

50376  
1985  
275

50376  
1985  
275

N° d'ordre : 1285

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

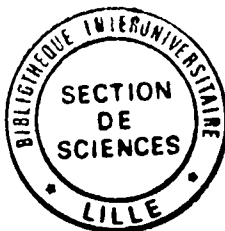
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Biologie et Physiologie Animales

par

Nicole GAILLET



## MISE EN EVIDENCE ET RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES ECDYSTEROÏDES CHEZ LES NEREIDIENS (ANNELIDES POLYCHETES)

Soutenue le 4 Juillet 1985 devant la Commission d'Examen

Président  
Rapporteur  
Examineurs

M. PORCHET, Université de Lille I  
M. CHARLET, Université de Strasbourg  
A. DHAINAUT, Université de Lille I  
R. JOLY, Université de Picardie  
F. SAUBER, Cours Universitaires Luxembourg

## AVANT-PROPOS

Que Monsieur PORCHET trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche. Je le remercie vivement de présider mon Jury de Thèse.

Je remercie Monsieur HOFFMANN qui a suivi mon travail avec intérêt. C'est au cours de stages effectués sous sa direction au Laboratoire de Biologie Générale de Strasbourg que mon premier contact avec les ecdystéroïdes a été réalisé. Les facilités techniques qu'il m'a accordées m'ont beaucoup aidée dans la réalisation de ce travail. Je lui en suis reconnaissante.

Je remercie tout particulièrement Monsieur CHARLET qui n'a cessé de m'aider par les conseils judicieux qu'il m'a toujours aimablement prodigués. Je suis heureuse de pouvoir lui exprimer ici ma profonde gratitude.

Je suis également très sensible à l'honneur que me font Messieurs DHAINAUT, JOLY et SAUBER en acceptant de juger ce travail. Je les en remercie vivement.

Mon mémoire doit beaucoup aux discussions régulières que j'ai eues avec Monsieur DESCAMPS. Je lui adresse mes remerciements très amicaux.

Je ne saurais oublier tous ceux qui, en m'apportant une aide technique ou morale, ont contribué à la réalisation de ce travail. Il m'est agréable de leur adresser mes très vifs remerciements, et qu'ils trouvent ici l'expression de mon amicale reconnaissance.

C'est avec un très grand plaisir que j'exprime ma profonde gratitude à Monsieur DURCHON à qui je dois d'avoir pu entreprendre ce travail de recherche. Qu'il sache combien la confiance qu'il m'a accordée a été un stimulant particulièrement précieux. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

## SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION . . . . .	1
MATERIEL ET METHODES . . . . .	3
A - Matériel biologique . . . . .	3
B - Méthodes . . . . .	3
I - Techniques d'analyse des ecdystéroïdes . . . . .	3
1 - Préparation des échantillons biologiques . . . . .	3
2 - Extraction des ecdystéroïdes . . . . .	4
3 - Recherche des conjugués d'ecdystéroïdes . . . . .	4
4 - Séparation des ecdystéroïdes . . . . .	5
a - Chromatographie sur couche mince (T.L.C.) . . . . .	5
b - Chromatographie en phase liquide à haute performance . . . . .	5
5 - Dosage des ecdystéroïdes . . . . .	6
6 - Injections de précurseurs radioactifs de l'ecdysone . . . . .	9
7 - Technique d'acétylation . . . . .	9
II - Technique de culture organotypique . . . . .	10
III - Techniques de microscopie . . . . .	10
1 - Microscopie photonique . . . . .	10
2 - Microscopie électronique . . . . .	11
 CHAPITRE I - RECHERCHE D'ECDYSTEROÏDES CHEZ <i>PERINEREIS CULTRIFERA</i> GRÜBE	
A - Répartition et taux des ecdystéroïdes immunoréactifs . . . . .	13
I - Résultats . . . . .	13
II - Discussion . . . . .	18
B - Analyse qualitative des composés immunoréactifs . . . . .	20
I - Analyse par chromatographie sur plaque de gel de silice (T.L.C.) . . . . .	20
II - Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (H.P.L.C.) . . . . .	22

1 - Purification des produits R.I.A. positifs de la zone 3 de la T.L.C. . . . . .	22
2 - Purification des ecdystéroïdes immunoréactifs de forte polarité . . . . .	23
3 - Purification des produits R.I.A. positifs de faible polarité . . . . .	23
III - Discussion . . . . .	23
 CHAPITRE II - ETUDE DE LA CONVERSION, <i>IN VIVO</i> , DE DEUX PRECURSEURS DE BIOSYNTHESE D'ECDYSONE : LA 2, 22, 25 TRIDESOXYEC- DYSONE (KETODIOL) ET LA 2-DESOXYECDYSONE.	
A - Conversion, <i>in vivo</i> , de la 2, 22, 25 tridésoxyecdysone . . . . .	30
I - Stade ovocytaire 168 $\mu$ m . . . . .	33
1 - Purification des composés radioactifs co-migrant avec la 20-hydroxyecdysone et l'ecdysone de référence . . . . .	33
2 - Purification des composés radioactifs peu polaires	33
II - Stade ovocytaire 233 $\mu$ m . . . . .	36
1 - Purification des produits radioactifs de forte polarité . . . . .	36
2 - Purification des produits radioactifs co-migrant avec la 20-hydroxyecdysone de référence . . . . .	36
3 - Purification des produits radioactifs peu polaires	36
B - Conversion, <i>in vivo</i> , de la 2-désoxyecdysone . . . . .	40
I - Stade ovocytaire 168 $\mu$ m . . . . .	40
1 - Purification des produits radioactifs des zones 2 et 3 . . . . .	41
2 - Purification des produits radioactifs de la zone 4 . . . . .	45
II - Stade ovocytaire 233 $\mu$ m . . . . .	45
1 - Purification des composés radioactifs polaires . .	45
2 - Purification des composés radioactifs des zones 2 et 3 . . . . .	45
3 - Purification des composés radioactifs peu polaires	49

	Pages
C - ACETYLATION . . . . .	49
1 - Acétylation avec la 20-hydroxyecdysone . . . . .	49
2 - Acétylation avec la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone. . . . .	49
D - DISCUSSION . . . . .	51

### CHAPITRE III - RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES ECDYSTÉROÏDES CHEZ LES NEREIDIENS

I - Action des ecdystéroïdes sur la maturation des produits génitaux mâles : étude en culture organotypique . . . . .	53
1 - Influence de la concentration en 20-hydroxyecdysone	54
2 - Importance du nombre d'incorporations . . . . .	56
3 - Action de l'ecdysone . . . . .	59
4 - Influence du mode d'incorporation des ecdystéroïdes . . . . .	59
a - Incubation préalable des prostomiums . . . . .	59
b - Injections de 20-hydroxyecdysone . . . . .	59
5 - "Activité" des milieux de culture . . . . .	59
II - Discussion . . . . .	60
 CONCLUSION GENERALE . . . . .	 63
 BIBLIOGRAPHIE . . . . .	 65

## ABRÉVIATIONS

E : ecdysone

E-OH : 20-hydroxyecdysone

2DE : 2-désoxyecdysone

2DE-20-OH : 2-désoxy-20-hydroxyecdysone

T.L.C. : chromatographie sur couche mince de silice

H.P.L.C. : chromatographie en phase liquide à haute performance

R.I.A. : radioimmunos dosage

U.V. : ultra-violet

## INTRODUCTION

Les Néréidiens (Annélides Polychètes) présentent des dispositions anatomiques qui en font un "modèle endocrinologique" relativement simple conduisant à une meilleure compréhension des mécanismes de l'endocrinologie générale. Or, depuis les travaux initiaux de DURCHON (1948) et de HAUENSCHILD (1956), les recherches entreprises chez ces animaux n'ont fait que confirmer les faits suivants :

- les ganglions cérébroïdes sécrètent une neurohormone qui inhibe la gamétogenèse et les transformations somatiques de l'épitoque, mais stimule certains métabolismes cellulaires, notamment la morphogenèse régénérative.
- cette hormone de nature neurosécrétrice est d'origine cérébrale, il n'existe pas de glande endocrine différenciée.
- l'activité endocrine du cerveau n'est pas constante tout au long de la vie de l'animal, importante pendant la phase juvénile, elle diminue en même temps que se développe la gamétogenèse pour finalement s'annuler à l'approche de la reproduction des animaux (HAUENSCHILD, 1955 ; DURCHON et PORCHET, 1971 ; DURCHON, 1978).
- le déterminisme de cette évolution hormonale est double : d'une part, un conditionnement externe qui joue un rôle important dans le déclenchement et le synchronisme des phases de reproduction et d'essaimage (HAUENSCHILD, 1955 ; CLARK, 1969 ; GOLDING, 1967) ; et d'autre part un conditionnement interne lié à l'évolution du milieu intérieur des *Nereis* (PORCHET et DURCHON, 1968 ; PORCHET et CARDON, 1976).

Jusqu'à ces derniers temps, aucune donnée expérimentale n'avait pu prouver la présence éventuelle d'autre(s) hormone(s) chez les Néréidiens.

Cependant, si les ecdystéroïdes constituent une famille de molécules utilisées comme messagers hormonaux chez les Arthropodes, nous savons maintenant que leur existence n'est plus limitée à ce seul embranchement. Depuis une dizaine d'années, on a pu en détecter dans d'autres groupes phylogénétiquement moins évolués tels les Némathelminthes (ROGERS, 1973 ; HORN *et al.*, 1974 ; MENDIS *et al.*, 1983), les Plathelminthes (TORPIER *et al.*, 1982 ; NIRDE *et al.*, 1983, 1984), les Annélides Hirudinées (SAUBER *et al.*, 1983) et Polychètes (PORCHET *et al.*, 1984).

Toutefois, les résultats obtenus chez les Annélides Polychètes demeuraient préliminaires et fragmentaires. Ils mettaient en évidence la

présence de matériel immunoréactif chez *Perinereis cultrifera* ainsi que quelques fluctuations dans le taux de ces molécules immunoréactives en fonction de l'âge des individus. Quant au rôle physiologique, nous avons constaté que les ecdystéroïdes ne semblaient pas avoir de grands effets au niveau des cellules somatiques, par contre, leur action sur les cellules germinales apparaissait plus nette, notamment dans le déclenchement des processus de spermatogenèse, placés sous le contrôle de la neurohormone cérébrale (DURCHON, 1948, 1956 ; HAUENSCHILD, 1956).

Il nous a paru fondamental de reprendre point par point ce travail afin d'en approfondir et de préciser les résultats.

Y-a-t-il effectivement des fluctuations du taux d'ecdystéroïdes au cours du développement de *Perinereis cultrifera* ? Quelle signification physiologique peut-on attribuer à la présence de ces ecdystéroïdes et aux fluctuations de leurs concentrations ?

Ces molécules sont-elles capables de jouer le rôle de messagers hormonaux ?

Telles sont les questions essentielles que nous nous sommes posées en abordant ce travail réalisé dans le cadre d'un programme commun de recherche avec le laboratoire d'Endocrinologie et d'Immunologie de l'Université de Strasbourg, Directeur J.A. HOFFMANN.



## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A - MATERIEL BIOLOGIQUE

Notre étude a porté sur deux espèces différentes de Néréidiens : *Perinereis cultrifera* Grube et *Nereis diversicolor* O.F. Müller, provenant respectivement de Luc-sur-Mer (Calvados) et de Grand-Fort-Philippe (Nord).

Les animaux récoltés sont gardés au laboratoire, dans de l'eau de mer filtrée, entre 12°C et 14°C, sans apport de nourriture ; ils restent soumis aux conditions photopériodiques naturelles.

La détermination de l'âge des animaux étant impossible au moyen de critères morphologiques externes, nous avons estimé celui-ci en faisant des ponctions coelomiques afin d'examiner l'état de maturation sexuelle des animaux. En effet, les Néréidiens ne possèdent pas de gonades différenciées, les cellules germinales évoluent librement dans la cavité coelomique et il est possible de déterminer le sexe et l'état génital de chaque animal par examen microscopique d'un prélèvement coelomique obtenu par ponction.

Pour classer les femelles, nous avons retenu comme critère le diamètre ovocytaire évalué à l'oculaire micrométrique. En ce qui concerne les mâles, c'est l'aspect des produits génitaux : amas mûrifomes des spermatogonies par exemple, qui a été retenu. Dans le cas où les produits génitaux ne sont pas encore décelables, les vers ont été alors considérés comme "indéterminés sexuellement".

### B - METHODES

#### I - TECHNIQUES D'ANALYSE DES ECDYSTEROÏDES

##### 1 - Préparation des échantillons biologiques

###### a - Ponction intracoelomique

Les ponctions sont réalisées au moyen de pipettes Pasteur dont le bout a été effilé à la flamme.

La pipette est introduite dans le coelome, parallèlement au corps de l'animal, en commençant par la partie postérieure de celui-

ci. Le contenu coelomique monte dans la pipette, tant par capillarité que sous l'effet de la pression intracoelomique ; il est constitué par le liquide coelomique, les produits génitaux et les coelomocytes.

b - Séparation des constituants issus d'une ponction intracoelomique

Une première centrifugation (1000 g, 5 mn) nous permet de récupérer dans un culot les éléments figurés tandis que le surnageant est composé du liquide coelomique.

Ce culot est repris par du tampon phosphate 0,05 M ; pH 7,4 ; NaCl 33 % ; remis en suspension, puis déposé à la surface d'un tamis (toile à bluter). Par agitation, les coelomocytes traversent les mailles du tamis, tandis que les ovocytes y sont retenus. Cette séparation est complétée par un passage sur Ficoll (Sigma) à 5 % dans le même tampon phosphate que celui utilisé précédemment (BULET *et al.*, 1983). Des contrôles au microscope photonique nous permettent de suivre le degré de purification des cellules. Une dernière centrifugation (1000 g ; 5 mn) élimine le tampon phosphate, nous pouvons ainsi récupérer ovocytes et coelomocytes.

L'ensemble de ces manipulations se fait à 4°C.

2 - Extraction des ecdystéroïdes

Les différents échantillons biologiques étudiés (ovocytes, coelomocytes, muscles, prostomiums et liquide coelomique) ont été homogénéisés dans l'éthanol à 60 %. Les homogénats ont été chauffés à 60°C pendant 15 minutes, puis centrifugés à 800 g pendant 10 minutes. Après centrifugation, les culots obtenus ont été réextraits trois fois à l'éthanol dans les mêmes conditions. Les surnageants respectifs ont été réunis, puis asséchés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite.

3 - Recherche de conjugués d'ecdystéroïdes

Afin de rechercher la présence éventuelle de conjugués d'ecdystéroïdes, des aliquotes de certains extraits ont été soumises soit :

a) à une hydrolyse enzymatique par l'extrait semi-purifié d'hépatopancréas d'*Helix pomatia* pour la détection des conjugués polaires d'ecdystéroïdes. Cette hydrolyse est faite par 2 mg de l'extrait enzymatique d'*Helix pomatia* (Sigma, G 0751) mis en solution dans 400 µl de tampon acétate 0,05 M ; pH 5,3. L'hydrolyse est réalisée à 37°C, pendant 18 heures, sous agitation constante.

b) à une hydrolyse chimique des esters en milieu basique pour la détection des conjugués apolaires d'ecdystéroïdes. Cette hydrolyse a été faite par une solution hydrolysante de carbonate de potassium (0,6 % de carbonate de potassium dans une solution méthanol/eau, 9V/1V) pendant 30 minutes à température ambiante.

Dans les deux types de traitement, les ecdystéroïdes libérés après l'hydrolyse ont été extraits selon le procédé décrit précédemment.

#### 4 - Séparation des ecdystéroïdes

Pour séparer les ecdystéroïdes, deux techniques chromatographiques ont été utilisées :

- chromatographie sur couche mince (T.L.C.)
- chromatographie en phase liquide à haute performance (H.P.L.C.).

##### a - Chromatographie sur couche mince

Ce type de chromatographie a été réalisé sur des plaques en verre recouverte de gel de silice (MERCK, 60 F<sub>254</sub>, épaisseur 0,25 mm avec indicateur fluorescent).

Les extraits asséchés ont été remis en solution dans de l'éthanol à 60 % pour être déposés sur la plaque. La séparation chromatographique a été effectuée dans le système de solvants chloroforme/éthanol 95 % (4V/1V). Après double migration, les gels ont été fractionnés en plusieurs zones en fonction de la migration des ecdystéroïdes de référence utilisés. La silice a ensuite été grattée et les ecdystéroïdes élués par l'éthanol.

##### b - Chromatographie en phase liquide à haute performance

Deux systèmes de solvants ont été utilisés pour séparer les produits en H.P.L.C. Les produits co-migrant en T.L.C. avec l'ecdysone, la 2-désoxyecdysone et la 20-hydroxyecdysone de référence sont chromatographiés dans un système isocratique de solvants méthanol/eau (V/V). En ce qui concerne les autres produits, moins polaires que l'ecdysone, ceux-ci ont été séparés en utilisant un gradient de 0 à 100 % de méthanol dans l'eau pendant 30 minutes (formeur de gradient WATERS Associates M 660, courbe IV).

Des fractions de 500 µl ont été collectées, puis soumises à des dosages par R.I.A. ou à des mesures de la radioactivité.

Pour ces deux techniques chromatographiques nous avons utilisé comme ecdystéroïdes de référence : l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone commerciales (SIMES, Milan, Italie), la 2-désoxyecdysone (don du laboratoire de Biologie Générale de Strasbourg), la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone (don

du Dr HORN, Csiro Melbourne - Australie). Ces substances de références ont été repérées par leur absorption en U.V. à 254 nm (WATERS Associates Spectrometre M 440).

### 5 - Dosage des ecdystéroïdes

Le dosage des ecdystéroïdes a été effectué par radioimmunos dosage par dialyse (R.I.A.) selon la technique mise au point par DE REGGI *et al.* (1975). La figure 1 en schématise le principe.

Cette technique, très reproductible, permet de doser de très faibles quantités d'ecdystéroïdes (de l'ordre de la picomole).

Les extraits, préparés selon la méthode décrite précédemment, ont été remis en solution dans 400 µl de tampon citrate 0,1 M ; pH 6,2. A 90 µl de cette solution, a été ajouté le même volume d'une solution d'antigène radioactif contenant 9000 cpm de [23, 24]<sup>3</sup>H ecdysone (activité spécifique 40 Ci/m mole) ; 150 µl du mélange obtenu ont été mis en dialyse contre 150 µl d'une solution d'anticorps anti-ecdysone diluée au 1/1000 (anticorps : lot D BL 2 ; don du Dr KOOLMAN, Marburg, R.F.A.).

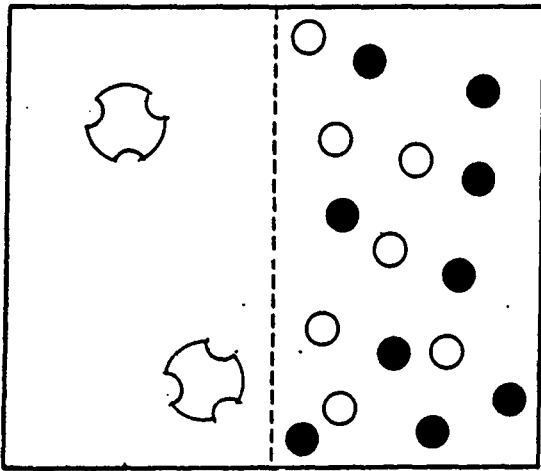
Nous donnons, figure 2, une représentation schématique du dialyseur utilisé.

La dialyse a été effectuée sous agitation, à 4°C, durant 24 heures. Pendant ce temps, l'hormone endogène éventuellement présente, va entrer en compétition avec le ligand radioactif pour les sites de reconnaissance de l'anticorps.

A l'arrêt de la dialyse, le contenu radioactif des deux chambres du dialyseur a été déterminé après comptage en scintillation liquide (compteur Intertechnique SL 4000) de 100 µl de solution. Le pourcentage d'antigène radioactif lié à l'anticorps a été comparé à celui obtenu après utilisation de concentrations connues d'ecdysone. Dans ces conditions, la concentration d'ecdysone requise pour obtenir 50 % d'inhibition de la liaison [23-24]<sup>3</sup>H ecdysone à l'anticorps, était de  $1,3 \cdot 10^{-8}$  M (cf figure 3).

D'après les études faites par KOOLMAN, nous savons que plusieurs ecdystéroïdes présentent des réactions de croisement avec l'ecdysone pour cet anticorps. Ceci indique que la technique de dosage utilisée quantifie, en fait, l'ensemble des différents ecdystéroïdes éventuellement contenus dans l'extrait. Des courbes d'inhibition de la liaison de l'antigène tritié à l'anticorps par la 20-hydroxyecdysone, l'ecdysone et la 2-désoxyecdysone ont été réalisées ; les concentrations requises pour déprimer de 50 % la liaison de l'antigène tritié à l'anticorps ont été respectivement de  $1,7 \cdot 10^{-8}$ ,  $1,3 \cdot 10^{-8}$  et  $5 \cdot 10^{-8}$  M ; ces courbes sont représentées sur la figure 3.

PRINCIPE du dosage RADIOIMMUNOLOGIQUE de l'ECDYSONE  
par dialyse à l'équilibre

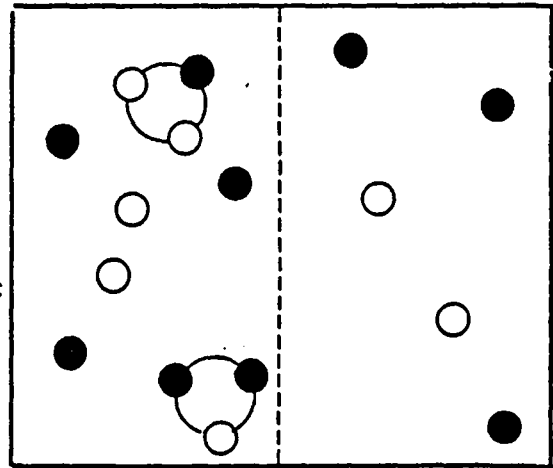


A

B

début de la DIALYSE

DIALYSE  
24 h, 4°C



A

B

fin de la DIALYSE

(état d'équilibre entre les  
chambres A et B)



ANTI ECDYSONE



23-24 <sup>3</sup>H ECDYSONE

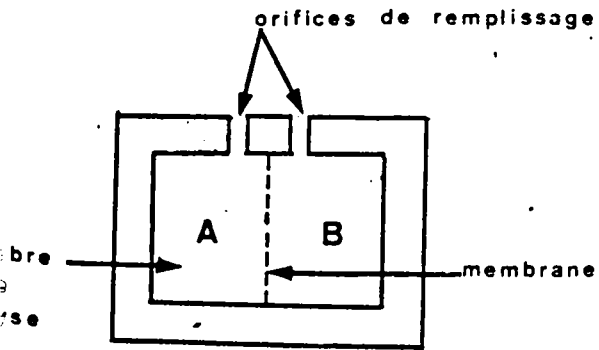
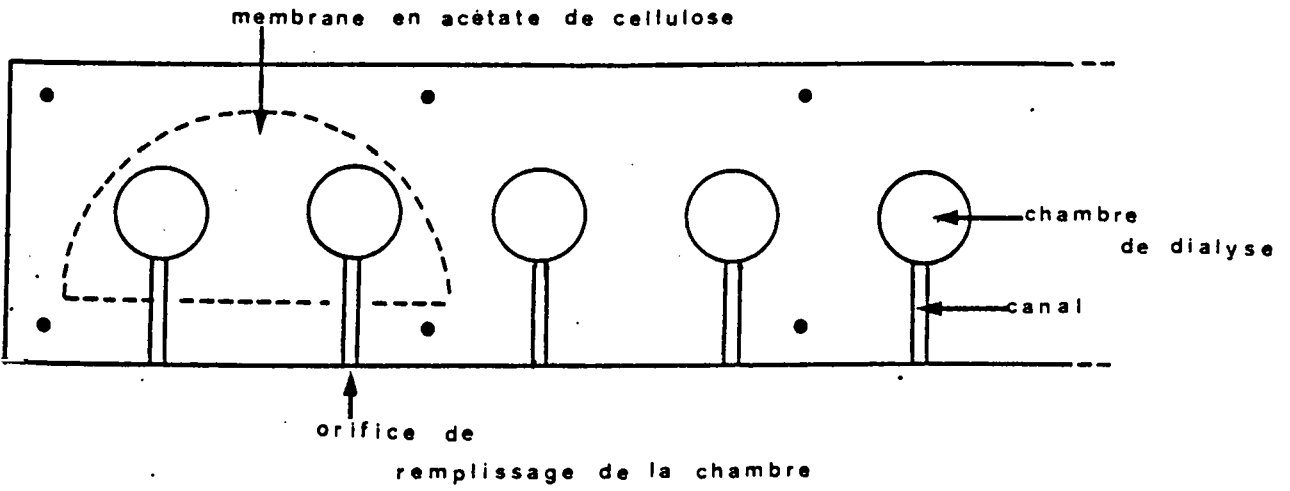


ECDYSONE de l'échantillon  
à doser

Figure ①

e (2)

APPAREIL à DIALYSE  
(vue de dessus)



coupe transversale  
d'un dialyseur

Figure 3 - Inhibition de la liaison de la [23-24]<sup>3</sup>H ecdysone avec l'anticorps par la 20-hydroxyecdysone, l'ecdysone et la 2-désoxyecdysone

Les concentrations de ces ecdystéroïdes pour inhiber de 50 % la liaison de l'antigène tritié à l'anticorps sont les suivantes :

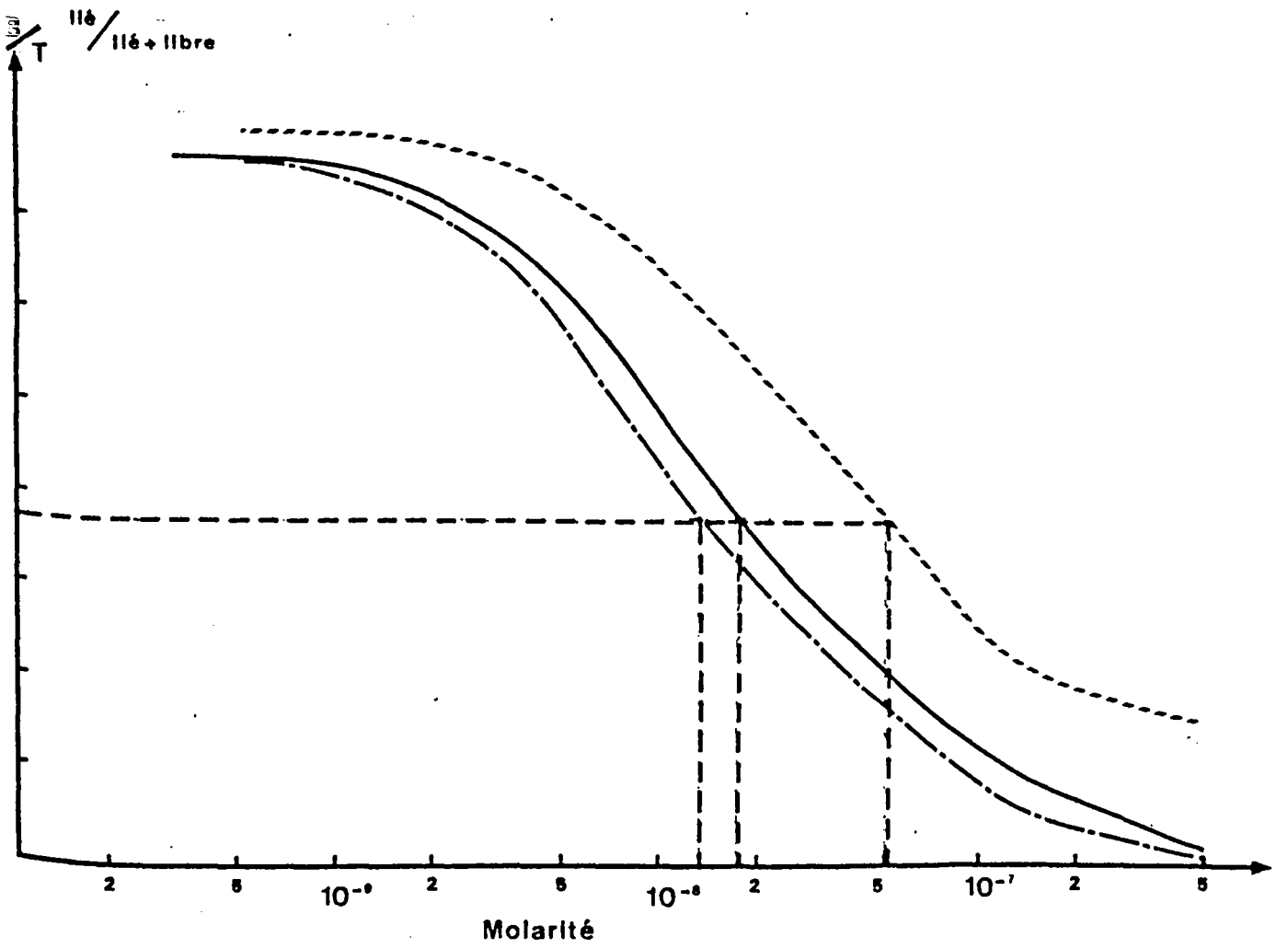
20-hydroxyecdysone	:	1,7 . 10 <sup>-8</sup> M
Ecdysone	:	1,3 . 10 <sup>-8</sup> M
2-désoxyecdysone	:	5 . 10 <sup>-8</sup> M

L'anticorps utilisé est dilué au 1/1000.

Ordonnée : pourcentage de liaison

Abscisse : molarité (concentration en ligand non radioactif dans la dialyse à l'équilibre)

————	20-hydroxyecdysone
- - - - -	Ecdysone
////	2-désoxyecdysone





Les réactions de croisement de la 20-hydroxyecdysone et de la 2-désoxyecdysone, exprimées en multiple des quantités d'ecdysone froide requises pour déprimer de 50 % la liaison de l'antigène tritié à l'anticorps sont donc les suivantes :

20-hydroxyecdysone : 1,5

2-désoxyecdysone : 4

#### 6 - Injection de précurseurs radioactifs de biosynthèse d'ecdysone

Nous avons utilisé deux précurseurs de biosynthèse d'ecdysone obtenus sous forme tritiée et aimablement mis à notre disposition par le Laboratoire de Biologie Générale de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. Il s'agit de :

a) la  $^3\text{H}_4$ -(23, 24)-3  $\beta$ , 14  $\alpha$ , 22 R, 25-tétrahydroxy-5  $\beta$ -cholest-7-ène-6-one ou 2-désoxyecdysone synthétisée par HETRU *et al.* (1983) et dont l'activité spécifique est de 108 Ci/mmole.

b) la  $^3\text{H}_4$ -(22, 23, 24, 25)-3  $\beta$ , 14  $\alpha$ -dihydroxy-5  $\beta$  cholest-7-ène-6-one ou 2, 22, 25 tridésoxyecdysone (kétodiol) synthétisée par HAAG *et al.* (sous presse).

Les deux précurseurs ont été purifiés par H.P.L.C., puis, après purification, ils ont été asséchés après addition d'une microgoutte de Tween 80 (MERCK). La reprise a été effectuée dans de l'eau de mer.

Chaque animal (deux femelles de diamètre ovocytaire 168  $\mu\text{m}$ , et deux autres de diamètre 233  $\mu\text{m}$ ) a reçu en une seule injection environ 70  $\mu\text{Ci}$  de kétodiol ou de 2-désoxyecdysone. Les animaux ont été sacrifiés 24 heures après l'injection et les ecdystéroïdes extraits selon le procédé précédemment décrit.

#### 7 - Technique d'acétylation

Cette technique a été utilisée dans le but de confirmer la nature des ecdystéroïdes radioactifs obtenus après injection des précurseurs radioactifs de l'ecdysone.

A cet effet, les ecdystéroïdes radioactifs co-éluant avec les substances de référence, après purification par H.P.L.C., ont été co-acétylés en présence d'ecdystéroïdes de référence. Après évaporation de l'extrait à tester, la co-acétylation a été réalisée dans un mélange de 50  $\mu\text{l}$  d'anhydride acétique et de 100  $\mu\text{l}$  de pyridine à température ambiante pendant 1 h 30. La réaction a été arrêtée par addition de 200  $\mu\text{l}$  de méthanol. Le mélange réactionnel a été ensuite asséché sous courant d'azote.

Les produits formés au cours de l'acétylation ont été repris dans des solvants appropriés puis séparés par H.P.L.C. en isocratique afin de comparer les différents acétates formés à partir des ecdystéroïdes à identifier à ceux des ecdystéroïdes de référence.

## II - TECHNIQUE DE CULTURE ORGANOTYPIQUE

La technique utilisée est celle de CHEN (1954). Les explants sont déposés sur des rondelles de papier à lentilles flottant sur le milieu de culture contenu dans un verre de montre. Ce dernier est placé dans une boîte de Pétri sur du coton hydrophile imbibé d'eau distillée stérile pour maintenir une atmosphère humide. Le tout est fermé par un couvercle afin d'éviter le dessèchement du milieu.

Le milieu de culture utilisé est celui de DURCHON et SCHALLER (1963) dépourvu de gélose (PORCHET, 1974).

Plusieurs types de cultures sont réalisés :

- incubation de prostomiums à forte activité hormonale en présence de 20-hydroxyecdysone puis associés à des parapodes provenant de mâles dont la spermatogenèse n'a pas dépassé le stade spermatogonies.
- associations parapodes-prostomiums traités pendant 12 jours (soit 6 incorporations) par la 20-hydroxyecdysone ou l'ecdysone.
- associations parapodes-prostomiums provenant de femelles de diamètre oocytaire inférieur à 90  $\mu\text{m}$ , ayant reçu des injections de 20-hydroxyecdysone.

Chaque série expérimentale est accompagnée par :

- un témoin parapode.
- un témoin association (prostomium + parapode).
- un témoin éthanol à 10 % puisque ecdysone et 20-hydroxyecdysone sont en solution dans l'éthanol à 10 %.

Les cultures sont maintenues à une température de 18°C.

## III - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE

### 1 - Microscopie photonique

Les pièces sont fixées dans le Bouin aqueux sans acide acétique. Après déshydratation, elles sont incluses dans la paraffine, coupées à 7  $\mu\text{m}$  puis colorées par le rouge nucléaire, picroindigocarmin.

## 2 - Microscopie électronique

Les pièces sont fixées 3 heures par le glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon monophosphate de sodium/biphosphate de sodium 0,4 M, pH 7,2, puis post fixées pendant 1 heure par le tétroxyde d'osmium à 1 %, dans le même tampon, et incluses dans l'araldite.

Les coupes, effectuées à l'ultramicrotome LKB sont contrastées à l'acétate d'uranyle à saturation dans l'alcool 50°, suivi par une "coloration" au citrate de plomb selon REYNOLDS (1963).

Les grilles sont observées au microscope électronique Siemens Elmiskop I A ou Jéol JEM 100 CX.

CHAPITRE I

RECHERCHE D'ECDYSTEROÏDES CHEZ

*Perinereis cultrifera* Grube

La première partie de ce chapitre est consacrée à la recherche d'ecdystéroïdes immunoréactifs au cours du cycle de développement de *Perinereis cultrifera* femelles.

Dans une seconde partie, nous avons cherché à préciser la nature des molécules immunoréactives détectées.

#### A - REPARTITION ET TAUX DES ECDYSTEROÏDES IMMUNOREACTIFS

Pour cette étude, nous avons utilisé 12 lots de 6 animaux chacun. Ces différents lots proviennent de 3 récoltes distinctes.

Pour l'ensemble des animaux, les diamètres ovocytaires s'étagent de 90µm à 260 µm, ce dernier correspond à la maturité sexuelle et précède l'épitoquie.

Pour chaque ver, nous avons d'abord isolé par section le prostomium, puis prélevé par ponction le contenu coelomique. Les éléments figurés de ce contenu coelomique (ovocytes et coelomocytes) ont été séparés du liquide coelomique selon la technique indiquée précédemment. Nous avons également préparé avec le reste du corps de l'animal un extrait, que nous appellerons par commodité, la fraction "muscles".

Prostomiums, ovocytes, coelomocytes, liquide coelomique et muscles ont été soumis séparément à une extraction des ecdystéroïdes par l'éthanol à 60 %; ceux-ci ont été dosés par R.I.A.

#### I - RESULTATS

Différents dosages, répartis au cours de trois années successives ont été effectuées (tableaux A, B, et C).

Les résultats montrent la présence de matériel immunoréactif chez *Perinereis cultrifera*, quel que soit le diamètre ovocyttaire considéré.

Les plus fortes valeurs ont été trouvées dans le compartiment ovocyttaire d'individus dont le diamètre ovocyttaire est de l'ordre de 130µm; ce taux d'ecdystéroïdes est nettement plus bas dans les ovocytes d'animaux âgés.

Quant au liquide coelomique, nous n'avons pas observé de grandes variations du taux global des ecdystéroïdes immunoréactifs au cours du cycle de développement des vers. Il faut cependant noter que la teneur maximale a été observée chez des animaux âgés, qui étaient proches de l'épitoquie.

En ce qui concerne les coelomocytes, le résultat des dosages effectués donne des taux qui fluctuent en "dents de scie". En outre, il semblerait que les coelomocytes d'animaux âgés renferment davantage de matériel immunoréactif.

DOSAGES RADIOIMMUNOLOGIQUES DES ECDYSTEROÏDES PRESENTS DANS LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS DU CORPS DE *PERINEREIS CULTRIFERA* AU COURS DE SON CYCLE DE DEVELOPPEMENT

Les tableaux A, B, C, correspondent chacun aux résultats des dosages effectués sur des animaux provenant de la même récolte.

Les résultats sont exprimés en picomoles équivalent d'ecdysone par gramme de poids frais, sauf pour les prostomiums où ils sont exprimés en picomoles par prostomium.

TABEAU A

Echantillon biologique	Diamètre ovocytaire en $\mu\text{m}$		
	90	130	168
Liquide coelomique	104	51	73
Ovocytes	453	173	86
Coelomocytes	331	121	280
Muscles	23	48	16
Prostomiums	0	2,1	0

TABEAU B

Echantillon biologique	Diamètre ovocytaire en $\mu\text{m}$		
	130	168	194
Liquide coelomique	54	57	29
Ovocytes	1186	50	30
Coelomocytes	11	67	28
Muscles	19	20	24
Prostomiums	2	< 0,5	< 0,5

TABEAU C

Echantillon biologique	Diamètre ovocytaire en $\mu\text{m}$					
	194	220	233	247	260	Epitoques
Liquide coelomique	68	97	60	143	195	18
Ovocytes	90	91	94	-	101	27
Coelomocytes	95	383	132	280	434	57
Muscles	23	44	31	60	35	14
Prostomiums	0	0	< 0,5	0	0	< 0,7

L'ensemble des résultats obtenus dans les différentes séries présente une certaine "hétérogénéité" lorsqu'il concerne des lots ne provenant pas de la même récolte mais constitués cependant d'animaux, théoriquement de même âge. Ceci peut s'expliquer par le fait que le diamètre ovocytaire ne semble pas être un critère absolu permettant de déterminer précisément l'âge de l'animal. Il nous fournit en quelque sorte un "âge apparent" qui peut ne pas être rigoureusement identique pour chacune des récoltes effectuées.

Il a paru nécessaire de regrouper les résultats en fonction de critères physiologiques établis selon DHAINAUT (1964 à 1972), et caractéristiques du développement de ces animaux.

Il est en effet possible de distinguer trois grandes étapes dans la vie de l'ovocyte (cf figure 4).

\* stade I au cours duquel s'effectuent les synthèses vitellines ou vitellogénèse (jusqu'à un diamètre ovocytaire de  $130\mu\text{m}$ ).

\* stade II compris entre  $130$  et  $220\mu\text{m}$  et qui correspond à la synthèse des mucopolysaccharides (alvéoles et granules corticaux) : il s'agit de la corticogénèse.

\* stade III qui correspond à la maturité génitale. Un profond remaniement s'opère au sein de l'ovocyte : les différents compartiments ovocytaires s'organisent en couches concentriques autour du noyau.

Par conséquent, dans le stade I, nous avons regroupé deux diamètres ovocytaires ( $90$  et  $130\mu\text{m}$ ), dans le stade II, les diamètres compris entre  $168$  et  $220\mu\text{m}$ ; et dans le stade III, les animaux dont le diamètre ovocytaire est supérieur à  $230\mu\text{m}$ .

Les résultats des moyennes obtenues pour les différents dosages effectués sont représentés sur la figure 5.

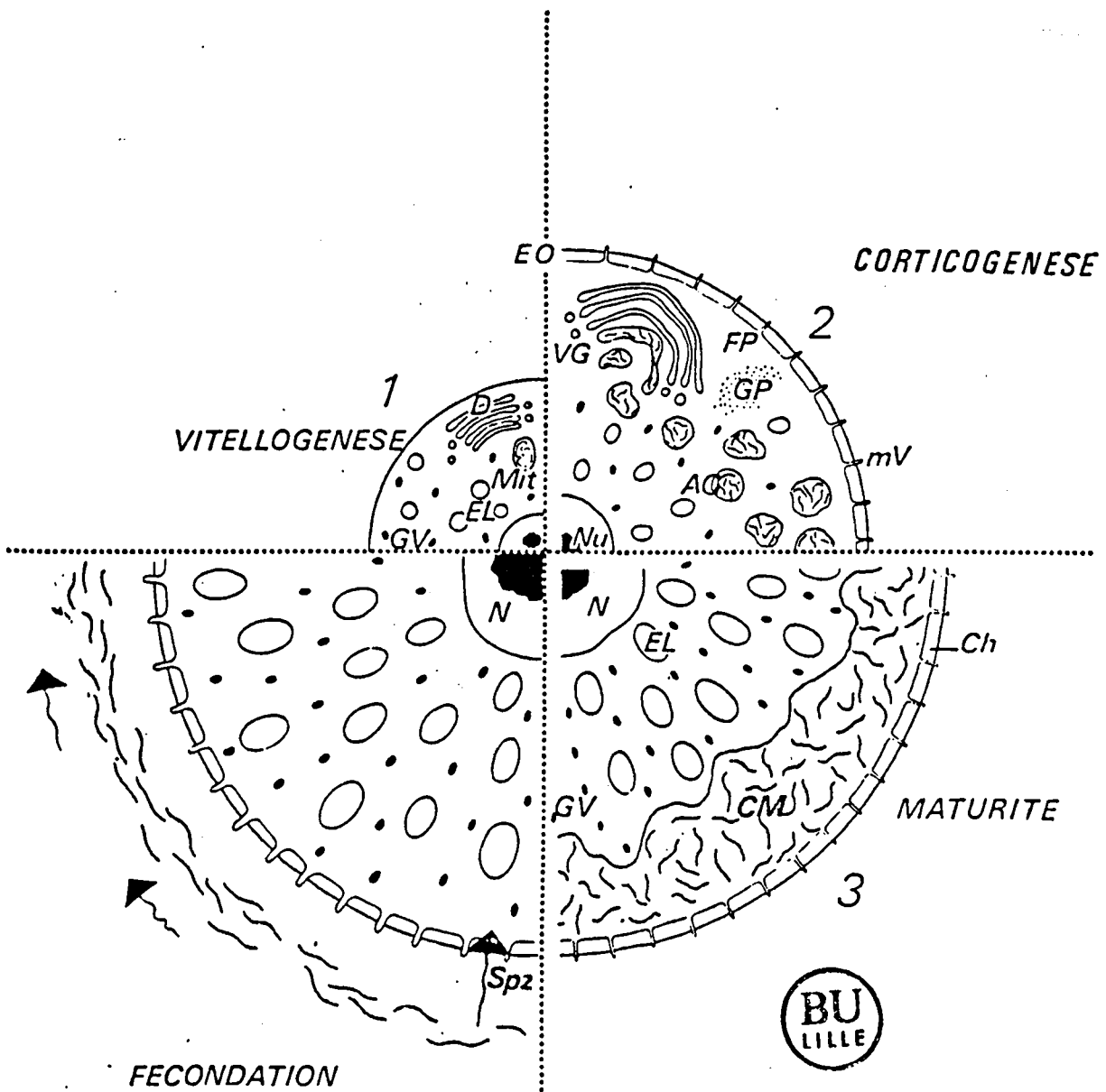
Cette représentation de nos résultats fait apparaître que des quantités assez importantes d'ecdystéroïdes sont présentes dans le compartiment ovocytaire du stade I; ce taux diminue nettement au stade II et reste du même ordre de grandeur jusqu'à la fin du stade III.

En ce qui concerne les coelomocytes, les valeurs subissent une variation inverse à celle observée pour les ovocytes, quoique d'amplitude plus faible. En effet, ce sont les coelomocytes du stade III qui sont les plus riches en ecdystéroïdes.

Quant au liquide coelomique, si les valeurs ne marquent pas de grandes fluctuations entre les stades I et II, au stade III, nous trouvons une teneur assez élevée en ecdystéroïdes, dont le taux est multiplié par deux, par rapport au stade précédent.

# OVOGENESE

## Différents Stades Cytologiques



A. C., alvéoles corticales; C. M., couche muqueuse; Ch, Chorion; D, dictyosome; E. L., enclave lipidique; E. O., enveloppe ovocytaire; F. P., face proximale du dictyosome; G. P., glycogène particulaire; G. V., Globule vitellin; Mit, Mitochondrie; mV, microvillosité; N, noyau; Nu, nucléole; Spz, spermatozoïde; V. G., vésicule golgienne.

Figure 4 - Représentation schématique des différentes étapes de l'ovogenèse chez *Perinereis cultrifera* (d'après PORCHET, 1974).

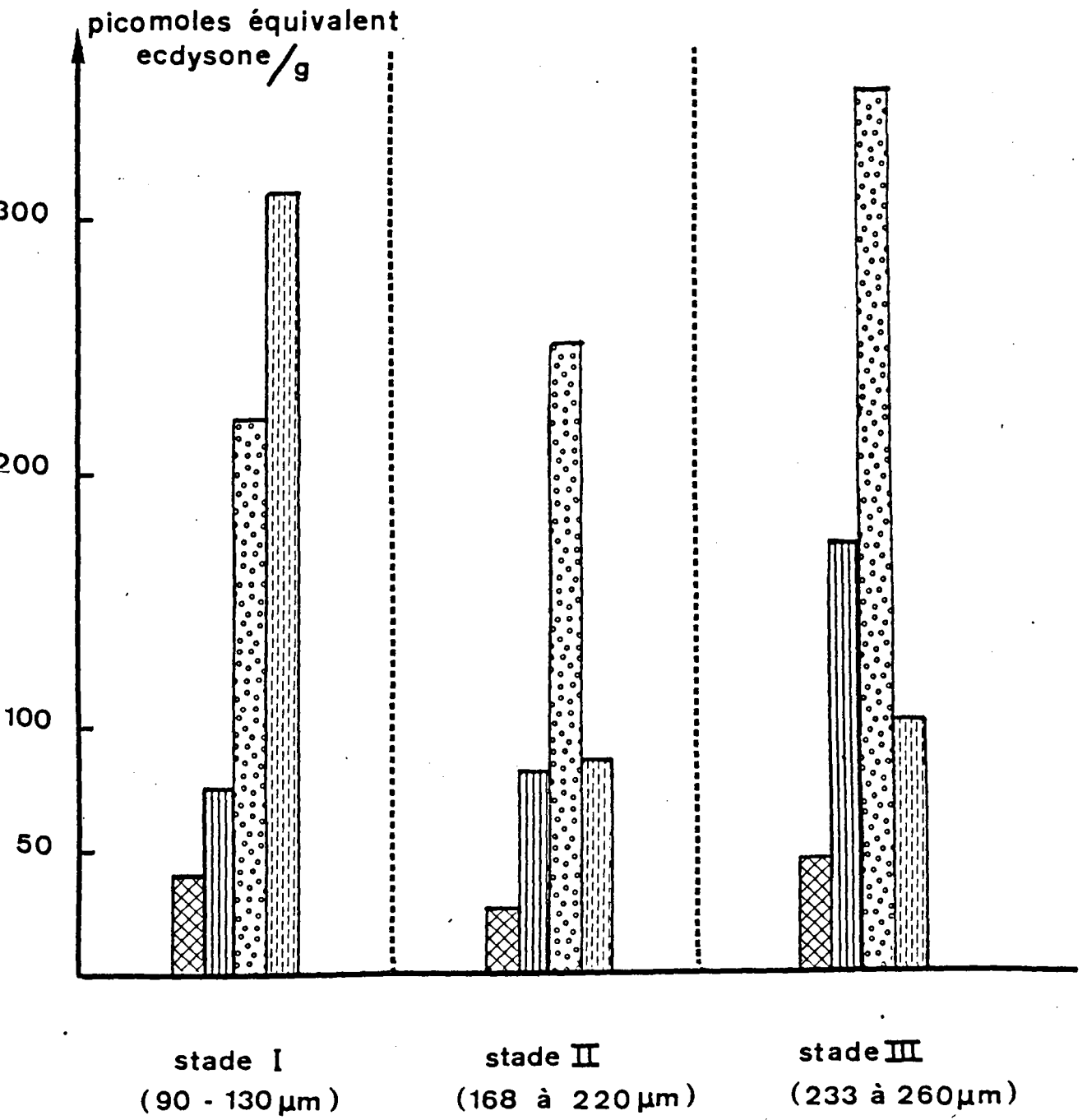


Figure 5 - Taux d'ecdystéroïdes dans les différents compartiments du corps de *Perinereis cultrifera* pendant les périodes de :

- vitellogenèse (Stade I),
  - corticogénèse (Stade II),
- et lors de la maturité génitale (Stade III).

Dosages radioimmunologiques. Les résultats sont exprimés en picomoles équivalent ecdysone par gramme de poids frais.

Le stade I regroupe 2 diamètres ovocytaires (90  $\mu\text{m}$  et 130  $\mu\text{m}$ ); le stade II comprend les individus dont le diamètre est compris entre 168  $\mu\text{m}$  et 220  $\mu\text{m}$  ; le stade III regroupe les animaux dont le diamètre est supérieur à 230  $\mu\text{m}$ .



muscles



liquide coelomique



coelomocytes



ovocytes

Dans les muscles, la quantité de matériel immunoréactif demeure toujours faible quel que soit le stade considéré.

Dans les prostomiums, les valeurs étaient le plus souvent non détectables ou à la limite de la sensibilité du R.I.A. utilisé.

## II - DISCUSSION

Cette première série de résultats, a confirmé la présence de matériel immunoréactif chez *Perinereis cultrifera*, cependant, s'il est indéniable que tout au long du cycle de développement de *Perinereis cultrifera* nous avons mis en évidence des ecdystéroïdes, les corrélations entre les taux de ces substances et les étapes du développement de ces animaux ne sont pas particulièrement nettes.

Chez les autres vers étudiés jusqu'alors, les variations dans le taux des ecdystéroïdes peuvent être corrélées à des phénomènes caractéristiques de leur cycle biologique.

Chez *Hirudo medicinalis*, le taux des substances immunoréactives au cours d'un cycle cuticulaire subit des variations importantes (Sauber 1983), les valeurs sont particulièrement élevées 24 à 48 heures avant la mue, plus faibles quand le rejet de la cuticule est en cours, et se maintiennent à des taux relativement bas pendant le reste de l'intermue.

Chez le parasite plathelminthe *Schistosoma mansoni*, Nirdé (1983) a mis en évidence un pic d'ecdysone chez le parasite de 11 jours ; ce pic est corrélatif de brusques variations des paramètres physiologiques et biologiques du parasite : c'est la période de transition entre la forme juvénile et les vers adultes. Au niveau des membranes, la technique de cryodécapage a révélé que ces dernières présentent des caractéristiques précises, associées à un phénomène assimilable à une mue (Torpier et al 1977). Un second pic d'ecdystéroïde a été relevé chez le parasite de 40 jours, autre période critique de son développement puisqu'elle est caractérisée par la maturation sexuelle et la ponte des oeufs.

Si nous comparons l'épitoquie chez *Perinereis cultrifera* à ces étapes particulières qui marquent le développement d'*Hirudo medicinalis* et de *Schistosoma mansoni* nous constatons que ce phénomène n'a pas les mêmes incidences au niveau du taux des ecdystéroïdes. Nous n'avons jamais constaté de modifications frappantes de la teneur en molécules immunoréactives au cours de la période qui précède l'épitoquie, pas même au niveau du compartiment musculaire qui subit cependant de profondes transformations durant cette période.

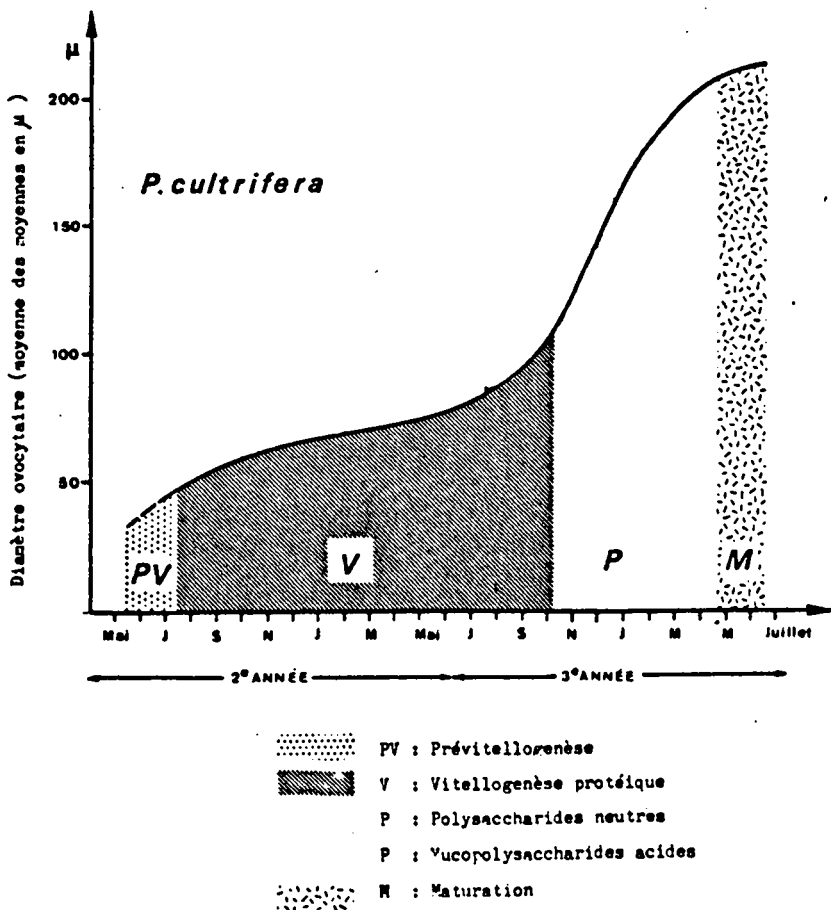


Figure 5 bis - Evolution cytologique des ovocytes de *Perinereis cultrifera* en fonction de leur courbe de croissance.

La durée de vie de *Perinereis cultrifera* est de 3 ans. La phase de grand accroissement ovocytaire commence à la fin de la 1ère année (d'après DHAINAUT, 1970 a).

Dans le compartiment ovocytaire, le pic d'ecdystéroïdes observé pour un diamètre de 130  $\mu\text{m}$  (période charnière dans le métabolisme ovocytaire) ne s'est pas reproduit avec autant de netteté au cours des autres dosages effectués. Cette disparité dans les résultats peut trouver une de ses explications dans le fait que les animaux sont récoltés périodiquement dans leur milieu naturel, contrairement à *Hirudo medicinalis* où les conditions d'élevage sont bien établies.

Toutefois il semble exister une relation entre la teneur en ecdystéroïdes du compartiment ovocytaire et l'activité hormonale du cerveau. Il apparaît qu'un taux élevé d'ecdystéroïdes correspond à une inhibition hormonale encore assez forte, tandis que des valeurs plus basses soient corrélatives d'une très faible activité hormonale.

Par ailleurs, la teneur en ecdystéroïdes de ce même compartiment semble liée à un autre paramètre, en l'occurrence la vitesse de croissance ovocytaire. *Perinereis cultrifera* est une espèce de Néréidien dont le cycle de vie est de 3 ans; les animaux éclos en Juin - Juillet, présentent à la fin de la première année un diamètre ovocytaire de 50 à 60  $\mu\text{m}$ , durant la seconde année, la croissance ovocytaire est très faible jusqu'à l'automne, mais présente à partir du mois d'Octobre un accroissement rapide jusqu'aux mois de Février - Mars de la troisième année (figure 5bis). Les ovocytes d'animaux jeunes, en période de croissance ralentie, renferment davantage d'ecdystéroïdes que les ovocytes en corticogénèse, période durant laquelle la croissance ovocytaire est extrêmement rapide.

Ce fait est à rapprocher des observations faites chez le crustacé *Carcinus maenas*, où un taux bas d'ecdystéroïdes est corrélé à la croissance des ovocytes (Andrieux, 1981). Par contre, chez *Bombyx mori* le taux d'ecdystéroïdes ovocytaires fluctue différemment durant le développement : très élevé dans les ovocytes mûrs, il est bas à la fin de la croissance ovocytaire et de nouveau élevé dans l'oeuf après la ponte ; Legay et al (1976) proposent un double rôle pour les ecdystéroïdes ovocytaires : stimulation de la croissance ovocytaire et influence morphogénétique sur l'ovocyte.

Les ecdystéroïdes ovocytaires, fréquemment présents chez les femelles adultes d'Insectes sont généralement synthétisés par les cellules folliculaires ; ceci est notamment le cas pour *Aedes atropalpus* (FUCHS et al., 1981), *Nauphoeta cinerea* (ZHU et al. 1983) et *Locusta migratoria* (LAGUEUX et al., 1977 ; GOLTZENE et al., 1978). Chez ce dernier, les cellules folliculaires entourant les ovocytes terminaux sont le siège d'une importante biosynthèse d'ecdystéroïdes ; cette synthèse a lieu à la fin de chaque cycle de maturation ovocytaire.

Chez les Néréidiens où les ovocytes, dépourvus de cellules folliculaires, flottent librement dans le liquide coelomique, pouvons-nous envisager une telle biosynthèse ?

Des incubations d'ovocytes pris à différents stades de leur évolution, et suivies de dosages radioimmunologiques, devraient pouvoir nous apporter des précisions.

### B - ANALYSE QUALITATIVE DES COMPOSES IMMUNOREACTIFS

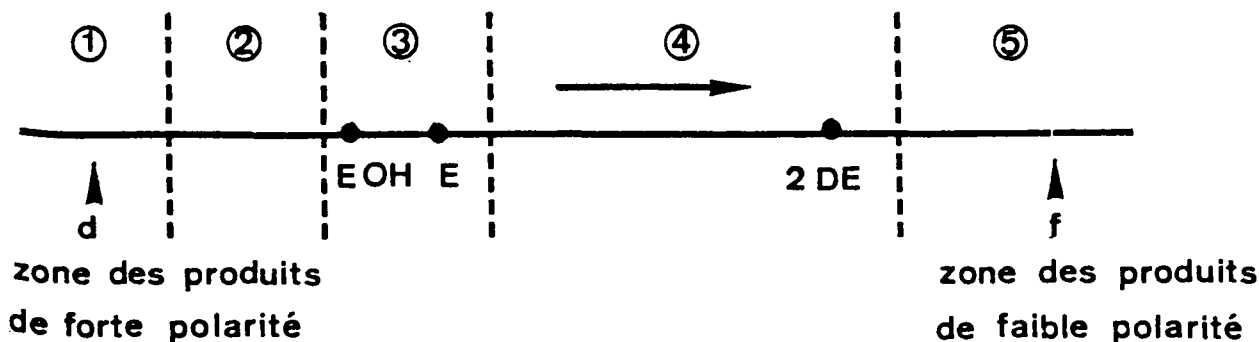
Au cours de cette seconde partie, nous avons cherché à préciser la nature des produits détectés par R.I.A. Cette étude a été faite en deux temps: par chromatographie sur couche mince, suivie de dosages radioimmunologiques, puis par purification en chromatographie en phase liquide à haute performance.

#### I - ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PLAQUE DE GEL DE SILICE (T.L.C.)

Nous sommes partis d'un lot de 6 animaux, de sexe femelle, et d'un diamètre ovocyttaire de l'ordre de 168  $\mu\text{m}$ . Pour chaque ver, nous avons prélevé le contenu coelomique, les différentes ponctions ont été rassemblées et extraites à l'éthanol à 60 %.

Après un premier dosage radioimmunologique (immunoréactivité totale) qui nous a donné une valeur de 60 picomoles par gramme de poids frais, l'extrait a été soumis à une T.L.C. (système de solvants : chloroforme/éthanol, 4V/1V). Après double migration, les produits ont été élués suivant 5 zones déterminées en fonction de leur polarité (cf figure 6, ci-dessous).

FIGURE (6)



d : dépôt ; f : front du solvant ; E-OH, E, 2DE : zone de migration de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence ; la flèche indique le sens de migration.

Après élution, les composés immunoréactifs ont été dosés par R.I.A. Le résultat des dosages est indiqué dans le tableau suivant.

Zone de la T.L.C.	Taux d'ecdystéroïdes en picomoles équivalent d'ecdysone par gramme de poids frais
1	13
2	10
3	34
4	ND
5	15

ND : non détectable par le R.I.A. utilisé.

Dans ce tableau, il apparaît une réponse positive :

- . dans les zones 1 et 2 qui correspondent aux zones de migration des produits très polaires (plus polaires que la 20-hydroxyecdysone),
- . dans la zone 3 qui correspond à la zone des produits co-migrant avec la 20-hydroxyecdysone et l'ecdysone de référence,
- . dans la zone 5 correspondant à la zone de migration des produits très peu polaires.

Afin de rechercher la présence éventuelle de conjugués d'ecdystéroïdes, les produits très polaires, élués à partir des zones 1 et 2 de la T.L.C. ont été soumis à une hydrolyse enzymatique par l'extrait semi-purifié d'hépatopancréas d'*Helix pomatia*. Les ecdystéroïdes, libérés après cette hydrolyse, ont été dosés par R.I.A. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Zone de la T.L.C.	Quantité d'ecdystéroïdes en picomoles par gramme de poids frais	
	AVANT hydrolyse	APRES hydrolyse
1	13	24
2	10	47

Ces résultats montrent que le taux de molécules immunoréactives est multiplié, à la suite de l'hydrolyse, par un facteur 2 pour la zone 1 et 5 pour la zone 2. Nous en concluons qu'une certaine partie des ecdystéroïdes présents chez *Perinereis cultrifera* sont en réalité des conjugués polaires d'ecdystéroïdes.

Nous avons également recherché l'existence de conjugués peu polaires en soumettant les produits élués à partir de la zone 5 de la T.L.C. à une hydrolyse chimique des esters par le carbonate de potassium en solution dans le méthanol. Le résultat de cette hydrolyse est représenté dans le tableau ci-dessous.

Zone de la T.L.C.	Quantité d'ecdystéroïdes en picomoles par gramme de poids frais	
	AVANT hydrolyse	APRES hydrolyse
5	15	53

Ce type de traitement a eu pour effet de multiplier la réponse immunoréactive par un facteur 4. Une autre partie des ecdystéroïdes présents chez *Perinereis cultrifera* sont des conjugués peu polaires d'ecdystéroïdes.

## II - ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (H.P.L.C.)

Les produits immunoréactifs détectés dans les zones 2, 3 et 5 après T.L.C. ont été purifiés en H.P.L.C. sur phase inverse (colonne RP 18 ; Merck ; longueur 250 mm ; diamètre interne 4 mm ; taille des grains 10 µm). L'élution a été effectuée par le système isocratique de solvants méthanol/eau ( V/ V ) ; débit 1 ml/mn. Des fractions de 500 µl ont été collectées puis traitées en vue du dosage radioimmunologique.

### 1) Purification des produits immunoréactifs de la zone 3 de la T.L.C.

Il s'agit des produits co-migrant en T.L.C. avec la 20-hydroxyecdysone et l'ecdysone de référence (voir figure 6). Après séparation par H.P.L.C., les fractions obtenues ont été asséchées puis dosées par R.I.A.



Les résultats des dosages, indiqués par la figure 7, montrent la présence de 2 composés immunoréactifs :

- . l'un a le même temps de rétention que celui de la 20-hydroxyecdysone de référence.
- . L'autre a un temps de rétention comparable à celui de l'ecdysone de référence.

2) Purification des ecdystéroïdes immunoréactifs de forte polarité

Il s'agit plus particulièrement des produits élués à partir de la zone 2 de la T.L.C et qui ont été avant H.P.L.C. soumis à une hydrolyse enzymatique par *Helix pomatia*.

Les résultats des dosages des produits immunoréactifs séparés par H.P.L.C. sont illustrés par la figure 8. Ils montrent l'existence d'un seul composé immunoréactif qui a été élué avec un temps de rétention identique à celui de la 20-hydroxyecdysone utilisée en référence.

3) Purification des produits immunoréactifs de faible polarité

Cette purification concerne les composés élués à partir de la zone 5 de la T.L.C. et qui ont subi une hydrolyse chimique par le carbonate de potassium en solution dans le méthanol.

La séparation chromatographique a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le résultat des dosages effectués sur les différentes fractions collectées est illustré figure 9. Ces résultats montrent l'existence d'un seul composé immunoréactif qui co-élue avec la 20-hydroxyecdysone de référence.

### III - DISCUSSION

Cette analyse qualitative quoique limitée et incomplète, nous apporte néanmoins un certain nombre de renseignements intéressants.

Pour la première fois, nous avons mis en évidence chez un Néréidien, deux ecdystéroïdes dont les comportements chromatographiques en T.L.C. et en H.P.L.C. sont identiques à ceux de la 20-hydroxyecdysone pour l'un, de l'ecdysone pour l'autre.

S'il y a de fortes présomptions pour que ces molécules immunoréactives soient effectivement la 20-hydroxyecdysone et l'ecdysone, nous ne pouvons pas l'affirmer : il est nécessaire d'en apporter la démonstration physico-chimique rigoureuse par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.

Figure 7 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse des produits co-migrant en chromatographie sur couche mince de silice avec la 20-hydroxyecdysone et l'ecdysone de référence (cf figure 6).

Elution par le mélange de solvants : méthanol/eau, 5V/5V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes : dosages radioimmunologiques des fractions collectées.

E-OH, E : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone et de l'ecdysone de référence.

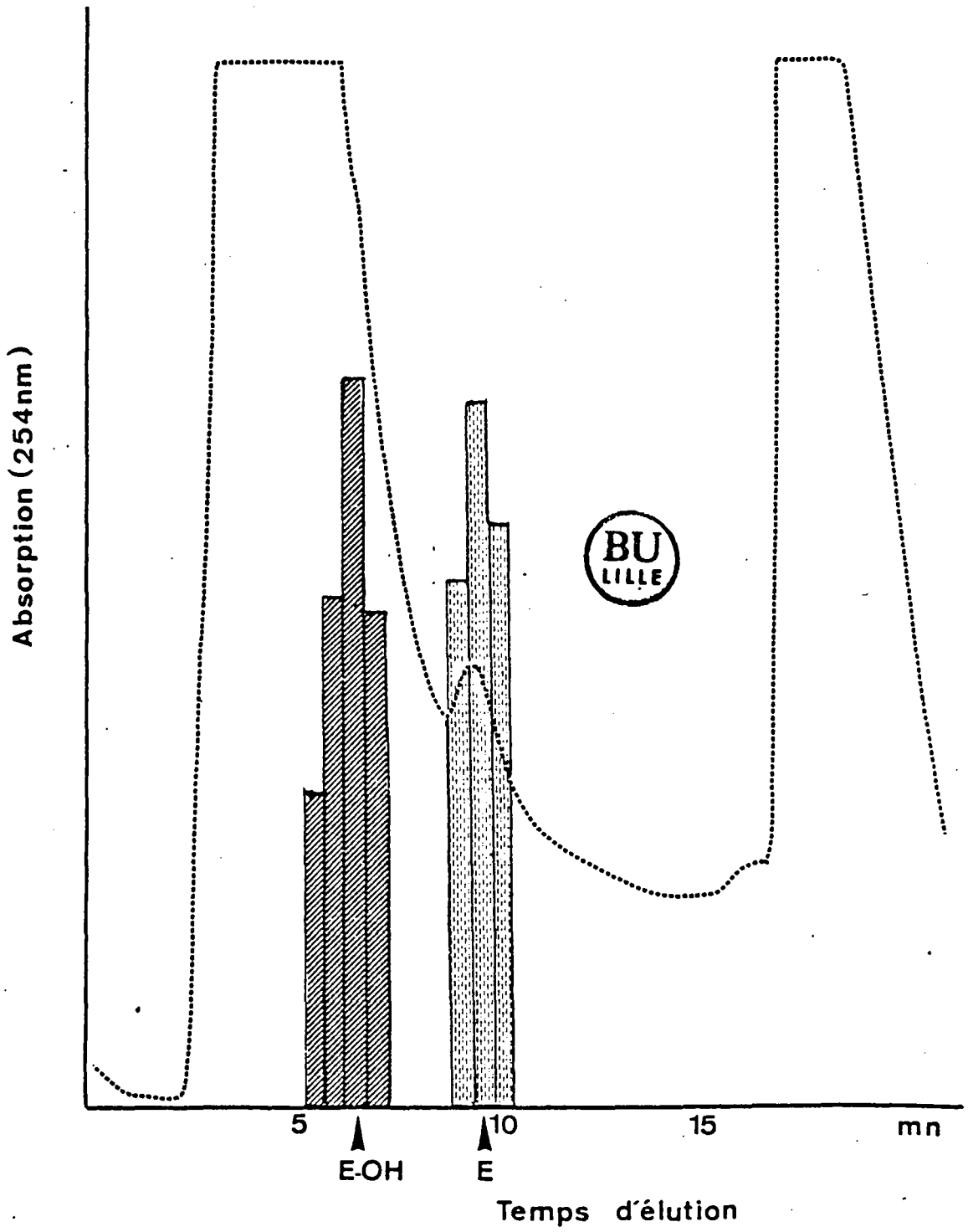


Figure 8 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse des produits élués à partir de la zone 2 de la TLC (cf figure 6), puis soumis à une hydrolyse enzymatique par l'extrait semi-purifié d'hépatopancréas d'*Helix pomatia*.

Elution par le mélange de solvants : méthanol/eau, 5V/5V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes : dosages radioimmunologiques des fractions collectées.

E-OH, E : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone et de l'ecdysone de référence.

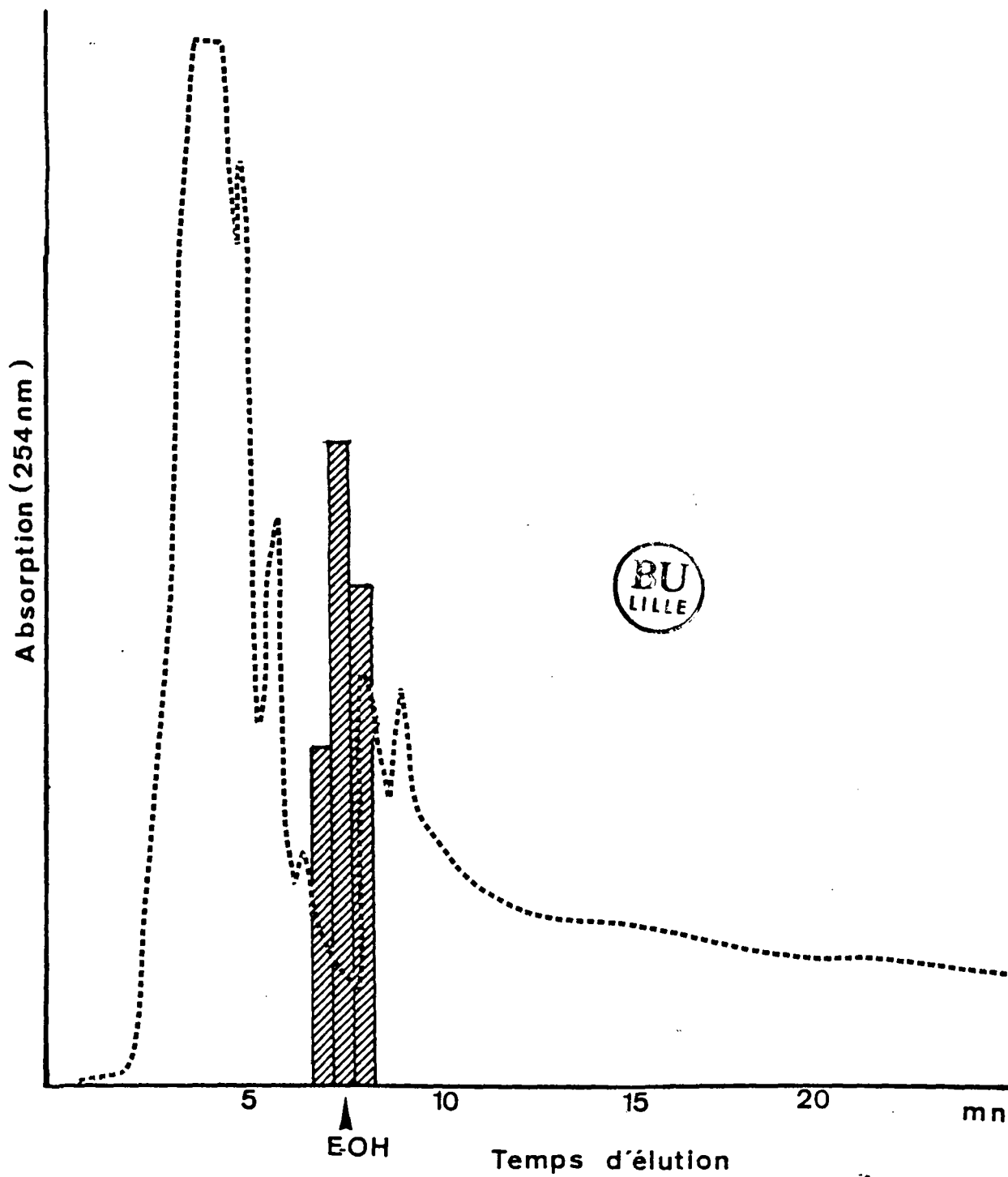
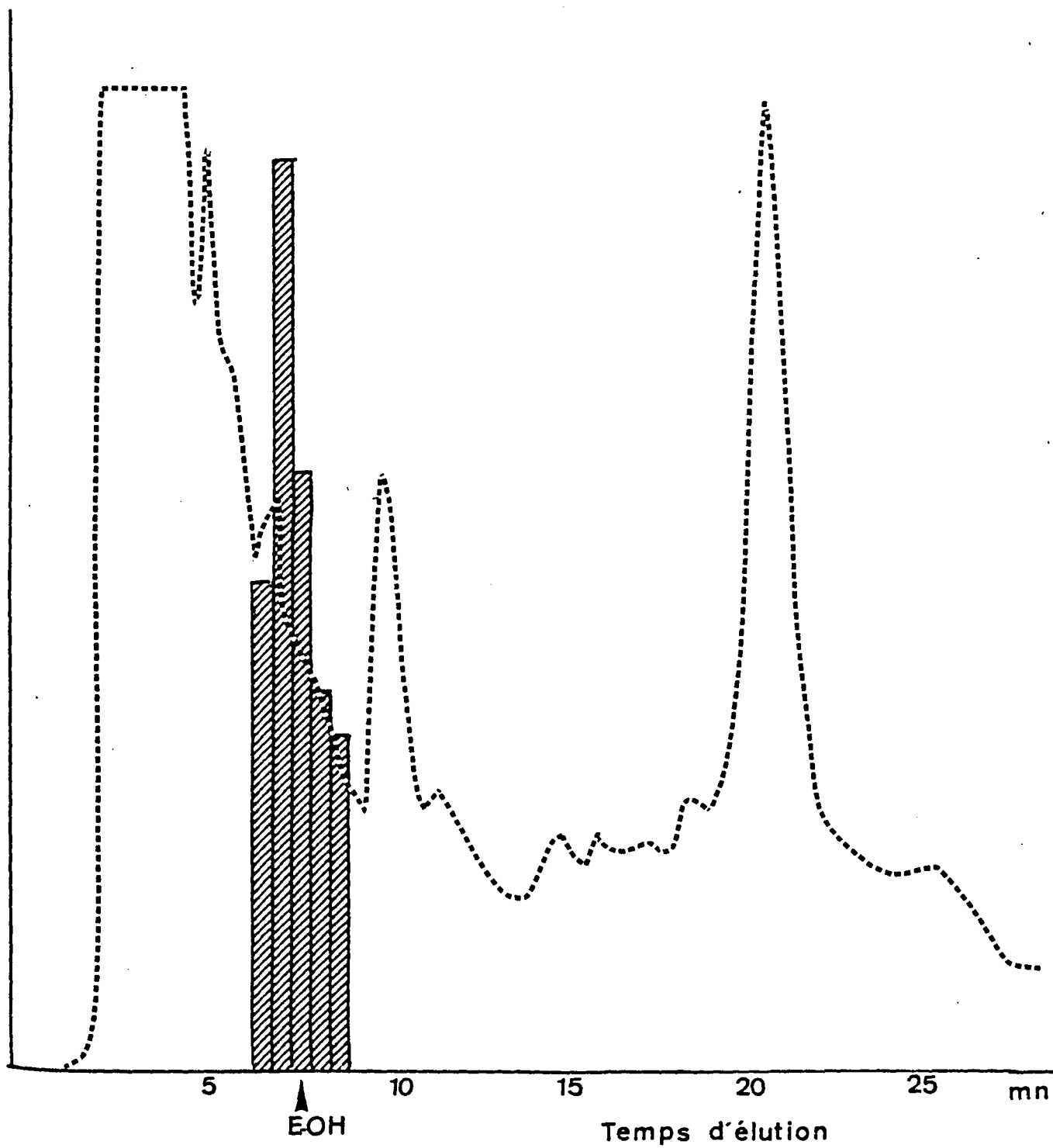


Figure 9 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse des produits élués à partir de la zone 5 de la TLC (cf figure 6) et soumis à une hydrolyse chimique par le carbonate de potassium.

Elution par le mélange de solvants : méthanol/eau, 5V/5V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes : dosages radioimmunologiques des fractions collectées.

E-OH, E : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone et de l'ecdysone de référence.

Absorption (254nm)



Ecdysone et 20-hydroxyecdysone ont d'ailleurs été à plusieurs reprises, identifiées chez d'autres Annélides : chez la Sangsue *Eryobdella octoculata* (SAUBER *et al.*, 1981), chez *Hirudo medicinalis*, la 20-hydroxyecdysone a été identifiée par spectrométrie de masse et chromatographie en phase gazeuse comme étant le principal ecdystéroïde (SAUBER *et al.*, 1983).

Chez le Plathelminthe *Schistosoma mansoni*, l'analyse combinée H.P.L.C.-R.I.A. a révélé la présence d'ecdysone et de 20-hydroxyecdysone. Il en est de même chez *Fasciola hepatica*, Plathelminthe hermaphrodite appartenant au même phylum que *Schistosoma mansoni*.

Le second point qui mérite d'être souligné concerne la présence de conjugués d'ecdystéroïdes. Ces produits immunoréactifs sont en partie :

- 1) soit des conjugués polaires de 20-hydroxyecdysone,
- 2) soit des conjugués peu polaires de 20-hydroxyecdysone.

L'hydrolyse enzymatique des premiers par l'extrait semi-purifié d'hépatopancreas d'*Helix pomatia*, tout comme le traitement chimique des seconds par une solution alcoolique de carbonate de potassium, libère de la 20-hydroxyecdysone.

La présence de conjugués d'ecdystéroïdes est fréquente dans de nombreux systèmes biologiques, les conjugués très polaires étant ceux que l'on rencontre le plus souvent. Chez plusieurs espèces d'Insectes, la majorité des ecdystéroïdes ovariens et embryonnaires sont présents sous cette forme ; il s'agit notamment de *Locusta migratoria* (SALL, 1982), *Schistocerca gregaria* (GANDE et MORGAN, 1979 ; DINAN et REES, 1981 a et b), de *Bombyx mori* (OHNISHI *et al.* 1977 a et b) et de *Galleria mellonella* (HSIAO et HSIAO, 1979).

La structure de certains d'entre eux est actuellement connue. Chez *Locusta migratoria*, les deux conjugués maternels prédominants ont été identifiés comme étant : l'ester 22-adénosine monophosphorique de la 2-désoxyecdysone et l'ester 22-N<sup>6</sup> (isopentenyl)-adénosine-monophosphorique d'ecdysone, tandis que le principal métabolite embryonnaire est le 3-phosphate de 3-épi-2 désoxyecdysone (TSOUPRAS *et al.*, 1982 a, b, 1983). Chez la femelle adulte de *Schistocerca gregaria*, les conjugués ovariens sont essentiellement des 22-phosphates d'ecdystéroïdes : le 22-phosphate d'ecdysone étant le conjugué prédominant (ISAAC *et al.*, 1982 b). Dans les oeufs, les 22-phosphates d'ecdysone, de 2-désoxyecdysone, de 20-hydroxyecdysone et de 2-désoxy-20-hydroxyecdysone, ont été identifiés (ISAAC *et al.*, 1983).

Des conjugués apolaires d'ecdystéroïdes ont également été mis en évidence, notamment chez les Tiques : *Ornithodoros moubata* (CONNAT, 1984)



et *Boophilus microplus* (WIGGLESWORTH et REES, 1983). Les auteurs indiquent que ces composés apolaires sont vraisemblablement des esters d'acides gras puisqu'un traitement chimique en milieu basique libère des ecdystéroïdes et des acides gras. Par ailleurs, des données préliminaires sur le métabolisme des ecdystéroïdes dans l'abdomen de la femelle de *Drosophila melanogaster* indiquent la présence de métabolites peu polaires comparables à ceux décrits précédemment (DÜBENDORFER et MAROY, 1983). Ces conjugués apolaires d'ecdystéroïdes peuvent aussi être produits *in vitro* par les tubes de Malpighi, les ovaires, les corps gras ; par ailleurs, ils sont aussi retrouvés dans les oeufs fraîchement pondus où ils peuvent représenter une forme de stockage.

Chez *Perinereis cultrifera*, la mise en évidence de conjugués d'ecdystéroïdes nous amène évidemment à nous poser le problème de la finalité de cette conjugaison : correspond-elle à une mise en réserve d'hormones destinées à exercer leur fonction ultérieurement, ou s'agit-il simplement d'une forme d'inactivation d'hormones précédant leur excrétion ? Nous pouvons aussi nous demander si :

- 1) la diminution du taux global d'ecdystéroïdes ovocytaires au cours de la maturation ne correspond pas en fait à une conjugaison de ceux-ci, ce qui équivaldrait alors à un stockage pour une utilisation future.
- 2) l'augmentation du taux de molécules immunoréactives dans les coelomocytes ne provient pas d'une libération de celles-ci à la suite d'une hydrolyse.

En complétant nos résultats par des analyses complémentaires, nous devrions parvenir à préciser le(s) rôle(s) que peuvent jouer ces molécules chez cet animal.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA CONVERSION, *IN VIVO*, DE DEUX PRECURSEURS DE BIOSYNTHESE D'ECDYSONE

LA 2, 22, 25 TRIDESOXYECDYSONE ET LA 2-DESOXYECDYSONE

La séparation par T.L.C. des ecdystéroïdes immunoréactifs, détectés chez *Perinereis cultrifera*, nous a permis de mettre en évidence l'existence de deux composés de polarité différente. L'un a le même comportement chromatographique que celui de la 20-hydroxyecdysone, l'autre a un comportement chromatographique identique à celui de l'ecdysone de référence.

Une immunoréactivité positive vis-à-vis d'un anticorps anti-ecdysone de produits co-migrant avec l'ecdysone ou la 20-hydroxyecdysone n'est évidemment pas une preuve de l'identité des molécules dosées.

Dans le but de préciser la nature des deux ecdystéroïdes immunoréactifs détectés et d'en connaître également les voies de biosynthèse, nous avons analysé les conversions, *in vivo*, de deux précurseurs radioactifs de biosynthèse d'ecdysone. Il s'agit de deux précurseurs intervenant dans la biosynthèse d'ecdysone dans le "modèle ovarien" de *Locusta* (cf revues de HOFFMANN *et al.*, 1980 et LAGUEUX *et al.*, 1984) :

- la 2,22,25-tridésoxyecdysone [ $^3\text{H}_4$  (22, 23, 24, 25)- 3  $\beta$ , 14  $\alpha$ -dihydroxy-5  $\beta$ -cholest-7-ène-6-one], activité spécifique 110 Ci/mmole synthétisée par HAAG *et al.*
- et la 2-désoxyecdysone [ $^3\text{H}_4$  (23, 24)-3  $\beta$ , 14  $\alpha$ , 22 R, 25-tétrahydroxy-5  $\beta$ -cholest-7-ène-6-one], activité spécifique 108 Ci/mmole, synthétisée par HETRU *et al.* (1983).

Notre approche expérimentale a été la suivante : nous avons injecté respectivement à des femelles de deux stades ovocytaires différents (168  $\mu\text{m}$  et 233  $\mu\text{m}$ ), soit 60  $\mu\text{Ci}$  de 2-désoxyecdysone, soit 75  $\mu\text{Ci}$  de 2, 22, 25 tridésoxyecdysone purifiées avant utilisation.

Les animaux ont été sacrifiés 24 heures après l'injection et les ecdystéroïdes ont été extraits à l'éthanol à 60 %.

#### A - CONVERSION *IN VIVO* DE LA 2, 22, 25 TRIDESOXYECDYSONE (kétodiol)

Les ecdystéroïdes extraits à partir des broyats complets ont été d'abord séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice, puis purifiés par H.P.L.C.

Après T.L.C. (système de solvants : chloroforme/éthanol, 4V/1V, double migration), les gels chromatographiques ont été analysés au lecteur Berthold (Silena, R.F.A.). Les radiochromatogrammes obtenus sont représentés figures 10 pour le stade 168  $\mu\text{m}$  et 11 pour le stade 233  $\mu\text{m}$ . Nous examinerons successivement ces deux stades.

Figure 10 - Radiochromatogramme des stéroïdes radioactifs présents dans un extrait complet de *Perinereis cultrifera* femelle de diamètre ovocytaire 168  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de kétodiol tritié.  
L'extrait a été chromatographié sur couche mince de silice dans le système de solvants : chloroforme/éthanol, 4V/1V, double migration.

E-OH, E, 2DE : zone de migration de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.  
d : dépôt ; f : front de migration ; la flèche indique le sens de la migration.

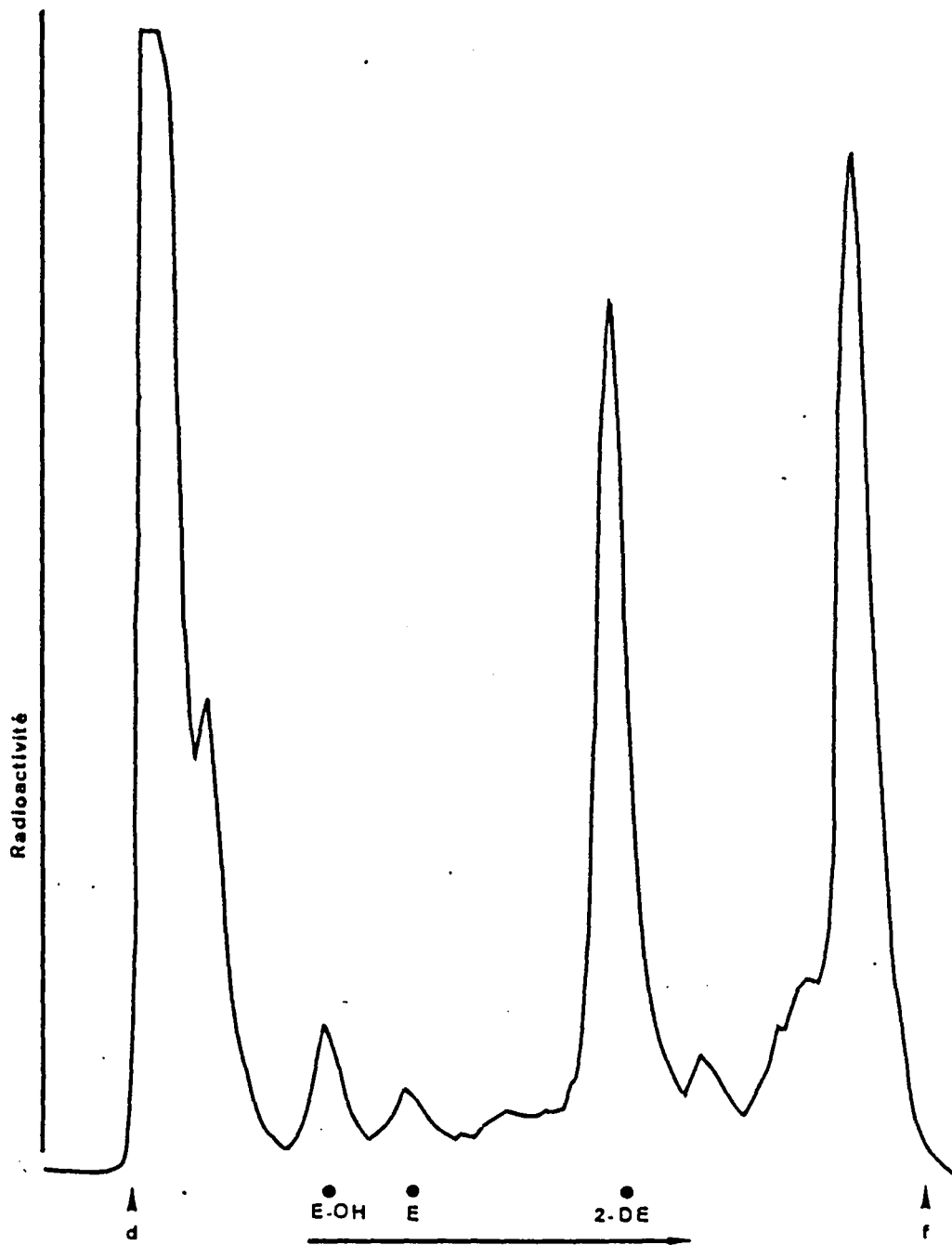
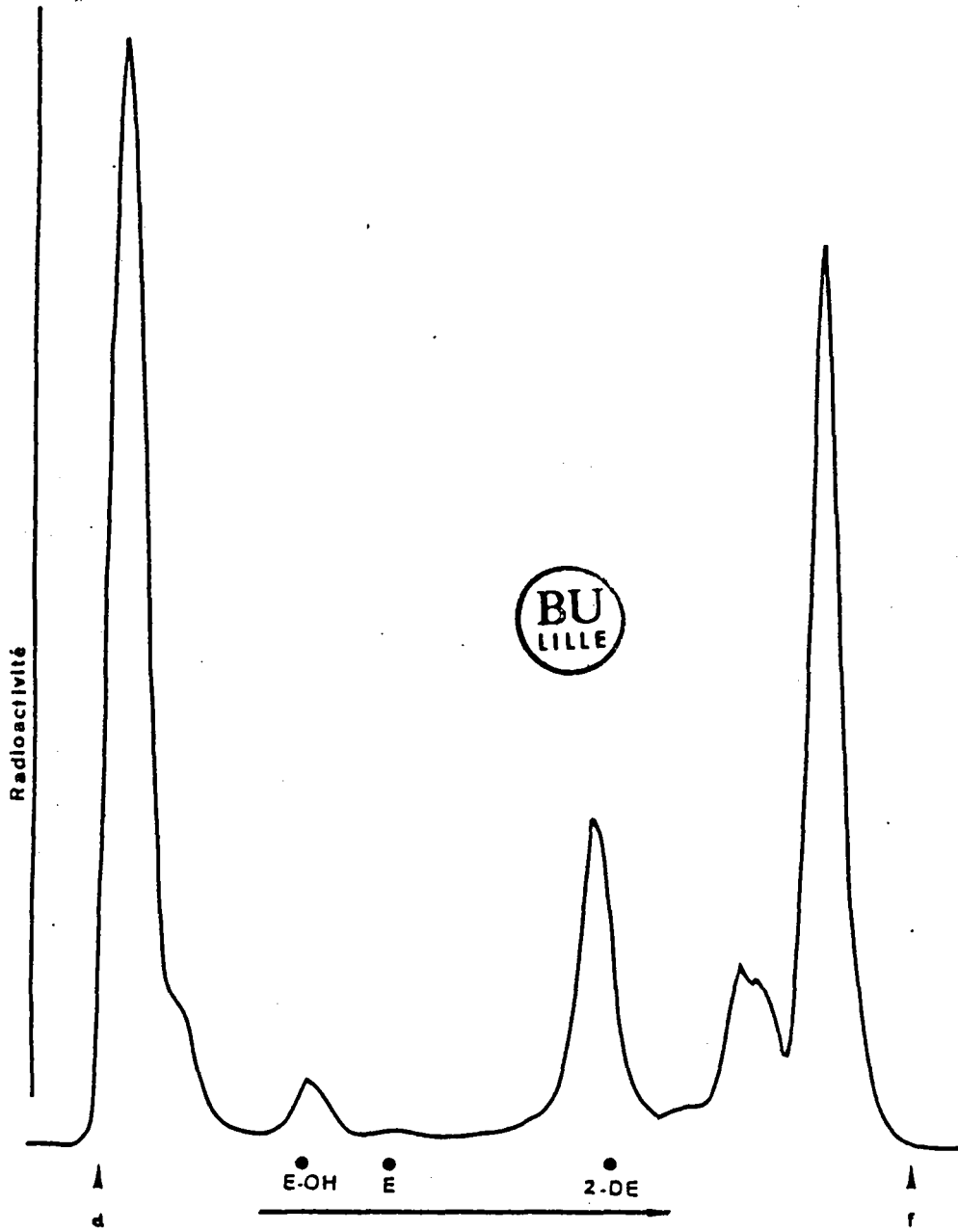


Figure 11 - Radiochromatogramme des stéroïdes radioactifs présents dans un extrait complet de *Perinereis cultrifera* femelle de diamètre ovocytaire 233  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de kétodiol tritié.

L'extrait a été chromatographié sur couche mince de silice dans le système de solvants : chloroforme/éthanol, 4V/1V, double migration.

E-OH, E, 2DE : zone de migration de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.  
d : dépôt ; f : front de migration ; la flèche indique le sens de la migration



I - STADE OVOCYTAIRE 168  $\mu$ m

Le radiochromatogramme (figure 10) obtenu après purification par T.L.C. montre une répartition de la radioactivité en cinq zones :

- 1 zone des produits très polaires ;
- 2 zone des produits co-migrant avec la 20-hydroxyecdysone de référence ;
- 3 zone des produits ayant un comportement chromatographique comparable à l'ecdysone ;
- 4 zone des produits co-migrant avec la 2-désoxyecdysone ;
- 5 zone des produits peu polaires.

Les composés radioactifs des différentes zones ont été élués de la silice à l'éthanol puis purifiés par H.P.L.C. (solvant : méthanol à 53 % dans l'eau). Des fractions de 500  $\mu$ l ont été collectées. De chaque fraction, nous avons prélevé une aliquote de 25  $\mu$ l qui a été utilisée pour quantifier la radioactivité.

Les chromatogrammes obtenus sont présentés par les figures 12 et 13.

1 - Purification des composés radioactifs co-migrant avec la 20-hydroxyecdysone et l'ecdysone (figure 12)

Il s'agit des produits élués à partir des zones 2 et 3 de la T.L.C.

Nous notons la présence de plusieurs pics de radioactivité :

- le premier pic est élué avec le même temps de rétention que la 20-hydroxyecdysone de référence.
- le second co-élué avec la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence.

2 - Purification des composés radioactifs peu polaires (figure 13)

Il s'agit des produits élués à partir des zones 4 et 5 de la T.L.C.

La purification a été réalisée en utilisant comme système de solvants un gradient de méthanol de 0 % à 100 % dans l'eau en 30 minutes, (formeur de gradient Waters Associates M 660, courbe IV).

Le chromatogramme montre cinq pics de radioactivité d'amplitude très inégale, l'un d'entre eux co-élué avec la 2-désoxyecdysone de référence, un autre avec la 2-22 didésoxyecdysone.



Figure 12 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse, des produits radioactifs co-migrant en TLC avec la 20-hydroxyecdysone et l'ecdysone de référence (cf figure 10), et provenant d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 168  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de kétodiol tritié.

Elution par le mélange de solvants : méthanol/eau, 5,3V/4,7V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE-20-OH, 2DE : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone, de la 2-désoxy-20 hydroxyecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.

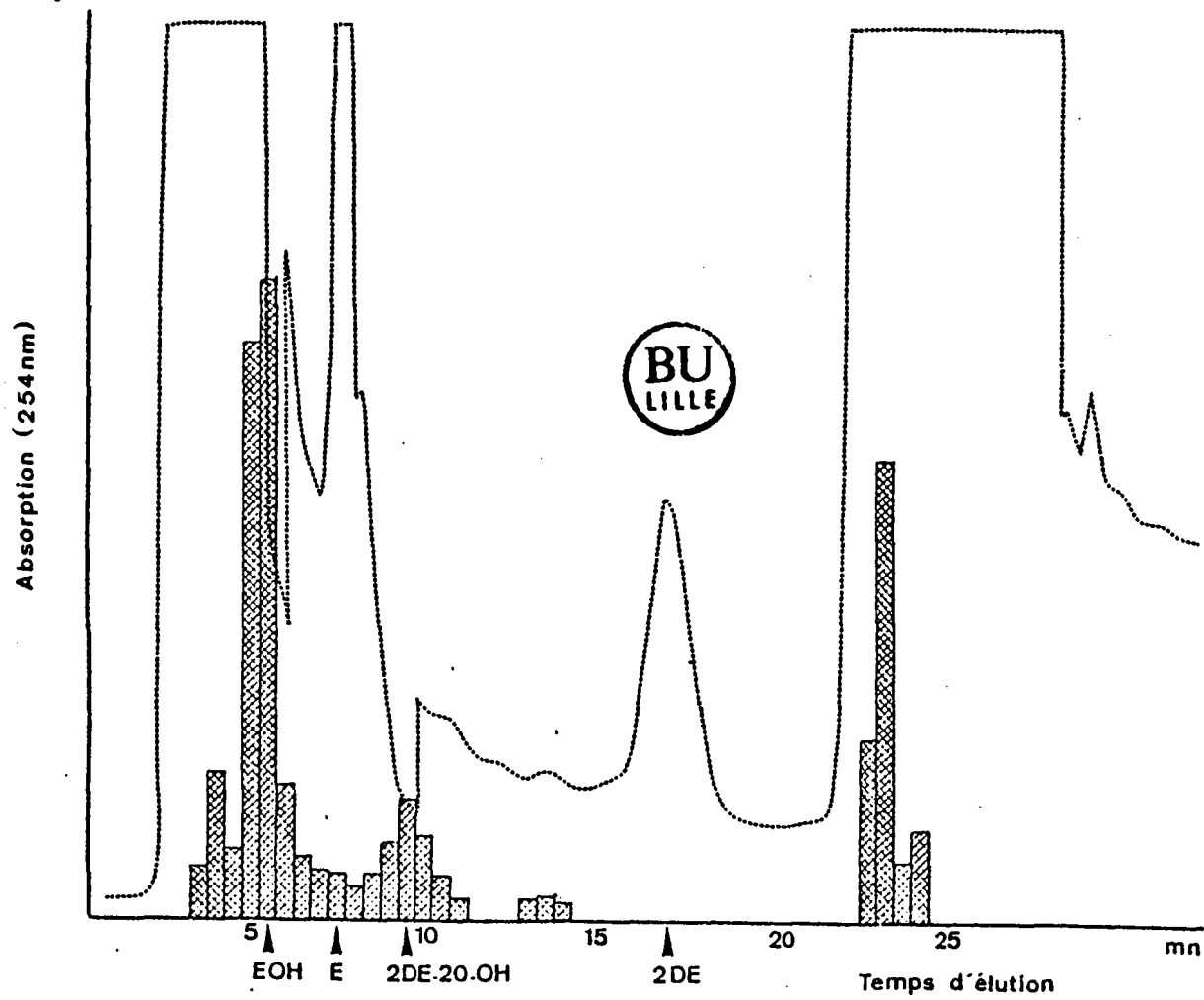
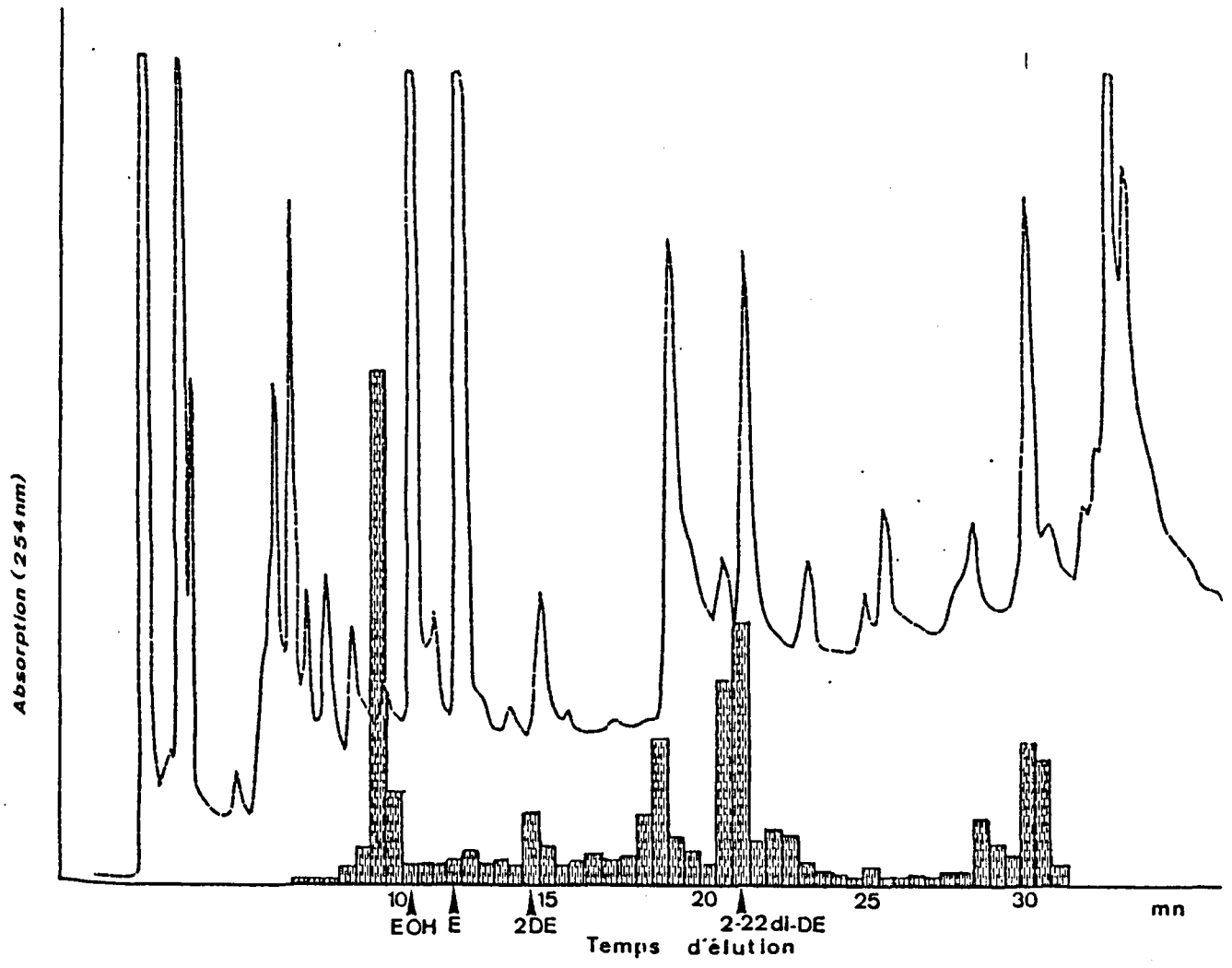


Figure 13 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse, des produits radioactifs des zones 4 et 5 de la T.L.C. (cf figure 10), provenant d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 168  $\mu\text{m}$ , soumise à une injection de kétodiol tritié.

Elution par un gradient de 0 à 100 % de méthanol dans l'eau.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE, 2-22 di-DE : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone, de la 2-22 didésoxyecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.



## II - STADE OVOCYTAIRE 233 $\mu$ m

Le radiochromatogramme (figure 11) obtenu après purification par T.L.C. montre quatre zones de radioactivité :

- 1 zone des produits très polaires ;
- 2 zone des produits co-migrant avec la 20-hydroxyecdysone de référence ;
- 3 zone des produits ayant le même comportement chromatographique que la 2-désoxyecdysone de référence.
- 4 zone des produits peu polaires.

Comme précédemment, les composés élués à partir des différentes zones ont été purifiés par H.P.L.C.

### 1 - Purification des produits radioactifs de forte polarité

Il s'agit des produits élués à partir de la zone 1 de la T.L.C. Après avoir été soumis à un traitement enzymatique par *Helix pomatia*, afin d'hydrolyser d'éventuels conjugués d'ecdystéroïdes, les ecdystéroïdes ont été extraits puis injectés en H.P.L.C. dans le système isocratique de solvants méthanol/eau, V/V. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 14.

Nous constatons que ces produits ne semblent pas être hydrolysables par *Helix pomatia* puisque près de 70 % de la radioactivité totale se retrouve dans les fractions très polaires.

### 2 - Purification des produits radioactifs co-migrant avec la 20-hydroxyecdysone

Il s'agit des produits élués à partir de la zone 2 de la T.L.C. Après élution à l'éthanol à 95 %, ils ont été soumis à une purification par H.P.L.C. (solvant : méthanol à 53 % dans l'eau).

Le chromatogramme correspondant à cette injection est représenté sur la figure 15.

Nous remarquons la présence d'un pic très important de radioactivité. Celui-ci correspond à un composé ayant un comportement identique en H.P.L.C. à celui de la 20-hydroxyecdysone de référence.

Un second composé co-élue avec la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence.

### 3 - Purification des produits radioactifs peu polaires

Il s'agit des produits élués à partir des zones 3 et 4 de la T.L.C. Après élution à l'éthanol à 95 %, ils ont été séparés par un gradient de méthanol de 0 à 100 % dans l'eau en 30 minutes (formeur de gradient Waters Associates M 660, Courbe IV).

Figure 14 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse des produits libérés par l'hydrolyse enzymatique des composés de la zone 1 de la T.L.C. (cf figure 11). Ceux-ci proviennent d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 233  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de kétodiol tritié.

Elution par le mélange de solvants : méthanol/eau, V/V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.

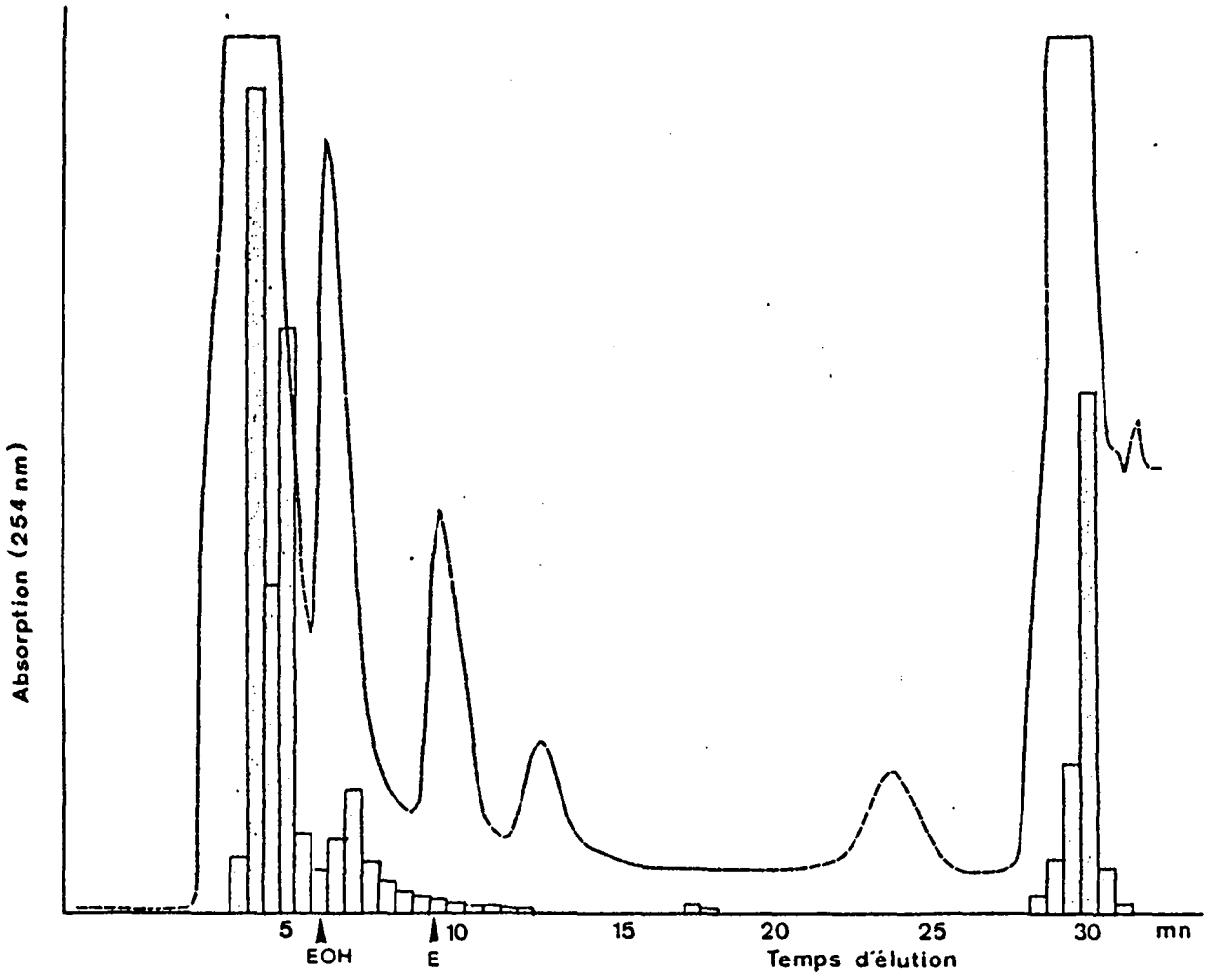


Figure 15 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse, des produits radioactifs co-migrant en TLC avec la 20-hydroxyecdysone et l'ecdysone de référence (cf figure 11), et provenant d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 233  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de kétodiol tritié.

Elution par le mélange de solvants : méthanol/eau, 5,3V/4,7V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE-20-OH, 2DE : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone, de la 2-désoxy-20 hydroxyecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.



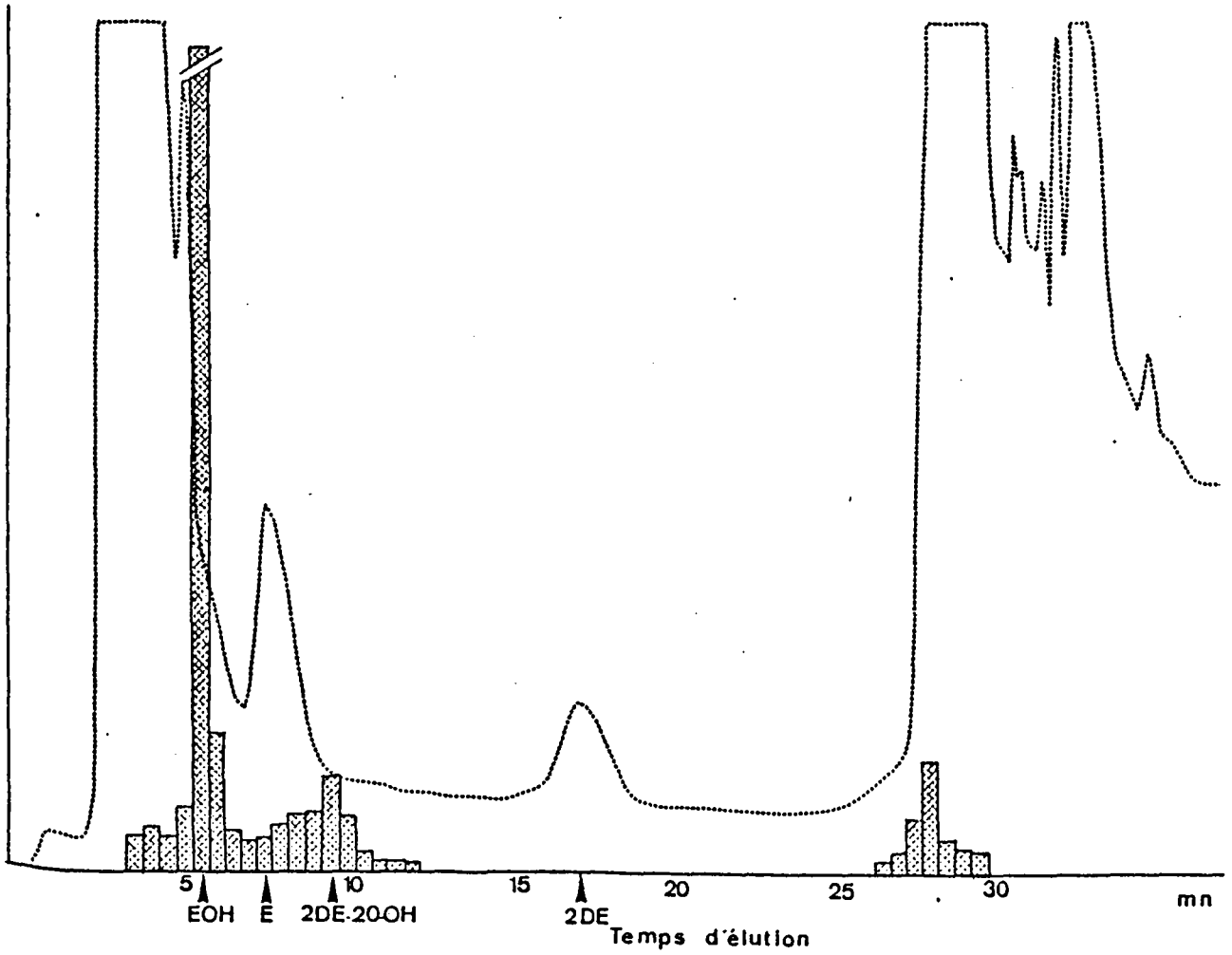
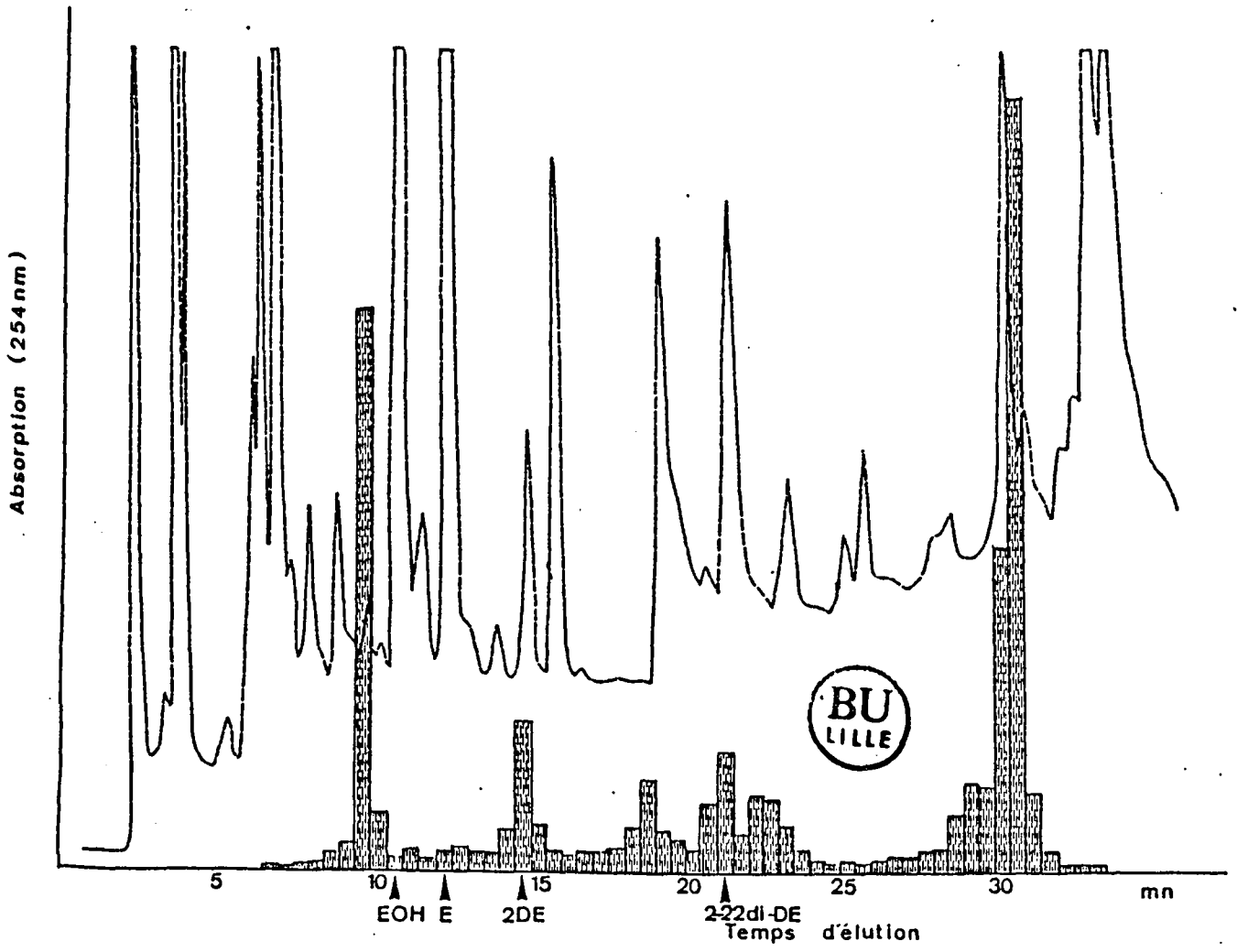


Figure 16 -- Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse, des produits radioactifs des zones 3 et 4 de la T.L.C. (cf figure 11), provenant d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 233  $\mu$ m, soumise à une injection de kétodiol tritié.

Elution par un gradient de 0 à 100 % de méthanol dans l'eau.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE, 2-22-di-DE : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone, de la 2-22-didésoxyecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence



Le chromatogramme (figure 16) montre cinq composés radioactifs, deux d'entre eux co-éluent avec des substances de référence connues : il s'agit notamment de la 2-désoxyecdysone et de la 2-22 didésoxyecdysone.

## B - CONVERSION, IN VIVO, DE LA 2-DESOXYECDYSONE

Notre démarche méthodologique a été la même que pour la 2, 22, 25 tridésoxyecdysone.

Les ecdystéroïdes extraits à partir des broyats complets ont été d'abord séparés par T.L.C., puis purifiés par H.P.L.C.

Après T.L.C. (système de solvants : chloroforme/éthanol, 4V/1V, double migration), les gels chromatographiques ont été analysés au lecteur Berthold. Les radiochromatogrammes obtenus à partir des injections aux stades 168  $\mu\text{m}$  et 233  $\mu\text{m}$  sont représentés respectivement sur les figures 17 et 18.

Nous examinerons successivement chacun de ces deux stades.

### I - STADE OVOCYTAIRE 168 $\mu\text{m}$

Le radiochromatogramme représenté sur la figure 17 montre une répartition de la radioactivité suivant quatre zones :

- 1 zone des produits très polaires.
- 2 zone des produits co-migrant avec la 20-hydroxyecdysone de référence.
- 3 zone de la 2-désoxyecdysone.
- 4 zone des produits peu polaires.

Après avoir été éluées, les différentes zones ont ensuite été purifiées par H.P.L.C.

#### 1 - Purification des produits radioactifs des zones 2 et 3

Il s'agit des composés qui co-migrent avec la 20-hydroxyecdysone et la 2-désoxyecdysone de référence. Après élution à l'éthanol à 95 %, ils ont été injectés en H.P.L.C. dans le système isocratique de solvants méthanol/eau, V/V. Le chromatogramme correspondant est représenté sur la figure 19.

La radioactivité se répartit suivant quatre pics dont deux sont de faible amplitude ; cependant, aucun d'entre eux ne semble co-éluer avec des substances de référence connues.

Figure 17 - Radiochromatogramme des stéroïdes radioactifs présents dans un extrait complet de *Perinereis cultrifera* femelle de diamètre ovocytaire 168  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de 2-désoxyecdysone tritiée. L'extrait a été chromatographié sur couche mince de silice dans le système de solvants chloroforme/éthanol, 4V/1V, double migration.

E-OH, E, 2DE : zone de migration de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.  
d : dépôt ; f : front de migration ; la flèche indique le sens de la migration.

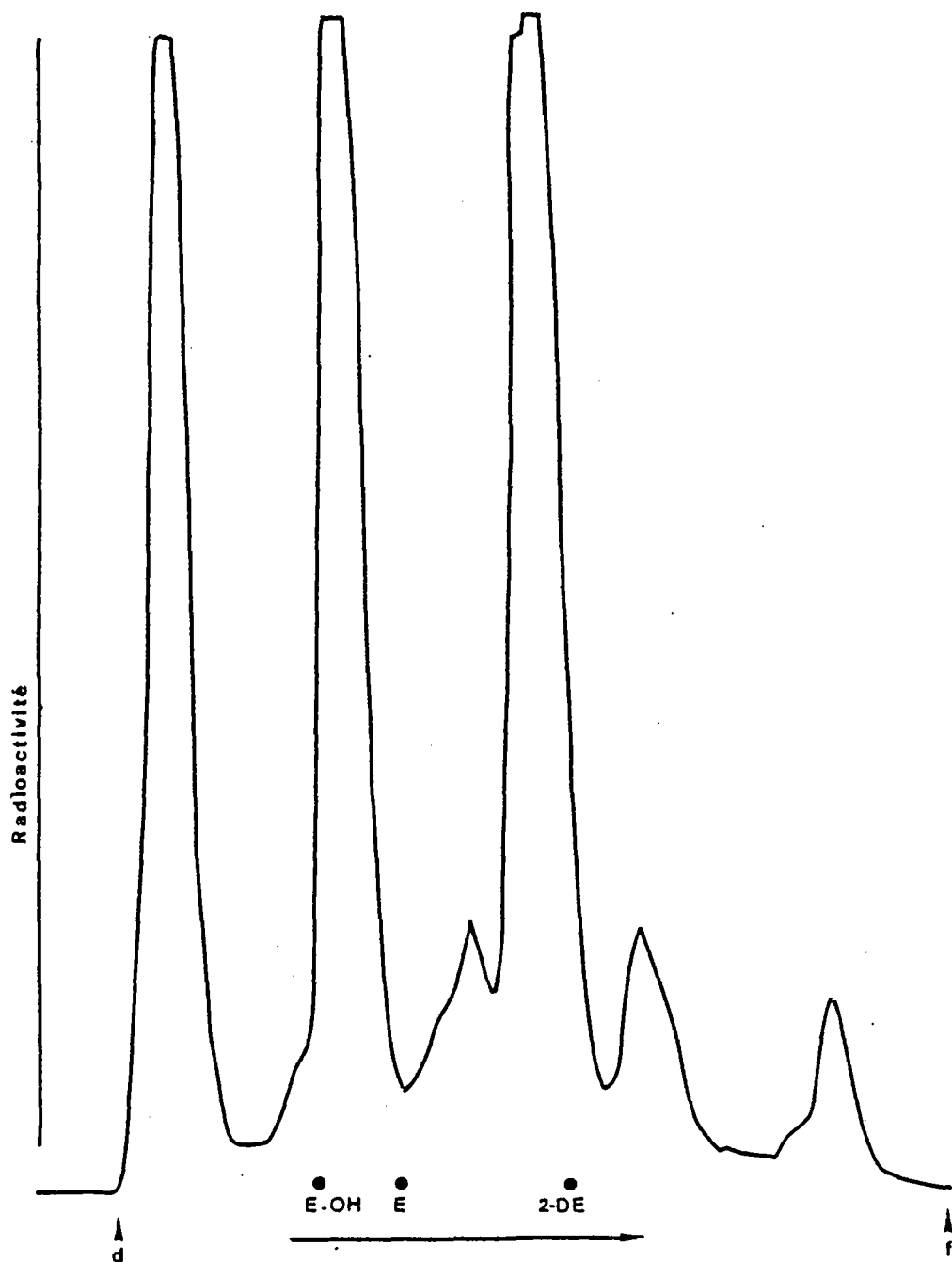


Figure 18 - Radiochromatogramme des stéroïdes radioactifs présents dans un extrait de *Perinereis cultrifera* femelle de diamètre ovocytaire 233  $\mu$ m soumise à une injection de 2-désoxyecdysone tritiée.

L'extrait a été chromatographié sur couche mince de silice, dans le système de solvants chloroforme/éthanol, 4V/1V, double migration.

E-OH, E, 2DE : zone de migration de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.

d : dépôt ; f : front de migration ; la flèche indique le sens de la migration.

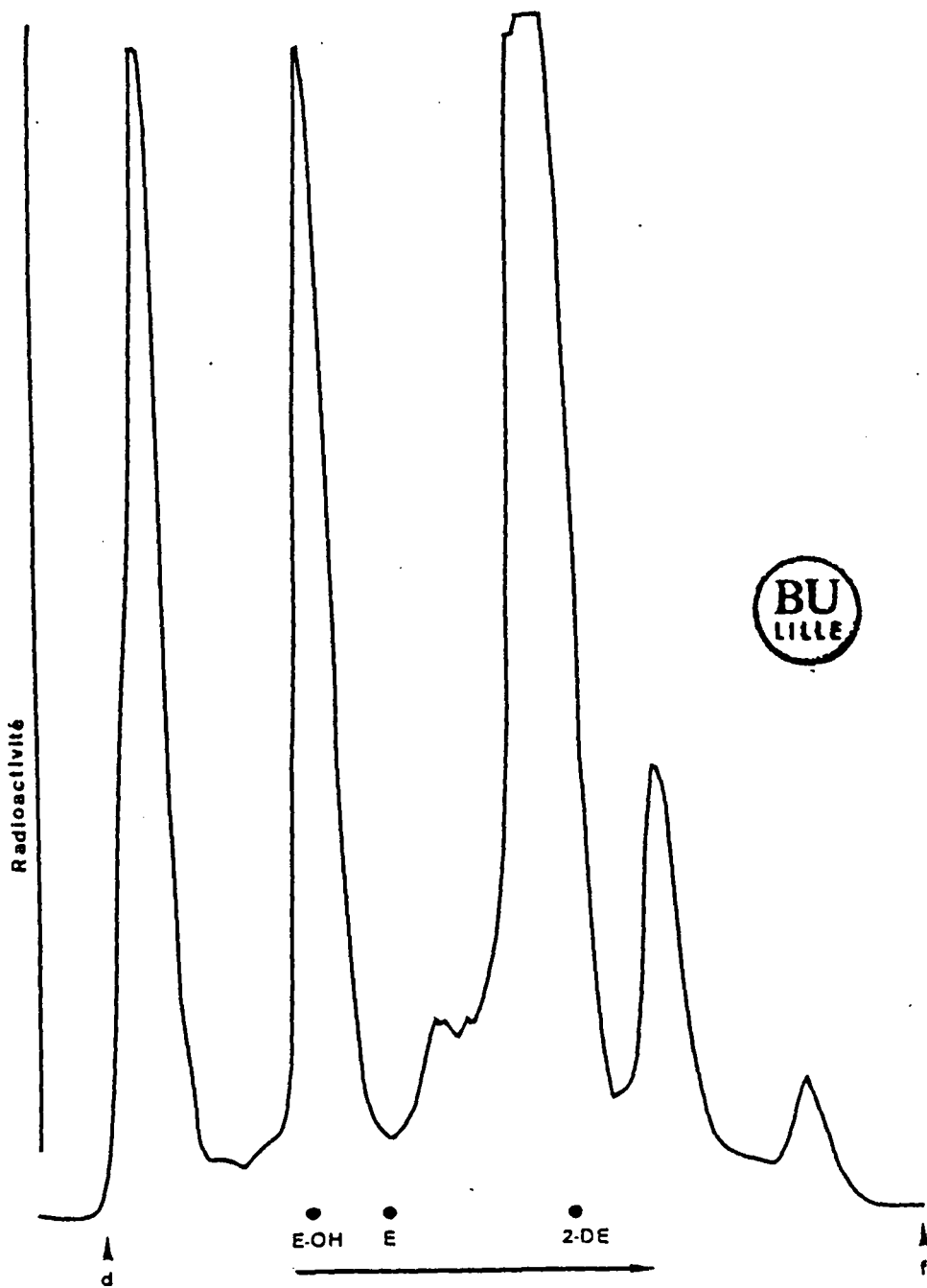




Figure 19 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse, des produits radioactifs des zones 2 et 3 de la T.L.C. (cf figure 17), et provenant d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 168  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de 2-désoxyecdysone tritiée.

Elution par le mélange de solvants méthanol/eau, V/V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone et de l'ecdysone de référence.

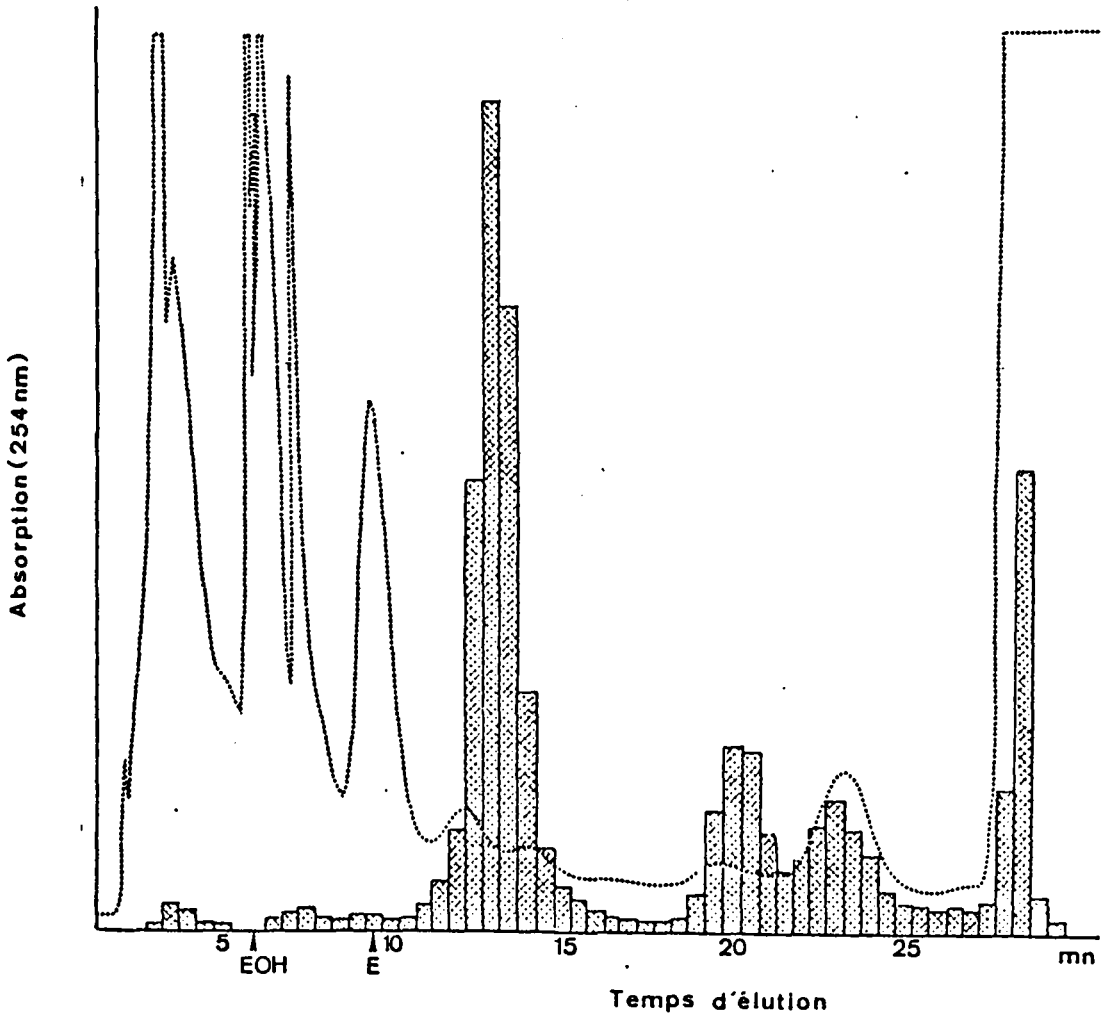
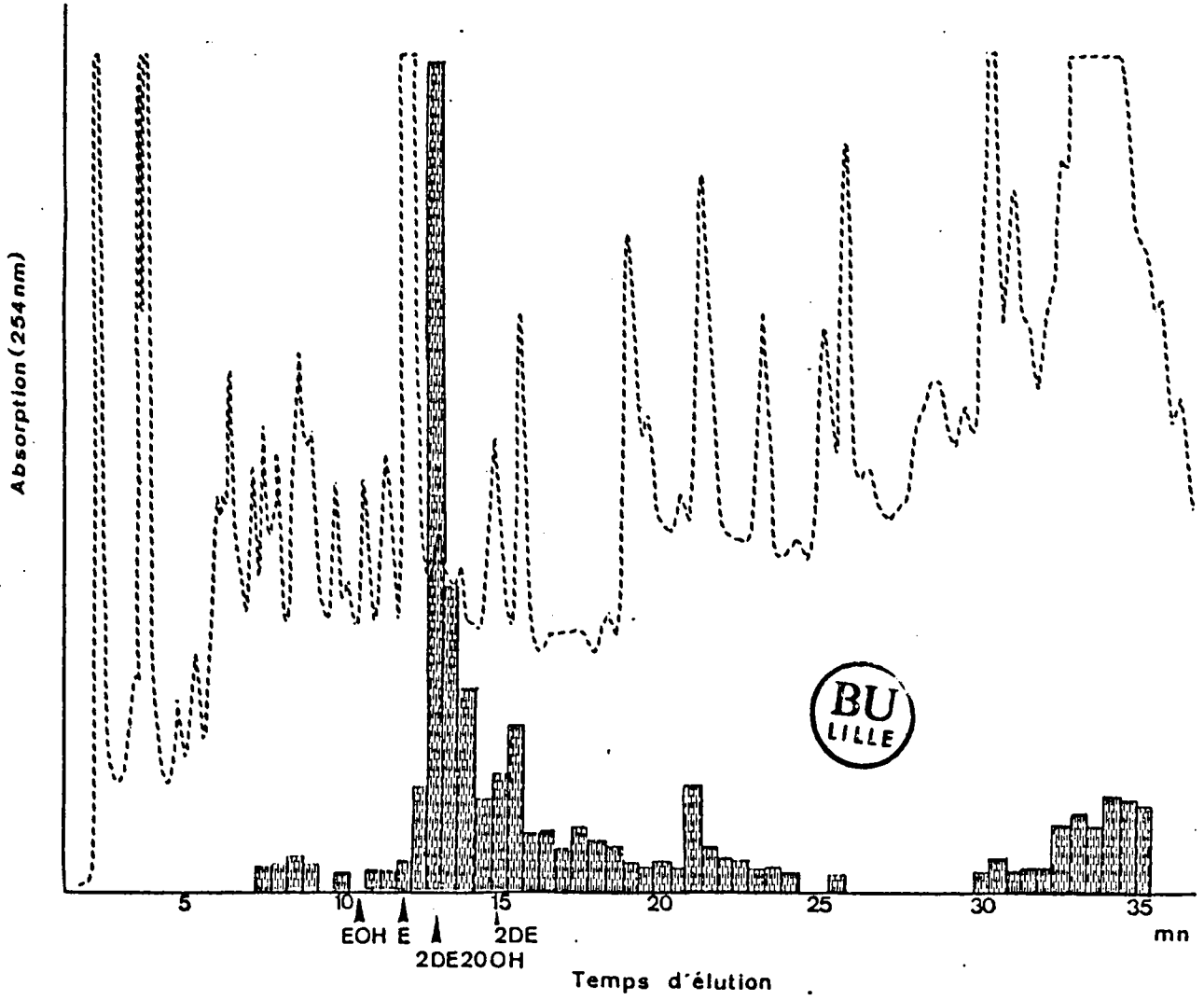


Figure 20 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse, des produits radioactifs de la zone 4 de la T.L.C. (cf figure 17) provenant d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 168  $\mu\text{m}$ , soumise à une injection de 2-désoxyecdysone tritiée.

Elution par un gradient de 0 à 100 % de méthanol dans l'eau.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE-20-OH, 2DE : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone, de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.



## 2 - Purification des produits radioactifs de la zone 4

Après élution à l'éthanol à 95 %, ces produits ont été purifiés par H.P.L.C. selon un gradient de méthanol de 0 à 100 % dans l'eau. Le chromatogramme présenté sur la figure 20 montre un pic de radioactivité de très grande amplitude élué avec le même temps de rétention que celui de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence.

## II - STADE OVOCYTAIRE 233 $\mu$ m

Le radiochromatogramme représenté sur la figure 18 nous indique une répartition de la radioactivité selon quatre zones :

- 1 zone des produits très polaires.
- 2 zone des produits qui co-migrent avec la 20-hydroxyecdysone de référence.
- 3 zone de la 2-désoxyecdysone.
- 4 zone des produits moins polaires que la 2-désoxyecdysone.

### 1 - Purification des composés radioactifs polaires

Il s'agit des produits très polaires élués à partir de la zone 1. Avant purification par H.P.L.C., ces produits ont été soumis à une hydrolyse enzymatique par *Helix pomatia*. La séparation H.P.L.C. a été effectuée selon un gradient de méthanol de 0 à 100 % dans l'eau.

Le résultat de cette analyse est représenté par la figure 21. Il montre que l'essentiel de la radioactivité se retrouve dans les fractions très polaires, ce qui suggère que nous sommes en présence de composés non hydrolysables par la technique utilisée. Néanmoins, cette hydrolyse a libéré deux composés moins polaires : le premier co-élue avec la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone, le second a le même temps de rétention que la 2-désoxyecdysone de référence.

### 2 - Purification des composés radioactifs des zones 2 et 3

Ce sont les produits qui co-migrent en T.L.C. avec la 20-hydroxyecdysone et la 2-désoxyecdysone de référence. Après élution, ils ont été injectés en H.P.L.C. dans le solvant méthanol à 53 % dans l'eau.

Le chromatogramme représenté par la figure 22 montre une répartition de la radioactivité selon quatre pics : le premier d'entre eux co-élue avec la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence ; par contre les autres pics correspondent à des métabolites qui ne co-éluent pas avec des substances de référence connues.

Figure 21 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse des produits libérés par l'hydrolyse enzymatique des composés de la zone 1 de la T.L.C. (cf figure 18). Ceux-ci proviennent d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 233  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de 2-désoxyecdysone tritiée.

Elution par un gradient de 0 à 100 % de méthanol dans l'eau. Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes : taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE-20-OH, 2DE : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone, de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.

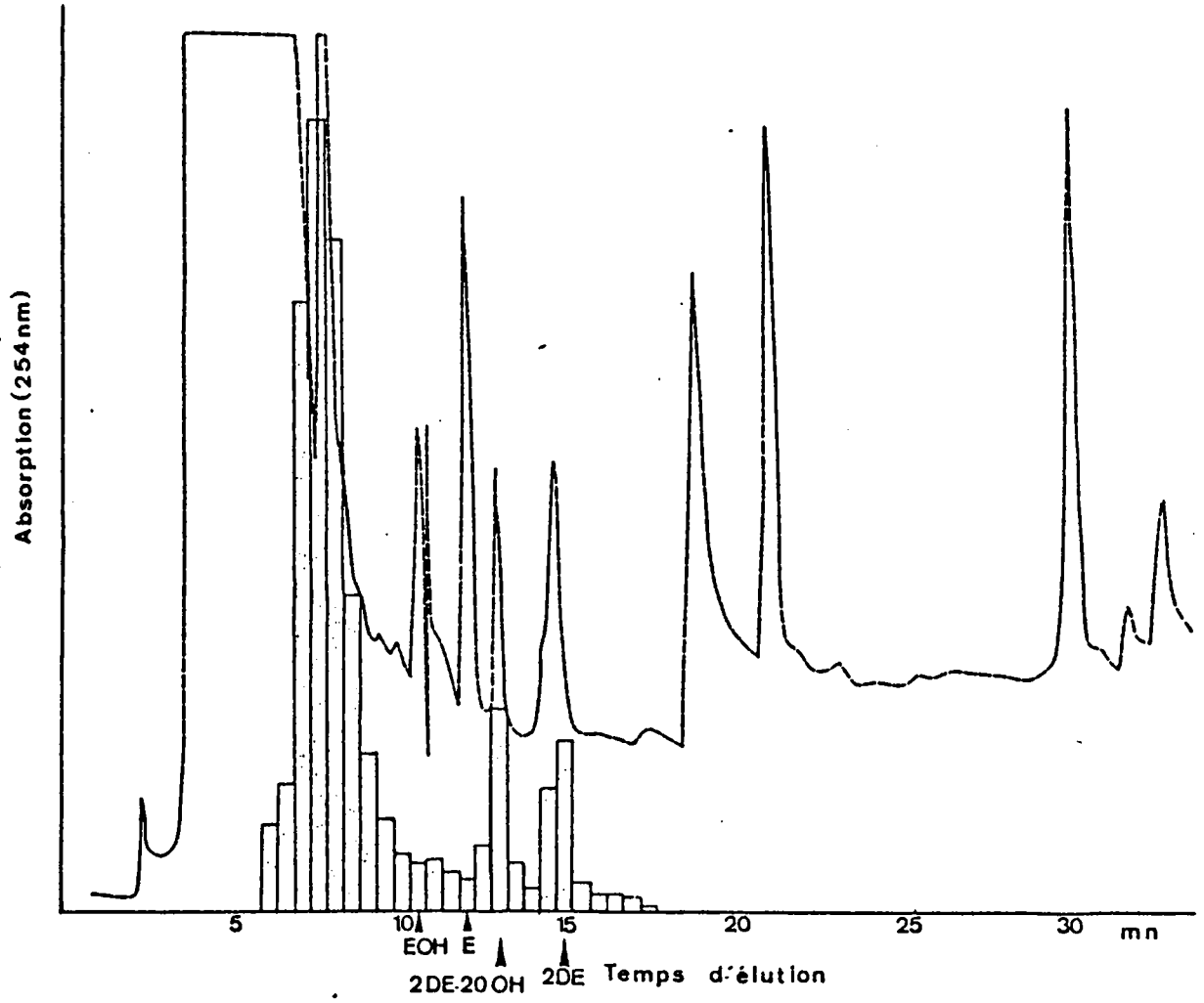


Figure 22 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse, des produits radioactifs des zones 2 et 3 de la T.L.C. (cf figure 18), et provenant d'un extrait de *Perine-reis cultrifera* de diamètre ovocytaire 233  $\mu\text{m}$  soumise à une injection de 2-désoxyecdysone tritiée.

Elution par le mélange de solvants méthanol/eau, 5,3V/4,7V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE-20-OH : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone et de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence.



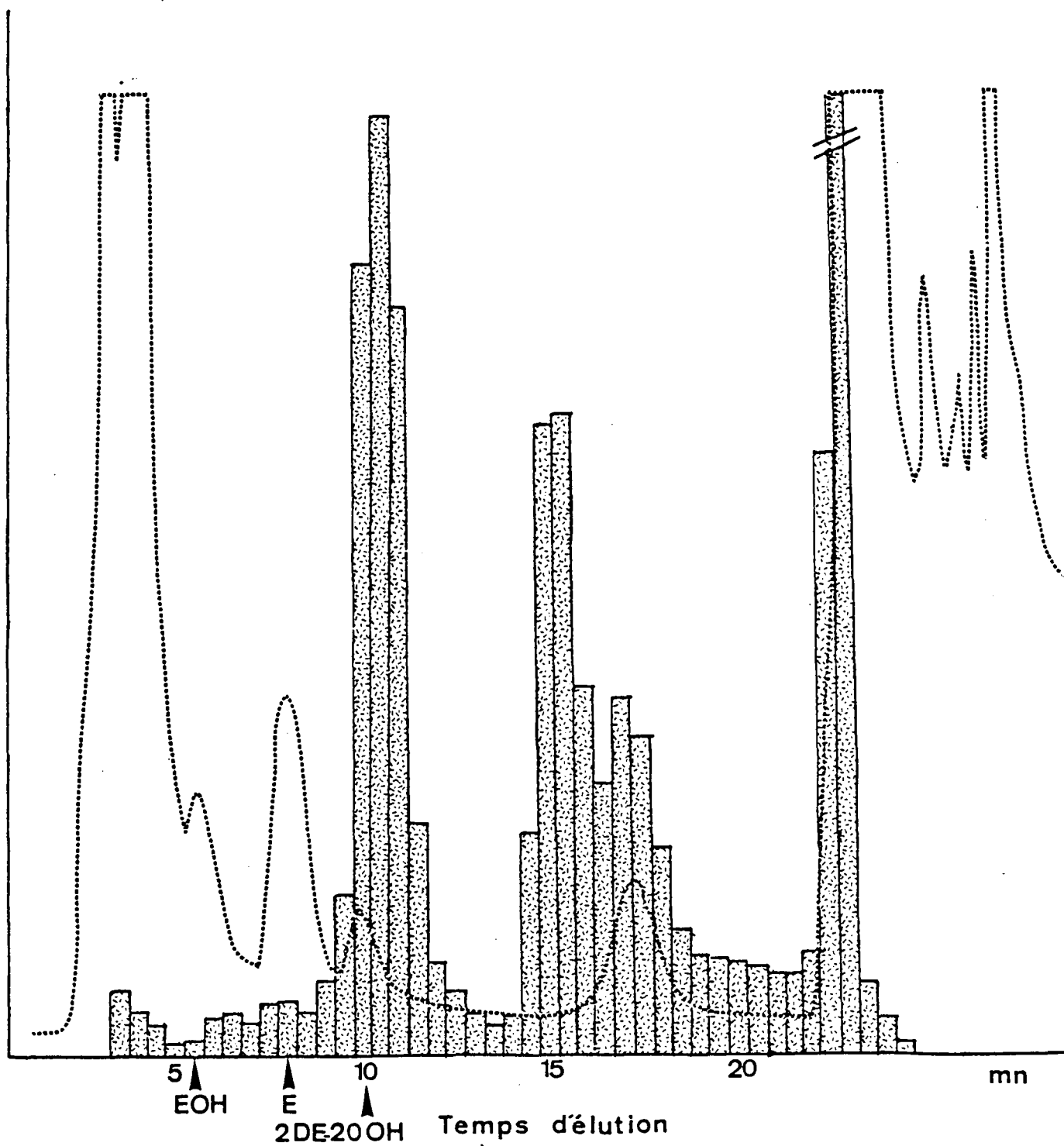
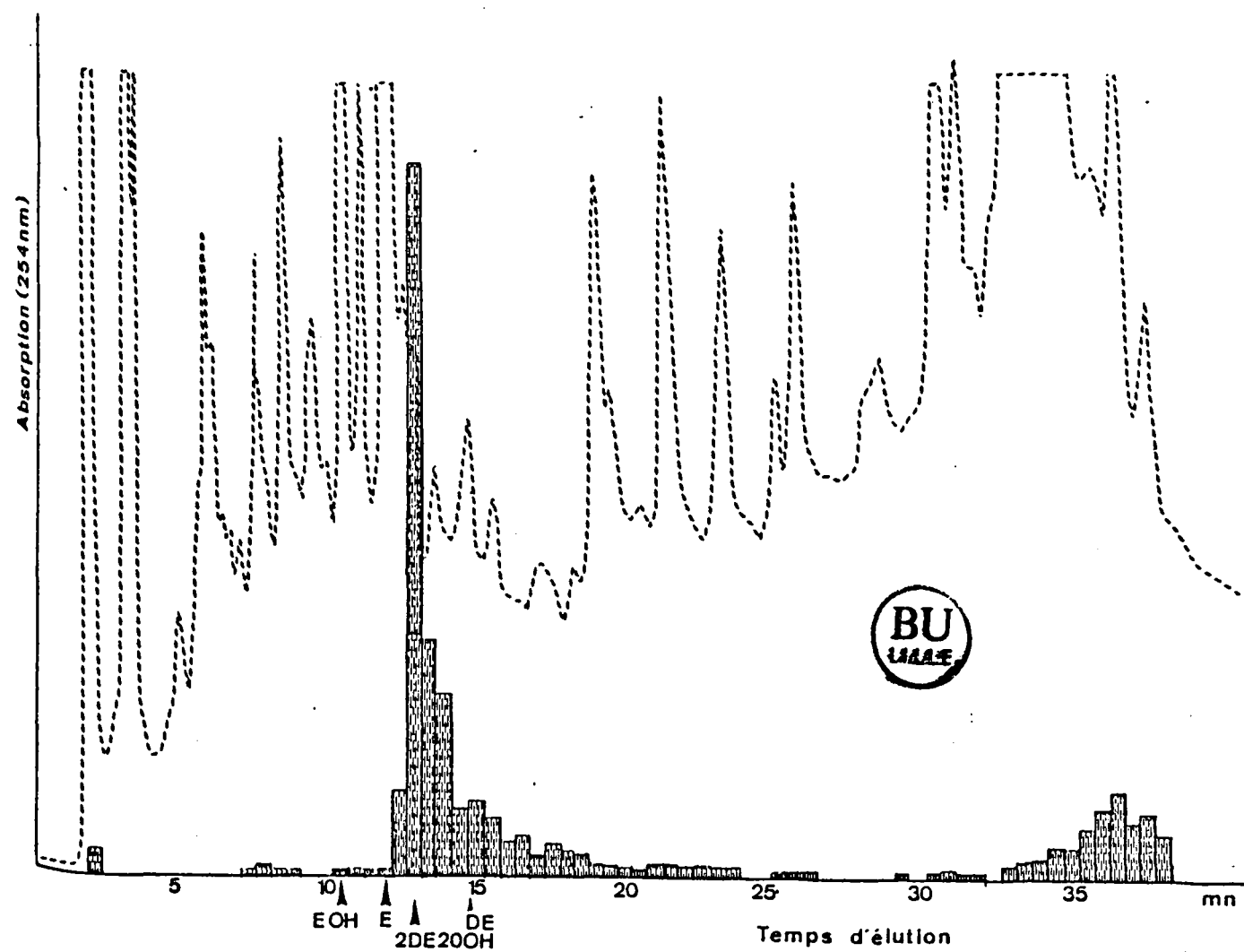


Figure 23 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse, des produits radioactifs de la zone 3 de la T.L.C. (cf figure 18) provenant d'un extrait de *Perinereis cultrifera* de diamètre ovocytaire 233  $\mu$ m, soumise à une injection de 2-désoxyecdysone tritiée.

Elution par un gradient de 0 à 100 % de méthanol dans l'eau. Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm, colonnes : taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH, E, 2DE-20-OH, 2DE : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone, de l'ecdysone, de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone et de la 2-désoxyecdysone de référence.



### 3 - Purification des composés radioactifs peu polaires

Il s'agit des produits élués à partir de la zone 4. Après l'éluotion à l'éthanol à 95 %, ils ont été purifiés par H.P.L.C. selon un gradient de méthanol de 0 à 100 % dans l'eau.

Le résultat de cette analyse, présenté figure 23, montre un pic très important de radioactivité ; celui-ci correspond à un composé ayant un comportement chromatographique identique en H.P.L.C. à celui de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence.

Nous venons de montrer que les précurseurs de biosynthèse d'ecdysone utilisés *in vivo* ont été convertis en un certain nombre de composés plus polaires. Parmi ces composés, certains ont un comportement chromatographique comparable à celui des ecdystéroïdes de référence auxquels nous avons pu avoir accès.

Nous avons cherché à vérifier la nature de ces composés en utilisant une technique d'acétylation. Les composés radioactifs éluant avec les substances de référence ont été co-acétylés avec les ecdystéroïdes de référence pendant 1 heure 30 selon la méthode décrite précédemment. Les différents acétates formés à partir des composés radioactifs à identifier ont été comparés à ceux des ecdystéroïdes de référence.

#### C - ACETYLATION

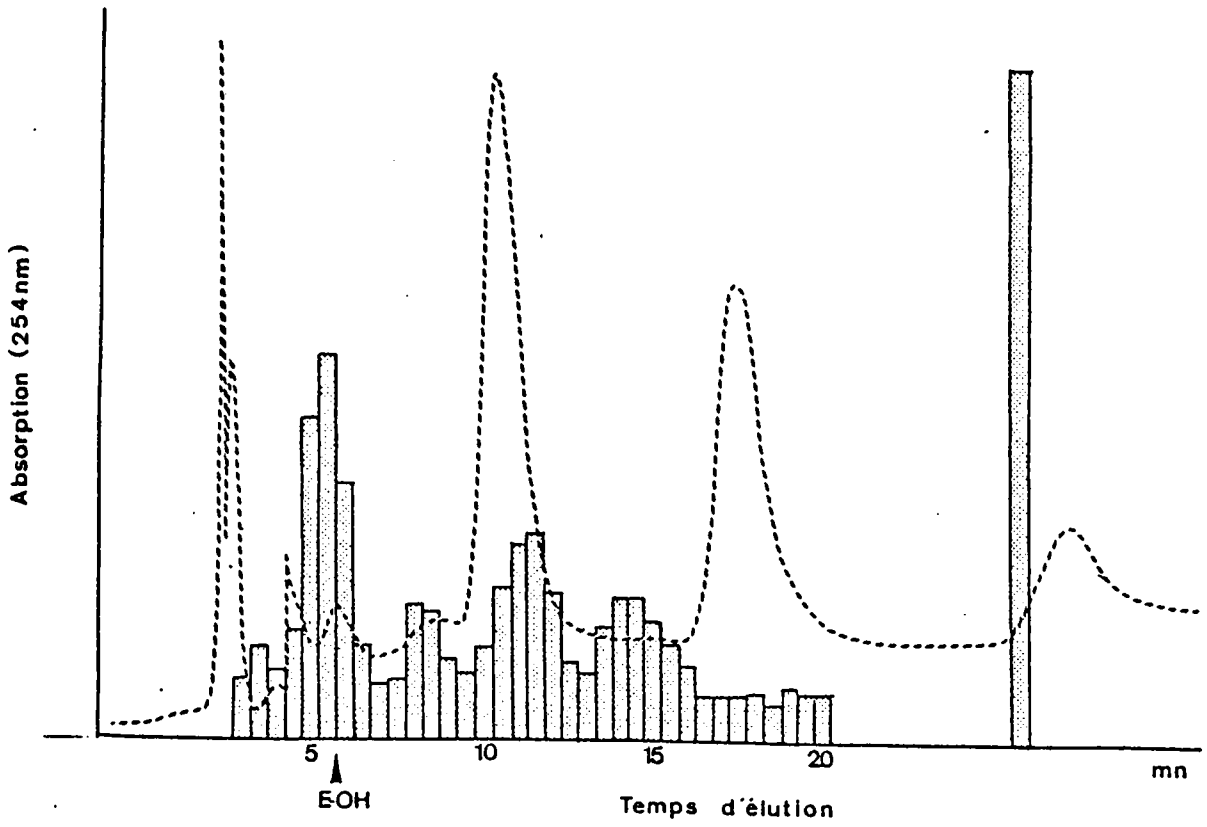
Nous avons acétylé les produits qui co-éluent :

1. avec la 20-hydroxyecdysone de référence (cf figure 15),
  2. avec la 2-désoxy-20 hydroxyecdysone (cf figure 20).
1. Après acétylation en présence de 20-hydroxyecdysone, les différents acétates obtenus ont été séparés par H.P.L.C. en phase inverse (solvant : méthanol à 53 % dans l'eau). Le chromatogramme obtenu, donné par la figure 24, ne montre pas la co-élution des pics de radioactivité des acétates du produit à identifier avec les pics d'absorption U.V. correspondant aux différents acétates du composé de référence. Ceci signifie que nous ne sommes pas en présence de 20-hydroxyecdysone, bien que ce composé présente en T.L.C. et en H.P.L.C. un comportement chromatographique analogue à cet ecdystéroïde.
  2. Après acétylation du produit qui co-élué avec la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence, les différents acétates obtenus ont été séparés par H.P.L.C. en utilisant comme solvant du méthanol à 65 %.

Figure 24 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse des produits de l'acétylation des composés co-éluant avec la 20-hydroxyecdysone de référence en H.P. L.C. (Figure 15) et les produits d'acétylation de la 20-hydroxyecdysone de référence.

Elution par le mélange de solvants méthanol/eau, 5,3V/4,7V.  
Traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes :  
taux de la radioactivité des fractions collectées.

E-OH : temps d'élution de la 20-hydroxyecdysone de référence.



Le chromatogramme représenté sur la figure 25 n'indique pas de co-élution entre les pics de radioactivité du composé à identifier et les pics d'absorption U.V. correspondant aux différents acétates du produit de référence.

Le comportement chromatographique du composé radioactif et de la référence étant différent, nous en concluons que le composé radioactif n'est pas de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone.

#### D - DISCUSSION

Les résultats obtenus dans ce second chapitre nous amènent à faire les commentaires suivants :

• L'injection *in vivo* de deux précurseurs radioactifs de biosynthèse d'ecdysone nous a permis de marquer un certain nombre de composés. Parmi ces composés radioactifs l'un se caractérise par son comportement chromatographique analogue à celui de la 20-hydroxyecdysone de référence. Cependant si les résultats de l'acétylation n'ont pas confirmé l'identité présumée de ce composé, cette similitude de comportement chromatographique nous autorise à dire qu'il s'agit probablement d'une molécule ayant la même polarité que la 20-hydroxyecdysone, mais qui en diffère par la position de ses groupements hydroxyles.

• Ces résultats prouvent aussi que *Perinereis cultrifera* possède un équipement enzymatique lui permettant de réaliser ses propres synthèses d'ecdystéroïdes à partir des précurseurs.

Un argument supplémentaire vient étayer ce fait puisque des dosages radioimmunologiques effectués sur des algues dont se nourrissent ces animaux, ne mettent pas en évidence de matériel immunoréactif. Les ecdystéroïdes présents chez *Perinereis cultrifera* ne sont donc pas d'origine alimentaire, mais synthétisés *de novo* par l'animal.

• Par ailleurs, si un certain nombre de composés ont été marqués, nous avons constaté qu'ils ne co-éluent pas toujours avec les substances de référence utilisées habituellement lors des études métaboliques réalisées chez les Insectes, notamment chez *Locusta*. Il semble alors que les voies métaboliques de la biosynthèse des ecdystéroïdes chez *Perinereis cultrifera* soient différentes de celles rencontrées dans le "modèle ovarien" de *Locusta*.

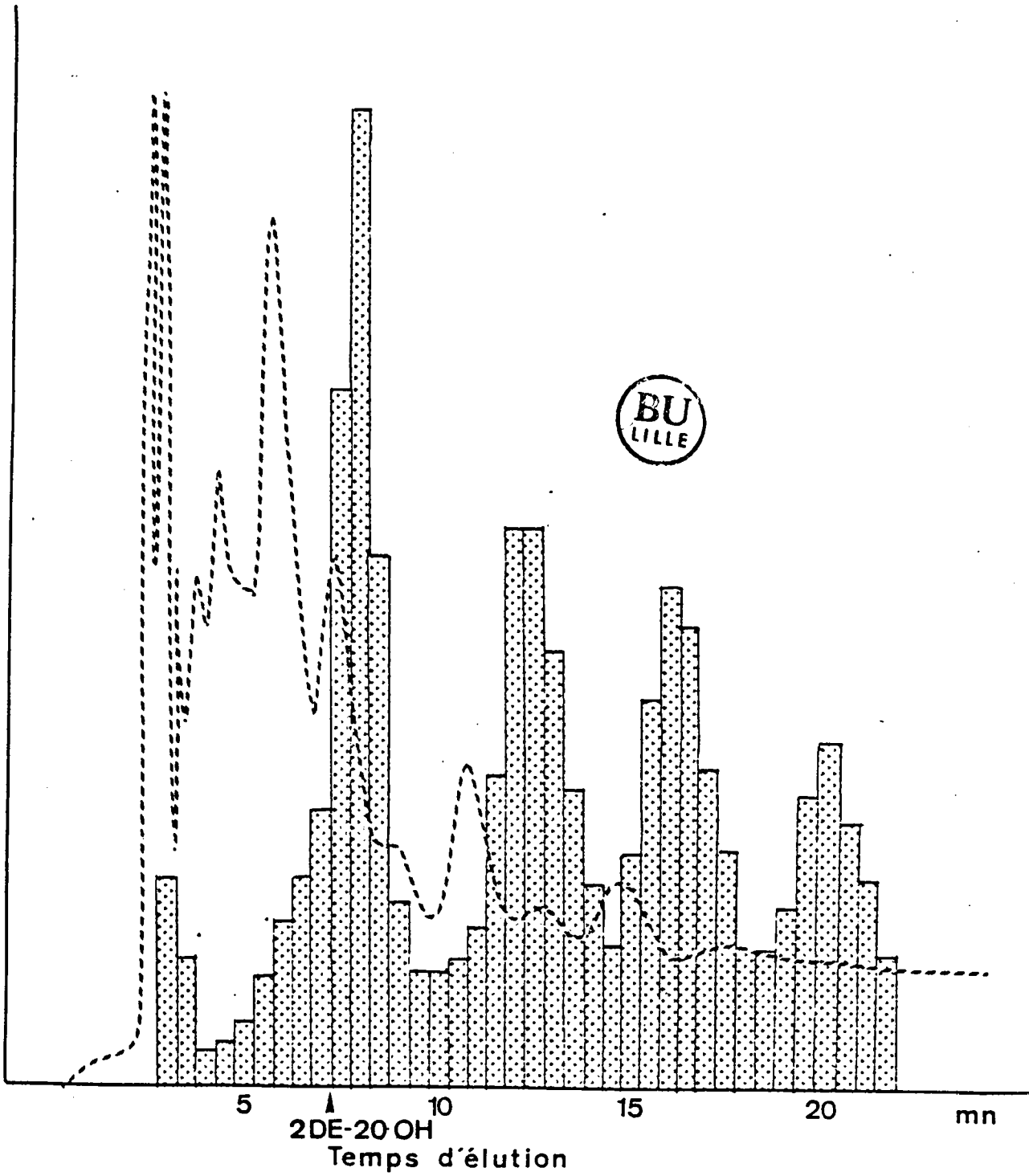
Figure 25 - Chromatogramme obtenu après injection en H.P.L.C. sur phase inverse des produits de l'acétylation des composés co-éluant avec la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence en H.P.L.C. (cf figure 20) et les produits d'acétylation de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence.

Elution par le mélange de solvants méthanol/eau, 6,5V/3,5V ; traits discontinus : absorption en U.V. à 254 nm ; colonnes : taux de la radioactivité des fractions collectées.

2DE-20-OH : temps d'élution de la 2-désoxy-20-hydroxyecdysone de référence.



Absorption (254 nm)



### CHAPITRE III

#### RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES ECDYSTEROÏDES CHEZ LES NEREIDIENS

L'objectif de la troisième partie de notre travail est de préciser le rôle physiologique des ecdystéroïdes chez les Néréidiens.

Etant donné que les résultats des expériences d'injection de 20-hydroxyecdysone chez *Perinereis cultrifera* n'ont pas été nettement reproductibles, tant au niveau musculaire qu'au niveau des ovocytes, nous avons focalisé nos recherches sur un point bien précis, en l'occurrence l'action des ecdystéroïdes dans le déroulement de la spermatogenèse chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller.

### I - ACTION DES ECDYSTEROÏDES SUR LA MATURATION DES PRODUITS GENITAUX MÂLES. ETUDE EN CULTURE ORGANOTYPIQUE.

Chez les Néréidiens, la spermatogenèse est inhibée par un facteur endocrine d'origine cérébrale. DURCHON (1952) a montré que l'ablation du cerveau entraînait une maturation précoce des produits génitaux mâles. La technique des cultures organotypiques a permis de confirmer les résultats obtenus *in vivo*.

Dans les parapodes isolés et ainsi soustraits à l'action endocrine du cerveau, on peut observer rapidement la spermatogenèse, c'est-à-dire l'évolution des spermatogonies en spermatozoïdes au bout de 5 à 6 jours (Planche I, figures A et B). Les cellules qui, dans les conditions naturelles subiraient un certain nombre de mitoses de multiplication spermatogoniale entrent rapidement en méiose (DHAINAUT, 1964 a).

Par contre, les spermatogonies maintenues sous contrôle hormonal en associant un parapode de mâle immature à un prostomium d'individu jeune, n'évoluent pas (Planche I, figure C).

Une première approche réalisée pour déterminer une action éventuelle de la 20-hydroxyecdysone sur le déroulement de la spermatogenèse avait montré que 5 incorporations régulières de 20-hydroxyecdysone  $10^{-5}$  M, pendant 12 jours, provoquaient un début de dissociation des amas mûrifomes de spermatogonies. Cette évolution des spermatogonies en spermatides traduit une levée du blocage de la spermatogenèse.

Ce résultat tout à fait préliminaire a pu être précisé.

#### 1 - Influence de la concentration en 20-hydroxyecdysone


Nous avons préparé une cascade de dilutions qui s'échelonnent de  $10^{-5}$  M à  $5.10^{-10}$  M. Chacune de ces concentrations a été testée selon le protocole expérimental décrit précédemment. La durée moyenne de la culture est de 12 jours.

PLANCHE I

CULTURE ORGANOTYPIQUE

Figure A - Parapode témoin. Les produits génitaux ont évolué en spermatozoïdes. X 550.

Figure B - Détail de la figure A. X 1200.

Figure C - Association témoin : les amas de spermatogonies restent bloqués (  ). X 300.

Figures D, E, F, G - Action de la 20-hydroxyecdysone sur l'activité cérébrale.


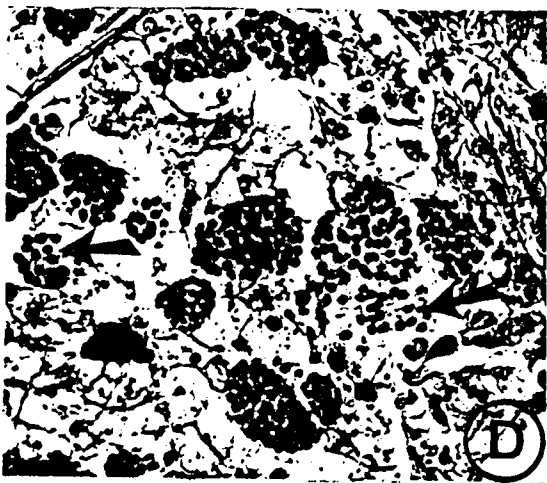
Figure D - Association parapode-prostomium avec addition de 20-hydroxyecdysone  $10^{-8}M$ , 5 doses, 12 jours de culture. Les amas sont pour la plupart dissociés. Plusieurs spermatozoïdes sont déjà libres (  ). X 550.

Figure E - Association parapode-prostomium avec incorporation de 20-hydroxyecdysone  $10^{-7}M$ , 5 doses, 12 jours de culture. La spermatogenèse est terminée, nous sommes au stade spermatozoïdes. X 550.

Figure F - Détail de la figure E. X 1200.

Figure G - Ultrastructure d'un spermatozoïde. d : matériel dense ; m : mitochondrie ; N : noyau ; ta : tube axial. X 24 000.



BU  
LILLE



Au terme de 12 jours d'incubation, les explants sont prélevés, fixés et colorés pour la microscopie photonique ou électronique.

Nous avons déterminé le seuil de concentration de 20-hydroxyecdysone en dessous duquel celle-ci est sans action en culture organotypique. Ce seuil se situe pour une concentration de  $10^{-8}$  M. Dans les parapodes correspondants, les produits génitaux sont pour la plupart en fin de prophase de méiose, car nombreux sont les amas mûrifformes dissociés (Planche I, figure D).

Pour des concentrations inférieures, les produits génitaux restent sous la forme d'amas de spermatogonies analogues à ceux de l'association témoin.

Pour des concentrations de  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M, quelques spermatides se présentent encore sous forme de tétrades, les autres sont différenciés en spermatozoïdes (Planche I, figures E, F, G).

Il est possible de résumer l'ensemble de ces résultats en exprimant graphiquement l'intensité du virage, en fonction de la concentration en 20-hydroxyecdysone (figure 26).

## 2 - Importance du nombre d'incorporations

Nous avons utilisé une concentration pour laquelle une évolution des produits génitaux en spermatides a toujours été observée ( $10^{-7}$  M).

Une seule incorporation de 20-hydroxyecdysone se révèle être inefficace ; au terme de 12 jours de culture, les produits génitaux sont toujours au stade de spermatogonies.

Par contre, à partir de 3 incorporations, les spermatogonies évoluent. Si nous interrompons la culture après 7 jours d'incubation, ce qui correspond à 3 doses de 20-hydroxyecdysone, nous observons encore des spermatogonies, cependant nous remarquons que certaines cellules ont subi de discrètes modifications morphologiques affectant leur noyau dont la forme devient plus sphérique (Planche II, figures A et B). Ces cellules sont d'ores et déjà engagées de manière irréversible dans le processus aboutissant à la méiose (DURCHON *et al.*, 1965). On peut les désigner sous le terme de spermatocytes.

Si nous introduisons, en une seule incorporation, dans le milieu de culture, la quantité équivalente à 6 doses, nous observons encore une levée du blocage mais plus tardive que lorsque les incorporations de 20-hydroxyecdysone sont pratiquées régulièrement.

Figure 26 - Effets de la 20-hydroxyecdysone et de l'ecdysone sur l'activité cérébrale.

L'activité cérébrale est testée en culture organotypique (association parapode-prostomium) d'après le degré d'évolution des produits génitaux.

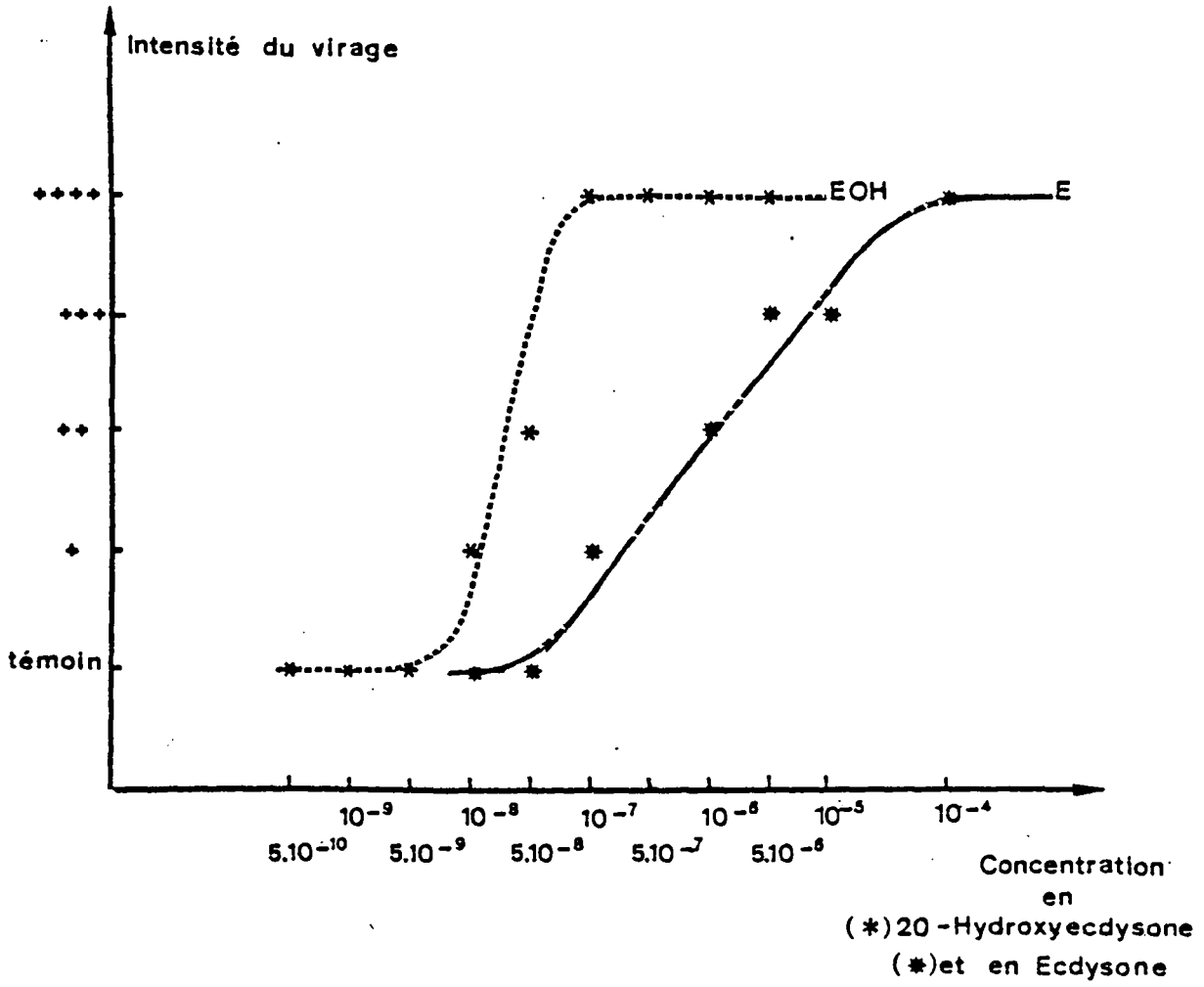




PLANCHE II

Figure A - Association parapode-prostomium avec addition de 20-hydroxyecdysone  $10^{-7}M$ , 3 doses, 7 jours de culture. Vue d'ensemble de quelques amas mûrifformes. L'amas de droite renferme de jeunes spermatocytes (➤), tandis que les cellules de celui de gauche sont encore au stade spermatogonies. La forme du noyau est plus sphérique dans les spermatocytes que dans les spermatogonies. X 1200.

Figure B - Ultrastructure de spermatocytes. X 10 000.

Figures C et D - Action de l'ecdysone sur l'activité cérébrale.

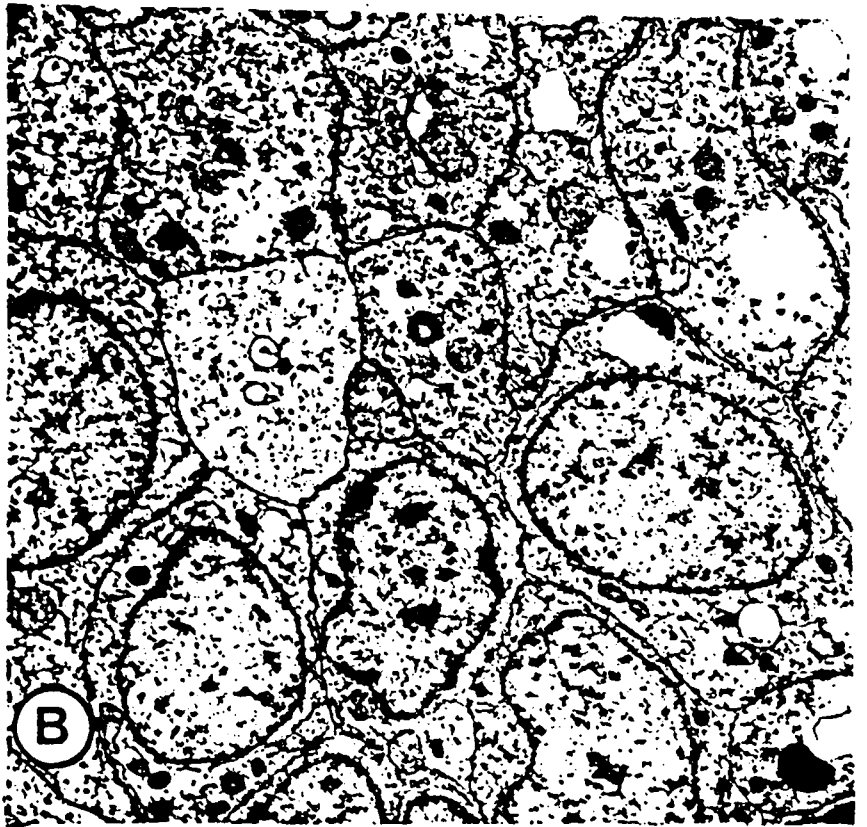
Figure C - Association parapode prostomium avec addition d'ecdysone  $10^{-4}M$ . Les amas se dissocient. Des spermatides sont libres (▼). X 300.

Figure D - Détail de la figure C. X 1200.

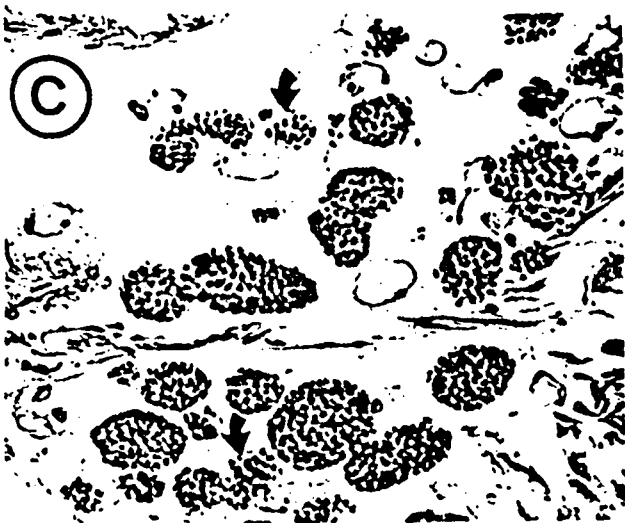


A

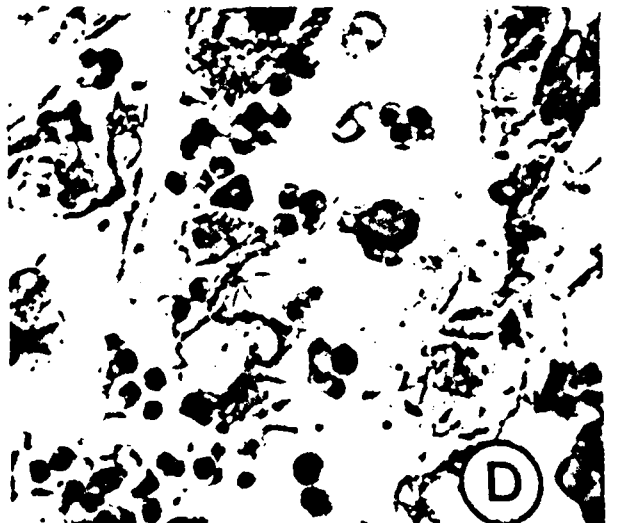
BU  
LILLE



B



C



D

### 3 - Action de l'ecdysone

En l'absence d'identification précise de la ou des molécule(s) d'ecdystéroïdes présents chez les Néréidiens, nous avons d'abord utilisé la 20-hydroxyecdysone puisque c'est généralement la forme la plus active chez les Insectes. Il était important de tester l'action d'autres ecdystéroïdes. Nous avons testé l'ecdysone.

Il apparaît que le seuil de virage, c'est-à-dire la concentration minimale en ecdysone susceptible d'induire la méiose, est plus élevé que celui de la 20-hydroxyecdysone. Il est observé pour une concentration dix fois supérieure. Un virage aussi net que celui constaté avec la 20-hydroxyecdysone a lieu pour une concentration de  $10^{-4}$  M (Planche II, figures C et D).

### 4 - Influence du mode d'incorporation des ecdystéroïdes

Deux facteurs sont restés fixes : la concentration en 20-hydroxyecdysone ( $10^{-7}$  M) et le nombre d'incorporations (6). Seules les modalités d'incorporation de la 20-hydroxyecdysone ont été modifiées.

#### a - Incubation préalable des prostomiums

Des prostomiums à forte activité hormonale sont prélevés puis incubés sur le milieu de culture habituellement utilisé. Après 6 incorporations régulières de 20-hydroxyecdysone, ces prostomiums sont associés à des parapodes de mâles immatures, sur un milieu de culture frais.

Après huit jours de culture (soit avec sensiblement deux jours de retard par rapport aux parapodes témoins), nous constatons que les produits génitaux sont au stade spermatides.

#### b - Injections de 20-hydroxyecdysone

Pendant un mois, nous injectons de la 20-hydroxyecdysone à des jeunes femelles. Les prostomiums de ces animaux traités sont ensuite prélevés et mis en culture par association avec des parapodes de mâles immatures.

La levée du blocage est très nette, les produits génitaux ont évolué jusqu'au stade spermatozoïdes ; cette évolution est aussi rapide que celle des parapodes témoins.

### 5 - "Activité" des milieux de culture

Nous avons, dans un premier temps, incubé des prostomiums à forte activité hormonale, pendant 4 jours ; nous récupérons le milieu de culture et dans un second temps nous y avons placé des parapodes de mâles immatures. Des incorporations régulières de 20-hydroxyecdysone sont faites au niveau de ces parapodes.

Nous constatons que les produits génitaux restent bloqués au stade spermatogonies, ce qui prouve d'une part que la 20-hydroxyecdysone n'agit pas directement sur les cellules germinales mâles et que la neurohormone inhibitrice est bien présente dans le milieu de culture puisque les spermatogonies restent quiescentes.

Par contre, si l'on récupère le milieu d'incubation sur lequel ont séjourné des prostomiums préalablement sensibilisés à la 20-hydroxyecdysone, soit par injections *in situ* ou par incorporation *in vitro*, et que des parapodes provenant de mâles immatures sont mis en culture sur ce milieu, les produits génitaux évoluent.

## II - DISCUSSION

Cette étude de l'action des ecdystéroïdes sur la spermatogenèse nous permet de dégager un certain nombre de points importants.

La 20-hydroxyecdysone est capable, selon sa concentration dans le milieu de culture de diminuer l'activité hormonale du cerveau ou de la bloquer complètement, ce qui détermine le déclenchement des processus de spermatogenèse.

Son action ne s'exerce donc pas directement sur les cellules germinales, comme il est fréquent de l'observer chez les Arthropodes. Le déclenchement de la spermatogenèse n'est que la conséquence de la chute du taux hormonal dû à l'inhibition de sa production par la 20-hydroxyecdysone. Dès la suppression de l'action endocrine cérébrale, les cellules germinales mâles entrent directement en interphase préméiotique, la spermatogenèse est capable de parvenir à son terme en absence de toute action hormonale.

Ceci explique le fait que la levée du blocage soit plus nette si le cerveau a été soumis à l'action de la 20-hydroxyecdysone avant d'être associé au parapode. Il est vraisemblablement inactif lors de la mise en culture. Si l'on pratique les incorporations de 20-hydroxyecdysone directement sur une association prostomium-parapode, il peut continuer - pendant un certain temps - à produire la neurohormone d'où un certain retard dans le virage des produits génitaux par rapport aux parapodes témoins.

Cette action "indirecte" de la 20-hydroxyecdysone ne peut-elle pas être rapprochée du phénomène de régulation interne de l'activité endocrine cérébrale mise en évidence chez les Néréidiens de sexe femelle ? (PORCHET, 1969).

Deux processus président au déroulement de l'ovogenèse, une activité endocrine, d'origine cérébrale et une régulation de celle-ci par une rétroaction d'origine ovocytaire. Les ovocytes submatures et matures

produisent une substance chimique capable d'inactiver tant *in vivo* qu'*in vitro* la production hormonale du cerveau. Cette substance est susceptible d'induire l'hétéronéridation complète chez de jeunes vers initialement dépourvus de produits génitaux et possédant leur cerveau, donc leur centre endocrine. Chez les femelles, la simple injection intracoelomique de cette substance, qualifiée de "feed-back" permet d'obtenir les mêmes résultats qu'une décérébration, c'est-à-dire la maturation ou la dégénérescence ovocytaire (PORCHET, 1967 ; PORCHET et CARDON, 1972 ; PORCHET *et al.*, 1976).

Des similitudes d'action existent entre la substance "feed-back" isolée des ovocytes matures et la 20-hydroxyecdysone ; cependant les injections répétées de 20-hydroxyecdysone n'ont jamais induit l'épitoquie.

Chez les femelles, les injections répétées de 20-hydroxyecdysone n'ont pas donné de résultats nettement reproductibles. La ségrégation des constituants ovocytaires traduisant une maturation précoce ne s'est pas toujours matérialisée. Par ailleurs, nous ne pouvons pas tester l'action de cette molécule en culture organotypique étant donné que ce type de manipulation entraîne des perturbations du métabolisme ovocytaire dues à un déséquilibre physiologique.

S'il est indéniable que des ecdystéroïdes sont présents dans le compartiment ovocytaire, il faut reconnaître que leur mise en évidence ne constitue qu'un instantané, elle ne préjuge en rien du ou des rôle(s) physiologique(s) qu'ils peuvent jouer. Il est d'ailleurs difficile d'anticiper actuellement dans ce domaine et il serait dangereux d'interpréter des résultats encore trop fragmentaires ; même chez les Insectes, le rôle physiologique des ecdystéroïdes chez les adultes mérite d'être approfondi, notamment dans le contrôle qu'ils peuvent exercer sur la synthèse de vitellogénine.

Chez *Aedes aegypti*, HAGEDORN (1980) considère que l'ecdysone produite par les ovaires induit la synthèse de vitellogénine par les corps gras ; il en est de même chez *Bombyx mori* (ONO *et al.*, 1975), *Oncopeltus fasciatus* (RANKIN et JÄCKLE, 1980) et chez plusieurs espèces de Diptères (POSTLETHWAIT et HANDLER, 1979 ; De LOOF, 1982a). Par contre, chez les Coléoptères et Orthoptères, l'induction de la synthèse de vitellogénine par les ecdystéroïdes ovariens n'a jamais été observée (CHEN *et al.*, 1981). Chez *Locusta migratoria*, la stimulation de la synthèse de vitellogénine par l'ecdysone ovarienne est exclue puisque les deux phénomènes sont séparés dans le temps : la synthèse de vitellogénine commence avant celle de l'ecdysone chez la femelle adulte de criquet. Les ecdystéroïdes produits

par les cellules folliculaires ne sont pas rejetés dans l'hémolymphe mais combinés à la vitelline (LAGUEUX *et al.*, 1981 a). Ce fait observé chez *Locusta* a amené De LOOF (1982b) à suggérer que les ecdystéroïdes secrétés par les cellules folliculaires pouvaient être un facteur majeur dans l'induction de la maturation ovocytaire.

Chez *Folsomia* et *Thermobia*, deux Aptérygotes, qui muent encore même lorsque le cycle de reproduction a commencé, il a été démontré qu'il existe une corrélation entre le taux d'ecdystéroïdes et les cycles ovariens (BITSCH *et al.*, 1979 ; PALEVODY *et al.*, 1977) et que des ecdystéroïdes sont effectivement présents dans les ovaires (BITSCH *et al.*, 1979 ; ROJO de la PAZ, 1983). Bien que la preuve n'ait pas encore été apportée, BITSCH et PALEVODY (1980) supposent même que les ecdystéroïdes jouent un rôle dans le contrôle hormonal de la régulation de la vitellogenèse.

Chez les Crustacés, la majorité des auteurs accordent aux ecdystéroïdes un rôle dans la vitellogenèse à travers les relations mue-vitellogenèse. L'ablation des glandes de mue chez l'Oniscoïde *Porcellio dilatatus* fait chuter la synthèse de vitellogénine (SOUTY et GOHAR, en préparation) ainsi que la synthèse et la libération de la vitellogénine dans l'hémolymphe (SOUTY *et al.*, 1982). Une injection compensatrice de 20-hydroxyecdysone rétablit cette synthèse et cette libération. D'une façon directe ou indirecte, la 20-hydroxyecdysone est nécessaire au maintien de la synthèse de la fraction exogène du vitellus protéique, en l'occurrence la vitellogénine.

Compte tenu de ces différents faits établis et hypothèses formulées pour les Arthropodes, pouvons-nous envisager des processus comparables chez *Perinereis cultrifera* ?

Nous savons que la vitellogenèse est, chez *Perinereis cultrifera*, hétérosynthétique (BAERT, Bangor, 1985). L'ovocyte est incapable de synthétiser sa vitelline, ce sont les coelomocytes, autres cellules libres dans le liquide coelomique, qui produisent la vitellogénine. Cette dernière subit ensuite des modifications au sein même de l'ovocyte. Y-a-t-il alors contrôle de la synthèse de vitellogénine par les ovocytes ? La complexité du problème et les données trop peu nombreuses ne nous permettent pas d'y apporter une réponse dans l'immédiat.

Il semble qu'en ce qui concerne le rôle physiologique des ecdystéroïdes, nous puissions adopter l'hypothèse émise, pour les Insectes, par De LOOF et GEYSEB (1983) qui favorise l'idée selon laquelle les processus physiologiques sont contrôlés par une balance hormonale plutôt que par les hormones prises individuellement. Un tel point de vue peut s'appliquer aussi aux Néréidiens.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats exposés dans ce travail confirment donc la présence d'ecdystéroïdes - libres et conjugués - chez *Perinereis cultrifera*. Ces ecdystéroïdes subissent des fluctuations dans le temps, mais aussi selon la nature du compartiment biologique considéré.

Le résultat essentiel qui se dégage de nos recherches concerne la mise en évidence d'un ecdystéroïde de même polarité que la 20-hydroxyecdysone, mais qui en diffère probablement par la position de ses fonctions hydroxyles. Le passage en spectrométrie de masse devrait nous en apporter la confirmation.

Par ailleurs, l'étude du métabolisme de précurseurs radioactifs de l'ecdysone a montré que *P. cultrifera* pouvait convertir ces précurseurs en un certain nombre de composés, ce qui implique la présence, chez cet animal, de l'équipement enzymatique indispensable à la réalisation de ces transformations.

Le second résultat qui doit être souligné concerne le rôle physiologique de ces ecdystéroïdes. Dans un travail précédent, nous avons mentionné une éventuelle action au niveau des cellules germinales ; nous pouvons maintenant préciser que cet effet - tout particulièrement chez le mâle - n'est que la conséquence d'une action exercée par la 20-hydroxyecdysone, sur le cerveau. C'est la raison pour laquelle, nous avons rapproché ce phénomène de celui qui est observé chez les femelles, où il y a régulation interne de l'activité endocrine cérébrale par une substance produite par les ovocytes matures.

Les résultats obtenus nous amènent à penser que, comme chez les Arthropodes, les ecdystéroïdes pourraient jouer le rôle de messagers hormonaux. Bien des travaux restent à faire pour élucider le rôle exact des ecdystéroïdes chez les Vers, que ce soient les Annélides Polychètes ou autres. En effet, même si l'on peut corrélérer une augmentation du taux des ecdystéroïdes avec un état de prémue chez *Hirudo* (SAUBER, 1983 .), ou si la détection des ecdystéroïdes sériques endogènes et urinaires est utilisée pour le dépistage précoce de certaines parasitoses (KOOLMAN, 1985), le rôle précis de ces molécules reste également inconnu chez ces animaux.

Par ailleurs, si ce travail de recherche nous a permis de répondre à un certain nombre de questions, beaucoup d'entre elles restent encore posées. Ce qui est notamment le cas pour le site de biosynthèse de ces ecdy-

stéroïdes : si d'ores et déjà, nous pouvons éliminer les prostomiums puisque les dosages radioimmunologiques des milieux de culture sur lesquels ils ont séjourné ne révèlent pas la présence de matériel immunoréactif, nous ne disposons d'aucun élément nous permettant de privilégier un compartiment biologique plutôt qu'un autre.

Sur le plan physiologique, nous devons d'une part approfondir le mécanisme d'action de ces molécules au niveau du cerveau en localisant la ou les catégorie(s) de cellules qui leur sont sensibles, et d'autre part parvenir à préciser leur fonction chez les individus de sexe femelle.

La continuation de nos recherches devra se faire, dans un premier temps, dans cette direction.



## BIBLIOGRAPHIE

- ANDRIEUX A., 1981 - Variations quantitatives et qualitatives des ecdystéroïdes chez *Carcinus maenas* : étude comparative préliminaire chez les femelles et les individus parasités par *Sacculina carcini*. C. R. Acad. Sci. Paris, 293, 457-460.
- BAERT J.-L., 1985 - Communication au Colloque de la "Society of Experimental Biology", Bangor, Pays de Galles.
- BITSCH J., ROJO DE LA PAZ A., MATHELIN J., DELBECQUE J.-P. et DELACHAMBRE J., 1979 - Recherches sur les ecdystéroïdes hémolympatiques et ovariens de *Thermobia domestica*. C. R. Acad. Sci., Paris, 289 D; 865-868.
- BITSCH J. et PALEVODY C., 1980 - La vitellogenèse des Insectes Aptérygotes. Bull. Soc. Zool. Fr., 105, 419-425.
- BOLLENBACHER W.E., GALBRAITH M.N., GILBERT L.I. et HORN D.H.S., 1977 - *In vitro* metabolism of 3  $\beta$ -hydroxy-, and 3  $\beta$ , 14  $\alpha$ -dihydroxy- (3  $\alpha$ -<sup>3</sup>H)-5  $\beta$ -cholest-7-en-6-one by the prothoracic glands of *Manduca sexta*. Steroids, 29, 47-63.
- BULET P., HOFACK B., VERBERT A. et PORCHET M., 1983 - A simple method of purification of coelomic cells in Nereidae. Experientia, 39, 436-437.
- CHEN M.J., 1954 - The cultivation in fluid medium of organized liver, pancreas and other tissues of foetals rats. Exptl Cell Res., 7, 518-529.
- CHEN T.T., REID P.C., CARR L. et SAUNDERSON J.C., 1981 - Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria*. Proc. 9th Intern. Symp. Comp. Endocrinol., 91.
- CLARK R.B., 1969 - Endocrine influence in Annelids. Gen. Comp. Endocrinol., 2, 572-581.
- CONNAT J.L., DIEHL P.A. et MORICI M., 1984 - Metabolism of ecdysteroids during the vitellogenesis of the Tick *Ornithodoros moubata* (Ixodoidea, Argasidae). Accumulation of apolar metabolites in the eggs. Gen. Comp. Endocrinol., 56, 100-110.
- DE LOOF A., 1982a - New concepts in endocrine control of vitellogenesis and in functioning of the ovary in insects. In : Exogenous and Endogenous Influences on Metabolic and Neural Control (Ed. by Addink A.D.F. and Spronk N.) Pergamon Press, Oxford.

- DE LOOF A., 1982 b - Similarities in the endocrine control of reproduction in insects and egg laying vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 46, 84.
- DE LOOF A. et GEYSEN J., 1984 - Epigenetic control of gene expression : a new unifying hypothesis. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11, 383-388.
- DE REGGI M., HIRN M. et DELAAGE M.A., 1975 - Radioimmunoassay of ecdysone. An application to *Drosophila* larvae and pupae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 1307-1315.
- DHAINAUT A., 1964 - Contribution à l'étude du métabolisme de l'A.R.N. par incorporation de  $^3\text{H}$  Uracile, au cours de l'ovogenèse chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 89, 408-413.
- DHAINAUT A., 1966 a - Etude ultrastructurale de l'évolution cytoplasmique au cours des premiers stades de l'ovogenèse chez *Nereis pelagica*. *C. R. Acad. Sci.*, 262, 2616-2619.
- DHAINAUT A., 1966 b- Etude ultrastructurale de l'évolution des éléocytes chez *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète) à l'approche de la maturité sexuelle. *C. R. Acad. Sci.*, 262, 2740-2743.
- DHAINAUT A., 1967 - Etude de la vitellogenèse chez *Nereis diversicolor* par autoradiographie à haute résolution. *C. R. Acad. Sci.*, 265, 434-436.
- DHAINAUT A., 1970 - Contribution à l'étude de la gamétogenèse des Néréidiens dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. Thèse Doct. Sci. Nat., Lille.
- DHAINAUT A., 1972 - Evolution nucléolaire au cours de l'ovogenèse de *Nereis pelagica* (Annélide Polychète). I. Etude morphologique. *J. Microsc.* 13, 67-84.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1967 - Evolution ovocytaire en l'absence d'hormone cérébrale chez *Perinereis cultrifera*. *C. R. Acad. Sci.*, 264, 2807-2810.
- DINAN L.N. et REES H.H., 1981 a - The identification and titers of conjugated and free ecdysteroids in developing ovaries and newly laid eggs of *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.*, 27, 51-58.
- DINAN L.N. et REES H.H., 1981 b - Incorporation *in vivo* of (4- $^{14}\text{C}$ )-cholesterol into the conjugates ecdysteroids in ovaries and eggs of *Schistocerca americana gregaria*. *Insect Biochem.*, 11, 255-265.

- DÜBENDORFER A. et MÁROY P., 1983 - Ecdysteroid metabolism in abdominal tissues of the adult female *Drosophila melanogaster*. Comm. VIth Eur. Ecdysone Workshop, Szeged, Hungary.
- DURCHON M., 1948 - Epitoquie expérimentale chez deux Polychètes : *Perinereis cultrifera* et *Nereis irrorata*. C. R. Acad. Sci., Paris, 227, 157-158.
- DURCHON M., 1952 - Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. Ann. Sc. Nat. Zool. Bio. ani., 14, 119-209.
- DURCHON M., 1956 - Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoquie chez les Néréidiens. Ann. Sc. Nat. Zool. Biol. Anim., 18, 269-273.
- DURCHON M. et SCHALLER F., 1963 - Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. C. R. Acad. Sci., 256, 5615-5617.
- DURCHON M., BOILLY B. et DHAINAUT A., 1965 - Recherches en culture organotypique sur l'action de l'hormone cérébrale des Néréidiens (Annélides Polychètes). C. R. Soc. Biol., 159, 106-113.
- DURCHON M. et PORCHET M., 1971 - Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. Gen. Comp. Endocrinol., 16, 555-565.
- DURCHON M. et JOLY P., 1978 - Endocrinologie des Invertébrés. P.U.F.
- FUCHS M.S. et KANG S.H., 1981 - Ecdysone and mosquito vitellogenesis ; a critical appraisal. Insect Biochem., 11, 627-633.
- GANDE A.R. et MORGAN E.D., 1979 - Ecdysteroids in the developing eggs of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. J. Insect Physiol., 25, 289-293.
- GOLDING D.W., 1967 - Endocrinology, regeneration and maturation in *Nereis*. Biol. Bull., 133, 567-577.
- GOLTZENE F., LAGUEUX M., CHARLET M. et HOFFMANN J.A., 1978 - The follicle cell epithelium of maturing ovaries of *Locusta migratoria* : a new biosynthetic tissue for ecdysone. Hoppe-Seyler's Z physiol. Chem., 359, 1427-1434.
- HAAG T., HETRU C., NAKATANI Y., LUU B., PIDRAT L., AUDINOT M. et MEISTER M.F. - Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals (sous presse).

- HAGEDORN H.H., 1980 - Ecdysone, a gonadal hormone in insects. *In* : Advances in Invertebrate Reproduction (Clarck W.H. and Adams T.S.), pp. 97-107. Elsevier-North Holland Inc., New-York/Amsterdam 1980.
- HAUENSCHILD C., 1955 - Photoperiodizität als Ursache des von der Mondphase abhängigen Metamorphose. Rythmus bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. Z. Naturforsch., 10, 658-666.
- HAUENSCHILD C., 1956 - Hormonale Hemmung der Geschlechtsreife und Metamorphose bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. Z. Naturforsch., 11b, 125-132.
- HETRU C., LAGUEUX M., LUU B et HOFFMANN J.A., 1978 - Adult ovaries of *Locusta migratoria* contain the sequence of biosynthetic intermediates for ecdysone. Life Sci., 22, 2141-2154.
- HETRU C., KAPPLER C., HOFFMANN J.A., NEARN R., LUU B. et HORN D.H.S., 1982 - The biosynthetic pathway of ecdysone : studies with vitellogenic ovaries of *Locusta migratoria* (Orthoptera). Cell. Mol. Endocrinol., 26, 51-80.
- HETRU C., NAKATANI Y., LUU B. et HOFFMANN J.A., 1983 - Synthesis of high specific activity  $3\text{H}_4$  (23, 24)-2-desoxyecdysone. Nouveau J. Chimie, 27, 587-591.
- HOFFMANN J.A., LAGUEUX M., HETRU C., CHARLET M. et GOLTZENE F., 1980 - Ecdysone in reproductively competent female adults and in embryos of insects. *In* : Progress in Ecdysone Research (J.A. Hoffmann ed.), pp. 431-465, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- HOFFMANN J.A. et HETRU C., 1983 - Ecdysone. Endocrinology of Insects, 65-88.
- HORN D.H.S., WILKIE J.S. et THOMSON J.A., 1974 - Isolation of  $\beta$ -ecdysone (20-hydroxyecdysone) from the parasite nematode *Ascaris lumbricoides*. Experientia, 30, 1109-1110.
- HSIAO T.H. et HSIAO C., 1979 - Ecdysteroids in the ovary and the egg of the greater wax moth. J. Insect Physiol., 25, 45-52.
- ISAAC R.E., ROSE M.E., REES H.H. et GOODWIN T.W., 1982 - Identification of ecdysone 22-phosphate and 2-deoxyecdysone-22-phosphate in eggs of the desert locust, *Schistocerca gregaria* by fast atom spectrometry and N.M.R. spectrometry. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 249-251.
- ISAAC R.E., ROSE M.E., REES H.H. et GOODWIN T.W., 1983 - Identification of the 22-phosphate esters of ecdysone, 2-deoxyecdysone, 20-hydroxyecdysone and 2-deoxy-20-hydroxyecdysone from newly laid eggs of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Biochem. J., 213, 533-541.

- KOOLMAN J., 1985 - Major Helminth infections of man detected by ecdysteroid R.I.A. of serum and urine. VIIth Ecdysone Workshop, Edinburg.
- KOOLMAN J. et SPINDLER K.D., 1983 - Mechanism of action of ecdysteroids. *Endocrinol. Insects*, 179-201.
- LAGUEUX M., HIRN M. et HOFFMANN J.A., 1977 - Ecdysone during ovarian development in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, 23, 109-120.
- LAGUEUX M., HARRY P. et HOFFMANN J.A., 1981 - Ecdysteroids are bound to vitellin in newly laid eggs of *Locusta*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 24, 325-328.
- LAGUEUX M., HOFFMANN J.A., GOLTZENE F., KAPPLER C., TSOUPRAS G., HETRU C. et LUU B., 1984 - Ecdysteroids in ovaries and embryos of *Locusta migratoria*. In : Biosynthesis, metabolism and mode of action of Invertebrate hormones. Hoffmann J.A. et Porchet M., Eds, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 168-180.
- LEGAY J.M., CALVEZ B., HIRN M. et DE REGGI M., 1976 - Ecdysone and oocyte morphogenesis in *Bombyx mori*. *Nature*, 262, 489-490.
- MENDIS A.H.W., ROSE M.E., REES H.H. et GOODWIN T.W., 1983 - Ecdysteroids in adults of Nematode *Dirofilaria immitis*. *Molec. Biochem. Parasitol.*, 209-226.
- NIRDE P., 1982 - Hormones de *Schistosoma mansoni* et interface hôte-parasite. Thèse 3ème Cycle, Université de Lille I.
- NIRDE P., DE REGGI M., TSOUPRAS G., TORPIER G., FRESSANCOURT P. et CAPRON A., 1984 - Excretion of ecdysteroids by schistosomes as a marker of parasite infection. *FEBS Letters*, 168, 235-240.
- OHNISHI E., MIZUNO T., IKEKAWA N. et AWATA N., 1977 a - Occurrence of  $\alpha$ -ecdysone in the developing embryos of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 23, 317-319.
- OHNISHI E., MIZUNO T., IKEKAWA N. et SAKURAI S., 1977 b - 2-Deoxy- $\alpha$ -ecdysone from ovaries and eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Science*, 197, 66-67.
- OHNISHI E., MIZUNO T., IKEKAWA N. et IKEDA T., 1981 - Accumulation of 2-deoxyecdysteroids in ovaries of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 11, 255-260.
- ONO S.E., NAGAYAMA H. et SHIMURA K., 1975 - The occurrence and synthesis of female- and egg-specific proteins in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 5, 313-329.

- PALEVODY C., DELBECQUE J.P. et DELACHAMBRE J., 1977 - Variations du taux des ecdystéroïdes en relation avec le cycle de mue et les cycles ovariens chez *Folsomia candida*. C. R. Acad. Sci., Paris, 285 D, 1323-1326.
- PORCHET M., 1967 - Rôle des ovocytes submatures dans l'arrêt de l'inhibition cérébrale chez *Perinereis cultrifera*. C. R. Acad. Sci., 265, 1394-1396.
- PORCHET M., 1969 - Interactions entre l'activité endocrine et l'état génital chez *Perinereis cultrifera*. Thèse 3ème Cycle, Lille.
- PORCHET M., 1974 - Activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. Thèse Doct. Sc. Nat., Lille.
- PORCHET M. et DURCHON M., 1968 - Influence de la maturité génitale sur la régénération postérieure chez *Perinereis cultrifera*. C. R. Acad. Sci., 167, 194-196.
- PORCHET M. et CARDON C., 1972 - Régulation de l'activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. C. R. Acad. Sci., 275, 2375-2378.
- PORCHET M. et CARDON C., 1976 - The inhibitory feed-back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in Nereis. Gen. Comp. Endocrinol., 30, 378-390.
- PORCHET M., GAILLET N., SAUBER B., CHARLET M. et HOFFMANN J.A., 1983 - Ecdysteroids in Annelids. Communication au 2ème Colloque International du C.N.R.S., Strasbourg.
- POSTLETHWAITE M.A. et HANDLER A.M., 1979 - The roles of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone during vitellogenesis in isolated abdomens of *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol., 25, 455-460.
- RANKIN M.A. et JACKLE H., 1980 - Hormonal control of vitellogenin synthesis in *Oncopeltus fasciatus*. J. Insect Physiol., 26, 671-684.
- REES H., GREENWOOD D.R., DINAN L.N., ISAAC R.E. et GOODWIN T.W., 1981 - Biosynthesis and metabolism of ecdysteroids. Proc. Int. Conf. on Regulation of Insect Development and Behaviour, 1980, part I, pp. 71-92, Wroclaw Technical University Press, Wroclaw, Poland.
- REYNOLDS E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 208-213.
- ROJO DE LA PAZ A., DELBECQUE J.P., BITSCH J. et DELACHAMBRE J., 1983 - Ecdysteroids in the haemolymph and the ovaries of the firebrat *Thermobia domestica* (Packard) (Insecta, Thysanura) : correlations with integumental and ovarian cycles. J. Insect Physiol., 29, 323-329.

