

50376
1985
280

50376
1985
280

N° d'ordre 1276

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

Abdallah BELHAMRA



**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU METABOLISME DES
LIPIDES NEUTRES ET DES PHOSPHOLIPIDES AU
COURS DE LA GAMETOGENESE DES NEREIDIENS
(ANNELIDES POLYCHETES).**

Présentée le 25 Juin 1985 devant la Commission d'Examen

Président
Rapporteur
Examineurs

M. PORCHET
A. DHAINAUT
J. KREMBEL
A. FISCHER

AVANT-PROPOS

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

Je remercie Monsieur le Professeur PORCHET de l'intérêt qu'il porte à mon travail. Je lui suis particulièrement reconnaissant d'avoir accepté de présider mon Jury de Thèse.

J'exprime à Monsieur le Professeur KREMBEL ma gratitude la plus vive pour tous ses conseils clairvoyants et son aide fructueuse qui ont permis la progression de ma recherche. Je le remercie d'avoir accepté de juger et de critiquer ce travail en faisant partie de mon Jury de Thèse.

Monsieur le Professeur FISCHER me fait le très grand honneur de participer à mon Jury de Thèse malgré ses multiples activités. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Je remercie aussi Monsieur FONTAINE et Monsieur BAERT pour le soutien et l'aide qu'ils m'ont apportés au cours de ce travail.

Je tiens enfin à remercier tous mes amis qui m'ont aidé durant mon séjour en France. Leur sympathie sera dans ma mémoire à tout jamais. Qu'ils veuillent bien accepter, avec ce mémoire, l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

SOMMAIRE

| | Pages |
|---|-------|
| INTRODUCTION | 1 |
| MATERIEL ET METHODES | 5 |
| I - Préparation du matériel biologique | 5 |
| 1 - Le matériel biologique | 5 |
| 2 - Séparation des constituants coelomiques | 5 |
| II - Extraction des lipides totaux | 6 |
| III - Etude qualitative des lipides | 8 |
| 1 - Lipides Neutres | 8 |
| 2 - Phospholipides | 11 |
| IV - Dosages | 12 |
| 1 - Dosage des protéines | 12 |
| 2 - Dosage du phosphore | 13 |
| V - Culture cellulaire | 15 |
| VI - Radioactivité | 15 |
| ETUDE QUALITATIVE DES LIPIDES NEUTRES | 18 |
| I - Résultats chromatographiques | 18 |
| II - Discussion | 18 |
| ETUDE METABOLIQUE DES LIPIDES NEUTRES | 24 |
| I - Etude <i>in vivo</i> | 24 |
| 1 - <i>P. cultrifera</i> | 24 |
| 2 - <i>N. diversicolor</i> | 31 |
| 3 - Discussion | 33 |

| | Pages |
|--|-------|
| II - Etude <i>in vitro</i> | 35 |
| 1 - Incorporation du glycérol ³ H | 35 |
| 2 - Incorporation d'acides gras | 37 |
| a - Acide butyrique ¹⁴ C | 37 |
| b - Acide oléique ³ H | 39 |
| 3 - Discussion | 40 |
| III - Autoradiographie | 42 |
| 1 - Résultats | 42 |
| 2 - Discussion | 43 |
| LIPOPROTEINES | 46 |
| I - Analyse <i>in vivo</i> des lipoprotéines radioactives de compartiments cellulaires | 47 |
| 1 - Protocole expérimental | 47 |
| 2 - Résultats | 48 |
| II - Synthèses <i>in vitro</i> de lipoprotéines par les cellules coelomiques | 50 |
| 1 - Protocole expérimental | 50 |
| 2 - Résultats | 51 |
| III - Libération des lipoprotéines par les cellules coelomiques dans le milieu de culture | 52 |
| 1 - Protocole expérimental | 52 |
| 2 - Résultats | 53 |
| IV - Incorporation par les ovocytes de macrolomécules synthétisées par les coelomocytes | 53 |
| 1 - Protocole expérimental | 53 |
| 2 - Résultats | 54 |
| 3 - Discussion | 55 |

| | Pages |
|---|-------|
| INTRODUCTION A L'ETUDE DES PHOSPHOLIPIDES | 57 |
| I - Etude qualitative | 57 |
| 1 - Expérience | 58 |
| 2 - Résultats | 58 |
| 3 - Discussion | 59 |
| II - Etude quantitative | 60 |
| 1 - Principe | 60 |
| 2 - Expérience | 60 |
| 3 - Résultats | 61 |
| 4 - Discussion | 64 |
| III - Etude métabolique | 65 |
| 1 - ^{32}P | 65 |
| a - <i>In vivo</i> | 65 |
| B - <i>In vitro</i> | 66 |
| 2 - Choline ^3H | 68 |
| a - <i>In vivo</i> | 68 |
| b - <i>In vitro</i> | 70 |
| c - Etude autoradiographique | 72 |
| 3 - Discussion | 73 |
| CONCLUSION GENERALE | 75 |
| BIBLIOGRAPHIE | 78 |

ABRÉVIATIONS

| | |
|----------------------|--|
| AG | : Acide Gras Libre. |
| AGE | : Acide Gras Estérifié. |
| CCM | : Chromatographie sur couche mince. |
| Coe | : Coelomocytes. |
| Cpm/g _{sec} | : Cpm par gramme d'extrait lyophilisé. |
| Cpm/γ | : Cpm par γ de protéines. |
| DG | : Diglycéride. |
| DO | : Densité Optique. |
| F.S.C. | : Fraction soluble coelomocytaire. |
| F.S.O. | : Fraction soluble ovocytaire. |
| LC | : Liquide coelomique. |
| LN | : Lipides Neutres. |
| LT | : Lipides Totaux. |
| LPC | : Lysophosphatidylcholine. |
| MG | : Monoglycéride. |
| OVO | : Ovocytes. |
| PC | : Phosphatidylcholine. |
| PE | : Phosphatidyléthanolamine. |
| PG | : Phosphatidylglycérol. |
| PH | : Phospholipides. |
| PI | : Phosphatidylinositol. |
| SM | : Sphingomyéline. |
| PS | : Phosphatidylsérine. |
| SE | : Stérol Estérifié. |
| SL | : Stérol Libre. |
| TCA | : Acide Trichloroacétique. |
| TG | : Triglycéride. |
| ∅ | : Diamètre ovocytaire. |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

En dehors de son rôle génétique, une des fonctions de l'ovocyte est de fournir les réserves qui serviront à alimenter le jeune embryon. Ces réserves se subdivisent en deux catégories : le vitellus ("yolk" des auteurs anglo-saxons) et les lipides, regroupés pour une grande part en des lobules de taille importante. Si les modalités d'élaboration et de stockage du vitellus ont été abondamment étudiées chez un grand nombre d'espèces animales, il n'en est pas de même des lipides, qui pourtant constituent une partie importante des réserves (près de 40 % en poids sec dans notre matériel). Ceci résulte vraisemblablement des difficultés techniques inhérentes à ce type de travaux. Chez les Invertébrés, ce sont les Insectes où les synthèses lipidiques ont été le mieux étudiées. Ainsi chez *Locusta migratoria*, le stockage, le transport et l'utilisation des lipides ont été étudiés par CHINO (1969), YOCHANAN (1973) puis par WHEELER (1984).

Les Néréidiens constituent un modèle biologique favorable pour aborder un tel problème. Les ovocytes en effet sont libres dans la cavité coelomique, cavité qui renferme en outre le milieu intérieur ou liquide coelomique et des cellules somatiques : les coelomocytes. Le rôle des interactions cellulaires dans la synthèse du vitellus a été précisé récemment. Chez *Nereis virens*, des réactions immunologiques ont montré l'existence d'identités antigéniques entre une vitelline ovocytaire et le liquide coelomique (FISCHER, 1979) ; les modalités d'incorporation de cette macromolécule ont été visualisées à la fois en fluorescence (FISCHER, 1981) et en autoradiographie (FISCHER et DHAINAUT, 1985). De même à partir des ovocytes de *Perinereis cultrifera* BAERT *et al.* (1984) ont isolé plusieurs formes de vitellines dont les processus de maturation ont été suivis au cours de l'ovogénèse. Les travaux en cours montrent que ce sont les coelomocytes qui synthétisent et libèrent dans le liquide coelomique une vitellogénine laquelle, incorporée par l'ovocyte va constituer l'élément précurseur des vitellines.

Notons également que des ovocytes isolés sont capables d'incorporer des petites molécules, tels les acides aminés (DHAINAUT, 1967 ; DHAINAUT

et PORCHET, 1977 a, b). Le rôle des protéines ainsi synthétisées est actuellement en cours d'investigation.

Dans le champ d'étude des lipides, les recherches chez les Annélides sont beaucoup moins avancées. Beaucoup de travaux n'ont porté que sur la composition globale des lipides dans l'ensemble du corps. Des travaux analogues ont été réalisés par WILBER et BAYORS (1947) sur plusieurs espèces d'Annélides marines et notamment sur *Nereis pelagica*. DE JORGE et PETERSON (1968) ont fait une étude biochimique globale, selon la maturité, du ver *Chaetopterus variopedatus*. De même VOOYS (1975) a dosé la teneur en glycogène et en lipides totaux chez *Arenicola marina*.

Dans le domaine de la gamétogenèse, DURCHON et LAFON (1951) font figure de pionniers. Ils ont noté que la multiplication et la maturation des cellules germinales semblent s'effectuer au dépens des éléocytes et s'accompagnent de changements importants dans la composition chimique du liquide coelomique.

Plus récemment, FONTAINE (1982) a effectué un travail important concernant le dosage des différentes classes lipidiques chez *Perinereis cultrifera*. Il a montré que les acides gras libres augmentent de façon importante dans les ovocytes, alors que les triglycérides diminuent, ainsi que les monoglycérides et diglycérides, à partir de 180 μ m. Par contre, à des stades avancés de l'ovogenèse, on note la présence en grande quantité de ces éléments dans le liquide coelomique. Cependant l'aspect métabolique restait plus préliminaire, n'ayant pu être réalisé que sur une seule espèce (*P. cultrifera*) et à des stades jeunes. C'est dans l'esprit d'une continuation du travail entrepris par FONTAINE que le présent sujet nous a été confié.

Nous avons vu antérieurement que l'élaboration du vitellus résulte d'une synthèse par les coelomocytes de macromolécules transférées aux ovocytes par l'intermédiaire du liquide coelomique. On pouvait se demander si un modèle similaire existait en ce qui concerne la synthèse des lipides. Pour aborder une pareille question, l'examen de cinétiques d'incorporation *in vivo* de précurseurs ne donne que des résultats difficilement interprétables étant donné l'intrication des voies métaboliques. Nous avons donc réalisé une partie importante de notre travail *in vitro*, techniques qui permettent de suivre l'évolution respective des compartiments cellulaires et de tester leur capacité de synthèse.

MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - PRÉPARATION DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1 - Le matériel biologique

Les deux espèces de *Nereidae* étudiées ici sont *Perinereis cultrifera* et *Nereis diversicolor*. La première espèce a été récoltée à Luc-sur-Mer (Calvados) alors que la deuxième vient de Fort-Philippe (Pas-de-Calais). Au laboratoire, tous les animaux sont isolés. Leur état génital est déterminé par examen microscopique et mensuration, à l'oculaire micrométrique, des ovocytes issus d'une ponction coelomique. Le diamètre ovocytaire d'un individu est déterminé en faisant la moyenne d'une trentaine d'ovocytes. Les *Perinereis cultrifera* sont conservées à l'obscurité à 14°C dans l'eau de mer filtrée et ne sont pas nourries. Les *Nereis diversicolor* sont conservées elles aussi dans les mêmes conditions, mais à 4°C.

2 - Séparation des constituants coelomiques

Le contenu coelomique de l'animal est prélevé par ponction intracoelomique grâce à une pipette Pasteur. Il est constitué du liquide coelomique, des ovocytes et des coelomocytes (éléocytes et leucocytes). Deux méthodes de séparation de ces différents constituants sont possibles :

1ère méthode (PORCHET, 1974) : après une première centrifugation, on a un dépôt constitué par les éléments figurés, le surnageant étant le liquide coelomique. Ce dernier est donc recueilli, on fait ensuite quatre lavages du culot à l'eau de mer suivis à chaque fois d'une légère centrifugation et d'un recueil du surnageant. Finalement, on obtient un culot d'ovocytes, les quatre surnageants étant constitués essentiellement de coelomocytes.

2ème méthode : on utilise du Ficoll 7,5 % dans du tampon phosphate (50 mM) (pH 7,4) auquel est ajouté du NaCl 33 %.

Les cellules sont mises en suspension dans 10 ml de tampon phosphate en agitant au Vortex. La suspension des cellules est ensuite disposée très soigneusement sur la solution de Ficoll disposée dans un tube

conique. L'ensemble est placé dans un cristallisateur rempli de glace.

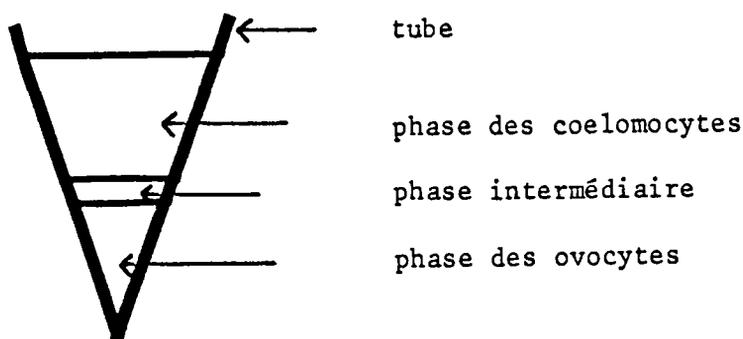


Fig. 1 : "Séparation du contenu coelomique dans une solution de Ficoll".

Après 10 minutes on obtient trois phases (fig. 1). Chacune est centrifugée pendant 1 minute à 3 000 t/mn. Les trois culots sont repris par du tampon puis redéposés sur du Ficoll. Après 10 mn d'attente, on recentrifuge et élimine le Ficoll. Ensuite les cellules sont lavées avec du tampon Tris 50 mM + NaCl 0,15 M pH 7,4.

II - EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX

Protocole expérimental

Coelomocytes et ovocytes sont broyés au Dounce. Le liquide coelomique et les broyats cellulaires sont lyophilisés et pesés avant d'en extraire les lipides.

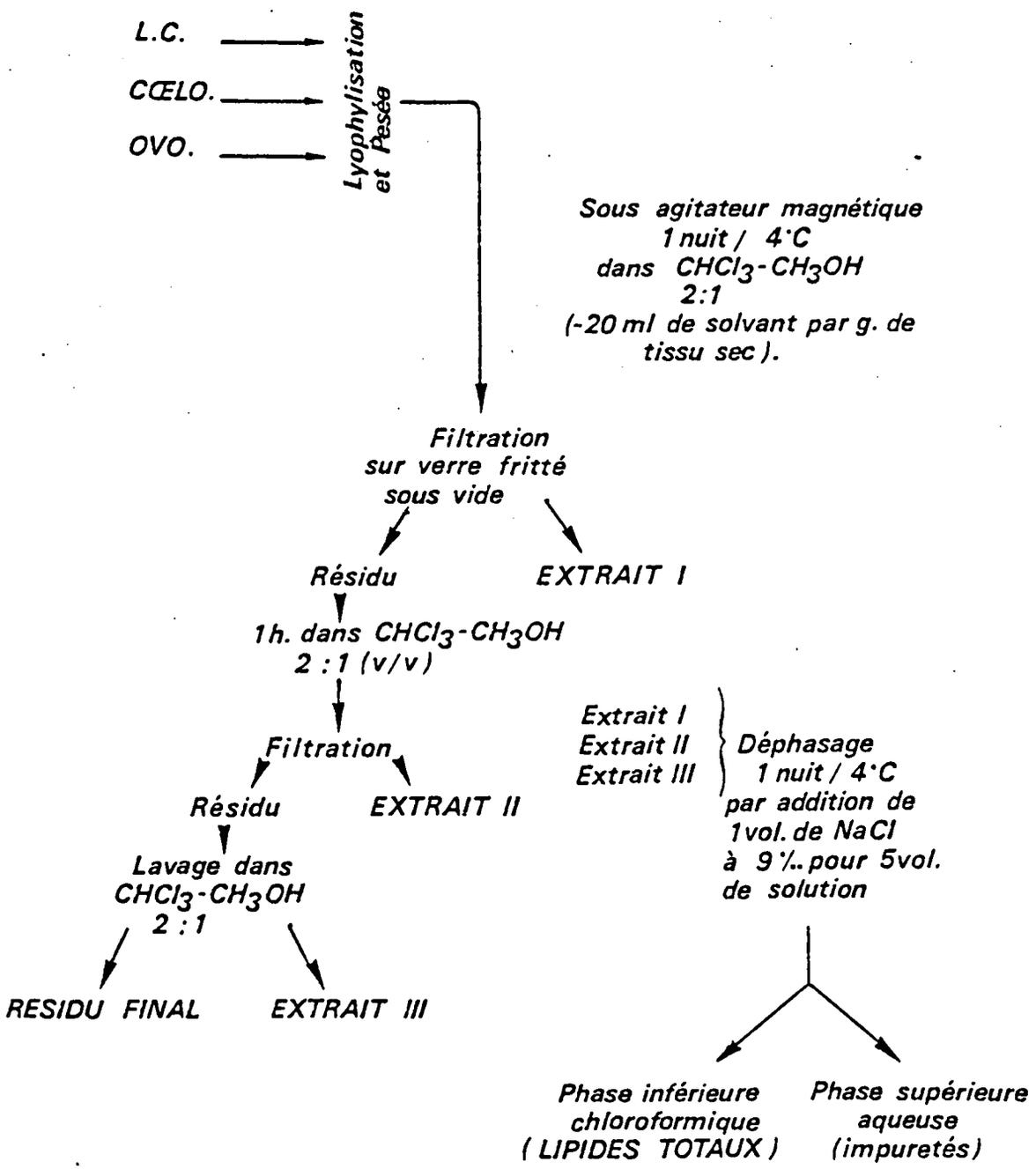
Les techniques d'extraction des lipides sont très nombreuses. La technique de J. FOLCH (1952, modifiée en 1957) est la plus utilisée pour le matériel animal. Il s'agit d'un mélange de chloroforme-méthanol dans les proportions 2:1 (v/v). Dans ce solvant, le méthanol dénature les protéines alors que le chloroforme favorise la mise en solution des lipides.

Un certain nombre d'auteurs utilisent le mélange à 4°C (BARTSCH, 1970 ; KWITEROVICH *et al.*, 1970 ; SUGITA *et al.*, 1974...). Nous avons manipulé à cette température qui empêche l'activité des lipases et diminue l'évaporation du solvant.

Réactifs : Solvant d'extraction : chloroforme/méthanol,
NaCl 9 ‰.

Extraction : (voir fig. 2).

Fig. 2 : " PROTOCOLE D'EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX "



Chaque extrait sec après lyophilisation est placé une nuit, sous agitation magnétique, à 4°C dans le système solvant d'extraction (20 ml de solvant par gramme de tissu sec). On filtre sur verre fritté —> Extrait I.

L'insoluble est repris pendant 1 heure dans CHCl₃/CH₃OH (2/1). Cette fois-ci 10 ml par gramme suffisent. On filtre à nouveau sur verre fritté —> Extrait II.

On reprend de nouveau l'insoluble par le même solvant puis filtration —> Extrait III.

Pour éliminer les substances non lipidiques solubilisées dans le solvant, les filtrats I, II et III sont rassemblés et subissent un déphasage selon la technique de FOLCH : on ajoute un volume de NaCl 9 % pour cinq volumes de solvant. Le déphasage se fait pendant une nuit à 4°C. Les substances hydrosolubles passent dans la phase hydroalcoolique supérieure. La phase chloroformique renferme les lipides totaux.

III - ETUDE QUALITATIVE DES LIPIDES

Les lipides totaux contiennent deux grandes classes de lipides :

- les lipides neutres (LN) (Monoglycérides, Diglycérides, Triglycérides, stérols, stérols estérifiés et les Acides Gras...),
- les phospholipides (phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, phosphatidyléтанолamine, phosphatidylcholine....)

On sépare les LN des autres classes de lipides par les méthodes de BERTHILLIER, LETOUBLON et GOT (1977) : les lipides totaux sont séchés sous azote et le résidu sec est solubilisé dans une petite quantité de solvant de FOLCH (1 ml). On ajoute ensuite une grande quantité d'acétone (6 à 8 fois plus). Les phospholipides sont insolubles dans l'acétone et vont alors précipiter après une centrifugation à 6 000 t/mn pendant 10 mn. On obtient dans le surnageant les lipides neutres ; le culot est constitué par les phospholipides. Pour sauvegarder la stabilité des échantillons lipidiques (YEE *et al.*, 1980), le surnageant acétonique (lipides neutres) est séché sous azote et stocké à 4°C. Le culot (phospholipides) est redissous dans le FOLCH et lui aussi stocké sous azote.

1 - Les différentes classes de lipides neutres

La principale technique utilisée est la chromatographie sur couche mince (KORTE et CASEY, 1982). Plusieurs points de méthodologie sont à examiner.

- choix du solvant,
- localisation des taches correspondant aux différents lipides neutres,
- identification de ces lipides.

a - Les plaques de chromatographie

Nous avons utilisé les plaques de Gel de Silice G (Kieselgel 60, Merck).

Afin de débarrasser les plaques de tout contaminant, on y fait migrer pendant une nuit le système solvant. Après séchage, on dépose les échantillons. D'autre part, pour activer les plaques on les place à l'étuve une heure à 100°C (BOBBIT *et al.*, 1972).

b - Dépôt de l'échantillon (fig. 3)

L'échantillon est dissous dans le FOLCH. Le dépôt est effectué à l'aide de micropipettes graduées.

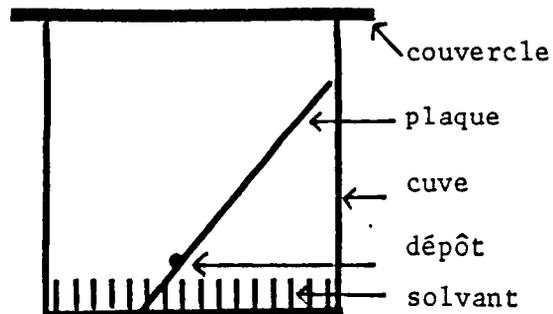
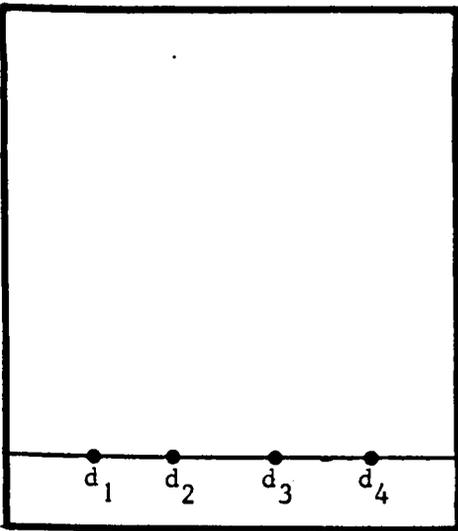


Fig. 3 : "Plaque de chromatographie avec les différents dépôts (d_1, d_2, d_3, d_4); et son emplacement dans une cuve de chromatographie".

c - Choix du solvant

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

hydrocarbures légers (éther de pétrole, hexane, heptane, etc...), cyclohexane, tétrachlorure de carbone, trichloroéthylène, toluène, benzène, dichlorométhane, chloroforme, éther éthylique, acétate d'éthyle, acétone, n-propanol, éthanol, méthanol, eau.

En faisant des essais avec les quatre solvants soulignés, on a pu comparer les résultats après révélations des taches et définir le

mélange de solvants qui donne les meilleurs résultats. D'autre part, l'addition de certaines substances entraîne une diminution des "traînées" et améliore les séparations. On a ainsi ajouté l'acide acétique glacial (environ 1 %) au mélange de solvant de développement.

d - Révélation des taches

Différentes techniques ont été mises en oeuvre :

Par vaporisation d' H_2SO_4 à 5 % puis chauffage à 100°C

.....
pendant 15 mn.

. Avantage : la coloration des taches se fait différemment. Ainsi les stéroïls apparaissent rapidement, sous forme d'une tache rouge vif, qui devient ensuite violacée.

. Inconvénient : ce révélateur est destructif et les lipides sont alors inutilisables après la révélation.

Vapeurs d'iode : les plaques séchées, pour les débarrasser du solvant qui les imprègne, sont mises dans une cuve saturée en vapeur d'iode. L'iode se fixe alors sur les doubles liaisons. Les lipides apparaissent alors sous forme de taches brunes.

Comme pour l'acide sulfurique la révélation à l'iode est rapide mais les lipides ne sont plus utilisables pour les analyses ultérieures.

La Rhodamine : ce révélateur a été préparé selon la méthode de DELBART (1978). Une solution mère de Rhodamine 6 G à 50 mg/litre d'eau est diluée avec une solution de NaOH 4N (1 vol/1vol).

Après pulvérisation et examen des plaques, encore humides, sous lumière UV, les lipides neutres apparaissent en jaune. La visualisation se fait à 365 nm. Ce réactif n'est pas destructif et est spécifique des lipides.

Technique de WRIGHT (1971) : on vaporise une solution de
1 ml de primuline (0,1 g dans 100 ml d'eau) avec 100 ml d'acétone et d'eau (4:1, v/v). La visualisation sous UV donne une fluorescence jaune pâle ou bleu pâle ce qui permet de révéler les stéroïls, les acides gras et les glycérides. C'est un réactif non destructif.

e - Identification des taches

C'est par utilisation de témoins qu'on a pu identifier nos différentes taches. Ces témoins sont :

α -Monopalmitin, Sigma.

Cholesteryl Arachidonate, Sigma.

Dipalmitin (Mixture of 1.2 et 1.3 Isomers), Sigma.

Nonadecanoic Acid methyl ester (C.19), Sigma.

Linoleic Acid (Cis 9-Cis 12-Octadecadienoic Acid), Sigma.

f - Réactions spécifiques

Elles sont réalisées après grattage du gel de silice contenant les taches, et après élution. Ainsi pour les stérols :

- réaction de LIEBERMAN-BURCHARD : cette réaction caractérise généralement les stérols possédant un hydroxyle en 3, β -équatorial et une double liaison en 5-6 ; les cétostérols et les stérols saturés donnent le plus souvent une réaction négative. Il y a apparition d'une coloration verte si l'on ajoute à une solution chloroformique d'un stérol un peu de mélange d'anhydride acétique-acide sulfurique (9:1).
- réaction de SALKOWSKI : aux stérols en solution chloroformique on ajoute 1 volume d' H_2SO_4 pur. On obtient après agitation deux couches superposées :
 - . couche chloroformique rouge sang : cholestérol
 - incolore : ergostérol
 - . couche chloroformique rouge brun
 - avec une fluorescence verte : cholestérol
 - rouge intense : ergostérol

Remarque : le solvant d'élution varie d'un auteur à l'autre. Citons :

BARAUD (1973) qui utilise pour tous les lipides le mélange $CHCl_3/MeOH/H_2O$ (6,5:2,5:4,5 ; v/v/v). BOLLADE et BOUCROT (1973) utilisent le $CHCl_3/MeOH$ (1:1 ; v/v). TURNER et HUTCHISON (1979) utilisent le $CHCl_3/MeOH$ (2:1 ; v/v) pour tous les lipides. C'est ce dernier solvant que nous avons utilisé.

2 - Les différentes classes de phospholipides

Les phospholipides ont aussi été séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice G. Pour la préparation des plaques et le dépôt des échantillons, voir ce qui a déjà été dit pour la chromatographie sur couche mince des lipides neutres.

a - Systèmes solvants

Nous avons essayé initialement plusieurs systèmes de solvants :

- . $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (90:10)
- . $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:25:4)
- . $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (60:30:6:1)

mais nous n'avons pas obtenu une bonne séparation de nos différentes taches. Certains auteurs utilisent d'autres modes de systèmes pour séparer les phospholipides. Par exemple, SKIPSKI, PETERSON et BARCLAY (1964) utilisent le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ mais dans les proportions (25:15:4:2), par volume. KORTE et CASEY utilisent le mélange $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Triéthylamine}$ (30:34:8:35) ; c'est ce dernier système qui nous a semblé le plus adapté pour notre séparation.

b - Localisation des phospholipides

Pour la localisation des taches on a utilisé les mêmes techniques que pour les lipides neutres à savoir :

- . Vaporisation d' H_2SO_4 à 5 %,
- . Vapeurs d'iode,
- . Rhodamine 6 G.

c - Identification des taches

Comme pour les lipides neutres, ici aussi on a eu recours à des témoins :

L-3 phosphatidylcholine, Sigma.
Phosphatidylsérine pig brain, Sigma.
Phosphatidylinositol pig liver, Sigma.
DL phosphatidyléthanolamine, Sigma.
La-phosphatidyl DL glycérol, Sigma.
Lysophosphatidylcholine, Sigma.
Sphingomyéline, Sigma.

IV - DOSAGES

1 - Dosage des protéines

Il existe plusieurs techniques de dosage des protéines, notamment celle de LOWRY (1951) et celle de BRADFORD (1976).

Pour nos dosages nous avons utilisé cette deuxième technique.

. Principe

Il s'agit d'un dosage colorimétrique. En effet le réactif de BIORAD permet le développement d'une coloration bleue en présence des pro-

téines. Cette coloration est proportionnelle à la quantité de protéines analysée. Par l'utilisation de quantités connues de protéines nous avons pu établir une courbe étalon existant entre les quantités de protéines et la densité optique lue au spectrophotomètre à 595 nm.

2 - Dosage des phospholipides

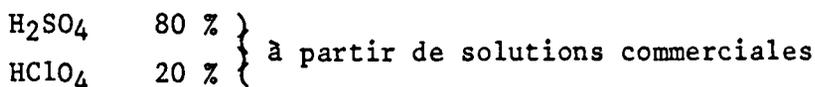
a - Principe

Le dosage colorimétrique du phosphore, selon FISKE et SUBBAROW (1925) a été adapté par BARTLETT (1959). Il permet d'évaluer la quantité de phospholipides présents dans les lipides totaux. Après avoir détruit la matière organique avec un mélange sulfo-perchlorique, on transforme l'acide phosphorique en acide phosphomolybdique, que l'on réduit par l'acide l amino-naphtol-4-sulfonique. Il se développe une couleur bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phosphore organique.

b - Dosage du phosphore

α - Minéralisation

Le gel contenant les phospholipides est gratté puis chaque tache est éluée par 1 ml du FOLCH pendant 24 h à 4°C. Après centrifugation (6000 t/mn, 10 mn), le surnageant est alors recueilli et séché sous azote dans un tube pyrex. Le résidu sec est ensuite minéralisé avec le mélange



et 100 mg d'oxyde de Vanadium pour 100 ml de solution. Pour chaque tube, on met 0,4 ml du réactif de minéralisation et on chauffe au bec Bunsen à 80°C environ pendant 40 secondes, en agitant énergiquement pour éviter les projections jusqu'à l'émission des vapeurs blanches.

β - Etude quantitative (Méthode de BARTLETT modifiée)

On homogénéise dans un mortier les éléments suivants :

- | | | | |
|---------------------------------|----|---|-----------|
| - acide aminonaphtol sulfonique | 1 | } | par poids |
| - métabisulfite de sodium | 60 | | |
| - sulfite de sodium | 2 | | |
| - molybdate d'ammonium | 20 | | |

Le mélange est stable pendant plusieurs mois, lorsqu'il est conservé dans un endroit sombre et sec. Une solution aqueuse est faite à partir du mélange à raison de 0,83 g pour 100 ml d'eau distillée. A chaque échantillon minéralisé, sont ajoutés 10 ml de cette solution et les tubes sont chauffés à 100°C, dans un bain-marie d'eau bouillante, pendant 8 mn.

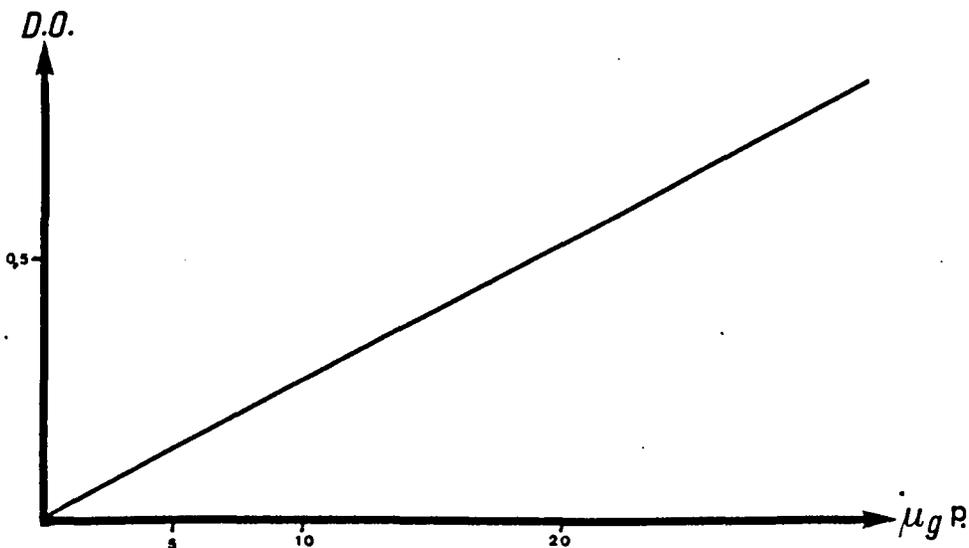
Après refroidissement, la coloration bleue est lue à 830 nanomètres sur un spectrophotomètre. Le dosage suit la Loi de BEER LAMBERT pour des concentrations de phosphore comprises entre 5 et 100 µg. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de phosphore contenue dans l'échantillon.

γ - Gamme étalon

.....
La gamme étalon est réalisée à partir du phosphate

de sodium monopotassique ou dihydrogénophosphate de potassium pur et sec (KH_2PO_4) en solution dans l'eau distillée à raison de 100 µg/ml. On dilue au 1/5 la solution standard contenant 100 µg de phosphore par ml, et on prélève les quantités nécessaires pour avoir 0, 5, 10, 20 et 30 µg de phosphore pour chaque point de la gamme étalon.

Figure 4 - Dosage du phosphore - Gamme étalon.



On réalise pour chaque série expérimentale un "blanc", à partir de 0,4 ml du réactif de minéralisation et de 10 ml d'eau distillée.

δ - Expression des résultats et précision de la mesure

.....
Les quantités de phosphore contenues dans chaque classe

de phospholipides sont lues sur la gamme étalon et exprimées en γ de phosphore par γ de protéines de l'échantillon.

Cette technique permet de doser jusqu'à 50 µg de phosphore avec une précision de 1 % (BLANCHIER, 1981).

V - CULTURES CELLULAIRES

1 - Milieu de culture

Deux à trois jours avant traitement, les animaux sont isolés dans de l'eau de mer stérile (pour 200 ml d'eau de mer, on ajoute 1 ml de pénicilline B (500 000 UI), 2 gouttes de streptomycine G (500 000 UI) et 0,6 ml de polymyxine.

Le milieu de culture est le TC 199 commercial (Eurobio) modifié au laboratoire par SLOMIANNY (D.E.A. 1984). Pour 100 ml du milieu

il faut :

- . TC 199, pH 7,15 : 8 ml
- . Solution saline : 72 ml
- . Ovalbumine : 1,6 ml
- . H₂O glucosée (1‰) : 1,6 ml
- . Pénicilline (500 000 UI dans 1 ml d'eau de mer stérile) : 1,6 ml

2 - Applications

Le ponctionnement des animaux, la séparation des cellules et la préparation du milieu de culture se font en salle stérile. Les cellules sont alors placées en milieu de culture dans des salières. A t = 0, le précurseur est ajouté au milieu de culture. Après incorporation, les cellules sont récupérées par centrifugation puis lavées par le milieu de culture froid. Elles sont ensuite lyophilisées et traitées au CHCl₃/MeOH (2:1) pour l'extraction des lipides et l'étude de la radioactivité.

VI - RADIOACTIVITE

L'utilisation d'isotopes marqués présente un grand intérêt pour suivre les processus de biosynthèse des macromolécules. Ainsi dans plusieurs de nos expériences nous avons utilisé des précurseurs radioactifs :

. Glycérol ¹⁴C et glycérol ³H : ce sont des précurseurs spécifiques des glycérides et phosphoglycérides, mais ils peuvent donner lieu à une synthèse d'autres types de molécules (stérols, AG, glycogène...).

. Acide oléique ³H et acide butyrique ¹⁴C : ce sont des acides gras. Ils donnent naissance aussi à une synthèse de glycérides et phosphoglycérides par liaison avec le glycérol mais par dégradation ils peuvent s'orienter vers d'autres voies métaboliques (glucides, protéines...).

. ^{32}P : précurseur de toutes les molécules phosphorylées (phosphoglycérides, enzymes phosphorylés, acides nucléiques...).

. Choline ^3H : c'est un précurseur spécifique de certaines classes de phospholipides comme la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine.

. Acétate ^{14}C : ce précurseur constitue un carrefour pour plusieurs voies métaboliques (glucides, lipides et protéines).

. Autoradiographie

Les échantillons (ovocytes et coelomocytes) sont fixés dans une solution de glutaraldehyde à 6 % pendant 3 heures et post-fixés au tétroxyde d'osmium à 1 % pendant 1 heure. Les solutions sont tamponnées avec du phosphate 0,1 M et une solution de NaCl (2,5 %) est ajoutée pour maintenir une osmolarité analogue à celle de l'eau de mer (950 mOsm). La déshydratation est réalisée par l'éthanol. Les bains d'oxyde de propylène sont réduits à 2 fois 10 minutes pour réduire les processus de dissolution des lipides.

Pour l'autoradiographie en microscopie photonique, les coupes semi-fines sont recouvertes d'émulsion Ilford K 5 ou Kodak NTB 3. La durée moyenne d'exposition est de 15 jours.

Pour l'autoradiographie à haute résolution, les coupes sont réalisées avec un ultramicrotome KLB UM III et traitées selon la méthode de LARRA et DROZ (1970). L'émulsion photographique utilisée est l'émulsion L 4 d'Ilford. La révélation est effectuée au microdol X après des temps d'exposition variant de 6 à 9 semaines.

ETUDE QUALITATIVE DES LIPIDES NEUTRES

ÉTUDE QUALITATIVE DES LIPIDES NEUTRES

I - RESULTATS CHROMATOGRAPHIQUES (C.C.M.)

Les *P. cultrifera* utilisées pour cette expérience ont un diamètre ovocytaire compris entre 100 et 130 μm . Après séparation des différents compartiments (L.C., ovocytes et coelomocytes), les échantillons sont lyophilisés. L'obtention et la séparation des différentes classes de lipides neutres se font suivant les techniques indiquées dans le chapitre Matériel et Méthodes. Pour les trois types de révélations utilisés : H_2SO_4 5 %, Rhodamine, vapeurs d'iode, les résultats sont les mêmes pour tous les dépôts (voir figure 5 et photos 1, 2, 3 et 4). Les types de lipides trouvés sont (par ordre de R_f croissant) : Monoglycérides - Diglycérides - Stérois libres - Acides gras libres - Triglycérides - Acides gras estérifiés (wax esters) et Stérois estérifiés.

Nous avons fait d'autre part la même étude qualitative sur des animaux mâles. Nous avons constaté les mêmes classes de LN chez les mâles et les femelles. Chez les mâles l'étude a été menée sur deux compartiments : éléments figurés (coelomocytes et spermatocytes) d'une part et liquide coelomique d'autre part (voir figure 5-1).

II - DISCUSSION

a - Solvant d'extraction

Le solvant d'extraction (FOLCH) que nous avons utilisé n'est qu'un système parmi tant d'autres. En effet les techniques d'extraction de lipides totaux varient selon les auteurs. BLIGHT et DYER (1959) utilisent le mélange chloroforme-méthanol-eau (2:2:1). Travaillant sur l'hémolymphe de *Periplaneta americana*, BOLLADE et BOUCROT (1973) réalisent l'extraction par le chloroforme-méthanol (3:1) pendant une nuit à 20°C. KORTE et CASEY (1982) font l'extraction des lipides à partir de cultures cellulaires, en utilisant le système préconisé par FOLCH (1957) : chloroforme-méthanol (2:1). Quant à WIEGAND et IDLER (1982) qui travaillent sur les ovaires des truites arc-en-ciel, leur système d'extraction est le tétrahydrofurane-éthanol.

Figure 5-1 - "Séparation sur CCM des différents LN chez le mâle et chez la femelle"

(a) Témoin cholestérol.

(b) Les différents Lipides Neutres identifiés dans les éléments figurés du mâle.

(c) Les différents Lipides Neutres identifiés dans les ovocytes d'une femelle de diamètre ovocytaire = 130 μ m.

- Solvant de séparation : Ether de pétrole/Diéthyl éther/ acide acétique (80:20:1).

- Réactif de révélation : vapeurs d'iode.

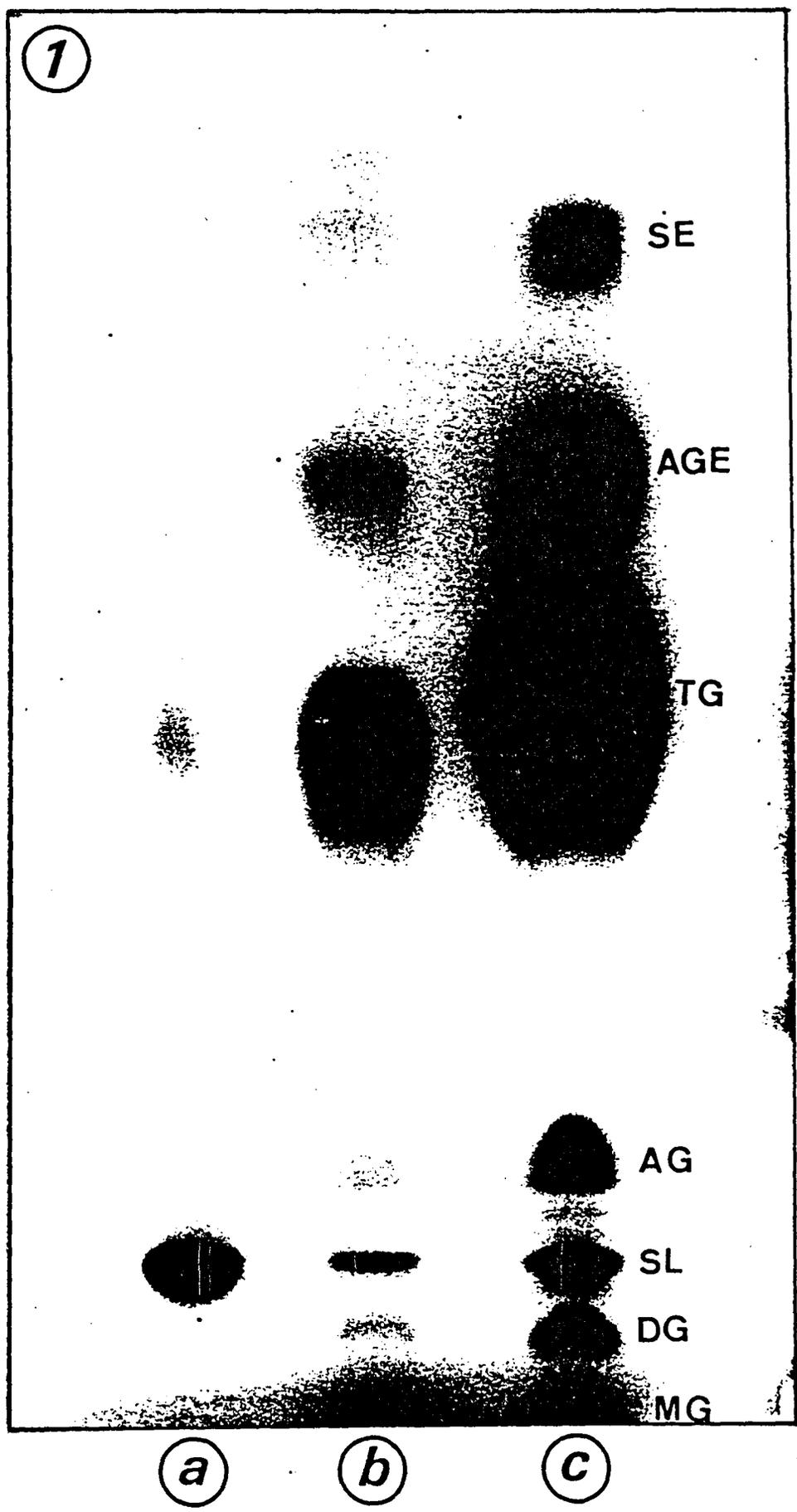


Figure 5-2 - "Séparation sur CCM des différents LN de *Perinereis cultrifera*.

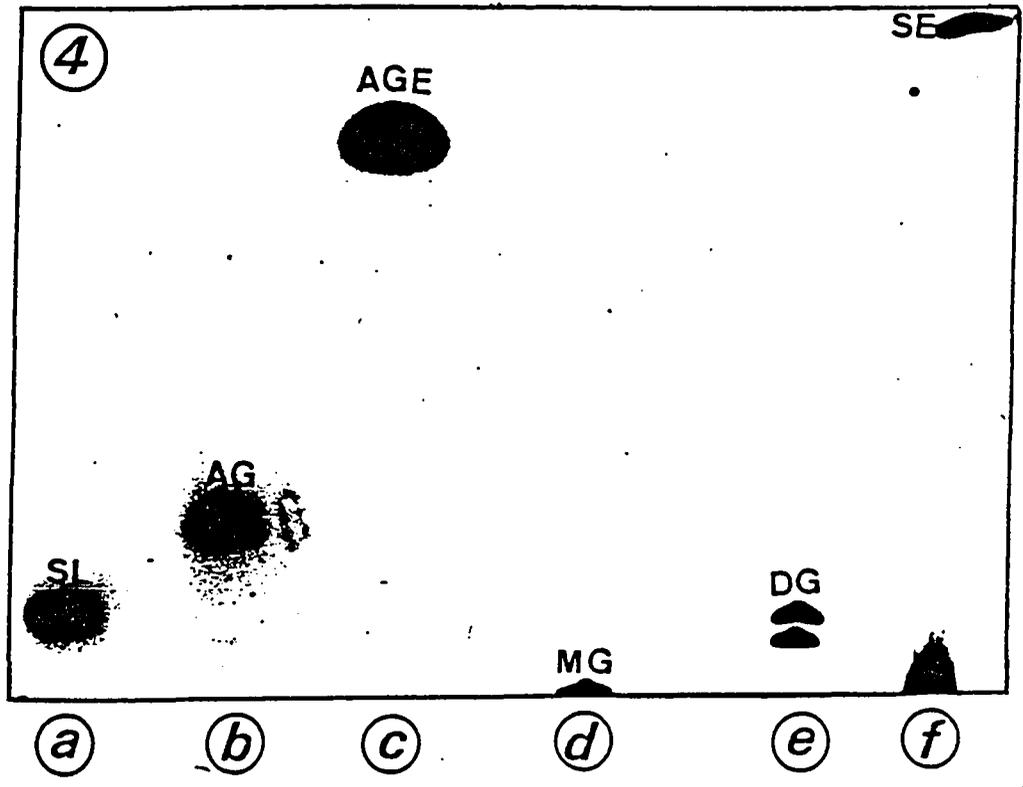
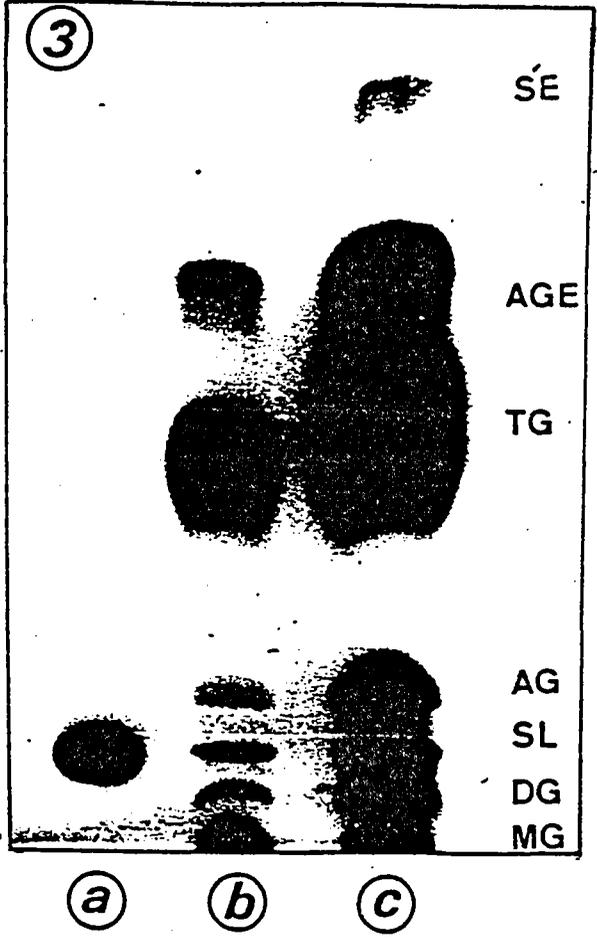
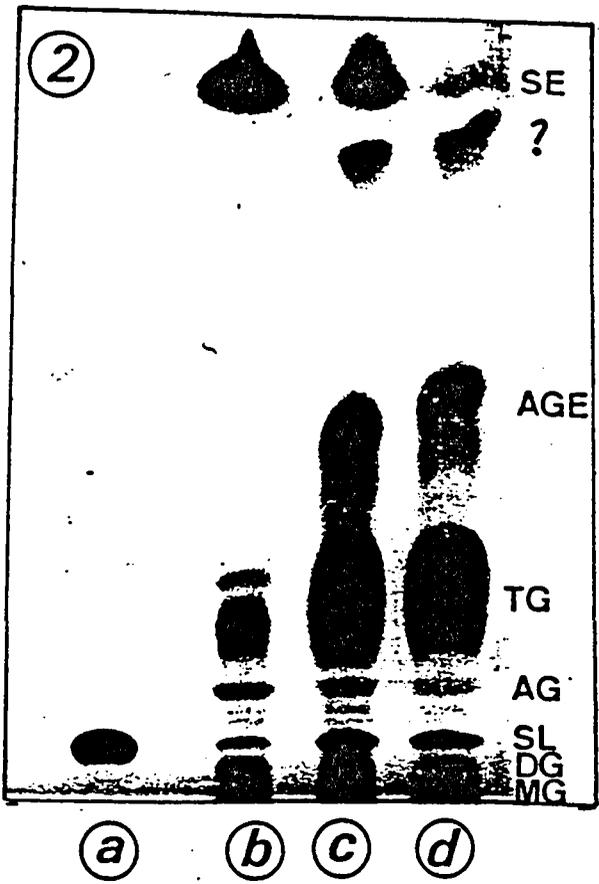
- (a) Témoin cholestérol.
 - (b) Les différents Lipides Neutres identifiés dans le L.C. d'une femelle de diamètre ovocytaire = 100 µm.
 - (c) Les différents Lipides Neutres identifiés dans les ovocytes du même animal.
 - (d) Les différents Lipides Neutres identifiés dans les coelomocytes du même animal.
- Solvant de séparation : n-heptane/diéthyl éther/acide acétique (75:25:4).
- Réactif de révélation : vapeurs d'iode.

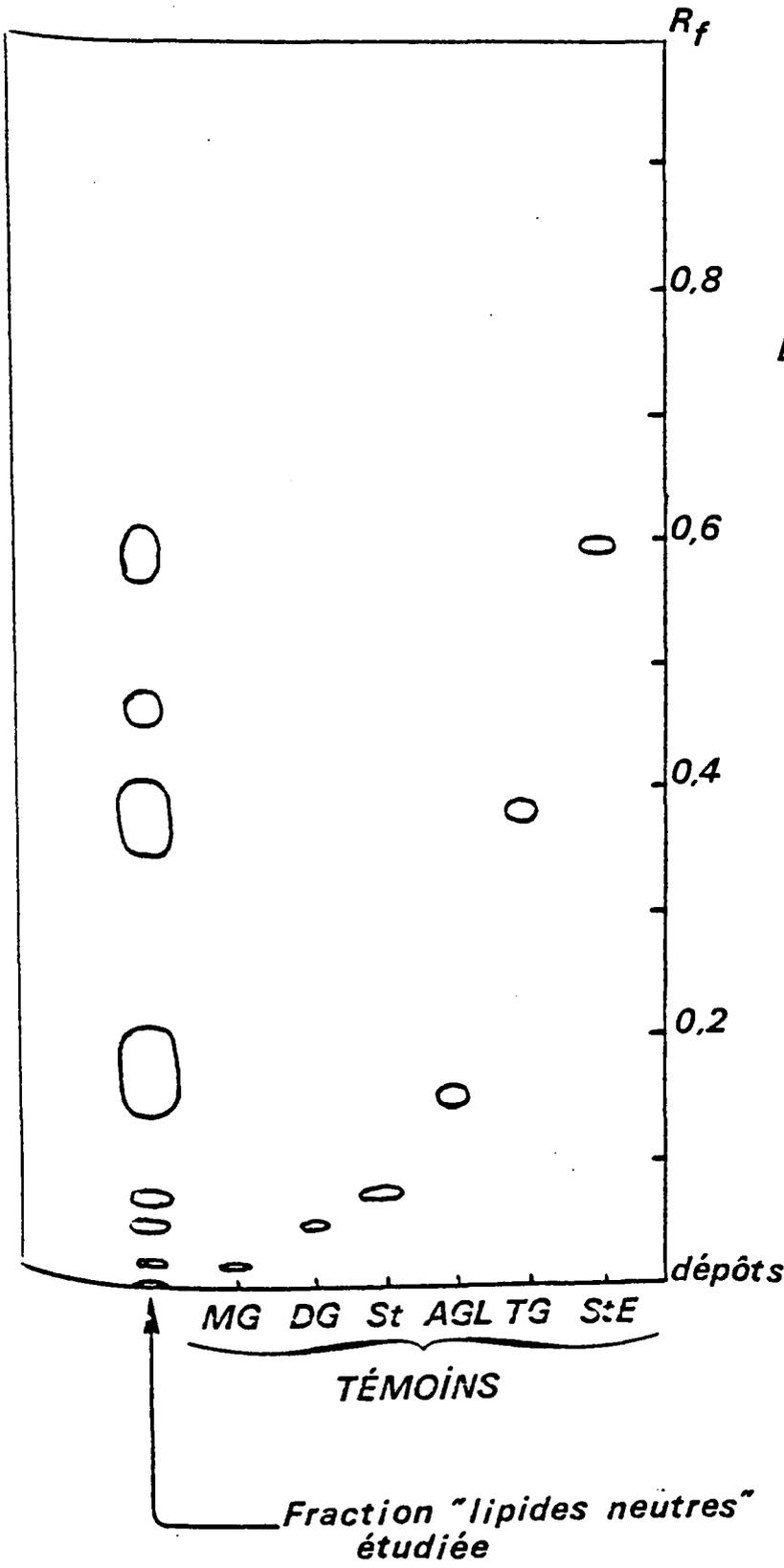
Figure 5-3 - "Séparation sur CCM des différents LN de *Perinereis cultrifera*.

- (Séparation à l'éther de pétrole).
- (a) Témoin cholestérol.
 - (b) Les différents Lipides Neutres identifiés dans le L.C. d'une femelle de diamètre ovocytaire : 100 µm.
 - (c) Les différents Lipides Neutres identifiés dans les ovocytes du même animal.
- Solvant de séparation : Ether de pétrole/diethyl éther/acide acétique (80:20:1).
- Réactif de révélation : vapeurs d'iode.

Figure 5-4 - "Localisation des témoins de référence après leur migration sur CCM".

- Solvant de séparation : Ether de pétrole/diethyl éther/acide acétique (80:20:1).
- Les témoins étudiés : (a) SL = stérol libre = cholestérol ; (b) AG = Acide gras libre = acide linoléique ; (c) AGE = Acide gras estérifié = acide nonadécanoïque méthyl-ester ; (d) MG = Monoglycéride = acide α-Monopalmitique ; (e) DG = Diglycéride = acide Dipalmitique ; (f) SE : stérol estérifié cholestérol arachidonate.





SOLVANT :
*Ether de pétrole / Diéthyl éther /
Acide acétique*
80 : 20 : 1

b - Solvant de migration

La place de certaines taches de lipides, sur la plaque de C.C.M., dépend du solvant de migration utilisé.

Pour le diéthyléther/benzène/éthanol/acide acétique (40:50:2:0,2), WIEGAND et IDLER (1982) retrouvent les mêmes taches que nous, seulement, avec ce solvant, la tache des DG est localisée entre les SL et les AGL.

Le système n-heptane/diéthyléther/acide acétique (75:25:4) utilisé par KORTE en 1982 subdivise certaines taches en d'autres taches difficiles à identifier. Il s'agit probablement d'isomères qui ont des R_f différents avec ce système de migration. Un tel solvant pourrait cependant servir comme base à des études structurales en chromatographie phase gaz et en spectrométrie de masse car il donne une résolution très fine.

Dans nos études métaboliques des lipides, nous avons opté pour le système : éther de pétrole/diéthyléther/acide acétique (80:20:1) (BOBBITT *et al.*; 1972).

c - Matériel biologique

Les sept classes de lipides neutres trouvées chez *P. cultrifera* ont également été retrouvées chez *N. diversicolor* aussi bien dans le cas des corps entiers que des contenus coelomiques. WILBERT et BAYORS (1947) ont travaillé sur plusieurs espèces d'Annélides (*N. pelagica*, *Amphitrite ornata* et *Arenicola marina*) et nous confirmons leurs résultats. McLAUGHLIN (1971) a trouvé aussi les mêmes classes de lipides neutres chez *E. foetida* (Oligochète). NAYA et KOTAKE (1967) ont détecté aussi ces lipides chez *P. communissima*. Enfin, WHEELER (1984) qui travaille sur le corps gras du Criquet, a retrouvé ces mêmes classes de LN.

ETUDE METABOLIQUE DES LIPIDES NEUTRES

ÉTUDE MÉTABOLIQUE DES LIPIDES NEUTRES

I - ETUDE IN VIVO

Une étude préalable du métabolisme lipidique a été réalisée par FONTAINE (1982) sur des individus jeunes de *P. cultrifera*.

Une première partie de notre travail a consisté à étudier le métabolisme des lipides neutres chez des animaux âgés de cette même espèce. Dans un deuxième temps, l'utilisation de l'acétate nous a permis d'examiner s'il y a des différences métaboliques éventuelles résultant de l'incorporation de précurseurs variés.

Enfin dans un but comparatif, une étude métabolique a été effectuée chez une autre espèce de Néréidiens : *N. diversicolor*.

1 - *P. cultrifera*

* Glycérol ¹⁴C

Les animaux utilisés pour cette expérience ont un diamètre ovocytaire > 200 µm.

. Référence du précurseur radioactif
.....
Glycérol ¹⁴C, activité spécifique 120 mCi/mM (C.E.A.).

. Injection
.....
Nous avons utilisé 12 femelles. Nous avons administré à chacune une dose de 5 µCi.

. Incubation
.....
Les animaux traités sont alors répartis en 4 lots de 3 animaux chacun.

| Lots | 1er | 2ème | 3ème | 4ème |
|--------------------|-----|------|------|------|
| Temps d'incubation | 5 h | 14 h | 48 h | 6 j |

. Extraction et séparation des LN
.....
(Voir Matériel et Méthodes).

. Résultats

.....

Nos résultats sont exposés dans le tableau suivant, ils sont exprimés en cpm/g de poids sec et en pourcentage.

Tableau 1 - Incorporation de glycérol ^{14}C . Evolution de la radioactivité dans les glycérides en fonction du temps, chez des *P. cultrifera* de $\emptyset > 200 \mu\text{m}$.

| | | 5 h | | 14 h | | 24 h | | 48 h | | 6 j | |
|-----|----|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|----|--------------------|------|--------------------|----|
| | | cpm/g _s | % | cpm/g _s | % | cpm/g _s | % | cpm/g _s | % | cpm/g _s | % |
| LC | MG | 2800 | 100 | 7200 | 100 | 81600 | 29 | 3200 | 2 | 0 | — |
| | DG | 0 | — | 0 | — | 123600 | 44 | 0 | — | 3200 | 43 |
| | TG | 0 | — | 0 | — | 74400 | 27 | 124800 | 98 | 4267 | 57 |
| OVO | MG | 2611 | 74 | 2857 | 45 | 3600 | 65 | 2560 | 100 | 3909 | 93 |
| | DG | 706 | 20 | 2857 | 45 | 1800 | 33 | 0 | — | 273 | 7 |
| | TG | 211 | 6 | 571 | 10 | 120 | 2 | 0 | — | 0 | — |
| COE | MG | 55364 | 62 | 9200 | 66 | 5778 | 61 | 5565 | 59 | 6710 | 49 |
| | DG | 33818 | 38 | 4000 | 28 | 3667 | 39 | 1913 | 20,5 | 839 | 6 |
| | TG | 0 | — | 800 | 6 | 0 | — | 1913 | 20,5 | 6206 | 45 |

Les courbes des pages 26, 27 et 29 traduisent l'évolution de la radioactivité dans les différents glycérides du L.C., des ovocytes et des coelomocytes en fonction du temps.

Liquide coelomique

Par rapport aux animaux jeunes (FONTAINE, 1982) où il n'y avait aucun marquage des TG du liquide coelomique, chez les animaux âgés, la radioactivité des TG du LC est faible au départ puis s'accroît à partir de 14 h pour chuter entre 48 h et 6 j. Pour les MG et les DG la radioactivité suit la même évolution au cours de temps.

Figure 6 - Evolution de la radioactivité dans les différents glycérides de l'ovocyte de *P. cultrifera* de 180 μm , après incorporation de l'Acétate ^{14}C *in vivo*.

Figure 7 - Evolution de la radioactivité dans les différents glycérides de l'ovocyte de *P. cultrifera* de $\emptyset > 200 \mu\text{m}$, après incorporation de glycérol ^{14}C *in vivo*.

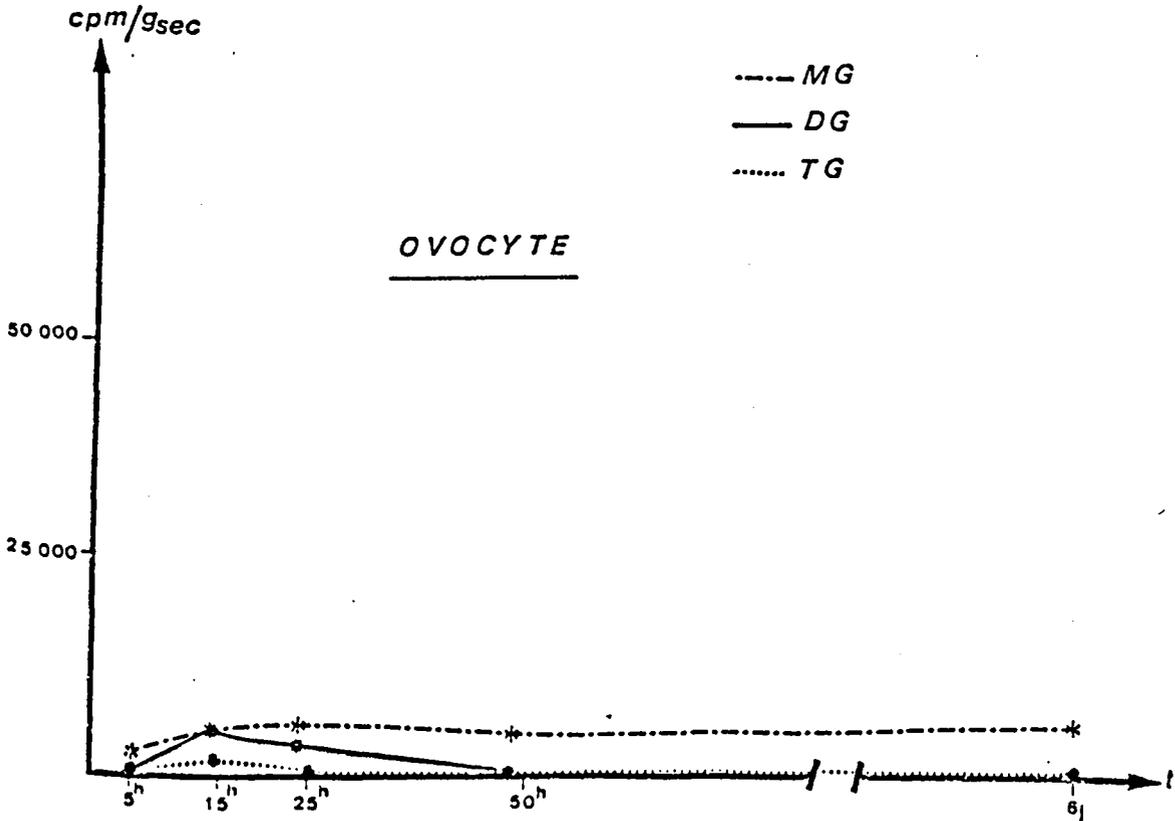
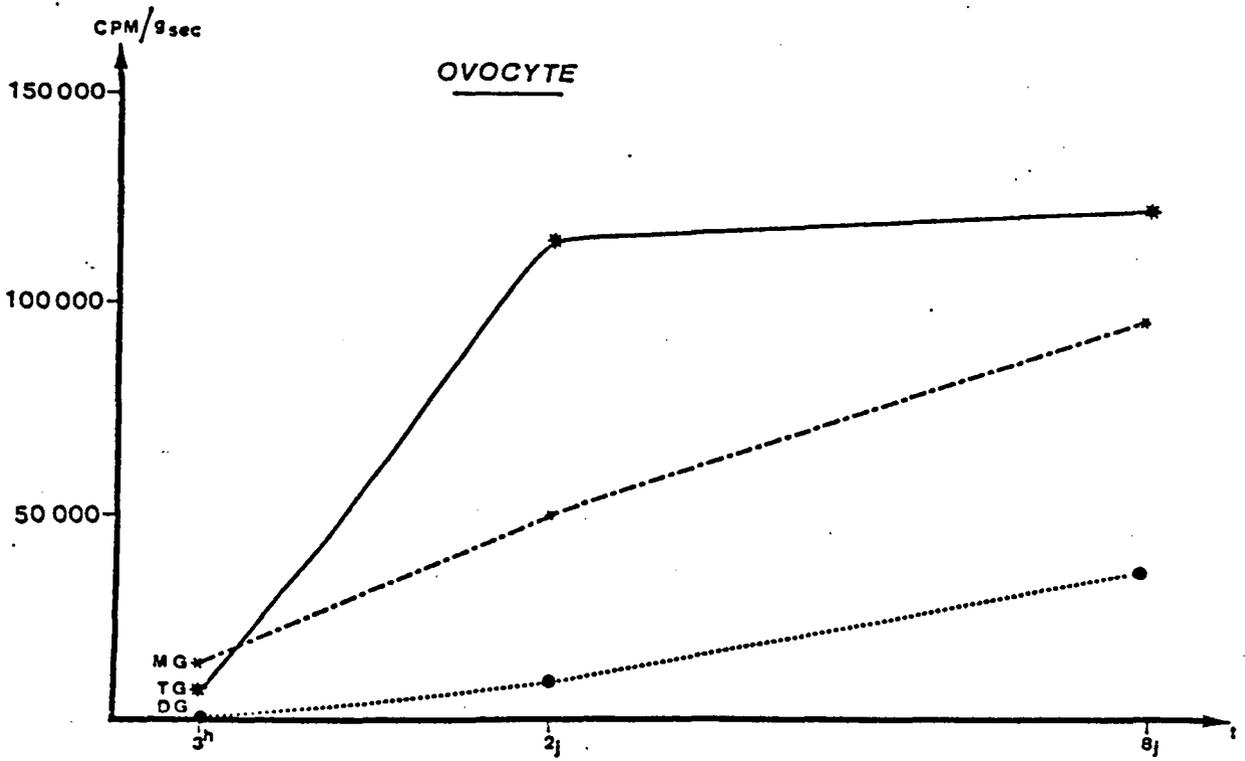


Figure 8 - Evolution de la radioactivité dans les différents glycérides des coelomocytes de *P. cultrifera* de \varnothing 180 μm , après incorporation d'Acétate ^{14}C *in vivo*.

Figure 9 - Evolution de la radioactivité dans les différents glycérides des coelomocyte de *P. cultrifera* de $\varnothing > 200 \mu\text{m}$, après incorporation du glycérol ^{14}C *in vivo*.

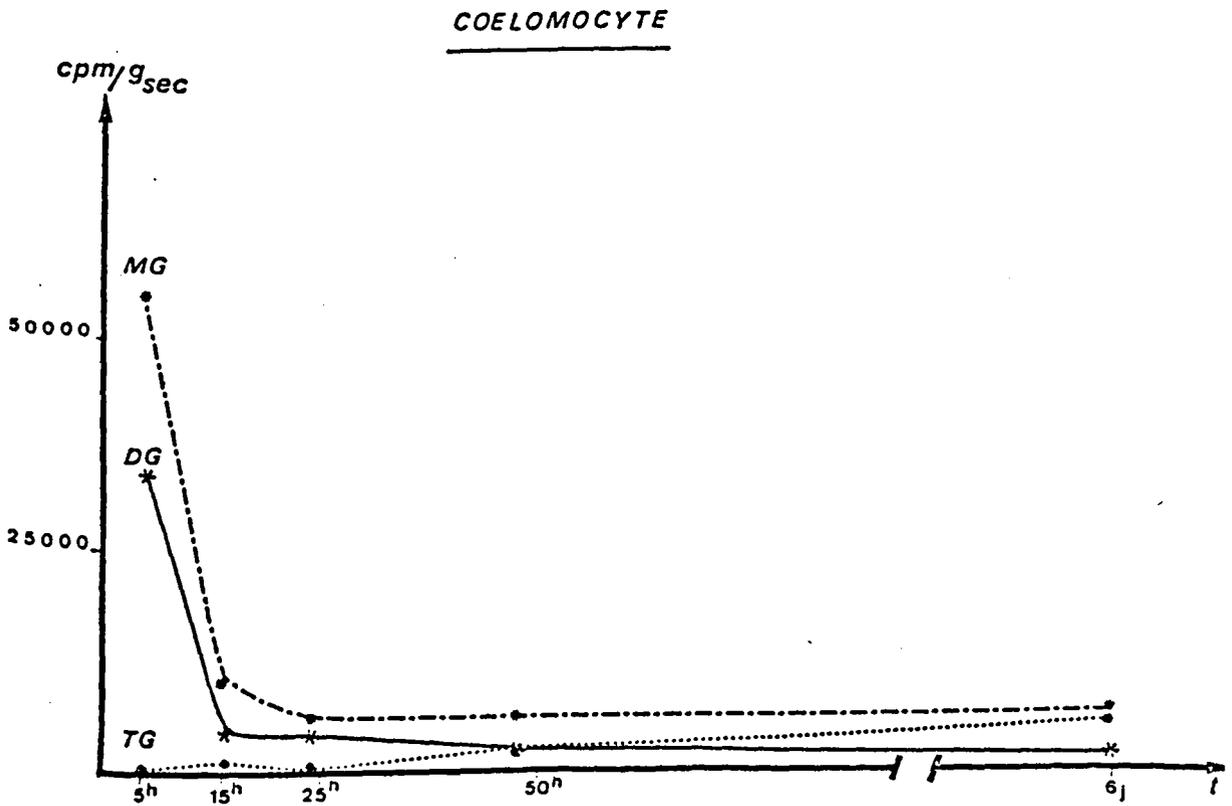
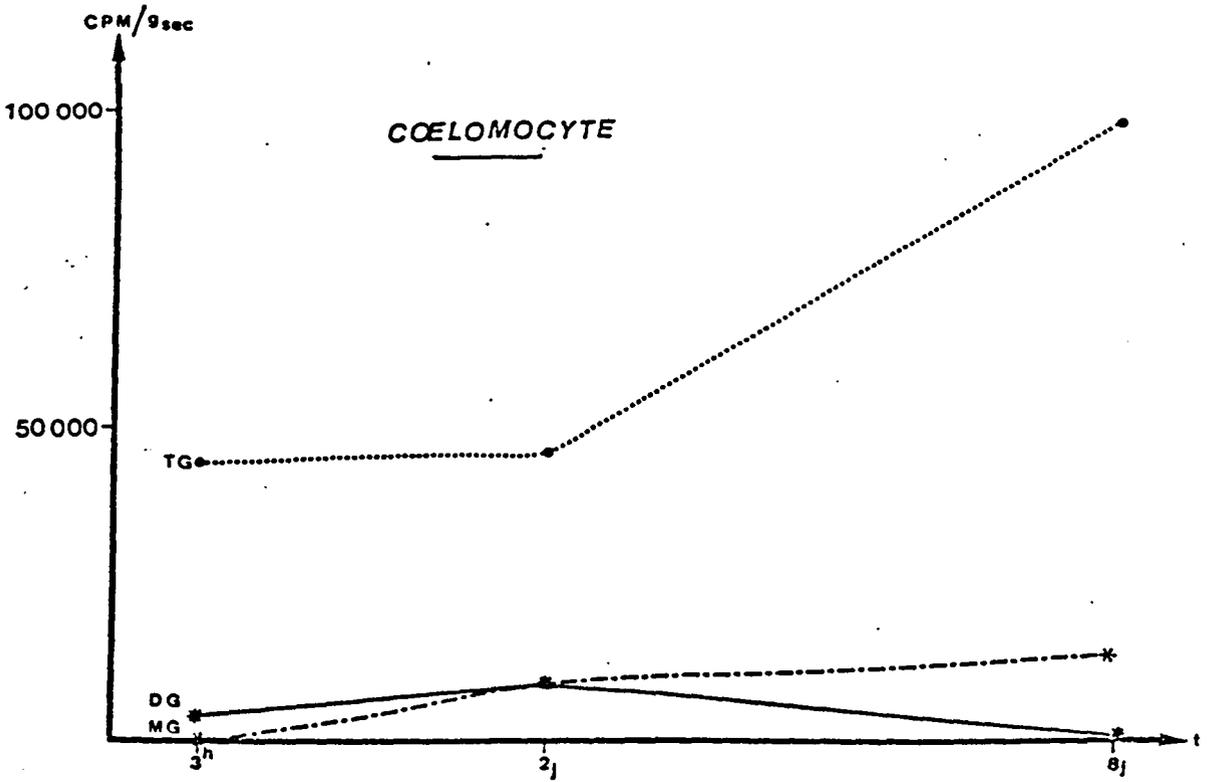
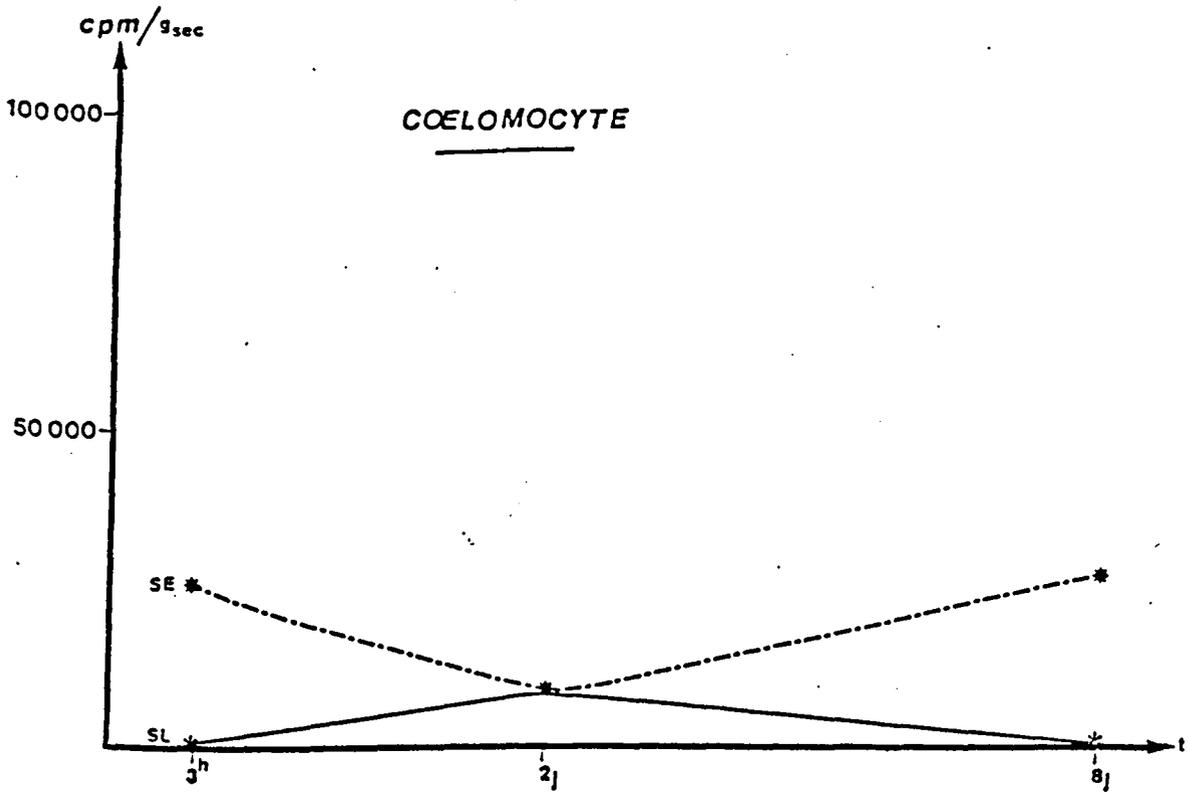
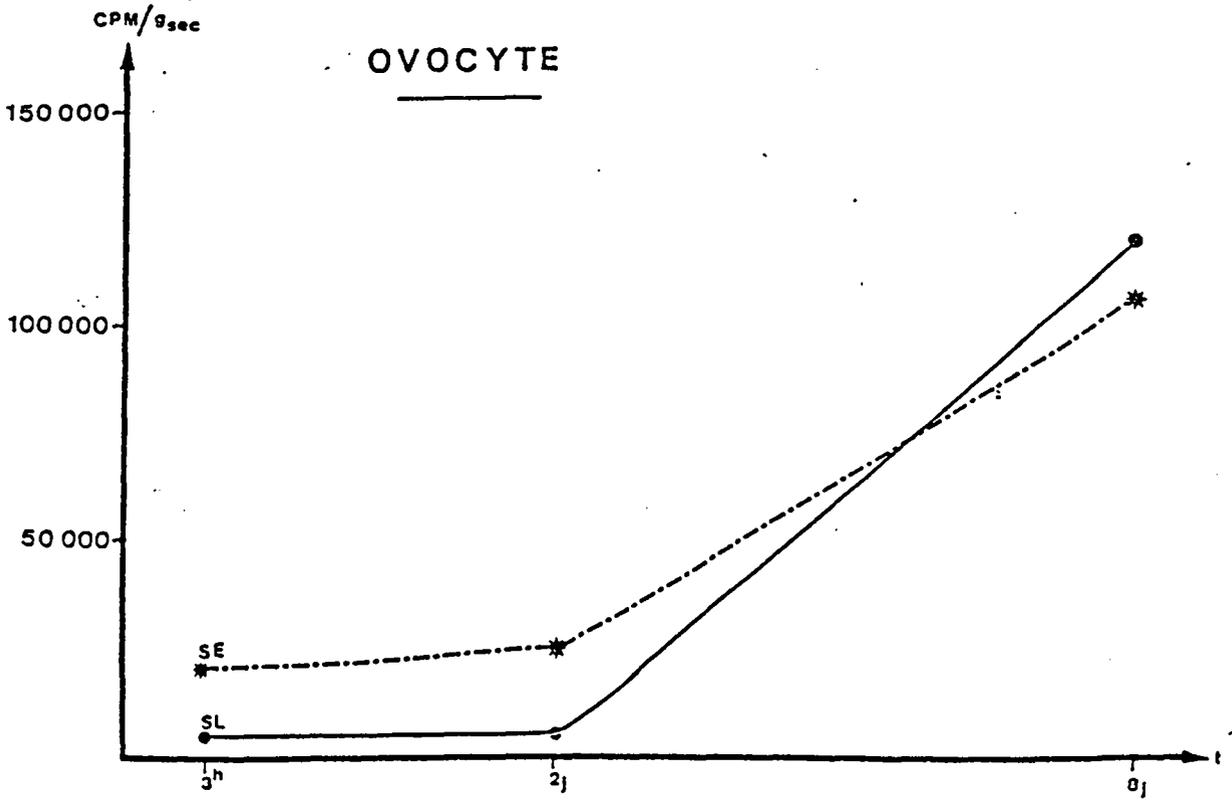


Figure 10 - Evolution de la radioactivité dans les stérols des ovocytes et des coelomocytes de *P. cultrifera* de \emptyset 180 μm , après incorporation *in vivo* de l'acétate ^{14}C .



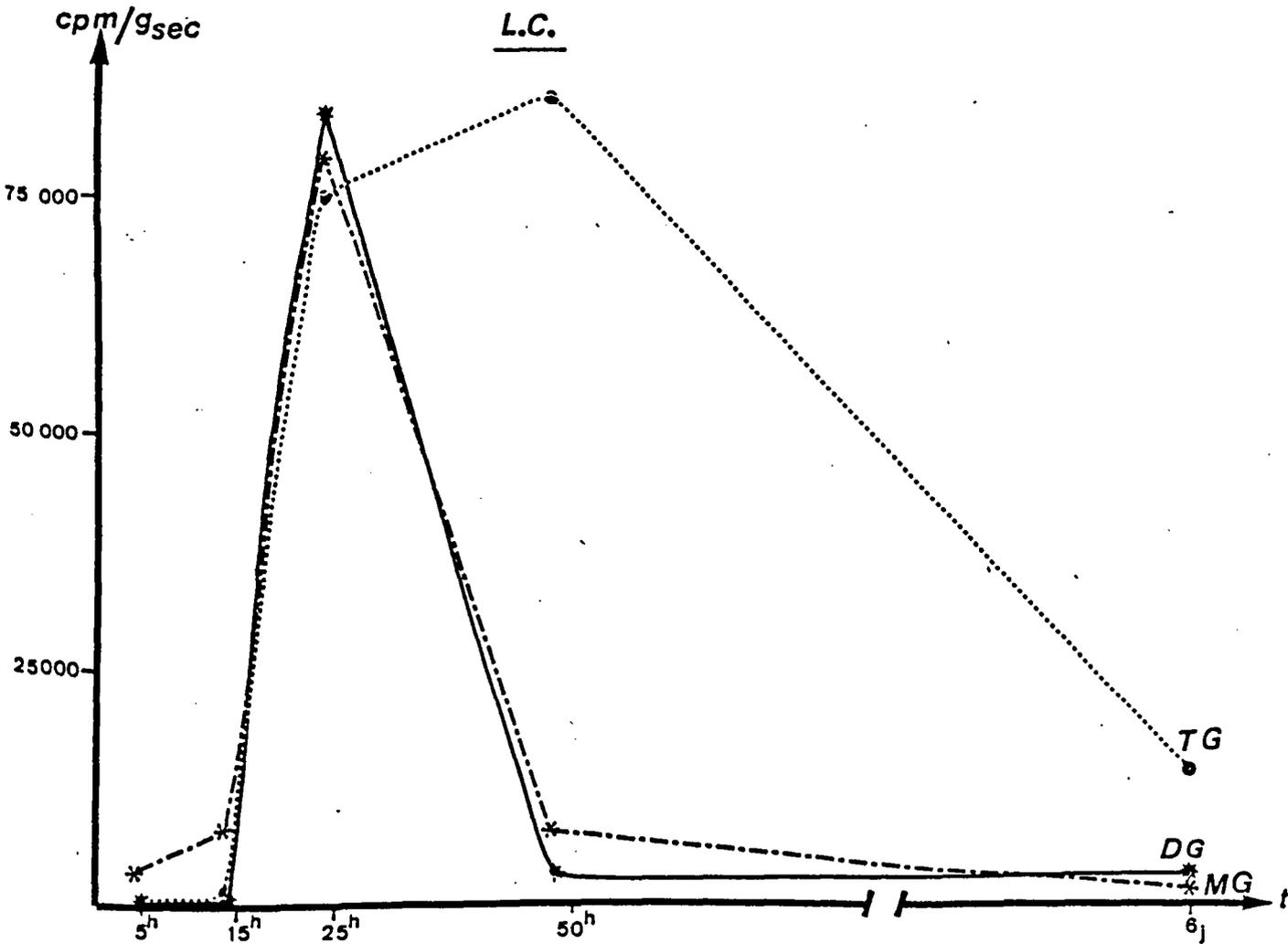


Figure 11 - Evolution de la radioactivité dans les différents glycérides du liquide coelomique de *P. cultrifera* de $\phi > 200 \mu\text{m}$, après incorporation du glycérol ^{14}C *in vivo*.

Ovocytes

Les résultats obtenus chez les animaux âgés diffèrent également de ceux des jeunes. En effet, chez ces derniers la radioactivité des TG croît régulièrement en fonction du temps (FONTAINE, 1982), alors que chez les âgés (fig. 7, page 26), la radioactivité des TG reste toujours très faible.

Coelomocytes

Chez les animaux âgés, les courbes traduisant l'évolution de la radioactivité dans les MG et DG présentent la même variation au cours de temps : un taux très important de radioactivité au départ, une chute rapide à 14 h puis un taux faible mais constant jusqu'à 6 j. Pour les TG on a un faible taux de radioactivité au départ, puis une progression à peu près régulière jusqu'à 6 j. Le phénomène est inverse de l'évolution des TG des coelomocytes des animaux jeunes (FONTAINE, 1982).

* Acétate ¹⁴C
,,,,,,,,,,,,,

Contrairement au glycérol, l'acétate est une molécule simple et elle constitue de ce fait un carrefour entre plusieurs voies métaboliques et notamment celle des stérols. Les animaux utilisés sont plus jeunes que ceux de l'expérience précédente. Leur diamètre ovocytaire est de 180 µm et ils sont encore éloignés de la maturité sexuelle.

. Référence du produit radioactif
.....

Acétate ¹⁴C. Activité spécifique 94 mCi/mM, solution aqueuse (C.E.A.).

. Injection
.....

On a injecté une dose de 25 µCi par animal. Le nombre d'animaux utilisés pour cette expérience est de six.

. Incubation
.....

Les animaux traités sont répartis en 3 lots de deux animaux et incubés dans les mêmes conditions (à jeun et à 14°C dans l'eau de mer).

| Lots | 1er | 2ème | 3ème |
|--------------------|-----|------|------|
| Temps d'incubation | 3 h | 2 j | 8 j |

L'extraction des lipides et la séparation sur C.C.M. est la même que pour le glycérol ¹⁴C.

. Résultats
.....

Les courbes des pages 26, 27, 28, montrent l'évolution de la radioactivité en fonction du temps, dans les trois compartiments, pour chaque type de lipide neutre.

Pour les glycérides ce sont les TG qui dominent dans les cellules coelomiques.

Remarque : Pour un problème technique, les TG du LC n'ont pas pu être analysés.

Pour les stérols, les graphiques montrent que durant la durée de l'expérience (3h à 8 j), le taux des stérols libres et estérifiés s'élève régulièrement dans les ovocytes. Par contre, le métabolisme des coelomocytes reste assez faible, et les taux des SL et SE évoluent en sens contraire.

Figure 12 - Evolution de la radioactivité dans les différentes classes de LN dans le liquide coelomique de *N. diversicolor* de Ø 130 µm après incorporation *in vivo* de glycérol ³H.

2 - N. diversicolor

Dans un but comparatif nous avons refait l'expérience *in vivo* chez *N. diversicolor* (en collaboration avec H. TAKI). Vingt animaux de diamètre ovocytaire 130 μm ont servi pour cette expérience.

- . Référence du précurseur radioactif
.....
Glycérol ^3H , activité spécifique 2,5 mCi/mM (Radiochemical Center Amersham).
- . Injection
.....
La quantité de glycérol ^3H injectée à chaque animal est de 25 μCi .
- . Temps d'incubation : 24 h, 4 jours, 8 jours.
.....
- . Résultats
.....
Pour réduire les erreurs qui pourraient survenir lors des pesées de poids sec, nous avons exprimé nos résultats en cpm/ γ de protéines.

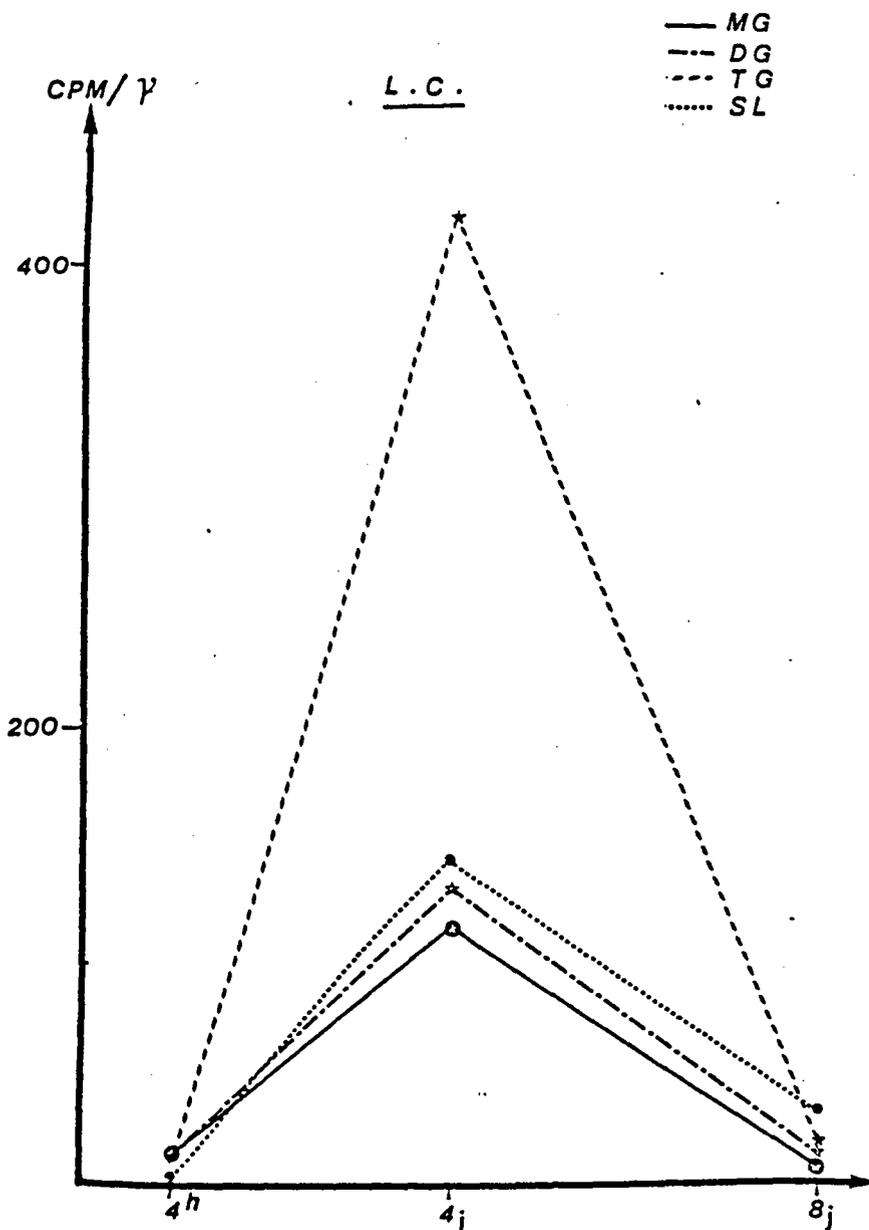


Figure 13 - Evolution de la radioactivité dans les différentes classes de LN de l'ovocyte de *N. diversicolor* de \emptyset 130 μm , après incorporation *in vivo* du glycérol ^3H .

Figure 14 - Evolution de la radioactivité dans les différentes classes de LN des coelomocytes de *N. diversicolor* de \emptyset 130 μm , après incorporation *in vivo* de glycérol ^3H .

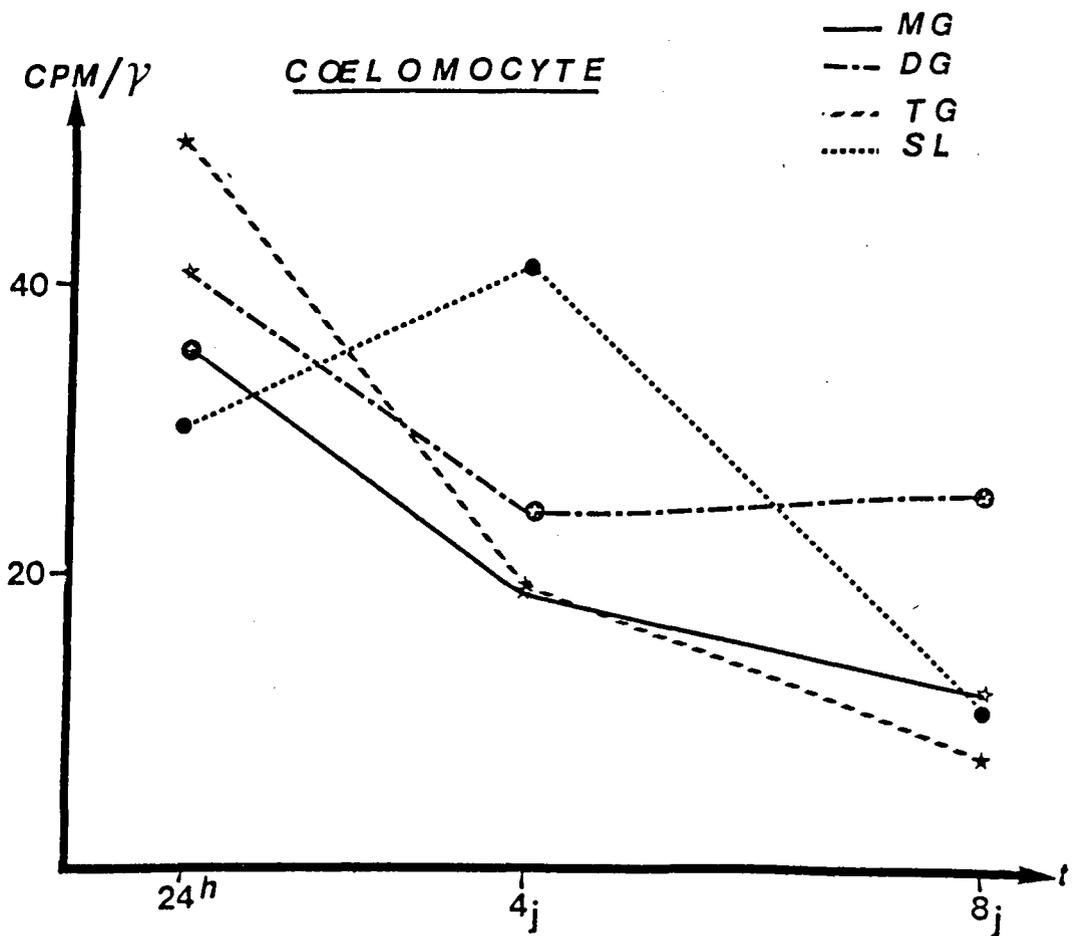
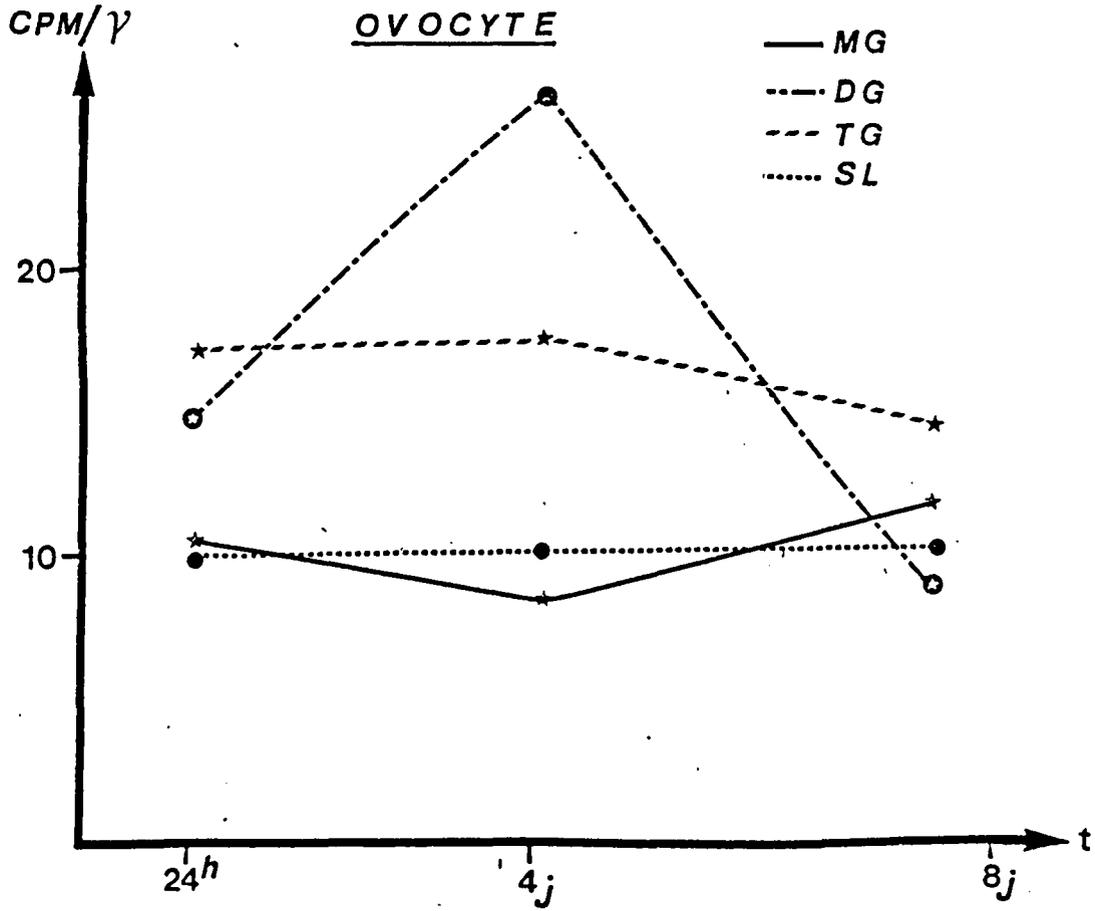


Tableau 2 - Evolution de la radioactivité dans les LN, exprimée en pourcentage et en fonction du temps, dans les trois compartiments coelomiques chez *N. diversicolor* (\emptyset 130 μ m). Injection de glycérol ^3H .

| Compartiments coelomiques | Classes | 24 h | 4 jours | 8 jours |
|---------------------------|---------|------|---------|---------|
| L.C. | MG | 8 | 1 | 7 |
| | DG | 7 | 0,5 | 12 |
| | SL | 5 | 0,5 | 12 |
| | AGL | 8 | 2 | 25 |
| | TG | 9 | 1 | 22 |
| | WE | 3 | 30 | 13 |
| | SE | 60 | 65 | 9 |
| OVO | MG | 12 | 9 | 15 |
| | DG | 18 | 28 | 12 |
| | SL | 12 | 10 | 19 |
| | AGL | 9 | 12 | 13 |
| | TG | 25 | 22 | 22 |
| | WE | 10 | 13 | 10 |
| | SE | 14 | 6 | 9 |
| COE | MG | 12 | 7 | 10 |
| | DG | 14 | 9 | 22 |
| | SL | 10 | 17 | 9 |
| | AGL | 15 | 48 | 13 |
| | TG | 21 | 10 | 8 |
| | WE | 19 | 5 | 24 |
| | SE | 9 | 4 | 14 |

Dans les ovocytes on remarque que la majeure partie de la radioactivité se trouve dans les glycérides (MG + DG + TG) soit 49 % de la radioactivité de toutes les classes de LN à 8 j d'incorporation. Ce résultat est comparable à celui obtenu chez *P. cultrifera*. La radioactivité des stérols est aussi importante. Elle représente 28 %. Les AGL et les WE restent à des taux relativement faibles. En ce qui concerne les coelomocytes, le marquage des glycérides à 8 j est moins fort que dans les ovocytes (40 %). Contrairement aux ovocytes les lipides complexes comme les WE et les SE y sont très marqués (24 % et 14 % respectivement).

3 - Discussion

* Glycérol ^{14}C

.....

L'incorporation de ce précurseur a été réalisée sur des *P. cultrifera* de diamètre ovocyttaire supérieur à 200 μ m. A ce stade, l'activité cérébrale est restreinte (DURCHON et PORCHET, 1971). La caractéris-

tique de cette cinétique réside dans le faible taux de synthèses de TG effectuées par les ovocytes. Ce résultat est tout à fait contraire à celui d'animaux jeunes (\emptyset 130 μm). Au delà du stade 200 μm , il semble donc que la phase d'accumulation des réserves triglycéridiques soit terminée. On note cependant, dans les ovocytes, un taux important de radioactivité représenté par les MG. Il est possible que cette catégorie de lipides puisse être orientée vers d'autres voies métaboliques, par exemple fournir de l'énergie à l'ovocyte. Celui-ci à ces stades ($> 200 \mu\text{m}$) réalise d'abondantes synthèses de mucus (alvéoles corticaux) ce qui explique son accroissement en volume. Les coelomocytes continuent de réaliser des DG et TG. Ces produits pourraient servir comme précurseurs aux synthèses des glycérophospholipides membranaires. L'épitoque est marquée en effet par de profonds remaniements morphologiques, notamment l'établissement des lamelles parapodiales. Les *N. diversicolor* étudiées à titre comparatif sont des animaux jeunes, encore soumis à une activité endocrine élevée. On constate dans les grandes lignes une similitude avec le comportement des *P. cultrifera* de stade physiologique comparable.

* Acétate ^{14}C
 ,,,,,,,,,,,,,,

Ce précurseur constitue un carrefour métabolique important. Dans les lipides, il donne lieu à une synthèse de lipides simples (glycérides) et de lipides complexes (stérols). Le fort taux de TG marqués à partir de ce précurseur confirme les résultats de FONTAINE (1982). La synthèse des stérols à partir d'acétate, déjà signalée par VOOGT (1974) chez plusieurs Polychètes et notamment chez *N. diversicolor*, se trouve confirmée ici. Cette dernière propriété existe également chez *N. pelagica* (JOYCEA WOOTTON et WRIGHT, 1962). Par contre ces mêmes auteurs notent que le *Lumbricus terrestris* (Oligochète) est incapable comme les Insectes de réaliser ses propres synthèses stéroliques. Dans la chaîne métabolique :
 Acétate \longrightarrow AG \longrightarrow Squalène ---X--- stérols, les transformations sont vraisemblablement bloquées entre le squalène et le stérol. La possibilité ou l'incapacité de synthèse des stérols selon les classes d'Annélides pourrait être liée dans une certaine mesure à leur régime alimentaire. Les vers de terre consomment en général des végétaux qui sont riches en phosphostérols alors que les Annélides marins sont souvent carnivores. Chez ces dernières, les stérols peuvent avoir une origine endogène, synthétisés par l'animal lui-même ou par des organismes symbiotiques.

II - ETUDE IN VITRO

Les résultats du chapitre précédent ont montré que les ovocytes accumulent les lipides sous forme de triglycérides. D'autre part, FONTAINE (1984 a, b) avait déjà signalé des fluctuations dans la teneur en lipides des coelomocytes au cours de l'ovogenèse. Ces données ont conduit à émettre l'hypothèse que des relations métaboliques pourraient exister entre les coelomocytes et les ovocytes.

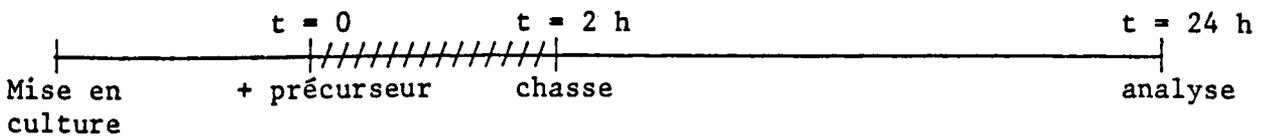
Dans le cas d'une étude *in vivo* il est naturellement difficile de dissocier les métabolismes respectifs de deux compartiments cellulaires. C'est pour cette raison que nous avons abordé ce problème en envisageant l'évolution *in vitro*.

1 - Incorporation du glycérol ³H

Pour les détails de la technique expérimentale, voir Matériel et Méthodes.

. Protocole expérimental

L'espèce étudiée ici est *P. cultrifera* de diamètre ovocytaire 150 µm (donc immature). Après ponction de 10 animaux, les cellules coelomiques sont séparées sur Ficoll. Les ovocytes et les coelomocytes sont alors prélevés séparément puis mis en culture dans le milieu TC 199 modifié, en présence du glycérol ³H à raison de 40 µCi/ml de milieu de culture. Après 2 h d'incubation, les cellules sont lavées avec du milieu de culture froid et remises en culture dans un milieu contenant du glycérol froid (chasse). 22 heures après, les lipides neutres sont extraits et la radioactivité des différentes classes est analysée.



La même expérience a été faite en parallèle mais cette fois-ci sans chasse.

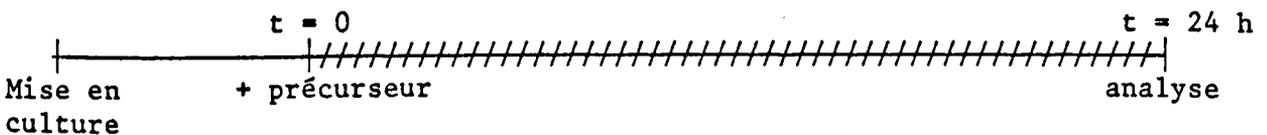
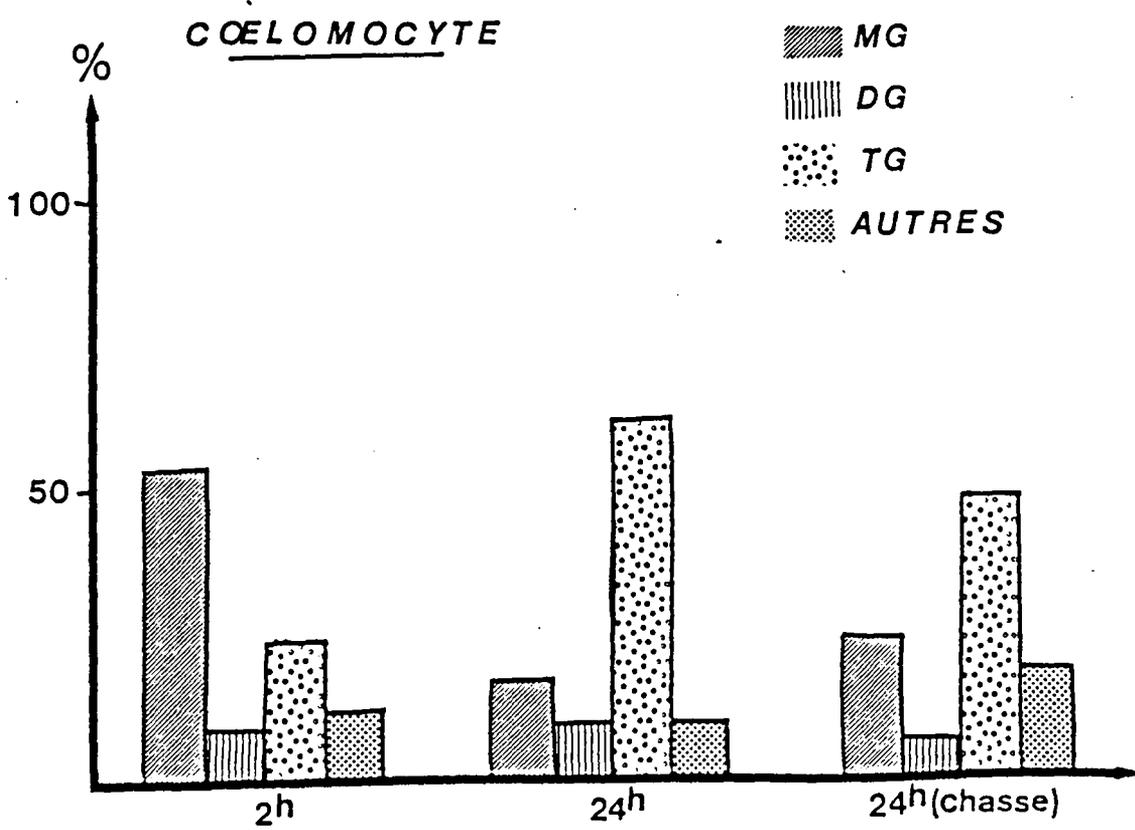
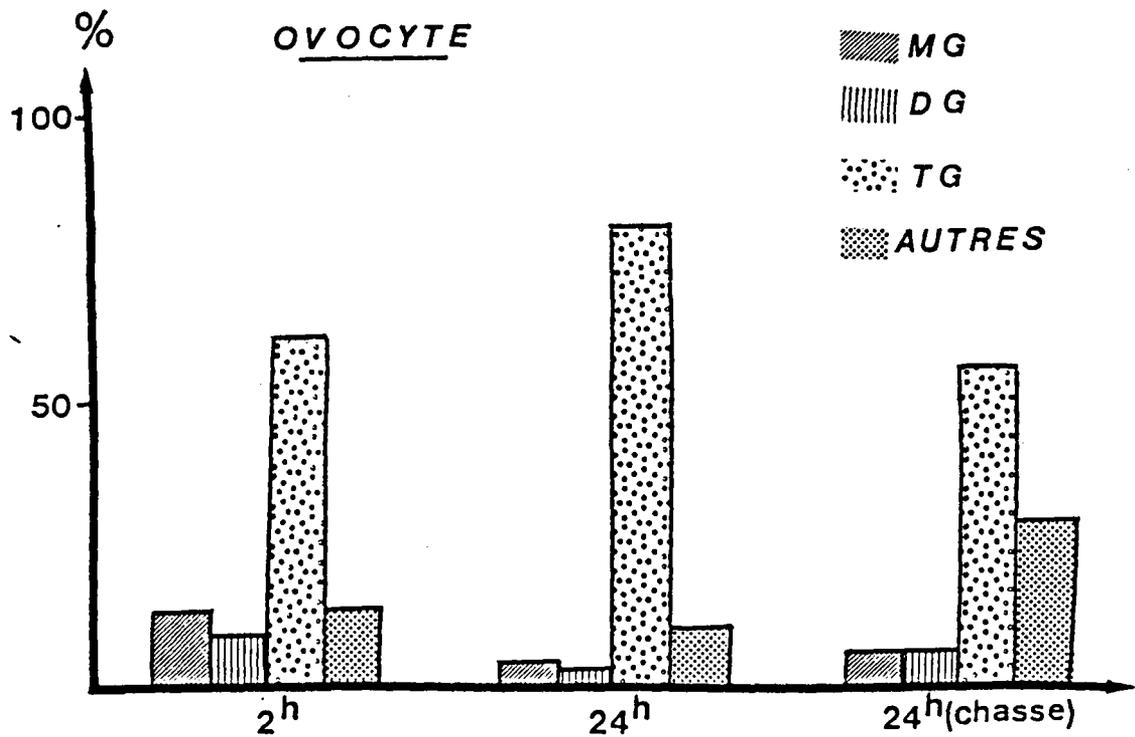


Figure 15 - Evolution de la radioactivité des différentes classes de LN, après incorporation *in vitro* du glycérol ^3H dans les ovocytes de *P. cultrifera* de \emptyset 150 μm .

Figure 16 - Evolution de la radioactivité des différentes classes de LN, après incorporation *in vitro* du glycérol ^3H dans les coelomocytes de *P. cultrifera* de \emptyset 150 μm .



. Résultats
.....

Tableau 3 - Incorporation *in vitro* de glycérol par les ovocytes isolés, en fonction du temps [résultats exprimés en cpm/g frais des ovocytes].

| Classes | 2 h | 24 h | 24 h (avec chasse à 2 h) | |
|---------|-------|-------|--------------------------|----|
| | | | cpm/γ | % |
| MG | 1077 | 1833 | 336 | 7 |
| DG | 1030 | 1458 | 336 | 7 |
| SL | 489 | 1458 | 336 | 7 |
| AGL | 391,5 | 1100 | 288,3 | 6 |
| TG | 5960 | 30060 | 2691 | 56 |
| WE | 294 | 1100 | 432 | 9 |
| SE | 190,5 | 366 | 384 | 8 |

Pour les ovocytes maintenus 24 h en présence de précurseur, on constate essentiellement une nette synthèse de triglycérides (Tableau 3). En pourcentage (fig. 15), cette classe de lipides apparaît prépondérante puisqu'à elle seule elle représente près de 82 %. Les résultats sont un peu différents lors d'une chasse de 22 heures. Les TG ne représentent plus qu'un pourcentage de 56 %. On constate par contre dans ce cas une augmentation relative assez nette des WE, SE et AGL.

Dans le cas des coelomocytes, les TG constituent également la classe de lipides synthétisée en plus forte proportion (fig. 16). Toutefois après chasse, les fluctuations en pourcentage sont moins nettes que dans le cas des ovocytes.

2 - Incorporation d'Acides gras

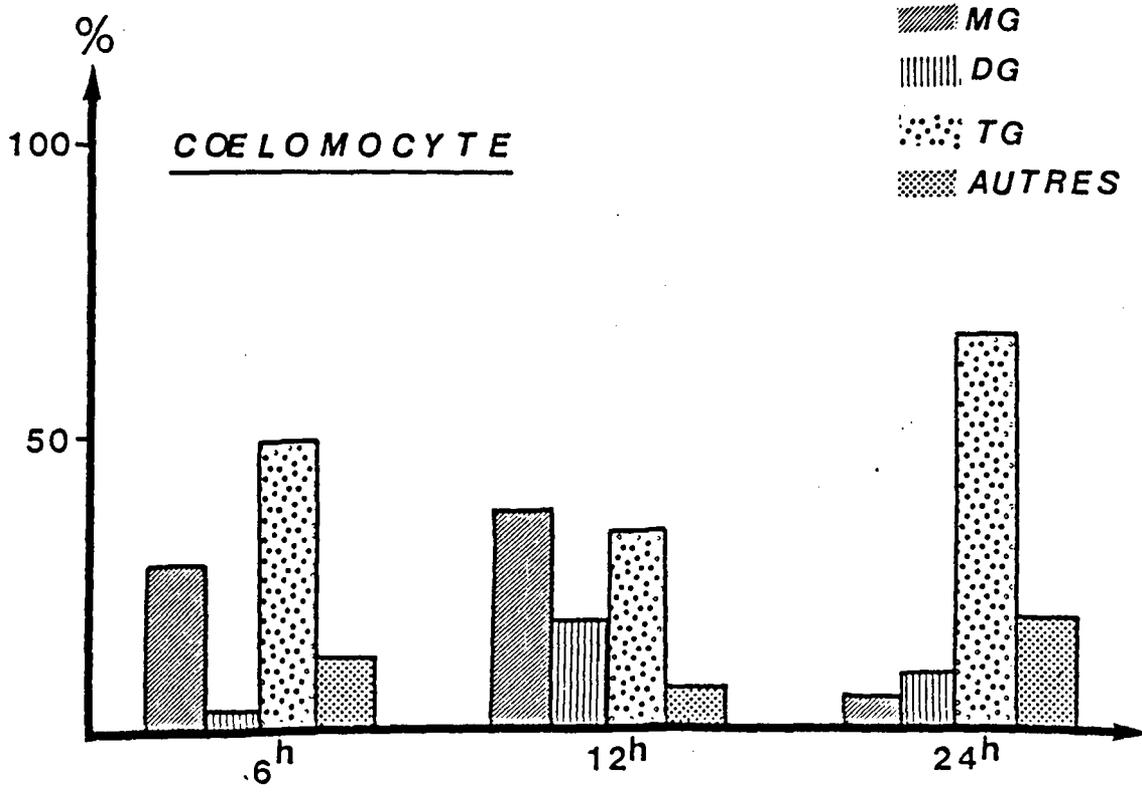
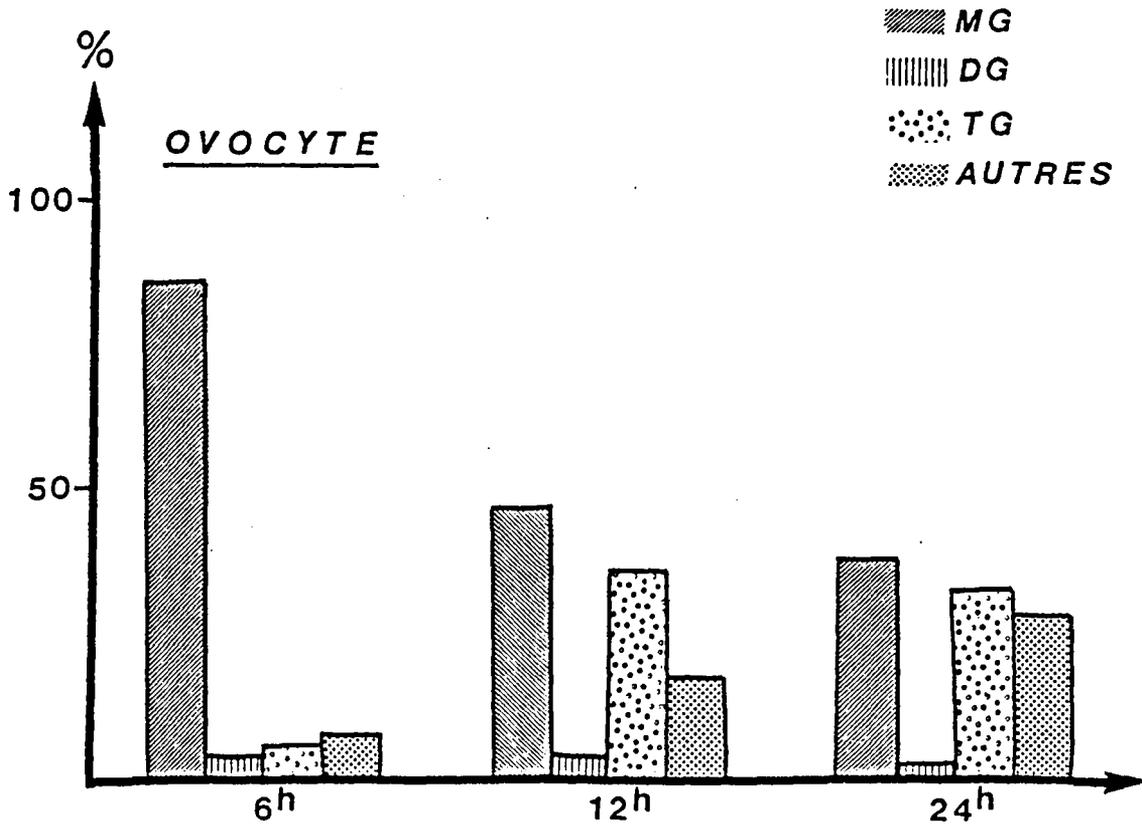
Après avoir étudié l'incorporation du glycérol, structure de base de la molécule de glycérides, nous envisageons les modalités d'incorporation de deux modèles d'acides gras, l'un à courte chaîne carbonée : l'acide butyrique, l'autre à longue chaîne : l'acide oléique.

a - Acide butyrique ¹⁴C

L'expérience s'est faite dans les mêmes conditions que pour le glycérol ³H, sur *P. cultrifera* de diamètre ovocytaire 130 μm. Le précurseur radioactif a été rajouté à raison de 0,2 μCi/ml de milieu de culture. Les ovocytes et les coelomocytes sont analysés séparément. Trois

Figure 17 - Evolution de la radioactivité des différentes classes de LN, après incorporation de l'acide butyrique ^{14}C *in vitro*, dans les ovocytes de *P. cultrifera* de \emptyset 130 μm .

Figure 18 - Evolution de la radioactivité des différentes classes de LN, après incorporation de l'acide butyrique ^{14}C *in vitro*, dans les coelomocytes de *P. cultrifera* de \emptyset 130 μm .



durées d'expérience ont été étudiées : 6 h, 12 h et 24 h. Les résultats sont donnés dans le tableau suivant, ils sont exprimés en cpm/ γ de protéine.

Tableau 4 - Evolution de la radioactivité en fonction du temps dans les ovocytes et les coelomocytes de *P. cultrifera* de diamètre 168 μ m, après incorporation *in vitro* d'acide butyrique ^{14}C [résultats exprimés en (cpm/ γ de protéine) $\times 10^3$].

| Compartiment coelomique | Classes | 6 h | 12 h | 24 h |
|-------------------------|---------|-----|------|------|
| OVO | MG | 690 | 380 | 240 |
| | DG | 20 | 10 | 10 |
| | SL | 10 | 50 | 60 |
| | AGL | 10 | 50 | 10 |
| | TG | 30 | 280 | 200 |
| | WE | 40 | 10 | 10 |
| | SE | — | — | 110 |
| COE | MG | 350 | 560 | 70 |
| | DG | 20 | 270 | 110 |
| | SL | 120 | 50 | 70 |
| | AGL | 20 | 30 | 130 |
| | TG | 760 | 500 | 930 |
| | WE | — | 30 | 70 |
| | SE | — | — | — |

b - Incorporation d'acide oléique ^3H

L'expérience s'est faite aussi *in vitro* sur des *P. cultrifera* de diamètre ovocytaire 156 μ m. Les ovocytes et les coelomocytes sont isolés sur ficoll. La dose radioactive utilisée ici est de 10^8 cpm/5 ml de milieu de culture. Le protocole expérimental est le même que précédemment.

Les résultats sont donnés par la figure suivante.

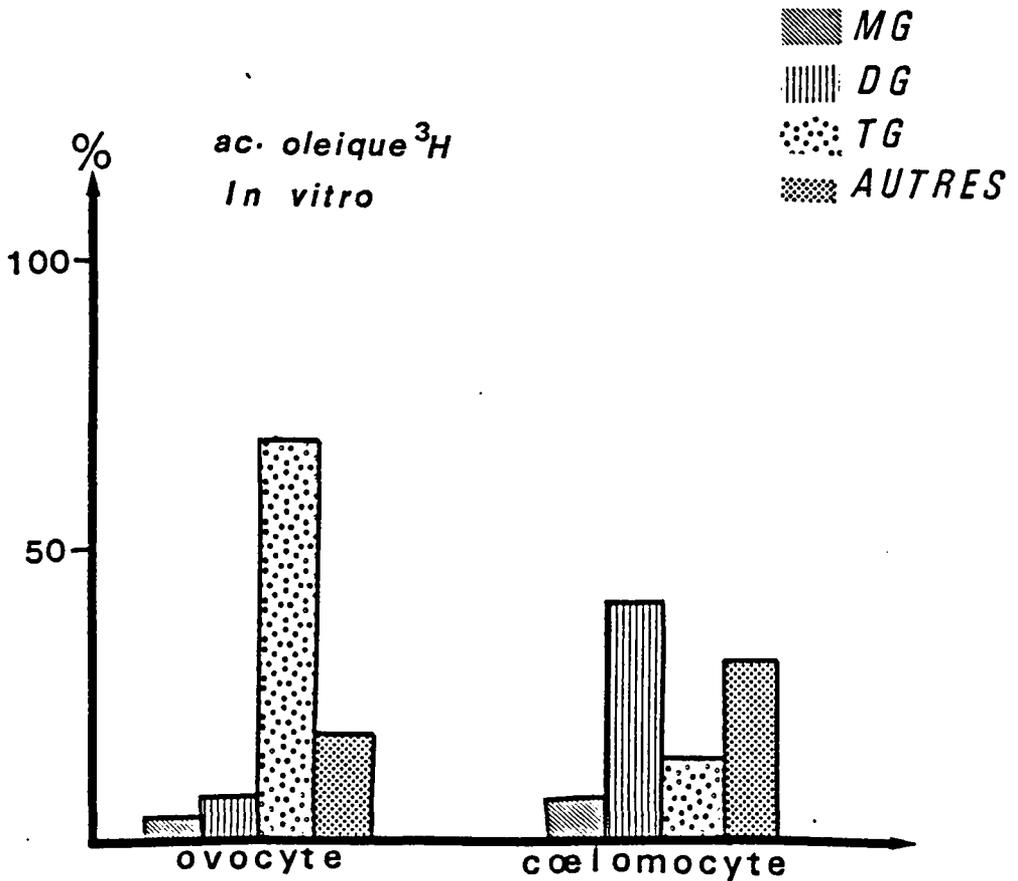


Figure 19 - Répartition du taux de radioactivité en pourcentage dans les différentes classes de LN des ovocytes et des coelomocytes, après 24 heures d'incorporation *in vitro* de l'acide oléique 3H chez *P. cultrifera* de diamètre ovocyttaire 156 μm .

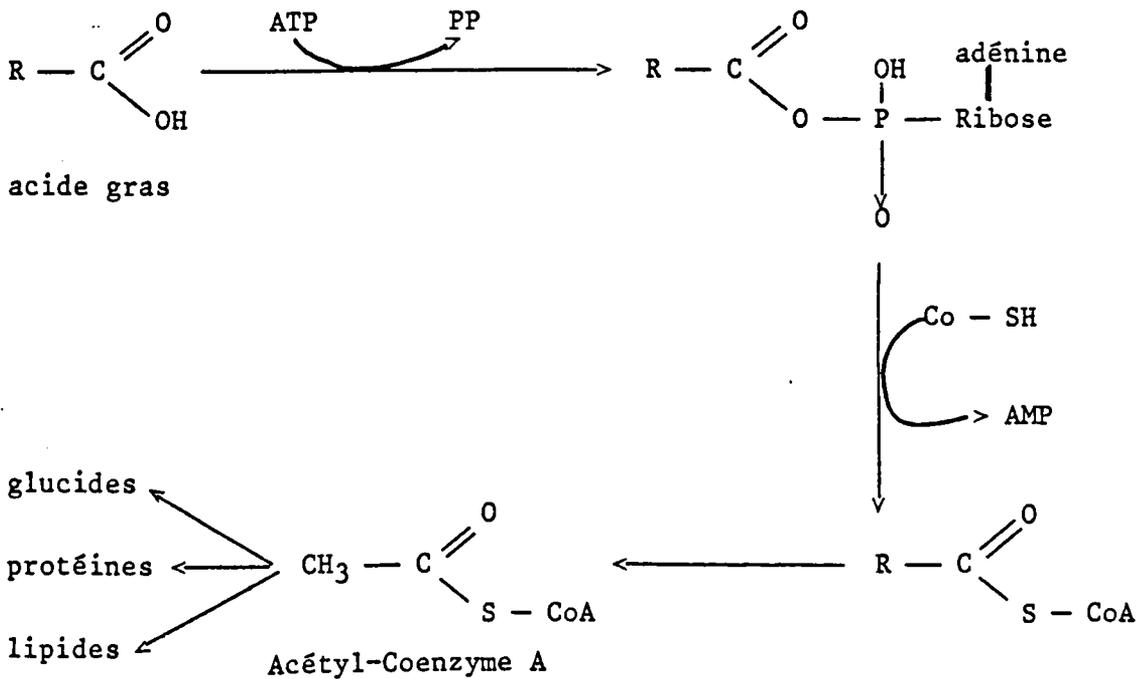
3 - Discussion

Pour les trois précurseurs radioactifs utilisés dans les expériences ci-dessus, les ovocytes et les coelomocytes isolés sont capables d'élaborer leurs propres synthèses de lipides neutres. Des travaux menés récemment dans notre laboratoire sur une autre espèce voisine (*N. diversicolor*) confirment ces données (TAKI, D.E.A., 1984).

En ce qui concerne le glycérol 3H , les résultats rejoignent l'étude *in vivo*. Les synthèses les plus importantes s'effectuent sous forme de TG. Toutefois la totalité des triglycérides ne constitue peut-être pas la forme de stockage définitif. Dans l'expérience de chasse, lorsque l'on observe l'évolution des produits synthétisés, les voies

métaboliques semblent s'orienter vers des synthèses de classes plus complexes (WE et SE) au détriment des TG. Dans les coelomocytes, le phénomène est semblable à ce qui se passe dans les ovocytes avec une apparition d'un taux important de MG au départ, qui chute ensuite en donnant lieu à des synthèses de TG.

L'acide butyrique est intégré non seulement dans la voie métabolique des lipides mais également dans celle des glucides et des protéines :



Métabolisme des acides gras, "Biochimie Générale" (J.H. WEIL, 1979).

Dans les ovocytes, à 6 h d'incorporation, le taux le plus important de la radioactivité se trouve localisé dans les MG. Ceux-ci chutent ensuite pour laisser apparaître des TG et des lipides complexes comme les wax esters (cires) et les stérols. Ces résultats confirment les modalités de synthèse des glycérides. Or il est intéressant de constater que l'on trouve les mêmes modalités chez les coelomocytes. Enfin, l'acide oléique 3H a confirmé une fois de plus le marquage important des TG dans l'ovocyte, alors que dans les coelomocytes ce sont les DG qui semblent synthétisés surtout à partir de ce précurseur.

III - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE

Cette étude a été effectuée sur *P. cultrifera* et menée parallèlement à la manipulation biochimique.

1 - Résultats

• Evolution ovocytaire *in vitro*

◦ 2 h d'incorporation

Le marquage est encore faible. La quasi totalité des grains d'argent (> 95 %) sont situés au niveau des lobules lipidiques. Près des deux tiers des lobules lipidiques présentent déjà des traces de radioactivité, celles-ci sont situées le plus fréquemment sur la zone marginale des lobules. Les éléments présentant la plus grande densité de grains d'argent sont généralement ceux situés dans la zone centrale de l'ovocyte.

Les lobules vitellins ne présentent aucun signe de radioactivité. De très rares grains d'argent sont parfois observés au niveau de l'appareil de Golgi.

◦ 8 h d'incorporation

Près de 90 % des traces radioactives sont encore en relation avec les lobules lipidiques. Les autres grains se répartissent entre l'appareil de Golgi, la membrane de l'enveloppe ovocytaire et les mitochondries (Pl. I, fig. a). Le contenu des lobules vitellins ne présente pratiquement jamais de traces radioactives. Quand des grains d'argent apparaissent associés à des lobules vitellins, ils sont toujours localisés au niveau de la zone corticale de ces éléments et sont vraisemblablement associés aux membranes entourant le vitellus.

A ce stade, les coelomocytes présentent également un marquage important, localisé essentiellement au niveau des lobules lipidiques (Pl. I, fig. b).

◦ 24 h d'incorporation (dont une chasse de 22 heures)

Globalement les résultats sont analogues au stade précédent. Pratiquement tous les lobules lipidiques présentent des traces de radioactivité (Pl. I, fig. d). Ils regroupent à eux seuls plus de 80 % de la radioactivité, les autres sites de marquage sont indiqués dans le tableau suivant :

| | |
|--|------|
| Lipides | 80 % |
| Golgi | 4 % |
| Mitochondries | 3 % |
| Enveloppe ovocytaire et membranes cytoplasmiques | 8 % |
| Vitellus | 4 % |
| Noyau | 0 |

• Evolution ovocytaire *in vivo*

• 24 h d'incorporation

Les résultats sont comparables à ceux obtenus dans l'expérience *in vitro* pour une durée équivalente. La prédominance de la radioactivité au niveau des lobules lipidiques (Pl. I, fig. c) et son absence presque totale au niveau des lobules vitellins incitent à penser qu'il n'existe pas de différence fondamentale entre les voies du métabolisme lipidique des ovocytes évoluant *in vitro* (en absence de coelomocytes) et ceux évoluant dans l'environnement naturel du liquide coelomique.

• 3 jours d'incorporation

Ce temps long a été réalisé pour voir si un marquage survenait au niveau des lobules vitellins. Sans être complètement nul, celui-ci reste très faible par rapport aux lobules lipidiques.

2 - Discussion

Les techniques biochimiques fournissent une analyse précise des composés lipidiques mais à l'échelle de la cellule n'offrent que peu de renseignements sur la distribution entre les différents organites. Pour cette raison, nous avons complété les techniques biochimiques par une analyse autoradiographique afin de visualiser à l'échelle cellulaire la localisation des synthèses réalisées par incorporation de précurseurs radioactifs.

Deux catégories de compartiments cellulaires révèlent la présence de radioactivité. Les lobules lipidiques regroupent entre 80 et 90 % des traces radioactives, ils constituent vraisemblablement le site d'accumulation des lipides neutres. Divers types de membranes sont également marqués et paraissent impliquées dans la voie métabolique des phospholipides.

Le métabolisme des lipides neutres n'a été qu'assez rarement étudié en autoradiographie, sans doute par suite des difficultés techniques inhérentes à l'intervention de solvants dans la préparation des inclusions. Le marquage est visualisé initialement au niveau des lobules lipidiques. Il est donc peu probable que des organites cellulaires soient le siège de réactions préliminaires de synthèse, quoique le rôle du réticulum ait été envisagé au niveau du foie (STEIN et STEIN, 1967a). Il est vraisemblable que, comme dans la glande mammaire (STEIN et STEIN, 1967b) le marquage des lobules s'effectue par addition des lipides synthétisés aux éléments préexistants.

L'incorporation du glycérol s'accompagne également d'un marquage au niveau des divers sites membranaires, notamment la membrane plasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries. Le glycérol représente une voie métabolique directe dans la synthèse des phospholipides. En biochimie, ces derniers sont séparés par traitement à l'acétone. En autoradiographie ceux-ci sont visualisés et l'analyse de l'incorporation du glycérol a même été utilisée pour étudier les sites de biogénèse membranaire (BIBB et YOUNG, 1974). La signification du marquage de l'appareil de Golgi se doit toutefois d'être discutée. Si cet organite est bien connu comme site de synthèse membranaire, il a également été établi qu'il joue un rôle dans l'accumulation des triglycérides des cellules intestinales (CLEMENT, 1980) et qu'il intervient dans les synthèses de lipoprotéines (STEIN et STEIN, 1967 a, b). Dans notre matériel, le taux de lipoprotéines ovocytaires est assez important mais une partie de ce matériel provient vraisemblablement de la vitellogénine élaborée par les coelomocytes. Or le matériel précurseur du vitellus parvient directement aux lobules vitellins sans transiter par l'appareil de Golgi (FISCHER et DHAINAUT, 1985). Un autre fait laisse à penser que le marquage golgien par le glycérol résulte des synthèses de phospholipides. La choline est un précurseur beaucoup plus spécifique des phospholipides et ses modalités d'intégration ont été précisées au niveau de divers types membranaires (FLICKINGER et READ, 1982). Son incorporation dans la zone corticale des ovocytes (voir chapitre Phospholipides), recouvre celle du glycérol et caractérise des zones riches en membranes.

PLANCHE I

Figure a - 8 heures d'incorporation du glycérol ^3H dans les ovocytes *in vitro*. Les grains d'argent se rencontrent dans les lobules lipidiques (L) et l'appareil de Golgi (G). Les lobules vitellins ne sont pas marqués. E.O. : enveloppe ovocytaire, V : vitellus. X 10 000.

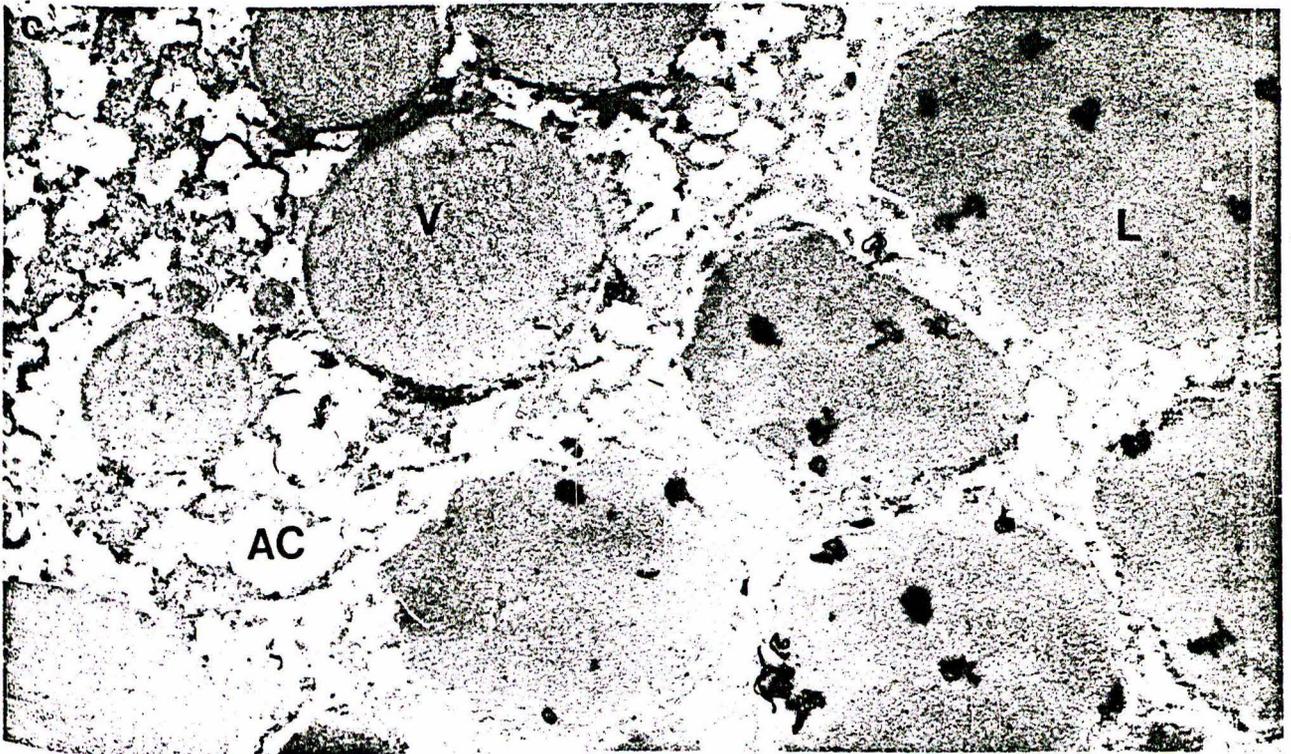
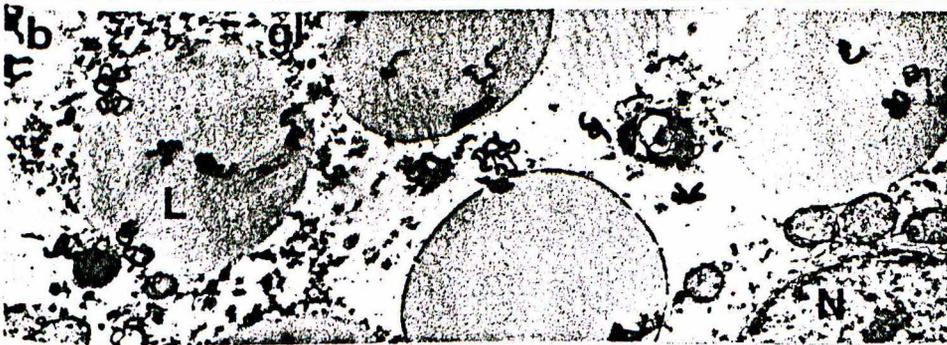
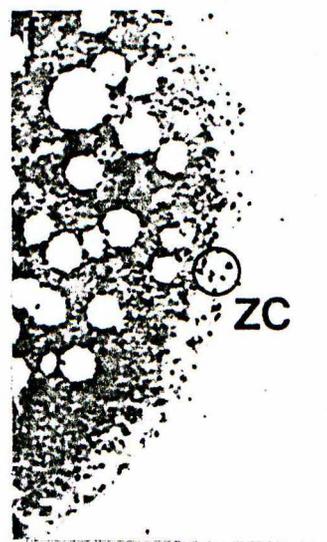
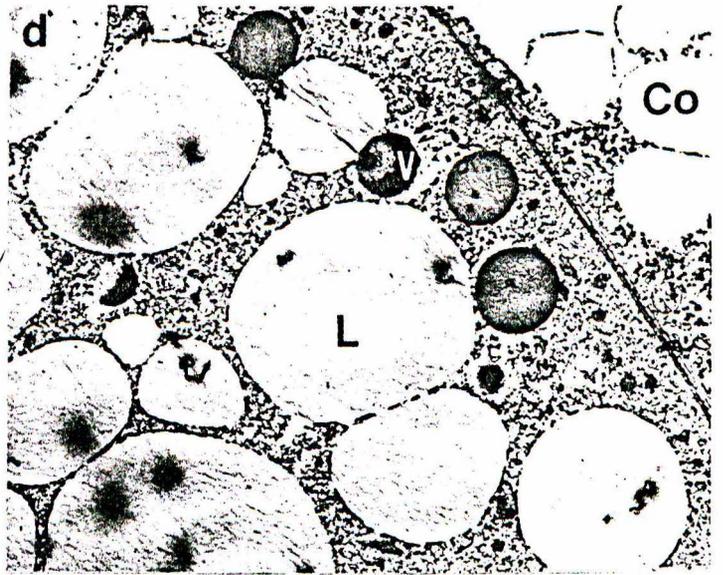
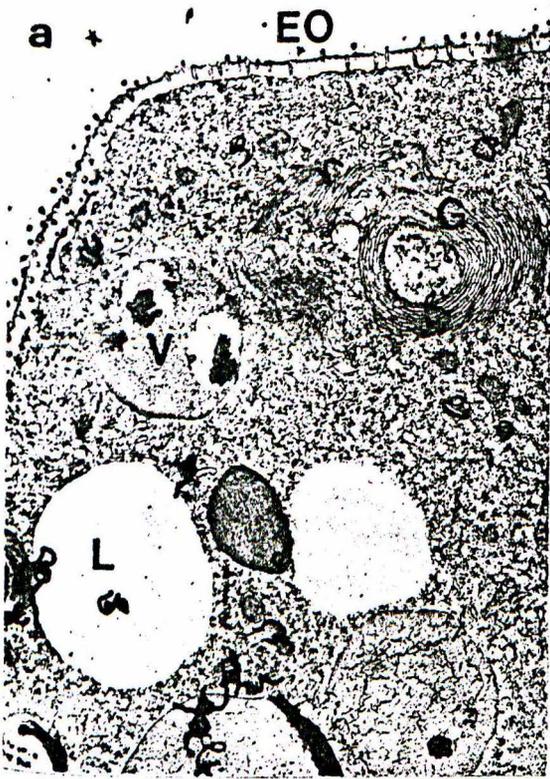
Figure b - Incorporation du glycérol ^3H dans les coelomocytes *in vitro*. Après 8 heures d'incorporation, la majeure partie du marquage est localisée sur les lobules lipidiques (L). Les zones riches en glycogène (gl) ne présentent pas d'accumulation de radioactivité. N : noyau. X 8 000.

Figure c - 24 heures d'incorporation du glycérol ^3H dans les ovocytes *in vivo*. On remarque la prédominance de la radioactivité au niveau des lobules lipidiques (L) et son absence presque totale au niveau des lobules vitellins (V). AC : alvéoles corticales. X 7 000.

Figure d - Après 24 heures d'incorporation du glycérol ^3H (dont une chasse de 22 heures) dans les ovocytes *in vitro*, le marquage est toujours localisé au niveau des lobules lipidiques (L). Le vitellus n'est toujours pas marqué (V). X 9 600.

Figure e - Incorporation de choline ^3H (24 heures). Très forte synthèse par les coelomocytes. X 1 200.

Figure f - Incorporation de choline ^3H (24 heures). Marquage localisé dans la zone corticale de l'ovocyte. ZC : zone corticale. X 2 000.



LIPOPROTEINES

LIPOPROTÉINES

INTRODUCTION

Les résultats du chapitre précédent montrent que les ovocytes isolés sont capables de réaliser une autosynthèse de lipides, la catégorie synthétisée en majeure partie était celle des TG.

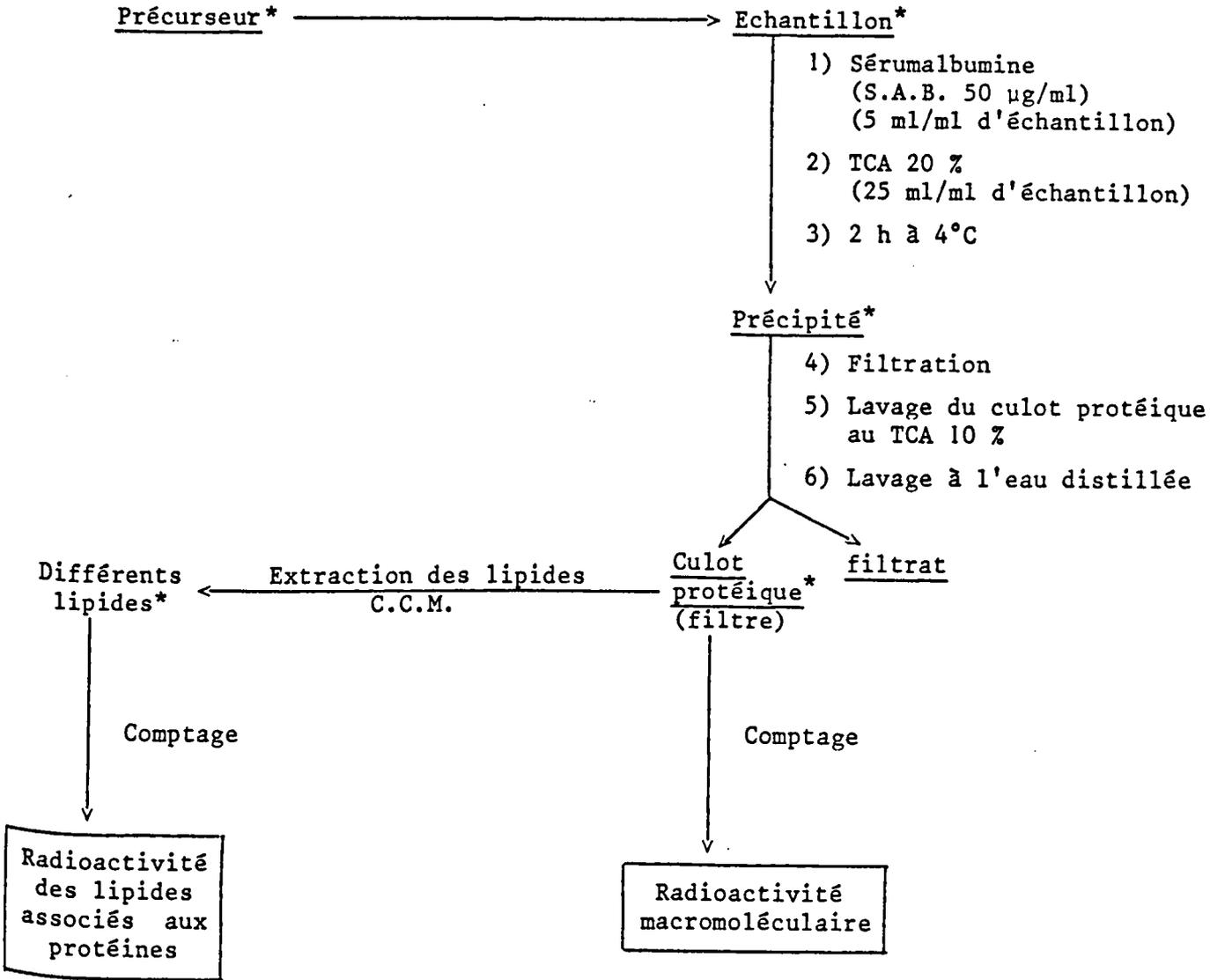
Les coelomocytes synthétisent également des lipides, mais contrairement au cas des ovocytes, ils semblent les relâcher à court terme dans le milieu environnant. Plusieurs hypothèses peuvent être émises sur le rôle du liquide coelomique :

- transfert vers les gamètes,
- métabolisme général,
- utilisation par les tissus somatiques et notamment les muscles.

Des travaux faits sur d'autres espèces animales (Insectes) (CHINO *et al.*, 1969), ont montré l'existence de molécules transporteuses de lipides chez ces animaux. Ces molécules sont de nature lipoprotéique. Aucun travail dans ce sens n'a été fait jusqu'à présent chez les Annélides, ce qui conduit à poser une série de questions :

- . Existe-t-il des lipides associés aux protéines dans le compartiment cellulaire et notamment dans le milieu intérieur : le LC ?
- . Les coelomocytes considérés comme la source éventuelle de lipides ovocytaires peuvent-ils synthétiser des lipoprotéines ? Celles-ci sont-elles relâchées dans le milieu environnant ?
- . Enfin, les ovocytes sont-ils capables *in vitro* d'absorber les macromolécules synthétisées par les coelomocytes ?

Pour tenter de répondre au moins partiellement à ces questions, nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences, en utilisant les techniques de WHEELER (1984) qui sont basées sur la précipitation des protéines au TCA :

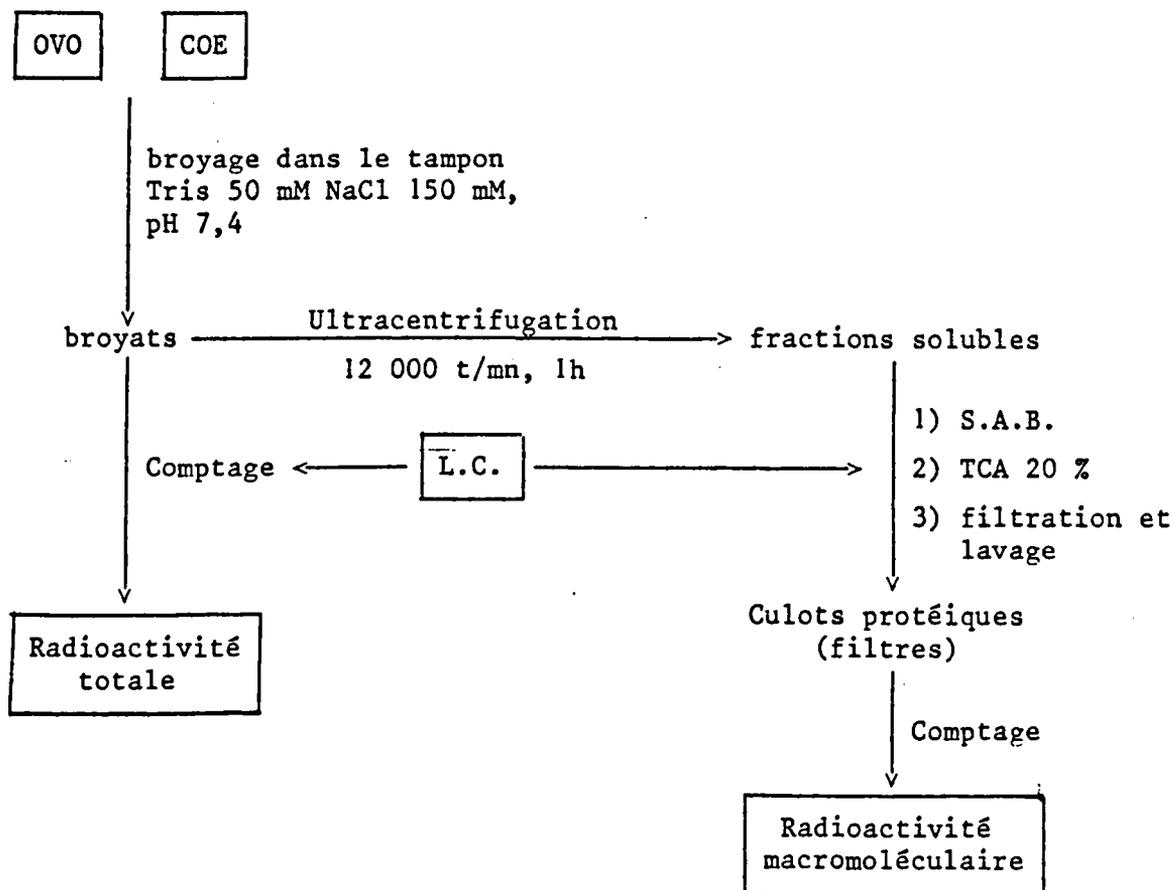


I - ANALYSE IN VIVO DES LIPOPROTEINES RADIOACTIVES
DE COMPARTIMENTS CELLULAIRES

1 - Protocole expérimental

L'expérience est réalisée sur 10 animaux (*P. cultrifera* de diamètre ovocytaire 190 µm. Une dose de 50 µCi de glycérol ³H est administrée à chaque animal. Les vers sont ensuite divisés en deux lots de 5 animaux chacun et maintenus dans les mêmes conditions (eau de mer filtrée à 15°C).

A 24 h d'incubation pour le 1er lot d'animaux et 4 jours pour le deuxième, les animaux sont ponctionnés et la radioactivité (totale et macromoléculaire) est testée pour chaque compartiment coelomique :



2 - Résultats

Les résultats sont donnés par le tableau suivant :

Tableau 5 - Evolution en fonction du temps de la radioactivité totale et macromoléculaire dans les 3 compartiments coelomiques de *P. cultrifera* (\varnothing 190 μ m) 24 h et 4 j après injection de glycérol ^3H .

| Echantillons | Radioactivité totale | | Radioactivité macromoléculaire | | $\frac{R^* \text{ macromol.} \times 100}{R^* \text{ totale}}$ |
|--------------|----------------------|------|--------------------------------|------|---|
| | cpm/ γ | % | cpm/ γ | % | |
| LC 24 h | 562 | 44,5 | 14 | 14,4 | 2,6 |
| OVO 24 h | 88 | 7,4 | 23,5 | 24,1 | 26,7 |
| COE 24 h | 568 | 48,1 | 60 | 61,5 | 10,5 |
| LC 4 j | 449 | 50,9 | 10,5 | 21,4 | 2,3 |
| OVO 4 j | 100 | 11,3 | 19,7 | 40,1 | 19,7 |
| COE 4 j | 333 | 37,8 | 18,9 | 38,5 | 5,7 |

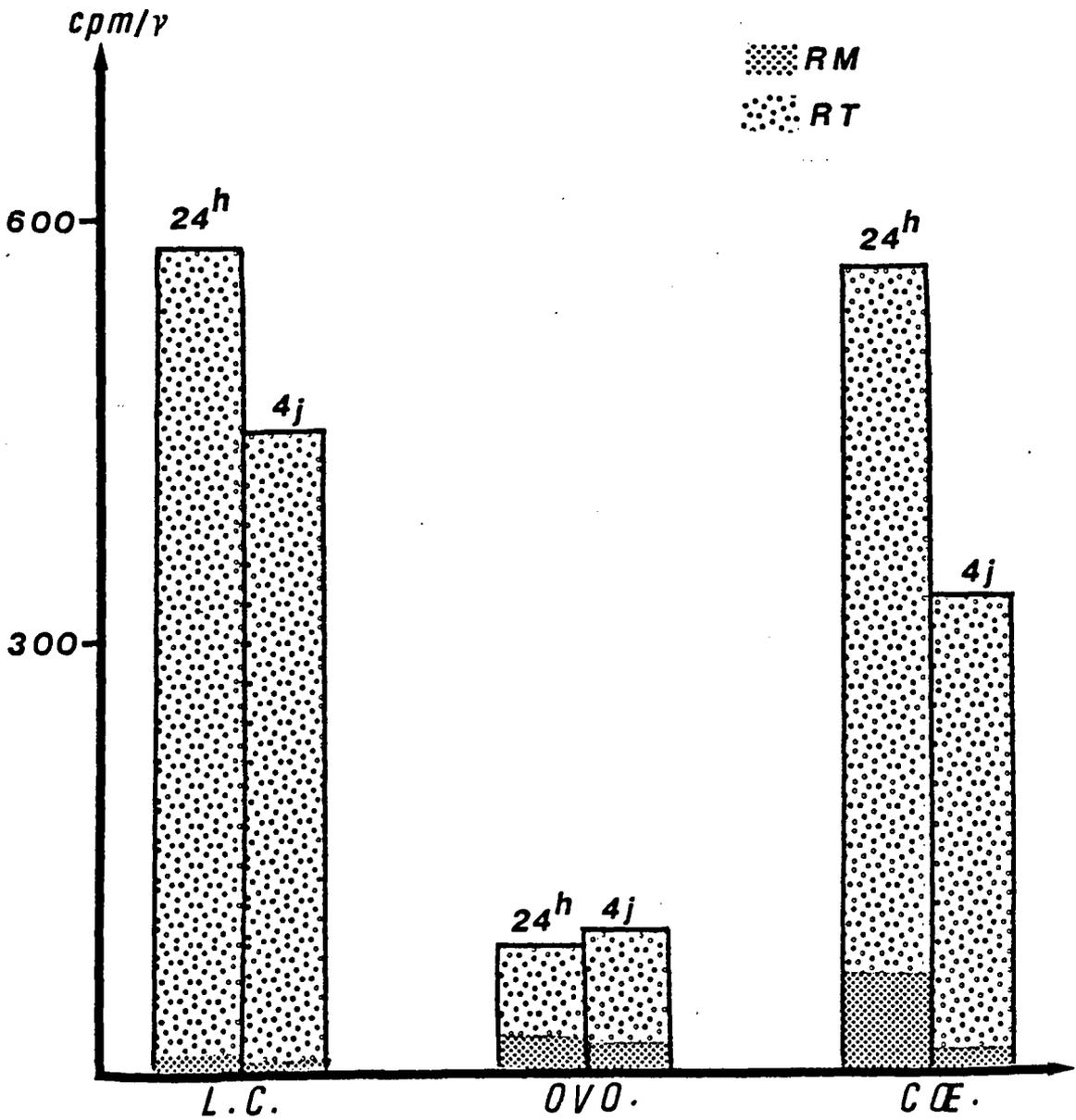


Figure 20 - Evolution de la radioactivité totale et de la radioactivité macromoléculaire dans les trois compartiments coelomiques de *P. cultrifera* (\varnothing 190 μ m), après incorporation *in vivo* du glycérol ^3H .

D'après ces résultats, on constate que la radioactivité totale du L.C. est très forte par rapport aux autres compartiments cellulaires. Il est possible que ceci soit dû à la présence du précurseur non métabolisé mais ceci est peu vraisemblable notamment pour le temps long de 4 jours.

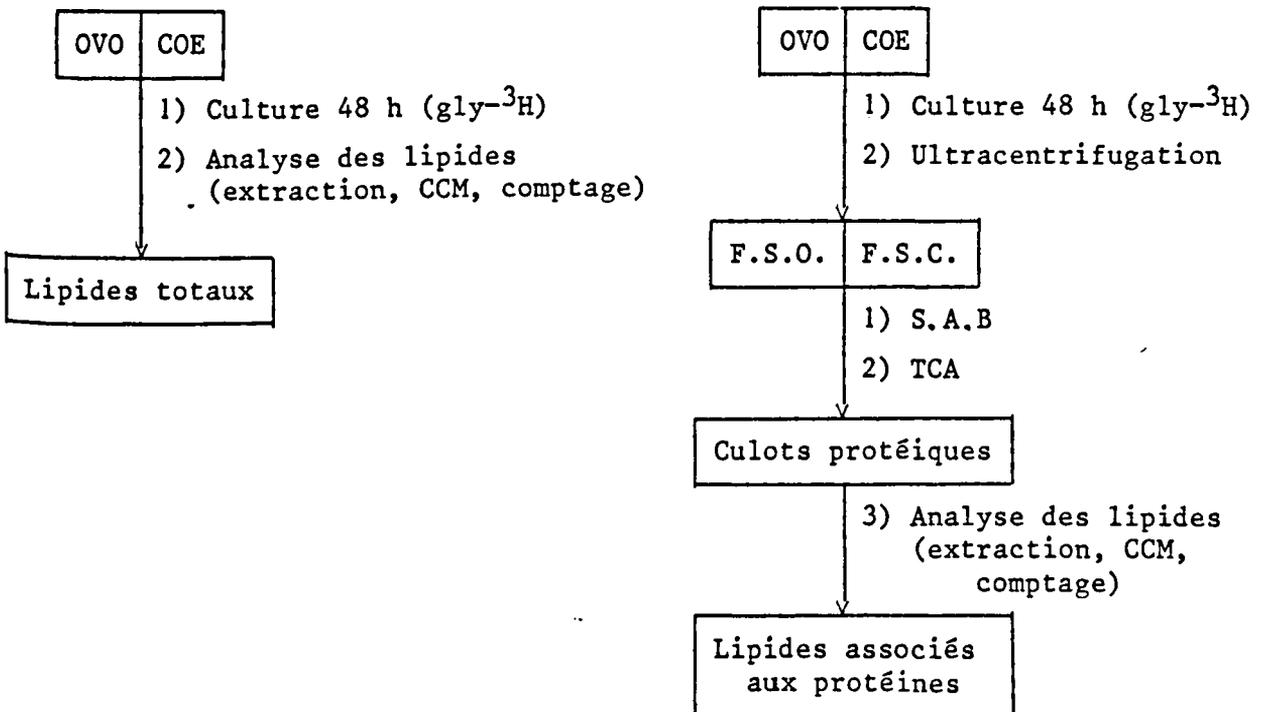
D'autre part, par rapport aux lipides totaux, les macromolécules lipoprotéiques ne représentent qu'une faible part dans le L.C. Par contre, elles sont importantes dans les ovocytes où on trouve 26,7 % de la radioactivité incorporée sous forme lipoprotéique à 24 h. Le marquage de ces macromolécules semble augmenter en fonction du temps dans le L.C. et les ovocytes. Il diminue par contre dans les coelomocytes, ce qui laisse penser à une possibilité de libération de lipoprotéines par ces cellules.

II - SYNTHÈSE IN VITRO DE LIPOPROTEINES PAR LES CELLULES COELOMIQUES

1 - Protocole expérimental

Cette expérience est faite sur *N. diversicolor* de 130 µm. Au total on a utilisé 20 animaux. Le contenu coelomique de ces animaux est séparé en ovocytes et coelomocytes. Chaque catégorie cellulaire est cultivée en présence de glycérol ³H à raison de 40 µCi/ml de milieu de culture. Le temps d'incorporation étudié ici est de 48 heures.

Deux séries expérimentales sont menées en parallèle afin de déterminer la radioactivité incorporée dans les lipides totaux et dans les lipides associés :



2 - Résultats

Tableau 6 - Radioactivité des lipides totaux et des lipides associés dans les ovocytes et les coelomocytes après 48 heures de culture en présence de glycérol ^3H .

| | | | MG + PL | DG | SL | AGL | TG | WE | SE |
|--------------------------------|-------------------|---------------|---------|-------|------|------|--------|------|------|
| Lipides totaux | ovocytes 48 h | cpm/ γ | 7,12 | 10,94 | 4,68 | 3 | 244,48 | 1,24 | 0 |
| | | % | 3 | 4 | 2 | 1 | 89 | 1 | 0 |
| | coelomocytes 48 h | cpm/ γ | 27 | 33 | 31 | 10 | 1041 | 5 | 0 |
| | | % | 2 | 3 | 3 | 1 | 90 | 1 | 0 |
| Lipides associés aux protéines | ovocytes 48 h | cpm/ γ | 2 | 1,54 | 1,2 | 0,8 | 9,56 | 0 | 0,22 |
| | | % | 13 | 10 | 9 | 5 | 62 | 0 | 1 |
| | coelomocytes 48 h | cpm/ γ | 4,25 | 2 | 1,61 | 1,36 | 7,40 | 0 | 0 |
| | | % | 25 | 12 | 10 | 9 | 44 | 0 | 0 |

Tableau 7 - Rapport Lipides associés x 100/Lipides totaux dans les cellules coelomiques après 48 heures de culture en présence de glycérol ^3H .

| Compartiment coelomique | MG + PL | DG | SL | AGL | TG | WE | SE | Total global |
|-------------------------|---------|----|----|-----|-----|----|----|--------------|
| Ovocytes 48 h | 28 | 14 | 25 | 26 | 4 | 0 | 0 | 5 |
| Coelomocytes 48 h | 16 | 6 | 5 | 14 | 0,7 | 0 | 0 | 1 |

Cette expérience réalisée *in vitro* confirme la possibilité de synthèses de macromolécules lipoprotéiques par les cellules coelomiques. Parmi les classes lipidiques associées aux protéines, on note essentiellement la participation des TG à la fois des ovocytes (62 %) et des coelomocytes (44 %). Toutefois, le pourcentage des lipides associés par rapport aux lipides totaux se caractérise dans l'ensemble par des valeurs très faibles, globalement 5 et 1 %.

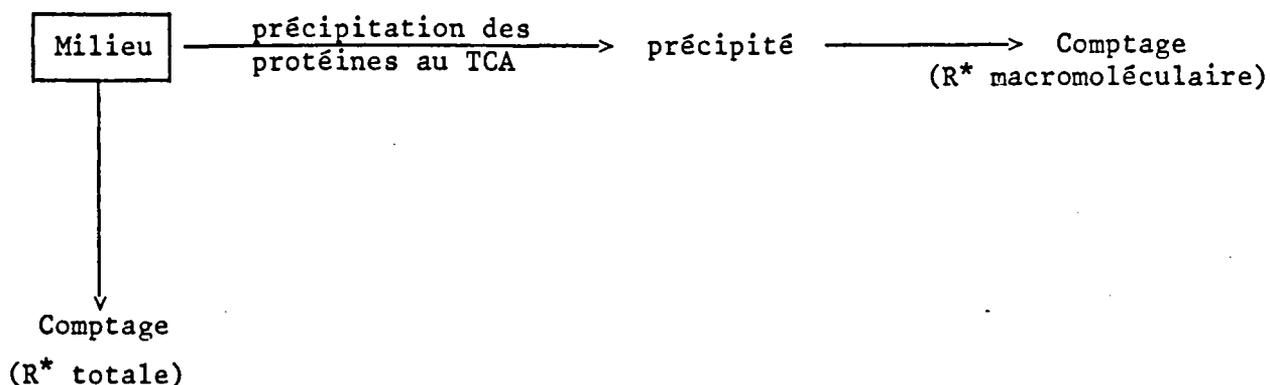
III - LIBERATION DES LIPOPROTEINES PAR LES CELLULES COELOMIQUES
DANS LE MILIEU DE CULTURE

1 - Protocole expérimental

L'expérience se décompose ici en plusieurs étapes :

- incorporation du glycérol ^3H dans les ovocytes et les coelomocytes *in vitro*,
- mise sur un milieu de culture froid, des cellules ayant incorporé le précurseur,
- "release".

L'espèce étudiée ici est *N. diversicolor* de diamètre ovocytaire 130 μm . Le contenu coelomique de 15 animaux est séparé en ovocytes et coelomocytes. Les cellules sont ensuite placées séparément sur un milieu de culture. A $t = 0$ on ajoute du glycérol ^3H dans les milieux de culture à raison de 200 $\mu\text{Ci}/10 \text{ ml}$ de milieu. A $t = 24 \text{ h}$, les cellules sont récupérées par centrifugation (6000 t/mn, 5 m,) puis lavées trois fois avec du milieu froid afin de se débarrasser du précurseur non incorporé. Les cellules coelomiques sont ensuite placées dans un milieu froid et incubées en lieu stérile. A $t = 4 \text{ h}$, 24 h et 48 h, des aliquots sont prélevés dans les milieux de culture des ovocytes et des coelomocytes. La radioactivité macromoléculaire ainsi que la radioactivité totale sont analysées comme dans les expériences précédentes :



2 - RésultatsTableau 8 - Libération de la radioactivité dans le milieu de culture par des cellules coelomiques marquées avec du glycérol ^3H .

| Milieux de culture | Radioactivité totale (cpm/ γ) | Radioactivité macromoléculaire (cpm/ γ) | $\frac{\text{R}^* \text{ macromoléculaire} \times 100}{\text{R}^* \text{ totale}} \%$ |
|--------------------|---------------------------------------|---|---|
| OVO 4 h | 6635 | 2 | 0,03 |
| OVO 24 h | 102 | 4,6 | 4,51 |
| OVO 48 h | 85 | 3,6 | 4,23 |
| COE 4 h | 778 | 11,7 | 1,5 |
| COE 24 h | 2442 | 138 | 5,65 |
| COE 48 h | 437 | 39,5 | 9,04 |

On remarque que le "relargage" de macromolécules lipoprotéiques par les ovocytes est très faible. En effet, seule 4 % de la radioactivité totale du milieu de culture est sous forme lipoprotéique. Ce comportement est normal pour des cellules de réserves, les lipoprotéines libérées pourraient provenir d'ovocytes morts ou en mauvais état. Par contre, dans le milieu des coelomocytes, on constate une augmentation constante du pourcentage de macromolécules marquées. Ces dernières représentent à peu près 9 % de la radioactivité libérée par les coelomocytes à 48 heures.

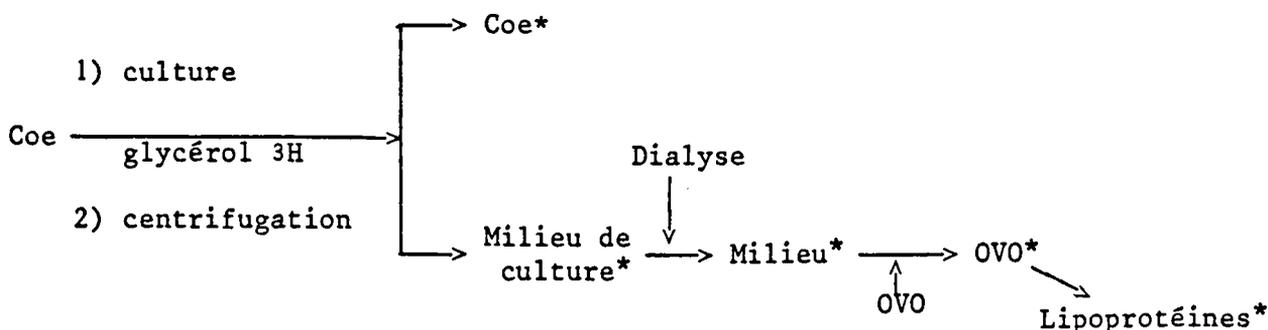
IV - INCORPORATION PAR LES OVOCYTES DE MACROMOLECULES SYNTHETISEES PAR LES COELOMOCYTES

1 - Protocole expérimental

D'après la manipulation précédente nous avons remarqué qu'il y a une part importante de la radioactivité "relarguée" par les coelomocytes sous forme macromoléculaire. Des ovocytes pourraient-ils incorporer ces macromolécules lipoprotéiques ? c'est à cette question que nous allons tenter de répondre ici.

Cette expérience est effectuée sur *N. diversicolor* \emptyset 130 μm . Les coelomocytes de dix animaux ont été incubés dans 10 ml de

milieu de culture pendant 48 h en présence de 300 μ Ci de glycérol ^3H . Les coelomocytes sont ensuite enlevés du milieu par centrifugation (6000 t/mn, 10 mn). Pour le débarrasser des petites molécules marquées et de l'excès de précurseur, le milieu de culture est dialysé contre l'eau de mer à 1 ‰ de glucose pendant 48 h. Ensuite des ovocytes sont placés dans ce milieu A et incubés en conditions stériles à 15°C. Les ovocytes proviennent du même type d'animaux que les coelomocytes de départ. A t = 48 h d'incubation, les ovocytes sont récupérés par centrifugation (6000 t/mn, 10 mn) puis lavés trois fois avec du milieu de culture froid. Des fractions solubles (F.S.O.) sont alors préparées à partir de ces ovocytes (voir expérience I, ci-dessus) Ces F.S.O. sont alors testées comme précédemment .



2 - Résultats

a - Variation de la radioactivité du milieu de culture dialysé (résultats exprimés en cpm/ml de milieu).

Avant incubation : 230 200

Après incubation : 163 700

b - Radioactivité des fractions solubles ovocytaires après 48 h d'incubation

(résultats exprimés en cpm/ml de F.S.O.)

Radioactivité totale : 34 000

Radioactivité macromoléculaire : 13 000

On remarque d'après ces résultats que les ovocytes sont capables d'absorber des macromolécules lipoprotéiques. En effet, après 48 h d'incubation dans un milieu contenant des macromolécules marquées au glycérol ^3H , l'ovocyte incorpore près de 70 % de cette radioactivité dont 38 % reste sous forme macromoléculaire dans la fraction soluble de l'ovocyte.

3 - Discussion

Les lipoprotéines sont bien étudiées chez les Insectes. Les travaux de WHEELER (1984) sur les lipoprotéines de l'hémolymphe de *Locusta migratoria* montrent que les lipides sont transportés du corps gras jusqu'aux muscles du vol, via l'hémolymphe, essentiellement sous forme de DG-lipoprotéines. THOMAS (1984) a abouti au même résultat chez *Schistocerca gregaria*. Cette forme de transport a été aussi signalée chez *Philo-samia cynthia* par CHINO *et al.* en 1969.

Chez les autres Invertébrés, la situation est peu connue. BEIJNINK et VOOGT (1984) ont signalé l'impossibilité de détecter des lipoprotéines dans le liquide coelomique de l'étoile de mer *Asterias rubens*. Chez les Annélides, le problème des associations lipides-protéines n'est pas clair. Dans le liquide coelomique (lieu de transfert entre les cellules coelomiques) le taux de lipides paraît assez important. Ces lipides totaux du liquide coelomique représentent jusqu'à 4,7 % par rapport à la masse totale de matière sèche des 3 compartiments coelomiques. L'expérience faite *in vivo* (paragraphe I ci-dessus) montre que les lipides associés à des protéines par contre sont eux très faibles dans le liquide coelomique. En collaboration avec BAERT nous avons montré l'impossibilité de la mise en évidence de macromolécules lipoprotéiques par fluorographie dans le liquide coelomique après incorporation de glycérol ³H. Ce problème se retrouve d'ailleurs dans le transfert de vitellogénine (BAERT, 1984). Cet auteur a montré que la vitellogénine, est toujours en taux très faible, difficilement détectable dans le coelome.

D'autre part, la fraction protéique intervenant éventuellement dans le transfert de lipides est difficile à distinguer de la molécule de vitellogénine qui contient également une partie de lipides. Une réponse à cette question pourrait être apportée par utilisation de techniques d'immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques de la vitelline.

INTRODUCTION A L'ETUDE DES PHOSPHOLIPIDES

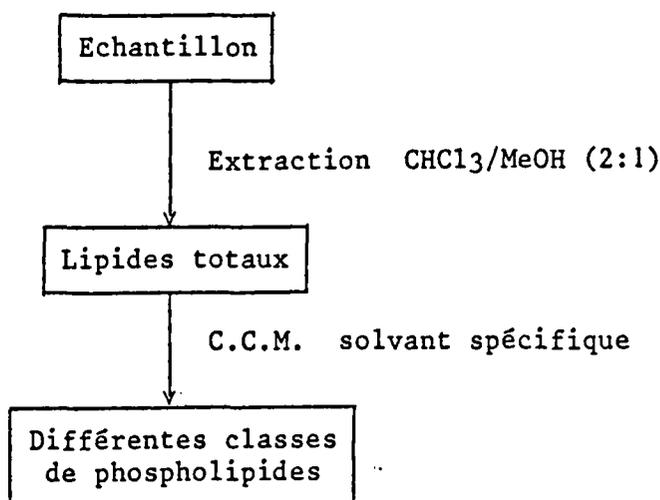
INTRODUCTION À L'ÉTUDE DES PHOSPHOLIPIDES

Contrairement aux glucides qui constituent une famille de composés relativement homogène, les lipides forment un groupe très hétérogène de composés, dont les structures sont très différentes. Nous avons divisé ces lipides en deux familles : la première est formée de lipides simples, ce sont les Lipides Neutres que nous avons étudié dans le chapitre précédent. La deuxième famille englobe les lipides complexes qui sont représentés en majeure partie par les phospholipides. C'est cette dernière catégorie de lipides polaires que nous allons envisager maintenant.

Les phospholipides sont des constituants bien connus des membranes et à ce titre, ils jouent un rôle biologique important. Malgré cela, ils ont encore été peu étudiés chez les Invertébrés. Chez les Annélides, les phospholipides représentent jusqu'à 30 % de l'extrait lipidique de l'animal (SALISBURY et ANDERSON, 1939). Nous avons effectué une étude qualitative et quantitative de ces phospholipides chez les deux espèces de Polychètes : *P. cultrifera* et *N. diversicolor*, et ce travail a été complété par une approche métabolique.

I - ETUDE QUALITATIVE

A cause de l'insolubilité des phospholipides dans l'acétone, beaucoup d'auteurs préconisent de les séparer par précipitation (voir Matériel et Méthodes) avant de les analyser en chromatographie. Cette méthode est peu précise pour une étude quantitative. En 1982, KORTE et CASEY ont proposé une nouvelle technique d'analyse qualitative des phospholipides qui ne passe pas par la précipitation à l'acétone.



C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée.

1 - Expérience

Deux espèces d'animaux sont utilisées : *P. cultrifera* et *N. diversicolor*. Leurs diamètres ovocytaires sont de 120 μm , 140 μm , 180 μm , 190 μm et 210 μm . Dix animaux de chaque diamètre ovocytaire et de chaque espèce sont ponctionnés et leurs contenus coelomiques séparés en ovocytes, coelomocytes et L.C. Les restes des corps sont aussi gardés pour analyse.

Les différents échantillons sont alors broyés dans l'eau distillée et lyophilisés. Les lipides sont ensuite extraits au chloroforme-méthanol (2:1).

• Chromatographie

Une fois l'extraction terminée, les lipides totaux sont récupérés par filtration. Après les avoir concentrés par évaporation sous azote, des aliquots de chaque extrait (50 μl) sont déposés sur une plaque de gel de silice afin de séparer les différentes classes de phospholipides.

. Plaques . Nous avons utilisé les mêmes plaques que pour l'analyse des Lipides Neutres (voir Matériel et Méthodes).

. Solvant de séparation . Le solvant choisi pour développer notre séparation est celui utilisé par KORTE et CASEY (1982) : chloroforme-éthanol-eau-triéthylamine (30:34:8:35).

. Révélation des taches . On a utilisé les mêmes révélateurs que pour les LN, à savoir du H_2SO_4 5 %, vapeurs d' I_2 et la Rhodamine (Matériel et Méthodes).

2 - Résultats

Sept classes de phospholipides ont été mises en évidence, à la fois au niveau des ovocytes, des coelomocytes ou du reste du corps (muscles, téguments). Ces classes ont pu être identifiées par utilisation de témoins. Il s'agit de lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylglycérol. Une tache toutefois n'a pu être déterminée et nous l'avons désignée sous le nom de tache X (voir figure 21). Quant aux liquides coelomiques, leur profil chromatographique est différent de celui des autres. En général, on y observe la présence de la tache X, de la phosphatidylcholine et de la phosphatidylglycérol. Cependant des fluctuations

assez importantes ont été notées selon la période de récolte, même à l'intérieur d'une même classe ovocytaire.

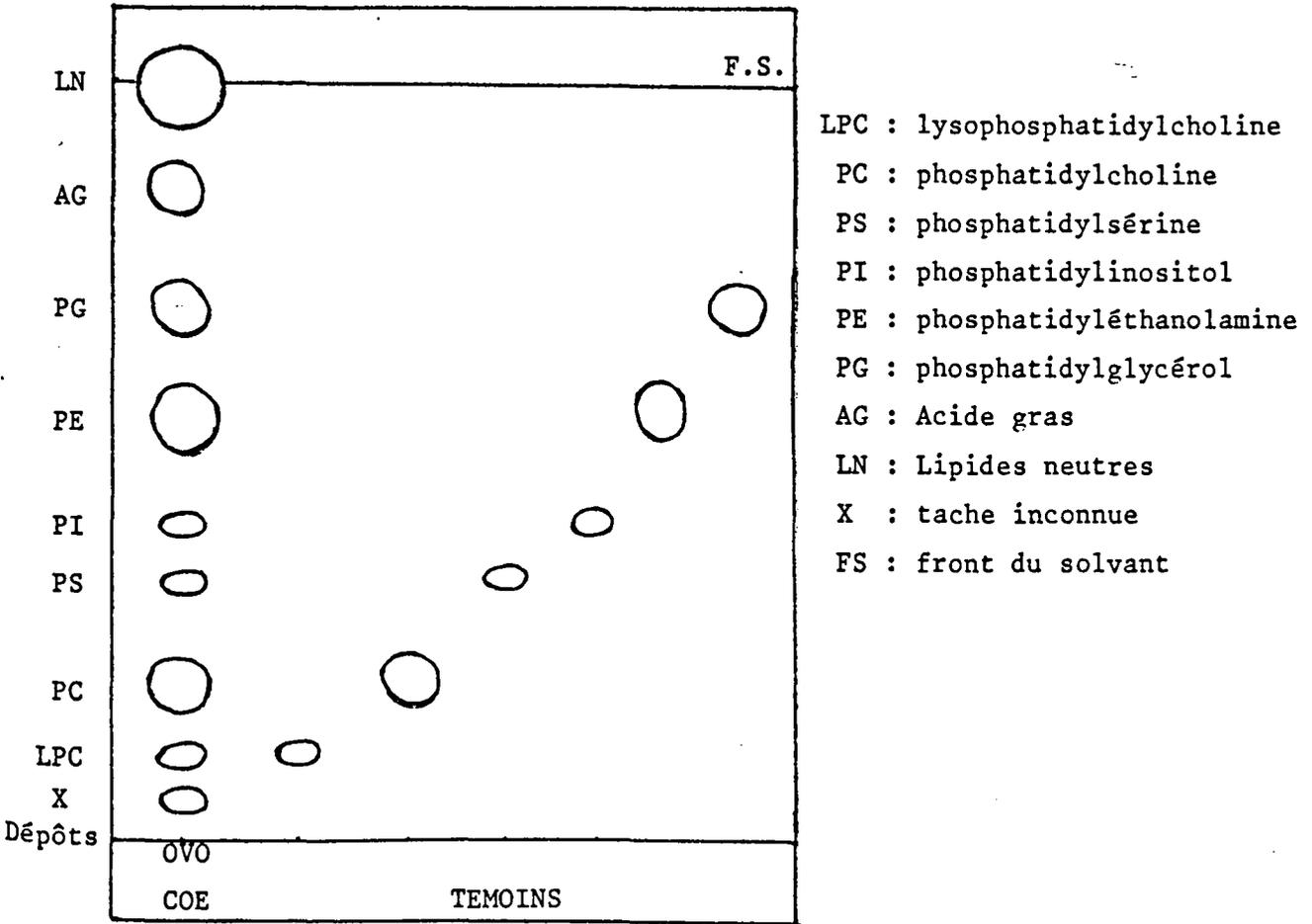


Figure 21 - Séparation et identification des différentes classes de phospholipides sur C.C.M.
 - Solvant de migration : $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{N}(\text{Et})_3$ (30:34:8:35)
 - Révélation : Rhodamine.

3 - Discussion

Que ce soit chez *P. cultrifera* ou *N. diversicolor*, l'étude qualitative des phospholipides a donné des résultats analogues en ce qui concerne les cellules coelomiques. Par contre, le liquide coelomique se caractérise par un nombre de tache plus réduit.

D'autres auteurs ont trouvé des résultats semblables aux nôtres chez divers Invertébrés. *POCOCK et al.* (1969), sur le corps entier de *N. diversicolor* ont signalé la présence dominante de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine. *McLAUGHLIN* (1971) qui travaillait sur l'Oligochète *Eisenia foetida* a trouvé que ce ver contenait trois classes principales de phospholipides : phosphatidylglycérol, phosphatidyléthanolamine

et phosphatidylsérine. Les mêmes phospholipides sont trouvés chez *Lumbricus terrestris* par KREPS *et al.* (1963) puis par ROOTS et JOHNSON (1966). SUBRAHMANYAM (1967) a trouvé les six classes principales de phospholipides chez les Mollusques : PG, PI, PS, PC, PE et la LPC. Les mêmes résultats sont trouvés par ESER AYANOGLU (1982) chez les Eponges.

Chez les Vertébrés les mêmes classes de phospholipides ont été trouvées, ainsi DOUGLAS *et al.* (1984) par utilisation de l'hexane-diéthyléther-Acide acétique (80:20:2) ont pu mettre en évidence les PG, PS, PI, PE, PC et la Sphingomyéline chez diverses espèces de poissons. En utilisant le même solvant de développement chromatographique que le nôtre, KORTE *et al.* (1982) ont signalé aussi la présence de sphingomyéline et l'absence de lysophosphatidylcholine dans plusieurs tissus humains.

On remarque donc que la composition en phospholipides varie peu suivant les espèces ; certaines classes comme la PC, la PE, la PS et la PI semblent être communes à tous les êtres vivants.

II - ETUDE QUANTITATIVE

Contrairement aux protéines, il n'existe que peu de techniques permettant de quantifier les phospholipides dans les tissus animaux. La principale technique est celle préconisée par MACHEBOEUF et DELSAL (1943), et qui consiste en un dosage du phosphore. Cette technique a été reprise par KREMBEL en 1966 puis par BLANCHIER (1981).

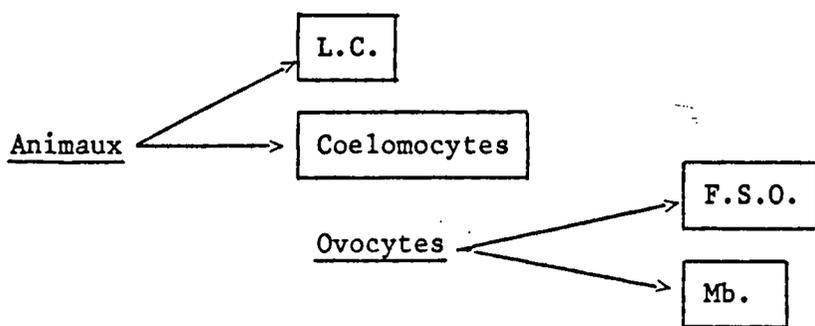
Nous avons donc appliqué cette technique en l'adaptant à notre matériel biologique et à notre procédure de séparation chromatographique des phospholipides.

1 - Principe (voir Matériel et Méthodes)

Ce dosage est basé sur la transformation des ions phosphates en phosphomolybdate et sur la coloration bleue qui se développe en présence d'un réducteur. La courbe d'étalonnage a été établie à partir d'une solution de phosphate monopotassique.

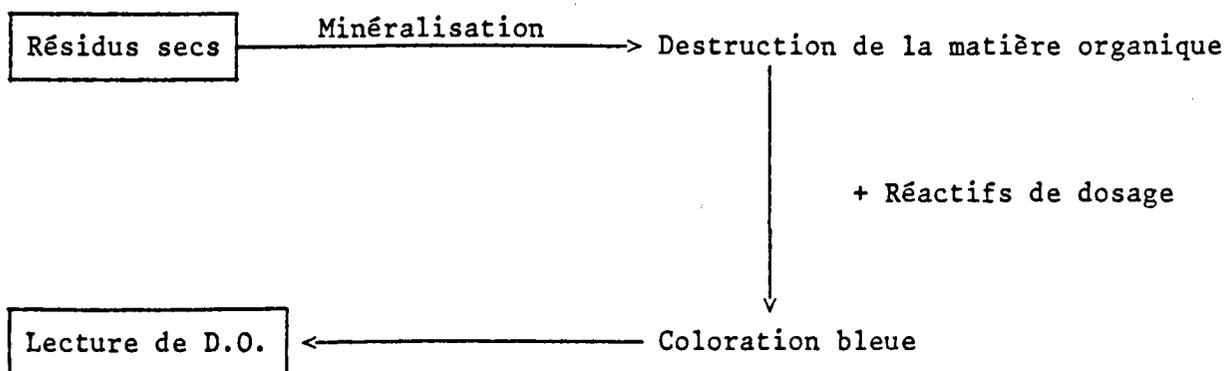
2 - Expérience

Les dosages de phospholipides ont été effectués sur *P. cultrifera*. Cinq diamètres ovocytaires différents ont été analysés (116 μm , 140 μm , 180 μm , 190 μm et 210 μm). Après ponction les contenus coelomiques sont séparés en ovocytes, coelomocytes et liquides coelomiques. Par ultracentrifugation (110 000 g/16 h) les ovocytes sont séparés en fraction soluble (FSO) et en membranes.



L'extraction des lipides et la séparation des différentes classes de phospholipides sont réalisées comme dans le chapitre précédent.

Les taches de phospholipides sont ensuite prélevées sur le gel et leur contenu est élué pendant 24 h par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1). Les éluats sont alors séchés sous azote et les résidus secs traités pour le dosage du phosphore. Nous rappelons ici les étapes principales :



Une gamme étalon nous permet alors de passer des densités optiques aux quantités de phosphore en microgrammes (γ).

3 - Résultats

Pour les liquides coelomiques, les coelomocytes et les fractions solubles ovocytaires, les résultats sont exprimés en γ de phosphore par γ de protéines de chaque échantillon.

Pour les membranes ovocytaires, les résultats sont donnés par rapport au contenu protéique des ovocytes correspondants.

Tableau 9 - Dosage du phosphore dans les différentes classes de phospholipides dans différents compartiments coelomiques (*P. cultrifera*) de diamètre ovocytaire : 116 μm , 140 μm , 180 μm , 190 μm et 210 μm .
+ : tache révélée en CCM mais non dosable ; - : tache inexistante

| Echantillons | Taches | | | | | | |
|---------------------|--------|-------|--------|-------|------------------------|------------------------|--------|
| | X | LPC | PC | PS | PI | PE | PG |
| LC \emptyset 116 | + | - | - | - | - | - | 0,034 |
| LC \emptyset 140 | + | - | - | - | - | - | 0,0004 |
| LC \emptyset 180 | 0,114 | - | + | - | - | - | - |
| LC \emptyset 190 | + | - | + | - | - | - | - |
| LC \emptyset 214 | 0,087 | - | 0,012 | - | - | - | - |
| COE \emptyset 116 | + | + | + | + | + | + | + |
| COE \emptyset 140 | + | + | + | + | + | 0,002.10 ⁻³ | + |
| COE \emptyset 180 | + | + | + | + | + | + | + |
| COE \emptyset 190 | 0,011 | + | 0,009 | + | + | + | + |
| COE \emptyset 210 | 0,179 | + | 0,033 | + | 0,464 | 0,003 | + |
| FSO \emptyset 116 | + | + | + | + | + | + | + |
| FSO \emptyset 140 | + | + | 0,0034 | + | + | + | + |
| FSO \emptyset 180 | 0,011 | 0,028 | 0,078 | 0,013 | 0,072 | 0,119 | 0,008 |
| FSO \emptyset 190 | 0,004 | 0,002 | 0,088 | 0,003 | 0,006 | 0,115 | 0,002 |
| FSO \emptyset 210 | 0,018 | 0,045 | 0,175 | 0,051 | 0,068 | 0,034 | 0,014 |
| Mb \emptyset 116 | + | + | 0,0001 | + | 0,008.10 ⁻³ | 0,04.10 ⁻³ | + |
| Mb \emptyset 140 | + | + | + | + | + | 0,006.10 ⁻³ | + |
| Mb \emptyset 180 | 0,010 | + | 0,034 | 0,004 | 0,032 | 0,006 | 0,002 |
| Mb \emptyset 190 | 0,0006 | ? | 0,008 | + | + | 0,027 | + |
| Mb \emptyset 210 | 0,003 | 0,019 | 0,044 | 0,008 | 0,030 | 0,103 | + |

Tableau 10 - Dosage du phosphore total dans les différents compartiments coelomiques d'animaux (*P. cultrifera*) de diamètre 116, 140, 180, 190 et 210 μm . [Résultats exprimés en γ phosphore/ γ protéines et en log 10000 X (γ phosphore/ γ protéines)].

| Echantillons | X = γ phosphore total/ γ de protéines | Log 10000 X |
|--------------|---|-------------|
| LC 116 | 0,034 | 2,53 |
| LC 140 | 0,0004 | 0,6 |
| LC 180 | 0,114 | 3,05 |
| LC 190 | + | + |
| LC 210 | 0,099 | 2,99 |
| COE 116 | + | + |
| COE 140 | 0,002.10 ⁻³ | - 3,7 |
| COE 180 | + | + |
| COE 190 | 0,021 | 2,32 |
| COE 210 | 0,679 | 3,8 |
| FSO 116 | + | + |
| FSO 140 | 0,0034 | 1,53 |
| FSO 180 | 0,329 | 3,51 |
| FSO 190 | 0,220 | 3,34 |
| FSO 210 | 0,405 | 3,61 |
| Mb 116 | 10 ⁻⁴ | - 4 |
| Mb 140 | 0,06.10 ⁻⁴ | - 1,22 |
| Mb 180 | 0,088 | 2,94 |
| Mb 190 | ? | ? |
| Mb 210 | 0,207 | 3,31 |

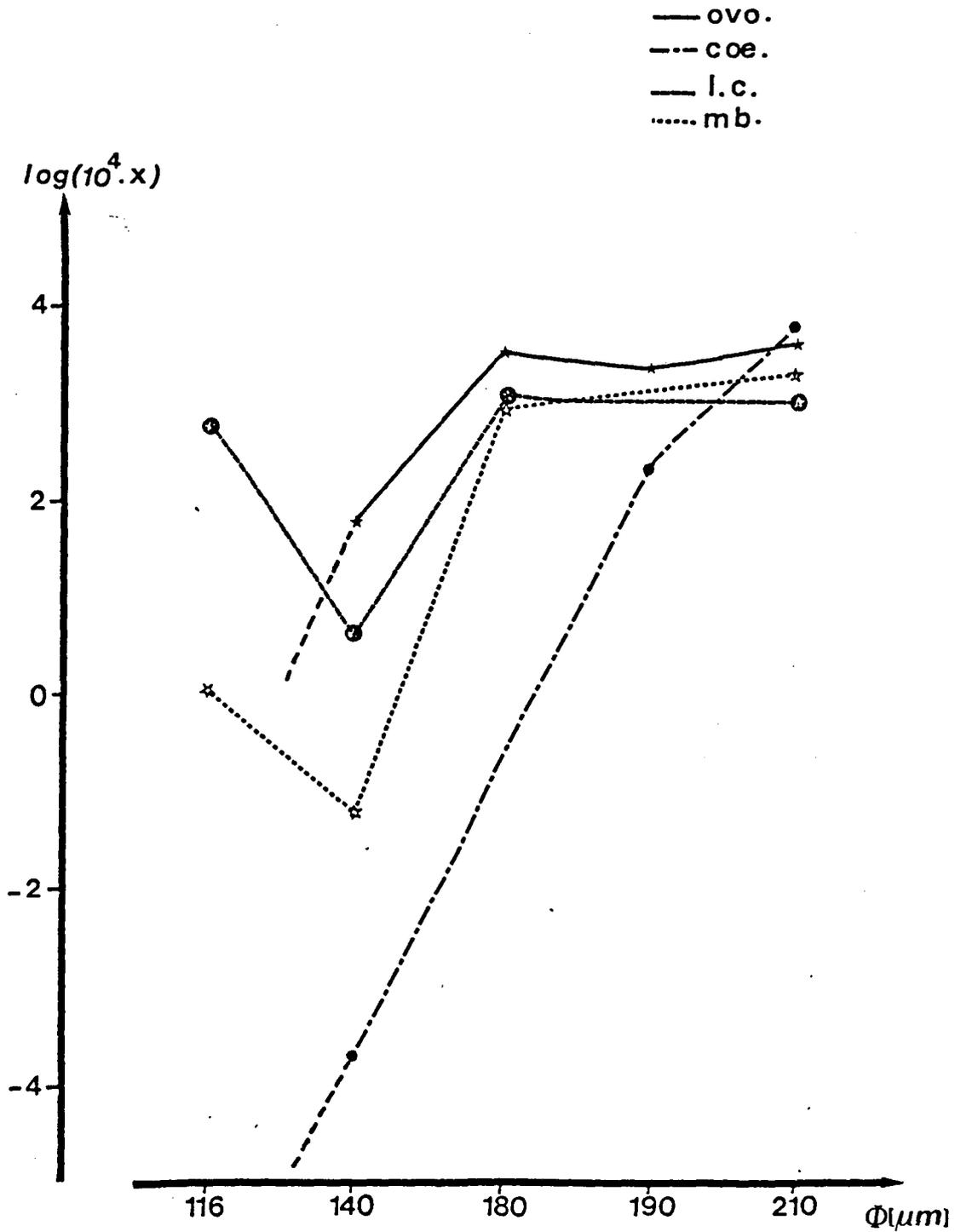


Figure 22 - Dosage du phosphore total dans les différents compartiments coelomiques d'animaux (*P. cultrifera*) de diamètres ovocytaires 116, 140, 180, 190 et 210 μm. [Résultats exprimés en log (10⁴ . x) x étant la quantité en γ de phosphore/ γ de protéine].

D'après les résultats exprimés dans les tableaux et les courbes ci-dessus, on peut faire plusieurs remarques :

La technique de dosage utilisée ici n'est sensible qu'à partir d'une certaine quantité de phosphore. Ceci explique bien l'impossibilité de doser le phosphore de plusieurs de nos taches (+).

Le liquide coelomique est le compartiment le plus pauvre en phospholipides quelque soit le stade ovocytaire considéré.

Par contre, les membranes ovocytaires, les fractions solubles ovocytaires et les restes des corps contiennent relativement beaucoup de phospholipides, surtout chez les animaux âgés (\emptyset 180, 190 et 210 μ m).

4 - Discussion

La relative richesse en phospholipides des membranes et des fractions solubles ovocytaires, surtout dans les gros diamètres ovocytaires, peut s'interpréter dans le sens des travaux de PORCHET (1974) et de DHAINAUT (1984). En effet, ces auteurs ont montré que durant l'ovogenèse, l'ovocyte de *P. cultrifera* connaît beaucoup de transformations. Il augmente considérablement de volume et plusieurs systèmes membranaires s'y développent en relation notamment avec l'élaboration des alvéoles corticaux. Le même phénomène s'observe chez *N. diversicolor* (DHAINAUT, 1969a, 1970b).

Il a été également démontré chez d'autres espèces animales que le taux des phospholipides est directement lié à la croissance pondérale de l'organe ou du tissu considéré. Par exemple, BLANCHIER (1981) a montré que dans les gonades (mâles ou femelles) de la seiche, la quantité de phospholipides augmente avec la maturation. Cet auteur a noté également des variations saisonnières qui peuvent être en relation directe avec l'alimentation.

Cette variation du taux de phospholipides apparaît aussi chez les Insectes. DELLA-CIOPPA *et al.* (1984 a, b) ont montré que chez *Leucoptaea maderae* les phospholipides du corps gras sont sous contrôle hormonal et varient considérablement au cours de l'ovogenèse.

En conclusion, on peut dire que la technique que nous avons utilisée pour doser les phospholipides chez *P. cultrifera* a permis de noter une différence entre animaux jeunes et animaux âgés. Chez ces derniers, comme dans plusieurs espèces animales, la synthèse des phospholipides est liée au déroulement de l'ovogenèse.

III - ETUDE METABOLIQUE

L'expérimentation a porté sur les deux espèces étudiées : *P. cultrifera* et *N. diversicolor*. Deux précurseurs ont été utilisés : le ^{32}P vu ses larges potentialités métaboliques, la ^3H choline liée par contre à une classe bien spécifique.

1 - ^{32}P

a - *In vivo*

(*P. cultrifera*, diamètre ovocytaire 140 μm).

* Expérience *

A $t = 0$ le précurseur radioactif [^{32}P : concentration = 1 mCi, 37 MBq (1 mCi/ml)], est injecté dans le coelome de huit animaux à raison de 30 à 50 $\mu\text{Ci}/\text{animal}$ selon le poids des animaux.

Après 48 h d'incorporation, les animaux sont ponctionnés, et les contenus coelomiques séparés en liquide coelomique, ovocytes et coelomocytes. Les cellules coelomiques sont alors broyées dans l'eau distillée. Un dosage de protéines est réalisé pour les 3 compartiments qui sont alors lyophilisés et dont le contenu lipidique est extrait. Ces extraits, après filtration, sont séchés sous N_2 puis repris par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1). La séparation, le développement et la révélation des différentes classes phospholipidiques sont faits suivant le procédé indiqué dans le chapitre "Etude quantitative". Les gels contenant les différents phospholipides sont alors grattés et leurs contenus élués dans le FOLCH. Après 24 h d'élution, la radioactivité de chaque tache est testée.

* Résultats *

Tableau 11 - Radioactivité des différentes classes de phospholipides après 48 heures d'incorporation de ^{32}P dans les ovocytes, les coelomocytes et le liquide coelomique de *P. cultrifera* (\emptyset 140 μm). [Résultats exprimés en (Cpm/ γ de protéine) $\times 10^3$].

| Taches | Ovocytes | Coelomocytes | Liquide coelomique |
|--------|----------|--------------|--------------------|
| X | 30 | 182 | 10 |
| LPC | 20 | 130 | 0 |
| PC | 90 | 520 | 40 |
| PS | 20 | 120 | 30 |
| PI | 16 | 60 | 26 |
| PE | 70 | 380 | 24 |
| PG | 30 | 70 | 14 |
| Total | 276 | 1462 | 144 |

Après 48 h d'incorporation du ^{32}P on remarque que c'est au niveau des coelomocytes qu'il y a le plus de marquage. La PC et la PE sont les taches les plus radioactives. Le liquide coelomique est peu marqué. Globalement le ^{32}P s'incorpore selon un rapport assez faible dans les phospholipides. Ceci pourrait résulter d'une compétition s'exerçant entre les diverses voies métaboliques : acides nucléiques, protéines, phospholipides, etc...

b - *In vitro*

L'expérience s'est faite sur *P. cultrifera* de diamètre ovocytaire 130 μm . Pour les références du produit radioactif, voir l'expérience *in vivo*.

* Expérience *

12 animaux sont ponctionnés et leurs contenus coelomiques séparés en ovocytes et coelomocytes. Les cellules isolées sont mises en culture en présence du ^{32}P à raison de 60 $\mu\text{Ci/ml}$ de milieu de culture.

Remarque : Vu que le précurseur est dans une solution acide dilué à pH 2-3, on a dû ajuster le pH de nos milieux de culture jusqu'à pH 7 avec une solution de NaOH N/100.

Nous disposons alors de 3 lots :

- (a) ovocytes seuls,
- (b) coelomocytes seuls,
- (c) coelomocytes + ovocytes.

Après 48 heures d'incorporation, les cellules sont récupérées et séparées de leurs milieux de culture par centrifugation (3000 t/mn pendant 5 mn). Puis, elles sont relavées deux fois par un milieu de culture froid afin d'éliminer le précurseur non incorporé. Les ovocytes et les coelomocytes cultivés ensemble (c), sont séparés sur ficoll. Toutes les cellules sont ensuite broyées dans l'eau distillée. Un dosage de protéine est alors effectué sur les différents homogénats cellulaires, lesquels sont ensuite lyophilisés et traités pour l'extraction et la séparation par CCM des différentes classes de phospholipides. La radioactivité de chaque tache est testée de la même façon que dans l'étude *in vivo*.

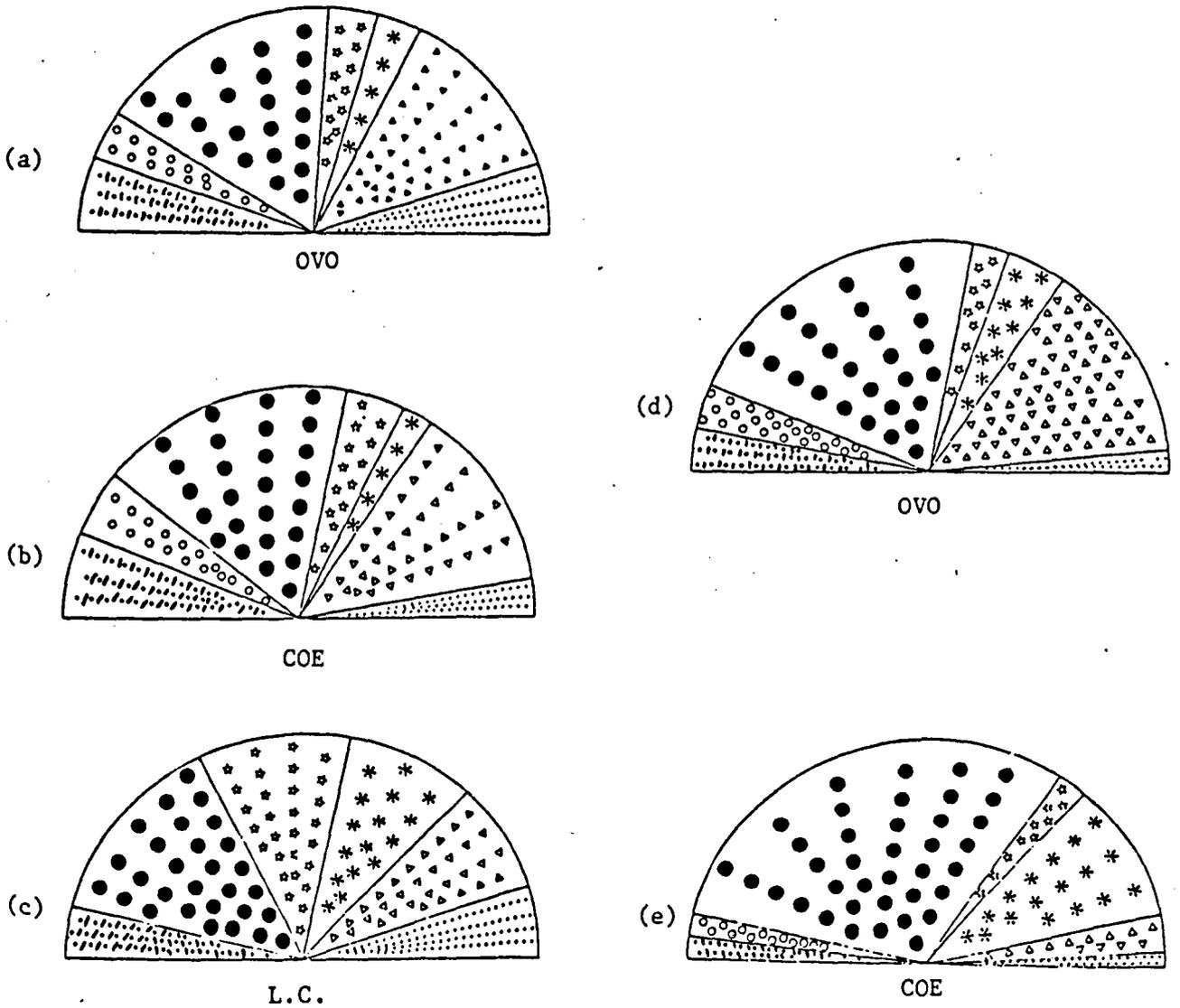
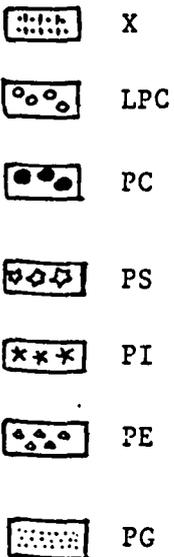


Figure 23 - Répartition de la radioactivité, en pourcentage, dans les différentes classes de phospholipides chez *P. cultrifera* (\varnothing 130-140 μ m) 48 h après incorporation du ^{32}P *in vivo* (a, b, c) et *in vitro* (d, e).



* Résultats *

Tableau 12 - Radioactivité des différentes classes de phospholipides, après 48 h de culture des ovocytes et coelomocytes de *P. cultrifera* (\emptyset 130 μ) en présence de ^{32}P . [Résultats exprimés en (Cpm/ γ de protéine) $\times 10^3$].

| Taches | Ovocytes seuls | Ovocytes cultivés avec les coelomocytes | Coelomocytes seuls | Coelomocytes cultivés avec les ovocytes |
|--------|----------------|---|--------------------|---|
| X | 40 | 40 | 60 | 100 |
| LPC | 40 | 40 | 60 | 30 |
| PC | 280 | 210 | 1280 | 530 |
| PS | 30 | 40 | 80 | 20 |
| PI | 50 | 40 | 20 | 30 |
| PE | 180 | 170 | 470 | 110 |
| PG | 30 | 60 | 90 | 50 |
| Total | 650 | 600 | 2060 | 870 |

Comme dans l'étude *in vivo*, on retrouve un métabolisme plus important dans les coelomocytes que dans les ovocytes. Là aussi, dans ces deux types de cellules, les classes les plus marquées sont la PC et la PE. On note aussi qu'il n'y a pas de différences notables entre les ovocytes isolés et ceux associés avec des coelomocytes.

2 - Choline ^3H a - *In vivo*
.....

La cinétique d'incorporation a été réalisée chez des *N. diversicolor* de diamètre ovocytaire 130 μm .

* Expérience *

Le précurseur radioactif est la choline ^3H (radioactivité spécifique 78 Ci/mM). La quantité injectée est de 20 μCi à 30 μCi /animal selon le poids des animaux. Pour chaque temps d'expérience : 2 j, 4 j et 7 j, un lot de 5 animaux est utilisé.

Après injection du précurseur, les animaux sont placés dans l'eau de mer à 4°C. A chaque temps d'expérience, les lipides sont extraits et la radioactivité des extraits lipidiques totaux est testée sans séparation en CCM, étant donné que la choline constitue un précurseur spécifique des phospholipides dominants : PC et PE.

* Résultats *

Tableau 13 - Evolution de la radioactivité lipidique dans les ovocytes, les coelomocytes et le liquide coelomique, après injection de la choline ^3H chez des *N. diversicolor* de \varnothing 130 μm . [Résultats exprimés en cpm/ γ].

| Echantillons | 2 jours | 4 jours | 7 jours |
|--------------|---------|---------|---------|
| Ovocytes | 6,1 | 11,5 | 27,6 |
| Coelomocytes | 41,3 | 90 | 51,7 |
| L.C. | 7,2 | 14,4 | 16,6 |

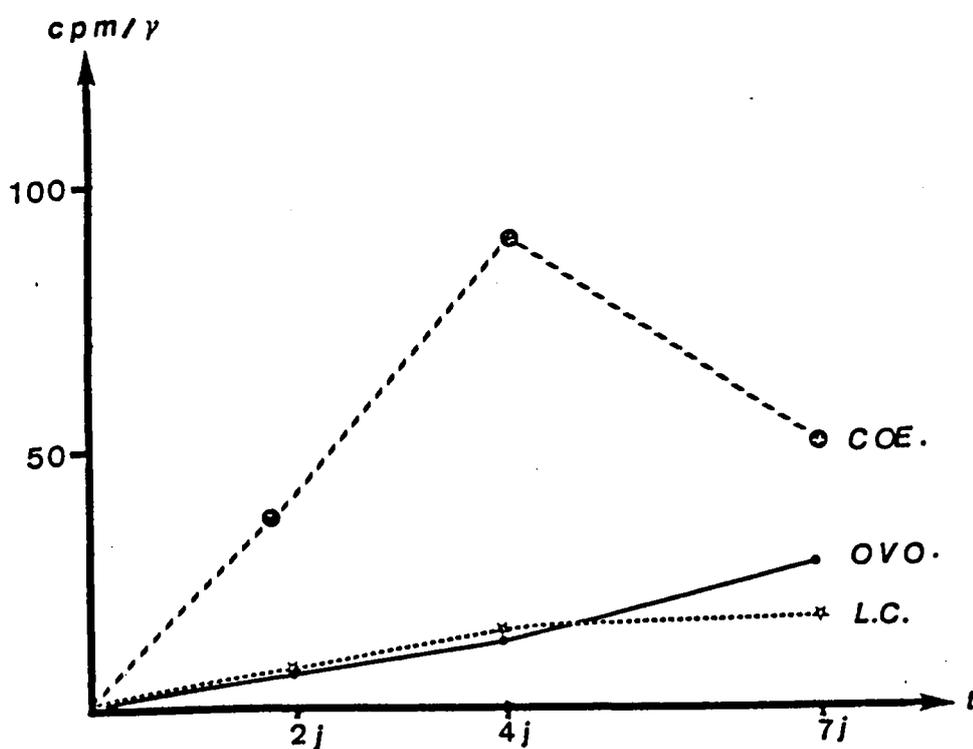


Figure 24 - Evolution de la radioactivité lipidique dans les ovocytes, les coelomocytes et le L.C., après injection de la choline ^3H chez des *N. diversicolor* de \varnothing 130 μm .

Comme dans l'étude avec le ^{32}P , le taux de radioactivité le plus fort se localise toujours au niveau des coelomocytes. Contrairement aux fractions lipidiques des ovocytes et du liquide coelomique, où la choline s'incorpore régulièrement jusqu'à 7 jours d'expérience, dans les coelomocytes on note un accroissement de la radioactivité entre 2 et 4 jours puis une chute à 7 jours. Cette chute pourrait s'expliquer par une possibilité de libération, par les coelomocytes, du matériel synthétisé.

b - *In vitro*
.....

* Expérience *

20 animaux (*N. diversicolor* Ø 130 µm) sont ponctionnés et leurs contenus coelomiques séparés en ovocytes et coelomocytes. Les cellules coelomiques isolées sont ensuite mises en culture en présence de la choline ^3H à raison de 30 µCi/ml de milieu de culture. A t = 24 h, les cellules sont récupérées et séparées de leurs milieux de culture par centrifugation (3000 t/mn pendant 10 mn). Ensuite, elles sont lavées avec du milieu froid. Les ovocytes et les coelomocytes sont alors broyés séparément dans l'eau distillée. La radioactivité et le contenu protéique sont alors analysés comme précédemment. L'extraction des lipides totaux est faite après lyophilisation des différents broyats cellulaires.

* Résultats *

Tableau 14 - Radioactivité lipidique et cellulaire après 24 heures de culture des ovocytes et des coelomocytes de *N. diversicolor* Ø 130 µm en présence de la choline ^3H . [Résultats exprimés en cpm/γ].

| Echantillons | Radioactivité cellulaire | Radioactivité lipidique | $\frac{\text{R}^* \text{ lipidique} \times 100}{\text{R}^* \text{ cellulaire}}$ % |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|---|
| Ovocytes 24 h | 4345 | 374,33 | 8,6 |
| Coelomocytes 24 h | 8419 | 2302,40 | 27,3 |

CHOLINE ^3H
24^h IN VITRO

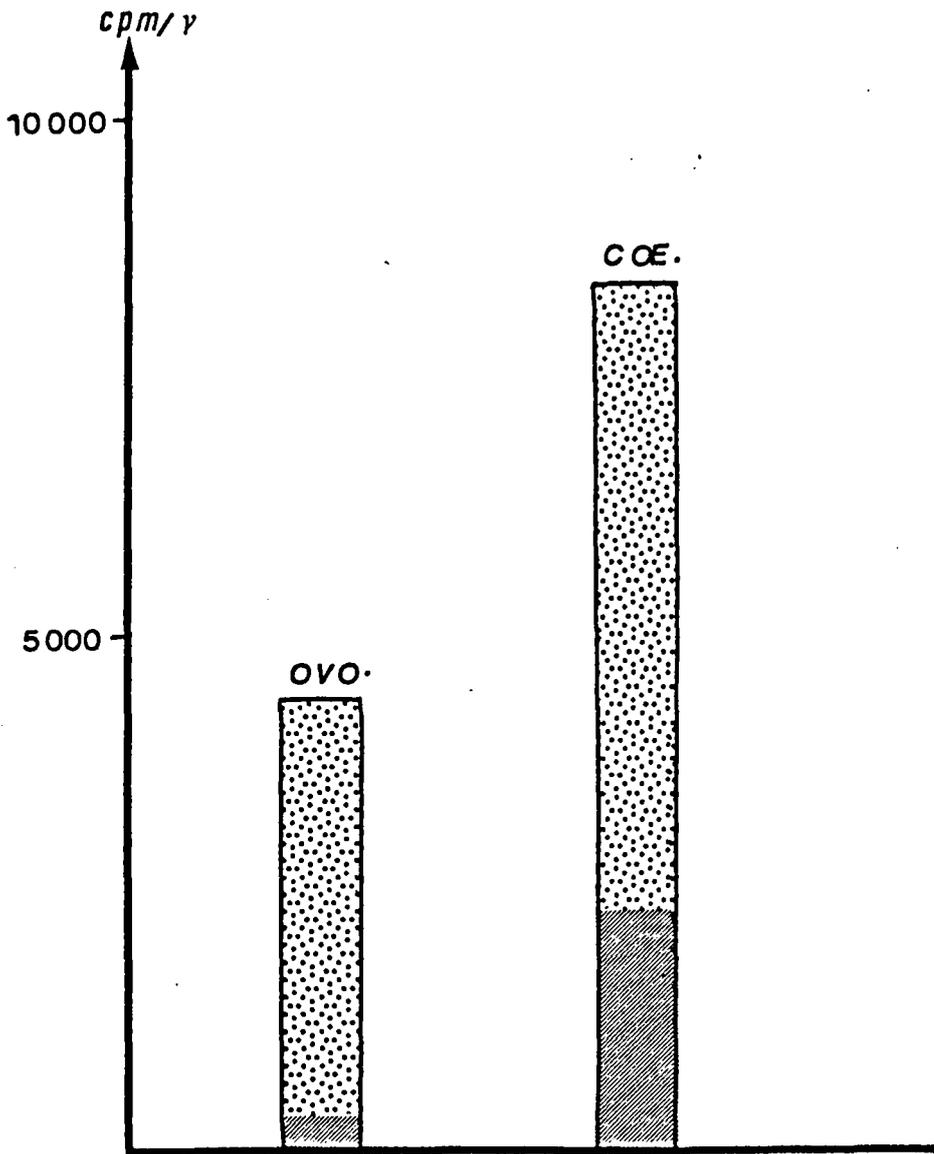


Figure 25 - Radioactivités lipidique et cellulaire après 24 h de culture des deux types de cellules coelomiques isolés, en présence de la choline ^3H .

Des travaux récents ont été effectués par ALONSO *et al.* (1984) sur des ovocytes d'Amphibiens. En cultivant ces ovocytes, en présence du 2-³H glycérol-3 phosphate, ces auteurs ont montré que les ovocytes mûrs incorporent beaucoup moins de radioactivité dans les fractions phospholipidiques que les ovocytes jeunes. Ce résultat est inverse de celui obtenu chez les Néréidiens. En effet chez ces derniers, l'abondance des phospholipides pourrait s'expliquer par la prolifération intense des systèmes membranaires que connaît l'ovocyte à des stades avancés de l'ovogenèse.

En conclusion, on peut dire que chez les Polychètes, les cellules coelomiques isolées sont capables de synthétiser leurs propres phospholipides, comme c'est le cas des lipides neutres. Comme chez plusieurs espèces voisines, plusieurs facteurs pourraient jouer sur ce métabolisme lipidique (température environnante, alimentation, hormone....) mais ce dernier point reste encore à préciser.

c - Etude autoradiographique *in vitro*

.....
L'incorporation a été effectuée *in vitro*, à la fois sur des ovocytes de *P. cultrifera* et de *N. diversicolor*.

o 3 heures d'incorporation

Le marquage est très faible à tous les niveaux de l'ovocyte. Il montre que pour cette durée d'incorporation les synthèses sont encore très limitées.

o 24 heures d'incorporation

Ovocytes : le marquage est localisé essentiellement dans la zone corticale (Pl. I, fig. f), zone particulièrement riche en membranes : réticulum, appareil de Golgi. Quelques grains d'argent sont observés au niveau des lobules lipidiques mais ce marquage est négligeable comparé à celui obtenu par incorporation du glycérol. Les lobules vitellins ne présentent aucun marquage.

Coelomocytes : par rapport aux ovocytes, ils se caractérisent par un marquage intense (Pl. I, fig. e). Ces données confirment les données biochimiques relatives à l'importante activité métabolique de ces cellules.

3 - Discussion

Comme pour les lipides neutres, l'étude métabolique des phospholipides a nécessité l'utilisation de précurseurs radioactifs (^{23}P , choline ^3H).

Pour le ^{32}P , dans les deux expériences (*in vivo* et *in vitro*), le taux le plus fort d'incorporation est situé au niveau des deux classes de phospholipides : PC et PE. Le taux de radioactivité incorporée est assez faible. Ceci pourrait s'expliquer par un phénomène de compétition entre plusieurs voies métaboliques notamment celles des acides nucléiques et des protéines.

Pour la choline ^3H , les résultats biochimiques et autoradiographiques révèlent une activité de synthèse à la fois dans les ovocytes et dans les coelomocytes. Dans les ovocytes, une partie du marquage est observée au niveau des sites de synthèse de membrane tel l'appareil de Golgi, ceci confirme l'interprétation donnée à ce niveau par le marquage du glycérol ^3H .

Les coelomocytes se caractérisent par des synthèses beaucoup plus intenses que celles des ovocytes. Ces données posent le problème de savoir si les phospholipides élaborés sont uniquement engagés dans la voie du renouvellement membranaire ou si d'autres catégories de phospholipides sont également synthétisées. Dans cette optique, on peut envisager que les protéines exportables des coelomocytes (et notamment la vitellogénine) pourraient se trouver ainsi visualisées.

Chez les Invertébrés, les travaux relatifs au métabolisme des phospholipides sont assez rares et surtout inféodés aux Arthropodes. THOMAS (1984) a montré chez *Schistocerca gregaria* une incorporation rapide *in vitro* du glycérol ^{14}C dans la fraction phospholipidique (40 %), le reste dans les lipides neutres. De même DELLA CIOPPA *et al.* (1984 a, b) chez *Leucophaea maderae*, ont montré que la PC représente 58 % du total des lipides phosphorylés de cet Insecte. Ces auteurs ont montré que chez des femelles adultes l'hormone juvénile induit une augmentation rapide de la synthèse des phospholipides, à partir d'une incorporation de choline ^{14}C . Cette synthèse s'accompagne d'une stimulation de la sécrétion de vitellogénine par le corps gras.

Chez le crabe *Carcinus maenas* (CHAPELLE *et al.*, 1982), l'éthanolamine ^3H est incorporée dans deux classes de phospholipides : PC et PE. Ce métabolisme est influencé par la température.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les lipides constituent une classe importante des réserves énergétiques destinées à l'embryon. Au cours de l'ovogenèse, l'ovocyte en accumule une quantité considérable qui finit par représenter 40 % du résidu sec.

Les dosages effectués par FONTAINE (1984 a), ont montré que chez *P. cultrifera*, il existe un balancement entre la teneur en lipides des ovocytes qui s'accroît à l'approche de la maturité sexuelle et celle des coelomocytes. En ce qui concerne les catégories de lipides, les acides gras augmentent considérablement dans les ovocytes contrairement aux glycérides (MG, DG et TG) qui diminuent à partir de 180 μm .

Une étude comparative de l'évolution lipidique au cours de la gamétogenèse chez les Invertébrés est délicate car les travaux sur les lipides sont relativement peu nombreux et surtout beaucoup d'entre eux ont porté sur la composition globale du corps sans distinguer d'une façon plus précise les différents compartiments. Outre les travaux de FONTAINE (1982, 1984 a, b), WILBER et BAYORS (1947) ont trouvé des taux élevés en AG chez plusieurs espèces de Polychètes. McLAUGHLIN (1971), CERBULIS et TAYOR (1969) ont signalé également l'importance des lipides neutres chez les Oligochètes. Enfin chez les Insectes, GILBERT et CHINO (1965) puis GILBERT (1967) ont noté que dans le corps gras, 98 % des lipides neutres sont des TG.

L'étude métabolique que nous avons réalisée sur des animaux à différents stades de l'ovogenèse a montré que les animaux jeunes ont une capacité de synthèse des lipides supérieure à celle des animaux âgés. En effet, chez les premiers ($\emptyset \leq 180 \mu\text{m}$), les synthèses, à partir de précurseurs tels le glycérol et l'acétate, s'orientent vers la forme de TG. Par contre chez les ovocytes âgés, les synthèses sont très faibles et à ces stades avancés de l'ovogenèse ($\emptyset > 200 \mu\text{m}$), les produits synthétisés sont surtout localisés au niveau du liquide coelomique.

La complexité du milieu intérieur et l'interrelation entre les différents compartiments coelomiques ne permettent que faiblement d'analyser la part jouée dans ce métabolisme par chaque type de cellule. Par une étude *in vitro* en présence de différents précurseurs (glycérol ^3H , acide butyrique ^{14}C , acide oléique ^3H), nous avons pu étudier le métabolisme des

ovocytes et des coelomocytes isolés. Chacun de ces deux types cellulaires est capable de réaliser ses propres synthèses de lipides neutres. L'incorporation du glycérol ^3H montre que les synthèses s'effectuent essentiellement sous forme de TG aussi bien dans les ovocytes que dans les coelomocytes. Avec l'acide butyrique ^{14}C , la forme finale de synthèse des lipides neutres (TG) est obtenue plus rapidement chez les coelomocytes. Par contre en partant de l'acide oléique ^3H et pour le même temps d'expérience, c'est au niveau des ovocytes qu'on rencontre le plus de TG marqués.

L'orientation des voies métaboliques vers la forme de TG, déjà signalée chez l'ovocyte en expérimentation *in vivo*, se vérifie donc aussi *in vitro*.

Ces résultats biochimiques ont été confirmés par les expériences autoradiographiques. En effet l'incorporation du glycérol ^3H se traduit par une accumulation de radioactivité au niveau des lobules lipidiques (85 %), par contre les lobules vitellins ne deviennent pas radioactifs.

On sait que chez beaucoup d'espèces animales il existe un transfert de lipides. Ce transfert entre les sites de synthèses et les sites d'utilisation s'effectue en général par l'intermédiaire de macromolécules lipoprotéiques. Nous avons cherché à savoir si un tel système existe chez nos animaux. Deux résultats sont apparemment en contradiction : (a) des ovocytes, placés sur un milieu de coelomocytes, sont capables d'absorber des macromolécules ; (b) le taux de lipoprotéines dans le liquide coelomique est très faible (2 à 3 %). A vrai dire ce dernier point n'est pas significatif, la vitellogénine élaborée par les coelomocytes (BAERT, 1985) est également relâchée à un taux extrêmement bas dans le liquide coelomique. Elle constitue pourtant la voie unique d'approvisionnement hétérosynthétique. Cependant ces deux voies métaboliques (protéines, lipides) sont différentes. En effet, les ovocytes sont capables d'autosynthétiser des lipides alors que la vitellogénine représente la seule source de vitelline. D'autre part, le taux de lipides libres étant élevé dans le liquide coelomique, l'absorption de macromolécules pourrait dans ce cas ne représenter qu'une voie métabolique annexe.

Nous avons abordé, dans la dernière partie de notre travail, l'analyse d'une autre famille de lipides, les phospholipides. Les résultats obtenus par les dosages ont montré que les cellules coelomiques d'animaux âgés sont beaucoup plus riches en phospholipides que celles des animaux jeunes.

Nous avons suivi l'élaboration de ces phospholipides *in vivo* et *in vitro* par l'utilisation de la choline ^3H et du ^{32}P . Les phospholipides synthétisés appartiennent à deux classes prédominantes : phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine. Dans ce cas précis, les coelomocytes incorporent plus de radioactivité que les ovocytes. Ce résultat a été confirmé par autoradiographie. Les phospholipides synthétisés sont liés en partie à des processus de renouvellement membranaire. C'est ainsi que dans les ovocytes l'autoradiographie visualise de la radioactivité au niveau de la zone de prolifération notamment l'appareil de Golgi. Toutefois pour les coelomocytes ce processus, vu son intensité, ne représente vraisemblablement pas l'ensemble des synthèses. Il est plausible que le marquage traduise, au moins en partie, la synthèse de vitellogénine élaborée par cette catégorie cellulaire et dont on sait que la molécule renferme des phospholipides (BAERT, 1985).

En fait, ce travail même s'il contient des points qu'il sera nécessaire d'approfondir, constitue une base pour analyser l'influence de l'hormone cérébrale sur les synthèses lipidiques et préciser son mode d'action au niveau des coelomocytes.

La connaissance du processus de transport des lipides a beaucoup progressé chez les Insectes ces dernières années. Il serait intéressant de poursuivre cette étude afin d'élucider ce problème chez les Annélides. La nature et le rôle des molécules stéroliques constitueraient aussi une voie intéressante de recherche.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ALONSO T.S. et BONINI DE ROMANELLI I.C., 1984 - Lipid biosynthesis in Amphibian oocyte and embryonic cell-free preparations. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79 B, 395-400.
- ARCE V., LINARES A., AGUILERA J.A. et GARCIA-PEREGRIN E., 1984 - The *in vivo* incorporation of acetate into different non-saponifiable lipids by neonatal chick tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 617-620.
- AYANOGLU E., WALKUP R.D., SILA D. et DJERASSI C., 1982 - Phospholipids studies of marine organisms : new phospholipid fatty acids from *Petrosia ficiformis*. *Lipids*, 17, 617-625.
- BAERT J.-L., SAUTIERE P. et PORCHET M., 1984 - Purification and characterization of oocyte vitellin from *P. cultrifera* (Polychaete Annelid). *Eur. J. Biochem.*, 142, 527-532.
- BAERT J.-L., 1985 - Maturation de la vitelline. (sous presse).
- BARAUD J., MAURICE A., NAPIAS C. et VELOURS J., 1973 - Action des carbures cancérigènes sur les lipides des membranes protoplastiques et des mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta*, 296, 481-492.
- BARTH C.A., 1983 - Regulation and interaction of cholesterol, bile salt and lipoprotein synthesis in liver. *Kohn Wochenschr.*, 61, 1163-1170.
- BARTLETT G.R., 1959 - Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 234, 466.
- BARTSCH G.G., 1970 - Glycolipid abnormalities in a myoclonic variant of late infantile amaurotic idiocy. *J. Lip. Res.*, 11, 241-247.
- BERTHILLIER G., LETOUBLON R. et GOT R., 1977 - Biosynthèse du diphosphate mannose dans les microsomes d'hépatocytes de Congre (*Conger vulgaris*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 2B, 201-203.
- BEIJNINK F.B., VAN DER SLUIS I. et VOOGT P.A., 1984 - Turnover rates of fatty acid and amino acid in the coelomic fluid of the sea star *Asterias rubens* : Implications for the route of nutrient translocation during vitellogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 761-767.

- BIBB C. et YOUNG R.W., 1974 - Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments. *J. Cell Biol.*, 61 : 327-343.
- BLANCHIER B., 1981 - Etude des lipides totaux et des stéroïdes dans la glande digestive et la gonade chez la Seiche *Sepia officinalis* L. Thèse de 3ème Cycle, Université de Caen.
- BLIGHT E.G. et DYER W.J., 1959 - A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- BOBBITT J.M., SCHWARTING A.E. et GRITTER R.J., 1972 - Introduction à la chromatographie. Gauthier-Villars Editeur.
- BOLLADE D. et BOUCROT P., 1973 - Incorporation d'acides gras radioactifs alimentaires dans les lipides chez *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.*, 3, 123-137.
- BRADFORD M.M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analt. Biochem.*, 72, 248-254.
- CASTLE D.J., CASTLE A.M., MA A.K. et STUKENBROK H., 1984 - An enhanced incorporation of fatty acid into phosphatidylcholine that parallels histamine discharge in mast cells. *J. Membrane Biol.*, 79, 215-230.
- CERBULIS J. et TAYLOR W.M., 1969 - Neutral lipid and fatty acid composition of earthworms (*Lumbricus terrestris*). *Lipids*, 4, 363-368.
- CHAPELLE S., BRICHON G. et ZWINGELSTEIN G., 1982 - Effect of environmental temperature on the incorporation of ³H Ethanolamine into the phospholipids of the tissues of the crab *Carcinus maenas*. *J. Exptl Zool.*, 224, 289-297.
- CHINO H., MURAKAMI S., et KEIJI H., 1969 - Diglycerides-carrying lipoproteins (DGLP) in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 1-26.
- CLEMENT J., 1980 - Intestinal absorption of triglycerols. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20 (4B), 1285-1307.
- DE JORGE F.B. et PETERSON J.A., 1968 - Sex differences and maturation influence of the chemical composition in *Chaetopterus variopedatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 27, 51-66.
- DELBART C., 1978 - Evolution des glycosphingolipides chez *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible après pollinisation. Thèse Université de Lille I.
- DELLA-CIOPPA G. et ENGELMANN F., 1984 a - Phospholipid synthesis in the fat body endoplasmic reticulum during primary and secondary juvenile hormone stimulation of vitellogenesis in *Leucophaea maderae*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 193, 78-85.

- DELLA-CIOPPA G. et ENGELMANN F., 1984 b - Juvenile hormone regulation of phospholipid synthesis in the endoplasmic reticulum of vitellogenic fat body cells from *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem.*, 14, 27-36.
- DENNING G.M., FIGARD P.H., KADUCE T.L. et SPECTOR A.A., 1983 - Role of triglycerides in endothelial cell arachidonic acid metabolism. *J. Lipid Res.*, 24, 993-1001.
- DE RENOBLES M. et BLOMQUIST G.J., 1984 - Biosynthesis of medium chain fatty acids in *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228, 407-414.
- DE VOOYS C.G.N., 1975 - Glycogen and total lipids in the lugworm (*Arenicola marina*) in relation to reproduction. *Netherl. J. Sea Res.*, 9, 311-319.
- DHAINAUT A., 1967 - Etude de la vitellogénèse chez *N. diversicolor* par autoradiographie à haute résolution. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 265, D, 434-436.
- DHAINAUT A., 1969 - Origine et structure des formations mucopolysaccharidiques de la zone corticale de l'ovocyte de *N. diversicolor*. *J. Microsc.*, 8, 69-86.
- DHAINAUT A., 1970 - Contribution à l'étude de la gamétogenèse des Néréidiens (Annélides Polychètes) dans les conditions naturelles et en absence d'hormone cérébrale. Thèse Doctorat Sci. Nat., Faculté des Sciences de Lille, 217 p.
- DHAINAUT A., 1984 a - Aspects cytophysiologiques des coelomocytes de Néréidiens (Annélides Polychètes). *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 73, 133-150.
- DHAINAUT A., 1984 b - Oogenesis in polychaetes. Ultrastructural differentiation and metabolism of nereid oocytes. *Fortschritte Zool.*, 29, 184-205.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1977a - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* dans les conditions naturelles. II. Etude autoradiographique des ovocytes jeunes. *Biol. Cell*, 28, 233-240.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1977b - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* dans les conditions naturelles. III. Etude autoradiographique des ovocytes submatures. *Biol. Cell.*, 28, 241-250.

- DHAINAUT A., PORCHET M. et FONTAINE F., 1980 - Identité immunologique et métabolique entre le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes de *P. cultrifera* (Annélide Polychète). Int. J. Invert. Reprod., 2, 285-296.
- DURCHON M. et LAFON M., 1951 - Quelques données biochimiques sur les Annélides. Ann. Sc. Nat., Zool., 11^o sér., XIII, 427-452.
- 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. Endoc., 16, 555-565.
- FELLOWS F.L.I. et McLEAN R.M., 1982 - A study of the plasma lipoproteins and the tissue lipids of the migrating lampray, *Mordacia mordax* (Poissons). Lipids, 17, 741-747.
- FISCHER A., 1979 - A vitellin-like antigen in the coelomic fluid of maturing *Nereis virens* females. Naturwiss., 66, 316.
- FISCHER A. et SCHMITZ K., 1981 - Preparation, properties and composition of *Nereis* vitellin, the yolk protein of the Annelid *Nereis virens*. Differ., 19, 103-108.
- FISCHER A. et DHAINAUT A., 1985 - The origin of yolk in the oocytes of *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Cell Tiss. Res., 240, 67-76.
- FISKE C.H. et SUBBAROW Y., 1925 - J. Biol. Chem., 66, 375.
- FLICKINGER R., 1982 - Distribution of phospholipids labeled with ³H-choline and relationship between membranous organelles in amoebae, as studies by electron-microscopic radioautography. Cell Tiss. Res., 222, 523-530.
- FOLCH J., LEES M. et STANLEY G.H.S., 1957 - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- FONTAINE F., 1982 - Les lipides coelomiques chez *P. cultrifera*. Les relations métaboliques entre le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes chez les Annélides Polychètes. Etude comparative avec les autres Invertébrés. Thèse 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- FONTAINE F., GEVAERT M.-H. et PORCHET M., 1984 a - Distribution of Neutral lipids in coelomic constituents during oogenesis of *Perinereis cultrifera* (Annelida, Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., 77A, 45-50.
- FONTAINE F., GEVAERT M.-H. et PORCHET M., 1984 b - Acylglycerol metabolism in the coelomic constituents during vitellogenesis of *Perinereis cultrifera* (Annelida, Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., 78B, 581-584.

- FRIED B. et BRADFORD D., 1984 - Histochemical and thin-layer chromatographic analyses of neutral lipids in various host sites infected with *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78 B, 175-177.
- GILBERT L.I., 1967 - Lipid metabolism and function in insects. *Adv. Insect Physiol.*, 4, 70-208.
- HACK M.H., GUSSAN A.E. et LOWE M.E., 1962 - Comparative lipid biochemistry. I. Phosphatides of invertebrates (Porifera to Chordata). *Comp. Biochem. Physiol.*, 5, 217-221.
- HANAHAN D.J. et WATTS R., 1961 - The isolation of an α -alkoxy- β -acyl- α -glycerophosphorylethanolamine. *J. Biol. Chem.*, 236, 59-60.
- KALLAPUR V.L., RAMAMOHANRAE Y. et NARASUBHAI A.V., 1984 - Triacylglycerol synthesis in the premolt field crab *Parathelphusa hydrodromus* (Milne-Edwards) (Crustacea). *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 92, 119-124.
- KORTE K. et CASEY L., 1982 - Phospholipid and neutral lipid separated by one-dimensional T.L.C. *J. Chromatog.*, 232, 47-53.
- KRAMER J.K.G., FOUCHARD R.C. et FARNWORTH E.R., 1983 - A complete separation of lipids by three-directional T.L.C. *Lipids*, 18, 896-899.
- KREPS E.M., MANUKYAN K.G., SMIRNOV A.A. et CHIRKOVSKAYA E.V., 1963 - A study of the phospholipids of the nervous system in an evolutionary series of animals. *Biokhimiya*, 28, 717-723.
- KREMBEL J., 1966 - Contribution à l'étude des lipides bactériens. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Strasbourg.
- KWITEROVICH P.O. Jr, SLOAN H.O. et FREDRICKSON D.S., 1970 - Glycolipid and other lipid. Constituents of normal human liver. *J. Lip. Res.*, 11, 322-330.
- LANDS W.E.M. et DEAN C.S., 1961 - The ultra-micro determination of lipids. *J. Lipid Res.*, 3, 129-130.
- LARRA F. et DROZ , 1970 - Techniques radioautographiques et leurs applications à l'étude du renouvellement des constituants cellulaires. *J. Microscopie*, 9, 845-880.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MACHEBOEUF M. et DELSAL S., 1943 - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 25, 116.
- MALINS D., 1960 - Fatty acids and glycerol ethers in alkoxy-diglyceride of dogfish liver oil. *Chem. Ind.*, 1359-1360.

- McLAUGHLIN J., 1971 - Biochemical studies on *Eisenia foetida*, the brandling worm. I. Tissue lipids and sterols. *Comp. Biochem. Physiol.*, 38B, 147-163.
- MILLER K.W., SMALL D.M., 1983 - Surface-to-core and interparticle equilibrium distribution of triglycerid-rich lipoprotein lipids. *J. Biol. Chem.*, 258, 13772-13784.
- MUELLER H.W., LOEFFLER E. et SCHMANDT W., 1982 - On the storage, transport, and extraction of serum lipids for the gas chromatographic analysis of the fatty acid fraction. *Clin. Chim. Acta*, 124, 343-349.
- NAITO H.K. et DAVIS J.A., 1984 - Laboratory considerations : Determination of cholesterol, triglycerides, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. *Lipid Res. Methodol.*, 1-76.
- NAYA Y. et KOTAKE M., 1967 - Untersuchung der freien Fettsäuren, der freien Sterine, der Sterinester und der Glyzeride im Regenwurm. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 40, 880-884.
- PELED Y. et TIETZ A., 1973 - FAT transport in the locust, *Locusta migratoria* : The role of protein synthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, 196, 499-509.
- PIRETTI M.V., SERRAZANETTI G.P. et VIVIANI R., 1982 - Investigation of the sterol constituents from the tissues of *Scapharca inaequalvis* (Mollusque) (Bruguiere). *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B, 211-214.
- POCOCK D.M.E., MARSDEN J.R. et HAMILTON J.G., 1969 - The presence of alkenyl et alkyl glycerides and choline and ethanolamine plasmalogens in a marine worm. *Comp. Biochem. Physiol.*, 30, 133-136.
- PORCHET M., 1974 - Activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. Données quantitatives, influence sur la teneur en glucides des ovocytes et du liquide coelomique, mecanisme régulateur de la sécrétion hormonale. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Lille I, 117 p.
- RAPPORT M.M. et ALONZO N.F., 1960 - The structure of plasmalogens. V. Lipids of marine invertebrates. *J. Biol. Chem.*, 235, 1953-1956.
- ROOTS E.I. et JOHNSON P.V., 1966 - Lipids and pigments of chloragosomes of the earthworm *L. terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 17, 283-288.
- SALISBURY L.F. et ANDERSON R.J., 1939 - Concerning the chemical composition of *Cysticercus fasciolaris*. *J. Biol. Chem.*, 129, 505-517.
- SHIMADA K., 1982 - Glycerol accumulation in developmentally arrested pupae of *Papilio machaon* obtained by brain removal. *J. Insect Physiol.*, 28, 975-978.

- SKIPSKI V.P., PETERSON R.F. et BARCLAY M., 1964 - Quantitative analysis of phospholipids by thin layer chromatography. *Biochem. J.*, 90, 374-378.
- SKIPSKI V.P., SMOLOWE F.A. et BARCLAY M., 1967 - Separation of neutral glycosphingo lipids and sulfatids by thin layer chromatography. *J. Lipid Res.*, 8, 295-299.
- SLOMIANNY M.-C., 1984 - Purification, synthèse de la neurohormone de *Nereis diversicolor* (Annélide Polychète). Contribution à l'étude de son action au niveau cellulaire. D.E.A., Université de Lille I.
- STANLEY-SAMNELSON D.W. et PIPA R.L., 1984 - Phospholipid fatty acids from exocrine and reproductive tissues of male american cockroaches, *Periplaneta americana* (L.). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 161-166.
- STEIN O. et STEIN Y., 1967 a - *J. Cell Biol.*, 33, 319.
- STEIN O. et STEIN Y., 1967 b - *J. Cell Biol.*, 34, 251.
- SUBRAHMANYAN D., 1967 - Glycerol ether phospholipid and plasmalogens of filarial parasite *Litosomides carni*. *Can. J. Biochem.*, 45, 1195-1197.
- SUGITA M. et DULANEY J.T., 1974 - Structure and composition of sulfatides isolated from livers of patients with metachromatic leukodystrophy : galactosyl sulfatide and lactosyl sulfatide. *J. Lipid Res.*, 15, 227-233.
- TERNER C., SZABO E.I. et SMITH N.L., 1970 - Separation of gangliosides, corticosteroids and water-soluble non-lipids from lipid extracts by sephadex columns. *J. Chromatogr.*, 47, 15-19.
- THOMAS K.K., 1984 - Studies on the absorption of lipid from the gut of desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A, 707-712.
- THOMSON G.A. et HANAHAN D.J., 1963 - Identification of α -glyceryl ether phospholipids as major lipid constitutions in two species of terrestrial slug. *J. Biol. Chem.*, 238, 2628-2631.
- THOMSON G.A. et LEE P., 1965 - Studies of the α -glyceryl-ethers occurring in molluscan tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 151-159.
- TOCHER D.R. et SARGENT J.R., 1984 - Analyses of lipids and fatty acids in roes of some northwest european marine fish. *Lipids*, 19 : 492-499.
- TRAPPE W., 1940 - *Biochem. Z.*, 305, 150.
- TURNER A.C. et HUTCHISON W.F., 1979 - Lipid synthesis in the adult dog heartworm, *Dirofilaria immitis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 6413, 403-405.

- VANCE D.E., WEINSTEIN D.B. et STEINBERG D., 1984 - Isolation and analysis of lipoproteins secreted by rat liver hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 792, 39-47.
- VOOGT P.A., 1974 - Biosynthesis and composition of sterols in Annelida. I. Investigations on some polychaetes. *Netherl. J. Zool.*, 24, 22-31.
- WALKUP R.D., JAMIESON G.C., RATCLIFF M.R. et DJERASSI C., 1981 - Phospholipids studies of marine organisms : phospholipids, phospholipid-bound fatty acids and free sterols of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas) *forma fulva* (Pallas) (= *Verongia thiona*). Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. *Lipids*, 16, 617-625.
- WEIL J.H., 1971 - *Biochimie générale*. Masson Editeur (3ème édition).
- WHEELER C.H., MUNDY J.E. et GOLDSWORTHY G.J., 1984 - Locust haemolymph lipoproteins visualised in the electron microscope. *J. Comp. Physiol.*, B, 154, 281-286.
- WHEELER C.H., VAN DER HORST D.J. et BEENAKKERS A.M.Th., 1984 - Lipolytic activity in the flight muscles of *Locusta migratoria* measured with haemolymph lipoproteins as substrates. *Insect Biochem.*, 14, 261-266.
- WIEGAND M.D. et IDLER D.R., 1982 - Synthesis of lipids by the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovary *in vitro*. *Can. J. Zool.*, 60, 2683-2693.
- WIEGAND M.D. et IDLER D.R., 1984 - Accumulation of vitellogenin derivative and triglycerides during early ovarian development in land locked Atlantic salmon : Requirement for carbohydrate-rich gonadotropin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 545-548.
- WILBER C.G. et BAYORS W.A., 1947 - A comparative study of the lipids in some marine annelids. *Biol. Bull.*, 93, 99-101.
- WIRTHENSOHN G., SIGRID L. et WALTER G., 1984 a - Phospholipid metabolism in rat kidney cortical tubules. I. Effect of renal substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 795, 392-400.
- WIRTHENSOHN G., SIGRID L. et WALTER G., 1984 b - Phospholipid metabolism in rat kidney cortical tubules. II. Effect of hormones on ³²P incorporation. *Biochim. Biophys. Acta*, 795, 401-410.
- WOOTTON J.M. et WRIGHT L.D., 1962 - Comparative study of sterol biosynthesis in annelids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 5, 253-264.

- WRIGHT R.S., 1971 - A reagent for the non-destructive location of steroids and some other lipophilic materials on silica gel thin-layer chromatograms. J. Chromatogr., 59, 220-221.
- YEE H.Y., YEE T.M.L. et JACKSON B., 1980 - Determination of phosphatidylcholine in amniotic fluid. Microchem. J., 25, 61-71.
- ZILVERSMIT D.B., 1983 - Lipid transfer proteins : overview and applications. Methods Enzymol., 98, 565-573.

