELIDE que nous étudions, nous avons soulevé précédemment le problème d'un transport de lipides entre les éléocytes et les ovocytes.

Les éléocytes, par leur aspect morphologique et leur activité de synthèse rappellent en effet les processus sécrétoires se déroulant dans les corps gras des insectes (H.H. HAGEDORN, A.M. FALLON et H. LAUFER 1973).

Toutefois, chez les Néréidiens (P.C. SCHROEDER, 1971 ; A. DHAINAUT, 1966) ou les Térébellidés (K.J. ECKELBARGER, 1975, 1976) aucune étude ultrastructurale n'a pu démontrer le transfert de matériel des éléocytes aux ovocytes.

On pense habituellement que la vitellogenèse se fait de manière autonome. Cependant, A. FISCHER (1979) a montré l'existence d'un antigène semblable à la vitelline dans le liquide cœlomique de femelle mature de *Nereis virens*. Toutefois, travaillant sur *Perinereis cultrifera*, si des résultats montrent une identité immunologique entre liquide cœlomique et ovocyte, nous ne pouvons pas encore affirmer qu'il existe une vitelline (A. DHAINAUT, M. PORCHET et F. FONTAINE, 1980 a et b), comme cela a, par contre, été démontré chez de nombreux invertébrés.

ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES

- I - LEUR SEPARATION SUR COUCHE MINCE ET LEUR IDENTIFICATION
- II - ETUDE QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES DU LIQUIDE COELOMIQUE
- III - ETUDE QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES DES COELOMOCYTES
- IV - ETUDE QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES DES OVOCYTES
- V - CONCLUSION : LES LIPIDES NEUTRES PENDANT LA MATURATION GENITALE DE
PERINEREIS CULTRIFERA
 - . Les monoglycérides et diglycérides
 - . Les stérols
 - . Les acides gras libres
 - . Les triglycérides
 - . Les stérols estérifiés
- VI - LES LIPIDES NEUTRES CHEZ LES INVERTEBRES
- VII - EXISTE-T-IL UN CONTROLE HORMONAL ?
 - 1° - Pour les Coelomocytes
 - 2° - Pour les Ovocytes
 - 3° - Conclusion
- VIII - LE CONTROLE HORMONAL DE L'OVOGENESE CHEZ LES INVERTEBRES

ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES

Après l'extraction des lipides totaux, ceux-ci ont été séparés en deux fractions, comme nous l'avons précisé dans "matériel et méthodes":

- . une fraction acétono-soluble (les "lipides neutres")
- . une fraction qui précipite à l'acétone (que nous appelons "Phospholipides").

Les "lipides neutres" et les "phospholipides", pourront, malgré nos précautions, posséder quelques impuretés, à l'état de traces.

I - LEUR SEPARATION SUR COUCHE MINCE ET LEUR IDENTIFICATION

Les lipides neutres sont ensuite séparés sur couche mince de gel de silice G, auparavant activé une heure à l'étuve et débarrassé des impuretés qu'il peut renfermer, par un passage du système solvant pendant une nuit.

Le système solvant utilisé est le suivant :

Ether de Pétrole / Diéthyl éther / Acide Acétique
80 : 20 : 1 (v/v/v)

Après migration du solvant, les plaques sont séchées au sèche cheveux et les taches sont visualisées aux vapeurs d'iode, à la Rhodamine ou l'acide sulfurique à 5 %.

Nous avons ainsi pu séparer 7 constituants de nos lipides neutres, une tâche subsistant au dépôt. (voir figure C1).

L'utilisation de témoins nous permet d'identifier : Monoglycérides, Diglycérides, stérols, acides gras libres, triglycérides, stérols estérifiés.

D'autre part, après vaporisation d' H_2SO_4 à 5 %, puis chauffage à $100^\circ C.$, la première tache à apparaître, rouge vif, est la tache de stérols. Celle-ci vire ensuite au violet. Les stérols estérifiés apparaissent aussi sous forme de tache rougeâtre, assez rapidement.

Une autre confirmation de la nature de ces deux tâches nous a été donnée par la réaction de Liebermann-Burchard caractéristique de certains stérols (ceux possédant un hydroxyle en 3- β équatorial et une double liaison en 5-6) :

chaque tache est grattée, éluée par du chloroforme-Méthanol (2 : 1). On extrait ainsi les lipides du gel de silice et on obtient le résidu sec.

Le résidu sec est alors dissout dans 1 ml de chloroforme + 0,5 ml d'anhydride acétique.

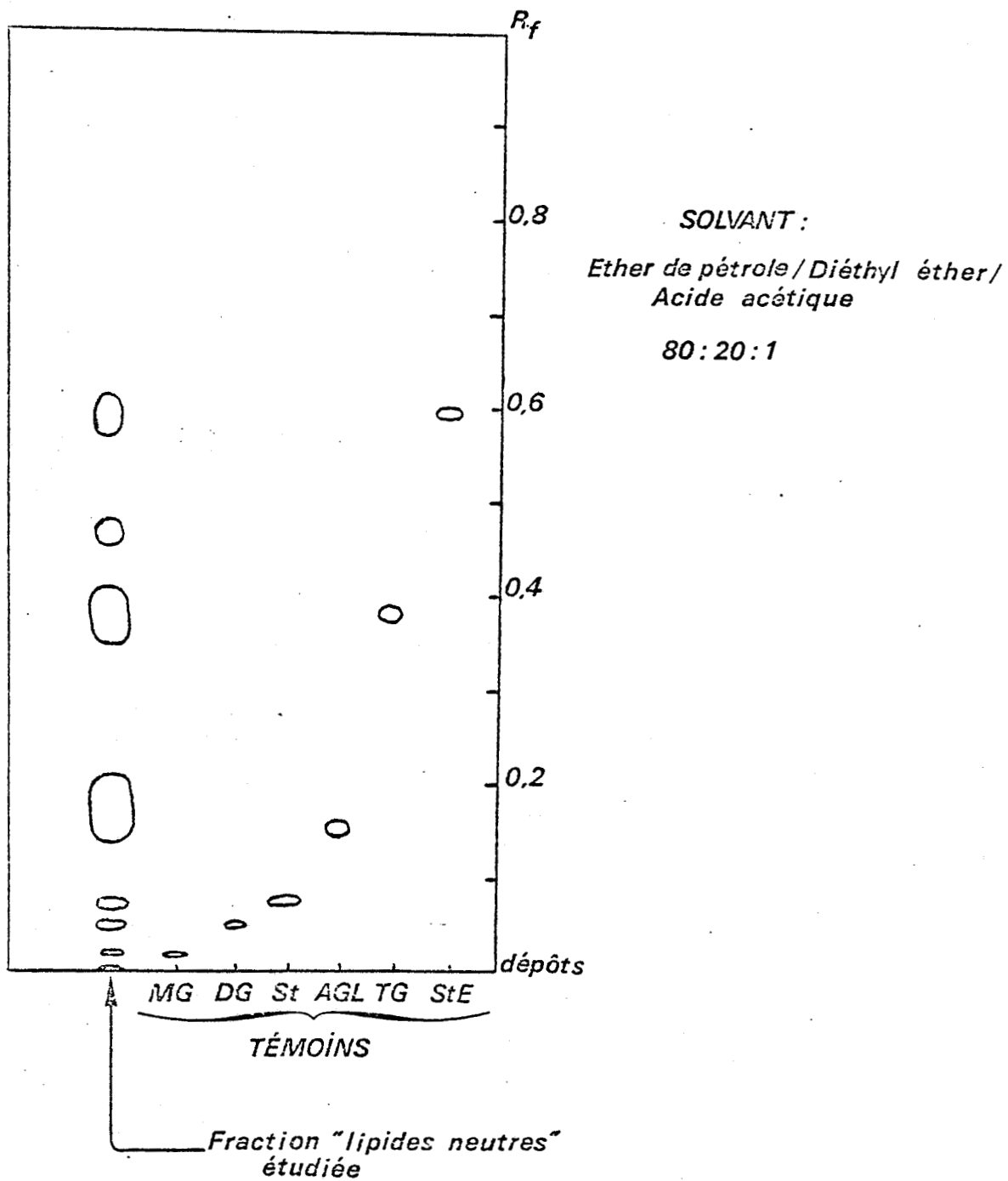


Figure C 1 : Chromatographie sur couche mince des lipides neutres.

On agite, puis on ajoute une goutte d'acide sulfurique concentré.

Nouvelle agitation.

On observe alors une coloration verte, très intense, pour la troisième tache, correspondant bien aux stérols. Pour la dernière tache des stérols estérifiés nous avons aussi une coloration verte, bien que moins intense que la précédente.

Les solutions provenant des autres taches ne donnent pas de coloration verte.

L'avant dernière tache n'a pas été identifiée.

Après les avoir identifiés, nous avons fait des chromatographies sur couche mince préparatives, afin de les doser selon J.S. AMENTA (voir "Matériel et Méthodes"). Le dépôt est disposé en trainée afin d'accroître la quantité de matériel à doser.

Les résultats de nos dosages sont pour chaque échantillon de lipides neutres exprimés en pourcentage. Ils sont présentés dans les tableaux C1, C2, et C3. Les résultats des Mono. et Diglycérides ne sont pas distingués, puisque les deux taches correspondantes sur nos chromatogrammes ne sont pas toujours bien discernables.

II - ETUDE QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES DU LIQUIDE COELOMIQUE.

Le tableau C1 nous présente les résultats de nos dosages pour les lipides neutres du liquide coelomique.

Tableau C1 : L'importance des différentes classes de lipides neutres du Liquide coelomique.

Diamètre ovocytaire (en μ)

	100	115	140	155	170	180	225	230
MG + DG	30	28	13	13	14	13	14	10
St	4	1	10	15	14	9	25	24
AGL	57	32	20	31	24	21	18	11
TG	1	1	11	10	18	14	4	5
SI	1	1	17	6	3	11	1	20
St.E	7	37	29	25	27	32	38	30

Nous observons tout de suite que ce sont Monoglycérides, Diglycérides, Acides gras libres et stérois estérifiés qui constituent l'essentiel des lipides neutres du liquide cœlomique des individus jeunes; stérois et triglycérides prennent ensuite de l'importance.

Les résultats du précédent tableau sont présentés dans les figures C2 à C7.

Figure C2 : Mono et Diglycérides diminuent entre 100 et 140 μ . De 30 % des lipides neutres ils n'en représentent plus que 15 %. Ils restent ensuite à un niveau stable.

Figure C3 : les stérois restent à l'état de traces chez les animaux jeunes. A 130 μ leur teneur commence à croître, pour représenter 25 % des lipides neutres lors de la maturité génitale.

Figure C4 : les acides gras libres représentent 60 % des lipides neutres chez les animaux d'un diamètre ovocytaire de 100 μ . Ils diminuent d'importance alors que s'effectue l'ovogenèse. La chute est assez brusque jusque 130 μ , plus lente ensuite. A maturité génitale, ils ne représentent plus que 15 % des lipides neutres du liquide cœlomique.

Figure C5 : jusque 130 μ les Triglycérides ne sont qu'à l'état de traces. Leur importance ira en croissant ensuite, jusque 190 μ , où ils représentent 20 % des lipides neutres du liquide cœlomique. Ils diminuent ensuite, et à 230 μ , ils ne représentent plus que 4 à 5 % des lipides neutres.

Figure C6 : la tache représentée par des substances non identifiées sur nos couches minces, subit une évolution assez semblable à celle de nos triglycérides (fig. C5). Cependant, à l'état de traces jusque 120 μ , elles s'accroissent plus précocement, à 140 μ , et diminuent ensuite. Une dernière valeur nous donne toutefois un taux important à 230 μ , alors que peu auparavant elles n'étaient plus qu'à l'état de traces.

Figure C7 : les stérois estérifiés sont d'abord peu importants à 100 μ , mais augmentent rapidement. A 110 μ , ils constituent 25 à 35 % des lipides neutres et se maintiennent à ce niveau durant toute l'ovogenèse.

Liquide Coelomique

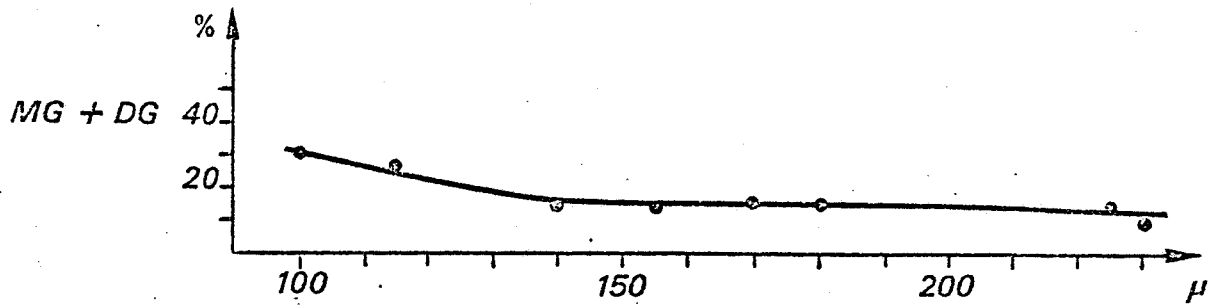


Figure C 2 : Evolution de la teneur en Monoglycérides + Diglycérides dans le liquide coelomique

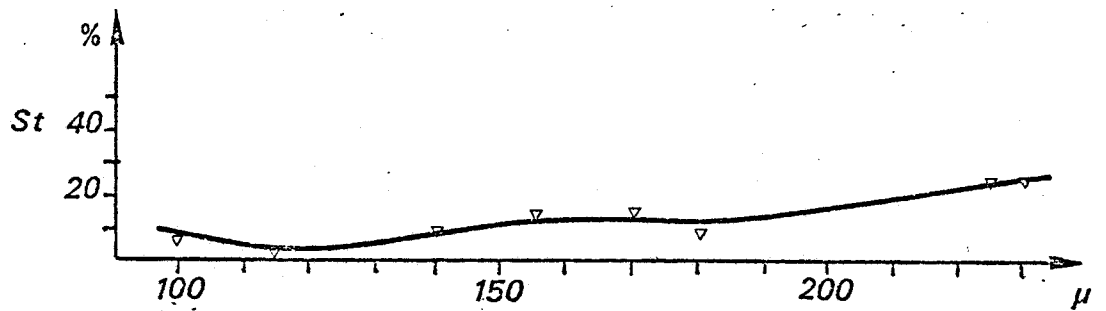


Figure C 3 : Evolution de la teneur en Stérols dans le liquide coelomique.

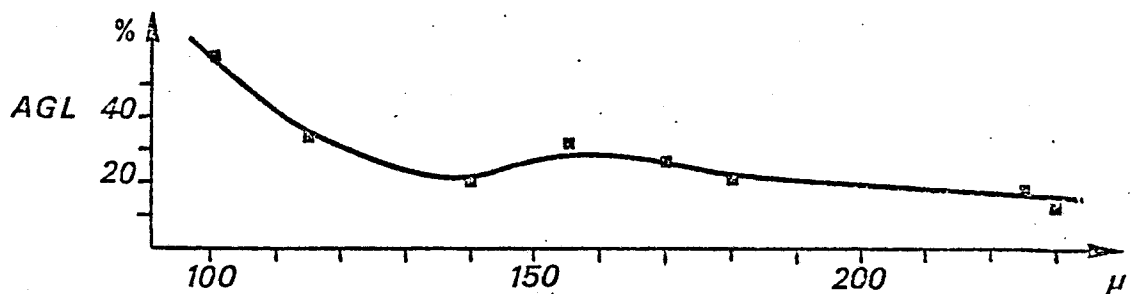


Figure C 4 : Evolution de la teneur en Acides Gras Libres dans le liquide coelomique.



Liquide Coelomique

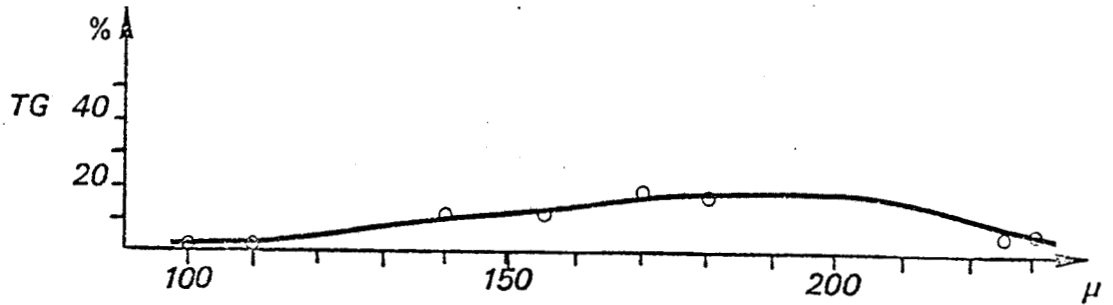


Figure C 5 : Evolution de la teneur en Triglycérides dans le liquide coelomique.

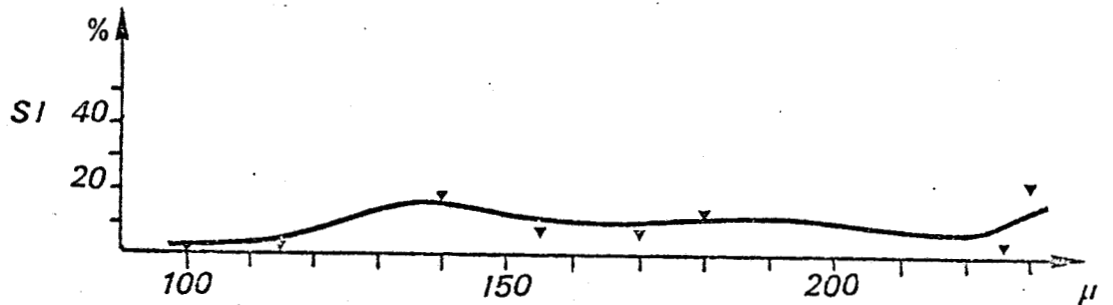


Figure C 6 : Evolution de la tâche non identifiée des lipides neutres du liquide coelomique.

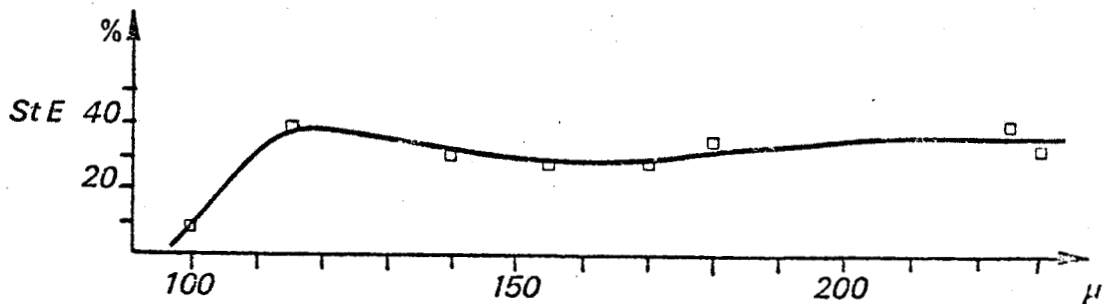


Figure C 7 : Evolution de la teneur en Stérols Estérifiés dans le liquide coelomique.

Conclusion : le liquide cœlomique se caractérise ainsi par une diminution des Mono + Diglycérides, ainsi que des Acides gras libres. Il s'enrichit par contre en stérols et triglycérides. Les stérols estérifiés constituent rapidement une fraction constante et importante (30 % des lipides neutres) du liquide cœlomique.

III - ETUDE QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES DES COELOMOCYTES.

Les résultats de nos dosages sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau C2 : L'importance des différentes classes de lipides neutres des Cœlomocytes.

Diamètres ovocytaires (en μ)

	100	115	155	180	195	230
MG + DG	9	5	3	7	0,5	4,5
St	1	5	10,5	16	2,5	22,5
AGL	24	13	23,5	31	22,5	13
TG	18	41	40	27	66	55
SI	5	5	14,5	6	8	4
St.E	43	31	8,5	13	0,5	1

Acides gras libres et Triglycérides sont ici particulièrement importants. Stérols et Stérols estérifiés ne deviennent importants qu'à certains stades. Nos résultats sont exposés dans les figures C8 à C13, qui permettent une meilleure visualisation de l'évolution de ces lipides neutres.

Figure C8 : Monoglycérides et Diglycérides restent à des taux faibles et sensiblement constants ($5 \pm 4\%$, tout au long de l'ovogenèse).

Figure C9 : les stérols augmentent de façon constante dans les coelomocytes = à l'état de traces à 100μ , ils constituent plus de 20 % des lipides neutres à 230μ . Leur taux est ainsi pratiquement multiplié par 20.

Figure C10 : Il y a une teneur assez élevée en acidesgras libres à 100μ . Mais à 115μ ils ne représentent plus que 13 % des lipides neutres des coelomocytes. Leur taux augmente ensuite et va plus que doubler (entre 180 et 190μ ils constituent 25 à 30 % des lipides neutres).

Figure C11 : Nos résultats pour les Triglycérides sont assez variables. Ils constituent néanmoins toujours une part importante des lipides neutres des coelomocytes.

De 20 % des lipides neutres à 100μ , leur taux va rapidement plus que doubler (ils représentent 40 % des lipides neutres entre 110 à 160μ).

Coelomocytes

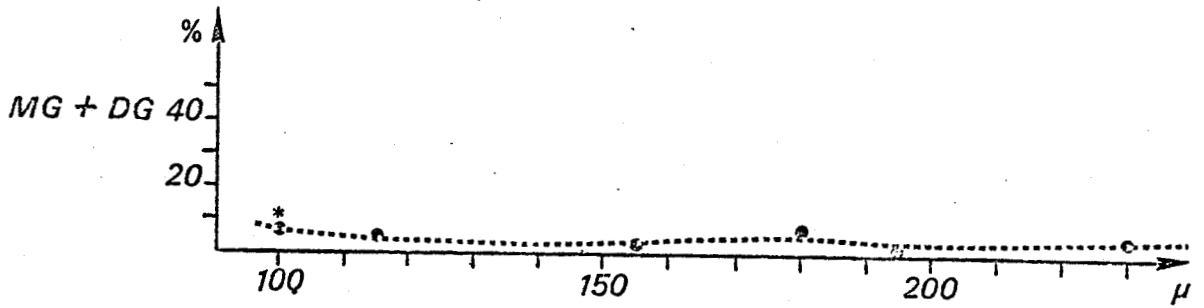


Figure C 8 : Evolution de la teneur en Monoglycérides + Diglycérides dans les Coelomocytes.

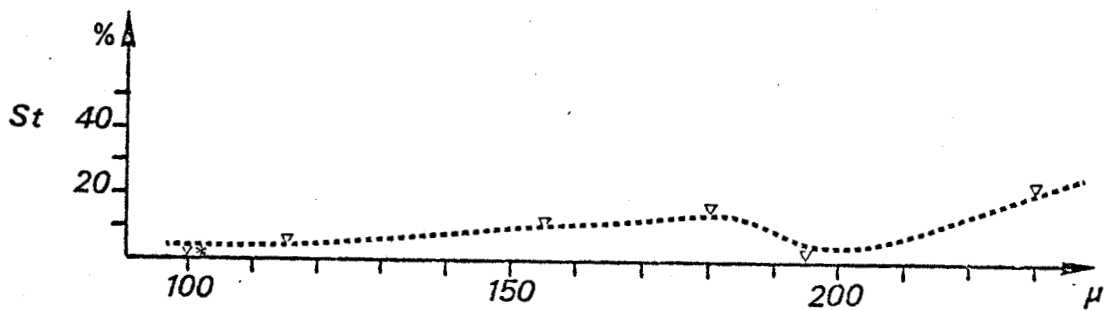


Figure C 9 : Evolution de la teneur en Stérols dans les Coelomocytes

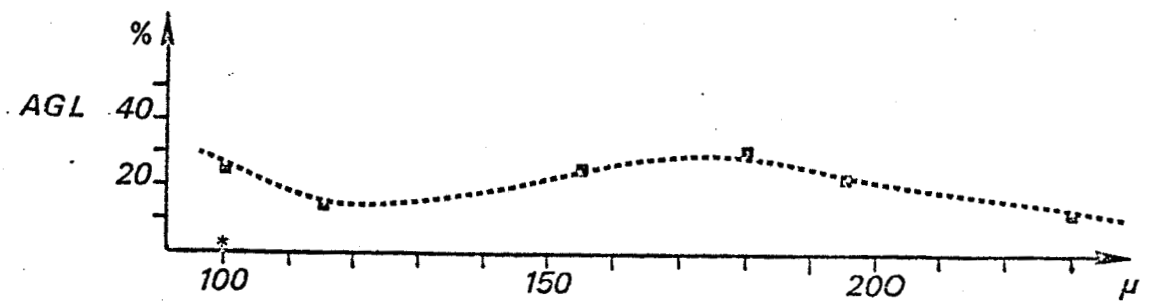


Figure C10 : Evolution de la teneur en Acides Gras Libres dans les Coelomocytes.



* Teneur en conditions anormales chez des vers d'un diamètre ovocytaire de 100 μ

Cœlomocytes

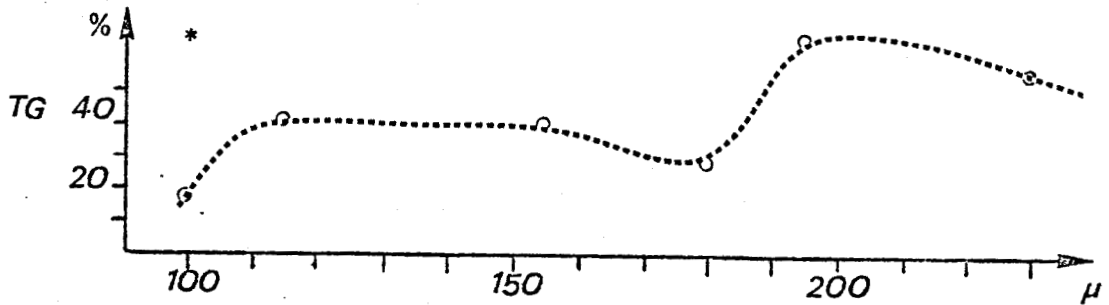


Figure C11 : Evolution de la teneur en Triglycérides dans les Cœlomocytes.

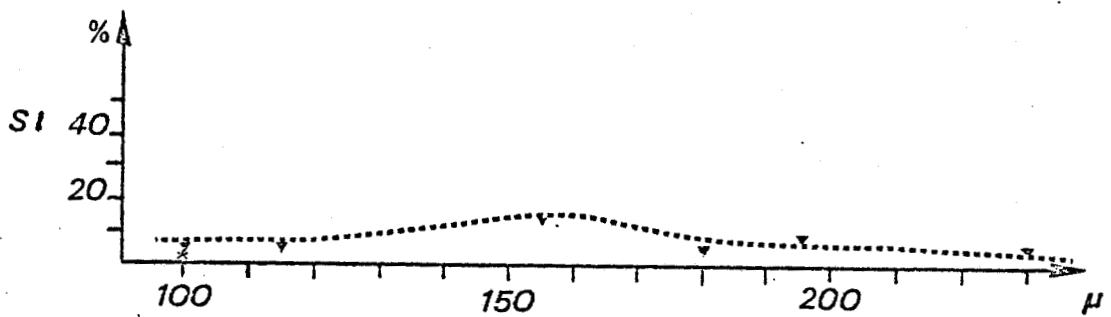


Figure C12 : Evolution de la tache non identifiée des lipides neutres des Cœlomocytes.

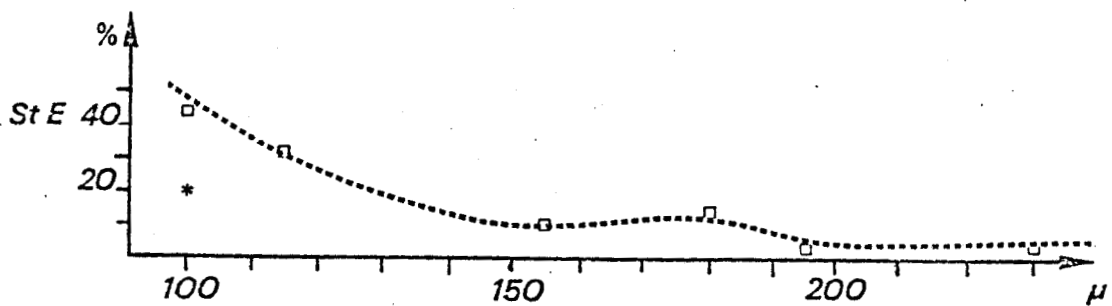


Figure C13 : Evolution de la teneur en Stérols Estérifiés dans les Cœlomocytes.



* Teneur en conditions anormales chez des vers d'un diamètre ovocytaire de 100 μ

Leur importance chute ensuite légèrement vers 170 - 180 μ , avant d'augmenter à nouveau (vers 200 μ ils représentent 65 % des lipides neutres). A la chute du taux de TG, correspond une augmentation de la teneur en AGL (voir figure C10).

En gros, les Triglycérides voient ainsi leur teneur passer de 15 % des lipides neutres vers 100 μ , à environ 60 % à 230 μ . Leur importance a donc quadruplée au cours de l'ovogenèse.

Figure C12 : Les substances de la tâche non identifiée restent à des taux faibles (environ 5 % des lipides neutres, en début et en fin d'ovogenèse). Les taux semblent plus élevés entre 140 et 170 μ .

Figure C13 : Les Stérols estérifiés sont à des taux élevés dans les coelomocytes, en début d'ovogenèse (environ 45 % des lipides neutres à 100 μ). Leur taux diminue ensuite, reste stable à 10 % des lipides neutres entre 150 et 180 μ , puis chute à nouveau. A l'approche de la maturité génitale ils ne sont plus qu'à l'état de traces;

Observons qu'à la chute des stérols estérifiés dans les coelomocytes, correspond une hausse des stérols libres.

Conclusion : dans les coelomocytes, les Stérols et Triglycérides sont les éléments qui présentent une augmentation alors que s'accomplit la maturation des gamètes. Au contraire, les stérols estérifiés diminuent. Les acides gras libres et la substance inconnue présentent une évolution comparable, avec augmentation en début d'ovogenèse, puis diminution à l'approche de la maturité génitale. Monoglycérides et Diglycérides présentent peu de variations et restent à des taux faibles.

IV - ETUDE QUANTITATIVE DES LIPIDES NEUTRES DES OVOCYTES.

Tableau C3 : L'importance des différentes classes de lipides neutres dans les Ovocytes.

Diamètres ovocytaires (en μ)

	100	115	145	155	180	195	230
MG + DG	3	1,5	4,5	7	8	0,5	2
St	1	3,5	7,5	10	12	9	5
AGL	2	1	4	6	19	18	47
TG	71,5	63,5	65	59,5	42	50,5	34
SI	7,5	18,5	7	10,5	12	12	8,5
St.E	15	12	12	7	7	10	3,5

Dans les ovocytes ce sont les Triglycérides qui prédominent largement. Les variations des différentes classes de lipides neutres au cours de l'ovogenèse sont reprises sur les figures C14 à C19.

Figure C14 : à l'état de traces au début de l'ovogenèse, Monoglycérides et Diglycérides augmentent ensuite régulièrement, pour constituer 8 % des lipides neutres à 180 μ . Leur taux chute ensuite rapidement.

Figure C15 : les Stérols à peu près inexistants à 100 μ , augmentent d'importance ensuite, pour représenter 12 % des lipides neutres dans un ovocyte de 180 μ . La teneur en stérols diminue ensuite légèrement à l'approche de la maturité génitale (ils constituent 5 % des lipides neutres à 230 μ).

Figure C16 : les acides gras libres des ovocytes présentent des variations de forte amplitude au cours de l'ovogenèse. A l'état de traces à 100 μ , ils constituent 50 % des lipides neutres à 230 μ .



Ovocytes

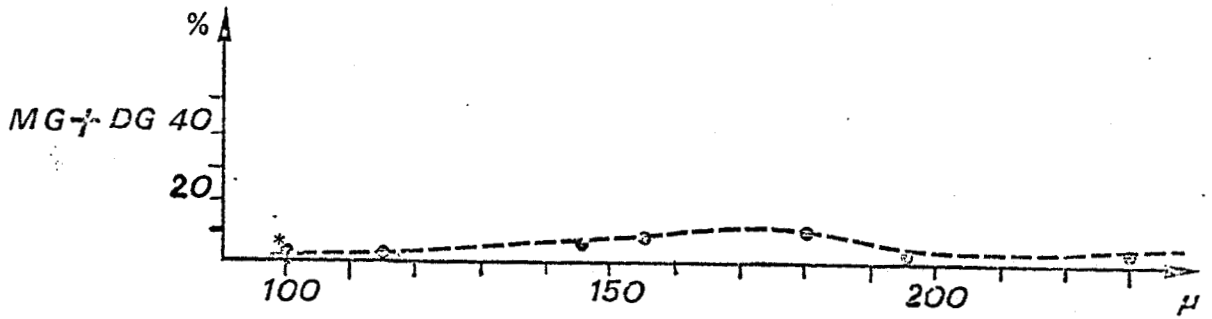


Figure C14 : Evolution de la teneur en Monoglycérides + Diglycérides dans les Ovocytes.

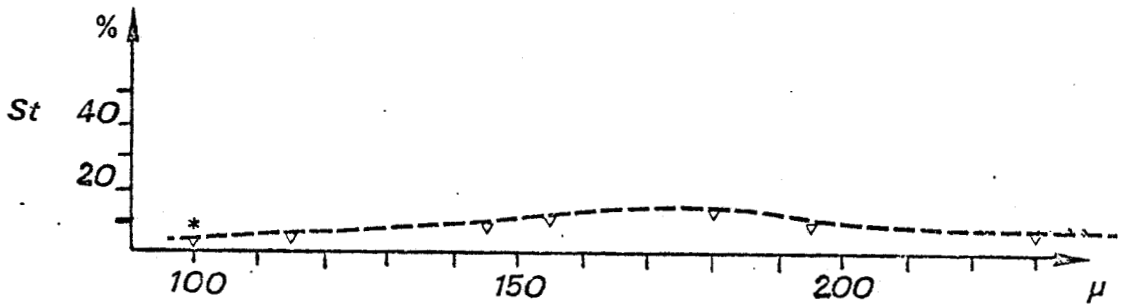


Figure C15 : Evolution de la teneur en Stérols dans les Ovocytes.

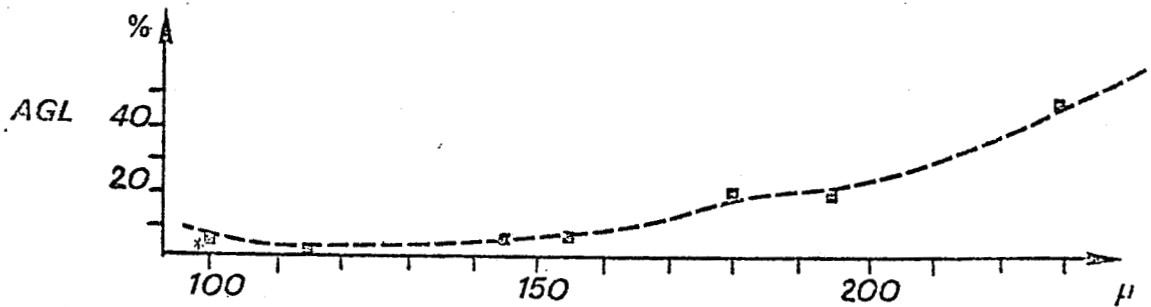


Figure C16 : Evolution de la teneur en Acides Gras Libres dans les Ovocytes.



* Teneur en conditions anormales chez des vers d'un diamètre ovocytaire de 100 μ

Figure C17 : les triglycérides des ovocytes ne présentent pas de variations aussi importantes que les acides gras libres. Leur évolution se fait aussi en sens inverse.

A 100 μ , ils constituent 70 % des lipides neutres, alors qu'à 230 μ ils n'en constituent plus que 35 %, leur importance diminuant ainsi de moitié alors que l'ovocyte accomplit sa maturation.

Figure C18 : la teneur en lipides neutres de la tâche non identifiée sur couche mince ne présente pas de variations importantes (elle constitue de façon constante 7 à 12 % des lipides neutres).

Figure C19 : Les Stérols estérifiés diminuent d'importance pendant la maturation des gamètes = de 15 % des lipides neutres à 100 μ , ils n'en constituent plus que 3 % à 230 μ . Leur diminution est régulière tout au cours de l'ovogénèse.

Conclusion : les variations les plus considérables dans la fraction "lipides neutres" des ovocytes, sont celles des triglycérides et des acides gras libres, qui évoluent en sens inverse (les premiers diminuant alors que les seconds augmentent). Dans le gamète femelle en cours de maturation, les stérols estérifiés diminuent aussi d'importance.

Les monoglycérides + diglycérides et les stérols présentent des variations semblables : en augmentation au cours de l'ovogénèse, leur taux chute à l'approche de la maturité génitale, à partir de 180 μ .

La substance encore non identifiée varie peu.

Remarquons que les Acides gras libres augmentent de façon importante dans les ovocytes, alors que les triglycérides diminuent, ainsi que les monoglycérides et diglycérides à partir de 180 μ . Les acides gras libres proviennent sans doute de l'hydrolyse des glycérides.

V - CONCLUSION : LES LIPIDES NEUTRES PENDANT LA MATURATION GENITALE DE PERINEREIS CULTRIFERA.

Nous venons d'étudier l'évolution des différents lipides neutres dans le liquide coelomique, les coelomocytes puis les ovocytes. Comparons maintenant l'évolution de la même classe de lipides neutres dans les trois fractions du milieu intérieur de nos vers.

Ovocytes

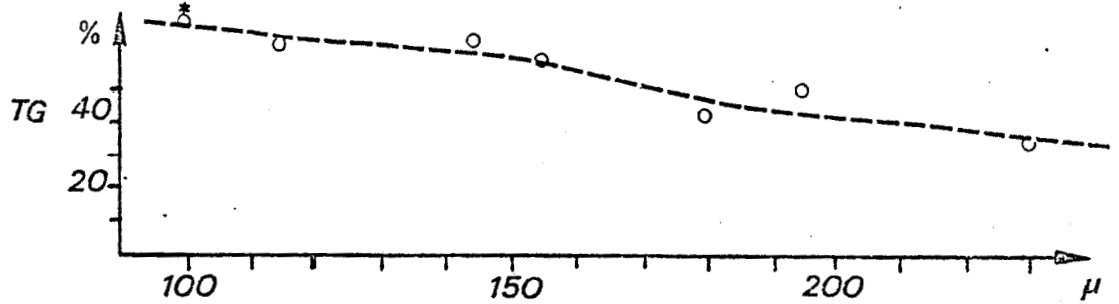


Figure C17 : Evolution de la teneur en Triglycérides dans les Ovocytes.

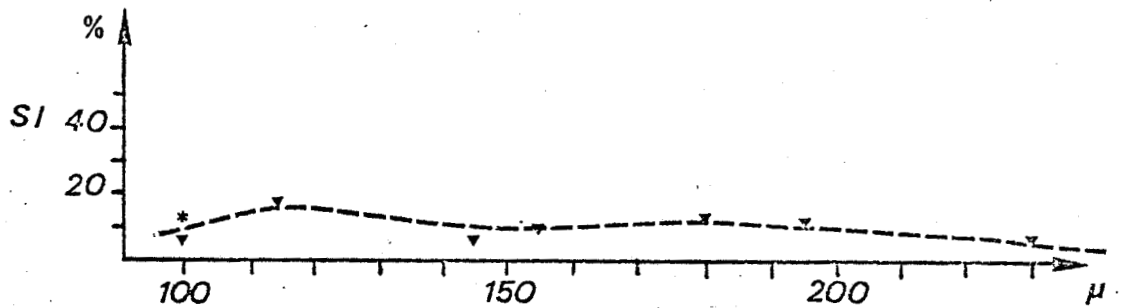


Figure C18 : Evolution de la teneur en lipides neutres non identifiés dans les Ovocytes.

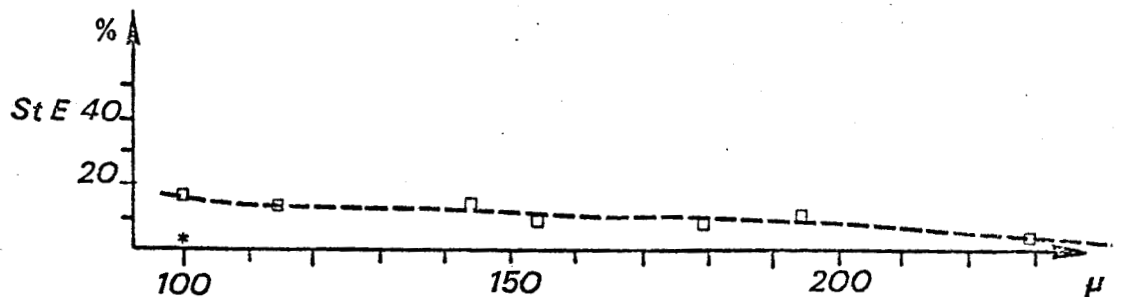


Figure C19 : Evolution de la teneur en Stérols Estérifiés dans les Ovocytes.



* Teneur en conditions anormales chez des vers d'un diamètre ovocyttaire de 100 μ

. Les monoglycérides (MG) et diglycérides (DG) sont surtout présents de façon notable dans le liquide cœlomique où ils représentent 30 % des lipides neutres chez les jeunes individus, pour n'en représenter que 15 % à partir de 140 μ , jusqu'à la maturité génitale (fig. C2).

Ils sont peu importants dans les cœlomocytes et dans les ovocytes. (fig. C8 et C14).

Remarquons toutefois que dans les ovocytes ils augmentent légèrement jusque 180 μ , pour diminuer ensuite.

. Les stérols augmentent de façon parallèle dans le liquide cœlomique et les cœlomocytes. Ils apparaissent cependant plus précocement dans les cœlomocytes. L'augmentation est d'autre part régulière dans ces deux constituants du milieu intérieur de *P. cultrifera*. (fig. C3 et C9).

A une teneur moins importante dans les ovocytes, ils augmentent aussi jusque 180 μ , puis leur taux chute ensuite. (fig. C15).

. Les acides gras libres (AGL) des cœlomocytes (fig. C10) présentent plusieurs fluctuations : en augmentation à partir de 150 μ , ils diminuent à partir de 180 μ .

Dans le liquide cœlomique et les ovocytes, les variations sont plus régulières, mais se font en sens inverse : ils diminuent dans le liquide cœlomique (mais restent néanmoins à un taux assez élevé), et augmentent dans les ovocytes après avoir été à peu près inexistantes chez les individus jeunes. (fig. C4 et C16).

. Les Triglycérides (TG) présentent de grandes variations (mais en sens inverse), dans les ovocytes et les cœlomocytes.

Leur diminution d'importance est régulière dans les ovocytes (fig. C17). Dans les cœlomocytes, par contre, ils augmentent, en présentant cependant une chute entre 150 et 170 μ (fig. C11).

Remarquons que les variations des taux de TG dans les cœlomocytes, comme dans les ovocytes, sont "compensées" par des variations inverses des taux d'AGL.

Dans le liquide cœlomique les TG augmentent, comme dans les cœlomocytes, tout en restant à un taux beaucoup plus faible. D'autre part, ces TG du liquide cœlomique chutent à l'approche de la maturité génitale.

. La tâche obtenue sur la couche mince de gel de silice et non identifiée, subit peu de variations quelque soit la fraction étudiée et il nous

est difficile d'en faire une interprétation.

. Les stérols estérifiés diminuent rapidement dans les cœlomocytes alors qu'après une hausse brutale et précoce dans le liquide cœlomique ils ne présenteront plus ensuite de variations (fig. C13 et C7). On observe que dans le liquide cœlomique, les stérols estérifiés constituent une part importante des lipides neutres. Dans les cœlomocytes, ils ne sont importants qu'aux stades jeunes (100 à 110 μ).

Les stérols estérifiés restent à un taux faible dans les ovocytes et diminuent au cours de l'ovogenèse. (fig. C19).

L'évolution de la même classe de lipides neutres dans les trois fractions du milieu intérieur de nos vers est reportée sur les figures C 20 et C 21 (qui constituent une synthèse des résultats exposés sur les figures C 2 à C 19).



D O S A G E S

COELOMOCYTES

LIQUIDE COELOMIQUE

OVOCYTES

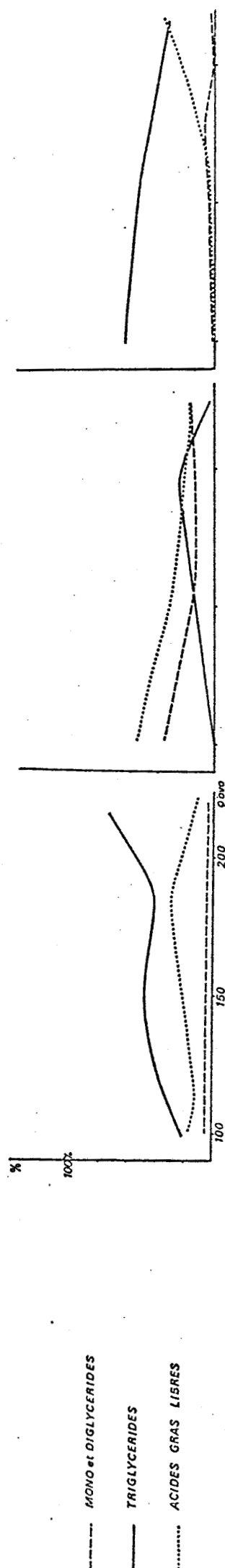


Figure C 20 : Evolution des glycérides et acides gras libres dans les trois fractions du milieu intérieur de *P. cultrifera*

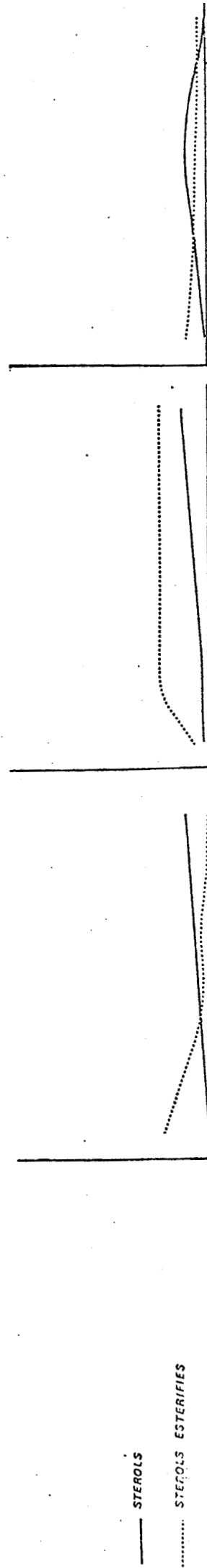


Figure C 21 : Evolution des stérols et stérols estérifiés dans les trois fractions du milieu intérieur de *P. cultrifera*



VI - LES LIPIDES NEUTRES CHEZ LES INVERTEBRES.

Dans cette étude de l'évolution du taux des différentes classes de lipides neutres, nous avons pu faire des observations intéressantes.

Il est maintenant utile de voir ce que l'on sait chez d'autres Invertébrés : cependant, nous ne trouvons encore que bien peu d'études comparables à la nôtre, c'est-à-dire une recherche des variations entre les lipides neutres de différentes fractions du milieu intérieur, et leur lien possible avec l'ovogenèse.

Ce sont les INSECTES qui sont bien sûr, là encore, les plus étudiés. Les lipides neutres constituent d'ailleurs une part importante des lipides totaux de certaines cellules. Ainsi, 13,9 % du poids frais de l'œuf d'Aphid est de nature lipidique, et 85 % de ces lipides sont des lipides neutres. F.E. STRONG, 1963 a et b, 1964). L.I. GILBERT (1967); nous apprend quant à lui que 90 à 92 % des lipides des œufs de *L. maderae* sont des lipides neutres.

Si les lipides neutres sont donc quantitativement importants, notamment dans l'œuf, voyons chez les Insectes quelle est la nature de ces lipides neutres, leur évolution au cours de la vie de l'animal (et particulièrement au cours de l'ovogenèse) et leur rôle que différents auteurs peuvent leur attribuer.

Rappelons ce qui a été exposé au chapitre précédent : l'œuf d'Insecte s'il s'est enrichi en lipides au cours de l'ovogenèse, cela s'est fait en grande partie grâce à une lipoprotéine libérée dans l'hémolymphe, et qui est captée par l'ovocyte en maturation (cette lipoprotéine, ou vitellogénine, entrant en grande partie dans la constitution du vitellus, comme l'ont prouvé de nombreux auteurs).

Les lipides neutres des œufs de *L. maderae* (L.I. GILBERT, 1967) sont : 90 % de TG, 2 à 3 % d'AGL, 1 à 2 % de St., et environ 2 % de St. E. Le taux important de TG se retrouve dans les ovocytes de notre Annélide, *P. cultrifera*.

L'importance des St. E. dans les œufs d'Insectes est assez variable selon les espèces. Selon B. DELAGE (1969), chez la mouche domestique on a trouvé que 41 % des stérols d'œufs sont estérifiés, de même que 36 % du cholestérol est estérifié dans les œufs du papillon *Hyalophora cecropia*. Ces valeurs sont nettement supérieures à ce que nous avons trouvé chez *P. cultrifera*.

E.C. MUNDALL et J.H. LAW (1979) chez *Manduca sexta* pensent que la vitellogénine des ovocytes et son précurseur de l'hémolymphe ont la même constitution en lipides. Cependant, ces auteurs n'ont pas quantifié les lipides neutres, mais seulement apprécié leur importance relative, en exposant ainsi

leurs résultats :

	Vitellus de l'œuf	Vitellogénine de l'hémolymphe
TG	+	+
DG	++	+ +
AGL	+	+
Cholestérol	+	+

Chez *H. Gloveri*, K. K. THOMAS et L.I. GILBERT (1969) ne trouvent pas non plus de changement notable dans la constitution en lipides. H. CHINO et coll. (1977), ont montré qu'il y avait plus de TG et moins de DG dans la vitellogénine de l'œuf que dans celle de l'hémolymphe de *P. Cynthia*.

La richesse de l'hémolymphe en DG, par rapport aux autres tissus, a d'ailleurs été observée par de nombreux auteurs. Les lipides neutres de l'hémolymphe d'Insecte sont presque essentiellement des DG, alors que dans le plasma des Mammifères, ce sont les TG qui prédominent. H. CHINO et L.I. GILBERT (1965) trouvent ainsi que dans l'hémolymphe pupal de *cecropia*, presque 75 % des lipides neutres sont des DG. Dans le corps gras, cependant, 98 % des lipides neutres sont des TG.

Ces dernières observations sont à rapprocher de nos résultats obtenus chez *P. cultrifera*. Les Coelomocytes, que beaucoup d'auteurs assimilent au Corps Gras des Insectes (et dont nous faisons en 1979 un important lieu de synthèse pour les lipides), sont de la même façon particulièrement riches en TG (jusqu'à 60 % des lipides neutres, alors que l'on est en fin d'ovogenèse). Les Coelomocytes sont par contre, comme les corps gras d'Insectes, pauvres en MG + DG (5 à 8 % des lipides neutres).

Enfin, si dans l'hémolymphe d'Insectes, il y a beaucoup de DG, dans le liquide coelomique de *P. cultrifera* on a fait une observation semblable : MG + DG représentent environ 20 % des lipides neutres du liquide coelomique, alors que dans ovocytes et coelomocytes ils n'en représentent pas 8 %.

Outre les Glycérides, voyons maintenant ce que l'on sait sur les Stérols et Stérols Estérifiés d'Insectes.

Dans les lipoprotéines du sérum de Mammifère (tels que Chylomicrons ou "Low Density Lipoproteins"), le cholestérol existe principalement sous forme estérifiée (L.A. HILLYARD et Coll., 1955) = 60 à 80 % du cholestérol présent est sous forme estérifiée.

Les travaux de CHINO et Coll. (1968) montrent par contre que tout le cholestérol des deux "Diglyceride Carrying Lipoproteins" de *Hyalophora cecropia* est libre et non estérifié. D'autres travaux montrent des résultats identiques = cela n'est pas surprenant cependant, puisque l'on sait que le cholestérol est principalement sous forme libre dans les tissus de nombreux Insectes.

Des travaux sur l'hémolymphe montrent à la fois des stérols libres et estérifiés dans l'hémolymphe de la blatte *Periplaneta Americana* (R.GH. DOWNER et H. CHINO, 1979, qui montrent cependant que 80 à 82 % du cholestérol ne s'estérise pas), du criquet *Acheta domesticus* (C.M. WANG et R.L. PATTON, 1969), Cependant, dans ces travaux, on ne distingue pas les constituants plasmatique et cellulaire de l'hémolymphe. Ainsi, on ne peut savoir dans ces derniers exemples, si les stérols sont transportés sous forme estérifiée dans le plasma de ces Insectes.

Il est d'autre part intéressant de noter qu'il n'existe pas de voie de synthèse à partir de l'acétate vers le cholestérol chez les Insectes, et donc que tous les stérols sont d'origine alimentaire. Ainsi, les lipoprotéines d'insectes pourraient-elles fonctionner comme transporteurs de cholestérol parmi les tissus tels que le Corps Gras et le Tube Digestif (hypothèse de CHINO et coll., 1968, 1969).

H. CHINO et coll. (1968) rapportent d'ailleurs un résultat intéressant à ce sujet : des larves de *Cynthia* sont nourries avec des feuilles sur lesquelles du cholestérol -C¹⁴ a été appliqué = l'analyse de leur hémolymphe après pupation montre de la radioactivité dans les lipoprotéines.

On voit donc, encore ici, une grande différence dans la nature des stérols de Mammifères et d'Insectes = surtout estérifiés dans les lipoprotéines du sérum de Mammifère, surtout libres dans les lipoprotéines de l'hémolymphe d'Insecte.

Dans le liquide coelomique de *P. cultrifera*, nos résultats montrent une prédominance des stérols estérifiés (30 à 40 % des lipides neutres). Les stérols libres ne deviennent importants (jusqu'à 20 % des lipides neutres) qu'à l'approche de la maturité génitale. Ces résultats sont donc différents de ce que l'on sait des mammifères où les stérols estérifiés dominent très largement, mais on n'observe pas la prédominance des stérols sous forme libre qui a été montrée chez certains Insectes.

A part les INSECTES, les travaux sur la nature des lipides neutres des Invertébrés restent rares.

Chez les CRUSTACES, on sait chez *Orchestia Gammarella* que la vitellogénine apparaît dans l'hémolymphe, et qu'alors débute la vitellogénèse secondaire caractérisée par une accumulation très importante de réserves lipidiques constituées de triglycérides (H. CHARNIAUX-COTTON, 1978). Il y a augmentation du nombre et de la taille des globules lipidiques contenant ces triglycérides. Cette vitellogénèse secondaire est principalement exogène, mais est aussi endogène.

R.F. LEE et P.L. PUPPIONE (1978) montrent que la plupart des lipides de l'hémolymphe du homard *Panulirus interruptus* sont associés avec une lipoprotéine de haut poids moléculaire. Les lipides de cette lipoprotéine sont pour 4 % et 3 % respectivement des Stérols et des Triglycérides (le restant étant des Phospholipides pour l'essentiel).

Chez les NEMATODES = P.I. ITTYCHERIAH (1977), chez *Romanomermis culicivora* qui accumule des produits de stockage dans le trophosome, montre qu'il s'agit principalement de stérols (sous forme libre et estérifiée) mais la signification fonctionnelle de telles quantités de stéroïdes reste énigmatique.

Enfin, à propos des ANNELIDES, J. Mc LAUGHLIN (1971) a étudié l'oligochète *Eisenia foetida* : les lipides neutres, représentant 80 à 85 % de l'extrait lipidique total, sont constitués de glycérides, AGL et stérols. Les stérols libres prédominent (15 % des L.N.). Il y a aussi 2 à 3 % de stérols estérifiés. Chez *Lumbricus terrestris*, J. CERBULIS et M.W. TAYLOR (1969), trouvent aussi des taux élevés en stérols (16 % du total des lipides neutres).

Pour ce qui est des Polychètes, C.G. WILBER et W.M. BAYORS (1947) ont trouvé des taux élevés en Acides Gras Libres. L'étude de J.Mc. LAUGHLIN (1971) montrait par contre chez l'Oligochète *Eisenia foetida* un taux faible d'AGL, mais un taux élevé de MG.

A propos des lipoprotéines d'Invertébrés, notons que si elles jouent un rôle important lors de l'ovogénèse des Insectes, on a pu démontrer qu'elles intervenaient aussi au moment du vol.

A.R. JUTSUM et G.J. GOLDSWORTHY (1976) ont aussi montré qu'une séquence d'événements métaboliques se produisait au début de l'activité du vol du criquet migrateur = la concentration en tréhalose de l'hémolymphe chute, alors que presque simultanément le taux de DG de l'hémolymphe est élevé et qu'augmente le turnover des lipides (D.J. VAN DER HORST, et coll., 1979). Pour le transport à travers l'hémolymphe vers les muscles du vol, ces DG sont associés à des lipoprotéines.

Au moment de la dispersion des gamètes chez les Polychètes, l'activité intense qui en résulte est sans doute tributaire d'un apport énergétique aux muscles, cet apport pouvant se faire grâce au transport de lipides à travers le liquide coelomique vers les sites d'utilisation.

Enfin, chez nos Annélides, nous avons séparé les stérois libres et estérifiés sur couche mince. A partir de là, une étude intéressante pourrait être entreprise. Les stérois d'Annélides sont encore peu étudiés et quand on sait l'importance des stéroïdes chez les Insectes (beaucoup d'hormones ou de phéromones sont des stéroïdes), c'est une lacune qu'il serait utile de combler.

VII - EXISTE-T-IL UN CONTROLE HORMONAL ?

Nous avons décérébré un lot de vers (diamètre ovocytaire : environ 100 μ), que nous avons ainsi laissé en conditions anhormonales pendant deux semaines.

Après séparation et dosage des différentes classes de lipides neutres selon les techniques précédemment indiquées, nous obtenons les résultats suivants pour les coelomocytes et les ovocytes :

Tableau C4 : L'importance des différentes classes de lipides neutres chez des vers d'un diamètre ovocytaire de 100 μ , mis en conditions anhormonales.

	MG + DG	St.	AGL	TG	S.i.	St.E.	
Coelomocytes	10	1	0,5	67,5	1	20	100 %
Ovocytes	0,5	7,5	0,5	77	14	0,5	100 %

Les résultats de ce tableau ont été reportés sur les figures C8 à C13 pour les Coelomocytes, et sur les figures C14 à C19 pour les Ovocytes.

1°) Pour les Coelomocytes

- Les *Monoglycérides + Diglycérides* et les stérols des coelomocytes se trouvent ici aux mêmes concentrations que pour des individus de même diamètre ovocytaire, restés intacts.
- Par contre, le taux d'*Acides gras libres* chute fortement. Notons, qu'en fin d'ovogenèse, alors que nous sommes pratiquement en conditions anhormonales, le taux d'acides gras libres est faible.
- D'autre part, les *stérols estérifiés* diminuent eux aussi fortement (comme ils diminuent au cours de l'ovogenèse alors que l'effet de l'hormone est moindre).
- Enfin, les *Triglycérides* se trouvent quant à eux à un taux aussi élevé que dans les coelomocytes d'animaux d'un diamètre ovocytaire de 200 μ .

Ainsi tout se passe comme si en milieu an hormonal, la libération d'acides gras par hydrolyse des triglycérides ne pouvait se faire et/ou que l'accumulation de triglycérides se trouvait facilitée.

Seule une partie des stérols estérifiés libèrent leurs acides gras.

2°) Pour les Ovocytes

Comme pour les coelomocytes = *Monoglycérides et Diglycérides* ne semblent pas affectés par la chute du taux d'hormone cérébrale dans le milieu intérieur de *P. cultrifera*.

Pour le restant de lipides neutres, on observe des différences notables avec les coelomocytes :

- Le taux de *stérols estérifiés* chute (comme cela se produit en fin d'ovogenèse normale). A cette chute des stérols estérifiés semble correspondre une augmentation des *stérols libres* (on trouve la même teneur en stérols libres que chez des animaux de 180 μ). Dans les coelomocytes, on avait aussi observé une chute des stérols estérifiés, mais à cette baisse n'avait pas correspondu la hausse des stérols libres que nous observons ici.
- Contrairement aux coelomocytes, *triglycérides* et *acides gras libres* restent ici aux mêmes taux que dans les ovocytes d'animaux intacts. L'absence d'hormone cérébrale dans le milieu intérieur n'a aucun effet sur les glycérides et les acides gras libres de nos vers.

3°) Conclusion

Les conditions an hormonales favorisent la mise en réserve de glycérides par les coelomocytes, mais n'ont aucun effet sur les ovocytes. Les coelomocytes seraient donc sensibles, directement ou indirectement, à cette hormone. La libération d'acides gras par les triglycérides des ovocytes serait par contre facilitée par un autre facteur hormonal ou par un mécanisme intrinsèque aux ovocytes.

Les conditions an hormonales favorisent la libération des acides gras des stérols estérifiés des coelomocytes et des ovocytes. Cependant, dans les coelomocytes cela ne se traduit pas par une hausse des stérols = peut-être ces stérols (sous forme estérifiée ou libre) sont-ils libérés dans le milieu intérieur ?

VIII - LE CONTROLE HORMONAL DE L'OVOGENESE CHEZ LES INVERTEBRES

Nous savons que chez les INSECTES, des hormones interviennent dans les processus de vitellogenèse. Cependant, la nature des hormones impliquées et leur mode d'action sont assez variés.

Les corpora allata contrôlent la synthèse d'hormone juvénile (JH), et la JH est l'hormone la plus souvent identifiée comme étant l'agent clé qui contrôle la synthèse de vitellogénine et aussi la vitellogenèse.

Toutefois, le rôle de l'hormone juvénile dans l'ovogénèse varie mais peut affecter un ou plusieurs des processus suivants (cf. L.M. RIDDIFORD, 1980) :

- a) La maturation des ovocytes en prévitellogenèse
- b) L'initiation de la synthèse des Lipoprotéines spécifiquement femelles (= vitellogénines)
- c) L'induction de la concentration de vitellogénine dans l'ovocyte.

Chez *Locusta migratoria*, la JH semble être nécessaire à la maturation normale du corps gras ♀ en organe sécréteur de vitellogénines (T.T. CHEN et coll., 1979 ; P. COUBLE et coll., 1979). Chez les ♀ allatectomisées, une JH provoque l'initiation de la synthèse de vitellogénine (T.T. CHEN et coll., 1979), 48 H après la première injection et presque immédiatement après l'injection suivante, phénomène semblable à la stimulation hormonale primaire et secondaire chez les Vertébrés. Un récepteur cytosolique de la JH dans les cellules du corps gras a d'ailleurs commencé à être identifié (F. ENGELMANN, 1980).

La JH contrôle aussi chez *Leucophaea maderae* l'exportation de la vitellogénine mature des cellules du corps gras : les corps gras de *Leucophaea* contiennent de plus grandes quantités de vitellogénines en même temps que les corpora allata sont inactifs et que la vitellogénine n'est plus produite ou est détectable dans l'hémolymphe (F. ENGELMANN, 1971a).

L.I. GILBERT (1967) avait aussi remarqué que le corps gras de *Leucophaea* incubé in vitro avec des corpora allata actifs, a une activité synthétique lipidique faible. Ensuite, la concentration de vitellogénine par les ovocytes en croissance sont sous le contrôle de la JH, comme c'est mis en évidence par de nombreuses observations (F. ENGELMANN, 1979).

Le rôle de la JH dans la synthèse de vitellogénine par le corps gras a été mis en évidence chez d'autres espèces = ainsi, VROMAN (1965) montre que l'allatectomie de *Periplaneta americana* ♀ conduit à une augmentation des lipides dans le tissu adipeux, en relation avec une synthèse active.

Glycosylation et lipidation des vitellogénines se produisent sans doute dans les citernes du Réticulum Ergastoplasmique des cellules du corps gras (F. ENGELMANN, 1980), celui-ci étant d'ailleurs particulièrement important en période de synthèse.

Si le rôle de la JH dans l'ovogenèse d'Insecte est largement répandu, l'ecdysone, une autre hormone du développement, peut induire la synthèse de vitellogénine chez *Aedes aegypti* (A. SPIELMAN et al, 1971 ; H.H. HAGEDORN, 1974).

C'est d'ailleurs chez ce moustique que l'on a pour la première fois montré que l'ecdysone pouvait jouer un rôle direct dans la reproduction d'un Insecte. Après un repas de sang, l'ecdysone est libérée de l'ovaire et convertie en 20-hydroxyecdysone, qui agit sur le corps gras pour stimuler la synthèse de vitellogénine et sa libération.

Les ecdystéroïdes ont été impliqués dans le processus de maturation de l'oeuf chez seulement un autre Insecte, *Drosophila melanogaster* (A.M. HANDLER et J.H. POSTLETHWAIT, 1978). De la 20-hydroxyecdysone injectée dans des abdomens isolés de drosophile ♀ provoque une augmentation d'environ trois fois du taux d'une vitellogénine nouvellement synthétisée dans l'hémolymphe, mais ne permet pas sa prise par l'ovocyte (A.M. HANDLER et coll., 1978).

Chez *Leucophaea maderae* cependant, l'ecdysone inhibe la synthèse de vitellogénine (F. ENGELMANN, 1971 b) et chez des espèces telles que *Rhodnius* (M.L.M. GARCIA et coll., 1979), la vitellogenèse est diminuée après application de cette hormone.

Chez les CRUSTACES, l'intervention d'hormones dans les processus de vitellogenèse ont aussi été bien démontrés.

Chez les Crabes en cours de vitellogenèse, l'épédonculation déclenche les processus de l'ovogenèse exogène : développement des villosités et multiplication des vésicules de pinocytose (A. DHAINAUT et M. De LEERSNYDER, 1976 b). On peut penser que c'est l'affaiblissement progressif de l'inhibition pédonculaire qui permet la vitellogenèse. FRENTZ (1960), chez *Carcinus maenas* montre que l'épédonculation provoque l'apparition dans l'hémolymphe des ♀, des lipoprotéines spécifiques.

H. JUNERA et coll. (1977) ont pu montrer chez *Orchestia gammarella* que l'ovaire secrète une hormone contrôlant la synthèse de vitellogénine. Cette hormone est sécrétée uniquement par l'ovaire en vitellogenèse et a été appelée VSOH ("Vitellogenin Stimulating Ovarian Hormone").

Rappelons à ce propos que l'oestradiol - 17 β dont le rôle dans la synthèse de la vitellogénine chez les Poissons, les Amphibiens et les Oiseaux est clairement établi, est également une hormone d'origine ovarienne. D'autre part, chez quelques espèces d'insectes, on soupçonne aussi l'existence d'une hormone identique à la VSOH des Crustacés (H.H.HAGEDORN et A.M. FALLON, 1973, chez *Aedes aegypti* ; E. MUNDALL et F. ENGELMANN, 1977, chez la punaise *Triatoma protracta*, par exemple).

Chez les ANNELIDES, et particulièrement chez les Polychètes, si nous savons qu'il y a un contrôle hormonal de l'ovogenèse, nous n'avons jamais pu prouver de façon certaine l'existence d'un transport de lipides, sous forme de vitellogénines, comme il en existe chez les Crustacés ou les Insectes. Cependant, nous avons pu faire une analogie entre le corps gras des Insectes et les éléocytes de Polychètes. Dans ce chapitre, nous avons pu voir qu'ils sont sensibles à l'absence d'hormone cérébrale = en conditions anhormonales, les éléocytes ont une constitution en lipides neutres identique à ce que l'on observe en fin d'ovogenèse.

Pour ce qui est des ovocytes de *P. cultrifera* = l'absence d'hormone semble seulement jouer sur leurs taux en stéroïdes (libres ou estérifiés). On ne peut que faire des hypothèses sur la signification de ce phénomène. On peut par exemple supposer qu'il s'agit d'une substance de nature hormonale dont la libération serait elle-même sous contrôle endocrine.

Enfin, signalons l'analogie entre les éléocytes d'Annélides en période d'intense activité et les cellules du corps gras d'Insectes. A. DHAINAUT (1966) observe en effet dans les éléocytes de *Nereis pelagica* un développement important de l'Ergastoplasme, comme des études ultrastructurales l'ont montré dans les cellules du corps gras d'Insectes. Cette évolution est accélérée en conditions anhormonales.

LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DU MILIEU INTERIEUR DE *PERINEREIS CULTRIFERA*

I - LA PREPARATION DES METHYL ESTERS D'ACIDES GRAS ET LEUR ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

1° - Préparation des méthyl esters d'acides gras

2° - Etude de la composition en acides gras par chromatographie gaz - liquide

II - CONTRIBUTION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS

III - LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DU LIQUIDE COELOMIQUE

IV - LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DE COELOMOCYTES

V - LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DES OVOCYTES

VI - CONCLUSION : LES ACIDES GRAS DANS LE MILIEU INTERIEUR DE *PERINEREIS CULTRIFERA*

VII - LES ACIDES GRAS CHEZ LES INVERTEBRES

LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DU MILIEU INTERIEUR DE PERINEREIS CULTRIFERA

Nous avons étudié la constitution des différents lipides neutres séparés sur couche mince. Il est intéressant, en effet, comme nous le verrons, de connaître les acides gras que ces lipides neutres peuvent contenir, et de voir comment ces acides gras peuvent varier dans le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes, au cours de l'ovogenèse.

I - LA PREPARATION DES METHYL ESTERS D'ACIDES GRAS ET LEUR ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

1°) Préparation des méthyl esters d'acides gras

Pour plus de détails sur la préparation des méthyl esters d'acides gras, on se reportera à "Matériel et Méthodes".

Les acides gras peuvent être prélevés des lipides neutres par saponification dans la Potasse - Méthanolique 2N et subir ensuite une méthanolyse.

On peut aussi obtenir directement par transestérification les esters méthyliques à partir des lipides, par action du mélange méthanol - acide sulfurique.

Dans tous les cas, après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras sont transférés dans une ampoule à décanter avec 3 ml d'heptane et 3 ml d'eau distillée. Après agitation et déphasage, la phase supérieure heptanoïque est prélevée et subit un nouveau déphasage dans une ampoule à décanter.

La transméthylation n'étant jamais complète, un faible pourcentage d'acides gras ne sont pas méthylés puisqu'il s'agit d'un équilibre. Il est donc souhaitable d'éliminer ces composants ainsi que les éventuels contaminants provenant des solvants utilisés. Pour cela, on purifie les esters méthyliques par chromatographie sur couche mince de gel de silice G.

Le solvant de migration est le benzène.

Après migration, les fractions sont révélées par pulvérisation d'une solution de Rhodamine 6G. Le spot correspondant aux esters méthyliques, repéré grâce à l'utilisation d'un témoin (figure D1) est gratté.

Le gel de silice, déposé dans un tube, est lavé trois fois à l'heptane. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation. Après chaque centrifugation, on récupère l'heptane contenant les méthyl esters d'acides gras. Notre solution est alors prête à être injectée.

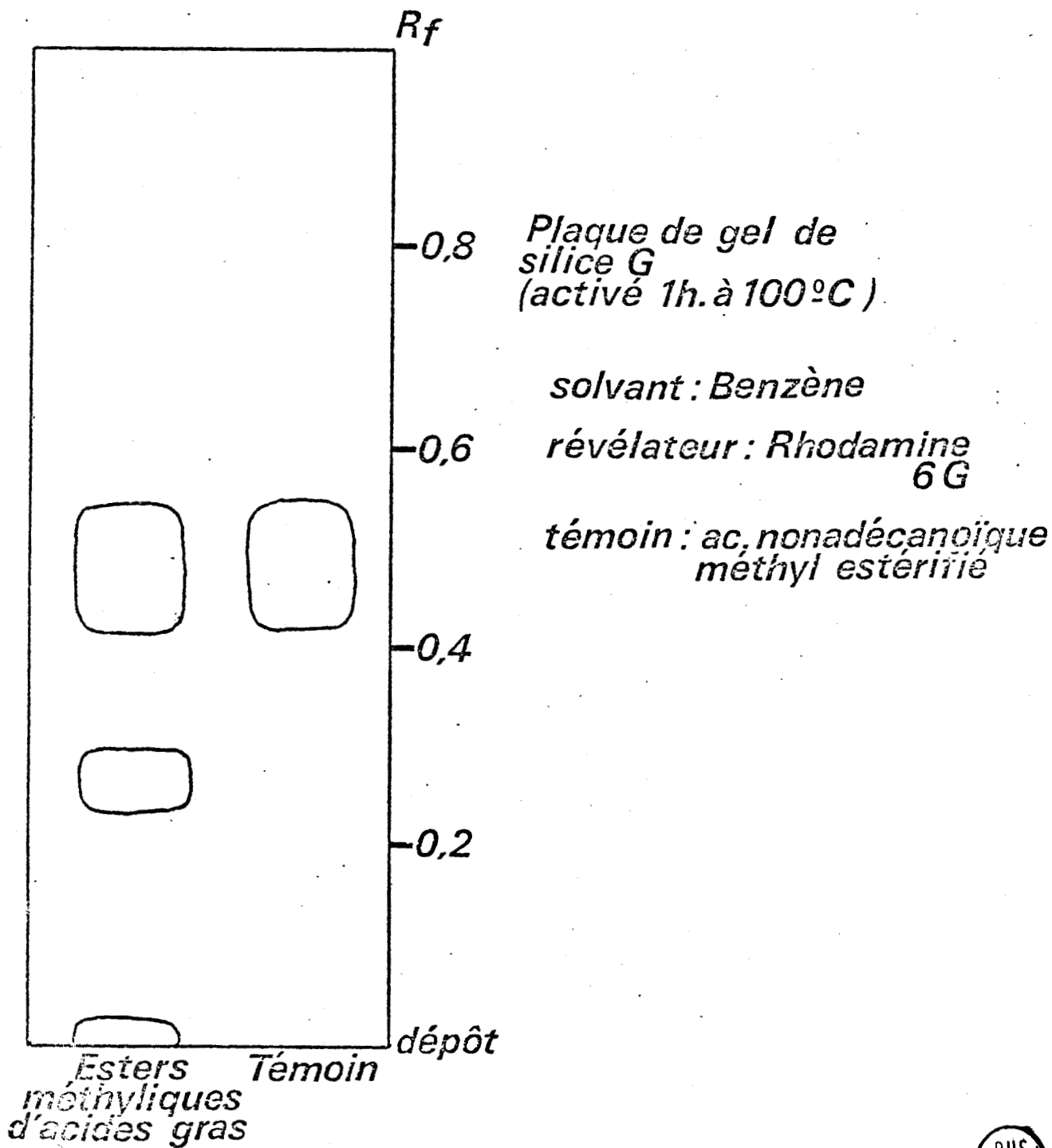


Figure D1 : Purification par chromatographie sur couche mince des esters méthyliques d'acides gras.

2°) Etude de la composition en acides gras par chromatographie gaz - liquide

Pour le type d'appareil et de colonne utilisés, on se reportera au chapitre " Matériel et Méthodes".

La figure D2 nous présente un type de chromatogramme.

Le tableau D1 nous donne la liste des acides gras rencontrés et identifiés par comparaison des temps de rétention des pics inconnus, avec ceux obtenus pour les esters méthyliques d'acides gras témoins commerciaux. Comme nous le verrons plus loin, la spectrométrie de masse a aussi été utilisée pour permettre l'identification de certains acides gras.

Pour chacun de ces acides gras, on indique la formule simplifiée et le nom. Les acides gras les plus courants sont plus souvent appelés sous un autre nom = quand c'est le cas, nous l'indiquons lui aussi.

Tableau D1 : Les acides gras des lipides neutres du milieu intérieur de *Perinereis cultrifera*.

Ne sont indiqués ici que les acides gras les plus fréquemment rencontrés dans les différentes classes de lipides neutres.

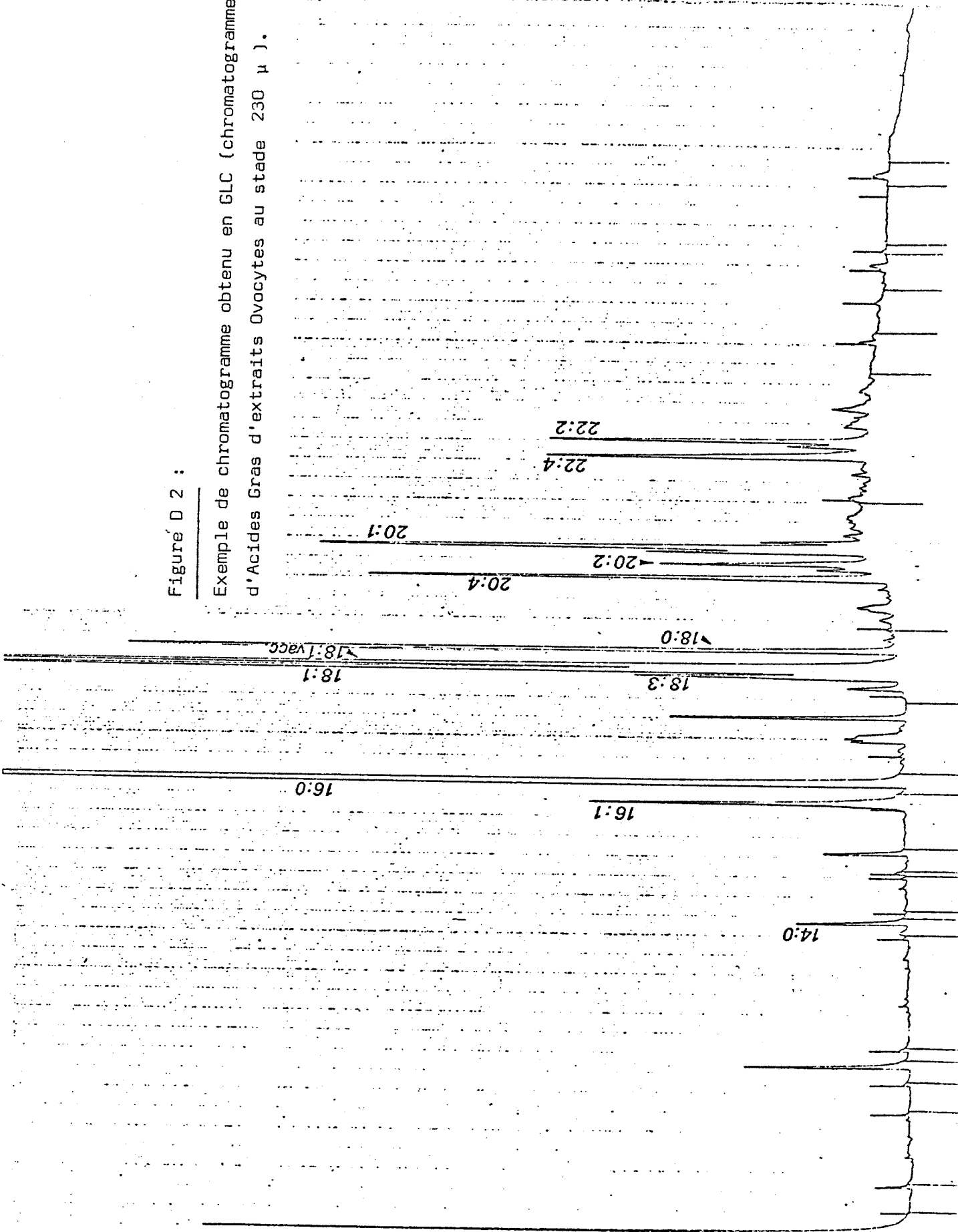
La première colonne du tableau indique à quelle série appartiennent les acides gras. La deuxième colonne donne la position des doubles liaisons en nomenclature classique. Dans la troisième colonne, nous précisons le nom commun de l'acide gras.

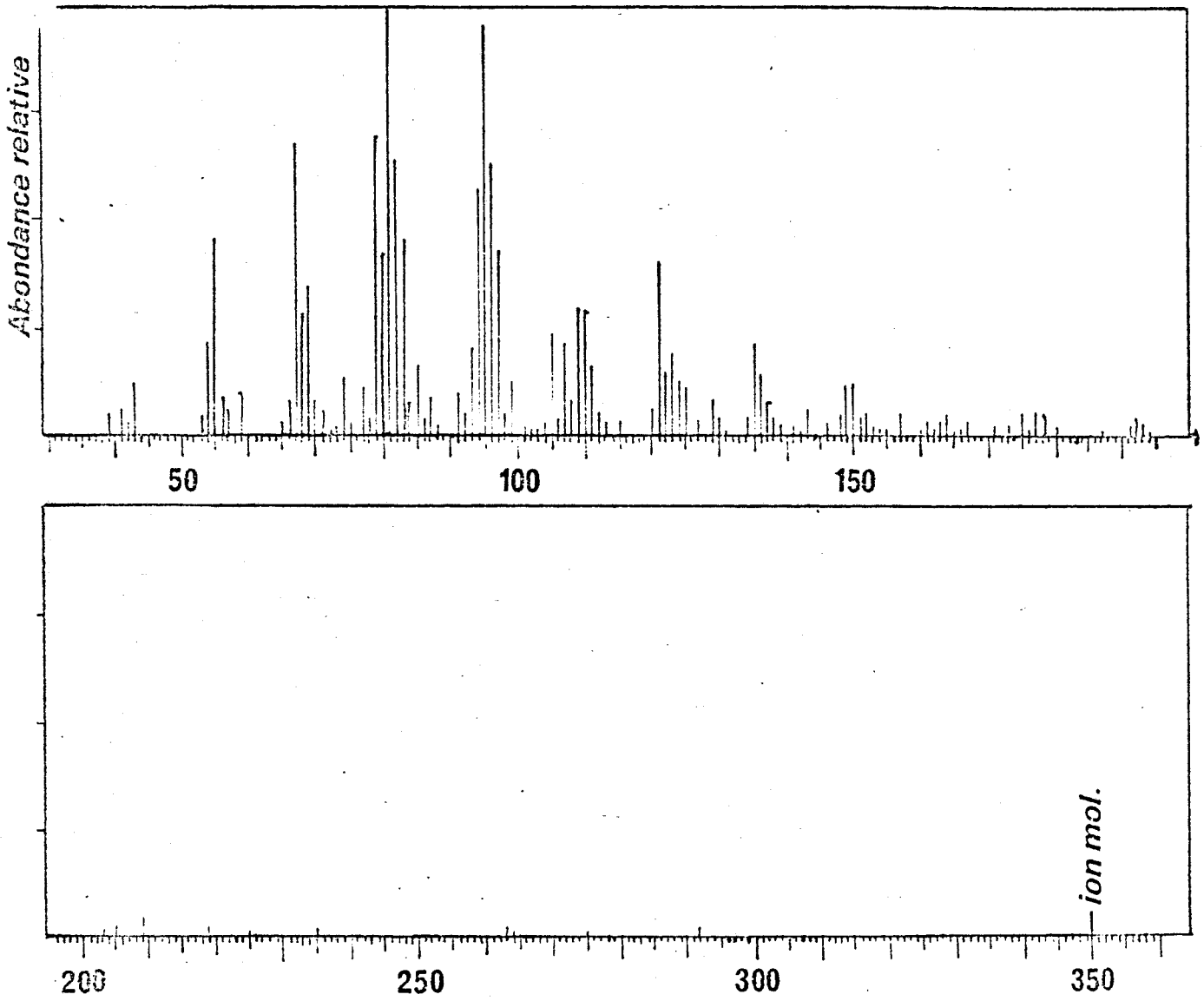
Les AG sont classés par ordre d'apparition sur le chromatogramme.

14:0	14:0 acide tétradécanoïque	ac. myristique
16:1(n-7)	16:1 Δ^9 ac. hexadécénoïque	ac. palmitoléique
16:0	16:0 ac. hexadécanoïque	ac. palmitique
18:3(n-6)	18:3 $\Delta^{6,9,12}$ ac.6,9,12 octadécatriénoïque	ac. γ -linoléique
18:1(n-9)	18:1 Δ^9 ac.9 octadécénoïque	ac. oléique
18:1(n-7)	18:1 Δ^{11} ac.11 octadécénoïque	ac. vaccénique
18:0	18:0 ac. octadécanoïque	ac. stéarique
20:4(n-6)	20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ ac.5,8,11,14 eicosatétraénoïque	ac. arachidique
20:2(n-6)	20:2 $\Delta^{11,14}$ ac. 11,14 eicosadiénoïque	ac. homolinoléique
20:1(n-9)	20:1 Δ^{11} ac. 11 eicosaénoïque	
22:4(n-9)	22:4 $\Delta^{4,7,10,13}$ ac.4,7,10,13docosatétraénoïque	
22:2(n-7)	22:2 $\Delta^{12,15}$ ac.12,15 docosadiénoïque	

Figure D 2 :

Exemple de chromatogramme obtenu en GLC (chromatogramme d'Acides Gras d'extraits Ovocytes au stade 230 μ).





Spectre de Masse du Methyl-linolate

Figure D3 : Spectre de Masse du Methyl-linolate .



II - CONTRIBUTION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS.

L'identification des acides gras effectuée en chromatographie gaz - liquide a été confirmée par la spectrométrie de masse, dont le principe a déjà été exposé dans "Matériel et Méthodes".

La figure D3 nous présente un exemple d'identification : le spectre de Masse du Méthyl-linoléate.

III - LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DU LIQUIDE COELOMIQUE.

Nos résultats, exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d'acides gras identifiés, sont exposés dans le tableau suivant (D2).

Tableau D2 : Les acides gras des lipides neutres du liquide coelomique

Diamètres ovocytaires	A G L			T G		St.E.
	70 μ	195 μ	230 μ	70 μ	195 μ	70 μ
14:0	-	-	1,2	-	-	3,1
16:1(n-7)	-	-	2,1	-	-	-
16:0	41,3	45,6	10,6	11,8	23,1	35,6
18:3(n-6)	-	1	12,9	2,2	9,8	-
18:1(n-9)	15,5	18,4	42,6	8,6	45,2	24,8
18:1(n-7)	13,5	12,4	9,6	4,8	7,8	8,7
18:0	19,4	15,4	10,5	8,9	14,1	27,8
20:4(n-6)	-	1,3	-	-	-	-
20:2(n-6)	-	4,2	-	-	-	-
20:1(n-9)	6,7	-	10,4	9,4	-	-
22:4(n-9)	-	-	-	-	-	-
22:2(n-7)	3,5	1,6	-	54,3	-	-
Total	99,9	99,9	99,8	100	100	100

Trois acides gras sont ici particulièrement abondants, quelque soit le lipide neutre étudié :

- 16 : 0 acide palmitique
- 18 : 0 acide stéarique
- 18 : 1(n-9) acide oléique
- et 18 : 1(n-7) acide vaccénique

Nous nous sommes intéressés à l'évolution du degré de saturation des acides gras du liquide coelomique.

Tableau D3 : Evolution du degré de saturation des acides gras dans le liquide coelomique.

Diamètres Ovocytaires		A G L	T G	St.E.
70 μ	S	60,7	20,7	66,5
	i	39,2	79,2	33,5
	i/S	0,64	3,8	0,5
195 μ	S	61	37,2	
	i	38,9	62,8	
	i/S	0,64	1,68	
230 μ	S	22,3	S : Pourcentages d'AG saturés i : Pourcentages d'AG insaturés i/S : Rapport du <u>taux d'AG insaturés</u> <u>taux d'AG saturés</u>	
	i	77,6		
	i/S	3,48		

Pour les A G L, aux stades 70 μ et 195 μ, nous avons les mêmes rapports = taux d'acides gras insaturés / taux d'acides gras saturés, qui montrent une prédominance des AG saturés (représentant environ 60 % des acides gras identifiés). A 230 μ, nous avons au contraire une brusque augmentation de la teneur en acides gras libres insaturés.

Pour les T G, ce sont les A G insaturés qui prédominent à 70 μ et à 195 μ .

A 70 μ, les acides gras insaturés ne sont d'ailleurs importants que dans les T G. Dans les autres lipides neutres, ce sont les acides gras saturés qui prédominent pour ce stade.

Tableau D4 : Evolution de la longueur de chaîne des acides gras des lipides neutres du liquide coelomique.

	AG de 14 et 16 C.		AG de 18 C.		AG de 20 et 22 C.	
	70 µ	195 µ	70 µ	195 µ	70 µ	195 µ
A G L	41,3	45,6	48,4	47,2	10,2	7,1
T G	11,8	23,1	24,5	76,9	63,7	t
St.E.	38,7	-	61,3	-	t	-

- Pas de résultats.

t. Inexistants ou à l'état de traces.

Dans le tableau ci-dessus (D4), nous avons classé les pourcentages d'acides gras dans différents lipides neutres, selon la longueur de la chaîne carbonée.

- . Acides gras à chaîne courte = de 14 et 16 carbones
- . Acides gras à chaîne moyenne = de 18 carbones
- . Acides gras à chaîne longue = de 20 et 22 carbones.

Dans les acides gras libres (AGL) du liquide coelomique, nous observons un taux constant à 70 et 195 µ, pour une longueur de chaîne donnée.

Pour les TG, nous observons par contre de grandes variations = entre 70 et 195 µ, l'importance des AG à chaîne courte double, celle des AG à chaîne moyenne triple. Par contre, on observe une chute des AG à chaîne longue.

Pour les stérols estérifiés (St.E.), nous n'avons que des résultats pour 70 µ = à ce stade, ce sont les AG à chaîne moyenne qui prédominent. Puis viennent les AG à chaîne courte. Les AG à chaîne longue sont inexistants.

Dans le tableau D5, nous étudions l'évolution du rapport = taux d'acide oléique / taux d'acide vaccénique, qui sont tous deux des acides gras à 18 carbones et à une seule double liaison, mais dont la position de cette double liaison est différente = en numérotant les atomes de carbone à partir du groupement méthyle (-CH₃), la double liaison de l'acide oléique est entre les carbones 9 et 10, et celle de l'acide vaccénique entre les carbones 7 et 8. La nomenclature des acides gras est exposée pages 37 et 39 de notre DEA.

Tableau D5 : Evolution du Rapport $\frac{18 : 1 \text{ oléique}}{18 : 1 \text{ vaccénique}}$ pour les acides gras des lipides neutres du liquide coelomique.

	70 μ	195 μ	230 μ
A G L	1,15	1,48	4,44
T G	1,79	5,79	-
St.E.	2,85	-	-

Dans le tableau D5, on observe ainsi que dans le liquide coelomique, les rapports $\frac{18 : 1 \text{ oléique}}{18 : 1 \text{ vaccénique}}$ sont toujours supérieurs à 1, quelque soit le lipide neutre ou le stade étudié.

Pour les AGL, à 70 μ et à 195 μ , il y a peu de variations. A 230 μ , on observe une brusque augmentation de la teneur en acide oléique.

Pour les TG, si à 70 μ le taux est faible, à 195 μ le taux d'acide oléique est élevé.

On peut penser qu'il existe une relation entre le taux d'acide oléique des TG à 195 μ et celui des AGL à 230 μ , qui sont tous deux élevés. C'est sans doute l'hydrolyse des TG qui enrichit les AGL en acide oléique.

La seule valeur que nous ayons pour les stérols estérifiés, à 70 μ , montre un taux triple d'acide oléique par rapport aux taux d'acide vaccénique.



IV - LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DES COELOMOCYTES.

Nos résultats sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau D6 : Les acides gras des lipides neutres des coelomocytes.

Diamètres ovocytaires	MG + DG		A G L		T G			St.E.		
	70μ	195μ	103μ	195μ	70μ	103μ	195μ	70μ	195μ	230μ
14:0	-	-	-	-	-	4,2	0,3	4,4	-	-
16:1(n-7)	-	-	-	2,1	-	5,2	1,9	4,5	-	-
16:0	100	57,9	23,6	41	72,3	19,2	34,9	23,7	30,7	93,1
18:3(n-6)	-	-	13,6	0,3	8	4,1	1,8	4,2	3,7	-
18:1(n-9)	-	19,6	19,6	9,4	10,7	13,1	12,1	10,8	36,1	3,3
18:1(n-7)	-	5,5		19,5			16,5			
18:0	-	16,9	23,4	8,7	9	9,7	6,3	10,5	24,9	-
20:4(n-6)	-	-	-	2,2	-	-	1,7	-	-	-
20:2(n-6)	-	-	9,8	2,5	-	44,5	3,7	33,9	-	-
20:1(n-9)	-	-	10	8,4	-		11		2,1	-
22:4(n-9)	-	-	-	1	-	-	2,1	-	-	-
22:2(n-7)	-	-	-	4,7	-	-	7,6	-	-	-
Total	100	99,9	100	99,8	100	100	99,9	99,8	100	100

Dans tous les lipides neutres des coelomocytes, l'acide palmitique est abondant. Les acides stéarique, oléique et vaccénique sont eux aussi à des taux assez élevés, mais variables selon le stade et la nature du lipide étudié.



Tableau D7 : Evolution du degré de saturation des acides gras des coelomocytes.

Diamètres ovocytaires	MG + DG	A G L	T G	St.E.
70 μ	S	99	81,3	38,6
	i	1	18,7	61,2
	i/S	0,05	0,23	1,58
100 μ	S		33,1	
	i		66,9	
	i/S		2,02	
195 μ	S	74,8	49,7	55,6
	i	25,1	50,1	44,4
	i/S	0,33	1,01	0,8
230 μ	S			93,1
	i			6,9
	i/S			0,07

Nous avons, dans le tableau D7, étudié l'évolution du degré de saturation des acides gras des coelomocytes.

Dans les MG + DG, les acides gras saturés restent à des taux élevés. Dans les TG, les saturés ne sont abondants qu'à 70 μ . Dans les stérols estérifiés, on observe au contraire une augmentation de la teneur en AG saturés.

Dans les TG de 100 à 195 μ , comme dans les AGL, les AG insaturés prédominent.

- S : Pourcentage d'AG saturés
- I : Pourcentage d'AG insaturés
- I/S : Pourcentage d'AG saturés

Comme nous l'avons fait pour les lipides neutres du liquide coelomique, étudions maintenant les variations de la longueur des chaînes carbonées.

Tableau D8 : Evolution de la longueur de chaîne des acides gras des lipides neutres des coelomocytes.

	AG de 14 et 16 C		AG de 18 C		AG de 20 et 22 C	
	70 μ	195 μ	70 μ	195 μ	70 μ	195 μ
MG + DG	\approx 100	57,9	t.	42	t.	t.
A G L	-	43,1	-	37,9	-	18,8
T G	72,3	37,1	27,7	36,7	t.	26,1
St.E.	32,6	30,7	31,2	69,3	36	t.

- Pas de résultat

t. Inexistants ou à l'état de traces.

Dans le tableau précédent (D8), on observe que les AG à chaîne courte (14 et 16 carbones) prédominent largement dans les MG et DG de coelomocytes correspondant au diamètre ovocytaire de 70 μ . Ils restent à un taux assez élevé à 195 μ .

Pour les AGL de coelomocytes, nous n'avons des résultats que pour 195 μ : les AG à chaîne courte et moyenne sont à des taux voisins et représentent environ 80 % des AGL. Il y a 20 % d'AGL à longue chaîne carbonée.

Pour les TG, entre 70 et 195 μ , on assiste à une augmentation de la longueur de chaîne des acides gras.

Dans les stérols estérifiés, les AG à chaîne courte, moyenne, ou longue, sont à des taux semblables à 70 μ . A 195 μ , ce sont les AG à 18 carbones qui prédominent, à 70 %.

Tableau D9 : Evolution du rapport $\frac{18 : 1 \text{ oléique}}{18 : 1 \text{ vaccénique}}$ pour les acides gras des lipides neutres des coelomocytes.

	70 μ	195 μ	230 μ
MG + DG	-	3,85	-
A G L	-	0,48	-
T G	-	0,73	-
St.E.	1,89	7,85	0,92

Le tableau D9 présente les évolutions des taux d'acide oléique et d'acide vaccénique, dans les coelomocytes.

L'acide oléique est abondant dans les MG + DG de 195 μ (où il y en a 4 fois plus que d'acide vaccénique).

Dans les stérols estérifiés, il y a aussi une forte teneur en acide oléique par rapport à l'acide vaccénique (à 195 μ , il y a 8 fois plus d'acide oléique).

Par contre, dans les TG et les AGL, à 195 μ , c'est l'acide vaccénique qui prédomine.



V - LES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES DES OVOCYTES.

Les résultats sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau D10 : Les acides gras des lipides neutres des ovocytes.

Diamètres ovocytaires	MG + DG		A G L				T G				St.E.	
	70μ	195μ	70μ	143μ	195μ	230μ	70μ	143μ	195μ	230μ	70μ	230μ
14:0	3,3	1,4	1	-	0,8	0,9	6	-	0,1	0,9	3,9	2,1
16:1(n-7)	2,9	2,3	2	5,2	3,1	4,1	4,4	-	2,4	2,8	2	4,2
16:0	30,2	14,9	30	33,6	22,6	32,5	18,2	36,1	37,2	32,1	22,7	31,9
18:3(n-6)	5,3	2,8	2,7	0,7	4,4	3,3	9,3	3,6	0,4	2,5	7,9	3,8
18:1(n-9)	26,5	15,2	18,9	9,7	10,2	12,1	33,3	10,7	14,1	13,7	32,1	23,3
18:1(n-7)	9	6,8	14,4	19,2	13,8	12,9	10,4	19	15,6	12,8	8,7	8,2
18:0	15,6	7	17,5	13,3	4,8	7,7	11,4	5	10,1	9,8	14,7	18,3
20:4(n-6)	-	18,4	-	6,1	13	6,1	-	9,1	3,7	3,8	-	-
20:2(n-6)	-	9,4	-	3,5	4,8	3,1	-	4,2	9,8	3,2	0,8	1,6
20:1(n-9)	7,1	8,9	12,4	8,6	8,9	7,8	6,9	5,5	0,8	8,5	6,9	4,3
22:4(n-9)	-	4,4	-	-	8,8	5,2	-	5,2	0,7	4,5	-	-
22:2(n-7)	-	8,1	-	-	4,6	4,1	-	1,6	4,7	5,3	-	2,2
Total	99,9	99,6	98,9	99,9	99,9	99,9	99,9	100	99,6	99,9	99,7	99,9

On observe que les acides palmitique, stéarique, oléique et vaccénique sont généralement bien représentés.



Tableau D11 : Evolution du degré de saturation des acides gras des lipides neutres des ovocytes.

Diamètres Ovocytaires		MG+DG	AGL	TG	St E
70 μ	S	49,1	48,5	35,6	41,3
	I	50,8	50,4	64,3	58,4
	I/S	1,03	1,04	1,81	1,41
140 μ	S		46,9	56,2	
	I		53	43,75	
	I/S		1,13	0,78	
195 μ	S	23,3	28,2	47,4	
	I	76,3	71,6	52,2	
	I/S	3,27	2,54	1,10	
230 μ	S		41,1	42,8	52,3
	I		58,7	57,1	47,6
	I/S		1,43	1,33	0,91

Le tableau précédent (D11) présente donc l'évolution du degré de saturation des acides gras des lipides neutres des ovocytes.

Les acides gras insaturés prédominent dans presque tous les lipides neutres des ovocytes, à tous les stades. Cependant, dans les stérols estérifiés de 230 μ on observe à peu près autant d'acides gras insaturés que de saturés.

D'autre part, dans les TG de 140 μ , le taux d'AG saturés est le plus important, mais au fur et à mesure que s'accomplit l'ovogenèse, ce sont les AG insaturés qui deviennent les plus abondants.

Dans les AGL, le taux d'AG insaturés devient aussi de plus en plus important de 70 à 200 μ , mais chute légèrement à 230 μ , à maturité génitale.

Tableau D 12 : Evolution de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras des lipides neutres des ovocytes.

	AG de 14 et 16 C		AG de 18 C		AG de 20 et 22 C	
	70 µ	195 µ	70 µ	195 µ	70 µ	195 µ
MG + DG	36,4	18,6	56,4	31,8	7,1	49,2
AGL	33	26,5	53,5	33,2	12,4	40,1
TG	28,6	39,7	64,4	40,2	6,9	19,7
St. E.	28,6	—	63,4	—	7,7	—

Les résultats du tableau D 12 sont intéressants : ils montrent généralement un allongement de la chaîne carbonée des acides gras, au cours de l'ovogenèse.

Dans les MG + DG, les AG à 16 et 18 carbones dominent à 70 µ. A 195 µ, les AG à 20 et 22 carbones représentent 50 % des AG totaux.

Dans les AGL, les chaînes de 18 carbones dominent à 70 µ ; à 195 µ ce sont les chaînes de 20 et 22 carbones qui sont les plus répandues.

Dans les TG, on observe le même phénomène d'allongement des chaînes carbonées, mais à 195 µ, les acides gras à longues chaînes ne représentent toujours que 20 % des acides gras totaux.

Pour les stérols estérifiés, nous n'avons des résultats que pour 70 µ : il y a alors prédominance des acides gras à 18 carbones.

Tableau D 13 : Evolution du rapport $\frac{18 : I \text{ oléique}}{18 : I \text{ vaccénique}}$ pour les acides gras des lipides neutres des ovocytes.

	70 µ	140 µ	195 µ	230 µ
	MG + DG	2,94	—	2,23
AGL	1,31	0,50	0,74	0,94
TG	3,2	0,60	0,90	1,07
St. E.	3,69	—	—	2,84

Dans le tableau D13, nous voyons que l'acide oléique domine largement dans les lipides neutres des ovocytes de 70 μ . Pour les AGL et les TG de 140 μ et 195 μ , c'est l'acide vaccénique qui devient alors le plus abondant. Dans les stérols estérifiés, l'acide oléique reste toujours beaucoup plus abondant que le vaccénique.

VI - CONCLUSION : LES ACIDES GRAS DANS LE MILIEU INTERIEUR DE *PERINEREIS*
CULTRIFERA :

M.L. KARNOVSKY remarquait déjà en 1969 que bien peu de travaux avaient été faits sur le Métabolisme lipidique des Annélides. Depuis, les choses n'ont guère évolué : les acides gras restent peu étudiés chez ces animaux.

Notre étude montre que dans les lipides neutres du liquide cœlomique, des cœlomocytes, ou des ovocytes, on a toujours les mêmes acides gras qui dominant : les acides palmitique, stéarique, oléique et vaccénique.

D'autre part, les acides gras insaturés sont principalement des C18 et des C20, avec chaque fois un nombre plus ou moins grand d'insaturations. Dans notre DEA (1979), nous faisons la même remarque pour les acides gras des macromolécules. J.A. LOVERN avait lui aussi remarqué chez l'Oligochète *Lumbricus terrestris* un grand nombre d'acides gras insaturés en C18 et en C20.

Pour le liquide cœlomique ce sont les AGL saturés qui prédominent (sauf à 230 μ). Pour les ovocytes par contre les AGL insaturés sont de plus en plus abondants au fur et à mesure que s'accomplit leur maturation. Pour les AGL de cœlomocytes, il y a, à peu près, autant de saturés que d'insaturés (avec néanmoins une prépondérance de ces derniers).

Dans les TG du liquide cœlomique on trouve beaucoup d'AG insaturés. Il en est de même dans cœlomocytes et ovocytes.

Dans les stérols estérifiés des cœlomocytes le taux d'AG saturés est de plus en plus important alors que s'accomplit l'ovogenèse. D'autre part, alors que les AG insaturés dominent dans tous les LN des ovocytes, les St. E. des ovocytes possèdent à l'approche de la maturation autant de saturés que d'insaturés.

Pour ce qui est des variations de la longueur des chaînes carbonées, dans les AGL d'ovocytes on observe une importante augmentation du nombre d'atomes de carbone au cours de l'ovogenèse. Par contre, la longueur des chaînes carbonées des AGL du liquide cœlomique et des cœlomocytes varie peu .

Pour les TG du liquide coelomique, les AG à chaîne courte et moyenne augmentent fortement, ceux à chaîne longue chute. Dans les TG des coelomocytes et des ovocytes, il y a au contraire augmentation importante des chaînes carbonées d'AG au cours de l'ovogenèse.

Dans les MG + DG des coelomocytes et des ovocytes, on observe le même phénomène que pour les TG : l'augmentation de la longueur des chaînes carbonées.

Dans les stérols estérifiés des coelomocytes et des ovocytes, on a surtout des AG à chaîne moyenne (18 carbonés).

L'allongement des chaînes carbonées et l'augmentation du taux d'acides gras insaturés que l'on observe généralement dans les lipides neutres, sont à rapprocher des résultats de notre DEA, où nous avons observé le même phénomène. Notons toutefois, que l'étude faite ici après séparation des différents lipides neutres sur couche mince montre des variations dans nos résultats selon la nature du lipide neutre et selon le milieu étudié (liquide coelomique, coelomocytes ou ovocytes).

Dans le liquide coelomique c'est toujours l'acide oléique qui est plus abondant que l'acide vaccénique. Le taux d'acide oléique augmente même au cours de l'ovogenèse.

Dans les éléments figurés par contre les phénomènes observés sont différents. Ainsi, dans les TG et les AGL c'est l'acide vaccénique qui est le plus abondant. Dans les St. E. des coelomocytes et des ovocytes, on a cependant, plus d'oléique que de vaccénique.

Il est intéressant de remarquer que les stérols estérifiés du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes sont assez semblables. Ils ont toujours un taux d'AG saturés important, et ces AG sont surtout à 18 carbonés. Enfin, il y a plus d'acide oléique que de vaccénique.

VII - LES ACIDES GRAS CHEZ LES INVERTEBRES.

Les études des acides gras d'Invertébrés ont surtout été faites chez les INSECTES.

Les acides gras intervenant dans la constitution des lipides neutres d'insectes sont assez variables.

F.E. Strong (1964) montre dans les AG des LN des œufs d'Aphid, la prépondérance de l'acide myristoléique (C14 : 1), de l'acide myristique et de l'acide oléique.

Selon L.I. Gilbert (1967), les AG des Insectes sont de la forme C2 à C34. L'acide oléique est le plus abondant. Parmi les nombreux AG insaturés, la

plupart ont une double liaison entre C9 et C10.

D'autre part, M. Fawzi et coll. (1961) ont montré que le palmitate et l'oléate sont les AG les plus courants dans les TG de *Locusta migratoria*.

S. Hérodek et T. Farkas (1960), travaillant sur *Bombyx mori* montrent que pendant le développement de l'adulte le pourcentage d'AG insaturés s'accroît, tout au moins chez la ♀. Ces auteurs pensent qu'ils jouent un rôle dans le développement de l'œuf.

L'existence d'acides gras polyinsaturés pose d'ailleurs un problème intéressant.

Sauf chez les Diptères (et les Aphides, dont les symbiotes peuvent fournir tous les lipides nécessaires), la plupart des espèces d'Insectes exigent des AG polyinsaturés. Des études métaboliques montrent que les Insectes sont incapables de synthétiser les AG di- et polyéniques "de novo" ou de les obtenir par modification d'AG monoéniques ou saturés préexistants qui peuvent être synthétisés ou obtenus à partir de la nourriture (L.I. Gilbert, 1967 ; W.F. Stephen et L.I. Gilbert, 1969 ; P.G. Fast, 1970).

Chez de nombreux Insectes, les AG essentiels sont les linoléique (C18 : 2 - Doubles liaisons au niveau des carbones 9 et 12) et/ou linoléinique (C18 : 3 - Doubles liaisons au niveau des carbones 9, 12 et 15).

Chez les Vertébrés, l'acide arachidonique (C20 : 4 - Doubles liaisons au niveau des carbones 5, 8, 11, 14) est l'AG essentiel de grande importance physiologique ; il peut être métabolisé à partir de l'acide linoléique alimentaire ou de nombreux autres AG polyinsaturés, et donc, si l'acide arachidonique est absent de la nourriture, le besoin en AG peut être satisfait par les autres AG présents (H.M. Sinclair, 1964 ; M. Guarnieri et R.M. Johnson, 1970).

Pour aucune espèce de Diptère, les AG polyinsaturés ou autres, ne sont pas essentiels. R.H. Dadd et J.E. Kleinjan (1979), ont néanmoins montré que *Culex pipiens* était le premier Diptère exigeant un AG polyinsaturé, le premier Insecte pour lequel une exigence en AG essentiel n'est pas satisfaite par l'acide linoléique et/ou l'acide linoléinique, mais est tributaire de l'acide arachidonique

Outre les Insectes, nous avons chez les Invertébrés quelques résultats chez les CRUSTACÉS.

Les Crustacés sont incapables de synthétiser les acides linoléique et linoléinique à partir d'acétate et de palmitate, comme les Mammifères.

A. KANAZAWA et coll. (1979 a et b) ont étudié l'effet de l'acide linoléique et de l'acide linoléinique sur la croissance de la crevette.

Leurs résultats indiquent que l'acide linoléique et l'acide linoléique sont tous deux efficaces pour la survie et la croissance de la crevette *Penaeus japonicus*, mais l'effet de l'acide linoléique est inférieur à celui de l'acide linoléique (c'est avec l'addition d'acide linoléique que l'on obtient les plus importantes augmentations de poids).

D'autre part, observent ces auteurs, la composition en AG des lipides des crevettes est modifiée par la composition des lipides contenus dans les aliments : les proportions des acides gras polyinsaturés de la série $\omega 3$ sont augmentés chez les crevettes nourries à l'aide d'aliments enrichis en acide linoléique (C18 : $\omega 3$).

Enfin, nous terminerons en faisant remarquer que la nature des AG, d'après les observations faites chez les Vertébrés, influe sur la lipogenèse.

Selon R. Jeffcoat et coll. (1979), la lipogenèse hépatique est contrôlée par les taux d'hydrates de carbone et de lipides. En général, les premiers stimulent alors que les derniers suppriment la lipogenèse hépatique.

Cependant, font observer ces auteurs, la nature et les concentrations de ces hydrates de carbone et de ces lipides, ont une influence importante.

Dans le Foie, l'activité lipogénique est inhibée par les AG saturés (Knocke, 1973) et les taux d'enzymes sont contrôlés par les AG polyinsaturés.

Dans le Tissu Adipeux, on a remarqué que les AG saturés sont plus inhibiteurs que les AG polyinsaturés.

LES PHOSPHOLIPIDES ET LEURS ACIDES GRAS

I - ETUDE PARTIELLE DES PHOSPHOLIPIDES DU MILIEU INTERIEUR DE *PERINEREIS* *CULTRIFERA*

1° - Essai d'identification des différents phospholipides

2° - Essai de quantification des différents phospholipides

II - EXTRACTION DES ACIDES GRAS DE PHOSPHOLIPIDES ET ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

III - LES ACIDES GRAS DES PHOSPHOLIPIDES D'OVOCYTES

IV - LES PHOSPHOLIPIDES = LEUR IMPORTANCE BIOLOGIQUE ET LEUR ROLE CHEZ LES INVERTEBRES

LES PHOSPHOLIPIDES ET LEURS ACIDES GRAS

I - ETUDE PARTIELLE DES PHOSPHOLIPIDES DU MILIEU INTERIEUR DE PERINEREIS CULTRIFERA.

Les phospholipides ne sont étudiés que de façon succincte. Les différentes techniques utilisées sont exposées dans le chapitre "Matériel et méthodes".

Rappelons que la fraction "phospholipidique" est obtenue par précipitation des lipides totaux à l'acétone.

1°) Essai d'identification des différents phospholipides.

Nous avons fait une chromatographie sur papier Whatman SG 81 (Technique de G.V. MARINETTI, 1962) dans le système solvant : Chloroforme - Méthanol - Ammoniaque - Eau (66 : 23 : 3 : 0,9 v/v/v/v). Ce solvant a déjà été utilisé sur le même support, par J. BARAUD (1973).

L'extrait phospholipidique d'ovocytes de 230 μ , montre deux taches (voir figure E1), correspondant l'une à la phosphatidyl sérine, l'autre à la phosphatidyl éthanolamine et/ou phosphatidyl choline.

Différents révélateurs ont été utilisés :

- l' H_2SO_4 à 5 % : révélateur universel
- l' α -naphthol : révélateur des glycolipides
- réactif de Karlsson-Pascher : révélateur des céramides
- ninhydrine : révélateur des fonctions amines primaires des phospholipides.

Travaillant sur couche mince de gel de silice G, on a utilisé le système solvant :

Chloroforme / Méthanol / Eau

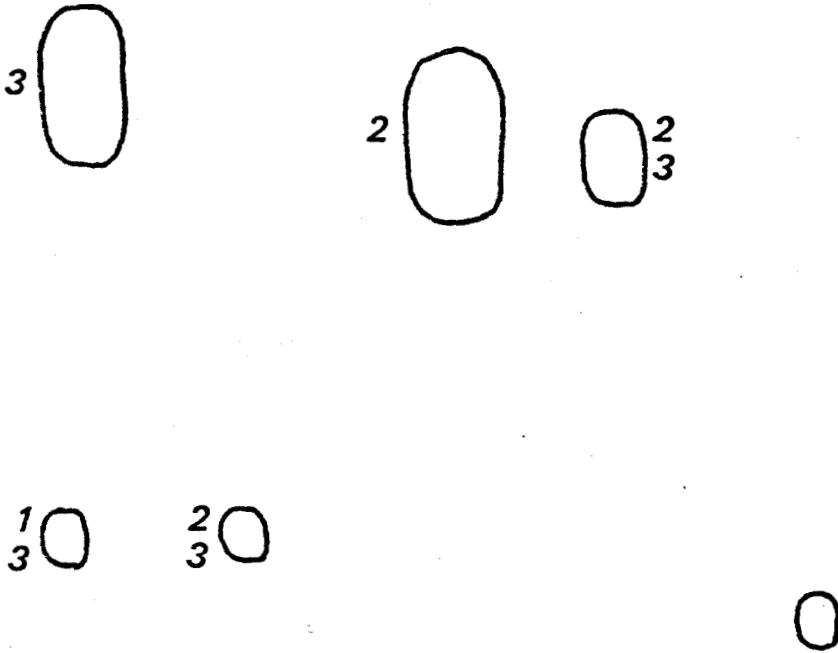
80 : 25 : 4 (v/v/v)

Après vaporisation d' H_2SO_4 à 5 % et chauffage pendant quelques minutes à 100°C, trois taches sont aisément identifiables (figure E2) :

- . la Phosphatidyl Sérine (et peut-être aussi Phosphatidyl Inositol)
- . la Phosphatidyl Choline
- . la Phosphatidyl Ethanolamine.

figure E₁: Chromatographie des Phospholipides

sur papier Whatman SG 81



Phospho-
lipides d'ovocytes
de 230 μ

P.S. P.C. P.E. P.I.

P.S. phosphatidyl sérine
P.C. " choline
P.E. " éthanolamine
P.I. " inositol

Système solvant: $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{NH}_4\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$
66 : 23 : 3 : 0,9

Toutes les tâches sont révélées à l' H_2SO_4 à 5%

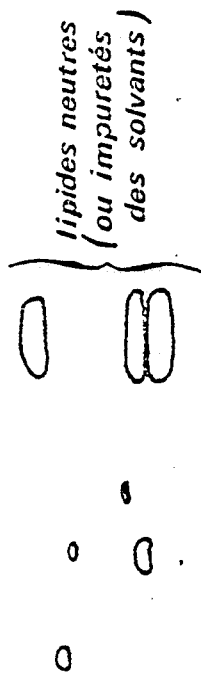
1 Tâche révélée à l' α -naphtol

2 " " au réactif de Karlsson—Pascher

3 " " à la ninhydrine

Figure E 2 : Chromatographie des Phospholipides sur couche mince de gel

de silice G front du solvant



PI PS PC PE Phospho.
d'Ovocytes
de 195 μ

Solvant : CHCl_3 / CH_3OH / H_2O
80 : 25 : 4

Révéléateur : H_2SO_4 à 5 %

Figure E 3 : Chromatographie des Phospholipides sur couche mince de gel

Silice G utilisant successivement deux systèmes solvants :
- Solvant I : Acétone/Ether de pétrole (98 : 2)
- Solvant II : CHCl_3 / CH_3OH / H_2O / CH_3COOH (60 : 30 : 6 : 6)
Révéléateur : H_2SO_4 à 5 %

Dans ces extraits phospholipidiques d'ovocytes de 195 μ , deux spots ne sont pas identifiés = ce sont sans doute des formes "lyso" (c'est-à-dire des phospholipides ne portant plus deux molécules d'acides gras, mais une seule).

La chromatographie représentée sur la figure précédente (figure E2) montre, près du front du solvant, de nombreuses taches = ce sont sans doute à la fois des lipides neutres qui contamineraient encore notre culot phospholipidique, mais aussi des impuretés provenant des solvants utilisés.

Dans la chromatographie sur couche mince de la figure E3, nous avons essayé de supprimer les inconvénients que nous venons d'exposer ci-dessus, pour la chromatographie précédente.

Deux systèmes solvants sont en effet utilisés.

Le 1er système solvant : Acétone / Ether de Pétrole (98 :2) nous permet de débarrasser nos dépôts phospholipidiques des lipides neutres qu'ils pourraient contenir.

Le 2ème système solvant : Chloroforme / Méthanol / Eau / Acide Acétique (60 : 30 : 6 : 1) nous permet de séparer les phospholipides.

Nous avons ici étudié 4 fractions phospholipidiques :

Ph 1 = Phospholipides d'ovocytes de 115 μ

Ph 2 = Phospholipides d'ovocytes de 150 μ

Ph 3 = Phospholipides d'ovocytes de 195 μ

Ph 4 = Phospholipides d'ovocytes de 230 μ

Comme pour la figure E2, trois spots se détachent nettement :

- . la Phosphatidyl Sérine (avec peut-être du Phosphatidyl Inositol)
- . la Phosphatidyl Choline
- . la Phosphatidyl Ethanolamine.

2°) Essai de quantification des différents phospholipides.

Reprenons la figure E3.

Une observation rapide nous permet de constater que, dans les extraits phospholipidiques d'ovocytes de 150 μ , la Phosphatidyl Sérine et la Phosphatidyl Ethanolamine n'apparaissent pas. Puisque la quantité de phospholipides déposée pour chaque extrait ovocyttaire peut être assez variable, on peut au moins penser que la Phosphatidyl Choline reste à des taux sensiblement constants quel que soit le stade considéré, mais que Phosphatidyl Sérine et Phosphatidyl Ethanolamine voient leurs taux diminuer vers 150 μ .

Pour les ovocytes de 195 et 230 μ , 2 taches apparaissent en quantité notable (taches déjà visibles sur la figure E2).

Des essais de dosages des Phospholipides (par dosage du Phosphore selon P.S. CHEN, 1954) ont été faites.

Après chromatographie sur couche mince préparative dans les deux systèmes solvants précédents, on observe quatre taches pour les extraits phospholipidiques de coelomocytes correspondant aux diamètres ovocytaires de 140 μ et de 160 μ .

Tache A : Sans doute des formes lyso

Tache B : Phosphatidyl Sérine

Tache C : Phosphatidyl Choline

Tache D : Phosphatidyl Ethanolamine.

Les résultats des dosages sont exposés dans le tableau suivant.

Tableau E1 : Résultats des dosages selon CHEN des Phospholipides de coelomocytes de *P. cultrifera*

	140 μ	160 μ
Tache A (formes lyso ?)	37 %	20 %
Tache B PS	Résultats nuls	27 %
Tache C PC	62 %	36 %
Tache D PE	Résultats nuls	17 %

Outre un nombre limité de taches, nous observons que, parmi les phospholipides identifiés, c'est la Phosphatidyl Choline qui domine à 140 μ . Apparaîtront ensuite en quantités appréciables : Phosphatidyl Sérine et Phosphatidyl Ethanolamine.

Après séparation sur couche mince, des dosages semblables ont été effectués sur les Phospholipides d'ovocytes de 100 μ , 140 μ et 230 μ .

A 100 μ , les phospholipides d'ovocytes se présentent sous forme de quatre taches aisément identifiables, correspondant aux phospholipides des coelomocytes. Seules les taches A (formes lyso, sans doute) et D (Phosphatidyl Ethanolamine) sont en quantité appréciable (respectivement $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{4}$ des Phospholipides totaux). Nos dosages indiquent que la Phosphatidyl Sérine et la Phosphatidyl Choline sont en quantité négligeable.

A 140 et 230 μ , par chromatographie sur couche mince préparative, nous observons un grand nombre de taches. Les 7 taches observées n'ont pu être identifiées avec certitude. Ces résultats montrent néanmoins qu'avant 140 μ , une intense activité métabolique affecte les Phospholipides des ovocytes.

Ainsi, si quatre phospholipides sont identifiés avec certitude, ceux-ci se trouvent en proportions variables dans les coelomocytes. Un grand nombre de phospholipides existent d'autre part dans les ovocytes, à partir de 140 μ .

II - EXTRACTION DES ACIDES GRAS DE PHOSPHOLIPIDES ET ETUDE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

Les acides gras, après hydrolyse et extraction selon les techniques exposées dans "Matériel et méthodes", sont étudiés en chromatographie en phase gazeuse, comme les acides gras de lipides neutres.

Seuls les acides gras des phospholipides d'ovocytes sont ici étudiés.

III - LES ACIDES GRAS DES PHOSPHOLIPIDES D'OVOCYTES.

L'importance relative de ces différents acides gras est exposée dans le tableau E2 ci-dessous.

Tableau E2 : Importance relative des acides gras des phospholipides des ovocytes.

Diamètres ovocytaires	70 μ	103 μ	115 μ	140 μ	230 μ
14 : 0	-	-	-	-	-
16 : 1(n-7)	6,7	-	-	0,9	0,65
16 : 0	64,1	24,3	26,5	41,6	28,5
18 : 3(n-6)	-	-	3	1,2	0,85
18 : 1(n-9)	-	11,1	6,7	6,1	6
18 : 1(n-7)	-	8,7	8	6,4	7,5
18 : 0	29,2	26,7	16,8	17,6	26,4
20 : 4(n-6)	-	11,1	21,4	10,4	12,9
20 : 2(n-6)	-	2,8	-	4,6	1,75
20 : 1(n-9)	-	7,6	5,1	4,7	5,45
22 : 4(n-9)	-	3,4	7,7	4	5,35
22 : 2(n-7)	-	4,1	4,7	2,4	4,6
Total	100	99,8	99,9	99,9	99,95

On observe que l'importance relative des acides palmitique et stéarique domine largement dans les phospholipides d'ovocytes jeunes. Ces phospholipides diversifient ensuite la nature de leurs acides gras.

Dans le tableau suivant (Tableau E3), on s'est intéressé à l'évolution du degré de saturation des acides gras.

Tableau E3 : Evolution du degré de saturation des acides gras de phospholipides d'ovocytes.

	70 μ	100 μ	115 μ	140 μ	230 μ
S	93,3	51	43,3	59,2	55
i	6,7	48,8	56,6	40,7	44
i/S	0,07	0,96	1,31	0,69	0,8

S : Pourcentage d'acides gras saturés.

i : Pourcentage d'acides gras insaturés.

i/S : Rapport du taux d'acides gras insaturés sur le taux d'acides gras saturés.

On observe ainsi d'abord une forte augmentation du taux d'acides gras insaturés au cours de l'ovogenèse. Cette augmentation s'arrête environ à 115 μ , puis l'importance des acides gras insaturés diminue et se stabilise à l'approche de la maturité génitale.

La figure E4 nous montre bien ces variations.

Entre 70 μ et 140 μ , on aurait ainsi une période d'intense activité du métabolisme des phospholipides des ovocytes.

Le tableau E4 et la figure E5 exposent l'évolution de la longueur de chaîne des acides gras constituant les phospholipides. Ces acides gras sont classés en acides gras à chaîne courte (14 et 16 carbones), à chaîne moyenne (18 carbones) et à chaîne longue (20 et 22 carbones), comme nous avons pu le faire pour les acides gras des lipides neutres.

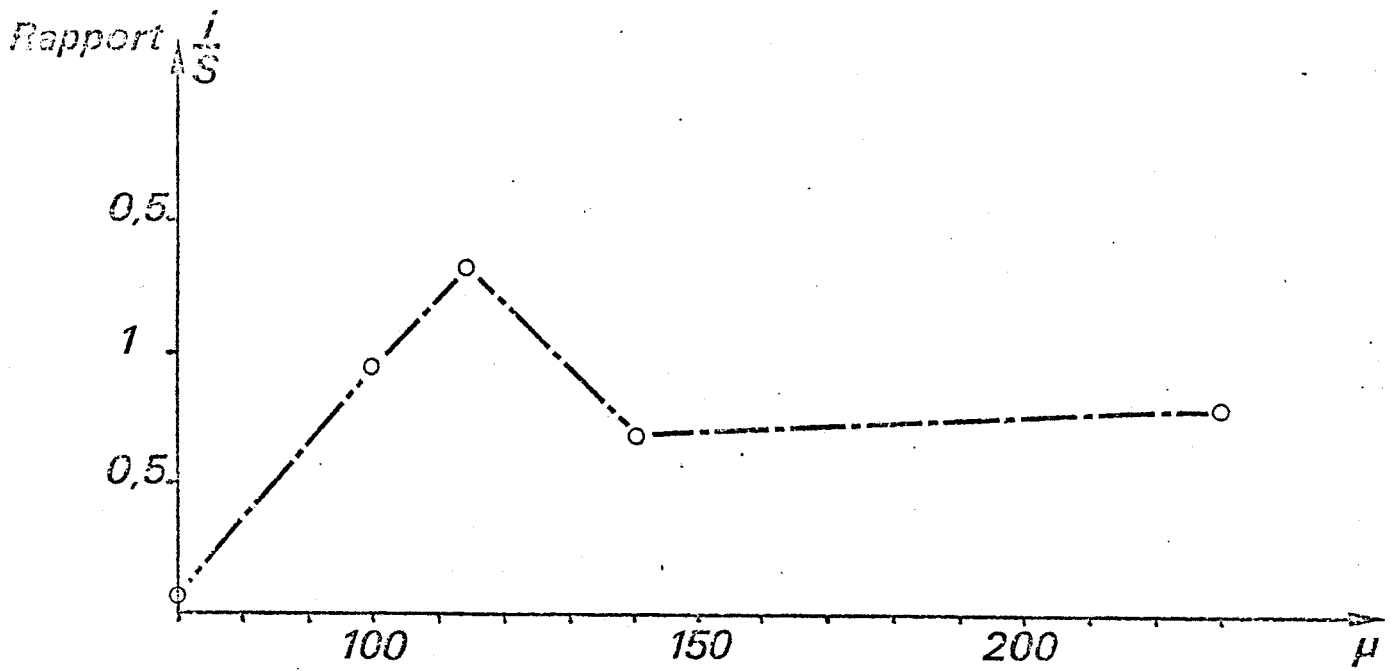


Figure E 4 : Evolution du rapport du taux d'acides gras insaturés sur le taux d'acides gras saturés dans les Phospholipides d'Ovocytes.

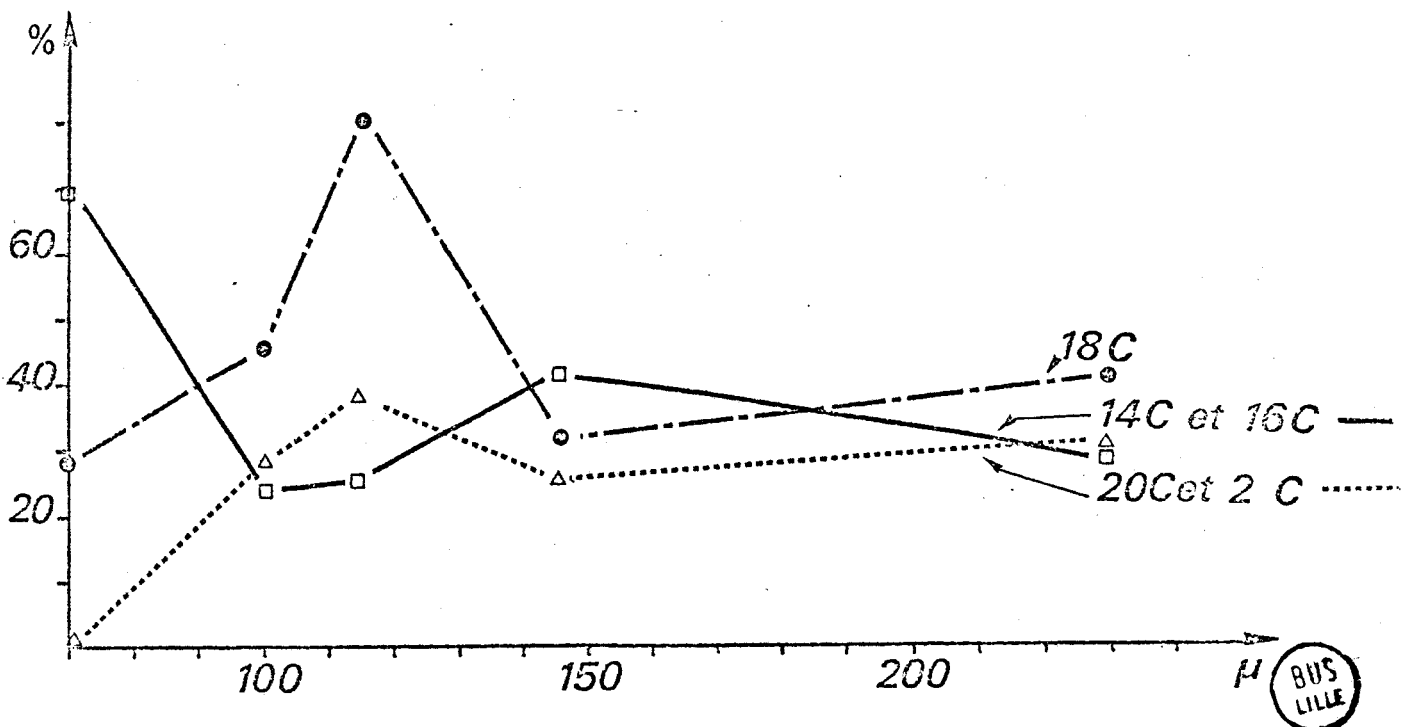


Figure E 5 : Evolution de la longueur de chaîne des acides gras constituant les Phospholipides d'Ovocytes.



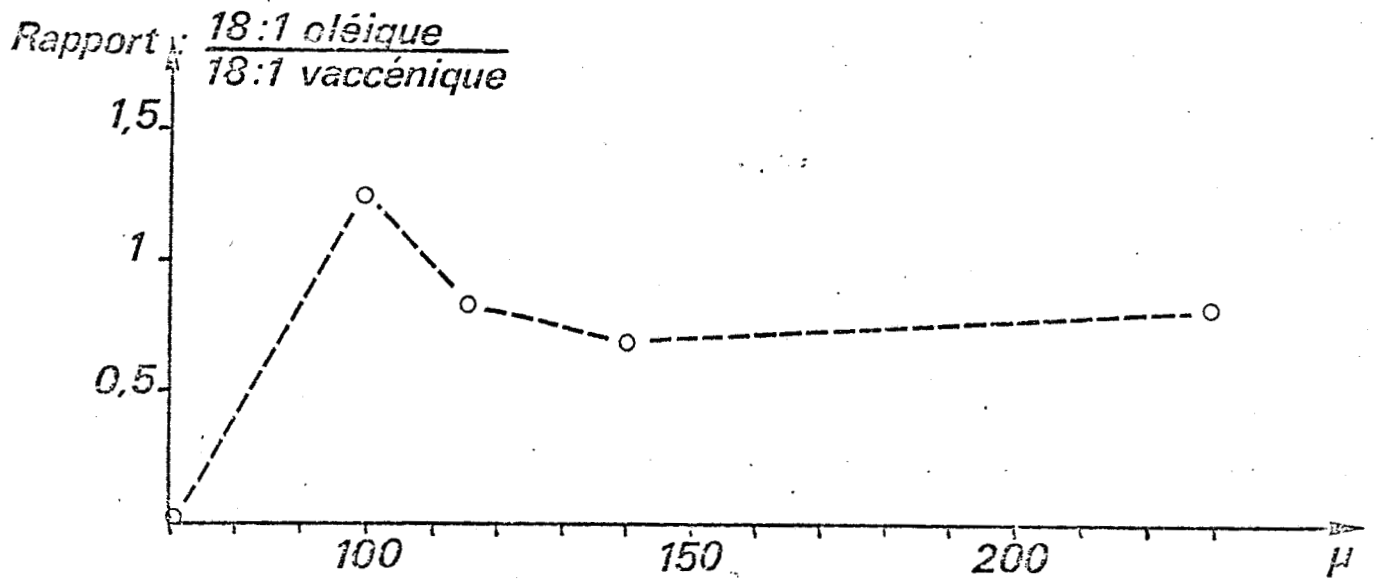


Figure E 6 : Evolution du rapport $\frac{18 : 1 \text{ oléique}}{18 : 1 \text{ vaccénique}}$
 dans les phospholipides d'Ovocytes (d'après les résultats exposés
 dans le tableau E 2, page 86).

Tableau E4 : Evolution de la longueur de la chaîne des acides gras des phospholipides d'ovocytes.

	Acides gras de 14 et 16 carbones	Acides gras à 18 carbones	Acides gras de 20 et 22 carbones
70 μ	70,8	29,2	Traces
100 μ	24,3	46,5	29
115 μ	26,5	81	38,9
145 μ	42,5	31,3	26,1
230 μ	29	40,8	30

On observe que les acides gras à chaîne courte, importants chez les jeunes ovocytes, chutent rapidement. Entre 100 et 150 μ , ils sont remplacés par des acides gras à chaîne moyenne, et dans une moindre mesure par des acides gras à chaîne longue. Entre 150 et 230 μ , les trois groupes d'acides gras sont à des taux voisins.

Comme on a pu le dire un peu plus haut, entre 100 et 150 μ , il y a une intense activité au niveau du métabolisme des phospholipides des ovocytes.

Enfin, reportons-nous au tableau E2 et observons l'évolution des taux d'acide oléique et d'acide vaccénique. Ces résultats sont exposés dans la figure E6.

On observe là encore d'importantes modifications chez les ovocytes de taille jeune ou moyenne. Entre 90 et 110 μ , c'est le taux d'acide oléique qui prédomine. Dans les ovocytes plus âgés, c'est l'acide vaccénique qui devient le plus important des deux acides gras à 18 carbones. Le rapport taux d'acide oléique / taux d'acide vaccénique ne se modifie alors guère.

On observe toujours la même période d'activité intense, soulignée précédemment.

IV - LES PHOSPHOLIPIDES = LEUR IMPORTANCE BIOLOGIQUE ET LEUR ROLE CHEZ LES INVERTEBRES.

Notre étude des Phospholipides des ovocytes de *Perinereis cultrifera*, bien que succincte, n'en est pas moins intéressante, puisque nous avons pu observer une période d'activité métabolique intense (période qui correspond bien du reste à celle qui a été observée pour le métabolisme des sucres, dans notre D.E.A.).

Nous avons pu voir aussi que le Phosphatidyl Choline était le Phospholipide toujours présent en quantité notable, à tous les stades de nos ovocytes. C'est en effet le principal Phospholipide de la plupart des cellules animales (elle est cependant absente de la plupart des bactéries). Sa première fonction dans la cellule semble être structurale ; cependant, des espèces de Phosphatidyl Choline sont connues pour moduler l'activité de certains enzymes (J. B. FINEAN - 1973) et ce lipide peut jouer un rôle dans la régulation cellulaire (D.E. VANCE et P.C. CHOY, 1979).

Rares sont les travaux sur les Phospholipides d'invertébrés, aussi nous avons bien peu d'éléments de comparaison.

Récemment, cependant, E.N. LAMBREMONT et P.F. DIAL (1980) ont comparé les Phospholipides du corps gras, des muscles du vol et des testicules de *Acheta domesticus*, et ont montré qu'ils diffèrent dans leur constitution en A.G. Huit A.G. existent dans la Phosphatidyl Choline et la Phosphatidyl Ethanolamine des testicules, mais n'existent pas dans les autres tissus.

D'autre part, l'attachement des deux groupes d'A.G. sur le glycérol définit une espèce de molécule distincte chimiquement qui possède une fonction métabolique spécifique. Des études antérieures sur les P.L. d'Insectes ont montré que, comme chez les Mammifères, les A.G. saturés prédominent habituellement en position 1 et les A.G. polyinsaturés en position 2 (M.A. MADARIAGA et coll. 1974) Les A.G. monoinsaturés semblent au contraire distribués au hasard. Pour la Phosphatidyl Ethanolamine, LAMBREMONT et DIAL (1980) ont trouvé des résultats semblables dans les testicules d'*Acheta domesticus*.

Outre cette étude récente sur un Insecte, citons des études effectuées sur des ANNELIDES, mais elles concernent l'animal en entier.

Chez *Lumbricus terrestris*, CERBULIS et W. TAYLOR (1969) ont trouvé 25 % de Phospholipides.

Chez *Esenia foetida*, J.Mc LAUGHLIN (1971) ne trouve que 11 % de Phospholipides dans l'animal entier.

L'étude de J.Mc. LAUGHLIN (1971) sur *Esenia foetida* montre aussi que les Sphingolipides les plus simples (Céramides, Cérébrosides, Sulfatides et Sphingomyéline) sont peu importants et que dans les glycérophospholipides la Phosphatidyl Choline prédomine (il y a aussi des quantités plus faibles de Phosphatidyl Ethanolamine et Phosphatidyl Sérine).

L'auteur observe aussi que les formes lyso de PS et PE existent, mais pas celle de la PC.

Le développement de l'étude des lipoprotéines chez les INSECTES ont aussi apporté une meilleure connaissance des Phospholipides de l'hémolymphe.

Les lipoprotéines de l'homme possèdent une part importante de Phospholipides, et il en est de même chez les Insectes.

Ainsi H. CHINO, S. MURAKAMI et K. HARASHIMA (1969) sur le ver à soie *Philosomia cynthia*, montrent que si les Diglycérides sont les principaux lipides des vitellogénines, il existe aussi des Phospholipides : PC, PE et Sphingomyéline.

H. CHINO et coll. (1977) chez le même animal montrent aussi qu'il y a moins de Sphingomyéline dans la vitellogénine de l'oeuf que dans celle de l'hémolymphe.

S. IZUMI, S. TOMINO et H. CHINO (1980) chez *Bombyx mori* observent la présence de PC et PE dans la vitelline.

E.C. MUNDALL et J.H. LAW (1979) travaillant sur *Manduca sexta* comparent le contenu en Phospholipides des vitellines de l'oeuf et de l'hémolymphe. Leurs résultats sont reportés dans le tableau suivant :

	Vitelline de l'oeuf	Vitelline de l'hémolymphe
PC	22	22,9
PE	65,8	71
Lyso PE	9,7	5,6
Sphingomyéline	2,5	0,5
	<hr/> 100 %	<hr/> 100 %

On a pu se demander si les PL des lipoprotéines sont transportés par ces lipoprotéines, ou s'ils sont simplement des constituants de celles-ci. K.K. THOMAS et L.I. GILBERT (1967) ont observé chez le ver à soie *Cecropia* que les PL sont libérés du corps gras vers l'hémolymphe et sont liés à une protéine spécifique de l'hémolymphe qui se déplace plus vite que les autres lipoprotéines sur disque d'électrophorèse. De la même façon, H. CHINO et coll. (1969) pensent que les deux vitellogénines de l'hémolymphe de *Philosomia cynthia* transportent les phospholipides en plus des diglycérides, des tissus (tels que le corps gras), vers les sites d'utilisation.

En dehors des Insectes, nous avons aussi une étude effectuée chez un CRUSTACE.

R.F. LEE et D.L. PUPPIONE (1978) observent que 88 % de la lipoprotéine majeur du homard *Panulirus interruptus* sont des phospholipides.

Chez l'homme, dans l'HDL, on a aussi une quantité importante de Phospholipides.

Les principales classes d'Arthropodes, en incluant la classe des Crustacés, ont divergé d'un ancêtre commun il y a environ 600 Millions d'années, au début du Cambrien (CISNE, 1974). Aussi, R.F. LEE et D.L. PUPPIONE (1978) estiment que le procédé de transport des lipides du sérum par le homard, utilisant principalement un phospholipide en association avec une apoprotéine, ont évolué de ce premier ancêtre des Arthropodes.

L'INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS : ESSAI

D'ETUDE DYNAMIQUE DU METABOLISME LIPIDIQUE CHEZ PERINEREIS CULTRIFERA

I - ETUDE DE L'INCORPORATION DE GLYCEROL C¹⁴ DANS LES FRACTIONS "LIPIDES NEUTRES" ET "PHOSPHOLIPIDES"

- a) Evolution de la Radioactivité dans les lipides neutres et les phospholipides de chaque lot
- b) L'incorporation du glycérol C¹⁴ dans les lipides neutres du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes
- c) L'incorporation du glycérol C¹⁴ dans les phospholipides du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes
- d) Conclusion

II - ETUDE DE L'INCORPORATION DU GLYCEROL C¹⁴ DANS LES GLYCERIDES

III - EXPERIENCE DE MISE EN CULTURE D'OVOCYTES EN PRESENCE DE COELOMOCYTES CONTENANT DES GLYCERIDES MARQUES

IV - EXPERIENCE DE MISE EN CULTURE D'OVOCYTES EN PRESENCE DE GLYCEROL C¹⁴ -

V - ESSAI D'IDENTIFICATION DES MOLECULES PORTEUSES DES GLYCERIDES MARQUES

- 1° - Fractionnement sur Sephadex G 25 SF
- 2° - Etude de la radioactivité du pic I
- 3° - Etude de la radioactivité du pic B₁
 - a) Chromatographie sur couche mince des lipides du pic B₂ du liquide coelomique
 - b) Passage du pic B₁ du liquide coelomique sur colonne P₂

VI - ETUDE DE L'INCORPORATION DE L'ACETATE ¹⁴C

- 1° - Evolution de la radioactivité dans les phases aqueuses et chloroformiques
- 2° - Evolution de la radioactivité dans les différentes classes de lipides neutres
 - a) Les MG + DG
 - b) Les stérols
 - c) Les AGL
 - d) Les TG
- 3° - La Biosynthèse des Stérols chez les invertébrés.

L'INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS : ESSAI

D'ETUDE DYNAMIQUE DU METABOLISME LIPIDIQUE CHEZ PERINEREIS CULTRIFERA

Par injection de précurseurs radioactifs, nous avons aussi tenté une étude dynamique du métabolisme chez nos vers.

I - ETUDE DE L'INCORPORATION DE GLYCEROL C¹⁴ DANS LES FRACTIONS "LIPIDES NEUTRES" ET "PHOSPHOLIPIDES".

Nos vers sont répartis en 3 lots. Après injection du glycérol C¹⁴ nous les ponctionnons dans 2 heures pour le 1er lot, 14 heures pour le 2ème et 48 heures pour le 3ème.

Pour chaque lot, le milieu intérieur sera donc prélevé et fractionné en ses trois constituants : liquide coelomique, coelomocytes, ovocytes.

Pour chacune de ces fractions, on extrait les lipides totaux que l'on sépare en lipides neutres et en phospholipides.

Après séchage, lipides neutres et phospholipides sont redissouts dans le même volume de solvant (2 ml), dont on prélève un aliquote de 2 ml pour comptage de la radioactivité.

Tableau F1 : Résultats des comptages (en cpm) après extraction des lipides neutres (LN) et des phospholipides (PL) chez des animaux ayant subi l'injection de glycérol C¹⁴ dans la cavité coelomique.

			cpm	Pourcentage de Radioactivité pour chaque lot		
Lot 2 H	LN	LC	194	780	20	80,5 %
		C	392		40,5	
		O	194		20	
	PL	LC	78	188	8	19,3 %
		C	34		3,5	
		O	76		7,8	
Lot 14 H	LN	LC	14	156	7,2	80,3 %
		C	10		5,1	
		O	132		68	
	PL	LC	2	38	1	19,5 %
		C	16		8,2	
		O	20		10,3	
Lot 48 H	LN	LC	208	1372	9,4	62,2 %
		C	758		34,4	
		O	406		18,4	
	PL	LC	34	828	1,5	37,6 %
		C	420		19,1	
		O	374		17	

A partir du tableau précédent, nous pouvons faire plusieurs observations :

a) Evolution de la Radioactivité dans les lipides neutres et les phospholipides de chaque lot.

2 heures après l'injection, 80 % de la radioactivité se retrouve dans les lipides neutres, principalement dans la fraction coelomocytaire. 14 heures après l'injection, l'importance de la radioactivité dans les lipides neutres n'a pas variée. Cependant, ce sont les ovocytes qui ont concentré le glycérol - ^{14}C -

Dans le lot 48 H, on observe une diminution de la radioactivité dans les lipides neutres, au profit des phospholipides. Mais ce sont les lipides neutres de coelomocytes qui concentrent le plus fort taux de radioactivité.

Il nous a semblé intéressant de reporter les résultats de ce tableau sur plusieurs graphes, pour chaque temps d'incorporation :

Figure F1 = Evolution de la radioactivité dans les lipides neutres et les phospholipides.

Dans les lots 2 H et 14 H, il y a peu d'incorporation de glycérol C^{14} dans les Phospholipides, et les taux d'incorporation restent stables. A 48 H, accentuation de l'incorporation au niveau des phospholipides.

b) Figure F2 = L'incorporation du glycérol C^{14} dans les lipides neutres du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes.

Notons tout d'abord que notre technique de fractionnement du milieu intérieur de *P. cultrifera*, laisse subsister une grande partie du précurseur non consommé par le métabolisme de nos vers, dans le liquide coelomique. On remarque cependant dans le lot 2 H, que c'est dans les coelomocytes que la radioactivité est la plus importante. Ils semblent rapidement incorporer le précurseur.

A 14 H, on observe un important pic de Radioactivité pour les lipides neutres d'ovocytes. Peut-être prélèvent-ils rapidement le précurseur directement dans le liquide coelomique ? Le taux de radioactivité est en effet à 14 H faible dans le liquide coelomique. Les coelomocytes, où le taux de radioactivité est là aussi faible, pourraient aussi libérer une partie de leur radioactivité, ce glycérol étant alors capté par les ovocytes.

fig. F1

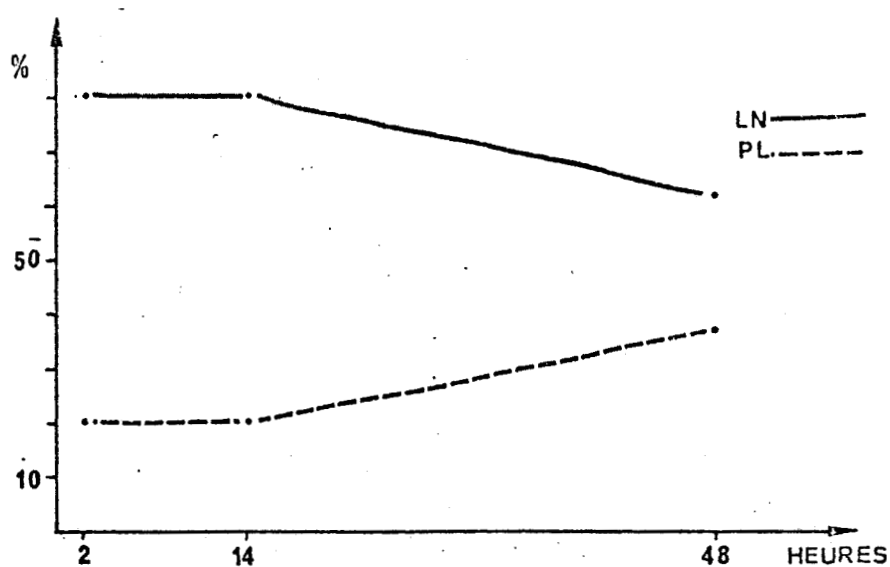


fig. F2

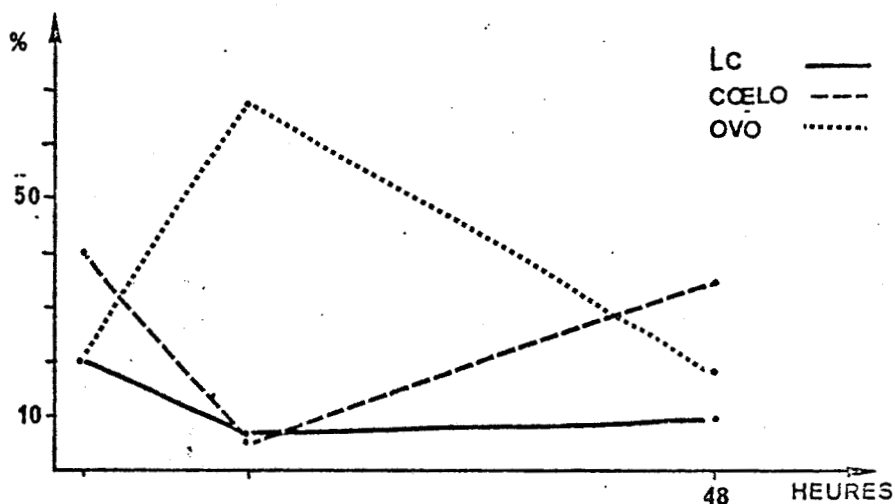


fig. F3

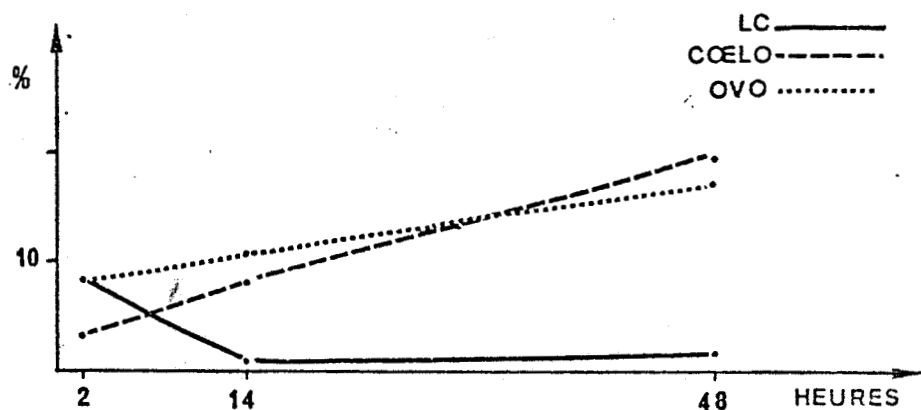


Figure F1 : Evolution de la Radioactivité dans les lipides neutres (LN) et les phospholipides (PL) après injection de glycérol C^{14} .

Figure F2 : L'incorporation du glycérol C^{14} dans les lipides neutres du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes.

Figure F3 : L'incorporation du glycérol C^{14} dans les phospholipides du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes.



Enfin, à 48 H, c'est dans les coelomocytes que l'on trouve le plus fort taux de radioactivité.

A partir de ces observations sur l'évolution de la radioactivité dans les lipides neutres, on peut faire deux hypothèses :

1 - les ovocytes pourraient incorporer rapidement le glycérol C¹⁴, en le prélevant directement dans le liquide coelomique où il se trouve après son injection.

2 - les coelomocytes, au bout de 2 jours d'incubation, incorporeraient activement le glycérol C¹⁴.

c) Figure F3 = L'incorporation du glycérol C¹⁴ dans les phospholipides du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes.

Dans les phospholipides du liquide coelomique, à 2 H, on observe un assez fort taux de radioactivité, mais il s'agit en grande partie sans doute du précurseur qui contamine notre fraction phospholipidique.

Ensuite, dans le liquide coelomique, le taux de phospholipides reste faible, avec une très légère hausse entre 14 H et 48 H.

Dans les coelomocytes et les ovocytes, de 2 H à 48 H, il y a par contre une hausse régulière et importante des phospholipides. L'augmentation du taux de phospholipides dans les coelomocytes se fait de façon un peu plus rapide que dans les ovocytes.

d) Conclusion

Le glycérol C¹⁴ est donc après une demi-journée rapidement incorporé dans les ovocytes où il doit se trouver sous forme de glycérides.

Les coelomocytes l'incorporent ensuite plus tardivement. Il serait intéressant de refaire cette manipulation avec des temps d'incorporation beaucoup plus longs.

Coelomocytes et ovocytes incorporent le glycérol de façon active dans leurs phospholipides. Cette intégration du glycérol marqué dans les molécules de phospholipides se fait de façon relativement lente et régulière.

II - ETUDE DE L'INCORPORATION DU GLYCEROL C¹⁴ DANS LES GLYCERIDES.

Après séparation des différents lipides neutres sur couche mince, nous avons aussi étudié l'incorporation du glycérol dans les glycérides. Les glycérides, une fois séparés et localisés sur la couche mince, sont grattés et élués du gel de silice. Le solvant contenant ces glycérides est alors prélevé, séché et ramené au même volume de 1 ml. Un aliquote de 50 µl est mis en présence de liquide scintillant, pour comptage de la radioactivité. Nos résultats sont exposés dans le tableau suivant (Tableau F2).

Les mono et diglycérides ont été joints au dépôt (qui contient donc une fraction notable de précurseur).

Puisque le glycérol C¹⁴ se retrouve chez nos animaux sous forme libre (= précurseur non consommé par le métabolisme de nos vers), ou sous forme de glycérides (mono-, di- ou triglycérides), la séparation sur couche mince va nous permettre de quantifier l'importance de l'incorporation du glycérol dans les TG.

Tableau F2 : Résultats des comptages des glycérides après séparation sur couche mince.

			Pourcentage de radioactivité pour chaque temps d'incorporation			
			cpm	LC	C	O
Lot 2 H	Dépôt + MG + DG	LC	292	100	64,5	53
		C	58			
		O	122			
	TG	LC	0	0	35,5	47
		C	32			
		O	108			
Lot 14 H	Dépôt + MG + DG	LC	16	100	0	52,8
		C	0			
		O	28			
	TG	LC	0	0	100	47,2
		C	420			
		O	25			
Lot 48 H	Dépôt + MG + DG	LC	78	100	82,4	29
		C	468			
		O	76			
	TG	LC	0	0	17,6	71
		C	100			
		O	186			

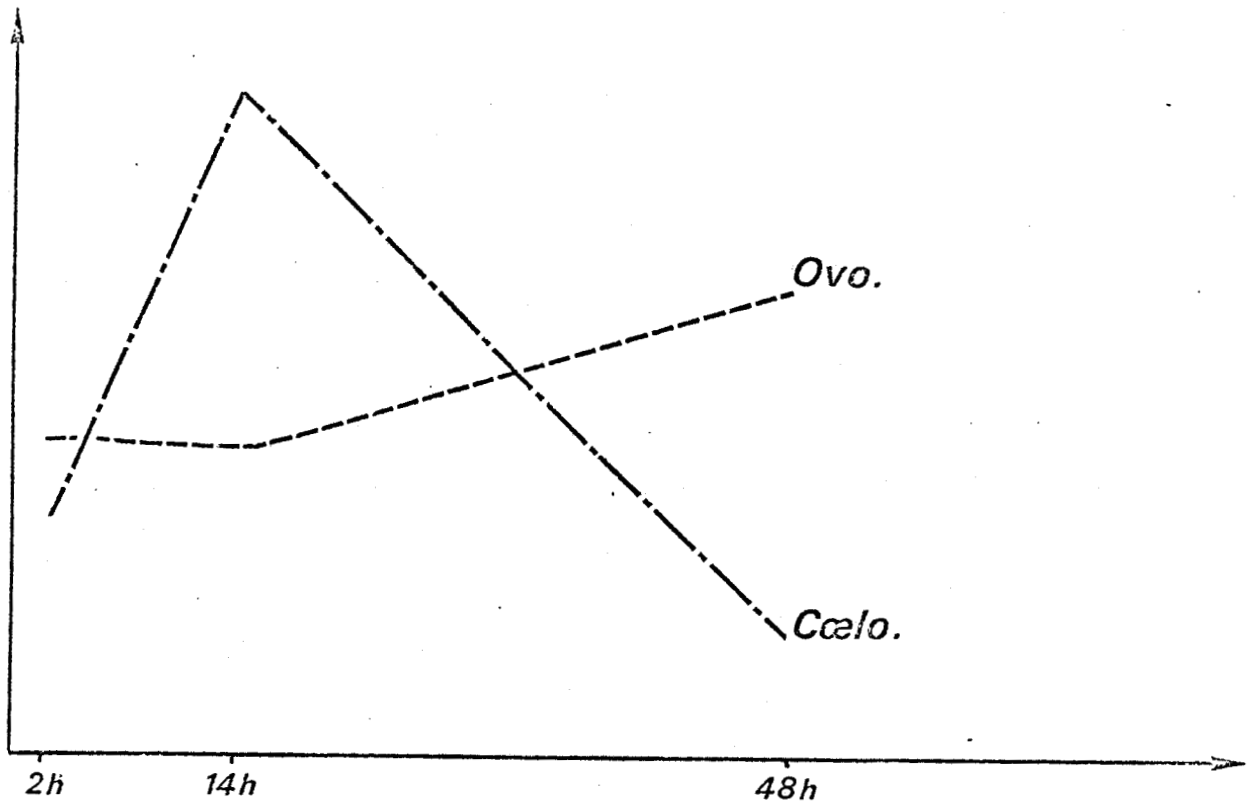
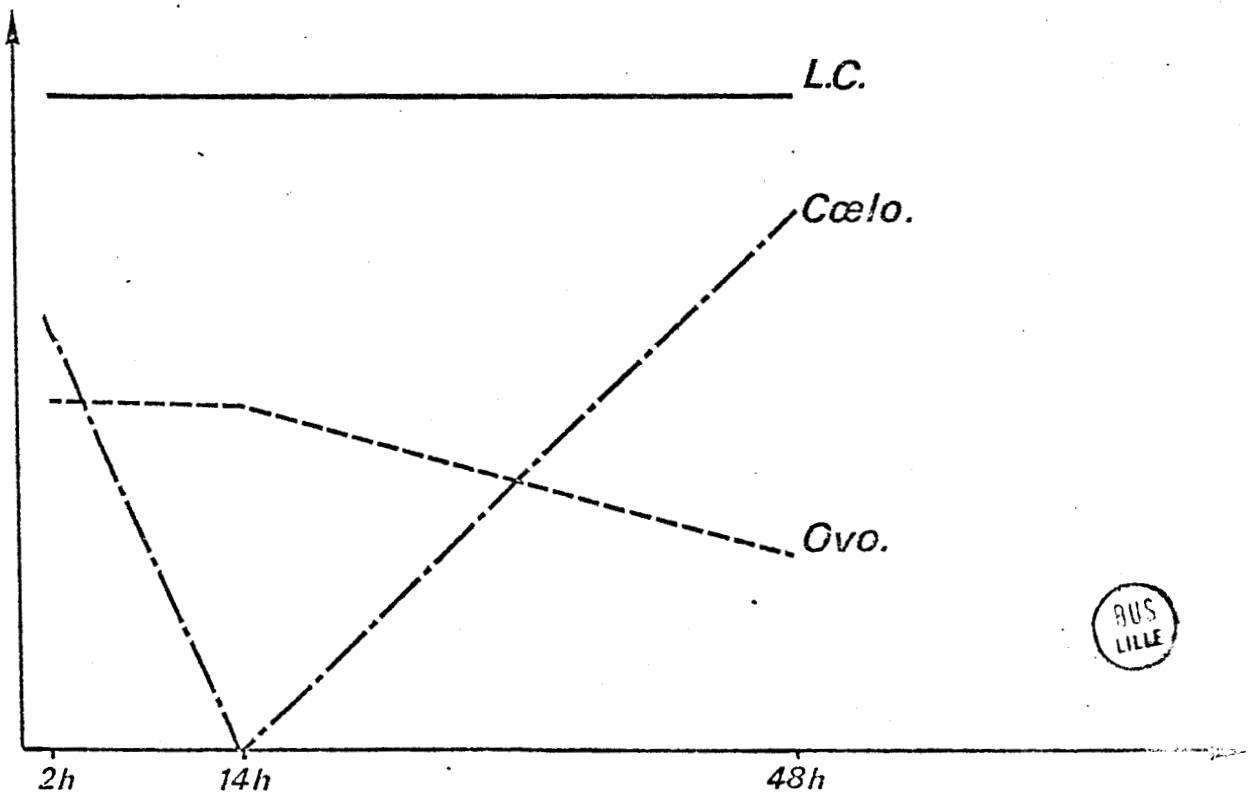


Figure F 4 : a) Evolution de la radioactivité dans les TG des coelomocytes et des ovocytes (dans les TG du liquide coelomique, il n'y a jamais de radioactivité).

b) Evolution de la radioactivité dans les MG + DG du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes.



Les résultats de ce tableau sont mis en évidence par les figures F4 et F5. On observe ainsi que :

. dans le *liquide coelomique*, tous les lipides neutres se retrouvent, quel que soit le temps d'incorporation sous forme de MG ou de DG (mais il s'agit aussi en grande partie du précurseur). Jusque 48 H d'incorporation, on n'a jamais de radioactivité dans les TG du Liquide Coelomique.

. Après 2 H d'incorporation, on trouve rapidement de la radioactivité dans les Mono- et Diglycérides des *Coelomocytes*. Cependant, à 14 H, ces 2 types de glycérides n'existent plus et sont remplacés par des Triglycérides. Après 48 H d'incorporation, ce sont les Mono- et Diglycérides qui dominent à nouveau dans les *Coelomocytes*.

Tout se passe comme si dans les *coelomocytes*, on avait une incorporation active du glycérol- C^{14} qui serait rapidement transformé sous forme de Mono- et Diglycérides. Cependant, cette forme serait passagère : à 14 H, ces glycérides se présentent tous sous forme de triglycérides, qui est la forme de stockage habituelle des cellules animales. Enfin, ces triglycérides seraient eux-mêmes progressivement détruits pour être transformés en Mono ou Diglycérides.

. Dans les *ovocytes*, le phénomène est différent : à 2 H et à 14 H, les taux de MG + DG d'une part, et ceux de TG d'autre part sont semblables (les premiers étant cependant légèrement plus importants que les seconds).

Ensuite, on assiste dans les *ovocytes* à une diminution des MG + DG et à une augmentation en TG, la forme habituelle de réserve.

On peut supposer que MG + DG sont transformés en TG par le métabolisme propre à l'*ovocyte*. On peut aussi observer que, entre 14 H et 48 H, les phénomènes qui se produisent dans *ovocytes* et *coelomocytes* s'inversent.

Remarquons que nos temps d'incubation sont courts. Il serait souhaitable de travailler avec des temps plus longs.

D'après les observations précédentes, on peut imaginer deux processus permettant aux glycérides d'intervenir dans la maturation des *ovocytes*.

1er processus : l'*ovocyte* puise le glycérol directement dans le milieu ambiant, son métabolisme propre le transformant en MG, DG, puis TG.

2ème processus : les *coelomocytes* métabolisent certaines substances qu'elles vont donner, via le liquide coelomique, aux *ovocytes* en voie de maturation.

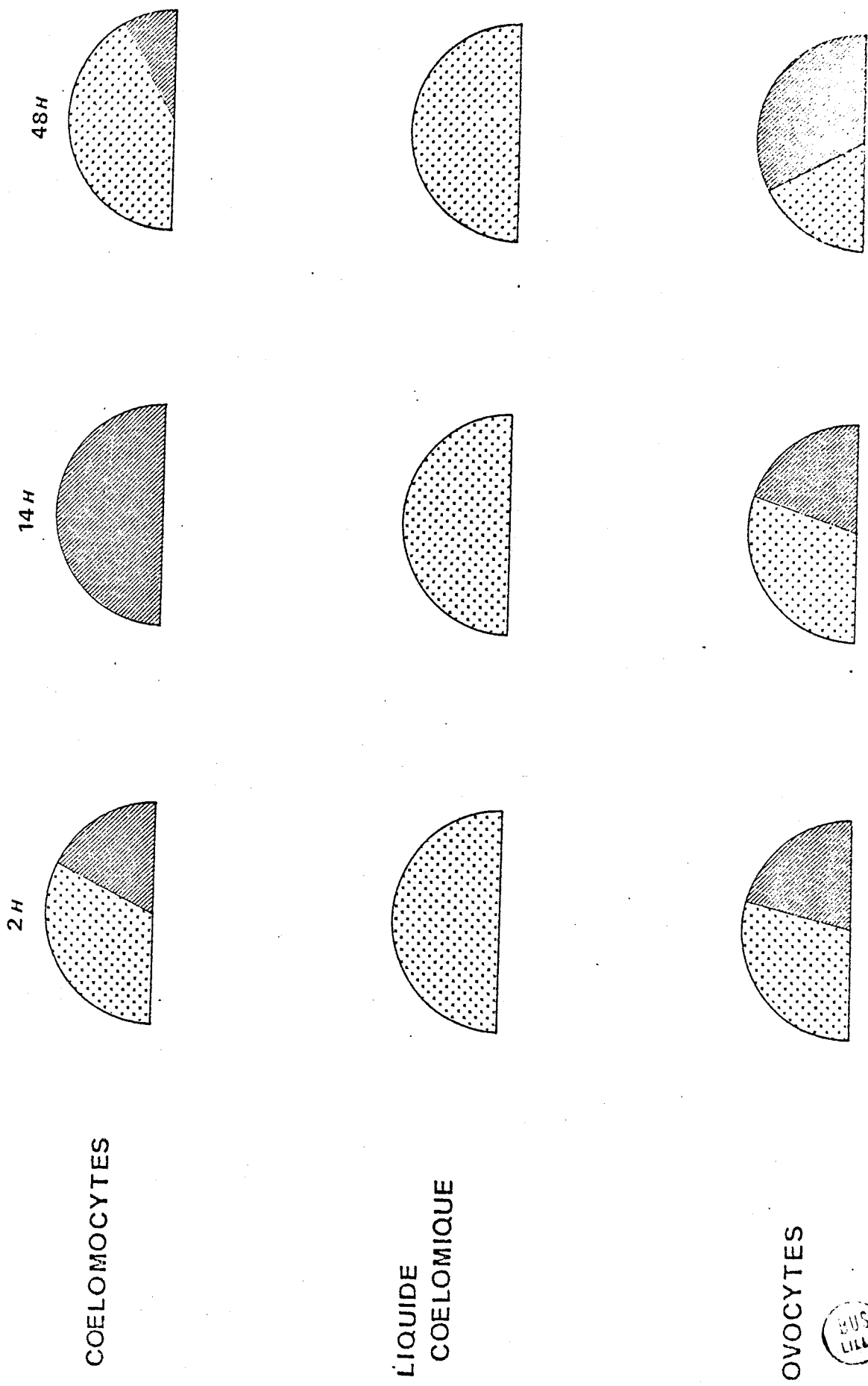


Figure F 5 : L'incorporation du glycérol - 14 C dans les trois fractions du milieu intérieur de *Perinereis cultrifera*



Essayons de vérifier ces 2 hypothèses, sachant qu'elles peuvent très bien coexister : les ovocytes pouvant d'une part synthétiser des molécules complexes à partir d'éléments simples (ce qui a en effet déjà été vérifié avec d'autres précurseurs) ; les ovocytes d'autre part pouvant profiter d'apports extérieurs sous forme de molécules plus complexes (telles que des substances synthétisées par exemple par les éléocytes).

Cette dernière voie, si elle est soupçonnée depuis longtemps, n'a jamais été prouvée de façon certaine.

III - EXPERIENCE DE MISE EN CULTURE D'OVOCYTES EN PRESENCE DE COELOMOCYTES CONTENANT DES GLYCERIDES MARQUES.

1°) 5 animaux sont injectés avec chaque fois 10 µl de glycérol C^{14} .

Après 3 heures, ces animaux sont sacrifiés.

Leur milieu intérieur est ponctionné et fractionné en liquide coelomique, coelomocytes et ovocytes.

2°) Alors que ces animaux étaient sacrifiés, on ponctionne deux animaux n'ayant pas subi d'injection. On en extrait le milieu intérieur. On ne garde que le liquide coelomique et les ovocytes.

Ces ovocytes sont déposés dans une salière avec un milieu de culture ainsi constitué : 0,6 ml de liquide coelomique + 1,2 ml d'eau de mer filtrée et stérile.

3°) Les coelomocytes marqués, provenant de la première manipulation, sont mis dans la salière contenant le milieu de culture tel qu'il a été constitué au paragraphe ci-dessus.

Ces 3 manipulations sont résumées sur la planche suivante et les résultats sont exposés dans le tableau F3.

Tableau F3 : Etude cinétique de la radioactivité après mise en culture d'ovocytes froids en présence de coelomocytes ponctionnés 3 H après l'injection de glycérol C^{14} .

	Milieu de culture		Coelomocytes		Ovocytes	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
Dépôt	56	89,6	152	61,5	158,5	40,7
MG + DG	5,5	8,8	16	4,9	60	15,6
TG	1	1,6	83	33,6	171	43,9

Planche 3 :

EXPÉRIENCE DE MISE EN CULTURE D'OVOCYTES
EN PRÉSENCE DE CÆLOMOCYTES CONTENANT
DES GLYCÉRIDES MARQUÉS AU ^{14}C

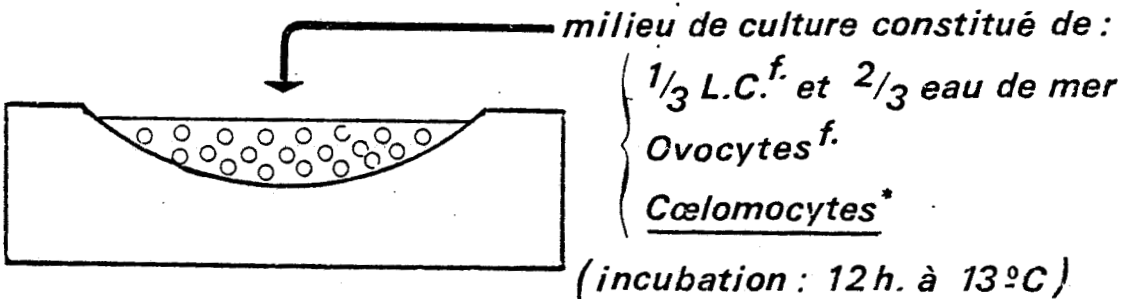
5 animaux sont injectés
avec du glycérol- ^{14}C

Temps d'incubation : 3h.

Liquide Cœlomique*

Cœlomocytes*

Ovocytes*



{ * éléments marqués }
{ f. " froids }

Dans le dépôt, la radioactivité est due à la présence de phospholipides et de glycérol ^{14}C à l'état libre. En effet, on a pu observer que des ovocytes mis en présence d'une concentration élevée en glycérol, l'incorporent immédiatement en grande quantité, les cellules apparaissant alors gonflées.

Les résultats exposés ci-dessus montrent que, dans le *milieu de culture*, les MG + DG sont les seuls glycérides à être marqués de façon sensible, les TG ne l'étant pratiquement pas. Ces quelques TG marqués peuvent d'ailleurs ne venir que de la destruction de coelomocytes, qui libèrent alors leur contenu.

Les coelomocytes, comme les ovocytes, contiennent en effet à la fois des MG + DG et des TG radioactifs, avec une prédominance très nette de la radioactivité dans les TG. On avait déjà observé un phénomène semblable : après 14 H, la radioactivité des TG était aussi plus importante que celle des DG, tout au moins dans les éléments figurés. Il y aurait donc bien transformation des DG en TG par le métabolisme des éléocytes et des ovocytes.

Autre expérience : des animaux qui ont subi l'injection de glycérol ^{14}C sont sacrifiés, comme précédemment (c'est-à-dire après 3 H). Mais ici, leurs coelomocytes marqués sont injectés à des vers possédant des gamètes de même diamètre ovocytaire. Ils sont laissés ainsi 24 H (temps d'incubation semblable à la culture précédente).

Les doses de radioactivité sont faibles et les résultats ne sont donc pas nets.

Néanmoins, on observe :

Pour le liquide coelomique	: Dépôt	* *
	DG	-
	TG	*
Pour les coelomocytes	: Dépôt	-
	DG	*
	TG	*
Pour les ovocytes	: Dépôt	-
	DG	* *
	TG	* *

(les étoiles indiquent une radioactivité plus ou moins intense).

Dans le *liquide coelomique*, on observe la présence de radioactivité dans les TG : cette radioactivité pourrait s'expliquer, partiellement ou totalement, par la destruction de coelomocytes, ceux-ci libérant les TG marqués qu'ils renferment.

Dans le liquide coelomique, les DG ne sont cependant pas marqués : nous travaillons en effet sur des quantités si faibles de matériel que la présence de radioactivité dans les DG peut très bien ne pas être décelée. D'autre part, les DG radioactifs du liquide coelomique ont très bien pu être tous prélevés par les ovocytes.

Pour les *coelomocytes* et les *ovocytes* : radioactivité à la fois dans DG et TG. Cette observation est intéressante, puisque ce sont uniquement des coelomocytes contenant des glycérides marqués qui se sont retrouvés dans l'environnement de nos ovocytes.

Cependant, on ne peut conclure de façon définitive sur une telle expérience, puisque les coelomocytes morts peuvent avoir libéré dans le milieu ambiant des DG et des TG marqués, pouvant être ensuite prélevés par les ovocytes sans que cela implique un transport actif par l'intermédiaire de lipoprotéines.

IV - EXPERIENCE DE MISE EN CULTURE D'OVOCYTES EN PRESENCE DE GLYCEROL C¹⁴

Un milieu de culture est constitué comme précédemment : deux animaux (diamètre ovocyttaire = 130 μ) sont sacrifiés. On leur prélève le milieu intérieur. Les ovocytes sont déposés dans une salière, avec un milieu de culture dépourvu de coelomocytes et ne contenant que du liquide coelomique dilué dans un peu d'eau de mer. Le tout est laissé 12 H à 13°C.

Ensuite, on prélève par centrifugation les ovocytes, dont on extrait les lipides totaux.

Ces lipides sont déposés sur couche mince et on sépare les lipides neutres.

Le gel de silice correspondant au dépôt, aux MG + DG, et aux TG, est chaque fois extrait des lipides qu'il contient. Après prélèvement d'un aliquote de 50 μ l et comptage, on observe que 12 H après la mise en culture, 85 % de la radioactivité se retrouve dans les TG des ovocytes, 5 % dans les MG + DG et les 10 % restant se retrouvent au dépôt (c'est-à-dire dans les Phospholipides, contaminés sans doute par un peu de précurseur).

Cette expérience confirme l'hypothèse précédemment formulée : les ovocytes incorporent donc rapidement le glycérol C¹⁴. Celui-ci est d'autre part très vite métabolisé sous forme de Triglycérides.

V - ESSAI D'IDENTIFICATION DES MOLECULES PORTEUSES DES GLYCERIDES MARQUES

1°) Fractionnement sur Séphadex G 25 SF (Figure F6)

Deux animaux (diamètre ovocytaire : 145-155 μ) sont injectés de glycérol C¹⁴. Ils sont sacrifiés 24 heures après, et leur milieu intérieur est séparé en ses trois constituants.

Le liquide coelomique et les extraits de coelomocytes et d'ovocytes sont alors fractionnés sur colonne de séphadex G 25 superfine. Cette technique de fractionnement et ses conditions d'utilisation sont les mêmes que celles employées dans notre DEA pour l'isolement des macromolécules (pages 16 et suivantes du DEA).

Après fractionnement à l'élugraphe, un aliquote de chaque tube est passé au compteur à radioactivité.

On observe que pour tous nos passages, quelque soit l'extrait passé sur séphadex, on obtient toujours *un pic de radioactivité dans le pic I et un pic de radioactivité dans le pic B₁*.

Même en poursuivant l'élution de notre colonne, on ne trouve pas de pic de radioactivité correspondant au précurseur non consommé par le métabolisme. Or, 24 heures de temps d'incorporation est un temps relativement court chez les Annélides : leur métabolisme n'a sans doute pas consommé tout le glycérol injecté.



2°) Etude de la radioactivité du pic I

Après extraction des lipides totaux, nous séparons phospholipides et lipides neutres du pic I.

Après passage au compteur d'un aliquote, en présence de liquide scintillant, on observe ceci :

- . dans le *liquide coelomique* : seulement de la radioactivité (peu importante) dans les lipides neutres.
- . dans les *coelomocytes* : de la radioactivité dans les lipides neutres et dans les phospholipides (mais surtout dans les lipides neutres).
- . dans les *ovocytes* : même chose que pour les coelomocytes.

Les lipides neutres ont aussi été passés sur couche mince de gel de silice G afin d'en isoler les différentes classes.

Dans les glycérides du pic I, on observe :

- . de la radioactivité (peu importante) dans MG + DG du *liquide coelomique*.
- . pour les *coelomocytes* : de la radioactivité dans MG + DG et dans TG (mais surtout dans MG + DG).
- . pour les *ovocytes* : de la radioactivité dans les MG + DG et dans les TG.

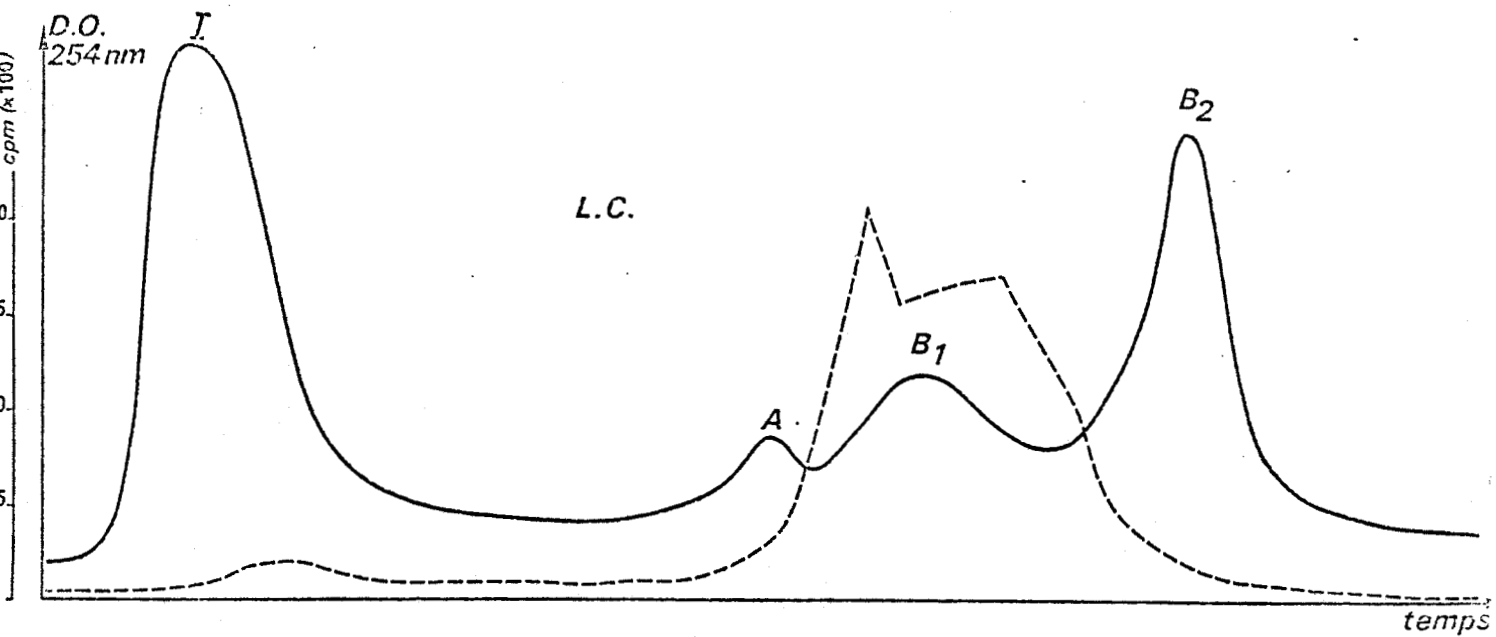
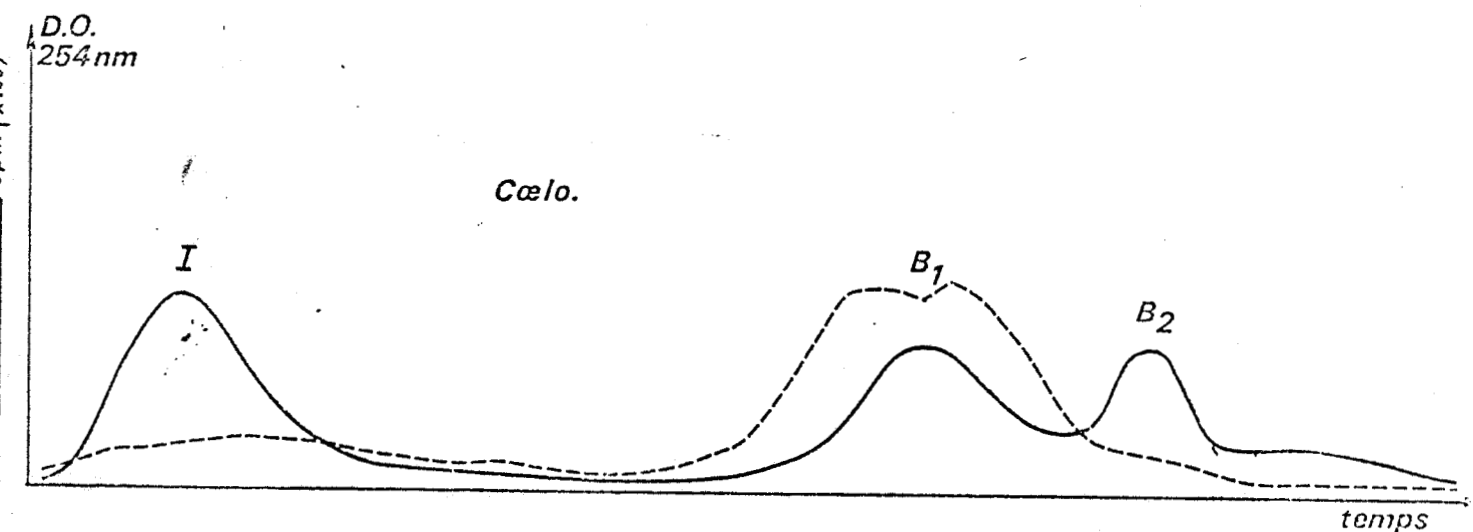


Figure F 6 : -a : Graphe obtenu après passage sur Séphadex G25 superfine du liquide coelomique.

-b : Graphe obtenu après passage sur Séphadex G25 superfine d'extrait de coelomocytes.



Les courbes de radioactivité obtenues après fractionnement sont indiquées en pointillés.

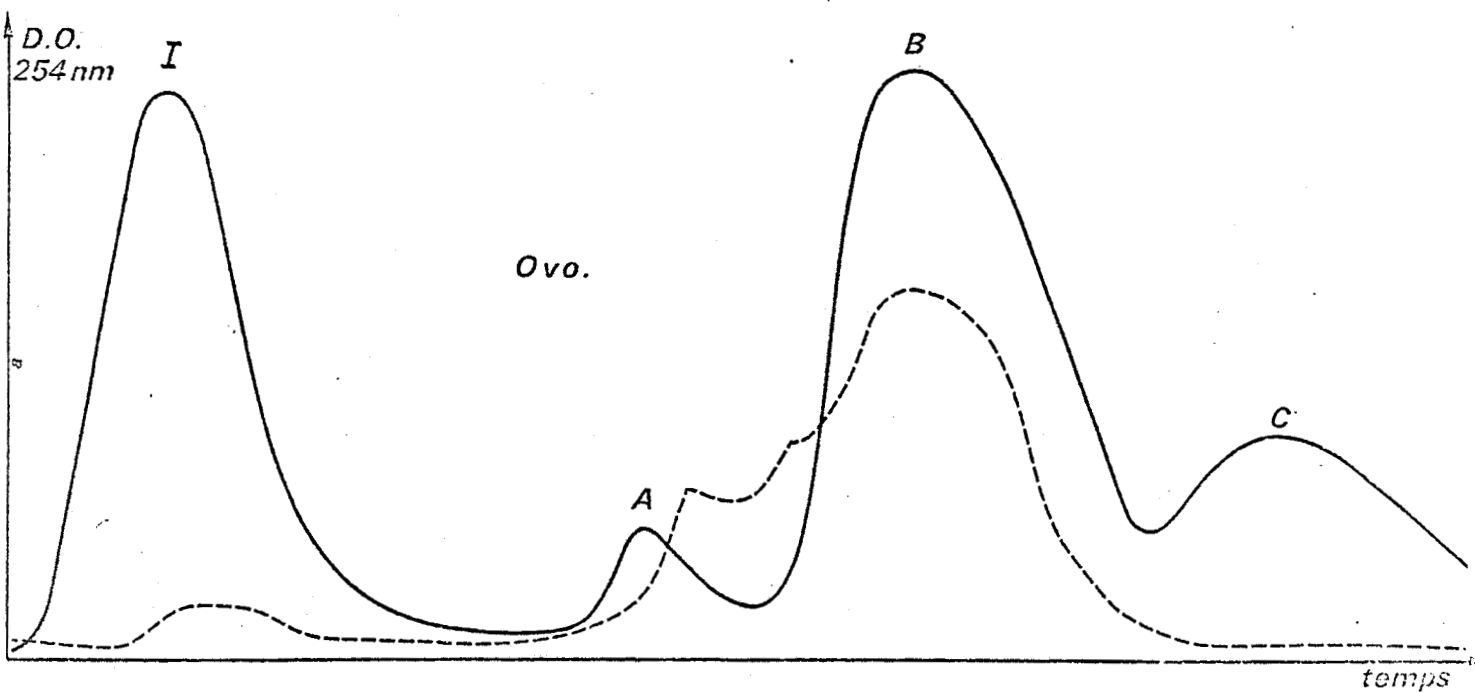


Figure F 6 : -c : Graphe obtenu après passage sur Séphadex G25 superfine d'extrait d'ovocytes.

Les courbes de radioactivité obtenues après fractionnement sont indiquées en pointillés.

On peut supposer que la radioactivité des Pics B_1 obtenus sur Séphadex G 25 SF, est en partie (ou totalement) due au précurseur. Aussi avons-nous recherché la nature de la radioactivité du Pic B_1 .

3°) Etude de la radioactivité du Pic B_1

a) Chromatographie sur couche mince des lipides du Pic B_2 du liquide coelomique.

Notre étude s'est faite sur le Pic B_1 du liquide coelomique. Puisque le Pic de radioactivité correspondant à B_1 contamine le Pic B_2 , nous avons extrait les lipides de B_2 afin de les étudier sur couche mince.

Notre étude révèle que :

- 99 % de la radioactivité de B_2 (contaminé par B_1) est dans le dépôt.
- 1 % se retrouve dans des MG + DG
- Il n'y a pas de radioactivité dans les TG.

b) Passage du Pic B_1 du liquide coelomique sur colonne P_2 (Figure F7)

Nous avons ici cherché à fractionner le Pic B_1 : si la radioactivité correspondant à ce pic est en partie ou totalement due au précurseur, un fractionnement sur un autre type de colonne permettra peut-être d'isoler la radioactivité correspondant au glycérol C^{14} injecté.

Le passage sur colonne P_2 nous donne 2 pics de radioactivité (α et β) qui se chevauchent.

On extrait les lipides totaux de α et de β avec le chloroforme /Méthanol (2 : 1), puis on fait un déphasage : ainsi le précurseur doit se retrouver dans la phase aqueuse et les glycérides dans la phase chloroformique.

Chaque fois, on obtient une radioactivité importante dans les phases aqueuses (il s'agit donc du précurseur). Mais, principalement pour le pic α de radioactivité, il y a de la radioactivité dans la phase chloroformique.

Les lipides (donc les phases chloroformiques de α et de β) sont passés sur CM :

- . Dans le pic α , on a de la radioactivité dans MG + DG et dans les TG.
- . Pour le pic β , on n'a de la radioactivité que dans les MG + DG.

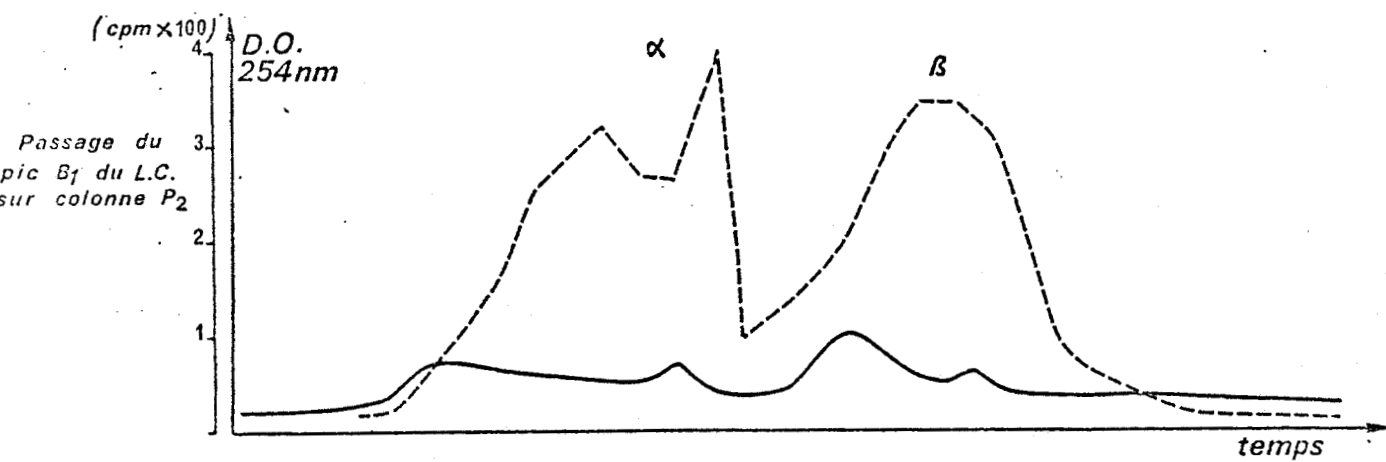


Figure F 7 : Passage du pic B 1 du Liquide Coelomique sur colonne P 2.

La courbe de Radioactivité qui présente 2 pics, est indiquée en pointillés.



Il est difficile de conclure de façon trop tranchée, puisque les pics α et β de radioactivité se contaminent l'un l'autre, mais les observations ci-dessus nous permettent de penser que le précurseur se trouve dans β et que le pic α correspond au contraire à des glycérides.

Si on sépare maintenant les lipides neutres et les phospholipides de α et β , on observe :

- . dans α : il y a de la radioactivité dans les lipides neutres et dans les phospholipides.
- . dans β : la radioactivité se retrouve surtout dans la fraction acéto- soluble (le précurseur, s'il contamine nos lipides, ne précipite pas à l'acétone).

VI - ETUDE DE L'INCORPORATION DE L'ACETATE ^{14}C

Si l'acétate est un substrat peu spécifique des substances lipidiques, son devenir chez nos vers nous apportera néanmoins des informations intéressantes.

Nos vers sont répartis en 4 lots, avec des temps d'incorporation différents : 3 heures, 1 jour, 3 jours et 8 jours.

Chaque lot sera sacrifié, le milieu intérieur étant extrait et fractionné en liquide coelomique, coelomocytes et ovocytes.

Chaque fois, on extrait les lipides totaux avec le solvant de FOLCH :

- . l'insoluble dans le FOLCH est ramené à 3 ml avec de l'eau.
- . la partie soluble dans le FOLCH (contenant principalement nos lipides) est ramenée à 3 ml avec du chloroforme.

Dans la phase aqueuse et dans la phase chloroformique, on prélève chaque fois un aliquote de 50 μl pour comptage de la radioactivité.

La planche suivante résume cette technique de préparation des phases aqueuses et chloroformiques.

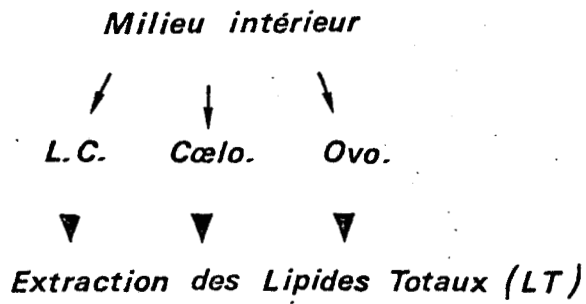
1°) Evolution de la radioactivité dans les phases aqueuses et chloroformiques

Les pourcentages de radioactivité dans les phases aqueuses et chloroformiques du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes, sont exposés dans le tableau F4 et sur les figures F8, F9 et F10.

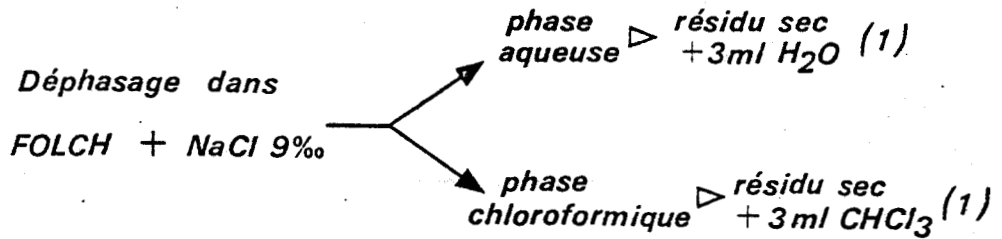


Planche 5 :

ÉTUDE MÉTABOLIQUE APRÈS INCORPORATION
D'ACÉTATE - ^{14}C : LA PRÉPARATION DES PHASES
AQUEUSES ET CHLOROFORMIQUES.



Pour chaque extrait
de Lipides Totaux



(1) on prélève 50µl pour
comptage de la radioactivité

Tableau F4 : Pourcentages de radioactivité dans les phases aqueuses et chloroformiques du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes, pour différents temps d'incorporation.

		3 heures	1 jour	3 jours	8 jours
LC	Ph. aq.	4	7	7,5	5
	Ph. chlorof.	18	21	14	12
C	Ph. aq.	12	13,5	10	2,5
	Ph. chlorof.	14,5	20,5	16,5	7,5
O	Ph. aq.	33,5	29	32	43,5
	Ph. chlorof.	18	9	20	28,5
		100 %	100 %	100 %	99 %

. 3 heures après l'injection, on observe une importante radioactivité dans la phase aqueuse des ovocytes. On a un taux de radioactivité semblable dans les phases chloroformiques du liquide coelomique, des ovocytes et des coelomocytes.

. 1 jour après l'injection, on observe une augmentation de la radioactivité dans les phases aqueuses et chloroformiques du liquide coelomique et des coelomocytes. Dans les ovocytes, on observe au contraire une chute du taux de radioactivité.

. Après 1 jour d'incorporation : on observe une chute régulière du taux de radioactivité dans les deux phases, du liquide coelomique et des coelomocytes. Dans les ovocytes, par contre, le phénomène est inversé : il y a augmentation régulière de la radioactivité dans les deux phases.

Conclusion : Quelque soit le temps d'incorporation, on observe des phénomènes semblables dans les phases aqueuses et chloroformiques du liquide coelomique et des coelomocytes. Dans les ovocytes, les phénomènes sont inversés. D'autre part, dans les ovocytes, c'est la radioactivité des phases aqueuses qui prédomine.

ACÉTATE - ^{14}C

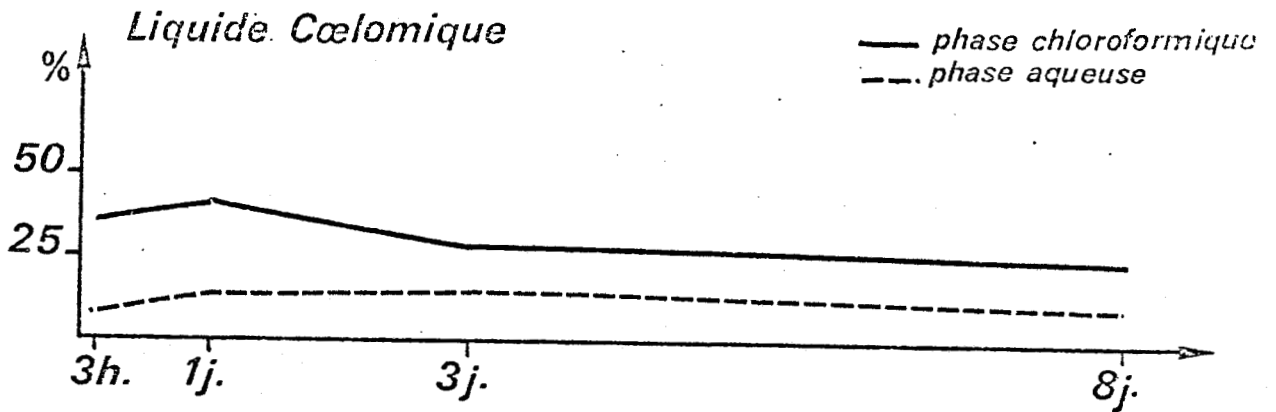


Figure F 8 : Evolution de la radioactivité dans les phases aqueuse et chloroformique du Liquide coelomique.

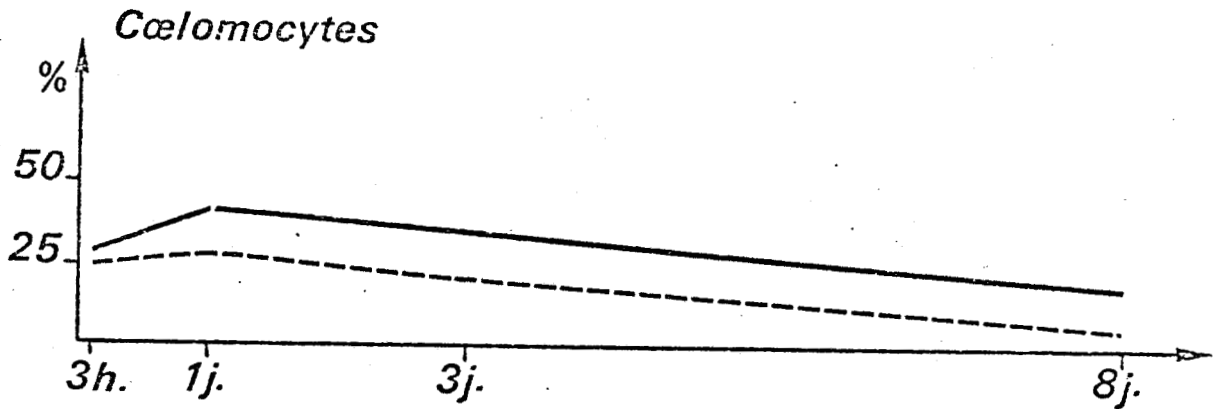


Figure F 9 : Evolution de la radioactivité dans les phases aqueuse et chloroformique des *coelomocytes*.

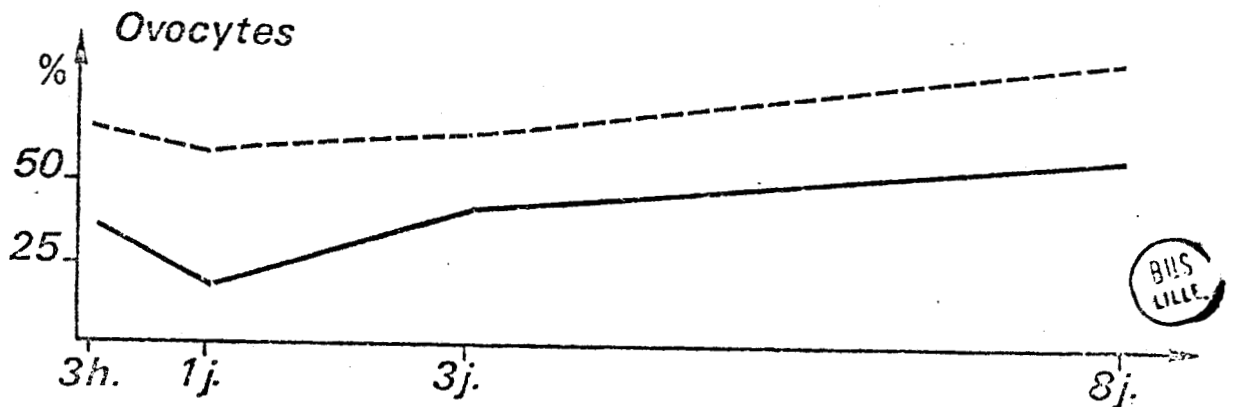


Figure F10 : Evolution de la radioactivité dans les phases aqueuse et chloroformique des *ovocytes*.

BIS
LILLE.

Tout se passe comme si, dans un premier temps, les ovocytes prélevaient directement l'acétate dans le milieu intérieur, ces cellules pouvant rapidement le métaboliser selon leurs besoins. Enfin, 24 heures après, les ovocytes utiliseraient des éléments fabriqués par les coelomocytes et qui leur seraient apportés via le liquide coelomique.

C'est un schéma que nous avons déjà proposé pour les glycérides. Notons que les substances consommées par les ovocytes seraient dans ce cas de préférence des substances de nature lipidique, puisque c'est dans la phase chloroformique que se trouve en grande partie la radioactivité du liquide coelomique et des coelomocytes.

2°) Evolution de la radioactivité dans les différentes classes de lipides neutres

L'acétate pouvant à la fois se convertir en acides gras et en stérols, nous avons séparé sur couche mince les différentes classes de lipides neutres contenus dans les phases chloroformiques.

Nos résultats sont exposés dans le tableau suivant, qui donne les pourcentages de radioactivité dans chaque classe de lipide neutre, pour un temps d'incorporation donné, et pour chacune des 3 fractions du milieu intérieur.

Tableau F5 : La Radioactivité dans les différents lipides neutres, après injection d'Acétate ^{14}C . 1ère colonne : nombre de cpm
2ème colonne : pourcentage de cpm

		3 heures		1 ^{er} jour		3 jours		8 jours	
L.C.	b	2049,6	66,1	1678,6	34,1	155,4	33,5	130,3	40,5
	c	290,8	9,4	1486,5	30,2	29,3	6,3	53,6	16,65
	d	527,9	17	1114,8	22,6	221,6	47,8	53,1	16,5
	e	149,5	4,8	368,1	7,5	49,4	10,7	57,5	17,86
	f	31,2	1	111,2	2,3	0	0	16,9	5,25
	g	50,9	1,6	166,8	3,4	7,8	1,7	10,5	3,26
		3099,9	31	4925,8	38	463,5	10,7	321,9	9,3
Coelo.	b	411,8	33,3	795,3	27,8	52,5	1,6	63,6	17
	c	140,7	11,4	765,1	26,7	58	1,7	38,7	10,3
	d	391,9	31,7	534,6	18,7	150,3	4,5	175,4	46,9
	e	180,7	14,6	572,9	20	2661,6	79,6	74,9	20
	f	60,8	4,9	133,3	4,7	233,2	7	6,2	1,65
	g	50,1	4	60,5	2,1	188,2	5,6	15,2	4
		1236	12,36	2861,7	22,1	3343,8	77,1	374	10,8
Ovo.	b	556,2	9,8	1029,2	20	113,6	21,5	141,7	5,1
	c	154,6	2,7	335,6	6,5	28,6	5,4	97,3	3,5
	d	647,4	11,4	731,2	14,2	104,1	19,7	189,9	6,65
	e	3760,5	66,4	2597,6	50,4	253,5	47,9	1674,5	60,5
	f	351,2	6,2	311,7	6	20,9	3,9	478,4	17,3
	g	193,2	3,4	151,9	2,9	8,5	1,6	167,1	6,75
		5663,1	56,64	5157,2	39,8	529,2	12,2	2768,9	79,3
Total de cpm	9999		12944,7		4336,5		3464,8		

ACÉTATE - ^{14}C

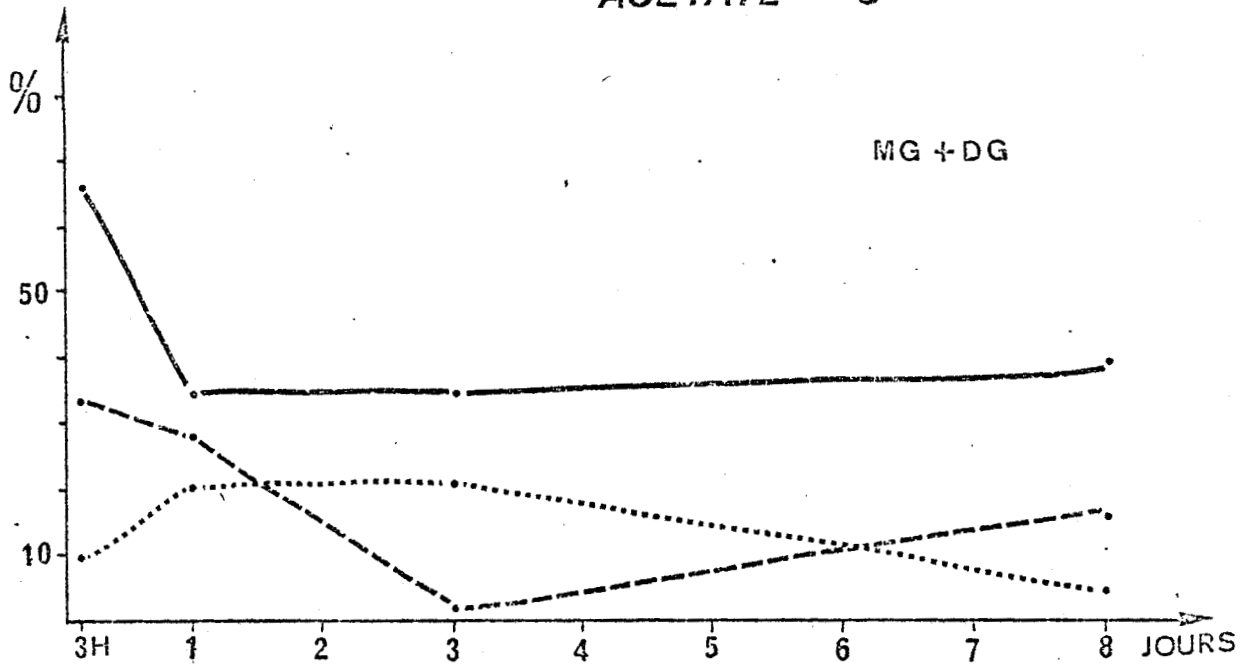


Figure F11 : Evolution de la radioactivité dans les Monoglycérides + Diglycérides du liquide coelomique des Coelomocytes et des Ovocytes, après injection d'Acétate - ^{14}C -

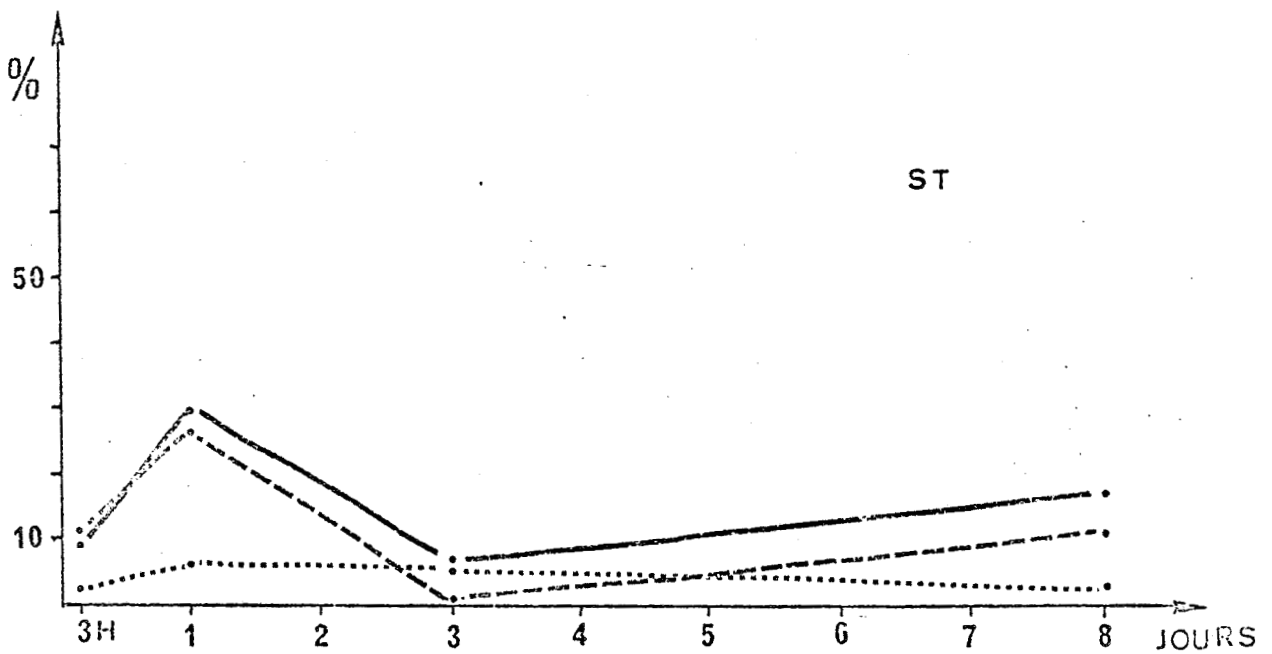


Figure F12 : Evolution de la radioactivité dans les Stérols du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes, après injection d'acétate - ^{14}C -

LC ———
COELO ———

3US
LILLE

ACÉTATE-¹⁴C

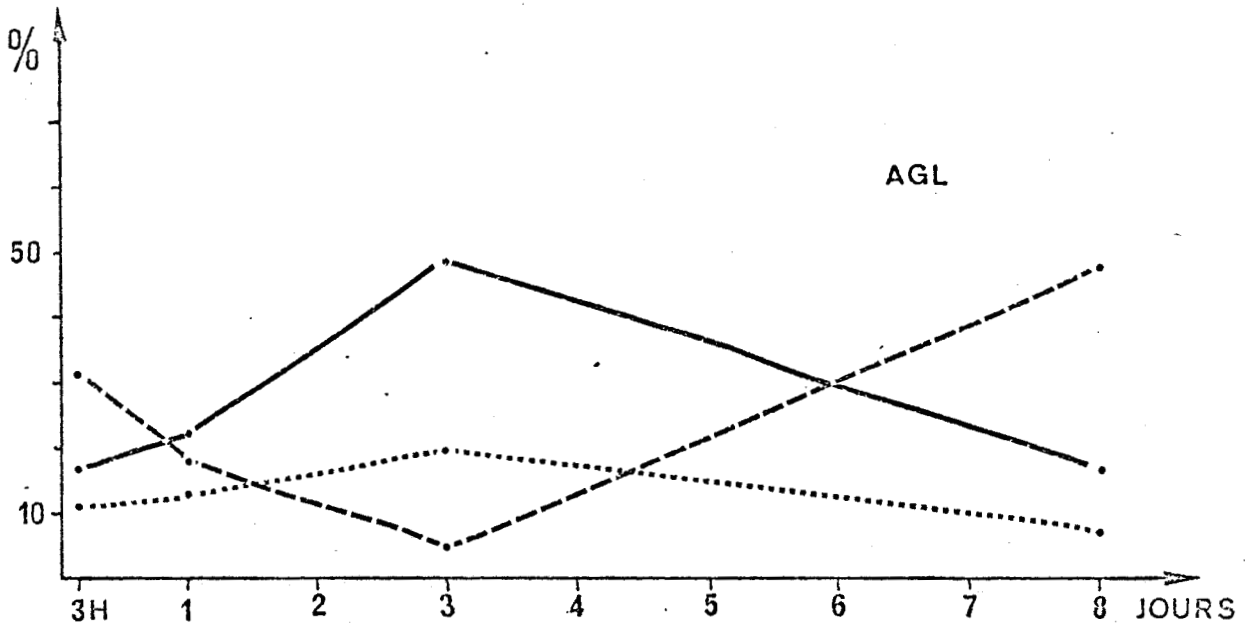


Figure F13 : Evolution de la radioactivité dans les acides gras libres du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes, après injection d'acétate - ¹⁴C -

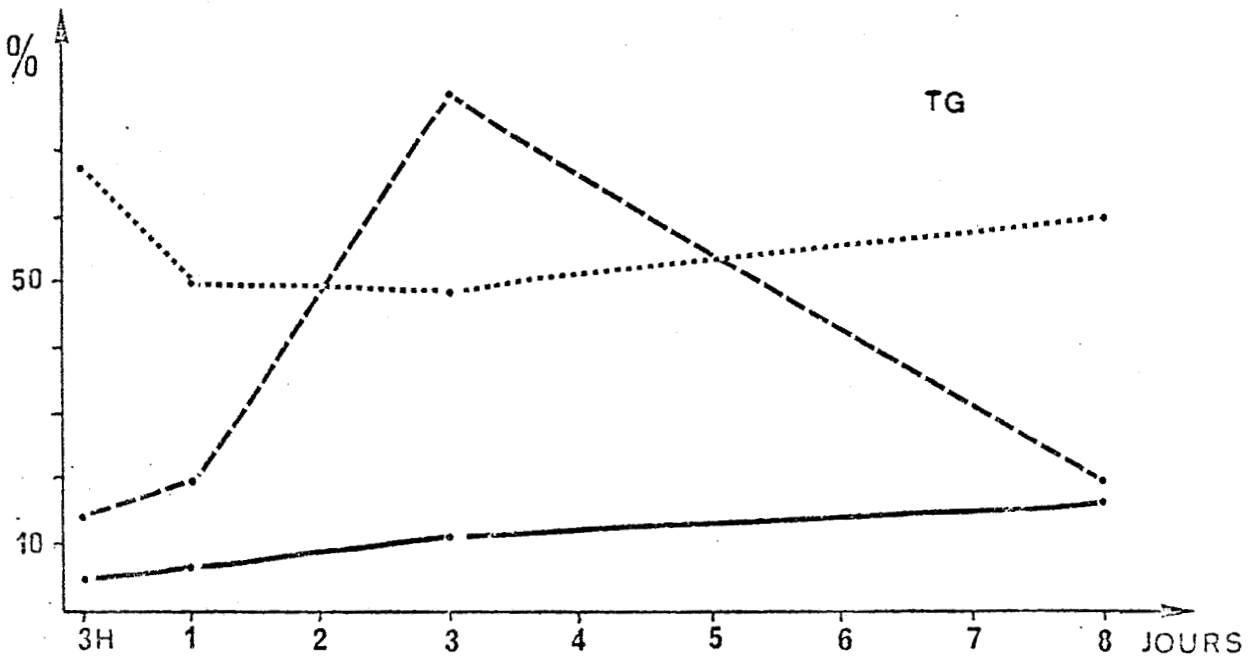


Figure F14 : Evolution de la radioactivité dans les triglycérides du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes, après injection d'acétate - ¹⁴C -



LC —————
 CCELO - - - - -
 OVO



Figure F 15 : Synthèse des résultats exposés sur les figures F 11 à F 14 : la radioactivité dans les glycérides et acides gras libres, dans les trois fractions de *P. cultrifera*, après injection d'Acétate - 14 C.



Les résultats de ce tableau sont exposés sur les graphes suivants (Figures F11 à F14).

a - Les MG + DG :

On observe une chute du taux de radioactivité entre 3 heures et 1 jour d'incorporation, dans le liquide coelomique.

Chute aussi, jusque 3 jours, de la radioactivité dans les MG + DG de coelomocytes. La radioactivité des MG + DG redevient ensuite à nouveau importante.

Dans les ovocytes, la radioactivité est surtout importante entre 1 jour et 3 jours, puis elle diminue.

b - Les stérols :

La radioactivité existe ici surtout dans les coelomocytes et le liquide coelomique après un jour d'incorporation. Elle est à peu près nulle dans les ovocytes.

c - Les AGL :

La radioactivité existe surtout dans le liquide coelomique où elle augmente jusque 3 jours, puis chute ensuite.

Dans les ovocytes, on observe un phénomène semblable au liquide coelomique, mais de plus faible amplitude.

Dans les coelomocytes, le phénomène par rapport au liquide coelomique est tout à fait inversé : diminution de la radioactivité jusque 3 jours, augmentation ensuite.

d - Les TG :

La radioactivité est particulièrement élevée dans les TG d'ovocytes, et pour les coelomocytes après 3 jours d'incorporation.

Pour les deux dernières taches obtenues sur couche mince (la tache de lipides inconnus et celle de stérols estérifiés), la radioactivité est à peu près inexistante.

Faisons une étude comparée des graphes représentant les taux de radioactivité des MG + DG, des AGL et des TG.

. Pour les coelomocytes : il semble y avoir rapidement synthèse de MG + DG, qui sont presque aussitôt remplacés par des TG (prédominant à 3 jours d'incorporation). Ensuite, ces TG sont eux-mêmes hydrolysés et on assiste à une augmentation des MG + DG et des AGL.

Ainsi, pour les coelomocytes, la courbe des TG est l'inverse de celles des AGL et des MG + DG.

. Pour les ovocytes : les phénomènes sont inversés par rapport aux coelomocytes. Les ovocytes ont une forte teneur en TG, mais qui baissè légèrement entre 1 jour et 3 jours, alors que leurs taux de MG + DG et d'AGL augmentent. Ensuite, c'est la synthèse de TG qui prédomine.

. Pour le liquide coelomique : on observe que le taux de MG + DG est toujours très élevé, qu'il est particulièrement important après 3 heures, puis qu'il chute ensuite pour augmenter légèrement jusqu'à 8 jours d'incorporation tout au moins.

Les triglycérides restent toujours à un niveau faible, mais qui augmente progressivement de 3 heures à 8 jours.

Les AGL du liquide coelomique augmentent, passent par un maximum à 3 jours, puis diminuent.

Dans le liquide coelomique, on n'observe ainsi aucune relation entre ce qui se passe pour les MG + DG, pour les AGL, ou pour les TG. Celà est d'ailleurs normal, puisque le liquide coelomique n'est pas un lieu de synthèse de glycérides, mais sa constitution est une conséquence de ce qui se passe ailleurs, dans les cellules, notamment ici les éléocytes et les ovocytes.

La tache qui correspond à des stérols libres (en ne se référant qu'à la valeur du R_f) doit être considérée à part. En effet, si elle est assez fortement radioactive après 1 jour d'incubation avec l'acétate ^{14}C , comme cela a déjà été dit, cette tache est en fait assez complexe. L'étude en chromatographie en phase gazeuse y a révélé en effet la présence d'acides gras. La radioactivité ne serait-elle pas due uniquement à la présence d'acides gras ? Objectons cependant, que la radioactivité n'existe que dans le liquide coelomique et dans les coelomocytes, et qu'elle est à peu près nulle dans les ovocytes. L'évolution de la radioactivité entre liquide coelomique et coelomocytes y est ainsi tout à fait comparable.

Néanmoins, nous avons entrepris un autre type de recherches : nous avons déposé sur couche mince de gel de silice G des taches éluées correspondant à des "stérols" de liquide coelomique, coelomocytes, ou ovocytes ayant été en présence d'acétate marqué, pendant 1 jour. (Figure 16).

Le solvant utilisé est le Benzène.

Nous utilisons comme témoins :

- une solution de cholestérol
- des "stérols" d'ovocytes de 115 μ , obtenus après fractionnement sur couche mince des lipides neutres et élution.

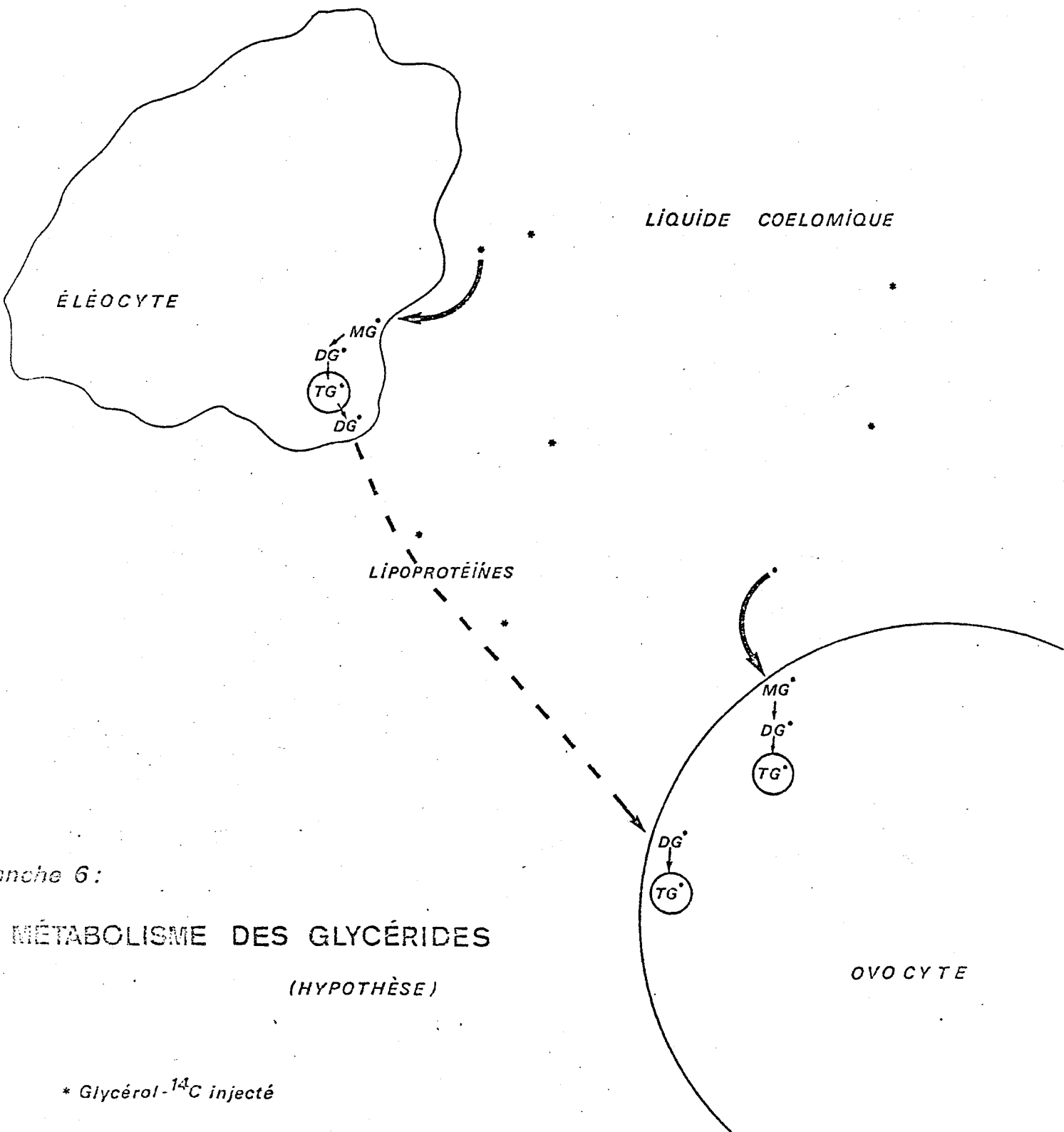


Planche 6:

MÉTABOLISME DES GLYCÉRIDES

(HYPOTHÈSE)

* Glycérol-¹⁴C injecté

AUS
LILLE

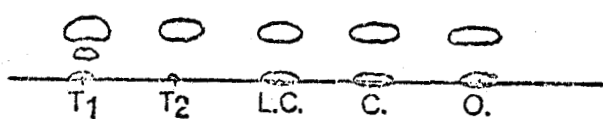


Solvant : le Benzène

T₁ : "stérols" d'ovocytes de 115 μ



T₂ : cholestérol (solution témoin)



L.C. } "stérols" de
C. } ces 3 fractions
O. }

Figure F16 : Chromatographie sur couche mince de "stérols" de liquide coelomique, coelomocytes et ovocytes, issus d'animaux ayant subi 1 jour d'incubation en présence d'Acétate 14 C.

Après migration, on observe une tache (correspondant aux stérols) et un spot subsiste au dépôt.

Les 2 taches sont éluées, séchées, reprises dans 200 µl, de Folch. 50 µl sont prélevés pour comptage.

On observe :

- . Pour le liquide coelomique : radioactivité au niveau de la tache correspondant aux stérols libres.
- . Pour les coelomocytes : radioactivité au niveau de la tache de stérols et au niveau du dépôt.
- . Pour les ovocytes : radioactivité au niveau du dépôt et des stérols.

Une manipulation identique a été faite pour des "stérols" d'animaux ayant subi 8 jours d'incubation : on obtient des résultats semblables.

Le tableau suivant résume nos observations :

Tableau F6 : La radioactivité au niveau des stérols et du dépôt après fractionnement des lipides sur couche mince (Solvant : le Benzène).

		Dépôt	Stérols
LC	1 J	0	*
	8 J	* *	*
C	1 J	* *	*
	8 J	*	* * *
O	1 J	* *	*
	8 J	*	* *

Les étoiles indiquent l'importance de la radioactivité observée (importance relative entre la radioactivité des stérols et du dépôt du même échantillon).

Ces observations nous laissent donc penser que des stérols sont synthétisés à partir d'acétate.

D'autre part, les variations de radioactivité observées après différents temps d'incorporation peuvent nous laisser penser que les coelomocytes sont un site important pour cette synthèse.

Afin de confirmer la présence de stérols radioactifs, une autre manipulation a été effectuée : des "stérols" de coelomocytes et d'ovocytes, mis en présence d'acétate marqué durant 3 jours, ont été élués de la couche mince lors de la séparation des lipides neutres. Les éluats sont séchés, récupérés dans l'alcool à 96°, mis en présence d'une solution aqueuse de digitonine. Il doit alors y avoir précipité des stérols (on rend plus visible ce précipité par addition d'un peu de cholestérol). Le précipité est repris dans 250 µl de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, puis 50 µl sont prélevés pour comptage.

On observe alors de la radioactivité, celle-ci étant particulièrement importante pour les ovocytes, qui ont d'ailleurs à 3 jours, un taux plus élevé de radioactivité dans la tache de stérols (taux supérieur aux coelomocytes).

3°) La Biosynthèse des Stérols chez les Invertébrés.

Les résultats exposés ci-dessus nous laissent penser que *Perinereis cultrifera* peut synthétiser des stérols à partir d'Acétate. Une étude complémentaire serait néanmoins intéressante pour confirmer cette hypothèse et connaître la nature des stérols.

Outre les Insectes, bien peu de travaux existent sur la nature des stérols d Invertébrés. Citons néanmoins : M.L. SWIFT et M.B. GHASSEMIEH (1980) et S.I. TESHIMA et G.W. PATTERSON (1980, 1981), chez l'huître *Crassostrea virginica* ; D. SICA (1980) chez des Mollusques Gastéropodes et céphalopodes ; A. KANAZAWA et coll. (1977) chez les Coelentérés, M.V. PIRETTI et G.P. SERRAZANE chez la crevette *Penaeus cheraturus*. Pour les Annélides, nous avons les travaux de P.A. VOOGT (1974 a et b) et J.A. BALLANTINE (1978).

Nous l'avons déjà écrit (cf. pages 8 et 9) de nombreux Invertébrés ne peuvent synthétiser de stérols à partir de simples précurseurs, tels que l'acétate. C'est le cas des Insectes, des Arachnides, des Crustacés,...

Chez les Annélides, animaux moins évolués, nous serions tentés de penser qu'il en est de même. Cependant le problème est plus complexe.

P.A. VOOGT (1974 b) travaillant sur différents oligochètes, montre que *Tubifex tubifex* et *Enchytraeus buchholtzi* peuvent synthétiser des stérols à partir d'acétate. Au contraire *Lumbricus terrestris* ne peut le faire, ni à partir d'acétate, ni à partir de mévalonate. Cela serait dû à son milieu de vie terrestre.

P.A. VOOGT (1974 a) a aussi étudié la Biosynthèse des stérols chez les Polychètes : *Nereis diversicolor*, *Nephtys hombergii* et *Spirographis spallanzani* ne peuvent synthétiser des stérols à partir d'acétate - ¹⁴C -

VOOGT cite d'ailleurs les résultats de différents auteurs qui, chez *Arenicola marina* et *Amphitrite ornata*, vont dans le même sens.

Notre étude chez *Perinereis cultrifera* semble ainsi être confirmée. On peut supposer que la capacité de synthétiser des stérols est une propriété commune aux Polychètes.

CONCLUSION

Dans notre D.E.A. nous avons étudié les relations métaboliques entre le Liquide Coelomique, les Coelomocytes et les Ovocytes chez *Perinereis cultrifera*. Nous avons ici complété cette recherche en s'attachant uniquement au métabolisme lipidique de ces vers.

Au cours de l'ovogenèse on observe une augmentation de l'importance relative des éléments figurés par rapport à la masse totale de substance sèche du milieu intérieur. Ce sont surtout les lipides qui en sont responsables. Ces lipides constituent d'ailleurs une part importante du milieu intérieur de *P. cultrifera* (jusqu'à 30 % de la masse totale de substance sèche). Les Ovocytes, au cours de leur maturation, concentrent une grande partie de ces lipides qui finissent par représenter 40 % de leur résidu sec. Ce taux important de lipides des Ovocytes succède à une teneur importante dans les Coelomocytes, puis le Liquide Coelomique.

Les différentes classes de lipides évoluent assez différemment dans les trois fractions, Liquide Coelomique, Coelomocytes et Ovocytes.

Les Monoglycérides et Diglycérides (que nous n'avons pas séparés dans nos dosages) sont surtout abondants dans le Liquide Coelomique, où ils représentent 30 % des lipides neutres chez les animaux jeunes, mais plus que 15 % à l'approche de la maturité génitale. Ils sont par contre moins abondants dans Coelomocytes et Ovocytes.

Les Triglycérides sont au contraire importants dans les Coelomocytes, où ils tendent à augmenter, et dans les Ovocytes, où leur importance diminue au cours de l'ovogenèse. Nous avons aussi observé qu'en conditions an hormonales les Triglycérides s'accumulent dans les Coelomocytes (mais que de telles conditions n'ont aucune influence sur les Ovocytes).

Avec ces résultats nous avons pu faire une analogie avec ce que l'on observe chez les Insectes : taux élevé de Diglycérides dans l'hémolymphe, et de Triglycérides dans un tissu de réserve, le Corps Gras.

Dans les Coelomocytes une modification importante du métabolisme se produit vers 150 μ , puisqu'à ce stade il y a augmentation du taux d'Acides Gras Libres.

L'étude des Phospholipides nous a aussi montré une modification du métabolisme vers 140-150 μ .

A ce stade il y a en effet dans les Phospholipides d'Ovocytes des variations des taux d'acides gras insaturés et saturés, de la longueur de chaîne de ces acides gras et du taux d'acide oléique par rapport à l'acide vaccénique. Après 150 μ , plus aucune modification ne semble affecter ces acides gras.

A 140 μ , la nature des Phospholipides d'Ovocytes est aussi différente : il y a chute des taux de Phosphatidyl Sérine et de Phosphatidyl Ethanolamine par rapport au taux de Phosphatidyl Choline.

Dans les Coelomocytes, des dosages montrent aussi la prédominance de la Phosphatidyl Choline avant 140 μ . Le taux de Phosphatidyl Choline diminue ensuite au profit de la Phosphatidyl Sérine et Phosphatidyl Ethanolami

L'incorporation du Glycérol - ¹⁴C a d'autre part montré une importante synthèse de Phospholipides, à la même période de l'ovogenèse, à la fois dans les Coelomocytes et les Ovocytes.

Il est intéressant ici de rappeler ce que l'on avait observé dans notre D.E.A. : une fraction macromoléculaire existe à la fois dans le Liquide Coelomique, dans les Coelomocytes et dans les Ovocytes. Nous avons observé que cette fraction prend de l'importance au moment de la submaturité génitale, notamment dans les Coelomocytes. Vers 140 μ , elle s'enrichit particulièrement en glucides avec, depuis le stade ovocytaire de 120 μ , apparition d'Acide Sialique dans Coelomocytes et Ovocytes, et augmentation du Galactose et du Fucose dans les Coelomocytes, et du Galactose, Fucose, Rhamnose, N-Acétyl Hexosamines dans les Ovocytes.

Comme dans l'étude du métabolisme lipidique on observe donc toujours l'apparition d'une intense activité métabolique en prévitellogenèse, notamment dans les Coelomocytes.

D'autre part, dans notre D.E.A, nous avons pu montrer que les Coelomocytes sont d'importants lieux de synthèse des acides gras contenus dans la fraction macromoléculaire : les acides gras appartenant aux quatre séries métaboliques apparaissent d'abord dans les Coelomocytes. Cela a particulièrement été montré pour les acides gras des séries palmitoléique, linoléique et linolénique. D'autre part la biosynthèse des acides gras saturés (hélice de WAKIL) s'effectuerait aussi dans la fraction coelomocytaire.

Les Coelomocytes apparaissent ainsi comme un lieu important de stockage et de biosynthèse d'acides gras, leur évolution se faisant souvent parallèlement avec le Liquide Coelomique. Par contre les Ovocytes semblent le plus souvent consommer ces acides gras.

Comment est favorisé et orienté le métabolisme de ces acides gras ?

Chez des Vertébrés, comme chez certains Invertébrés, on sait qu'il existe un mécanisme endocrine qui intervient aussi bien sur la synthèse des acides gras, que sur leur libération dans le milieu intérieur (sérum ou hémolymphe).

Nous avons observé que les conditions an hormonales favorisent la mise en réserve de lipides (sous forme de Triglycérides) par les Coelomocytes, mais que cela n'a aucun effet sur les réserves ovocytaires. Les Coelomocytes semblent donc sensibles à un facteur hormonal.

D'autre part les conditions an hormonales favorisent la libération des acides gras des Stérois Estérifiés des Coelomocytes et des Ovocytes. Cependant, dans les Coelomocytes, cela ne se traduit pas par une hausse de Stérois : ces Stérois (sous forme libre ou estérifiée) sont vraisemblablement libérés dans le milieu intérieur.

On a pu en effet observer que si les Stérois Estérifiés apparaissent précocement dans les Coelomocytes, c'est dans le Liquide Coelomique qu'ils atteignent un taux de plus en plus élevé, jusqu'à représenter 25 % des lipides neutres à 130 μ . Notons que les acides gras des Stérois Estérifiés du Liquide Coelomique, des Coelomocytes et des Ovocytes sont assez semblables avec un important taux d'acides gras saturés, présence surtout d'acides gras à 18 carbones, et prédominance de l'acide oléique sur l'acide vaccénique.

D'autre part l'augmentation de la teneur en Stérois libres dans les Coelomocytes et le Liquide Coelomique se fait de façon parallèle. L'injection d'Acétate - ¹⁴C montre aussi une augmentation parallèle de la radioactivité dans la fraction stérolique des Coelomocytes et du Liquide Coelomique.

Dans les Ovocytes les Stérois libres ne sont abondants qu'à l'approche de la maturité génitale et chutent ensuite.

Les Stérols d'Annélides sont peu étudiés. Beaucoup d'hormones et de phéromones sont des stéroïdes : nos résultats nous laissent penser à un rôle endocrine possible de ces Stérols de *P. cultrifera*. On peut notamment rappeler l'existence d'une substance feed-back qui agit sur l'activité endocrine du cerveau (C.CARDON et M.PORCHET, 1973) et qui pourrait très bien avoir une composante stérolique.

Que ce soit dans le métabolisme protéique, glucidique, ou lipidique, la fraction coelomocytaire joue donc un rôle particulièrement important.

Dans cette étude, l'injection de précurseurs radiatifs (Glycérol - ¹⁴C et Acétate - ¹⁴C) nous ont fourni des résultats particulièrement intéressants.

D'une part les Ovocytes peuvent incorporer activement le Glycérol et le métaboliser sous forme de Triglycérides.

D'autre part les Coelomocytes incorporent aussi ce Glycérol et le métabolisent en Monoglycérides, Diglycérides et Triglycérides, puis libèrent ces glycérides dans le Liquide Coelomique sous forme de Mono ou Diglycérides.

L'injection d'Acétate - ¹⁴C confirme et complète ces résultats : il y a bien formation de Triglycérides dans les Coelomocytes. Ces Triglycérides sont ensuite catabolisés en glycérides plus simples avec libération d'acides gras. Les Mono et Diglycérides restent à des taux élevés dans le Liquide Coelomique.

On peut ainsi imaginer deux voies possibles pour la pénétration des lipides servant à la maturation ovocytaire :

1er processus : les ovocytes puisent le matériel dont ils ont besoin directement dans le liquide coelomique.

2ème processus : les coelomocytes métabolisent les glycérides.

Ces glycérides s'accumulent dans les cellules coelomiques sous forme de Triglycérides. Ceux-ci sont ensuite libérés dans le Liquide Coelomique et gagnent l'Ovocyte sous forme de Mono ou Diglycérides. Dans l'Ovocyte, les glycérides sont alors mis en réserve sous forme de Triglycérides.

Le premier processus avait déjà été mis en évidence pour d'autres précurseurs : l'Ovocyte peut puiser directement dans le Liquide Coelomique des monosaccharides et des acides aminés, et les utiliser pour réaliser ses

synthèses de vitellus et d'alvéoles corticaux (A. DHAINAUT, 1967; A. DHAINAUT et M. PORCHET, 1977 a et b).

Le deuxième processus est assimilable à ce qui a déjà été mis en évidence chez les Insectes. L'hémolymphe transporte les glycérides sous forme de Diglycérides véhiculés par une lipoprotéine. Cependant le nombre peu important de vésicules de pinocytose que les études ultrastructurales ont mis en évidence au niveau de l'enveloppe ovocytaire, laisse présager que seul un matériel de faible poids moléculaire peut pénétrer dans l'Ovocyte.

Par les techniques d'immunoélectrophorèse nous avons testé la fraction macromoléculaire des Coelomocytes (A. DHAINAUT, M. PORCHET et F. FONTAINE, 1980) : ces cellules possèdent au même moment les mêmes déterminants antigéniques que le Liquide Coelomique et les Ovocytes. A partir de 120 μ , jusqu'à la maturité, il existe ainsi un matériel identique. Cette substance n'existe pas chez les mâles ou les très jeunes femelles. FISCHER (1979), chez *Nereis virens* avait lui aussi montré l'existence d'un antigène commun au Liquide Coelomique et aux Ovocytes. Cet auteur l'assimile à une vitelline.

Comme on l'a déjà rappelé, on a pu observer chez *P. cultrifera* une similitude du fractionnement sur Séphadex du Liquide Coelomique, comme des extraits de Coelomocytes et d'Ovocytes, où on retrouve la même fraction macromoléculaire, contenant glucides, lipides et protéines.

Cependant le matériel spécifique au Liquide Coelomique femelle pourrait ne pas être impliqué dans l'élaboration du vitellus, mais plutôt dans celle des alvéoles corticaux. Le stade où on retrouve l'antigène commun et où se produit une intense activité métabolique, coïncide en effet avec le début de la synthèse des alvéoles corticaux.

Enfin, l'injection d'Acétate - ¹⁴C a permis de mettre en évidence que les *Perinereis cultrifera* pourraient synthétiser *de novo* les Stéroïls. Cela semble être une propriété commune aux seules Annélides Polychètes, puisque les Oligochètes ne peuvent le faire. Cette observation est intéressante puisque l'on sait que chez les Insectes, les Crustacés, les Arachnides et les Diplopodes, il n'y a pas non plus de voie de synthèse de l'Acétate au Cholestérol et que tous les Stéroïls sont donc d'origine alimentaire ou proviennent de symbiotes.

Dans cette étude du métabolisme lipidique et de son rôle dans l'ovogénèse chez *Perinereis cultrifera* nous avons ainsi pu voir que chez les Annélides il existe de grandes variations dans le métabolisme et la physiologie de la reproduction.

qui reflètent l'hétérogénéité de leur évolution et des modes de reproduction.

D'autre part la connaissance des processus de transport des lipides a progressé ces dernières années. Cependant les seuls résultats chez les Invertébrés ne concernent que des espèces du phylum des Arthropodes (Insectes ou Crustacés), comme le rappelle M.J. CHAPMAN (1980) dans son importante synthèse sur les lipoprotéines animales. Ainsi il serait intéressant de poursuivre cette étude et de caractériser les lipoprotéines servant au transport des lipides chez *Perinereis cultrifera*. D'autre part la nature des Stérols de notre Annélide et peut-être le rôle des Coelomocytes dans cette synthèse serait aussi une voie intéressante de recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLAIS J.P., BERGERARD J., ETIENNE J. et POLONOVSKI J., 1964 - Nature et évolution des Lipides au cours de l'Embryogenèse de *Locusta migratoria migratorioides*. J. Insect. Physiol. 10, 753-772.
- ANGEL A. et BRAY G.A., 1979 - Synthesis of fatty acids and cholesterol by liver, adipose tissue and intestinal mucosa from obese and control patients. Eur. J. Clin. Invest. 9, 355-362.
- ARMENTA J.S., 1964 - A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. J. Lipid Res. 5, 270-272.
- AZERAD R. et LEDERER E., 1974 - Biochimie des Lipides (Lipides, stéroïdes et vitamines liposolubles). Ediscience/Mc Graw-Hill. Paris.
- BANDURSKI R.S. et AXELROD B., 1951 - J. Biol. Chem., 193-405.
- BARAUD J., MAURICE A., NAPIAS C. et VELOURS J., 1973 - Actions de carbures cancérogènes sur les lipides des membranes protoplastiques et des mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae*. Bioch. Bioph. Acta, 296, 481-492.
- BARTSCH G.G., 1970 - Glycolipid abnormalities in a myoclonic variant of late infantile amaurotic idiocy. J. Lip. Res. 11, 241-247.
- BEENAKKERS A.M. Th. et GILBERT L. I., 1968 - The fatty acid composition of fat body and haemolymph lipids in *Hyalophora cecropia* and its relation to lipid release. J. Insect Physiol. 14, 481-494.
- BERTHILLIER G., LETOUBLON R. et GOT R., 1977 - Biosynthèse diphosphate mannose dans les microsomes d'hépatocytes de congre (*Conger vulgaris*). Comp. Biochem. Physiol. B,
- BLIGH E.G. et DYER W.J., 1959 - A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- BLOCH K.E., 1979 - Speculations on the evolution of sterol structure and function. C.R.C. Critical Reviews in Biochemistry, Nov. 79, 1-5.
- BOBBITT J.M., SCHWARTING A.E. et GRITTER R.J., 1972 - Introduction à la chromatographie. Gauthier-Villars, Editeur.
- BOLLADE D. et BOUCROT P., 1971 - Répartition des constituants lipidiques de l'hémolymphe de *Periplaneta americana* en fonction de l'âge. Leur composition en acides gras. C.R. Acad. Sc. Paris, 272 D, 845-848.

- BOLLADE D. et BOUCROT P., 1973 - Incorporation d'acides gras radioactifs alimentaires dans les lipides chez *Periplaneta americana*. Insect. Biochem. 3, 123-137.
- BRAND Th.E., 1927 - Stoffbestand und Ernährung einiger Polychäten und anderer mariner Würmen. Zeitschr. f. vergleich. Physiol. 5, 643-698.
- BURROWS S., CRYLLS F.S.M. et HARRISON J.S., 1952 - Nature, 170, 800.
- CARDON C. et PORCHET M., 1973 - Purification partielle d'une substance responsable de la rétraction génitale sur l'activité endocrine cérébrale chez les Nereidae - C.R. Acad. Sci 277, 1761-1764.
- CARROLL K.K., 1961a - Separation of lipid classes by chromatography on florisil. J. Lipid Res. 2, 135-141.
- CARROLL K.K., 1961b - Quantitative estimation of peak areas in gas-liquid chromatography. Nature, 191, 377-378.
- CERBULIS J. et TAYLOR M.W., 1969 - Neutral lipids and fatty acid composition of earthworms (*Lumbricus terrestris*). Lipids, 4, 363-368.
- CHAMINADE M. et LAVERDURE A.M., 1980 - La vitellogenèse endogène chez *Tenebrio molitor* (Coléoptère). Bull. Soc. Zool. 105, 437-444.
- CHAPMAN M.J., 1980 - Animal lipoproteins : chemistry, structure, and comparative aspects. J. Lipid Res. 21, 789-853.
- CHARNIAUX - COTTON H., 1978 - L'ovogenèse, la vitellogénine et leur contrôle chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). Comparaison avec d'autres Malacostracés. Arch. Zool. exp. gén. 119, 365-397.
- CHAVANT L., MAZLIAK P. et SANCHOLLE M., 1978 - Formation des acides gras insaturés chez un champignon filamenteux : *Aspergillus ochraceus* Vuillemin. Physiol. vég., 16, 607-616.
- CHAVANT L., MAZLIAK P. et SANCHOLLE M., 1979 - Biosynthèse de l'acide linoléique chez un champignon filamenteux Siphomycète : *Mucor mucedo*. Ann. Pharm. Fr. 37, 55-58.
- CHEN P.S., TORIBARA T.Y. et WARNER H., 1954 - Anal. Chem. 28, 1756.
- CHEN T.T., COUBLE P., ABU-HAKIMA R. et WYATT G.R., 1979 - Juvenile hormone - controlled vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body. Hormonal induction in vivo. Dev. Biol. 69, 59-72.
- CHINO H. et GILBERT L.I., 1964 - Diglyceride release from insect fat body : a possible means of lipid transport. Science, N.Y., 143, 359-361.
- CHINO H. et GILBERT L.I., 1965 - Lipid release and transport in insects. Biochim. Biophys. Acta, 98, 94-110.
- CHINO H., MURAKAMI S. and HARASHIMA K., 1969 - Diglyceride - carrying lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. Biochim. Biophys. Acta, 176, 1-26.

- CHINO H. et GILBERT L.I., 1971 - The uptake and transport of cholesterol by haemolymph lipoproteins. *Insect Biochem.* 1, 337-347.
- CHINO H., DOWNER R.G. et TAKAHASKI K., 1977 - The role of diacyl - carrying lipoprotein I in lipid transport during insect vitellogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 487, 508-516.
- CISNE J.L., 1974 - Tribolites and the origin of arthropods. *Science* 186, 13-18
- CLARK M.E. - Biochemistry of the coelomic fluid of the polychaete *Nephtys* and changes during starvation. Vol. II of Proceedings of the XVI International Congress of Zoology, Washington. 1963 a p. 42.
- CLARK M.E. 1963 b - Biochemical changes in the coelomic fluid of the Polychaete *Nephtys* during different hormonal states. 2e cf. Européenne d'Endocrinologie comparée. Gen. and Comp. End. Vol 3 n° 6, 691-692.
- CLARK M.E., 1964 - Biochemical studies on the coelomic fluid of *Nephtys hombergi* (polychaeta - nephtidae) with observations on changes during different physiological states. *Biological Bull.* 127, n° 1, 63-84.
- CLARK M.E., 1968 - Free amino-acid levels in the coelomic fluid and body wall of Polychaetes. *Biol. Bull.* 134, 35-47.
- CLARK A.J. et BLOCK K., 1959 - The absence of sterol synthesis in insects. *J. Biol. Chem.* 234, 2578-2582.
- CLEMENT G. et BEZARD J., 1961 - Technique de dosage par chromatographie gaz-liquide d'un mélange d'acides gras, du butanoïque au docosanoïque. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 564-566.
- COUBLE P., CHEN T.T. et WYATT G.R., 1979 - Juvenile hormone - controlled vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body. *Cytological development. J. Insect Physiol.* 25, 327-337.
- CROISILLE Y., JUNERA H., MEUSY J.J. et CHARNIAUX-COTTON H., 1974 - The female - specific protein (Vitellogenic Protein) in Crustacea with particular reference to *Orchestia gammarella* (Amphipoda). *Amer. Zool.* 14, 1219-1228.
- DADD R.H. et KLEINJAN J.E., 1979 - Essential fatty acid for the mosquito *Culex pipiens* : Arachidonic acid. *J. Insect Physiol.* Vol. 25 495-502.
- DALES R.P., 1957 - Preliminary observations in the role of the coelomic cells in food storage and transport in certain polychaetes. *J. Mar. Biol. t.* 36 n° 1, 91-110.
- DALES R.P. - The coelomic and Peritoneal Cell Systems of some Sabellid Polychaetes. *Quart. J. Microscop. Sci.* 102 (1961) 327-346.
- DALES R.P., 1963 and 1967 - The chloragocytes and other peritoneal cells. Chapter 5 : Excretion and Regulation of the body fluid. *Annelids.* Hutchinson University Library - London.

- DALES R.P. - The coelomocytes of the terebellid polychaete *Amphitrite johnstoni*.
Quart. J. Microscop. Sci. GB 105 (1964) 263-279.
- DALES R.P. - Respirad and Energy Metabolism in Annelids. Chemical Zoology.
Academic Press 1968 - Volume IV, Chapter 3, p. 106.
- DE ANGELIS R.L., ROBINSON M.M. et SIGEL C.W., 1980 - Solvent effects on the
precision of sample application in quantitative thin - layer chroma-
tography. I. Liquid Chromatogr. 3 (6), 833-839.
- DEHORNE A. - Hystolyse et phagocytose musculaire dans le coelome des néréides
à maturité sexuelle. 1922a. Comp. Rend. Acad. Sci. Paris 174,
1043-1045.
- DEHORNE A. - Destruction et phagocytose des fibres musculaires à la fin de
la maturation des ovocytes chez *Hediste diversicolor*.
1922b - Comp. Rend. Soc. Biol. 87, 1305-1307.
- DEHORNE A. - La grande vacuole des Eléocytes chez les Néréides, les néphro-
éléocytes. Comp. Rend. Soc. Biol. 1930, 103, 663-665.
- DEJMAL R.K. et BROOKES V.J., 1972 - Insect lipovitellins. Chemical and
physical characteristics of a yolk protein from the ovaries of
Leucophaea maderae. J. Biol. Chem. 247, 869-874.
- DE JORGE F.B. et PETERSEN J.A., 1968 - Sex differences and maturation influence
on the chemical composition in *Chaetopterus variopedatus* (Polychaeta).
Comp. Biochem. Physiol. 27, 51-66.
- DELAGE B., 1969 - Stérois et terpènes chez les Insectes.
L'année biologique, 8, 411-453.
- DELBART C., 1978 - Evolution des glycosphingolipides chez *Petunia hybrida*,
espèce auto-incompatible, après pollinisation.
Thèse Université de Lille I, n° 698.
- DE VOOYS C.G.N., 1975 - Glycogen and total lipids in the lugworm (*Arenicola
marina*) in relation to reproduction.
Netherl. J. Sea Res. 9, 3-4, 311-319.
- DHAINAUT A. - Etude ultrastructurale de l'évolution des Eléocytes chez
N. pelagica à l'approche de la maturité sexuelle. C.R. Acad. Sc.
Paris t. 262, Série D, 27 juin. 1966a p. 2740-2743.
- DHAINAUT A. - Etude ultrastructurale de l'évolution cytoplasmique au cours
des premiers stades de l'ovogenèse chez *Nereis pelagica* L.
Comp. Rend. Acad. Sci. Paris 1966b, Série D 262, 2616-2619.
- DHAINAUT A., 1967 - Etude de la vitellogenèse chez *Nereis diversicolor*
O.F. Müller (Annélide Polychète) par autoradiographie à haute
résolution. C.R. Acad. Sc., 265, 434-436.

- DHAINAUT A. - Origine et structure des formations Mucopolysaccharidiques de la Zone Corticale de l'ovocyte de *Nereis diversicolor*.
J. Microscopie 8 (1969), 69-86.
- DHAINAUT A. - Influence de la diminution du taux d'hormone cérébrale sur l'évolution éléocytaire et les processus de gamétogenèse chez *N. pelagica*. Gen. Comp. Endocrinology, 18 (1972) p. 586.
- DHAINAUT A. et DE LEERSNYDER M., 1976a - Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire du crabe *Eriocheir sinensis*.
I - Ovogenèse naturelle. Arch. Biol. 87, 261-282.
- DHAINAUT A. et DE LEERSNYDER M., 1976b - Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire du crabe *Eriocheir sinensis*.
II - Ovogenèse après ablation des pédoncules oculaires.
Arch. Biol. 87, 283-302.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1977 - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* dans les conditions naturelles.
II - Etude autoradiographique des ovocytes jeunes.
Biol. Cellulaire 28 - 283-240.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1977 - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *P. cultrifera* dans les conditions naturelles.
III - Etude autoradiographique des ovocytes submatures.
Biol. Cellulaire 28, 241-250.
- DHAINAUT A., PORCHET M. et FONTAINE F., 1980 - Identité immunologique et métabolique entre le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète).
Int. J. Inver. Reprod. 2.
- DITTMER J.C. et LESTER R.L., 1964 - A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms.
J. Lipid Res. 5, 126-127.
- DONALDSON W.E., 1979 - Regulation of fatty acid synthesis.
Federation Proc., 38, 2617-2621.
- DORTLAND J.F., 1979 - The hormonal control of vitellogenin synthesis in the fat body of the female colorado potato beetle.
Gen. Comp. Endocrinol. 38, 332-344.
- DOWNER R.G., 1978 - Functional role of lipids in insects. In "Biochemistry of Insects". Edited by Rockstein M. 57-92 Academic Press. New York.
- DOWNER R.G.H. et CHINO H., 1979 - Cholesterol and cholesterol ester in haemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*.
Can. J. Zool. 57, 1333-1336.

- DUBINSKY Z. et AARONSON S., 1979 - Increase of lipid yields from some algae by acid extraction. *Phytochemistry*, 18, 51-52.
- DURCHON M. et LAFON M., 1951 - Quelques données biochimiques sur les Annélides. *Ann. des Sc. Nat., Zool.*, 11ème série, XIII, 427-452.
- DURCHON M. et PORCHET M. - Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. *Gén. and Comp. End.* 16 (1971), 555-565.
- ECKELBARGER K.J. - The Reproductive Biology and Development of the Terebellid Polychaete *Nicolea zostericola* and the Origin and Role of Coelomic Cells in ovogenesis. *Dissertation Abstracts Int.* 35 B, 1974, 3110-3111.
- ECKELBARGER K.J., 1975 - A light and electron microscope investigation of gametogenesis in *Nicolea zostericola* (Polychaeta : Terebellidae). *Marine Biology* 30, 353-370.
- ECKELBARGER K.J., 1976 - Origin and Development of the Amoebocytes of *Nicolea zostericola* (Polychaeta Terebellidae) with a discussion of their possible role in ovogenesis. *Marine Biology* 36, 169-182.
- ECKELBARGER K.J., 1979 - Ultrastructural evidence for both autotrophic and heterotrophic yolk formation in the oocytes of an Annelid (*Phragmatopoma lapidosa* : Polychaeta). *Tissue and Cell*, 11(3), 425-443.
- ECKELBARGER K.J., 1980 - An ultrastructural study of oogenesis in *Streblospio benedicti* (Spinidae), with remarks on diversity of vitellogenic mechanisms in Polychaeta. *Zoomorphologie*, 94, 241-263.
- ENGELMANN F., 1971a - Juvenile hormone - controlled synthesis of female - specific protein in the cockroach *Leucophaea maderae*. *Archs. Biochem. Biophys.* 145, 439-447.
- ENGELMANN F., 1971b - Endocrine control of insect reproduction, a possible basis for insect control. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 6, 217-221.
- ENGELMANN F., 1979 - Insect vitellogenin : identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.*, 14, 49-108.
- ENGELMANN F., 1980 - Endocrine control of vitellogenin synthesis in "Insect Biology in the future". M. LOCKE et D. SMITH Eds. Academic Press.
- FAST P.G., 1970 - Insect lipids. *Progr. Chem. Fats. Lipids* 11, 181-242.
- FAUVEL P., 1959 - Classe des Annélides Polychètes. *Traité de Zoologie de P.P. Grassé. Masson - Tome V - Fasc. 1 - 13-196.*
- FAWZI M., OSMAN M.F.N. et SCHMIDT G.H., 1961 - Analyse der Körperfette von imaginalen Wanderheuschrecken der art *Locusta migratoria migratorioides* L. *Biochem. Z.* 334, 441-450.

- FINEAN J.B., 1973 - In "Form and Function of Phospholipids" (Ansell G.B., Hawthorne J.N. et Dawson R.M.C., eds). Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam, 171-203.
- FISCHER A., 1974 - Stages and stage distribution in early oogenesis in the annelid *Platynereis dumerilii*. Cell Tissue Res. 156 (1) 35-45.
- FISCHER A., 1979 - A vitellin - like antigen in the coelomic fluid of maturing *Nereis virens* females. Naturwissenschaften, 66, S. 316.
- FOLCH J., ASCOLI I., LEES M., MEATH J.A. et LE BARON F.N., 1951 - Preparation of lipid extracts from brain tissues. J. Biol. Chem. 191, 833-841.
- FOLCH J., LESS M., STANLEY G.H., 1957 - A simple method for the isolation and purification total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- FONTAINE F., 1979 - Interrelations métaboliques entre liquide coelomique, coelomocytes et ovocytes chez *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète). D.E.A. Université de Lille I.
- FRENTZ R., -1960 - Contribution à l'étude biochimique du milieu intérieur de *Carcinus maenas* Linné. Thèse Bull. Soc. Sci. Nancy, 19, 1 -176.
- GARCIA M.L.M., MELLO R.P. et GARCIA E.S., 1979 - Ecdysone, juvenile hormone and oogenesis in *Rhodnius prolixus*. J. Insect. Physiol. 25, 695-700.
- GELLISSSEN G., WAJC E., COHEN E. EMMERICH H., APPLEBAUM S.W. et FLOSSDORF J., 1976 - Purification and properties of oocyte vitellin from the migratory locust. J. Comp. Physiol. 108, 287-301.
- GELLISSSEN G. et EMMERICH H., 1978 - Changes in the titer of vitellogenin and of diglyceride carrier lipoprotein in the blood of adult *Locusta migratoria*. Insect Biochem. 8, 403-412.
- GELLISSSEN G., EMMERICH H., 1980 - Purification and properties of a diglyceride-Binding lipoprotein (LP I) of the hemolymph of adult male *Locusta migratoria*. J. Comp. Physiol. 136, 1-9.
- GIESE A.C., 1966 - Physiol. Rev. 46, 244.
- GILBERT J., 1972 - Synthèse bibliographique des recherches électrophorétiques sur les protéines des Crustacés. Ann. Biol. 11, 305-327.
- GILBERT L.I., 1967 - Lipid metabolism and function in insects in "Advances in Insect Physiology". Acad. Press 4, 69-211.
- GILBERT L.I. et CHINO H., 1974 - Transport of lipids in insects. J. Lipid Res. 15, 439-456.
- GLUCK L., KULOVICH M.V., BORER R.C., BRENNER P.H., ANDERSON G.G., SPELLACY W.N., 1971 - Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis Specially W.N. Am. J. Obst. Gyn., 109, 440-445.

- GOLAY M.J.E., 1957 - Nature 180, 435.
- GRIFFOND B., 1980 - La vitellogenèse chez la Paludine *Viviparus viviparus* L. (Mollusque Gastéropode Prosobranchie). Bull. Soc. Zool. 105, 401-407.
- GUARNIERI M. et JOHNSON R.M., 1970 - The essential fatty acids. Adv. Lipid Res. 8, 115-174.
- GUIOCHON G. et SIOUFFI A., 1979 - L'optimisation en chromatographie sur couche mince. Analisis, 7, 316-326.
- HAGEDORN H.H. et JUDSON C.L., 1972 - Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk proteins. J. exp. Zool. 182, 367-377.
- HAGEDORN H.H., FALLON A.M. et LAUFER H., 1973 - Vitellogenin synthesis by the fat body of the mosquito *Aedes aegypti*. Dev. Biol. 31, 285-294.
- HAGEDORN H.H., 1974 - The control of vitellogenesis in the mosquito, *Aedes aegypti*. Amer. Zool. 14, 1207-1217.
- HANDLER A.M. et POSTLETHWAIT J.H., 1978 - Regulation of vitellogenin synthesis in *Drosophila* by ecdysone and juvenile hormone. J. Exptl. Zool. 206, 247-254.
- HANES C.S. et ISHERWOOD 1949 - Nature 164, 1107. Modifié par :
- BURROWS S., CRYLLS F.S.M. et HARRISON, 1952 - Nature 170, 800 .
- HARWOOD J.L., JAMES A.T., 1975 - Metabolism of trans-3-hexa decenoic acid in broad bean. Eur. J. Biochem, 50, 325-334.
- HERODEK S. et FARKAS T., 1960 - Changes in the composition of fatty acids in *Bombyx mori* in the course of ontogeny. Cité par L.I. GILBERT (1967)
- HESS R.T., 1970 - The fine structure of coelomocytes in the Annélid *Enchytraeus fragmentcsus*. J. Morph. USA 132 (1970) 335-352.
- HILLYARD L.A., ENTENMAN C., FEINBERG H. et CHAIKOFF, 1955 - J. Biol. Chem. 214, 79.
- ISSAQ H. J., 1980 - Triangular thin-layer chromatography. J. Liquid Chromatogr. 3 (6), 789-796.
- ISSAQ H. J., 1980 - Two phase thin-layer chromatography. J. Liquid chromatogr. 3 (6), 841-844.
- ITTYCHERIAH P.I. 1977 - Storage material of the nematode *Romanomermis culicivorax* a mermithid parasite of larvalmosquitoes. Nematologica, 23, 165-171.
- IZUMI S., TOMINO S. et CHINO H. 1980 - Purification and molecular properties of vitellin from the silkworm, *Bombyx mori*. Insect. Biochem. 10, 199-208.
- JAMES A.T. et MARTIN A.J.P., 1952 - Biochem. J. 50, 679.
- JEFFCOAT R., ROBERTS P.A. et JAMES A.T., 1979 - The control of lipogenesis by dietary Linoleic acid and its influence on the deposition of fat. Eur. J. Biochem. 101, 447-453.

- JOHNS R.B., NICHOLS P.D., et PERRY G.J., 1980 - Fatty acid components of mine species of molluscs of the littoral zone from australian waters.
Comp. Biochem. Physiol. 65 B, 207-214.
- JUNERA H., MARTIN M, SOLARI A., et MEUSY J.J., 1977 - Détermination du poids moléculaire de la vitellogénine et des lipovitellines d' *Orchesta gammarella*, crustacé amphipode.
C. R. Acad. Sc. Paris, 285, 909-912.
- JUTSUM A.R. et GOLDSWORTHY G.J., 1976 - Fuels for flight in *Locusta*. J. Insect Physiol 22, 243-249.
- KABATA K., SADAKANE H., MIYACHI M., NAGATA K., HATANO S., et WATANABE T., 1979 - Studies on lipid changes during the development of frost hardiness in *Chlorella ellipsoidea*
J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 23, 155-161
- KAMOUM P., 1977 - Appareils et méthodes en biochimie. Flammarion.
- KANAZAWA A., TESHIMA S.I., et ANDO T., 1977 - Sterols of coelenterates. Comp. Biochem. Physiol. 57 B, 317-323.
- KANAZAWA A. TESHIMA S., TOKIWA S., CECCALDI H.J., 1979 - Effects of dietary linoleic and linolenic acids on growth of prawn.
Oceanologica Acta, Vol. 2, n° 1, 41-48
- KANAZAWA A., TESHIMA S., ONO K., 1979. - Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids.
Comp. Bioch. Physiol. 63 B 295-298.
- KARLSSON K.A., NILSSON K., SAMUELSSON B.O.E., STEEN G.O., 1969 - The presence of hydroxy fatty acids in sphingomyelins of bovine rennet stomach.
Biochim. Biophys. Acta., 176, 660-663.
- KARLSSON K. A. , PASCHER J., 1971 - Thin layer chromatography of ceramides.
J. Lipid. Res., 12, 466-472.
- KARLSSON K.A., SAMUELSSON B.O.E., STEEN G.O., 1973 - Sphingolipids composition of bovine kidney cortex, medulla and papilla.
Biochim. Biophys-Acta, 316, 317-335.
1973 - Detailed structure of sphingomyelins and ceramides from different regions of bovine kidney with special reference to long chain base. Biochim. Biophys-Acta. 316, 336-362.
- KARNOVSKY M.L., 1969 - Annelida, Echiurida and Sipunculida - Lipid components and metabolism. Chemical Zoology. Academic Press. Volume IV, chapter 8 205-210.
- KATZ I., and KEENEY M., 1967 - The lipids of some rumen holotrich protozoa .
Biochim. Biophys. Acta, 144, 102-112.

- KENNEDY E.P., 1961 - Biosynthesis of complex lipids Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 20, 934-940.
- 1963 - The biosynthesis of complex lipids. Fifth Int. Congr. Biochem-7, 113-133.
- KERR M.S., 1969 - The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus* II - A lipoprotein serologically identical to ovocyte lipovitellin. Develop. Biol. 20, 1-17.
- KESSEL R. G. et GANION L.R., 1979 - Localization of horseradish peroxidase in the panoistic dragonfly ovary. J. Submicr. Cytol. 11(3), 313-324.
- KESSEL R. G., et BEAMS H.W., 1980 - Cytodifferentiation and vitellogenesis during oogenesis in Arachnida : cytological studies on developing oocytes of a harvestman. J. morphol. 163, 175-190.
- KNOCHE H., ESDERS T.W., KOTHS K. et BLOCH K., 1973 - J. Biol. Chem. 248, 2317-2322.
- KÜKENTHAL W., 1885 - Über die lymphoiden Zellen der Anneliden, Jena Z. Naturwiss., 18, 319-364.
- KWITEROVICH Jr. P.O., SLOAN H.O., FREDRICKSON D.S., 1970 - Glycolipid and other lipid constituents of normal human liver. J. Lip. Res., 11, 322-330.
- LAFFERTY F.W., 1969 - Spectrographie de masse. Ediscience S.A., Paris.
- LAMBREMONT E.N., 1972 - The in vivo synthesis of acyl. and other bonded phospholipids in *Heliothis virescens*. J. Insect Physiol., 18, 581-594.
- LAMBREMONT E.N., STEIN C.I. et BENNETT A.F., 1965 - Synthesis and metabolic conversion of fatty acids by the larvalboll weevil. Comp. Biochem. Physiol. 16, 289-302.
- LAMBREMONT E.N. et DIAL P.F., 1980 - Fatty acid composition of major phospholipids from the fat body, flight muscle and testis of the house cricket, and positional distribution of fatty acids in testicular phospholipids. Comp. Biochem. Physiol. 66 B, 327-330.
- LANDOWNE R.A. et LIPSKY S.R., 1961 - Biochim. Biophys. Acta. 46, 1.
- LEE R.F. et PUPPIONE D.L., 1978 - Serum lipoproteins in the spiny lobster, *Panulirus interruptus*, Comp. Biochem. Physiol. 59 B, 239-243.
- LIEBERMANN C. et BURCHARD H., 1885 - Ber. Dtsch. Chem. Ges. 18, 1803.
- LIPSKY S.R. et LANDOWNE R.A., 1958 - Biochim. Biophys. Acta, 27, 666.
- LIPSKY S.R., LANDOWNE R.A. et GODET M.R., 1959 - Biochim. Biophys. Acta, 31 336.
- LIPSKY S.R., LOVELOCK J.E. et LANDOWNE R.A., 1959 - J. Amer. Chem. Soc., 81, 1010.
- LOVELOCK J.E., 1958 - J. chromatogr. 1, 35.
- LOVERN J.A., 1940 - The lipids of the earthworm. Biochem. J. 34, 709-711.

- LYNEN F., 1979 - Fatty acid biosynthesis and its regulation. Perspectives in Inherited Metabolic Diseases, vol. 3. 1-23.
- MAC INTOSH W.C., 1907 - Notes from the Gatty Marine Laboratory, St. Andrews, N° 28, on the reproduction of *Nereis diversicolor* O.F. Müller. Ann. Mag. Nat. Hist., Ser. 7, 20, 176-185.
- Mac LAUGHLIN J., 1971 a - Biochemical Studies on *Eisenia foetida*, the Brandling Worm. I-Tissue lipids and sterols. Comp. Biochem. Physiol. 38 B 147-163.
- Mac LAUGHLIN J., 1971 b - Biochemical Studies on *Eisenia foetida* the brandling worm. III-Blood composition. Comp. Bioch. Physiol. 38 B, 179-195.
- MADARIAGA M.A., MATA F., MUNICIO A.M. et RIBERA A., 1974 - Changes in the fatty acid patterns of glycerolipids of *Dacus oleae* during metamorphosis and development. Insect Biochem. 4, 151-160.
- MARINETTI G.V., 1962 - Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides. J.Lipid Res. 3, 1-20.
- MARINETTI G.V., 1967- In "Lipid chromatographic analysis". Vol I. Ed. G.V. MARINETTI, M. DEKKER.
- MARINETTI G.V., 1980 - This week's citation classic in "Current contents", 20,10.
- MARTIN B.J., 1978 - Teneur en lipides et composition en acides gras des oeufs de *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda) au cours de l'embryogenèse. C.R. Soc. Bio., 172, 1168.
- METCALFE L.D., SCHMITZ A.A., 1961 - The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. Anal. Chem, 33, 363-364.
- MEUSY J.J., 1972 - La gaméto-genèse et la fraction protéique de l'hémolymphe spécifique du sexe femelle chez quelques crustacés supérieurs : étude descriptive et rôle des glandes androgènes. Th. Doct. Etat, Univ. PARIS VI.
- MEUSY J.J., 1980 - Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in crustacea = a review. Reprod. Nutr. Dévelop., 20, 1-21.
- MUNDALL E. et ENGELMANN F., 1977 - Endocrine control of vitellogenin synthesis and vitellogenesis in *Triatoma protracta* J.Insect Physiol. 23, 825-836.
- MUNDALL E.C. and LAW J.H., 1979 - Physical and chemical characterization of vitellogenin from the hemolymph and eggs of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Comp. Biochem. Physiol. 63 B, 459-468.

- NELSON D.R. et SUKKESTAO D.R., 1968 - Fatty acid composition of the diet and larvae and biosynthesis of fatty acids from ^{14}C - acetate in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*.
J. Insect Physiol. 14, 293-300.
- O'ROURKE L. and MONROE R.E., 1976 - Utilization of radiolabelled acetate by three isopods in lipid synthesis.
Comp. Biochem. Physiol. 55 B, 553-557.
- ORR C.H. et CALLEN J.E., 1958 - J. Amer. Soc. 80, 249.
- PAN M.L., BELL W.J. et TELFER W.H., 1969 - Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body.
Science N.Y. 165, 393-394.
- PARTRIGE S.M., 1949 - Nature, 164, 443.
- PATTNAIK N.M., MUNDALL E.C., TRAMBUSTI B.G., LAW J.H. and KEZDY F.J., 1979 - Isolation and characterization of a larval lipoprotein from the hemolymph of *Manduca sexta*. Comp. Biochem. Physiol. 63 B, 469-476.
- PELED Y. and TIETZ A., 1973 - Fat transport in the locust, *Locusta migratoria* : the role of protein synthesis. Bioch. Biophys. Acta., 296, 499-509.
- PICAUD J.L., 1978 - Parentés antigéniques des protéines spécifiques femelles chez quelques crustacés isopodes. C.R. Soc. Biol. 172, 320-324.
- PIRETTI M.V. et SERRAZANETTI G.P., 1980 - Investigation of the sterol constituents of the prawn *Penaeus cheraturus*. Comp. Biochem. Physiol. 66 B, 301-305.
- PORCHET M., 1974 - Activité endocrine cérébrale chez les Nereidae. Données quantitatives, influence sur la teneur en glucides des Ovocytes et du L.C., mécanisme régulateur de la sécrétion hormonale. Thèse, Université des Sciences et Techniques de Lille, N° 300.
- PORCHET M., SPIK G., DHAINAUT A., 1977 - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* dans les conditions naturelles. I - Etude biochimique. Biol. Cellulaire 28, 225-232.
- PORCHET M. et SPIK G., Biochemical analysis of Nereidae gametogenesis. I - Evolution of glycoconjugates during natural oogenesis of *Perinereis cultrifera*. Comp. Bioch. Physiol. (1978) 59 B 175-181.
- PORCHET M. DHAINAUT A., PORCHET- HENNERE E., 1979 - Evidence of coelomic substances inducing genital maturation in *Perinereis cultrifera*. Wilhelm Roux's Archives 186, 129-137.
- PRESTON R.L., The accumulation of amino acids by the coelomocytes of the bloodworm, *Glycera dioranchiata*. Diss. Abstr. Int. 32 B (1971) 530.

- RAGHAVAN S.S., MUMFORD R.A., KANFER J.N., 1974 - Isolation and characterization of glucosylon sphingosine from Gaucher's spleen. *J. Lipid Res.*, 15, 484-490.
- RAHEMTULLA F. and LOVTRUP S., The comparative Biochemistry of Invertebrate Mucopolysaccharides. III Oligochaeta and Hirudinea. *Comp. Bioch. Physiol.* (1975) 50 B, 627-629.
- RIDDIFORD L.M., 1980 - Insect endocrinology : Action of hormones at the cellular level. *Ann. Rev. Physiol.* 42, 511-528.
- ROMIEU M., 1923 - Recherches histophysiologiques sur le sang et sur le corps cardiaque des annélides polychètes. Thèse, Fac. Sciences, Université Paris (DOIN)
- ROTH T.F. et PORTER K.R., 1964 - Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell. Bioch.* 20, 313-332.
- ROUSER G., KRITCHEVSKY G., YAMAMOTO A., 1967 - Column chromatography and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipides. In : "Lipid chromatographic analysis", ed. G.V. MARINETTI, vol. 1, 99-162, M. DEKKER inc. N.Y.
- SALKOWSKI E., 1872 - *Pfluger's Arch. ges. Physiol.* 6, 207.
1908 - *Z.F. Physiol. Chem.* 57, 523.
- SCANABISSI F.S. et TRENTINI M., 1979 - Ultrastructural observations on the oogenesis of *Triops cancriformis* (crustacea, notostraca).
II - Early developmental stages of the oocyte. *Cell Tissue Res.* 201, 361-368.
- SCHEER B.T., Carbohydrates and Carbohydrate Metabolism. Annelida, Sipunculida, *Echiurida*, Chemical zoology, Academic Press 1969, volume IV, chapter 5, 142-143.
- SCHOENMAKERS H.J.N., 1977 - Ultrastructural evidence for the presence of steroid synthesizing cells in the ovary of the starfish *Asterias rubens* (Echinodermata). *Cell Tissue Res.*, 182, 275-279.
- SCHOENMAKERS H.J.N., 1979 - In vitro biosynthesis of steroids from cholesterol by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 63 B, 179-184.
- SCHROEDER P.C., Studies on Oogenesis in the Polychaete Annelid *Nereis grubei*.
II - Oocyte growth Rates in Intact and Hormone - Deficient Animals. *Gen. and Comp. Endocr.* 16 (1971) 312-322.
- SILBERZAHN N., 1980 - La vitellogenèse chez *Crepidula formicata* (mollusque Prosobranchie). *Bull. Soc. Zool.* 105, 409-412.
- SINCLAIR H.M., 1964 - Essential fatty acids - In "Lipid Pharmacology", p. 237-273. Academic Press, London.

- SIOUFFI A. et GUIOCHON G., 1976 - Utilisation des microparticules de silice en chromatographie sur couche mince. *Analisis*, 4, 147-151.
- SPIELMAN A., GWADZ R.W. et ANDERSON W.A., 1971 - Ecdysone-initiated ovarian development in mesquitoes. *J. Insect Physiol.* 17, 1807-1814.
- STEINER M.R. et LESTER R.L., 1972 - in vitro studies of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 260, 222-243.
- STENHAGEN E., ABRAHAMSSON S. et Mc LAFFERTY F.W., Registry of Mass spectral data.
- STEPHEN W.F. et GILBERT L.I., 1969 - Fatty acid biosynthesis in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *J. Insect Physiol.* 15, 1833-1854.
- STEPHEN W.F. and GILBERT L.I., 1970 - Alterations in fatty acid composition during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia* : correlations with juvenile hormone titre. *J. Insect Physiol.* 16, 851-864.
- STRONG F.E., 1963 a - Studies on lipids in some homopterus insects. *Hilgardia*, 34, 43-61.
- 1963 b - Fatty acids = in vivo synthesis by the green peach aphid *Myzus persicae*. *Science*, N.Y., 140, 983-984.
- 1964 - Lipid composition of the eggs from an aphid. *Nature*, 202, 622.
- STRONG F.E., 1963 b - Fatty acids : in vivo synthesis by the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Science*, N.Y., 140, 983-984.
- STRONG F.E., 1964 - Lipid composition of the eggs from an aphid. *Nature*, 202, 622.
- SUGITA M., DULANEY J.T., MOSER H.W., 1974 - Structure and composition of sulfatides isolated from livers of patients with metachromatic leukodystrophy = galactosyl sulfatide and lactosylsulfatide. *J. Lip. Res.*, 15, 227-233.
- SWIFT M.L., WHITE D. et GHASSEMIH M.B., 1980 - Distribution of Neutral Lipids in the tissues of the Oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids*, 15 (2), 129-132.
- TELFER W., 1954 - Immunological studies of insect metamorphosis. II - The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the *cecropia* silkworm. *J. Gen. Physiol.* 37, 539-558.
- TESHIMA S., KANAZAWA A. et OKAMOTO H., 1976 - Analysis of fatty acids of some crustaceans. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 25, 41-46.
- TESHIMA S., KANAZAWA A., HYODO S. et ANDO T., 1979 - Sterols of the triton, *Charonia tritonis*. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 64 B, 225-228.
- TESHIMA S., PATTERSON G.W. et DUTKY S.R., 1980 - Sterols of the Oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids*, 15, 1004-1011.

- TESHIMA S. et PATTERSON G.W., 1981-Δ 5,7 - Stérols of the oyster, *Grassostrea virginica*
Comp. Biochem. Physiol. 68 B, 177-181
- THOMAS K.K., 1974 - Lipid Composition of the fat body and haemolymph and its relation to lipid release in *Oncopeltus fasciatus* J. Insect Physiol. 20, 845-858.
- THOMAS K.K., 1979 - Isolation and partial characterization of the haemolymph lipoproteins of the wax moth, *Galleria mellonella*. Insect Biochem., 9, 211-219.
- THOMAS K.K. and GILBERT L.I., 1967 - J. Insect Physiol. 13, 963.
- THOMAS K.K. et GILBERT L.I., 1968 - Isolation and characterization of the haemolymph lipoproteins of the American silk moth, *Hyalophora cecropia*. Archs Biochem. Biophys. 127, 512-521.
- THOMAS K.K. et GILBERT L.I., 1969 - The haemolymph lipoproteins of the American silkworm, *Hyalophora gloveri* : studies on lipid composition, origin and function. Physiol. Chem. Phys. 1, 293-311.
- TIETZ A., 1967 - Fat transport in the locust : the role of diglycerides. Eur. J. Biochem. 2, 236-242.
- TRAPPE W., 1940 - Biochem. Z., 305, 150.
- TRENTINI M. et SABELLI SCANABISSI F., 1978 - Ultrastructural observations on the oogenesis of *Triops cancriformis* (Crustacea, No tostraca). I. Origin and differentiation of nurse cells. Cell Tiss. Res. 194, 71-77.
- TURNER A.C. et HUTCHISON W.F., 1979 - Lipid synthesis in the adult dog heartworm, *Dirofilaria immitis*. Comp. Biochem. Physiol. 64 B, 403-405.
- TURUNEN S., 1973 - Role of labelled dietary fatty acid and acetate in phospholipids during the metamorphosis of *Pieris brassicae*. J. Insect Physiol. 19, 2327-2340.
- TURUNEN S., 1979 - Digestion and absorption of lipids in insects. Comp. Biochem. Physiol. 63 A, 455-460.
- VANCE D.E. et CHOY P.C., 1979 - How is phosphatidylcholine biosynthesis regulated ? Trends in Biochemical Sciences, 145-148.
- VAN DER HORST D.J., DOORN J.M. et BEENAKKERS A.M.Th., 1979 - Effects of the adipokinetic hormone on the release and turnover of haemolymph diglycerides and on the formation of the diglyceride - transporting lipoprotein system during locust flight. Insect. Biochem. 9, 627-635.
- VORBECK M.L. et MARINETTI G.V., 1965 - J. Lipid Res., 6, 3.
- VROMAN H.E., KAPLANIS J.N. et ROBBINS W.E., 1965 - Effect of allatectomy on lipid biosynthesis and turnover in the female American cockroach, *Periplaneta americana*. J. Insect. Physiol. 11, 897-904.

- WAKIL S.J., PUGH E.L. et SAUER F., 1964 - The mechanism of fatty acid synthesis. Proc. Nat. Acad. Science USA, 52, 106-114.
- WANG C.M. et PATTON R.L., 1969 - Lipids in the haemolymph of the cricket *Acheta domesticus*. J. Insect. Physiol. 15, 851-860.
- WIGGLESWORTH V.B., 1958 - The distribution of esterase in the nervous system and other tissues of the insect *Rhodnius prolixus*. Q. J. Microsc. Science 99, 441-450.
- WILBER C.G., BAYORS W.M. 1947 - A comparative study on the lipids in some marine annelids. Biol. Bull. Woods Hole 93, 99-101.
- WILLIAMS M.L., BYGRAVE F.L. et BIRT L.M., 1974 - Phospholipid synthesis in developing flight muscle of *Lucilia*. Insect Biochem. 4, 161-172.
- WOLIN E.M., LAUFER H., ALBERTINI D.F., 1973 - Uptake of the yolk protein lipovitellin, by developing crustacean oocytes. Develop. Biol. 35, 160-170.
- WRIGHT R.S., 1971 - A reagent for the non - destructive location of steroids and some other lipophilic materials on silica gel thin-layer chromatograms. J. Chromatogr., 59, 220-221.
- YEE H.Y., YEE T.M.L., et JACKSON B., 1980 - Determination of phosphatidylcholine in Amniotic fluid. Microchem. J. 25, 61-71.

RESUME

Après leur identification, nous avons étudié l'évolution des différentes classes des lipides neutres dans le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes. L'étude des phospholipides est aussi faite de façon succincte.

Nos résultats montrent le rôle de tissu de réserve joué par les coelomocytes qui accumulent des triglycérides et libèrent des glycérides plus simples (mono et diglycérides) qui sont à une teneur importante dans le liquide coelomique.

Nous observons aussi une intense activité métabolique vers 140-150 μ , principalement dans les coelomocytes, qui sont en outre sensibles à un facteur hormonal.

L'injection de glycérol - ^{14}C et d'acétate ^{14}C confirme ces résultats.

Chez les Annélides Polychètes, l'origine des réserves ovocytaires est un problème depuis longtemps discuté. On sait que l'ovocyte peut utiliser des précurseurs simples (acides aminés et monosaccharides) pour ses synthèses de vitellus et d'alvéoles corticaux. Vous montrons ici qu'ils peuvent aussi synthétiser rapidement des Triglycérides directement à partir du glycérol injecté.

L'apport de matériel synthétisé par les éléocytes a déjà été suggéré. Nos résultats appuient cette hypothèse : des lipoprotéines peuvent jouer le rôle de molécules transporteurs dans le liquide coelomique. Enfin, phénomène assez rare chez les Invertébrés : les *Perinereis cultrifera* peuvent synthétiser *de novo* des stérols à partir d'acétate. Les coelomocytes jouent un rôle important dans cette synthèse : on rappelle ici l'existence d'une substance feed-back, qui pourrait très bien avoir une composante stérolique synthétisée par les éléocytes.



- . COELOMOCYTE . LIPIDE
- . COELOMOCYTE. GLYCERIDE
- . COELOMOCYTE. STEROL
- . ANNELIDE POLYCHETE. *PERINEREIS CULTRIFERA*
- . *PERINEREIS* . OVOGENESE
- . ELEOCYTE