N° d'ordre 1234
50376
1984 UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE 235

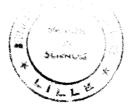
50376 4984. 235.

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR DE 3ème CYCLE EN
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

par

ROUABAH-SADAOUI Leila



ET DU COCON D'EISENIA FOETIDA SAV. (ANNELIDE, OLIGOCHETE)

le 30 novembre 1984

Jury d'examen : M. PORCHET, Président

R. MARCEL, rapporteur

B. FOURNET, Examinateur

C. LATTAUD, Examinateur

E HUISTON

المنافع المناف

Loué soit ton nom, nous ne possédons d'autre science que celle que tu nous as enseignée, tu es le savant, le sagé - Coman Saint -

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur DURCHON qui m'a enseigné le désir acharné de connaître. Son accueil et sa sympathie seront gravés dans ma mémoire à tout jamais. Qu'il veuille bien accepter, avec ce mémoire, l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je dois beaucoup à Monsieur MARCEL qui avec une inlassable patience m'a initiée à la recherche en me confiant ce sujet. Sa rigueur scientifique a approfondi les raisonnements au cours de discussions toujours fructueuses. Cette collaboration effective de tous les instants m'a procuré un enrichissement dont je lui suis infiniment reconnaissante. Il n'a ménagé ni son temps ni sa peine, je l'en remercie vivement.

Je remercie Monsieur le Professeur PORCHET de l'intérêt qu'il porte à mon travail. Je lui suis particulièrement reconnaissante d'avoir accepté de présider mon Jury de Thèse en dépit de ses charges de plus en plus lourdes.

Monsieur le Professeur FOURNET, grâce à qui une partie des expériences a pu être réalisée au laboratoire de Chimie Biologique, me fait le très grand honneur de participer à mon Jury de Thèse malgré ses multiples activités. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

J'exprime à Monsieur LATTAUD ma gratitude la plus vive d'avoir accepté de juger et de critiquer ce travail en faisant partie de mon Jury de Thèse.

A Monsieur BAERT il m'est très agréable aujourd'hui de lui exprimer mes remerciements les plus sincères pour tous ses conseils clairvoyants et son aide fructueuse qui ont permis la progression de ma recherche.

Enfin je remercie tous ceux qui, au Laboratoire de Biologie Animale et au Laboratoire de Chimie Biologique, m'ont apporté leur soutien et leur aide au cours de ce travail.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	3
I - Matériel biologique	3
II - Méthodes biologiques	3
A - Techniques de prélèvement	3
B - Techniques histologiques	4
C - Techniques histochimiques	4
D - Technique autoradiographique	4
III - Méthodes biochimiques	5
A - Préparation du matériel biologique	5
B - Méthode colorimétrique de dosage des	
protéines et des polysaccharides	5
C - Méthodes d'identification et de dosage	
chromatographique des composés glucidiques	
et lipidiques	5
D - Méthodes d'analyse électrophorétique des protéines	5
CHAPITRE I - STRUCTURE DU CLITELLUM : ANALYSE HISTOLOGIQUE ET	
HISTOCHIMIQUE	6
I - Etude du cocon	6
II - Etude histologique du clitellum	8
A - Etude d'un ver immature	8
B - Etude d'un ver submature	8
C - Etude d'un ver mûr	9
III - Etude histochimique du clitellum	10
A - Etude des protéines	10
B - Etude des sucres	10
C - Etude des lipides	11
IV - Discussion	11
V - Conclusions	12

CHAPITRE II - ETUDE BIOCHIMIQUE DES PROTEINES	14
I - Techniques utilisées	14
A - Dosage des protéines	14
l - Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldhal	14
2 - Dosage des protéines totales par la méthode	
de Geiger-Bessman	14
B - Etude électrophorétique des protéines	14
l - Electrophorèse en gel de polyacrylamide	
en milieu non dénaturant	14
2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide	
en milieu dénaturant	15
3 - Electrophorèse bidimensionnelle sur gel	
de polyacrylamide	15
II - Résultats	17
III - Discussion	23
CHAPITRE III - ETUDE BIOCHIMIQUE DES SUCRES	26
I - Les analyses colorimétriques	26
A - Principes	26
B - Dosage	26
Méthode à l'orcinol	26
II - Chromatographie en phase gazeuse	27
A - Principe	27
B - Protocole expérimental	27
C - Caractéristiques des appareils utilisés	28
III - Résultats	28
IV - Discussion	34
CHAPITRE IV - ETUDE BIOCHIMIQUE DES LIPIDES	37
I - Extraction et purification des lipides totaux	37
A - Extraction	37
B - Purification	38
II - Séparation des lipides neutres et des phospholipides	38

III - Etude des acides gras des lipides neutres	38
A - Préparation des acides gras	38
l - Saponification	38
2 - Méthanolyse des acides gras libres	39
B - Passage en chromatographie gaz-liquide	39
C - Etude qualitative des acides gras	39
l - Comparaison des temps de rétention	39
2 - Spectrographie de masse	39
3 - Caractéristiques de l'appareil	40
D - Etude quantitative	40
IV - Résultats	40
V - Discussion	46
CHAPITRE V - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE	49
I - Résultats	49
l - Leucine tritiée	49
2 - Mannose ³ H	49
II - Discussion	50
CONCLUSION GENERALE	52

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Oligochètes et Hirudinées possèdent un clitellum ("les Clitellates") chargé de secréter le cocon dans lequel sont pondus les oeufs.

Le clitellum se développe à la puberté, disparaît pendant les périodes de repos sexuel (diapause de certains Oligochètes) ou de régénération.

HARMS (1912b) se pose le problème de savoir si le clitellum est un caractère sexuel secondaire mâle ou femelle. Il conclut que le clitellum subsistant après l'ablation des ovaires et disparaissant après ablation des glandes génitales mâles doit être considéré comme un caractère sexuel secondaire mâle placé sous la dépendance des testicules. HUBL (1953) et HERLANT-MEEWIS (1956) ont constaté que l'apparition et la mise en charge des cellules "a" du cerveau est parallèle au développement du clitellum et que les cellules "a" ont un cycle saisonnier en relation avec l'activité génitale.

BERJON (1956) a prouvé en culture d'organe que le cerveau induit la turgescence du clitellum. JUBERTHIE (1967) a démontré un parallélisme entre la dégénérescence des cellules "a" et la régression du clitellum. MARCEL (1980), MARCEL et CARDON (1982) ont démontré que les ganglions cérébroïdes sécrètent une substance "clitellogène". Cette substance pourrait être la même que la substance gonadotrope permettant le développement des testicules (LATTAUD et MARCEL, 1983). Le cocon renferme les réserves nécessaires pour le développement de l'embryon. Chez les Lombriciens les oeufs sont oligolécithes, contrairement aux Néréidiens (Annélides, Polychètes) où les oeufs contiennent une quantité importante de vitellus.

On est ainsi conduit à penser qu'il pourrait bien exister entre la différenciation du clitellum et les organes génitaux une relation directe. Il est donc intéressant de déterminer les différentes variations structurales et biochimiques qui interviennent au cours de la formation de ce clitellum.

Protéines, sucres et lipides se partagent la composition du clitellum et du cocon mais est-ce que le clitellum mûr transfère toutes ses protéines, sucres et lipides dans le cocon lors de son élaboration ? Une fois pondu le cocon se contenterait-il de ces substances transférées par le clitellum ? Serait-il capable de synthétiser des produits nouveaux ? C'est pour répondre à toutes ces questions afin d'essayer de montrer l'étroite contribution du clitellum à la formation du cocon d'E. Joetida que nous avons entrepris ce travail. Nous nous sommes donc proposé :

- Dans un premier temps de faire une étude histologique et histochimique pour essayer de mettre en évidence des composés caractéristiques du clitellum en cours de maturation sexuelle.
- Dans un deuxième temps d'étudier plus particulièrement ces constituants, d'un point de vue biochimique.
- Enfin, dans un troisième temps, de mettre à profit ces résultats pour une étude autoradiographique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

Notre travail a été effectué sur le ver du fumier Eisenia foetida Sav. forme typica, espèce homodyname de Lombricien (Annélide Oligochète).

Elevage

Nous avons récolté dans des bacs d'élevage en masse des vers à différents stades de maturation sexuelle. Ces vers sont répartis en trois lots :

- Immatures : ce sont des vers sans clitellum apparent.
- Submatures : caractérisés par la pigmentation en blanc crème de la région où se différenciera plus tard le clitellum.
- Mûrs : il s'agit des vers avec un clitellum turgescent.

Quelques vers sexuellement mûrs sont conservés deux par deux dans des boîtes de Pétri emplies à moitié de terreau recouvert de feuilles de frêne. Ce terreau provient des bacs d'élevage. La fécondation croisée des vers aboutit en 4 à 6 jours à la ponte de plusieurs cocons (jusqu'à 25 cocons) sans s'accoupler de nouveau. Le cocon n'est donc pas secrété pendant l'accouplement comme le pensait FOOT (1898).

Les cocons sont généralement déposés en surface, au-dessus des feuilles de frêne. Ils sont prélevés chaque jour, rincés avec de l'eau du robinet et mis dans une boîte de Pétri entre deux feuilles de papier filtre humide.

A 1, 5, 10, 15 et 20 jours d'incubation, à l'aide de ciseaux de Pascheff-Wolff, l'enveloppe du cocon est ouverte, la gelée est alors récupérée et analysée.

II - METHODES BIOLOGIQUES

Avant toute manipulation les vers sont soumis à un jeûne complet pendant 4 jours afin de vider leur tube digestif de la terre qu'il contient.

A - Techniques de prélèvement

Les vers sont opérés après anesthésie. Pour cela ils sont plongés 3 à 4 minutes dans une solution de chlorétone à 0,5 % dans l'eau distillée. Les vers anesthésiés sont allongés sur une rondelle de papier filtre humide et opérés sous la loupe binoculaire. La partie correspondant au clitellum (du 27e au

35e segment) est sectionnée à l'aide d'un microscalpel. Le tube digestif est soigneusement retiré. Ce sont les parties ventrale (musculature) et dorsale (clitellum) qui sont étudiées.

B - Techniques histologiques

· Microscopie photonique

Les pièces sont fixées au Bouin Hollande sans acide acétique, déshydratées et incluses dans la paraffine pour être débitées en coupes de 6 µm d'épaisseur. Après déparaffinage, les coupes sont colorées par la fuchsine paraldéhyde de GABE suivant la technique de CLARK. Cette méthode met bien en évidence les différents constituants du clitellum.

C - Techniques histochimiques

Les protéines sont recherchées par la technique de la tétrazoréaction de DANIELLI. Elles prennent alors une teinte allant du jaune au pourpre permettant de les localiser.

Nous nous sommes aussi attachés à l'étude des polysaccharides par la technique du P.A.S. avec un contrôle enzymatique à l' α -amylase.

Les lipides ont été mis en évidence par le procédé de BAKER et ELFTMAN au Noir Soudan B.

Nous avons été amenés à pratiquer un démasquage en traitant les coupes pendant 4 heures par le mélange méthanol/chloroforme (1 Vol/ 1 Vol), les enrobages ont été exécutés à la paraffine ce qui permet la confection des coupes de 6 µm favorables à l'étude cytochimique.

D - <u>Technique autoradiographique</u> (d'après la technique de LARA et DROZ, 1970)

Les vers entiers reçoivent 3 µCi de mannose et 5 µCi de leucine tritiés. Les fixations sont faites à 12 heures, 17 heures et 24 heures après l'injection afin de réaliser une cinétique. Des coupes de 6 µm d'épaisseur montées sur des lames gélatinées sont déparaffinées, réhydratées et plongées dans une émulsion photographique Ilford K 5 (V/V dans de l'eau distillée) à 40°C. Les lames séchées en position verticale sont rangées dans une boîte noire à l'abri de la lumière. Après 15 jours d'exposition nous avons révélé les lames. La révélation est suivie d'une coloration des coupes au rouge nucléaire-picroindigocarmin.

Pour les coupes semi-fines, la coloration est effectuée au Bleu Azur B.

III - LES METHODES BIOCHIMIQUES

A - Préparation du matériel biologique

Les vers mis au jeûne total pendant 4 jours (ayant le tube digestif entièrement vide) sont anesthésiés au chlorétone. Sous une loupe binoculaire les clitellums sont prélevés et rincés à l'eau bidistillée pour éliminer l'annesthésique. Ils sont broyés dans l'eau bidistillée au moyen d'un homogénéiseur DOUNCE.

Les cocons se dessèchent très vite, c'est pourquoi une grande importance a été attachée à l'humidité. Des cocons placés sur du papier filtre humide sont découpés et la gelée est récupérée pour être analysée.

B - Méthodes colorimétriques de dosage des polysaccharides et des protéines

Nous avons entrepris la recherche des oses neutres et des protéines par diverses techniques biochimiques d'analyse colorimétrique. C'est ainsi que la méthode de Geiger-Bessman a été utilisée pour le dosage des protéines. Cette mesure est confirmée par le dosage de l'azote total grâce à la méthode de Kjeldhal.

C'est la méthode à l'orcinol que nous avons choisie pour le dosage des oses neutres.

C - Méthodes d'identification et de dosage chromatographique des composés glucidiques et lipidiques

Vu sa sensibilité (l à 2 μ g) nous avons pensé que la chromatographie en phase gazeuse est un procédé de choix pour doser les oses. C'est le mélange chloroforme-méthanol dans les proportions 2:1 (V/V) qui a été choisi pour l'extraction des lipides totaux. Après extraction, il nous a semblé intéressant de savoir quels étaient les acides gras que certains de ces lipides neutres pouvaient contenir.

D - Méthodes d'analyse électrophorétique des protéines

Les protéines du clitellum ainsi que celles des cocons à différents stades de leur développement ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de Sodium dodécylsulfate (S.D.S.) : la migration des molécules protéiques est alors directement proportionnelle à leur poids moléculaire.

Nous avons aussi analysé les protéines par l'électrophorèse en milieu non-dénaturant (sans S.D.S.) ainsi que par l'électrophorèse bidimensionnelle.

CHAPITRE I

STRUCTURE DU CLITELLUM

ANALYSE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE

STRUCTURE DU CLITELLUM

ANALYSE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE

Des vers arrivés à maturité sont mis par deux en élevage à 20 ± 2°C dans des boîtes de Pétri contenant du terreau. Ces vers vont s'accoupler. L'accouplement chez Lumbricus terrestris a été soigneusement décrit par HERING (1856). Le même problème a fait l'objet d'étude approfondie de FOLDKAMPF (1924) sur Lumbricus terrestris.

AVEL (1929) a observé l'accouplement chez Allolobophora terrestris Sav.

Les glandes sétales annexées aux soies génitales d'E. foetida élaborent des substances qui participent aux dispositifs d'accrochage des deux partenaires (GROVE, 1925; GROVE et COWLEY, 1927).

I - ETUDE DES COCONS

Après l'accouplement chaque ver dépose à la surface tous les 4 à 5 jours un cocon où sont enfermés les oeufs. La fréquence de ponte dépend de la température. MICHON (1954) observe que chez E. foetida élevé à 18°C la ponte est inférieure de moitié à celle obtenue à 28°C. Les oeufs sont fécondés dans le cocon au moment de son passage au niveau des spermathèques (GROVE, 1927; GROVE et COWLEY, 1927). Malgré la tendance naturelle des oeufs à la polyspermie (ANDRE, 1963; DEVRIES, 1964 b), le nombre de spermatozoïdes fécondants est rarement supérieur à 1 (FOOT, 1894).

Le développement embryonnaire d'E. foetida appartient au type "direct": il s'effectue en totalité dans le cocon, depuis la fécondation des oeufs jusqu'à l'éclosion des jeunes vers différenciés. La durée d'incubation des vers de terre est variable. Sur un total de 600 cocons mis en incubation jusqu'au terme, 81 ont avorté soit 13,5 %. Les observations sur les 519 cocons qui ont permis une éclosion ont été reportées dans le tableau I, celui-ci est établi en fonction du nombre de jeunes à l'éclosion (de l à 8) et de la durée d'incubation observée (de 12 à 22 jours).

Dans les deux classes extrêmes nous avons porté les rares individus qui ont éclos en moins de 12 jours ou plus de 22 jours après la ponte.

Tableau I - Nombre de jeunes à l'éclosion en fonction de la durée d'incubation.

	Totaux	12 jours et moins	13 jours	14 jours	15 jours	16 jours	17 jours	18 jours	19 jours	20 jours	21 jours	22 jours	Nombre de jeunes à l'éclosion
Durée moyenne d'incubation	0,81%								^				0
19,43 J ± 4,40	122 23,58 %	5	,1	-	7	71	_	6	7	91	21	30	
17,93 J ± 4,23	178 34,29 %	17	7		10	20	16	27	=	13	16	33	2
17,67 J ± 4,20	127 24,47 Z	4	5	80	13	17	20	19	5	14	13	6	9
18,04 J ± 4,24	42 8,09 %		_	ю	_	.53	7	-	7	3	5	2	4
17,47 J ± 4,17	37 7,13 %	20	1	2	2	_		9		3	2		5
17,25 J ± 4,15	8 1,54 %	7			_			2					9 .
16,67 J ± 4,08	3 0,58 %			-				2					7
ш < 13 Ј	2 0,38 %	2											8
	519	52 10,02 %	12 2,31 %	26 5,01 %	34	57 10,98 %	51 9,83 %	76 14,64 %	39 5,78 %	50 9,63 %	74 14,26 %	74	
Moyenne du nombre de jeunes à l'éclosion		3,7 ± 1,92	2,7 ± 1,64	1,9 ±	2,5 ± 1,58	2,2 ± 1,48	2,3 ± 1,51	2,8 ± 1,67	2,4 ± 1,54	2,3 ±	1,7 ± 1,30	1,7 ± 1,30	

La lecture du tableau fait ressortir avec évidence la grande variabilité des valeurs obtenues, néanmoins une certaine règle peut être tirée : plus le nombre d'embryons dans le cocon est élevé, moins la durée d'incubation est longue, inversement moins le nombre d'embryons est élevé plus la durée d'incubation est longue. Le coefficient de corrélation entre ces deux variables est très élevé (0,96). Il est le signe d'une liaison certaine entre le nombre d'embryons et la durée d'incubation. Autrement dit, la corrélation entre nombre d'embryons et durée d'incubation peut être considérée comme significative.

Les cocons ont la forme d'un citron (Pl. I, figs A et B). Ils ont des tailles variables allant de 3 à 4 millimètres de longueur pour une masse moyenne de 7 milligrammes. D'abord blanc et mou, le cocon brunit et durcit dans les 45 minutes qui suivent son dépôt. Ce brunissement serait dû à la présence de fer (KNIGHT et HUNT, 1974). Le mécanisme du durcissement du cocon n'est pas encore connu. L'étude de KNIGHT et HUNT (1974) a montré chez Expobdella octoculata que la composition chimique de l'enveloppe du cocon était voisine des kératines.

Le tube muqueux qui emprisonne le cocon au moment de la ponte persiste normalement 5 à 8 heures, avant de se décomposer. L'enveloppe de ces cocons est élastique et transparente (Pl. I, fig. C) ce qui permet, quelques jours après la ponte, d'observer des embryons au centre de la gelée qui remplit le cocon. Ils sont en nombre très variable d'un cocon à l'autre (Tableau I).

Dès que les embryons sont dotés d'un système sanguin, le cocon devient orange. Les embryons sont alors observables par transparence d'autant que la gelée nutritive a été consommée. L'oeuf est donc dans un cocon dont le contenu secrété par les glandes clitelliennes, assurera la croissance embryonnaire. Notons que chez E. foetida le vitellus des oeufs est peu abondant. HESS et VENA (1974) travaillant sur Enchytraeus fragmentosus et RICHARDS (1977) sur Lumbricillus rivalis ont montré que la faible valeur nutritive du cocon de ces deux espèces est compensée par l'abondance des réserves vitellines de l'oeuf.

Chez E. foetida les jeunes vers ont la même structure que les adultes. Ils sortent du cocon par le pôle portant un petit tube et jamais par celui qui est pointu.

II - ETUDE HISTOLOGIQUE DU CLITELLUM

A - Etude d'un ver immature

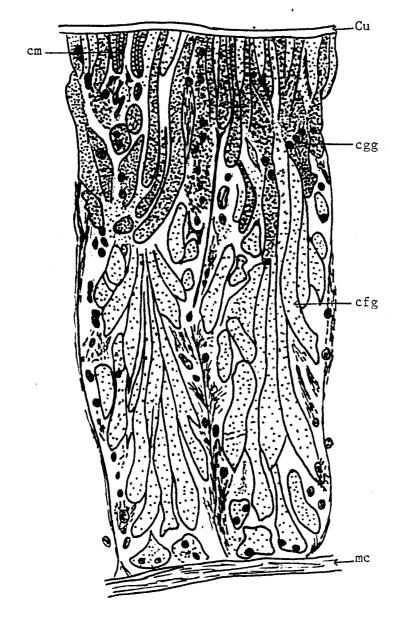
Chez E. foetida les gonades se différencient au cours de la vie embryonnaire et à l'éclosion le jeune ver présente déjà trois paires de glandes génitales qu'il conservera toute sa vie. Il s'agit de deux paires de testicules et d'une paire d'ovaires. Ces glandes sont encore très petites et indifférenciées. Au bout de deux mois, le ver, s'il a été bien alimenté, a notablement grandi, mais il est encore tout-à-fait infantile et dépourvu de caractères sexuels somatiques externes.

Le jeune ver continue à croître mais la région où se différenciera plus tard le clitellum (du 27e au 35e segment) ne présente aucune modification extérieure nette. L'épithélium de cette région a la même structure que celle des segments voisins. A la fin de la période infantile, bien qu'extérieurement il soit difficile d'apercevoir les traces des caractères sexuels somatiques, l'étude des coupes de la région clitellaire montre l'absence de cellules muqueuses. L'épithélium cutané de la région ventrale est formé d'une couche externe de cellules cylindriques étroites et d'une couche interne de cellules plus petites disposées sans ordre apparent (Pl. II, fig. A). Ces plages cellulaires sont des ébauches de différenciations glandulaires.

C'est la région correspondant au futur clitellum (27e au 35e segment) prélevée chez le ver à ce stade que nous qualifierons durant tout notre travail de "clitellum immature".

B - Etude d'un ver submature

Le début de la puberté se manifeste par l'apparition de caractères sexuels secondaires. L'épithélium est formé d'une couche externe de cellules cylindriques étroites fortement serrées les unes contre les autres doublée intérieurement d'une couche assez épaisse de cellules épithéliales disposées sans ordre apparent (Pl. II, fig. B). Dorsalement l'animal ne présente encore aucune indication du futur clitellum mais ventralement la base des soies pourvues de glandes sétales (soies ventrales des 30e, 31e et 33e segments) présente l'aspect de petites papilles saillantes et se pigmente en blanc crème. C'est cette pigmentation qui a été utilisée comme critère externe pour reconnaître les vers submatures.



Coupe du clitellum de *Lumbricus terrestris* : cfg, cellules à fins granules ; cgg, cellules à gros granules ; cm, cellules à mucus ; cu, cuticule ; mc, musculature circulaire d'après CROVE).

C - Etude d'un ver mûr

4 à 6 mois après la naissance, la puberté se manifeste par le développement complet de caractères sexuels somatiques ventraux. Au niveau de la région clitellaire sur chacun des segments 30, 31 et 33 on trouve une paire de larges papilles saillantes (Pl. III, fig. C). On remarque l'apparition du clitellum du 27 au 35ème segment. La peau dorsale prend un aspect chagriné et les sillons intersegmentaires commencent à s'atténuer. La pigmentation de la région clitellaire déjà visible à la submaturité, s'intensifie à la maturité rendant le clitellum différent des autres segments. A mesure que l'activité génitale progresse, l'épithélium dorsal et ventral du 27e au 35e segment se modifie. Il devient de plus en plus chagriné en même temps que les sillons intersegmentaires disparaissent complètement. Puis il gonfle et finit par former la ceinture saillante, espèce de selle qui entoure les parties dorsale et latérale du corps jusqu'aux tubercules de la puberté (Pl. III, fig. A). La saillie du clitellum provient d'un énorme développement de cellules glandulaires sous-jacentes à l'épithélium et qui dérivent de la couche sous-cutanée des petites cellules qui étaient apparues à la puberté (AVEL, 1928). L'emploi de la muci-hématéine associée au picro-indigo-carmin, de la thionine et de la triple coloration de Mallory permettent à AVEL (1928), GROVE et COWLEY (1928) d'étudier la répartition de 3 catégories glandulaires dans le clitellum mûr : les glandes à mucus (a), les glandes à gros granules (b) et les glandes à fins granules (c). Nous avons retrouvé ces glandes (Pl. II, fig. C) lors de notre étude histologique.

GROVE et COWLEY (1928) précisent le rôle de ces diverses catégories glandulaires. Le tube muqueux serait formé par la sécrétion des cellules à mucus (a). Les cellules à gros granules (b) élaboreraient la paroi du cocon, tandis que les cellules à fins granules (c) seraient à l'origine de la gelée "albumineuse" remplissant le cocon et à l'intérieur de laquelle sont déposés les oeufs. AVEL (1929), VALEMBOIS, ROCH et LASSEGUES (1984) pour expliquer la résistance aux actions bactériennes du contenu du cocon pensent que cette résistance pourrait être due à la composition propre de cette substance ou à des sécrétions antibiotiques de l'épiderme du ver adulte.

VANDEBROEK (1934) dans son mémoire sur l'embryogenèse d'E. foetida et DEVRIES (1972) signalent que le vitellus du cocon devient extrêmement dur après passage dans de nombreux liquides, notamment les alcools. Nous nous sommes heurtée aux mêmes difficultés malgré l'essai de plusieurs techniques qui sont demeurées sans résultat positif : le vitellus empêche la confection de coupes convenables.

III - ETUDE HISTOCHIMIQUE DU CLITELLUM

Dans le but de mettre en évidence les sucres, les protéines et les lipides, nous avons réalisé une étude histochimique de la région clitellaire du ver aux trois stades précédemment décrits, à savoir :

- . ver immature,
- . ver submature,
- . ver mûr.

A - Etude des protéines

La tétrazoréaction de Danielli permet d'observer, chez les immatures, dans la région correspondant au futur clitellum, que les cellules formant la couche interne sont relativement pauvres en protéines (Pl. IV, fig. A).

Chez les submatures, les cellules épithéliales ne se colorent pas toutes de la même manière. Certaines cellules semblent très colorées, d'autres un peu moins (Pl. IV, fig. B). Il est probable que les cellules possèdent à ce stade les caractères spécifiques de leur future sécrétion.

A la maturité, l'intensité de la coloration de la tétrazoréaction dans les cellules à gros granules et les cellules à mucus n'est pas très importante. Cette intensité s'accentue dans les cellules à fins granules (Pl. IV, fig. C). Ce sont donc les cellules à fins granules qui sont plus riches en protéines que celles à gros granules et que les cellules à mucus.

B - Etude des sucres

Pour les sucres nous avons choisi la réaction à l'acide périodique-Schiff (P.A.S.) avec contrôle enzymatique à l'α-amylase pour le glycogène. La réaction positive n'est due qu'à la présence des polysaccharides puisqu'elle disparaît sur les coupes n'ayant pas subi d'oxydation périodique.

Chez les immatures, la couche externe de cellules cylindriques réagit très positivement au P.A.S., au contraire de la couche interne qui paraît peu colorée (Pl. IV, fig. D).

Dansle clitellum submature la couche externe est plus colorée que les cellules épithéliales de la couche interne (Pl. IV, fig. E).

A la maturité, les cellules à fins granules sont nettement plus colorées que celles à gros granules et à mucus qui ne présentent que des granulations modérément colorées (Pl. IV, fig. F). Les cellules à fines granulations sont donc riches en polysaccharides.

C - Etude des lipides

L'observation de nos coupes après coloration au Noir Soudan révèle la pauvreté du clitellum en lipides au stade immature et submature. A la maturité on note la présence de quelques gouttelettes lipidiques sans répartition préférentielle. Cette pauvreté a été vérifiée par une délipidation à l'alcool-éther bouillant.

IV - DISCUSSION

Le cocon de l'Oligochète E. foetida mesurant 3 à 4 millimètres pour une masse moyenne de 7 milligrammes est nettement plus gros que celui de l'Hirudinée *Piscicola geometra* qui d'après MALECHA (1979) ne mesure que 1,5 mm environ pour une masse de 0,2 mg.

Chez E. foetida trois types cellulaires: cellules à mucus, cellules à fins granules et cellules à gros granules, semblent suffisants pour la formation du cocon. Les cellules à mucus forment le tube muqueux, les cellules à gros granules fournissent la paroi du cocon et les cellules à fins granules sécrètent le contenu "albumineux" du cocon. Il en serait de même pour Lumbricillus rivalis (RICHARDS, 1977), pour Enchytraeus (HESS et VENA, 1974) et pour Branchiobdella pentodonta (FERNESI et WAGNETTI, 1974). Le cocon serait toutefois élaboré par trois sécrétions différentes chez Tubifex (HIRAO, 1965; SUZITANI, 1977).

D'après MALECHA (1979) chez *P. geometra* cinq types cellulaires interviennent dans l'élaboration du cocon : les <u>cellules de type l</u> sécrètent une substance riche en mucopolysaccharides acides et la structure des granules est très voisine des sécrétions muqueuses dans d'autres groupes et notamment dans certaines cellules à mucus des Oligochètes (RICHARDS, 1975).

- . Les cellules de type 2a donnent naissance aux fibrilles de la paroi du cocon.
- . Les <u>cellules de type 2b</u> seraient à l'origine de la formation de l'opercule (hypothèse émise par MALECHA, 1979).
- . Les <u>cellules de type 3</u> donnent les amas denses de forme variable de la paroi.
- Les <u>cellules</u> de type 4. La sécrétion de ce type de cellules constitue les réserves du cocon et est l'équivalent de celle des cellules à fins granules des Lumbricidés et des cellules globuleuses de L. rivalis (RICHARDS, 1977) Chez P. geometra, dès que la paroi du cocon est achevée, la sécrétion de ces cellules est déversée très rapidement en même temps que se fait la ponte d'un oeuf unique.

. Les <u>cellules de type 5</u> : MALECHA (1979) émet l'hypothèse de la sécrétion d'une phéromone intervenant dans la reconnaissance des individus en vue de la copulation.

RICHARDS (1974) émet l'hypothèse que les cellules muqueuses orthochromatiques des Lumbricidés sécrètent une phéromone sexuelle attractive.

Chez E. foetida DEVRIES (1972) a montré que le nombre d'oeufs pondus par cocon est très variable. On peut en trouver jusqu'à 15 ou 20 dans les cas extrêmes, 4 à 12 le plus souvent. Il sont rarement tous fécondés. La fréquence de fécondation varie d'un cocon à l'autre (en moyenne 2 à 5 oeufs fécondés). Ceux qui n'ont pas reçu de spermatozoïdes peuvent se développer par parthénogenèse mais présentent une segmentation aberrante. Chez les Hirudinées le nombre d'oeuf dans le cocon varie avec les espèces, la famille des Piscico-Lidae est la seule à n'en pondre qu'un.

La maturité d'un ver se manifeste dorsalement par la turgescence du clitellum et ventralement par la pigmentation en blanc crème de la région allant du 27e au 35e segment. L'étude histochimique montre que le clitellum mûr est plus riche en protéines et en sucres que la région homologue du ver submature ou immature. Mis à part les cellules à mucus qui sont relativement riches à la fois en sucres et en protéines, les deux autres types cellulaires qui forment le clitellum répondent d'une manière différente à la tétrazoréaction de Danielli et au P.A.S. En effet, les cellules à fins granules sont plus riches en protéines et en sucres que les cellules à gros granules. Le clitellum d'E. foetida est pauvre en lipides : ce n'est qu'à la maturité que nous avons pu mettre en évidence quelques gouttelettes lipidiques répandues sans ordre apparent dans les cellules.

V - CONCLUSIONS

- A l'immaturité, la région allant du 27e au 35e segment et où se différenciera plus tard le clitellum est formée d'une couche de cellules cy-lindriques doublée extérieurement d'une plage de cellules plus petites disposées irrégulièrement.
- A la submaturité du ver, nous retrouvons encore cette couche de cellules cylindriques et une couche épaisse de cellules épithéliales.
- A la maturité, le clitellum est formé de glandes à mucus, de cellules à grosses granulations et de cellules à fines granulations.
- L'observation de nos coupes met clairement en évidence la richesse du clitellum en protéines et en sucres et sa relative pauvreté en lipides.

La maturation clitellaire est donc caractérisée cytochimiquement par une nette augmentation du taux de protéines et du matériel P.A.S. positif. Ainsi il nous a semblé intéressant de confronter nos observations à des données biochimiques d'autant qu'à notre connaissance il n'existe aucun travail réunissant données biochimiques et caractéristiques structurales du clitellum d'E. foetida à différents stades de maturation sexuelle.

Pour compléter ce travail, nous nous sommes orientée vers une étude biochimique du cocon afin d'élucider les transformations qui interviennent durant le cycle d'incubation de celui-ci.

CHAPITRE II

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES PROTÉINES

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES PROTÉINES

INTRODUCTION

L'étude histochimique ayant montré l'existence dans le clitellum d'une assez grande quantité de protéines, nous avons procédé au dosage et à la séparation des protéines.

I - TECHNIQUES UTILISEES

A - Dosage des protéines

1 - Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldhal

L'échantillon est minéralisé en présence d'acide sulfurique à chaud. De cette manière l'azote protéique se transforme en azote ammoniacal. La solution des sels d'ammonium obtenue est ensuite déplacée par la soude concentrée puis distillée et l'ammoniaque est recueillie dans une solution titrée d'acide sulfurique dilué. L'acide en excès est alors dosé par la soude titrée, en présence de rouge de méthyle.

2 - <u>Dosage des protéines totales par la méthode de Geiger-Bessman</u>

Parmi les méthodes de dosage préconisées c'est celle de

GEIGER-BESSMAN (1972) que nous avons utilisée : en présence du réactif de

FOLIN-CIOCALTEUX, les protéines forment un complexe jaunâtre qui se prête à un dosage spectrophotométrique. La lecture se fait à 540 nm. La même méthode a été utilisée pour le dosage des protéines dans les fractions solubles. Ces fractions sont préparées à partir de broyats de clitellums et du contenu de cocons par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes.

B - Etude électrophorétique des protéines . Trois types d'électrophorèse ont été utilisés.

- l Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu nondénaturant
 - Il s'agit du déplacement d'une molécule chargée sous l'in-

fluence d'un champ électrique dans un support de polyacrylamide. Le support étant un gradient d'acrylamide 5-25 % nous travaillons à un pH 8,8. Les molécules se déplacent selon la charge mais au cours de la migration, les grosses molécules sont vite bloquées. Les petites continuent à migrer et seront bloquées plus bas dans le gel selon leur poids moléculaire. Il s'agit donc d'une séparation des protéines natives selon leur poids moléculaire.

2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant

Les échantillons sont traités par le S.D.S, en chauffant l'échantillon à la température de 100°C pendant 5 min en présence du S.D.S. (dodécyl-sulfate de sodium). Les protéines sont dénaturées et dissociées en leurs sous-unités. La vitesse de migration de la protéine ainsi traitée est proportionnelle au poids moléculaire du polypeptide.

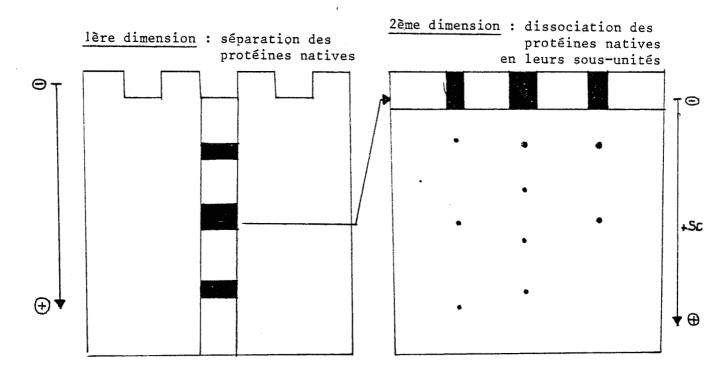
Il existe une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire d'un polypeptide et sa mobilité. En comparant la mobilité d'une protéine avec celle des protéines témoins, on parvient à déterminer son poids moléculaire.

3 - Electrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide

Ce système permet de relier les deux types d'électrophorèse.

Il permet donc de déterminer la composition polypeptidique des protéines natives séparées selon leur poids moléculaire car en :

lère dimension, les protéines natives sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse dans un gradient d'acrylamide 5-25 %, 2ème dimension, ces protéines natives séparées sont analysées dans l'électrophorèse en milieu dénaturant (en présence du S.D.S.) (Schéma 1).



Toute l'étude biochimique est faite sur les stades du clitellum déjà définis antérieurement. En ce qui concerne les cocons, signalons que le développement embryonnaire d'E. foetida appartient au type direct : il s'effectue en totalité dans le cocon, depuis la fécondation des oeufs au passage du cocon par les orifices des spermathèques jusqu'à l'éclosion des jeunes vers différenciés. Nous avons déjà signalé la variabilité de la durée d'incubation des vers de terre.

DEVRIES (1972) a dressé une chronologie du développement embryonnaire chez E. foetida unicolor à 22°C.

Segmentation	1	à 24 h	eures
Jeune blastule	29	heures	
Blastule moyenne	48	heures	
Début de l'applatissement dorso-ventral	60	heures	}
Placule moyenne	3	jours	lers grains vitelling dans l'endoderme
Jeune gastrule	4	jours	}
Gastrule sphérique de 150-200 µm	n 5	jours	Absorption active
Gastrule ovoïde de 400-500 μm	6	jours	du vitellus par
Gastrule de 1,5-2 mm	12	jours	} le stomodeum
Jeune ver éclos	25-28	jours	allongement de l'embryon

Se basant sur cette étude chronologique, nous avons jugé intéressant d'étudier les variations biochimiques durant le développement embryonnaire d'E. foetida. C'est ainsi que nous avons opéré sur des cocons :

- après l jour d'incubation à 22°C ----→ entre segmentation et jeune blastule ;
- après 5 jours d'incubation à 22°C \longrightarrow gastrule de 150-200 μm
- après 10 jours d'incubation à 22°C \longrightarrow 2mm > gastrule > 500 μ m
- après 15 jours d'incubation à 22°C —⊳ gastrule
- après 20 jours d'incubation à 22°C → embryon complet

Durant toute notre étude nous étions limités par le nombre de cocons disponibles. Pour avoir l' ml de gelée nutritive il fallait environ 100 cocons. Un autre problème est venu s'ajouter au premier : il s'agit de la détermination de l'unité biologique. Nous avons été confrontés à ce problème tout au long de notre étude : fallait-il exprimer les résultats des dosages des clitellums par rapport à un clitellum, et ceux des cocons par rapport à un cocon ? Les animaux sur lesquels nous opérons sont à des stades de maturité différents. Aussi le clitellum est plus ou moins gros selon le stade que l'on considère. Il est

très petit à l'immaturité, plus important à la submaturité et turgescent à la maturité. Un clitellum mûr peut avoir un poids représentant le double, voire le triple de la même région chez un ver immature. En outre à la maturité, le poids d'un clitellum diffère d'un ver à l'autre. Pour des vers provenant d'un même cocon, la formation du clitellum et donc la maturité génitale ne se déroule pas de la même manière.

Quelle que soit la forme de l'expression des résultats, elle peut comporter un certain nombre d'erreurs à savoir : l'impossibilité de tenir compte de la grosseur du clitellum et du cocon et, pour le cocon en particulier, erreur sur la relation entre le jour d'incubation et le développement réel de l'embryon. On peut cependant dire que le choix d'opérer sur des résidus secs et l'expression des résultats en pourcentage par rapport à ces derniers pourrait être dans un premier temps le meilleur moyen de mener une étude comparative de nos échantillons.

II - RESULTATS

Résultats du dosage des protéines par la méthode de Kjeldhal
 A partir de l'équation chimique

$$2 \text{ NH}_4\text{OH} + \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}_4$$

et sachant que 1 ml d' ${\rm H_2SO_4}$ 0,1 N correspond à 1,4 mg de ${\rm N_2}$

soit n = nombre de millilitres d'acide sulfurique versé

v = la prise d'essai

la teneur en azote est égale à :

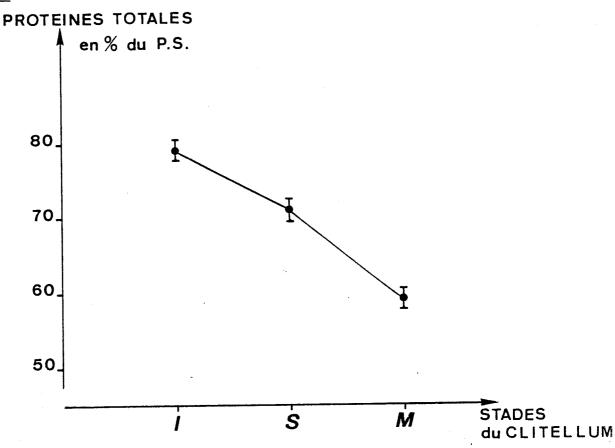
cet azote peut être exprimé en protéines par la formule suivante :

Les valeurs obtenues sont consignées dans le tableau II.

Tableau II - Teneurs en protéines totales dans le clitellum, exprimées en pourcentage par rapport au poids sec (les valeurs exposées représentent la moyenne de 6 expériences).

	Clitellums immatures	Clitellums submatures	Clitellums mûrs
Méthode de Kjeldhal	82 ± 1,63	76 ± 1,84	62 ± 1,77
Méthode de Geiger-Bessman	79 ± 1,72	71 ± 1,74	59 ± 1,68

Figure 1



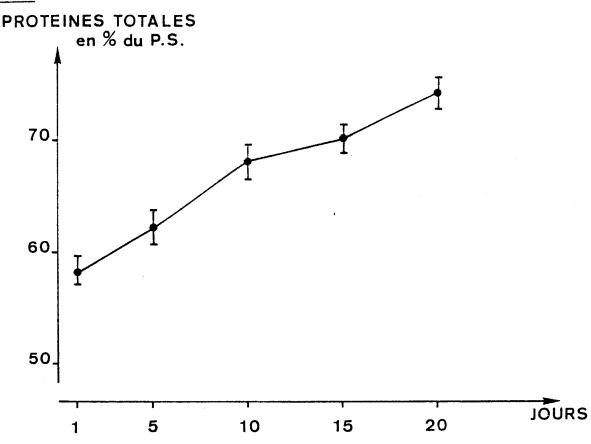
Des résultats exprimés dans le tableau II, il ressort que la teneur en protéines totales diminue progressivement au cours de la maturation puisqu'elle passe de 82 % dans le clitellum immature à 62 % dans le clitellum mûr. Ces résultats ont été confirmés par la deuxième méthode de dosage des protéines totales.

2 - Résultats du dosage des protéines totales dans le cocon à différents stades d'incubation (méthode de Geiger-Bessman)

Tableau III - Teneurs en protéines totales dans les cocons de l à 20 jours d'incubation, exprimées en pourcentage par rapport au poids sec (les valeurs exposées représentent la moyenne de 6 expériences).

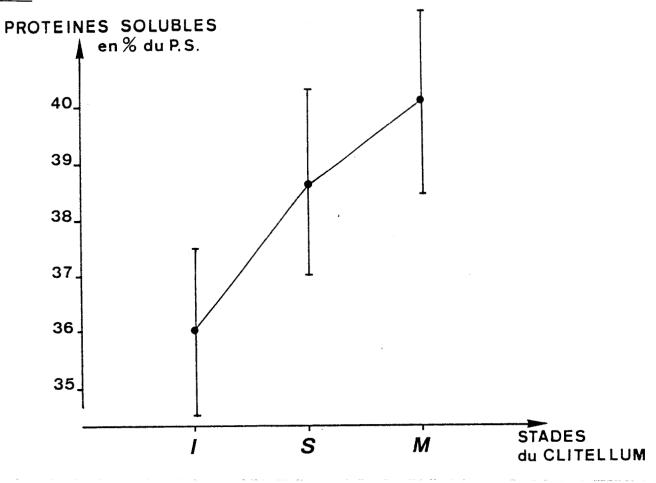
Cocon l j	Cocon 5 j	Cocon 10 j	Cocon 15 j	Cocon 20 j
58 ± 1,43	62 ± 1,52	68 ± 1,64	70 ± 1,54 .	74 ± 1,50

Figure 2

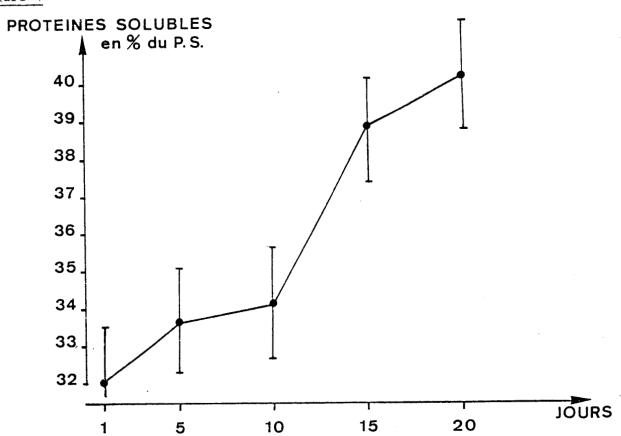


La Figure 2 montre une évolution progressive de la teneur en protéines totales qui, de $58\ \%$ le ler jour d'incubation, atteint $74\ \%$ le $20\mbox{em}$ e jour.

Figure 3







3 - Résultats du dosage des protéines solubles dans le clitellum et dans le cocon de l à 20 jours d'incubation (méthode de Geiger-Bessman)

Tableau IV - Teneurs en protéines solubles dans le clitellum et dans le cocon de l à 20 jours d'incubation exprimées en pourcentage de matières sèches (les valeurs exprimées représentent la moyenne de 5 expérience

Clitellums	Clitellums	Clitellums	Cocons	Cocons	Cocons	Cocons	Cocons
immatures	submatures	mûrs	l j	5 j	10 j	15 j	20 j
36,09	38,64	40,13	32,08	33,64	34,17	38,86	40,26
±	±	±	±	±	±	±	±
1,50	1,67	1,64	1,52	1,43	1,57	1,48	1,51

Le tableau IV montre une augmentation des protéines solubles pendant la maturation du clitellum. Il en est de même pour le cocon pendant la période d'incubation.

Tableau V - Tableau récapitulatif : tous les résultats sont donnés en pourcentage par rapport au poids sec.

	Clitellums immatures	Clitellums submatures	Clitellums mûrs	Cocons l j	Cocons 5 j	Cocons 10 j	Cocons 15 j	Cocons 20 j
Protéines totales								
Kjeldhal	- 82	76	62					
Geiger- Bessman	79	71	59	58	62	68	70	74
Protéines solubles								
Geiger- Bessman	36,09	33,64	40,13	32,08	33,64	34,17	38,86	40,26

4 - Résultats de l'étude électrophorétique

Après analyse comparative des électrophorégrammes en milieu non-dénaturant des fractions solubles des clitellums aux trois stades de maturation sexuelle, nous pouvons dégager schématiquement l'apparition de 3 protéines majeures au stade mûr : A, B et C (Pl. V, fig. A). La protéine A ne semble pas homogène et pourrait être constituée de 2 protéines de hauts poids moléculaires très proches. Ces trois protéines majeures sont complètement absentes dans le clitellum immature et légèrement représentées à la submaturité.

La nature lipoglycoprotéique de ces protéines est mise en évidence par la coloration au Noir Soudan pour les lipides et le réactif de Schiff pour la partie glycannique (Pl. V, figs B et C). Les résultats de cette coloration montrent que la

protéine A : de poids moléculaire légèrement supérieur à 440 Kd (kilodaltons) est de nature glycolipoprotéique.

A₁: est de nature glycolipoprotéique,
A₂: serait de nature glycoprotéique.

protéine B : de poids moléculaire supérieur à 232 Kd est de nature glycoprotéique.

protéine C : de poids moléculaire légèrement inférieur à 134 Kd est elle aussi une glycoprotéine.

L'analyse en milieu non-dénaturant des fractions solubles de cocons de l à 20 jours d'incubation révèle la présence d'une protéine majeure que l'on peut assimiler à la fraction A du clitellum et l'absence totale des protéines B et C (Pl. V, fig. A).

La fraction soluble du cocon n'est qu'une partie du cocon (schéma 2). Il est possible que les protéines B et C se trouvent dans la fraction insoluble. L'électrophorèse en milieu dénaturant par le S.D.S. permet de dissoudre au moins en partie les fractions insolubles du cocon. Dans un premier temps il a fallu analyser le contenu du cocon et du clitellum. Cette électrophorèse a révélé la présence de 4 polypeptides majeurs de haut poids moléculaire dans le clitellum mûr (a, b, c, d). a et b sont d'un poids moléculaire supérieur à 94 Kd, c a un poids moléculaire approximativement égal à 94 Kd et d est d'un poids moléculaire inférieur à 94 Kd (Pl. VI, fig. A). L'analyse des fractions solubilisées des cocons de l à 20 jours d'incubation révèle la présence de deux polypeptides de même poids moléculaire que a et c. Ces deux polypeptides sont présents quel que soit le stade d'incubation du cocon (Pl. VI, fig. B).

Nous avons donc 4 polypeptides majeurs dans le clitellum mûr et 2 polypeptides majeurs dans le cocon. Or dans le cocon on n'a que A comme protéine native. On pourrait penser que a et b constituent A et que b et c peuvent constituer au moins en partie les protéines natives B et C.

Nous allons essayer de rechercher b et c dans les culots obtenus par centrifugation des broyats de cocons de l à 20 jours d'incubation (schéma 2). Ces culots sont traités 24 heures à la température ambiante par le S.D.S. puis 5 minutes à 100°C. Les surnageants où se trouvent les protéines solubilisées par le S.D.S. sont analysés. Le profil électrophorétique révèle l'absence des polypeptides b et d (Pl. VII, fig. A).

Nous allons rechercher b et d dans les enveloppes des cocons. Pour cela, les enveloppes sont traitées de la même manière que les culots. Les électrophorégrammes obtenus montrent l'absence de b et d dans les enveloppes (P1. VII, fig. B).

L'électrophorèse en milieu non-dénaturant a révélé que la fraction native A décelée dans la fraction soluble du clitellum mûr est aussi présente dans les fractions solubles du cocon.

Cette fraction native A est de même nature dans la fraction soluble du clitellum et du cocon, à savoir : glycolipoprotéique. Ces deux arguments nous conduisent à penser que la fraction native A décelée dans la fraction soluble du clitellum mûr est la même que celle trouvée dans la fraction soluble du cocon. L'électrophorèse en milieu dénaturant nous a permis de démontrer que deux polypeptides majeurs a et c sont communs à la fraction soluble du clitellum mûr et du cocon. Ces polypeptides peuvent correspondre aux sous-unités de A.

Le résultat d'une électrophorèse bidimensionnelle serait susceptible de confirmer cette hypothèse. Les électrophorégrammes obtenus montrent 3 spots dont 2 correspondent à a et c (Pl. VIII, figs A et B).

Le résultat de cette électrophorèse n'est qu'un troisième argument permettant de confirmer que la fraction native A serait transférée du clitellum mûr dans le cocon.

Dans une dernière étape nous avons voulu savoir si cette fraction A serait dans l'embryon après 10 jours d'incubation du cocon (gastrules) ou alors dans le gelée nutritive. La comparaison des électrophorégrammes montre que la fraction native A (A $_1$ et A $_2$) est présente dans les gastrules alors que seul A $_1$ semble présente dans la gelée nutritive (P1. IX, fig. B).

III - DISCUSSION

Des résultats exposés il ressort que la teneur en protéines exprimée en pourcentage par rapport au poids sec diminue progressivement au cours de la maturation du clitel·lum. A l'opposé, la courbe représentative des protéines solubles dans le clitel·lum aux trois stades de maturation sexuelle révèle une augmentation de celles-ci au cours de la maturation.

CANER (1981) travaillant sur l'ovocyte de P. cultrifera trouve que la teneur des protéines exprimées en pourcentage par rapport au poids sec est de 36,4 pour une taille ovocytaire de $100-120~\mu m$, 36,6 pour $180-200~\mu m$ et 45 % à la maturité (diamètre ovocytaire 250 μm). En exprimant ces résultats en nanogrammes par ovocyte, il trouve que l'évolution des protéines est plus significative : 287 nanogrammes pour un diamètre ovocytaire de $100-120~\mu m$, 1743 nanogrammes à la submaturité ($180-200~\mu m$ et 5625 nanogrammes à la maturité ($250~\mu m$).

Suite à cet exemple, on pourrait donc penser que la baisse en pourcentage des protéines totales à l'approche de la maturité génitale chez E. foetida n'est qu'une moindre croissance par rapport à celle des autres constituants (glucides, lipides). Ces résultats sont corroborés par les observations cytologiques puisque la coloration spécifique des protéines déjà visible dans le clitellum immature s'accentue au fur et à mesure de la maturation génitale d'E. foetida.

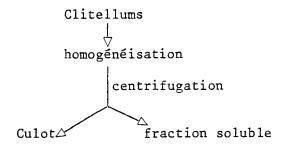
En ce qui concerne les cocons de l à 20 jours d'incubation, nous remarquons une évolution progressive de leurs teneurs en protéines totales qui de 58 % le ler jour de l'incubation atteint 74 % le 20ème jour.

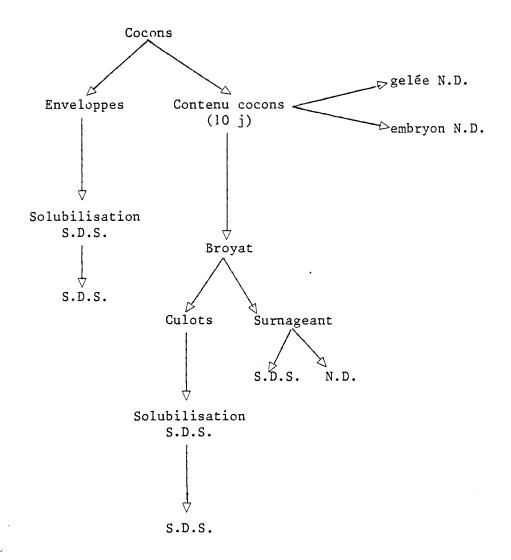
Cette augmentation peut refléter effectivement une augmentation des protéines dans le cocon synthétisées par les embryons mais pourrait être due en partie à la diminution des autres produits (glucides notamment).

La courbe d'évolution des protéines solubles dans le cocon montre un léger enrichissement durant l'incubation.

Tous ces résultats montrent l'existence de variations importantes durant le cycle d'incubation.

Sachant que le clitellum et le cocon sont l'un et l'autre riches en protéines, nous avons essayé après cette étude quantitative des protéines totales et solubles d'entamer une analyse qualitative de ces protéines. L'étude comparative que nous avons entreprise avait pour but de mieux caractériser ces protéines. A cet égard l'électrophorèse nous a semblé correspondre aux besoins d'une telle étude puisqu'elle permet de séparer les protéines avec





N.D. : électrophorèse en milieu non dénaturant.

S.D.S. : électrophorèse en milieu dénaturant.

un bon pouvoir de résolution. La comparaison des profils électrophorétiques devrait conduire alors à la mise en évidence des différences de composition. Notons que notre étude comparative ne tient compte que des critères bien tranchés à savoir si une bande polypeptidique est absente ou présente, ou si la variation du poids moléculaire est nette. En effet, de par le nombre de protéines séparées, il est difficile de comparer point par point les électrophorégrammes.

L'étude électrophorétique en milieu non-dénaturant des protéines solubles du clitellum au cours de la maturation montre l'apparition de 3 protéines de haut poids moléculaire à partir de la submaturité. Ces trois protéines représentent la majeure partie du matériel protéique à la maturité. Il s'agit des protéines A, B, C.

Toujours en milieu non-dénaturant nous avons analysé le contenu du cocon à différents stades d'incubation (schéma 2). La comparaison des électro-phorégrammes obtenus permet de mettre en évidence une analogie entre la fraction native A révélée dans le clitellum mûr et celle présente dans le cocon quel que soit son stade d'incubation.

De par la nature glycolipoprotéique et le poids moléculaire nous pouvons penser que c'est l'équivalent de la fraction A qui a été retrouvé dans le cocon. L'électrophorèse en milieu dénaturant et la bidimensionnelle nous ont permis de confirmer cette hypothèse. Les protéines natives B et C, absentes dans la fraction soluble du cocon, pourraient être dans l'enveloppe de celui-ci ou dans sa fraction insoluble. L'électrophorèse en milieu dénaturant ne nous a pas permis une telle conclusion.

Cette fraction majeure A présente dans le cocon serait-elle dans l'embryon ou alors dans la gelée nutritive ? L'électrophorèse en milieu non-dénaturant révèle que les deux protéines (A_1 et A_2) qui forment la fraction soluble du cocon sont présentes dans l'embryon, par contre seule A_1 serait présente dans la gelée. Cette détermination reste assez imprécise. Une étude approfondie paraît indispensalbe pour mieux expliquer ce résultat.

Les broyats de clitellums d'E. foetida ou de cocons est un mélange biologique complexe où la détection des protéines reste malgré tout difficile. Il est cependant possible que A₁, dont la nature est glycolipoprotéique, d'un poids moléculaire élevé, soit éventuellement assimilée à une vitelline. En effet, chez les Invertébrés, aussi bien chez les Insectes que chez les Annélides néréidiens les vitellines sont définies comme des lipoglycoprotéines, de poids moléculaires élevés et qui représentent une part importante des protéines de l'oeuf.

Ces critères étant réunis pour A_1 , on pourrait l'assimiler à une vitelline. Il est cependant curieux de la voir subsister jusqu'à l'éclosion. Elle pourrait servir au développement post-embryonnaire.

IV - CONCLUSION

- . Les protéines sont plus abondantes dans le clitellum à la maturité génitale. Il y a donc synthèse au cours de la maturation.
- . A tous les stades d'incubation, les cocons ont une teneur élevée en protéines. Cette teneur augmente au fur et à mesure du développement des embryons.
- . L'analyse électrophorétique en milieu non-dénaturant révèle la présence de protéines majeures au stade mûr du clitellum (A, B et C) :
 - la fraction majeure constituée des protéines A₁ et A₂ est de nature glycolipoprotéique,
 - la protéine B est une glycoprotéine,
 - la protéine C est aussi une glycoprotéine.
- . A l'opposé de la fraction majeure A, présente dans la fraction soluble du cocon, les protéines B et C n'ont pas été retrouvées dans le cocon quel que soit le stade d'incubation.
- . En milieu dénaturant nous avons mis en évidence plusieurs polypeptides majeurs marquant la maturation du clitellum.
- . Dans le même milieu dénaturant, 2 polypeptides majeurs ont été mis en évidence dans le cocon à tous les stades d'incubation.
- . Les protéines B et C sont absentes dans les enveloppes et les culots de cocons.
- . La fraction majeure A décelée dans la fraction soluble du clitellum mûr est transférée dans le cocon où elle est détectée à différents stades d'incubation.
- . La fraction majeure A, de nature glycolipoprotéique, pourrait être assimilée à une vitelline.
- . La fraction majeure A (A $_1$ + A $_2$) est présente dans l'embryon, par contre seule A $_1$ serait présente dans la gelée.

CHAPITRE III

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES SUCRES

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES SUCRES

INTRODUCTION

Afin de bien analyser qualitativement et quantitativement les oses au cours de la maturation sexuelle du clitellum, ainsi que durant l'incubation du cocon, nous avons entamé leur étude biochimique.

I - LES ANALYSES COLORIMETRIQUES

A - Principe

Il s'agit de développer une coloration sous l'influence de réactifs chimiques et d'en mesurer l'intensité en lisant la densité optique (D.O.) au spectrophotomètre moléculaire. La loi de Beer-Lambert permet alors de connaître la concentration recherchée en fonction de la D.O.

B - Dosage

Les résidus secs sur lesquels nous pratiquons nos dosages sont des milieux complexes renfermant des glucides, des protéines et des lipides. Pour toutes les analyses colorimétriques nous avons utilisé des courbes d'étalonnage. Afin que ces courbes soient significatives, il est nécessaire de traiter les différentes dilutions exactement comme les échantillons à doser. D'autre part il est indispensable de vérifier quelques points de la courbe d'étalonnage pour chaque série de dosages.

Méthode à l'orcinol (dosage des oses neutres)

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

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

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

Bien que le maximum d'absorption se situe à 420 nm, la lecture se fait à 510 nm pour éviter l'interférence avec des protéines.

II - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

A - Principe

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

Les substances à chromatographier sont dissoutes dans un solvant n'ayant aucune affinité pour la phase stationnaire et la solution est introduite dans la colonne par la chambre d'injection (ou chambre de vaporisation) qui a été préchauffée à une température élevée. Les substances et leur solvant sont volatilisés et le flux de gaz vecteur les entraîne dans la colonne. Chacun des constituants est plus ou moins retardé dans sa migration selon son affinité pour la phase stationnaire : les produits sortent de la colonne successivement dans l'ordre d'affinité croissante (ceux qui n'ont aucune affinité pour la phase stationnaire sortent les premiers).

A la sortie de la colonne, les vapeurs passent dans un détecteur relié à un enregistreur qui fournit un tracé sur papier (Pl. X), c'est une technique très sensible.

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

B - Protocole expérimental

- . On commence par introduire un témoin interne. Il s'agit du mésoinositol. Comme le mésoinositol n'existe pas dans nos solutions, il n'interfère donc pas avec les glucides présents et ne contamine pas les pics des sucres étudiés. Le mésoinositol est un hexa-alcool cyclohexanique de formule brute $C_6H_{12}O_6$.
 - . L'ensemble (témoin interne + fraction à étudier) est lyophilisé.
- . On passe à la méthanolyse par addition du mélange méthanol/acide chlorhydrique, 0,5 N à 80°C pendant 24 heures. La quantité de méthanol/acide chlorhydrique à ajouter est proportionnelle à la teneur en oses, normalement l ml par mg.
 - . Elimination des protéines par centrifugation.
 - . Délipidation 2 fois à l'heptane.

- . trifluoracétylation par addition de 100 μ l de dichlorométhane (CH₂Cl₂) et 100 μ l d'anhydride trifluoracétique (CF₃COO)₂O. Le tube bien fermé est chauffé 2 fois pendant 5 minutes à 150°C dans un bain de sable.
 - . Injection.

C - Caractéristiques des appareils utilisés

- . Chromatographie des sucres :chromatographie sur colonne de verre (0,3 x 300 cm) phase OV 210 à 5 M.
 - . Gaz vecteur : azote à 15 ml/mn.
- . Température du four programmée de 100°C à 200°C à raison de 2°C/mn.
 - . Température de l'injecteur et du détecteur : 220°C.

III - RESULTATS

Toutes les données numériques qui suivent sont des pourcentages exprimés soit par rapport au poids sec aux différents stades du développement du clitellum et du cocon, soit par rapport aux sucres totaux.

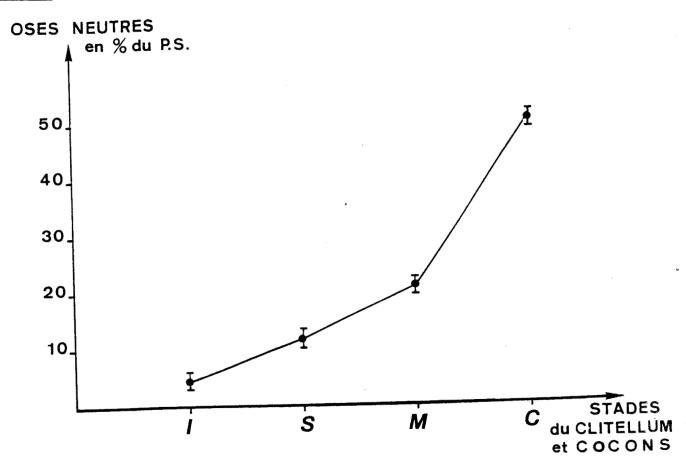
La méthode de dosage colorimétrique des glucides totaux a permis de déterminer le taux des oses du clitellum et du cocon et de démontrer que la teneur en glycoprotéines du clitellum se modifie au cours de la maturation génitale : cette teneur qui n'est que de 4,50 % dans le clitellum immature croît pour atteindre 11,84 % dans le clitellum submature puis 21 % dans le clitellum mûr (Tableau VI et figure 5).

Tableau VI - Teneurs en oses totaux exprimées en pourcentage par rapport au poids sec.

Clitellum immature	Clitellum submature	Clitellum mûr	Ensemble de cocons à différents sta- des d'incubation
4,50 ± 1,83	11,84 ± 1,73	21,00 ± 1,78	50,00 ± 1,69

Pour ce qui concerne les cocons, cette méthode appliquée à un ensemble de 50 cocons, à différents stades d'incubation, révèle une quantité extrêmement importante de sucres : 50 % (Tableau VI, 4ème colonne).

Figure 5

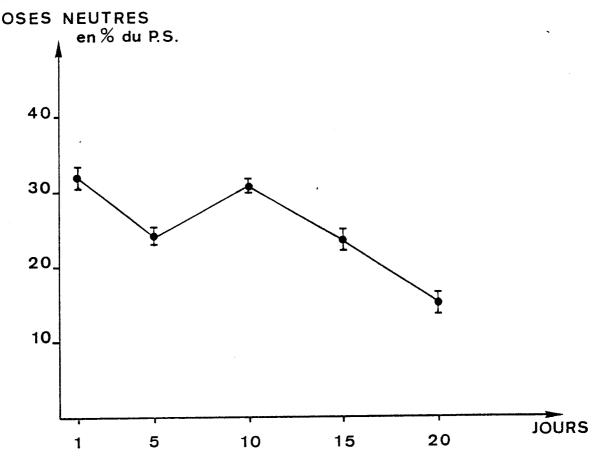


Le dosage des sucres totaux dans les cocons à différents stades d'incubation montre un appauvrissement à l'approche de l'éclosion (Tableau VII et figure 6).

Tableau VII - Les oses dans les cocons de l à 20 jours d'incubation (dosage à l'orcinol).

Cocon l j	Cocon 5 j	Cocon 10 j	Cocon 15 j	Cocon 20 j
32,0 ± 1,58	24,7 ± 1,61	31,8 ± 1,29	23,5 ± 1,42	15,4 ± 1,38

Figure 6



Le taux des glucides augmentant fortement pendant la maturation du clitellum, il nous a semblé intéressant d'envisager leur variation qualitative et quantitative aux différents stades de maturité génitale. Parallèlement nous avons étudié la composition glucidique du cocon durant son incubation (du ler jusqu'au 20ème jour). En effet les résultats du dosage colorimétrique prennent une signification toute particulière lorsqu'on constate que les glucides représentent une grande partie du poids sec de nos échantillons.

Pour cette étude la chromatographie en phase gazeuse représente un procédé rapide et sensible. Elle permet en effet de doser en une seule opération chromatographique les oses suivants : galactose, glucose, mannose, fucose, xylose, les hexosamines, les acides glucuronique et sialique.

Les résultats obtenus par cette méthode sont consignés dans les tableaux VIII et IX pour les clitellums et X et XI pour les cocons.

Figure 7

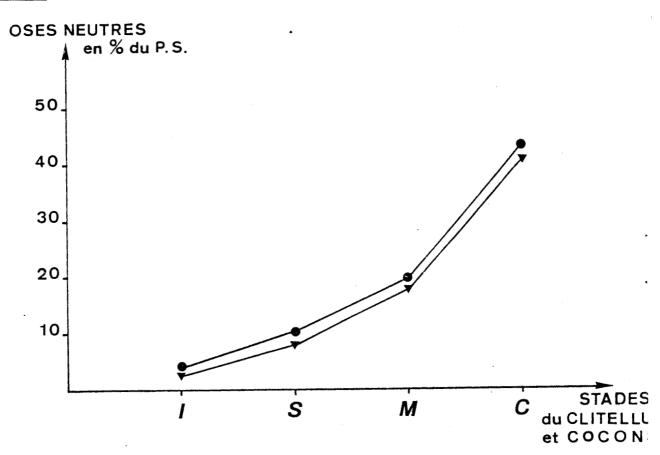


Tableau VIII - Teneur en glucides exprimée en pourcentage :

par rapport par rapport aux
au poids sec sucres totaux

	Fuc	Gal	Man	Glc	Xy1	Gal Nac	Glc Nac
Clitellum immature	4,6 0,18	23,1	0,5	30,5	3,6	10,3	9,8
Clitellum submature	6,4	25,7	16,8	25,3 2,66	5,7	9,9	9,8
Clitellum mûr	7,2	19,5	34,9	7,2	7,5	15,2 2,95	8,6
Mélange de cocons	9,2	20,5	28,0	5,8	11,1	13,2	12,0

Tableau $\mathbb X$ - Teneur en oses exprimée en pourcentage par rapport au poids sec (chromatographie phase gazeuse).

	Teneur totale en oses avec Glc	Teneur totale en oses sans Glc
Clitellum immature	3,90	2,91
Clitellum submature	10,50	7,80
Clitellum mûr	19,50	18,00
Mélange de cocons	43,20	40,70

Figure 8

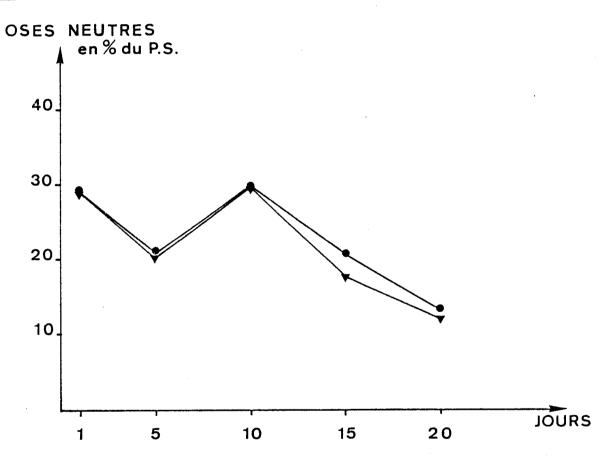


Tableau X - Teneur en oses des cocons à différents stades d'incubation exprimée en pourcentage

par rapport aux sucres totaux rapport au poids sec

(chromatographie en phase gazeuse)

	Fuc	Ga1	Man	G1c	Xy1	Gal Nac	Glc Nac
Cocon 1 j	18,7 5,52	22,2	30,1	négligeable	1,30	15,3	9,2
Cocon 5 j	15,7 3,32	24,5 5,18	33,3 7,04	1,9	3,6	12,5	8,4
Cocon 10 j	17,3 5,21	23,3	30,8 9,30	régligeable	3,8	14,6	3,00
Cocon 15 j	13,7	20,8	28,6 6,05	13,7	3,1	11,02	8,7
Cocon 20 j	12,5	23 3,20	30,1 4,20	12,5	3,8 0,53	10,2	7,7

Tableau XI - Teneur en oses exprimée en pourcentage par rapport au poids sec (chromatographie phase gazeuse)

Cocons à différents stades d'incubation	Teneur en oses avec Glc	Teneur en oses sans Glc
Cocon l jour	29,53	29,53
Cocon 5 jours	21,13	20,73
Cocon 10 jours	30,10	30,10
Cocon 15 jours	21,14	18,19
Cocon 20 jours	13,93	12,19

Nous remarquons un enrichissement du clitellum en galactose et en mannose. En effet le galactose représente 0,9 % du poids sec du clitellum immature, 2,7 % du submature et 3,8 % du clitellum mûr. Le mannose passe de 0,5 % du poids sec du clitellum immature à 6,80 % à la maturité sexuelle. Le fucose et le xylose sont à des concentrations relativement faibles (Tableau VIII) : le fucose ne représente que 1,41 % du poids sec à la maturité du clitellum; le xylose atteint 1,47 % au même stade. La teneur en hexosamines (galactosamine et glucosamine) est de 0,78 % du poids sec du clitellum immature puis arrive à 4,63 % à la maturité. L'expression de la teneur de chacun des sucres en pourcentage par rapport aux sucres totaux permet de mettre en évidence la prédominance nette du glucose à l'immaturité du clitellum (30,5 % des sucres totaux), ainsi que du galactose (23,1 % des sucres totaux) (Tableau VIII). Le mannose par contre est prédominant au stade mûr du clitellum (34,9 % des sucres totaux). Le galactose étant bien représenté à l'immaturité, l'est aussi à la maturité (19,5 % des sucres totaux).

Nous avons analysé un ensemble de cocons dans le but de vérifier si les mêmes sucres déjà présents dans le clitellum mûr se retrouvaient dans le cocon ou si, au contraire des modifications qualitatives apparaissent dans le cocon. Dans ces conditions nous constatons que les cocons contiennent plus de sucres que le clitellum aux différents stades de maturité génitale (le double). Les sucres représentent la majeure partie du résidu sec des cocons : 43,2 %. Ce résultat nous a incitée à entreprendre une analyse de l'évolution quantitative et qualitative des glucides dans le cocon dès la ponte (l j) jusqu'à l'approche de l'éclosion (après 20 jours d'incubation).

Il est surprenant de remarquer que le glucose, presqu'inexistant dans le cocon à la ponte, devient relativement abondant après 10 et 20 jours d'incubation, c'est-à-dire à l'approche de l'éclosion (Tableau X). Durant toute l'incubation, on obsérve une prédominance nette du mannose dans le cocon (9,3 % du poids sec le 10e jour). Un autre sucre est bien représenté à tous les stades d'incubation : le galactose (7,03 % du poids sec le 10e jour). Contrairement à ce que l'on remarque dans le clitellum, le fucose est à une concentration relativement importante dans le cocon (5,52 % du poids sec l jour après la ponte) (Tableau X). La teneur en xylose est (relativement) faible durant l'incubation du cocon (0,53 % du poids sec après 20 jours d'incubation). Les hexosamines sont nettement mieux représentées dans le cocon que dans le clitellum (7,24 % du poids sec le premier jour d'incubation).

La teneur de chaque sucre exprimée en pourcentage par rapport aux sucres totaux montre la prédominance du mannose et du galactose durant toute

l'incubation (30,1 % de mannose à 1 jour, 33,3 % des sucres totaux le 5e jour d'incubation). Le galactose représente 24,5 % des sucres totaux le 5e jour d'incubation.

On peut donc déduire que la concentration des monosaccharides neutres devient de plus en plus importante au fur et à mesure qu'on s'approche de la maturité sexuelle (3,9 % du poids sec du clitellum immature, 10,5 % à la submaturité et 19,5 % à la maturité) (Fig. 7). Aussi le clitellum mûr renferme une quantité appréciable de sucres.

Au contraire, dans le cocon, l'approche de l'éclosion s'accompagne d'une baisse de la teneur glucidique (30,1 % du poids sec le 10e jour d'incubation contre 13,93 % après 20 jours d'incubation). Toutefois la figure 8 indique un enrichissement en oses entre 5 et 10 jours d'incubation, enrichissement qui ne paraît pas explicable. Qualitativement, quels que soient le stade de maturation génitale du clitellum et la durée d'incubation du cocon d'E. foetida, on remarque la présence générale des mêmes monosaccharides neutres à savoir : fucose, mannose, galactose, glucose et xylose.

Nous avons aussi deux hexosamines : glucosamine et galactosamine. Enfin, nous n'avons jamais décelé les acides glucuronique et sialique dans Eisenia foetida.

IV - DISCUSSION

Du point de vue quantitatif, le calcul des oses par la chromatographie en phase gaz donne des résultats légèrement inférieurs à ceux trouvés par le dosage effectué par la méthode colorimétrique : 4,50 % de sucre dans le clitellum immature par la méthode colorimétrique pour 3,9 % par la chromatographie en phase gaz (Tableaux VI et IX). Cette différence pourrait être due au fait que l'hydrolyse pour l'analyse en phase gaz n'est pas aussi poussée que celle mise en oeuvre pour l'étude colorimétrique. Toutes les liaisons ne seraient donc pas coupées.

Des résultats de la chromatographie en phase gaz consignés dans le tableau IX, il ressort que la teneur en glucose est relativement importante dans le clitellum immature (30,5 % des sucres totaux) et submature (25,3 % des sucres totaux). Il s'agit,

- soit de glucose libre et de glycogène;
- soit de glucose conjugué

La cytologie a déjà révélé l'existence du glycogène dans le clitellum ; par hydrolyse, ce glycogène libère une grande quantité de glucose qu'il est alors impossible de distinguer du glucose libre. Le rhamnose a été trouvé dans les ovocytes de P. cultrifera (PORCHET, 1974); ce sucre est complètement absent chez E. foetida. Par ailleurs, les autres sucres, déjà détectés dans P. cultrifera par PORCHET (1974) ont été retrouvés dans le clitellum et le cocon d'E. foetida. Il s'agit du fucose, mannose, galactose, glucose et xylose. Les deux hexosamines (galactosamine et glucosamine) détectées chez E. foetida se retrouvent aussi dans les ovocytes de P. cultrifera aux différents stades de l'ovogenèse. Cependant l'acide glucuronique présent dans P. cultrifera est totalement absent dans notre échantillon; l'acide sialique n'a jamais été détecté dans Eisenia foetida ni dans les ovocytes de P. cultrifera.

Chez d'autres Invertébrés, l'analyse biochimique des glycoprotéines a été surtout entreprise au niveau des ovules et des oeufs d'Echinodermes (VASSEUR, 1948; TYLER, 1949; MONROY, 1954) et des substances précurseurs du vitellus des ovocytes d'Insectes (TOBE et LOUGHTON, 1967; YAMASAKI, 1974, etc...). Aucune recherche n'a porté sur les gamètes mâles.

Signalons que l'ensemble de l'ovocyte de P. cultrifera ne contient jamais plus de 23 % de sucres alors que dans le cocon d'E. foetida à 10 jours d'incubation, le taux de sucres atteint 30,1 %; il est cependant plus faible à 20 jours (13,93 % du poids sec).

Nous avons signalé la baisse de la teneur glucidique dans le cocon à l'approche de l'éclosion, cette chute pourrait être reliée au développement embryonnaire. En effet les oses représentent la source de réserves énergétiques dans lesquelles l'embryon puise au fur et à mesure de ses besoins.

PORCHET (1969) a montré chez P. cultrisera que le vitellus riche en glucides à la maturité devient pauvre en glucides à partir de la fécondation.

A 120 μm de diamètre l'ovocyte de P. cultrifera freine la production de pentoses et de l'acide glucuronique alors qu'il active celle des hexosamines (PORCHET, 1974).

Dans les cocons d'Eisenia foetida quelle que soit la manière d'exprimer nos résultats, nous n'avons pas rencontré d'inhibition ni d'activation sélective. Nous assistons à une baisse générale des teneurs aussi bien des monosaccharides que des hexosamines.

En ce qui concerne le clitellum, le calcul du pourcentage de chacun des sucres par rapport aux sucres totaux permet de mettre en évidence un sucre caractéristique de l'immaturité du ver, il s'agit du glucose, et un sucre caractéristique de la maturité : le mannose

V - CONCLUSION

- Dans le clitellum, il y a une nette augmentation de la teneur totale en oses (certains sucres sont multipliés par plus de 10). Donc les synthèses sont abondantes au cours de la maturation sexuelle.
- Les cocons renferment une quantité énorme de sucres : 43 % en chromatographie phase gazeuse et 50 % à l'orcinol.
- Tous les sucres décelés dans le clitellum se retrouvent dans le cocon : fucose, galactose, glucose, mannose, xylose et deux hexosamines : Galactosamine et Glucosamine.
- Nous remarquons l'absence des acides glucuronique et sialique dans le clitellum et dans le cocon.
- Il y a une diminution globale des oses (2 fois moins) au cours de la maturation des embryons. Les différents sucres diminuent dans la même proportion. Il y a donc utilisation de ces sucres pour le développement des embryons.
- Le calcul du pourcentage de chaque sucre par rapport aux sucres totaux permet la mise en évidence d'un sucre caractéristique de l'immaturité sexuelle d'Eisenia foetida: il s'agit du glucose. Un autre sucre caractérise la maturité génitale c'est le mannose.

CHAPITRE IV

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES LIPIDES

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES LIPIDES

INTRODUCTION

LAUGHLIN (1971) a montré chez E. foetida que les lipides neutres représentent 80 à 85 % de l'extrait lipidique. A l'opposé de cette étude menée sur l'animal entier, nous nous sommes limitée au clitellum dans le but d'étudier les variations des lipides au cours de la maturation sexuelle du ver.

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressée au cocon qui est élaboré par le clitellum mûr pour vérifier si la gelée qui le remplit ne contient que des acides gras déjà présents dans le clitellum ou si au contraire, le cocon est capable d'élaborer des acides gras afin d'avoir une composition lipidique adaptée aux besoins des embryons.

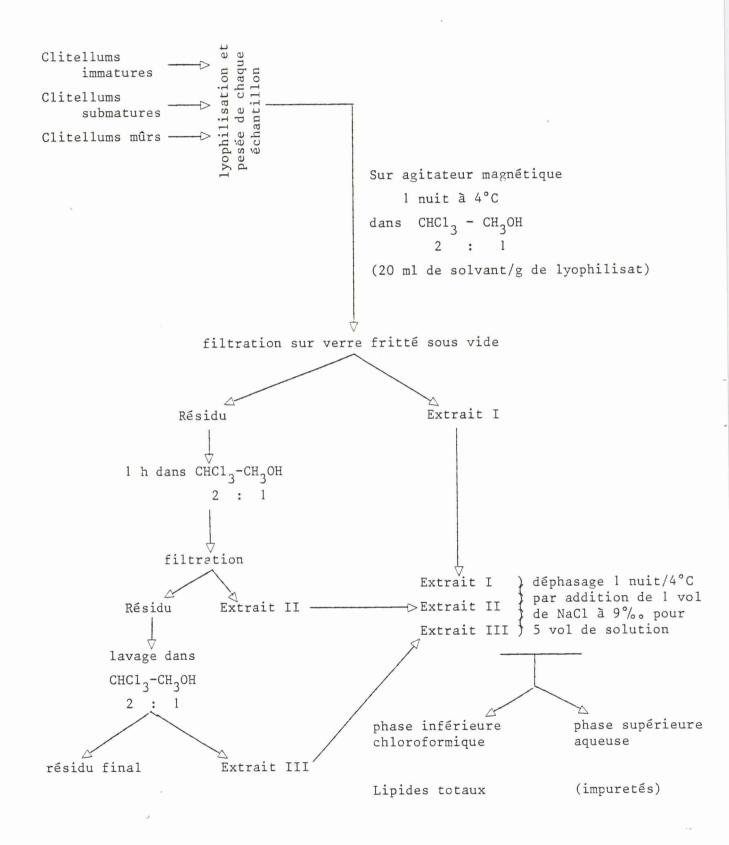
I - EXTRACTION ET PURIFICATION DES LIPIDES TOTAUX

A - Extraction

Pour être valable, une méthode d'extraction doit conduire à une délipidation aussi complète que possible, et à l'obtention d'un extrait pur, tout en respectant l'intégrité des lipides. Comme ceux-ci sont en général intégrés dans des complexes lipoprotéiques les agents physiques restent inopérants et il est nécessaire d'utiliser des procédés chimiques. Nous avons donc utilisé le solvant de FOLCH (1951, modifié en 1957), un mélange de chloroforme et de méthanol dans les proportions 2:1 (V/V). Ce solvant permet d'obtenir, par un partage de phase, un extrait lipidique libéré de la majorité des contaminants non lipidiques. Dans ce solvant, le méthanol dénature les protéines tandis que le chloroforme favorise la solubilisation des substances lipidiques.

- l Les résidus secs sont placés sous agitation magnétique dans le solvant de FOLCH (20 ml de solvant par g de lyophilisat) durant une nuit. L'extraction est réalisée à + 4°C, afin d'éviter l'évaporation du solvant et empêcher l'action des enzymes lipolytiques qui peuvent résister au traitement par le méthanol.
- 2 La filtration sur verre fritté et sous vide permet d'obtenir l'extrait I (Schéma 3).

Protocole d'extraction des lipides totaux



- 3 Le résidu est repris par le mélange méthanol/chloroforme et filtré une deuxième fois sur verre fritté : c'est l'extrait II.
- 4 On lave une dernière fois le résidu par le solvant de FOLCH, ce qui donne après filtration l'extrait III.

Une fois l'extraction terminée les trois extraits sont réunis (schéma 3) et la purification peut débuter.

B - Purification

Le but de cette purification est l'élimination de substances non lipidiques qui sont solubilisées dans le solvant de FOLCH. Pour cela, dans une ampoule à décanter, l'extrait lipidique total (I + II + III) est additionné d'une solution aqueuse de NaCl 9 %. à raison de l volume de solution de NaCl pour 5 volumes d'extrait lipidique. Après agitation le déphasage s'opère pendant une nuit à + 4°C. Les substances hydrosolubles passent alors dans la phase hydroalcoolique supérieure tandis que les lipides totaux purifiés se trouvent dans la phase chloroformique inférieure.

II - SEPARATION DES LIPIDES NEUTRES ET DES PHOSPHOLIPIDES

Cette opération permet d'obtenir d'une part les lipides neutres, d'autre part les phospholipides. Grâce à l'insolubilité des phospholipides dans l'acétone, ces deux classes sont séparées par une centrifugation énergique de l'extrait lipidique. Les lipides neutres demeurent dans le surnageant alors que les phospholipides sont récupérés dans le culot.

III - ETUDE DES ACIDES GRAS DES LIPIDES NEUTRES

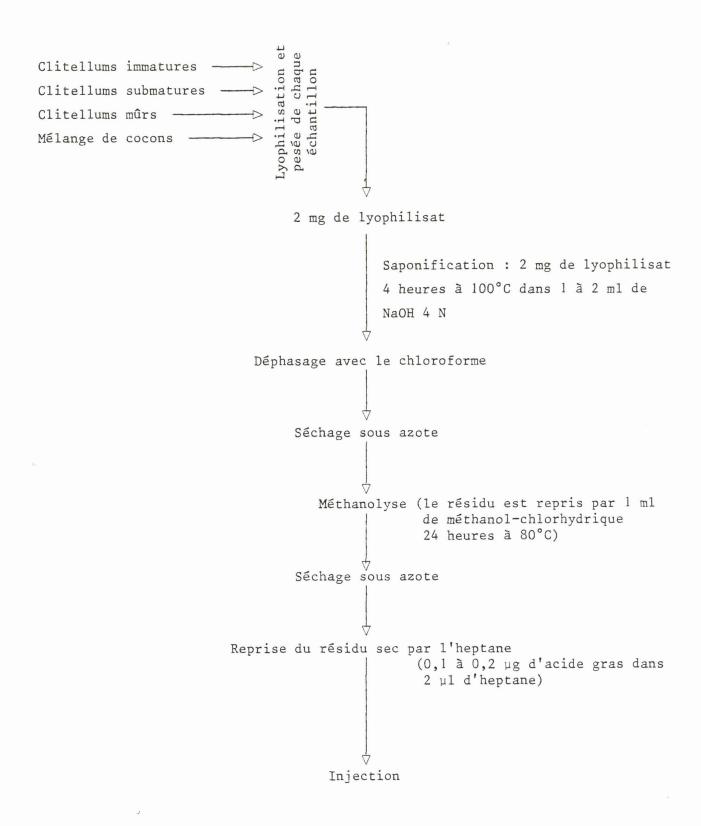
Afin de réaliser les analyses quantitatives et qualitatives des acides gras des échantillons, nous avons utilisé la chromatographie gaz-liquide (GLC).

A - Préparation des acides gras

1 - Saponification

Elle permet de séparer les acides gras du glycérol. Les surnageants acétoniques contenant les lipides neutres sont séchés sous courant d'azote puis lyophilisés. Le lyophilisat est repris par la soude 4 N. La quantité de soude à ajouter est proportionnelle à la teneur en lipides neutres. La saponification se déroule à 100°C pendant 4 heures. Les acides gras sont ensuite récupérés par un déphasage avec le chloroforme.

Protocole du dosage des acides gras en chromatographie



2 - Méthanolyse des acides gras libres

Les acides gras libres obtenus après saponification sont séchés sous azote afin d'éliminer le chloroforme avant d'être lyophilisés. Le résidu sec est repris par le méthanol-chlorhydrique. La méthanolyse se déroule à 80°C pendant 24 heures. Après séchage sous azote, les acides gras sont repris par l'heptane. La quantité d'heptane à ajouter est proportionnelle à la teneur en acides gras (0,1 à 0,2 µg d'acide gras dans 2 µ1 d'heptane).

B - Passage en chromatographie gaz-liquide

Le principe a été exposé dans le chapitre II.

Caractéristiques des appareils utilisés
GIRDEL série 300 colonne capillaire OV
101-85 m de long, diamètre intérieur 0,35 mm
Pression d'entrée 0,4 bar. Gaz vecteur : azote
Injecteur type ROS. Programmation de la température jusqu'à
240°C - 20 minutes
Température de l'injecteur et du détecteur : 240°C.

C - Etude qualitative des acides gras des lipides neutres

On sait que les acides gras peuvent être identifiés par la comparaison des temps de rétention et la spectrographie de masse. Nous avons été amenée à utiliser ces deux méthodes.

l - Comparaison des temps de rétention

Pour les mêmes conditions d'expérience, les temps de rétentions sont caractéristiques d'un produit, ce qui permet d'identifier les produits inconnus par comparaison avec des substances connues. Cette identification se fait par superposition d'un chromatogramme obtenu par passage d'un mélange d'acides gras témoins et du chromatogramme obtenu après passage de l'échantillon.

2 - Spectrographie de masse

Afin de définir certains acides gras non identifiés en G.

L.C. ou de confirmer ceux déjà identifiés, nous avons fait appel à la spectrophotométrie de masse où un spectre de masse obtenu à partir de moins d'un milligramme d'échantillon donne des renseignements analytiques et structuraux. On convertit donc l'acide inconnu en un certain nombre de produits identifiables, caractéristiques de la molécule initiale (Pl. XI, fig. B).

3 - Caractéristiques de l'appareil

Ensemble de couplage GLC (spectrométrie de masse quadripolaire RIBER MAG R 10-10 associé au système informatique SYDAR 121).

Chromatographie GIRDEL, série 30, équipée d'une colonne capillaire (1,25 m x 0,25 mm) garnie de SEX 30,

Injecteur à aiguille de type ROS

Température du four : 220°C

Température de l'injecteur : 280°C

Gaz vecteur : Hélium

Gamme de masse balayée 70-250 en 400 ms.

D - Etude quantitative

C'est à partir des chromatogrammes que les acides gras sont quantifiés.

Pour connaître la concentration réelle des différents acides gras présents dans le mélange, on introduit dans l'échantillon une quantité d'acide n-heptadécanoïque (C 19) proportionnelle à la teneur en lipides que l'on sait ne pas figurer dans le mélange initial. Il sert d'acide gras de référence.

- si X représente la quantité inconnue d'un acide gras dans le mélange,
- et si S représente la surface du pic correspondant,
 - si A représente la quantité connue de l'acide gras de référence,
- et si S' représente la surface du pic correspondant,

on aura alors

X = A.S/S'

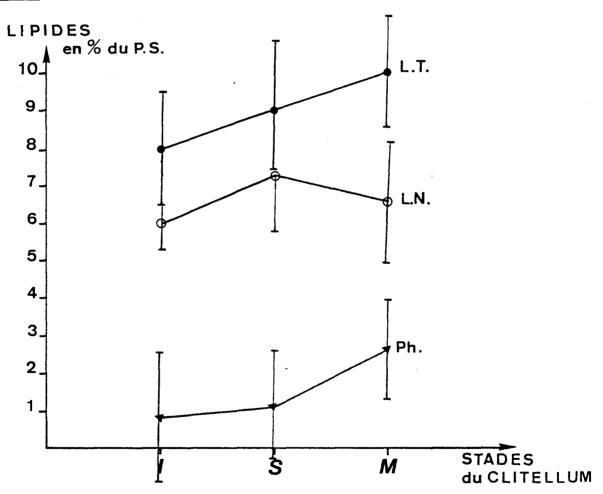
IV - RESULTATS

Les clitellums aux différents stades et la gelée qui remplit les cocons sont parfaitement broyés dans l'eau bidistillée. Nous opérons sur le lyophilisat, les résultats sont donc exprimés en pourcentage du poids sec.

Tableau XII - Teneur du clitellum en lipides neutres et phospholipides exprimée en pourcentage du poids sec.

Stades d'incubation sexuelle	Teneur en lipides totaux	Teneur en lipides neutres	Teneur en phospholipides
Clitellum immature	8 ± 1,51	6 ± 0,69	0,8 ± 1,69
Clitellum submature	9 ± 1,78	7,3 ± 1,42	1,1 ± 1,53
Clitellum mûr	10 ± 1,82	6,6 ± 1,64	2,7 ± 1,34

Figure 9



Le nombre de cocons pondus dans les élevages a été trop faible pour pouvoir faire l'objet d'une analyse biochimique systématique (extraction des lipides totaux, séparation des lipides neutres et phospholipides) il aurait fallu avoir environ 300 cocons pour pouvoir pratiquer une extraction des lipides). Nous avons donc dû nous limiter à l'étude de leurs acides gras qui nécessite moins de matériel.

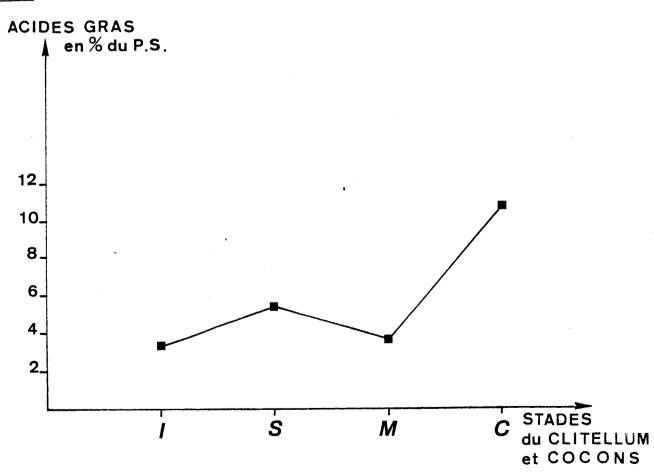
Tableau XIII - Etude de la composition en acides gras du clitellum à différents stades de maturation sexuelle, et du cocon exprimée en pourcentage de matière séche.

	C ₁₄	c_{14}^0 c_{16}^1 c_{16}^0 c_{17}^0	c ₁₆	c ₁₇	c ₁₈	c_{18}^2	C18	$c_{18}^3 c_{18}^2 c_{18}^1 c_{18}^{1 \text{vacc}} c_{18}^0 c_{20}^3 c_{20}^2 c_{20}^1 c_{20}^0 c_{22}^2 c_{23}^0 c_{24}^0$	c ₁₈	c_{20}^3	c_{20}^2	c_{20}^1	c_{20}^0	c_{22}^2	c_{23}^0	c ₂₄
Clitellums immatures	0,11	0,11 0,23 0,76 0,35	0,76	0,35		0,22	0,40	0,22 0,40 0,18 0,69	69,0			0,29 0,64	0,04		0,03 0,07	0,07
Clitellums submatures	0,14	0,14 0,25 1,03 0,27	1,03	0,27	0,08	0,43	0,71	0,08 0,43 0,71 0,66	1,01			0,59 0,07	0,07		0,05 0,11	0,11
Clitellums mûrs	0,10	0,10 0,14 0,81 0,29	0,81	0,29		0,23	0,23 0,28	0,30	0,62 0,05	0,05		0,32	0,04	90*0	0,32 0,04 0,06 0,03 0,12	0,12
Cocons	0,43	0,43 1,16 1,16 0,94	1,16	0,94		0,81	1,16	0,81 1,16 1,16	1,16	1,16 0,28 0,11 0,50 0,23	0,11	0,50	0,23		0,08 0,73	0,73

Tableau XIV - Teneur en acides gras des clitellums et des cocons, exprimée en pourcentage de matière séche.

Stades d'incubation sexuelle	Teneur en acides gras
Clitellums immatures	3,48
Clitellums submatures	5,40
Clitellums mûrs	3,59
Mélange de cocons	10,63

Figure 10



Les acides gras sont classés par ordre d'apparition sur le chromatogramme (Pl. XI, fig. A). Les acides gras que l'on retrouve le plus fréquemment dans nos échantillons sont consignés dans le tableau XVI où la première colonne indique à quelle série appartiennent les acides gras. La deuxième indique la position de la double liaison, la troisième donne le nom en nomenclature classique et la quatrième donne le nom commun de l'acide gras.

Tableau XVI - Principaux acides gras retrouvés dans le clitellum et dans le cocon.

Série d'acide gras	Position de la double liaison	Nomenclature classique	Nom commun
14:0	14:0	Ac tétradécanoïque	Ac myristique
16:1 (n-7)	16:1Δ ⁹	Ac hexadécanoïque	Ac palmitoléique
16:0	16:0	Ac hexadécanoïque	Ac palmitique
17:0	17:0	Ac heptadécanoïque	Ac margarique
18:2	18:2	Ac cis-6-cis-9-octadécadiénoïque	Ac linoléique
18:1 (n-9)	18:1∆ ⁹	Ac 9-octadécénoïque	Ac oléique
18:1 (n-9)	18:1∆ ¹¹	Ac ll-octadécénoïque	Ac vaccénique
18:0	18:0	Ac octadécanoïque	Ac stéarique
20:1 (n-9)	20:1Δ ¹¹	Ac ll-eicosénoïque	
10:0	20:0	Ac n-eicosénoïque	Ac arachidique
23:0	23:0	Ac tricosanoïque	
24:0	24:0	Ac tétracosanoïque	Ac lignocénique

Dans les échantillons se retrouvent des acides gras saturés et insaturés. Ainsi les acides 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 23:0 et même 24:0 ont été trouvés dans le clitellum d'E. foetida ainsi que dans les cocons.

Les acides gras à chaîne courte sont volatils et ne peuvent être décelés par les techniques utilisées.

On peut grouper les acides gras en quatre séries :

à l'exception du 22:2 les trois autres acides gras ont été trouvés chez Eisenia foetida et dans les cocons.

Les acides 16:1 et 18:1 sont légèrement plus abondants dans les cocons et dans les clitellums submatures.

b) Série oléique (n-9)

Parmi la série oléique ce sont les 18:1, 18:2 et 20:3 que nous avons mis en évidence dans le clitellum d'E. foetida à différents stades de maturité sexuelle et dans les cocons.

Le 20:2 n'a été trouvé que dans les cocons.

Le 18:1, 18:2 et 20:1 ont des taux élevés dans les clitellums submatures et dans les cocons.

c) Série linoléique (n-6)

Il a été démontré chez de nombreux animaux que les acides gras de cette série ne peuvent être synthétisés qu'à partir de l'acide lino-léique. Cet acide gras est indispensable.

Le 18:2 est mieux représenté dans les clitellums submatures et dans les cocons. Quant au 18:3 il n'est présent que dans les clitellums submatures et en teneur négligeable.

Le 20:3 n'a été décelé que dans les clitellums mûrs et dans les cocons.

d) Série linolénique

N'ont été retrouvés chez E. foetida (clitellums ou cocons) que les acides gras 18:3 et 20:3.

Tableau XV -	Tableau	récapitulatif.
--------------	---------	----------------

Stades d'incubation sexuelle du clitellum et mélange de cocons	Lipides totaux	Lipides neutres	Phospholipides	Acides gras
Clitellums immatures	8	6	0,8	3,48
Clitellums submatures	9	7,3	1,1	5,40
Clitellums mûrs	10	6,6	2,7	3,59
Mélange de cocons			`	10,63

V - DISCUSSION

Nos résultats (figure 9) montrent que le taux des lipides par rapport au poids sec des clitellums d'E. foetida est relativement faible : 8 % du résidu sec des clitellums immatures. Cette teneur augmente chez les submatures pour atteindre 9 % puis 10 % pour les clitellums mûrs. Cette légère augmentation est sans doute en relation avec les grands phénomènes métaboliques qui se produisent chez l'animal au cours de la puberté et dont on a déjà vu l'incidence sur les protides et les glucides. Il est vraisemblable que l'animal a besoin d'énergie pour sa maturation sexuelle et cette augmentation de teneur en lipides est l'une de ses sources énergétiques avec les glucides.

Quantitativement il n'y a pas de grandes différences de teneur en lipides neutres au niveau des clitellums immatures, submatures et mûrs. En effet nous trouvons 6 % pour les clitellums immatures. Ce taux augmente et atteint 7,3 % pour les submatures puis chute jusqu'à 6,6 % pour les mûrs (fig. 9 et tableau XV).

Les phospholipides sont présents dans le clitellum mais en quantité négligeable (0,8 à 2,7 %). Par contre chez l'animal entier LAUGHLIN (1971) trouve que les phospholipides représentent ll % du poids de l'animal. Par ailleurs il souligne que les sphingolipides les plus simples sont peu abondants chez E. foetida et que dans les glycérophospholipides, la phosphatidylcholine prédomine. Il y a aussi des quantités plus faibles de phosphatidyléthanolamine et phosphatidyl-sérine.

Pour les acides gras nos résultats qualitatifs consignés dans le tableau XIII montrent que les acides gras appartenant à différentes voies métaboliques sont présents chez E. foetida ainsi que dans leurs cocons qui, rappelons-

le, est la sécrétion du clitellum mûr. Ce sont les mêmes acides gras qui ont été mis en évidence dans l'ovocyte de P. cultrisera par FONTAINE (1982) qui sont relativement abondants dans les cocons d'Eisenia soetida (Tableau XIII). Il s'agit des acides palmitique, stéarique, oléique et vaccénique. Le 20:2, complètement absent dans les clitellums de vers mais présent dans les cocons, existe également dans les ovocytes de P. cultrisera (FONTAINE, 1971)

Chez les Invertébrés ce sont les lipides neutres des Insectes qui sont les mieux étudiés. Ainsi, 13,9 % du poids de l'oeuf d'Aphide est de nature lipidique et 85 % de ces lipides sont des lipides neutres (STRONG, 1963 a et b, 1964). GILBERT (1967) nous apprend, quant à lui, que 90 à 92 % des lipides des oeufs de Leucophaea maderae sont des lipides neutres. Chez les Insectes les lipides neutres sont donc quantitativement importants notamment dans l'oeuf qui s'enrichit en lipides au cours de l'ovogenèse. Les principaux acides gras décelés sont les linoléiques (C 18:2) (double liaison au niveau des C9 et C12) et/ou linoléniques (C 18:3) (double liaison au niveau des carbones 9, 12 et 15).

KANAZAWA et Coll. (1979 a et b) ont étudié l'effet de l'acide linoléique et de l'acide linolénique sur la croissance de la crevette. Leurs résultats indiquent que ces deux acides gras sont efficaces pour la survie et la croissance de la crevette. Ils démontrent aussi que la composition en acide gras des lipides des crevettes est modifiée par la composition des lipides contenus dans les aliments.

Chez *P. cultrifera* ce sont les ovocytes qui contiennent la majeure partie des substances lipidiques du milieu intérieur. La teneur en lipides totaux est prédominante au stade de submaturité génitale (diamètre ovocytaire 180-200 µm) et de maturité génitale (220-240 µm).

Bien que les lipides neutres des animaux ne contiennent pratiquement que les acides gras ayant un nombre pair d'atomes de carbone, ceux d'E. foeti-da contiennent un acide gras à nombre impair d'atomes de carbone. Il s'agit du C 17:0 absent même chez P. cultrifera.

VI - CONCLUSION

- Les clitellums mûrs d'Eisenia foetida contiennent plus de lipides que les clitellums submatures et immatures. Il y a une augmentation régulière quoique légère de la teneur en lipides totaux à l'approche de la maturité génitale.

- La majeure partie des lipides totaux, au niveau du clitellum aux différents stades de maturité génitale, est représentée par les lipides neutres dont le taux ne varie pratiquement pas. Celui des phospholipides est par contre très faible mais il montre une augmentation importante (3 fois plus environ) à la maturité.
- Les acides gras ont de fortes concentrations à tous les stades de maturation. Notons que le clitellum submature en contient un maximum. Le cocon emmagasine une grande quantité d'acides gras (il y a donc lors de la sécrétion de l'albumen une concentration notable en acide gras).
- Les acides palmitique, stéarique, oléique et vaccénique sont détectés aux trois stades de maturation sexuelle du clitellum ainsi que dans le cocon. Leur teneur est toujours assez importante.
- Enfin, Eisenia foetida est l'un des rares animaux à posséder un acide gras à nombre impair de carbones : l'acide margarique.

CHAPITRE V

ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE

ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE

Nous avons tenté une approche de l'étude du métabolisme des protéines et des polysaccharides d'E. foetida. L'étude biochimique nous a permis d'orienter notre choix des précurseurs sur le mannose marqué au ³H et la leucine tritiée. Les vers reçoivent des injections de 2 µCi de ³H-mannose dans 5 µl d'eau distillée (son activité spécifique est de 2l Ci/mMole dans une solution aqueuse stérile : 0,5 ml), et 5 µCi de leucine tritiée dont l'activité spécifique est de 50 Ci/mMole dans 0,5 ml de solution aqueuse stérile. Les animaux sont sacrifiés l2 heures, l7 heures et 24 heures après l'injection. Le clitellum est alors prélevé, les pièces sont traitées suivant la méthode exposée dans le chapitre matériel et méthodes. Les lames ont été révélées après 15 jours d'exposition. Cette révélation est suivie d'une coloration.

I - PESULTATS

l - La leucine

- . Dans le cas de la leucine, on compte l2 grains d'argent/µm² résultant du bruit de fond après l2 heures d'incorporation contre 30 au niveau de l'épithélium. A tous les temps nous remarquons un très grand nombre de grains d'argent au-dessus des cellules à mucus.
- . Après 12 heures d'incorporation, les cellules à grosses granulations présentent un marquage 2 à 3 fois plus intense que celui des cellules à fines granulations (Pl. XII, fig. A).
- . Pour un temps d'incorporation de 17 heures, la plupart des grains d'argent se situent au niveau des cellules à fines granulations, cependant un marquage important est encore observable dans les cellules à grosses granulations (Pl. XII, fig. B).
- . 24 heures après l'incorporation, on ne note pas de différence nette de marquage entre les deux types cellulaires bien que celles à gros granules paraissent parfois un peu plus marquées (Pl. XII, fig. C). Dans tous les cas les cellules à mucus sont très radioactives.

2 - Le mannose

. Dans tous les cas la densité de grains d'argent résultant du bruit de fond est inférieure à celle détectée au niveau des cellules marquées du clitellum (16 grains d'Ag/µm² au niveau de l'épithélium après l2 heures d'incorporation du mannose contre 5 grains/µm² résultant du bruit de fond).

- . Pour 12 heures d'incorporation, l'examen des autoradiogrammes révèle que les grains d'argent se localisent préférentiellement au-dessus des cellules à fins granules. Ces cellules montrent un marquage en général plus intense que celui des cellules à gros granules (Pl. XII, fig. D).
- . 17 heures après l'injection le marquage se situe au-dessus à la fois des cellules à fins granules et des cellules à gros granules, toutefois ces dernières sont faiblement radioactives (Pl. XII, fig E).
- . Au bout de 24 heures, la majorité des grains d'argent se situe au niveau des cellules à grosses granulations. Un marquage non négligeable persiste cependant au niveau de celles à fines granulations (Pl. XII, fig. F).

II - DISCUSSION

Les résultats obtenus avec la leucine et le mannose comme précurseurs indiquent que toutes les cellules du clitellum (cellules à fines et à grosses granulations) sont capables de synthétiser à la fois les protéines et les sucres. D'après nos résultats biochimiques, le clitellum mûr possède un taux élevé de mannose. Il n'est donc pas surprenant de constater la bonne incorporation de ce sucre l2 heures après son injection. Cette incorporation ne se fait pas de la même manière pour les deux types cellulaires du clitellum à savoir : cellules à fins granules et celles à gros granules. Nous observons que de 12 à 17 heures après l'incorporation ce sont les cellules à fines granulations qui synthétisent plus de sucres. 24 heures après les cellules à grosses granulations emmagasinent un peu plus de sucres que celles à fines granulations. Quant à la synthèse des protéines elle est plus intense au niveau des cellules à grosses granulations en début d'incorporation de la leucine tritiée. Cette synthèse devient de plus en plus importante dans les cellules à fines granulations, 17 heures après l'injection. Elle paraît enfin nettement plus abondante au niveau des cellules à grosses granulations heures après l'incorporation. On pourrait déduire que les cellules à grosses granulations synthétisent plus de protéines que celles à fines granulations. Nous n'avons pas eu la possibilité d'étudier la répartition des molécules marquées après des temps d'incorporation longs : aucun animal ne résistait après 24 heures d'incorporation, il pourrait déjà y avoir une perturbation des différents métabolismes. Ceci aurait peut-être permis de déterminer le rôle des différents types cellulaires qui forment le clitellum, dans le métabolisme protidique et glucidique. Les cellules à gros granules élaborent la

paroi du cocon. On sait que les enveloppes sont vraisemblablement constituées de kératines. Or après 24 heures d'incorporation de la leucine et du mannose on observe le plus de marquage au niveau des cellules à gros granules. On pourrait conclure que l'enveloppe du cocon est riche à la fois en sucres et en protéines, ce qui n'est vérifié pour l'instant que pour les protéines.

Les cellules à fins granules seraient à l'origine de l'albumen. L'analyse biochimique de celui-ci démontre sa richesse en protéines (58 % du poids sec après l jour d'incubation du cocon). Il est par contre relativement pauvre en sucres (29,5 % du poids sec après l jour d'incubation). Le fait d'avoir plus de grains d'argent au niveau des cellules à gros granules qu'au niveau de celles à fins granules après 24 heures d'incorporation de la leucine et du mannose marqués suggère que la paroi du cocon pourrait être formée de glycoprotéines.

III - CONCLUSION

Nos observations nous laissent penser que les trois types cellulaires qui forment le clitellum - cellules à mucus, cellules à gros granules et cellules à fines granulations - sont toutes les trois capables de synthétiser les protéines et les sucres. Les variations dans le temps sont faibles. Ceci pourrait laisser penser que l'enveloppe du cocon serait constituée non seulement de kératines mais aussi de glycoprotéines. D'autre part ces résultats confirment l'existence de glycoconjugués dans l'albumen.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ainsi donc, les résultats que nous venons d'exposer montrent clairement un accroissement des quantités de protéines et de polysaccharides, plus que de lipides, au cours de la maturation sexuelle d'E. foetida. Cette augmentation traduit l'activité synthétique des différents constituants sécréteurs du clitellum (cellules à mucus, cellules à fins granules, cellules à gros granules).

L'analyse électrophorétique a mis en évidence une hétéroprotéine (A) de poids moléculaire supérieur à 440 kilodaltons. Cette protéine, par ses caractères et sa nature lipoglycoprotéique, pourrait être une vitelline comparable à celle des Annélides (Néréidiens) ou à celle des Arthropodes.

Les sucres représentent 43 % du poids sec d'un échantillon de cocons à différents stades d'incubation. Par chromatographie en phase gazeuse,
nous avons pu analyser ces sucres afin de préciser leur variation, selon le
degré d'évolution du clitellum et du cocon. On retrouve les mêmes monosaccharides à tous les âges de l'animal. En effet quel que soit le stade de maturation sexuelle du clitellum et de développement du cocon, l'analyse a montré
l'existence des monosaccharides suivants : fucose, galactose, mannose, glucose,
xylose, la galactosamine et la glucosamine. La différence apparaît au niveau
quantitatif : on note une forte augmentation du mannose à la maturité, où il
représente 34,9 % des sucres totaux au lieu de 13 % à l'immaturité. Ce sucre
pourrait donc être caractéristique de la maturité génitale. Par contre l'immaturité sexuelle pourrait être caractérisée par le glucose.

Pour les cocons le début de l'incubation est caractérisé par des teneurs élevées en oses. Au contraire à l'approche de l'éclosion, nous remarquons une baisse générale des différents oses : le fucose représentant 5,25 % du résidu sec le ler jour d'incubation ne correspond plus qu'à 1,74 % après 20 jours d'incubation.

Le clitellum s'enrichit en lipides au cours de la maturation. Toutefois leur quantité reste toujours faible (10 % du poids sec du clitellum mûr). Ce sont les lipides neutres qui représentent la majeure partie de ces lipides totaux (6,6 %). En utilisant la chromatographie en phase gazeuse, nous avons vu en détail la composition en acides gras. Nos résultats montrent que des acides gras appartenant à différentes voies métaboliques sont présents dans le clitellum d'E. foetida quel que soit le stade de maturation sexuelle ainsi que dans les cocons durant toute l'incubation. Les acides palmitique, stéarique, oléique et vaccénique ont des teneurs importantes aussi bien dans le clitellum que dans les cocons. De plus Eisenia foetida est l'un des rares animaux à posséder un acide gras à nombre impair de carbones : l'acide margarique.

L'autoradiographie montre que protéines et glucides sont synthétisés dès les premières heures de l'incorporation. Après 24 heures d'incorporation de la leucine et du mannose, ce sont les cellules à gros granules qui présentent le plus de marquage. Sachant que ces cellules élaborent la paroi du cocon, on peut penser que l'enveloppe du cocon serait constituée de protéines (kératines) et de glycoprotéines. Les cellules à fins granules synthétisent aussi bien les protéines que les sucres. Or ce sont ces cellules qui seraient à l'origine du contenu du cocon. Ceci confirme l'existence de glycoconjugués dans l'albumen. L'activité de synthèse de protéines et de sucres au niveau des 3 types cellulaires qui secrétent les constituants du cocon est conforme à ce que l'on attendait. En effet, ces cellules élaborent d'une manière répétitive des cocons, il est donc indispensable qu'elles soient capables de synthétiser à la fois les protéines et les sucres car cette fabrication continue nécessite sans aucun doute un très grand apport d'énergie et de protéines.

Sachant qu'une hormone peptidique gouverne, seule ou associée à d'autres facteurs, la maturation sexuelle des vers, il faudra rechercher par quel mécanisme s'effectue ce contrôle au niveau des différentes cellules cibles du clitellum (cellules à fins granules, cellules à gros granules, cellules à mucus) pour élaborer cet ensemble complexe qu'est le cocon.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDRE (F.), 1963 Contribution à l'analyse expérimentale de la reproduction des Lombriciens. Bull. Biol. Fr. et Belg., 97, 1-101.
- AVEL (M.), 1927 a Caractères sexuels secondaires et glandes génitales chez les Lombriciens. C. R. Soc. Biol., 96, p. 1143.
- AVEL (M.), 1927 b Expériences de transplantation sur les caractères sexuels secondaires des Lombriciens. C. R. Soc. Biol., 97, p. 1069.
- AVEL (M.), 1928 a La castration chez les Lombriciens n'empêche pas l'évolution des caractères sexuels secondaires anatomiques et physiologiques. C. R. Sco. Biol., <u>187</u>, p. 67.
- AVEL (M.), 1928 b Sur le déterminisme humoral des caractères sexuels secondaires anatomiques externes chez les Lombriciens. C. R. Soc. Biol., 99, p. 501.
- AVEL (M.), 1928 c Sur le rôle du clitellum dans la sécrétion du cocon chez les Lombriciens. Bull. Soc. Sool. France, 53, p. 322.
- AVEL (M.), 1959 Classe des Annélides Oligochètes. In Traité de Zoologie, P.P. Grassé, Masson, 5, 224-270.
- ANDREW (E.A.), 1895 Conjugation of the Brandling. A. Amer. Nat., 29.
- BERJON (J.J.), 1965 Application de la culture organotypique sur milieu artificiel à la discrimination des fonctions endocrines des ganglions cérébroïdes du Lombricien Eisenia foetida (Sav.). C. R. Acad. Sci., 260, 6212-6214.
- CANER (F.), 1981 Contribution à l'étude biochimique de l'ovogenèse de Perinereis cultrifera. Thèse 3ème Cycle, Université de Lille I.
- COLE (J.F.), 1893 Notes on the clitellum of the earthworm. Zool. Anz., $\underline{16}$, p. 440 et 453
- DEFRETIN (R.) et DEMAILLY (E.), 1953 Sur quelques caractères histochimiques des divers types de cellules glandulaires du clitellum du Lombric.

 C. R. Soc. Biol., 147, 1251-1253.
- DEPRET (M.), 1979. Recherches biochimiques et biologiques sur les gonades et le sang de deux Mollusques Céphalopodes : Sepia officinalis et Loligo vulgaris. Thèse 3ème Cycle, Université de Lille I.
- DEVRIES (J.), 1964 b Le développement des oeufs à polyspermie intense obtenus après fécondation expérimentale chez le Lombricien Eisenia foetida unicolor. Bull. Soc. Zool. Fr., 98, 771-776.

- DEVRIES (J.), 1972 Etude descriptive et expérimentale du développement embryonnaire chez le Lombricien Eisenia foetida. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Bordeaux I.
- DURCHON (M.), 1967 Endocrinologie des Vers et des Mollusques. Masson Ed., Paris, 237 p.
- FELDKAMPF (J.), 1924 Untersuchungen ueber die Geschlechtsmerkmale und due Begattung der Regenwurmer. Zool. Jahrb. Abt. f. Anat., 46, p. 609.
- FOOT (K.), 1894 Preliminary note on the maturation and fertilization of the egg of Allolobophora foetida. J. Morph., 9, 475-484.
- 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.) et 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.), 1982 Les lipides coelomiques chez Perinereis cultrifera
 Grübe (Annélide Polychète). Thèse 3ème Cycle, Université de Lille I.
- GABE (M.), 1953 Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine paraldéhyde. Bull. Microscop. Appl., 3, 153-162.
- GABE (M.), 1968 Techniques histologiques. Masson et Cie, Paris.
- GEIGER (P.J.) et BESSMAN (S.P.), 1972 Protein determination by Lowry's method in the presence of sulfhydryl reagents. Analyt. Biochem., 49: 467-473.
- GROVE (A.J.), 1927 The passage of the spermatozoa into the cocon in the brandling worm (Eisenia foetida Sav.). Quart. J. Microsc. Sc., 71, 465-477.
- GROVE (A.J.) et GOWLEY (L.F.), 1926 On the reproductive processes of the brandling worm (E. foetida Sav.). Quart. J. Microsc. Sc., 70, 559-581.
- GROVE (A.J.) et GOWLEY (L.F.), 1927 The relation of the glandular elements of the clitellum of the brandling worm (E. foetida Sav.) to the secretion of the cocon. Quart. J. Microsc. Sc., 71, 37-45.
- HARMS (W.), 1912 Beeinflussung der Daumenballen des Kastraten durch transplantation auf normale Rana fusca. Zool. Anz., 39, p. 145.
- HERLANT-MEEWIS (H.), 1956 Croissance et neurosécrétion chez Elsenia foetida.

 Ann. Sci. Nat., Zool., 11° S., 18, 185-198.
- HERING (E.), 1856 Zur anatomie und physiologie der Generationsorgane des Regenwurms. Btaunschweig.

- HOFFMEISTER (W.), 1845 Die bis Jetztbe Kannten Arten aus der Femilie der Regenwürmer. Braunschweig.
- HÜBL (H.), 1953 Die inkretorischen Zellelemente im Gehirn der Lumbriciden.
 Arch. Entwickl. Mech. org., 146, 421-432.
- JUBERTHIE (C.), 1967 Progrès récents sur la biologie des Oligochètes souterrains Haplotaxidae et Lumbricidae. Spelunce Mémoires, 5, 268-272.
- KANAZAWA (A.), TESHIMA (S.), TOKIWA (S.) et CECCALDI (H.J.), 1979 Effects of dietary linoleic and linolenic acids on growth of prawn. Oceanol. Acta, 2, 41-48.
- KANAZAWA (A.), TESHIMA (S.) et ONO (K.), 1979 Relationship between essential fatty acid requierements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. Comp. Biochem. Physiol., 63 B, 295-298.
- LARRA (F.) et DROZ (B.), 1970 Techniques autoradiographiques et leur application à l'étude du renouvellement des constituants cellulaires. J. Microsc., 9, 845-880.
- LATTAUD (C.) et MARCEL (R.), 1983 Stimulation in vitro de la sécrétion de l'androgène testiculaire par une fraction purifiée de cerveau chez Eisenia foetida forme typica (Sav.) (Annélide Oligochète)., Can. J. Zool., 61, 2399-2401.
- LISON (L.), 1960 Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes. Gauthier-Villards, Paris (2 volumes).
- 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. Biochem. Physiol., 38 B, 179-197.
- MALECHA (J.), 1979 Contribution à l'étude de la biologie de l'Hirudinée

 Rhynchobdelle Piscicola geometra. Thèse Doctorat d'Etat, Université

 de Lille I.
- MARCEL (R.), 1980 Recherches sur le facteur clitellogène chez E. foetida Sav. (Annélide Oligochète). Bull. Soc. Zool. Fr., 105, p. 127.
- MARCEL (R.) et CARDON (C.), 1982 Purification par chromatographie liquide à haute performance de la neurohormone cérébrale d'E. foetida (Annélide Oligochète). Essai sur la régénération et la clitellogenèse. Reprod. Nutr. Develop., 23, 1003-1009.

- MONROY (A.), 1954 Observations on the fertilization reaction in the eggs of some Polychaetes and on ascidian, with special reference to the cortical changes. Publ. Biol. Fr., 31, 1639-1641.
- MONTREUIL (J.) et SPIK (G.), 1963 Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Monogr. Labo. Chimie Biol., Lille, 146 p.
- PORCHET (M.), 1969 Intéraction entre l'activité endocrine du cerveau et l'état génital chez *P. cultrifera*. Thèse 3ème Cycle, Université de Lille I.
- PORCHET (M.), 1970 Relations entre le cycle hormonal cérébral et l'évolution ovocytaire chez P. cultrisera. Gen. comp. Endocrinol., 15, 220-231.
- PORCHET (M.), 1974 Activité endocrine cérébrale chez les Nereidae. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Lille I.
- PORCHET (M.), Spik (G.) et DHAINAUT (A.), 1977 Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de P. cultrifera (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. I. Etude biochimique. Biol. Cellulaire, 28, 225-232.
- RICHARDS (K.S.), 1974 The ultrastructure of the cuticle of some british lumbricids (Annélida). J. Zool., Lond., 172, 303-316.
- RICHARDS (K.S.), 1975 The ultrastructure of the metachromatic mucous cells of some british lumbricids (Annelida). J. Zool., Lond., <u>177</u>, 233-246.
- RICHARDS (K.S.), 1977 a Structure and function in the Oligochaete epidermis (Annelida). Symp. Zool. Soc. Lond., 39, 171-193.
- RICHARDS (K.D.), 1977 b The histochemistry and ultrastructure of the clitellum of the enchytraeid *Lumbricillus rivalis* (Oligochaeta: Annelida). J. Zool. Lond., 183, 161-176.
- RIMINGTON (C.), 1931 Biochem. J., <u>25</u>, 1062. Cité par Montreuil (J.) et Spik (G.), 1963, 1968.
- STRONG (F.E.), 1963 a Studies on lipids in some homopterus insects. Hilgardia, 34, 43-61.
- STRONG (F.E.), 1963 b Fatty acids : in vivo synthesis by the green peach aphid Myzus persicae (Sulzer). Science, 140, 983-984.
- STRONG (F.E.), 1964 Lipid composition of the eggs from an aphid. Nature, 202, 622.

- SUZUTANI (C.), 1977 Light and electron microcopical observations on the clitellar epithelium of Tubifex. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool., 21, 1-11.
- TILLMANS (J.) et PHILIPPI (K.), 1929 Biochem. Z., 215, 36. Cité par Montreuil (J.) et Spik (G.), 1963, 1968.
- TYLER A., 1949 Properties of fertilizin and related substances of eggs and sperm of marine animals. Am. Nat., 83, 195-219.
- VALEMBOIS (P., ROCH (P.) et LASSEGUES (M.), 1984 Simultaneous existence of hemohesins and hemagglutinins inthe coelomic fluid and in the cocon albumen of the earthworm *E. foetida* Andrei. Comp. Biochem. Physiol., 78 A, 141-146.
- VASSEUR (E.), 1948 Etudes chimiques sur l'enveloppe gélatineuse de l'oeuf d'Oursin. Acta Chem. Scand., 2, 900-913.
- VASSEUR (E.), 1949 Proc. Ist Int. Congr. Biochem. (Cambridge), 281, Cité par HUNT, 1970, In "Polysaccharide protein complexes".

ANNEXE

PLANCHES

PLANCHE I

ETUDE DU COCON

Figure A - Cocon d'E. foetida. X 1 000.

Figure B - Vue latérale du cocon. mc : mucus. X l 000.

Figure C - Face dorsale du cocon. X 10 500.

Figure D - Enveloppe muqueuse du cocon. X 1 000.



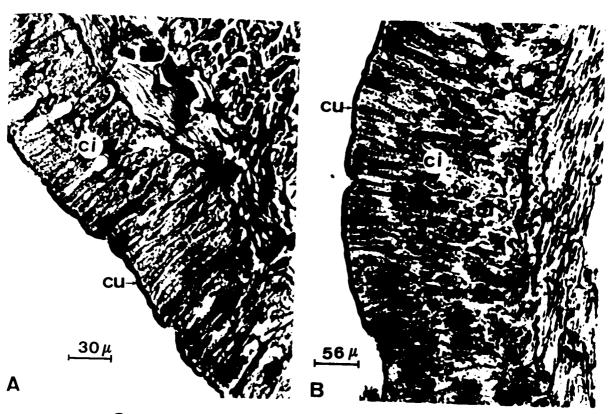
PLANCHE II

ETUDE HISTOLOGIQUE DU CLITELLUM A DIFFERENTS STADES DE MATURATION SEXUELLE

Figure A - Clitellum immature. cu : cuticule ; ci : couche interne.

Figure B - Clitellum submature. cu : cuticule ; ci : couche interne.

Figure C - Clitellum mûr. cu : cuticule ; cm : cellules à mucus ; cgg : cellules à grosses granulations ; cfg : cellules à fines granulations.



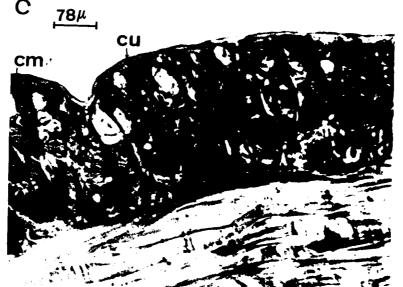


PLANCHE III

Figure A - Clitellum mûr. Les flèches indiquent les limites du clitellum. X l 000.

Figure B - Soie génitale (sg) et orifice génital femelle (ogf).
X l 000.

Figure C - Face dorsale du clitellum. Pore dorsal : pd. X 1 000.

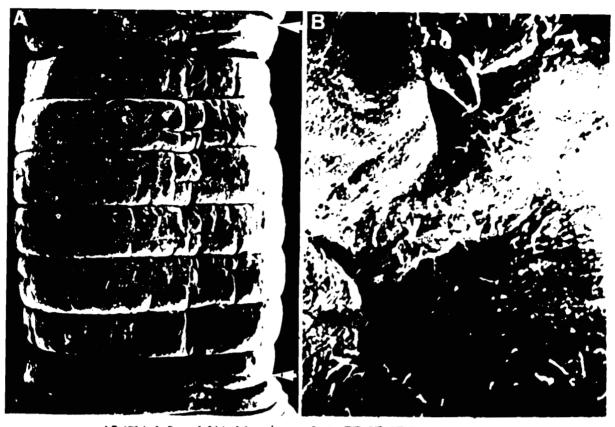




PLANCHE IV

ETUDE HISTOCHIMIQUE DU CLITELLUM A DIFFERENTS STADES DE MATURATION SEXUELLE.

Etude cytochimique des protéines (P).

Figure A - Au niveau du clitellum immature.

Figure B - Au niveau du clitellum submature.

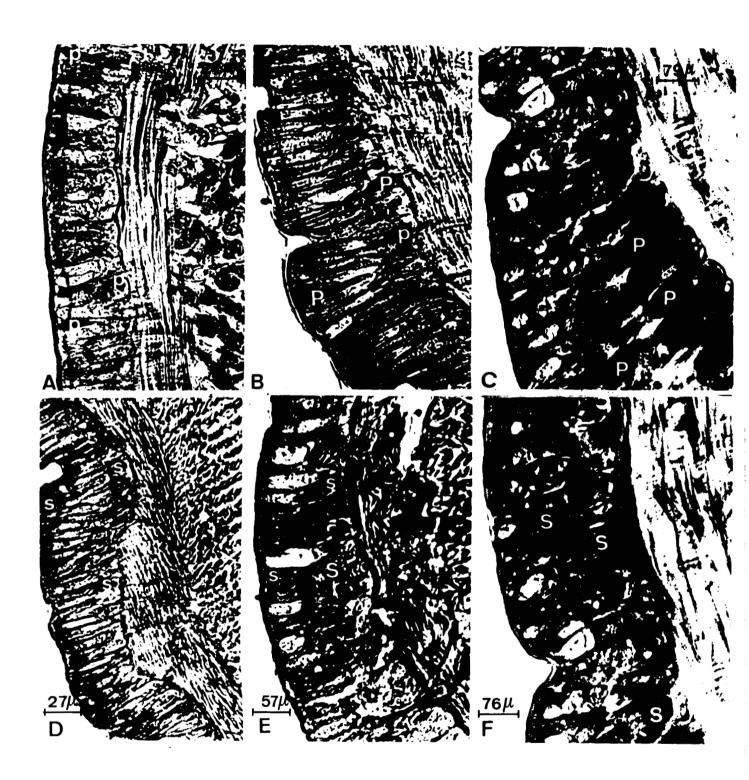
Figure C - Au niveau du clitellum mûr

Etude cytochimique des sucres (S).

Figure D - Au niveau du clitellum immature.

Figure E - Au niveau du clitellum submature.

Figure F - Au niveau du clitellum mûr.



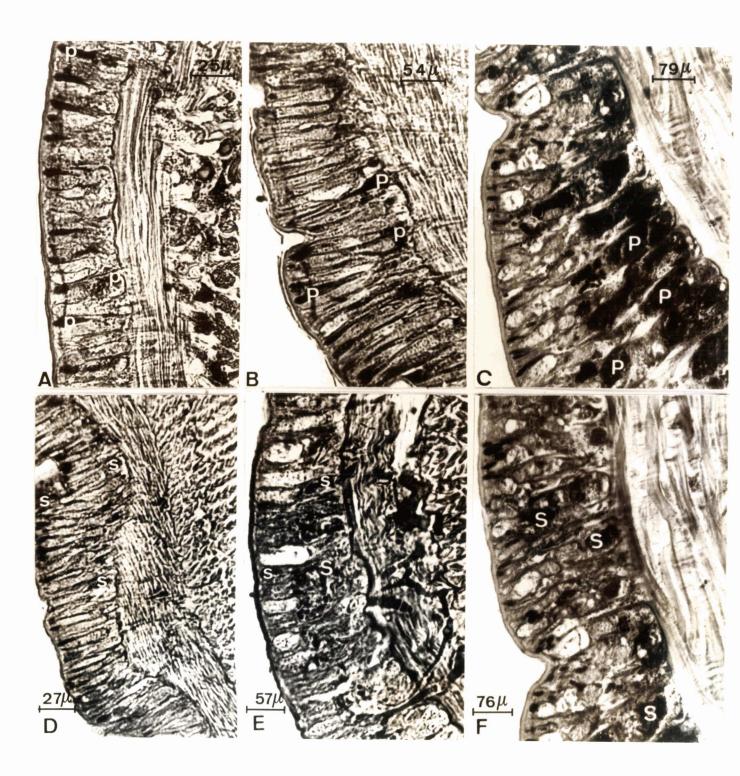


PLANCHE V

ANALYSE ELECTROPHORETIQUE EN MILIEU NON DENATURANT DES PROTEINES SOLUBLES

DU CLITELLUM ET DU COCON

ANALYSE ELECTROPHORETIQUE en MILIEU NON DENATURANT

des PROTEINES SOLUBLES du CLITELLUM et du COCON

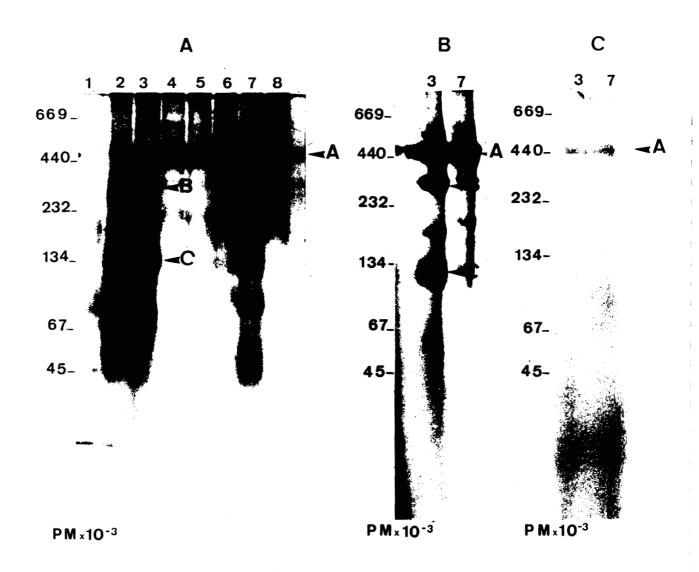


Figure A - Analyse des protéines solubles du clitellum immature (1), clitellum submature (2), clitellum mûr (3), cocon 1 jour (4), cocon 5 jours (5), cocon 10 jours (6), cocon 15 jours (7), cocon 20 jours (8).

L'analyse est réalisée par électrophorèse dans un gradient 5-25 % d'acrylamide.

Figure B - Coloration par le réactif de Schiff des polysaccharides du clitellum mûr (3), de cocons 10 jours (7).

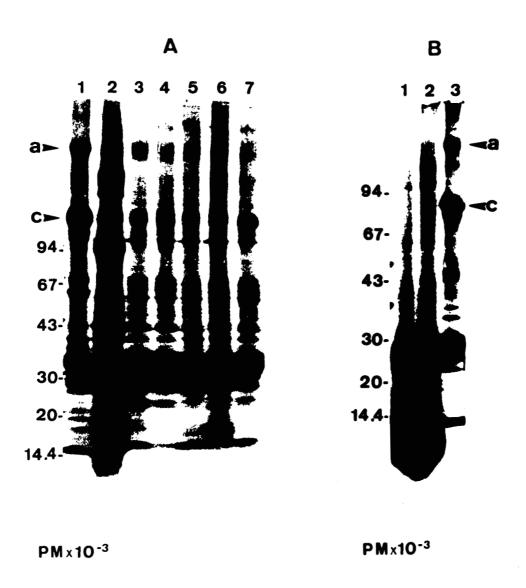
Figure C - Coloration par le Noir Soudan des lipides du clitellum mûr (3), de cocons 10 jours (7).

PLANCHE VII

ETUDE ELECTROPHORETIQUE EN MILIEU DENATURANT DES PROTEINES SOLUBILISEES

DES CULOTS DE COCON ET DE LEURS ENVELOPPES

ETUDE ELECTROPHORETIQUE en MILIEU DENATURANT des PROTEINES SOLUBILISEES des CULOTS de COCON et de leurs ENVELOPPES



- Analyse des protéines solubles du cocon (10 jours), du clitellum mûr, des différents culots de cocons à différents stades d'incubation : cocon 10 jours (1), clitellum mûr (2), culot de cocons 1 jeur (3), culot de cocons 5 jours (4), culot de cocons 10 jours (5), culot de cocons 15 jours (6), culot de cocons 20 jours (7).

Figure B - Analyse des protéines solubles des enveloppes de cocons : enveloppe de cocons 1 jour (1), enveloppe de cocons 20 jours (2), cocons 10 jours (3).

PLANCHE VIII

ANALYSE BIDIMENSIONNELLE DES PROTEINES SOLUBLES DU CLITELLUM ET DU COCON

ANALYSE BIDIMENSIONNELLE des PROTEINES SOLUBLES

du CLITELLUM et du COCON

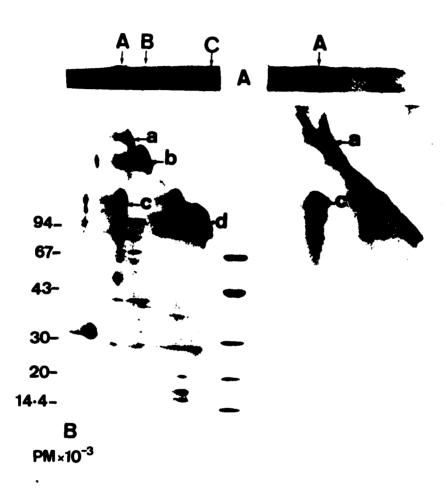


Figure A: lère dimension. Séparation des protéines natives du clitellum mûr et du cocon après 10 jours d'incubation. Cette séparation est faite selon leur poids moléculaire par électrophorèse dans un gradient 5-25 % d'accrylamide.

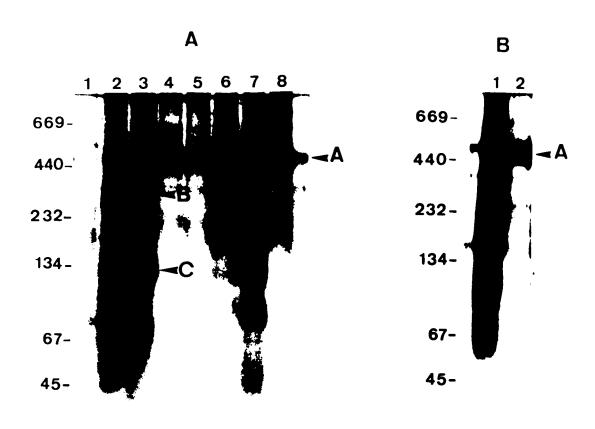
Figure B : 2ème dimension. Analyses de ces protéines natives par électrophorèse dans un gradient 5-25 % d'acrylamide en présense de S.D.S.

PLANCHE IX

ETUDE ELECTROPHORETIQUE EN MILIEU NON DENATURANT DES PROTEINES SOLUBLES

DES EMBRYONS ET DE LA GELEE DU COCON

ETUDE ELECTROPHORETIQUE en MILIEU NON DENATURANT des PROTEINES SOLUBLES des EMBRYONS et de la GELEE du COCON



PM x 10⁻³ PM x 10⁻³

Figure A = Analyse des protéines solubles du clitellum immature (1), clitellum submature (2), clitellum mûr (3), cocon 1 jour (4), cocon 5 jours (5), cocon 10 jours (6), cocon 15 jours (7), cocon 20 jours (8),

Figure B - Analyse des protéines solubles de la gelée (1), de l'embyron (2).

L'analyse est réalisée par électrophorèse dans un gradient 5-25 % d'acrylamide.

PLANCHE X

EXEMPLE DE CHROMATOGRAMME OBTENU EN CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSEGAZEUSE (CHROMATOGRAMME DES POLYSACCHARIDES DU CLITELLUM MÛR).

Il n'y a pas d'acide glucuronique ni d'acide sialique.

Gluc : glucose

Fuc : fucose

Gal : galactose

Man : mannose

Xyl : xylose

Gal Nac : galactosamine

Gluc Nac : glucosamine

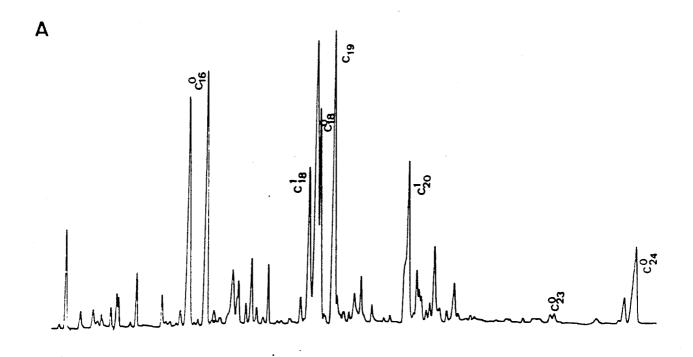
1	7—	Tél:90	 	№ f.71						1		Ī							T
\equiv																		·	T
\equiv																			Ŧ
			 	===				-				<u> </u>	ļ	-					
	H																		t
==			 	=							_	ļ <u></u>							1
$\overline{+}$	H=										MAN								+
			 		_==						2	ļ							1
	-		 									 	-						†
=										-		1							
	H		 	-															†
=-	-		 ļ						\circ									-	
	Π								S								_		T
			-						Ш										١
			 <u> </u>						Σ										T
	1=		 =	===								====							
-			 												_				1
			 																1
	E																	<u> </u>	1
			 				-					ļ	ļ			 			
											$\parallel \parallel$	ļ						-	4
	Н-		 			C			-		-#	 							+
ļ ļ			 			FU									 .				
											₹ U								1
			 						- 1		U	12.2	ļ						
	\vdash								- 11										┪
	- 1		 		<u></u> -			-										- :	
			<u> </u>						-					-				<u> </u>	1
===	1		 																1
										A									1
	1																O		1
			 					-			H		GA				V	H≤	₫
											<u>, </u>								1
		\	 					ī-									23	HIZ	Ì
			 								g -		M.	AN	=			FIE	7
1 1						丑	I				W_{-}		III			A	U	IIL	Ţ
					7	<u> </u>	4 <u>~</u>		ال		¥		1			1	IC		+
			 	 		L :										1 .	1		
											7 .		-						7
																			1
																		 	1

PLANCHE XI

ETUDE DES ACIDES GRAS EN CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE

Figure A - Exemple de chromatogramme obtenu en GLC (chromatogramme d'acide gras du clitellum mûr).

Figure B - Exemple de spectre de masse (spectre de masse de l'acide oléique).



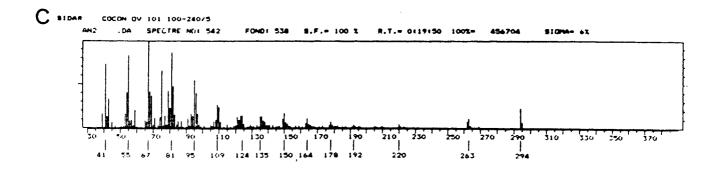


PLANCHE XII

ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE

Autoradiographie de la Leucine-3H.

- Figure A Incorporation de la leucine tritiée pendant 12 heures.

 Les cellules à grosses granulations (Cgg) présentent

 un marquage plus intense que les cellules à fines

 granulations (cfg).
- Figure B Incorporation de la leucine tritiée pendant 17 heures.

 La plupart des grains d'argent se localisent au niveau des cellules à fines granulations (cfg). Un marquage important est encore observable dans les cellules à grosses granulations.
- Figure C Incorporation de la leucine tritiée pendant 24 heures.

 Pas de différence nette de marquage entre les deux

 types cellulaires.

Autoradiographie du Mannose-3H.

- Figure D Incorporation du mannose tritié pendant 12 heures.

 Les grains d'argent se localisent au-dessus des cellules à fins granules (cfg).
- Figure E Incorporation du mannose tritié pendant 17 heures.

 Le marquage se situe à la fois au-dessus des cellules à gros granules (cgg) et à fins granules (cfg).
- Figure F Incorporation du mannose tritié pendant 24 heures.

 Le marquage se situe au niveau des cellules à grosses granulations. Un marquage non négligeable persiste au niveau des cellules à fines granulations.

