

N° d'ordre : 180

50376
1987
263

50376
1987
263

THÈSE

présentée à

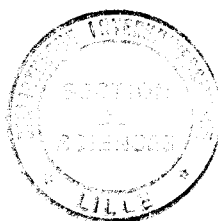
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

par

Hassan TAKI



CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA REGULATION ENDOCRINE DU METABOLISME DES LIPIDES NEUTRES ET DES PHOSPHOLIPIDES CHEZ LES NEREIDIENS (ANNELIDES POLYCHETES)

Soutenue le 27 Novembre 1987 devant la Commission d'Examen

Président
et

Rapporteurs
Examineurs

M. PORCHET

P. LUBET
A. DHAINAUT
J. KREMBEL
J.L. BAERT

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés (CNRS, UA 148) de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur Maurice Porchet. Je tiens à le remercier de m'avoir accepté dans son Laboratoire. Je le remercie vivement de présider mon Jury de Thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur André Dhainaut qui a joué le rôle de "père spirituel" et qui n'a cessé de m'aider par les conseils judicieux qu'il m'a toujours aimablement prodigués.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Luc Baert pour sa collaboration dans la réalisation d'une partie de ce travail. Je lui suis également reconnaissant de sa gentillesse et d'avoir accepté de faire partie de mon Jury de Thèse.

Je tiens également à remercier :

Monsieur le Professeur Lubet de l'Université de Caen,
Monsieur le Professeur Krembel,
d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie aussi :

Madame Françoise Bonet pour la dactylographie de ce mémoire,
Madame Yvette Himpens pour sa gentillesse et ses relations humaines,
Monsieur Lassalle pour la réalisation des graphiques,
Madame Auger pour la préparation des photos,
Ainsi que tous les membres du Laboratoire UA 148 qui ont participé, de près ou de loin, à l'accomplissement de ce travail.

Je ne saurais oublier le soutien matériel et moral que ma famille m'a apporté jusqu'à la fin de ce travail, qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance et de mon amour pour elle.

A la mémoire de mon frère Mohamed et de mon oncle Moulay Omar.

A mes parents,
mes frères et soeurs,
mes beaux-frères,
mes neveux et mes nièces,
mes cousins et cousines
mes amis

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	7
I - Matériel biologique	7
II - Méthodes	7
1 - Séparation des constituants coelomiques	7
2 - Techniques expérimentales	8
2.1. Techniques chirurgicales	8
2.2. Techniques de culture	8
2.3. Techniques biochimiques	10
2.3.1. Dosage des protéines	10
2.3.2. Extraction des lipides totaux	10
2.3.3. Séparation des lipides neutres des phospholipides	11
2.3.4. Séparation des différentes classes de lipides	11
2.3.5. Séparation des acides gras	13
2.3.6. Spectrographie de masse	15
2.3.7. Techniques de radioactivité	16
PREMIERE PARTIE : LIPIDES NEUTRES	18
I ₁ - Cinétique de la synthèse des lipides neutres (ovogenèse naturelle) chez <u>N. diversicolor</u>	19
I _{1.1.} <u>In vivo</u>	19
a - Coelomocytes	19
b - Ovocytes	21
c - Liquide coelomique	21
d - Discussion	23
I _{1.2.} <u>In vitro</u> (culture des ovocytes)	24

I ₂ - Comparaison du métabolisme des lipides neutres en présence et en absence de l'hormone cérébrale	26
a - Coelomocytes	26
a ₁ . Chez <u>N. diversicolor</u>	26
a ₂ . Chez <u>P. cultrifera</u>	32
b - Ovocytes	34
b ₁ . Chez <u>N. diversicolor</u>	34
b ₂ . Chez <u>P. cultrifera</u>	38
I ₃ - Action stimulatrice de l'hormone cérébrale sur le métabolisme des lipides neutres des coelomocytes et des ovocytes de <u>N. diversicolor</u>	40
a - Coelomocytes en culture	41
a ₁ . Influence de la présence de prostomiums entiers sur les synthèses de lipides neutres	41
a ₂ . Influence des sécrétions cérébrales sur la libération des lipides neutres par les coelomocytes	41
b - Ovocytes en culture	45
b ₁ . Influence de l'addition de prostomiums sur les synthèses de lipides neutres	45
b ₂ . Influence des sécrétions cérébrales sur les synthèses de lipides neutres	45
I ₄ - Discussion	47
DEUXIEME PARTIE - METABOLISME DES PHOSPHOLIPIDES	51
II-A. Ovogenèse naturelle	51
II-A ₁ Coelomocytes	51
a - Incorporation de la choline ³ H <u>in vivo</u>	51
b - Incorporation <u>in vitro</u>	53
b ₁ . Synthèse des PL par les coelomocytes en culture	54

b ₂ . Association coelomocytes et ovocytes en culture	54
b ₃ . Libération des PL par les coelomocytes	55
b _{3.1} . Choline- ³ H	55
b _{3.2} . ³² Phosphore	56
b ₄ . Association des PL libérés à des protéines	57
b ₅ . Identification des protéines associées aux PL	58
b _{5.1} . Incorporation de ³ H-choline	58
b _{5.2} . ³² Phosphore	58
 II-A ₂ Ovocytes	59
a - ³² Phosphore	59
b - ³ H-choline	59
b ₁ . <u>In vivo</u> (ovocytes isolés après incubation)	60
b ₂ . <u>In vitro</u>	60
b _{2.1} . Ovocytes isolés en culture	60
b _{2.2} . Absorption des lipides du milieu de culture (des coelomocytes) par les ovocytes	62
b _{2.2.a} . Variation du milieu de culture en présence d'ovocytes	62
b _{2.2.b} . Analyse biochimique des PL incorporés par les ovocytes	63
b _{2.2.c} . Analyse fluorographique	65
c - Incorporation de ³ H-glycérol	66
 II-A ₃ Etude autoradiographique	66
a - Etude <u>in vivo</u>	67
b - Etude <u>in vitro</u>	67
b ₁ . Coelomocytes isolés	67
b ₂ . Ovocytes placés dans un milieu de culture enrichi par les sécrétions des coelomocytes	67
b ₃ . Ovocytes isolés ayant incorporé de la choline- ³ H	67

II-B. Recherche d'un contrôle endocrine du métabolisme des PL	68
1. Action stimulatrice de l'hormone cérébrale sur la libération des phospholipides par les coelomocytes	68
2. Influence cérébrale sur les ovocytes	69
2.1. Effet de la décérébration sur les synthèses de PL des ovocytes de <u>N. diversicolor</u>	69
2.2. Action stimulatrice de l'hormone cérébrale sur la synthèse des PL des ovocytes de <u>P. cultrifera</u>	71
DISCUSSION	73
A - Voie métabolique des précurseurs utilisés	73
B - Signification physiologique	75
TROISIEME PARTIE - ACIDES GRAS	78
A - Etude qualitative	78
B - Etude quantitative	80
B ₁ . Conditions naturelles	80
a - Coelomocytes	80
a ₁ . <u>N. diversicolor</u>	80
a ₂ . <u>P. cultrifera</u>	80
b - Ovocytes	82
b ₁ . <u>N. diversicolor</u>	82
b ₂ . <u>P. cultrifera</u>	82
B ₂ . Recherche d'un contrôle endocrine sur la composition en acides gras dans les ovocytes et les coelomocytes	85
a - Coelomocytes	85
a ₁ . Chez <u>N. diversicolor</u>	85
a ₂ . Chez <u>P. cultrifera</u>	85
b - Ovocytes	88
b ₁ . Chez <u>N. diversicolor</u>	88
b ₂ . Chez <u>P. cultrifera</u>	88
c - Discussion	91

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

95

BIBLIOGRAPHIE

101

INTRODUCTION

Depuis les travaux de Durchon (1948) il est connu qu'il existe une régulation endocrine des processus de gamétogenèse. Cette activité endocrine du cerveau est importante pendant la phase juvénile puis décroît progressivement jusqu'à s'annuler à l'approche de la reproduction des animaux (Hauenschild, 1955 ; Durchon, 1978). Les cellules neurosécrétrices du cerveau élaborent une hormone inhibitrice qui agit à la fois sur le germe et sur le soma. D'après les travaux d'Hauenschild (1956) et Boilly-Marer (1962), cette hormone n'est pas spécifique de l'espèce.

Durant les dernières années, un certain nombre de données relatives au conditionnement hormonal ont été acquises dans divers domaines des régulations métaboliques.

Pour ne prendre que quelques exemples, la corticogénèse apparaît clairement inhibée par une activité cérébrale importante : l'ablation du cerveau (Dhainaut, 1984b) ou la réduction de son activité à l'approche de la maturité sexuelle (Dhainaut et Porchet, 1977b) se traduisent par une abondante prolifération d'alvéoles corticales. Dans le domaine des synthèses nucléaires, l'absence d'hormone entraîne une modification nucléolaire (Bertout 1973) et engendre une chute des synthèses de RNA (Caner, 1981). Dans le domaine de la vitellogénèse, les études autoradiographiques après incorporation de leucine tritiée ont montré une chute de la radioactivité dans les lobules vitellins (Dhainaut et Porchet, 1977b). Toutefois, dans le cas des processus de vitellogénèse hétérosynthétique (Baert, 1986), les relations apparaissent moins directes et des recherches sont effectuées actuellement pour élucider les mécanismes contrôlant les synthèses de vitellogénine au niveau des coelomocytes.

Dans ce travail nous nous sommes plus particulièrement intéressé au processus de régulation des synthèses lipidiques survenant au cours de l'ovogénèse. A la suite des travaux de Caner (1981), de Fontaine (1982) et de Belhamra (1985), un certain nombre de données (voir paragraphe suivant) concernant le métabolisme des lipides ont été acquises à la fois au niveau des ovocytes, des coelomocytes et du liquide coelomique. Toutefois, ces analyses ont été effectuées uniquement au cours de l'ovogénèse naturelle. Le travail qui nous a été confié a consisté à aborder ce problème sous l'angle expérimental, que ce soit par ablation de cerveau ou addition de sécrétions cérébrales au milieu de culture. Dans le cadre de ce travail, un chapitre préliminaire fera tout d'abord une mise au point sur nos connaissances

La première partie du travail expérimental a été consacrée à l'étude du métabolisme des lipides neutres, celui-ci étant étudié par incorporation de glycérol tritié. Cette étude a été effectuée à la fois in vivo et in vitro chez N. diversicolor et P. cultrifera.

La seconde partie a été consacrée aux phospholipides. Leur métabolisme élevé avait intrigué au cours de travaux antérieurs (Belhamra, 1985). Par incorporation de ^{32}P -phosphate et de ^3H -choline, nous avons pu préciser la signification physiologique de ces synthèses et nous avons recherché si ce métabolisme était régulé par l'hormone cérébrale.

Enfin, la troisième partie a été consacrée à l'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse. Nous avons recherché si des différences significatives dans la teneur en acides gras se manifestaient entre les cellules témoins de l'ovogenèse naturelle et des gamètes ayant évolué en absence d'hormone cérébrale.

Données sur les connaissances actuelles relatives aux lipides des Néréidiens

Par opposition à d'autres Invertébrés et plus particulièrement aux Insectes (Thomas et al., 1966 ; Mayer et Candy, 1967 ; Wlodawer et Lagwinska, 1967 ; Thomas et Gilbert, 1968, 1969 ; Chino et al., 1969 ; Imboden et al., 1987...) et aux Crustacés (Shiek, 1969 ; Farkas, 1973 ; Tret'yak et Limarenk, 1977 ; Chapelle et al., 1975, 1976, 1977, 1979 ; Brichon et al., 1980), assez peu d'études ont été faites sur les lipides des Néréidiens. Les investigations réalisées ont été effectuées au cours de l'ovogenèse naturelle. Les analyses ont porté sur chacun des compartiments du milieu coelomique : coelomocytes, ovocytes et liquide coelomique.

Les coelomocytes

Le premier, Fontaine (1982) s'intéresse aux lipides neutres et aux acides gras des coelomocytes de P. cultrifera au cours de l'ovogenèse. Dans ces cellules, le taux des stérols et des triglycérides augmente quand s'effectue la maturation des gamètes. Au contraire à ce moment les stérols estérifiés diminuent. La teneur en acides gras libres, importante en début de l'ovogenèse, diminue à l'approche de la maturité génitale. Monoglycérides et diglycérides ne présentent que peu de variations.

Dans les stérols estérifiés des coelomocytes, le taux d'acides gras saturés s'accroît au cours de l'évolution génitale. La longueur des chaînes carbonées d'acides gras augmente également dans les triglycérides des coelomocytes.

Toujours chez P. cultrifera, Belhamra (1985) s'est intéressé au métabolisme des lipides neutres et phospholipides. En utilisant différents précurseurs (glycérol ^3H , acide butyrique ^{14}C , acide oléique ^3H), il a montré qu'en culture, les coelomocytes isolés sont capables de réaliser leur synthèse de lipides neutres, représentée essentiellement par des TG.

Dans les coelomocytes, sept classes de phospholipides ont été trouvées à différents stades de l'ovogenèse (Belhamra, 1985). Ces phospholipides sont les suivants : lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylglycérol et un élément "X" inconnu. L'étude métabolique des phospholipides a

été effectuée en utilisant comme précurseurs du phosphate et de la choline marqués (Belhamra, 1985). Après incorporation de phosphate, l'essentiel de la radioactivité est retrouvé au niveau des PC, PE et PI. Chez N. diversicolor une intense incorporation de choline ^3H est observée au niveau des coelomocytes. La baisse progressive de radioactivité observée à partir du 4ème jour après l'injection peut laisser envisager la possibilité d'une libération de phospholipides dans le milieu intérieur.

Le liquide coelomique

Au cours de la maturation chez les femelles de P. cultrifera, le liquide coelomique est caractérisé par une diminution des mono et diglycérides, ainsi que les acides gras libres. Il s'enrichit par contre en sérols et en TG. Les stérols estérifiés constituent rapidement une fraction constante et importante (30 % des lipides neutres) du liquide coelomique (Fontaine, 1982).

Quatre acides gras sont particulièrement importants quel que soit le lipide neutre étudié : l'acide palmitique (16:0), l'acide stéarique (18:0), l'acide oléique (18:1), l'acide vaccénique (18:1 vacc). En fonction de l'état génital, les acides gras libres insaturés augmentent de pourcentage. Dans le domaine métabolique, l'étude cinétique réalisée par Belhamra (1985) montre l'existence d'un pic de triglycérides radioactifs 24 heures après l'injection de glycérol ^3H ; ce pic pourrait résulter d'une libération d'éléments synthétisés par les coelomocytes.

Les ovocytes

Chez P. cultrifera, le dosage global des lipides ovocytaires (Caner, 1981) montre que par rapport au taux de protéines, le stockage des lipides se ralentit à l'approche de la maturité sexuelle (Fig. 1). Fontaine (1982) a ensuite entrepris une analyse spécifique de ces lipides. Il a montré qu'au cours de l'ovogenèse il n'y a pas de changement qualitatif dans la composition lipidique des ovocytes. Sept classes de lipides neutres sont toujours rencontrées : monoglycérides, diglycérides, triglycérides, acides gras libres, acides gras estérifiés, stérol libres et stérols estérifiés.

En fin de stade 1 (vitellogenèse), les triglycérides représentent l'élément majeur de lipides neutres (77 % en poids). Pendant la phase de croissance rapide et à la maturité ovocytaire (stades 2 et 3), le taux des différentes classes lipidiques varie sensiblement (Fontaine et al., 1984a). En résumé, il constate :

- une augmentation constante du taux des acides gras,
- une augmentation au stade 2, du rapport des stérols libres et des mono et diglycérides suivie d'une diminution de ce rapport au moment de la maturité ovocytaire,
- une diminution constante du taux des triglycérides et des stérols estérifiés.

A noter que les résultats de cet auteur sont exprimés en pourcentage de la fraction lipidique neutre, ce qui ne prend pas en compte l'évolution des autres constituants cellulaires (protéines, glucides, acides nucléiques). Or, la proportion de ces derniers varie au cours de l'ovogenèse (Caner, 1981) ; il est donc difficile d'évaluer dans ces conditions la croissance effective des différentes classes de lipides.

Le métabolisme de l'acylglycérol dans les ovocytes a été suivi (Fontaine, 1982) en étudiant in vivo l'incorporation de deux précurseurs : glycérol ^{14}C et acétate ^{14}C . Dans les deux cas, Fontaine observe une synthèse importante des TG dans les ovocytes. Cette accumulation des TG pourrait résulter de deux processus :

- 1 - Synthèse directe à partir des éléments du liquide coelomique,
- 2 - Capture des triglycérides synthétisés par les coelomocytes et relâchés ensuite dans le milieu coelomique.

Récemment, la mise en évidence d'une autosynthèse des lipides neutres par les ovocytes de P. cultrifera a été démontrée par Dhainaut et Belhamra (1986). Dans cette étude biochimique et autoradiographique, des ovocytes isolés sont incubés dans un milieu de culture contenant selon les cas du glycérol ^3H , de l'acide butyrique ^3H ou de l'acide oléique ^{14}C . Les TG représentent la principale classe de lipides synthétisés ; les autres classes (stérols, acides gras, wax esters) deviennent aussi radioactives à un moindre degré. Le marquage des TG est beaucoup plus important avec le glycérol et l'acide oléique qu'avec l'acide butyrique. Enfin, par autoradiographie, il a été démontré que les TG synthétisés sont localisés au niveau des gouttelettes de lipides du cytoplasme, les lobules vitellins n'apparaissent pas marqués.

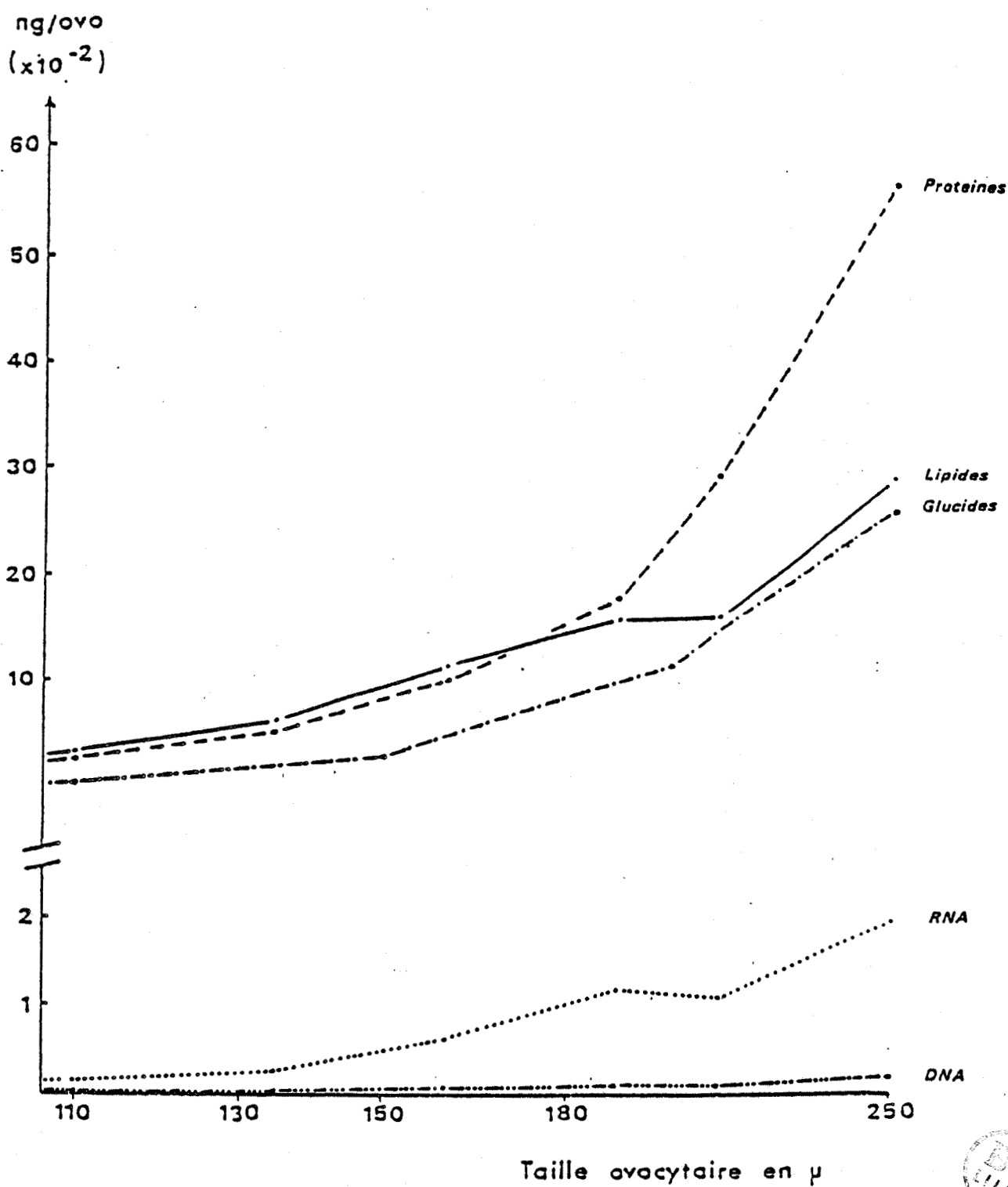


Figure 1 - Résultats de dosages effectués sur les ovocytes de *P. cultrifera*, exprimés en nanogrammes par ovocyte. (d'après Caner, 1981).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Deux espèces de *Nereis* ont été utilisées pour cette étude : *Nereis diversicolor* et *Perinereis cultrifera*. La première espèce est récoltée aussi bien à Petit-Fort-Philippe (Nord) qu'à Luc-sur-Mer (Calvados), la deuxième uniquement à Luc-sur-Mer. Au laboratoire les *N. diversicolor* sont placées dans la chambre froide à 4°C dans l'eau de mer. Les *P. cultrifera* sont conservées à l'aquarium à une température variant entre 12°C et 15°C.

II - MÉTHODES

1 - Séparation des constituants coelomiques

A l'aide d'une pipette Pasteur effilée, le contenu coelomique des animaux est prélevé par ponction intracoelomique. Le contenu coelomique est ainsi récupéré puis mis dans un tube à hémolyse et placé au froid dans la glace. Une centrifugation à 5 000 g pendant 5 minutes permet d'obtenir un surnageant : le liquide coelomique et un culot constitué de coelomocytes et d'ovocytes. A l'aide d'une seringue, on prélève le liquide coelomique.

Pour la séparation des ovocytes des coelomocytes, trois méthodes sont utilisées.

a - Technique de Porchet (1974) : le culot coelomique est mis en suspension dans de l'eau de mer. Après centrifugation, le surnageant est recueilli. Cette opération est répétée trois ou quatre fois. Les surnageants issus des centrifugations successives contiennent les coelomocytes. Le culot recueilli à la fin de la dernière centrifugation est constitué d'ovocytes. Les différentes centrifugations se font à 4°C.

b - Le culot coelomique est mis en suspension dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 et du NaCl à 33 ‰. Une filtration de l'ensemble à travers une toile de nylon dont le diamètre des pores est de 30 à 40 µm permet de séparer les ovocytes des coelomocytes. Ces derniers, ne dépassant pas un diamètre de 30 µm passent seuls à travers les pores du tamis.

c - Du ficoll à 5 % mélangé à la solution tampon phosphate précitée est mis dans un tube conique placé sur de la glace. Les cellules coelomiques mises en suspension dans la solution tampon sont déposées soigneusement sur la surface de la solution de ficoll. Les ovocytes sédimentent les premiers au fond du tube.

2 - Techniques expérimentales

2.1. Techniques chirurgicales

2.1.1. Anesthésie

Réalisée par immersion de l'animal dans une solution à 0,5 ‰ de Ms222 dans l'eau de mer.

2.1.2. Décérébration

Les décérébrations ont été pratiquées selon la méthode mise au point par DURCHON (1952). Après anesthésie, le prostomium est réséqué.

2.1.3. Transection

Les animaux sont sectionnés transversalement dans la région médiane du corps. Chacun des deux fragments est isolé dans un récipient d'élevage. Les ovocytes et coelomocytes de la région postérieure ne sont plus soumis à l'action de l'hormone cérébrale tandis que la région antérieure continue à subir l'influence endocrine du cerveau et sert de témoin.

2.2. Techniques de culture

2.2.1. Milieu de culture

Il s'agit du milieu TC 199 commercial (Eurobio) modifié. Pour préparer approximativement 100 ml de milieu on a :

TC 199 (pH 7,4)	10 ml
Solution saline	90 ml
Ovalbumine	2 ml
Penicilline	2 ml
Eau glucosée	2 ml

Préparation de la solution saline : pour un litre de solution :

NaCl : 18,33 g ; KCl : 0,35 g ; CaCl₂ 2H₂O : 1,34 g ; MgCl₂ 6H₂O : 11,84 g ; Na₂SO₄ : 4,42 g ; NaHCO₃ : 0,22 g ; glucose : 11,11 g

Solution glucosée : 1 g de glucose pour 1000 ml d'eau de mer stérile.

2.2.2. Méthode de mise en culture des coelomocytes et ovocytes

Avant la mise en culture cellulaire, les animaux sont isolés au minimum 4 jours dans de l'eau de mer stérile en présence d'antibiotiques (en solution mère par addition de 5 ml d'eau de mer stérile par flacon)

Pour 100 ml d'eau de mer : 0,5 ml de Pénicilline B (500 000 UI)

0,3 ml de Polymyxine

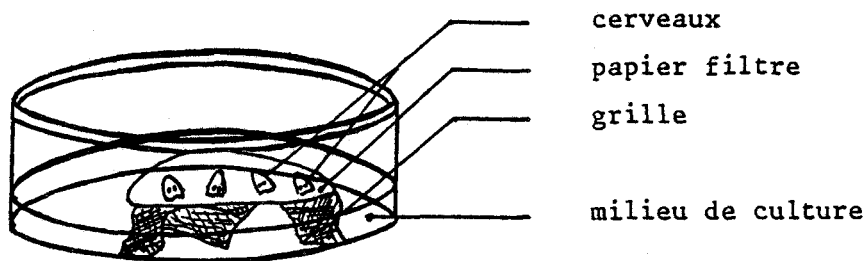
1 goutte de Streptomycine (500 000 UI)

Les incubations cellulaires (ovocytes + coelomocytes) sont généralement effectuées dans 5 ml de milieu en boîtes de Pétri à 15°C.

2.2.3. Méthode de mise en culture des cerveaux et prélèvement des sécrétions hormonales

Le milieu de culture est le même que celui utilisé pour les ovocytes et coelomocytes.

Après décérébration des vers, les cerveaux sont mis sur un papier filtre posé sur une grille et placés dans une boîte de culture contenant du milieu TC 199 (Eurobio) modifié. Le temps de mise en culture des cerveaux est de 3 ou 4 jours.



Après l'incubation, le milieu de culture récupéré est testé sur des cultures de spermatocytes pour tester l'activité de ses sécrétions cérébrales.

Le milieu est ensuite stocké à -70°C jusqu'à son utilisation pour éviter sa dégradation.

2.3. Techniques biochimiques

2.3.1. Dosage des protéines

La technique utilisée est celle de BRADFORD (1976). La quantité de protéines est déterminée par le réactif Biorad. Le S.A.B. (serum albumin bovin) sert de gamme étalon.

2.3.2. Extraction des lipides totaux

■ Systèmes solvants

De nombreux systèmes solvants polaires-non polaires (isopropanol-chloroforme, éthanol-éther, méthanol-hexane, méthanol-benzène, éthanol-toluène) ont été proposés dans la littérature. Les modèles les plus usuels pour l'extraction des lipides tissulaires ont été mis au point par FOLCH *et al.* (1957) et BLIGH et DYER (1959). Les deux méthodes sont semblables sauf que la dernière prend en compte la teneur en eau de l'échantillon.

La méthode de FOLCH *et al.* (1957) utilise le solvant chloroforme-méthanol 2:1 (v/v) avec 20 ml de solvant par gramme de tissu sec.

La méthode de BLIGH et DYER (1959) utilise un solvant CHCl_3 -MeOH- H_2O (2:2:1) avec 25 à 50 ml de ce solvant/g de poids. Habituellement à un rapport 50 ml:1g, l'étape de réextraction n'est pas nécessaire.

A noter qu'il est difficile d'obtenir une extraction complète des lipides des tissus déjà lyophilisés.

Les étapes de purification varient selon les méthodes utilisées. L'eau ou les solutions salines (CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl, KCl ...) sont utilisées comme systèmes de lavage. La quantité additionnée au milieu d'extraction est importante. Les solutions aqueuses de lavage entraînent la majorité des contaminants non lipidiques. Cependant, elles peuvent extraire certains lipides, gongliosides et ceramides, certains phospholipides comme l'acide phosphatidique, PS, PI et PE et il faudra tenir compte de ce paramètre pour l'analyse des phospholipides.

■ Stockage des échantillons après purification

Il est souvent nécessaire de stocker les échantillons jusqu'au moment de leurs analyses. Des précautions doivent être observées pour éviter la détérioration et l'oxydation si les échantillons sont stockés.

1- L'extrait lipidique doit être stocké dans un solvant ou le système solvant.

La conservation sous forme de résidu sec n'est pas recommandable.

- 2- lorsque l'auto-oxydation constitue un problème majeur, par exemple pour l'analyse des acides gras (où les doubles liaisons sont sensibles à l'oxydation), un préservateur tel que 2,6 ditert-butyl-p-crésol (0,005 %) doit être additionné au solvant.
- 3- Les échantillons doivent être stockés à l'obscurité et à basse température.
- 4- Enfin, pour diminuer l'oxydation, l'échantillon sera conservé sous azote.

■ Protocole expérimental

Les cellules sont broyées au Dounce. Pour l'extraction des lipides totaux, nous avons choisi une modification de la technique de FOLCH, LEE et SLOANE-STANLEY (1957). L'homogénat cellulaire est mélangé dans 12 volumes de chloroforme-méthanol (2:1). Au bout de 30 minutes, la suspension est centrifugée et le liquide surnageant est séparé. Le solvant est agité pendant 3 minutes avec une solution aqueuse à 9‰ de chlorure de sodium (0,2 V/1 V). Cette opération est nécessaire pour éliminer les sels minéraux et autres impuretés entraînées par le solvant polaire. L'émulsion est alors centrifugée ; la phase aqueuse supérieure qui renferme les impuretés non lipidiques est éliminée tandis que la phase chloroformique inférieure renfermant les lipides est évaporée à sec sous azote.

2.3.3. Séparation des lipides neutres des phospholipides

Après séchage des lipides totaux sous azote, le résidu sec est solubilisé dans 1 ml de liquide de Folch. A cette solution sont ajoutés 8 ml d'acétone, une centrifugation de l'ensemble (4 000 t/mn) pendant 10 mn donne un culot formé par les phospholipides insolubles dans l'acétone. Les lipides neutres sont solubilisés dans le surnageant. Afin d'éliminer toute trace de lipides neutres pouvant contaminer le culot phospholipidique, deux lavages successifs à l'acétone suivis chacun d'une centrifugation sont réalisés. Lipides neutres et phospholipides sont séchés à sec sous azote puis repris par une petite quantité de solvant "Folch". Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à leur analyse.

2.3.4. Séparation des différentes classes de lipides

Différentes méthodes ont été proposées pour séparer les lipides par chromatographie sur couche mince (CCM) : RANDERATH (1984) a utilisé des plaques de gel de silice. Ces plaques sont lavées avec du méthanol-acide chlorhydrique concentré (9:1) avant leur utilisation. Pour isoler les triglycérides, il avait utilisé le système solvant hexane-diéthyléther-acide acétique (90:10:1). La fraction partielle (MG-DG-AGL et stérols) est séparée des phospholipides en plaçant la même plaque dans le diéthyléther.

BISERTE (1930) a employé le solvant de migration éther de pétrole-éther éthylique-acide acétique (90:10:1). On observe alors une excellente séparation des lipides neutres, alors que les phospholipides demeurent au point de départ.

FREEMAN et WEST (1966) ont utilisé deux systèmes solvants utilisés successivement pour la séparation des lipides neutres.
 1er système : Diéthyléther-benzène-éthanol-acide acétique (40:50:2:0,2 V/V/V/V)
 2ème système : Diéthyléther-hexane (6:94 V/V)

a) Séparation des différentes classes de lipides neutres

Lors de notre étude, nous avons préféré utiliser comme système solvant : Ether de pétrole-diéthyléther-acide acétique (80:20:1 V/V). Des plaques chromatographiques de gel de silice G (Kieselgel 60, Art 11 845, Merck) sont utilisées comme support de séparation des classes de lipides.

Après saturation de la cuve chromatographique par le solvant, on y place la plaque et on laisse le solvant migrer pendant une nuit afin d'éliminer tout contaminant.

Le dépôt de l'échantillon sur la plaque est situé à 2 cm de sa base. A l'aide d'une micropipette 100 à 200 µl de solvant sont déposés soigneusement sur la ligne de départ du gel de séparation.

Identification des taches

Grâce à des lipides témoins, nous avons pu identifier les différentes taches séparées après migration du solvant. Ces témoins sont :

- . α-Monopalmitin, Sigma
- . Diplamitin (mixture of 1-2 and 1-3 isomers), Sigma
- . 11-eicosenoic acid 99%, Sigma
- . Arachidonic acid (5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid), Serva
- . Nonadecanoic acid methyl ester, Sigma
- . Linoleic acid (Cis 9 - Cis 12 - octadécadienoic acid), Sigma
- . Cholesteryl arachidonate, Sigma
- . Triacylglycerols (Tristearin 25 %, Triolein 25 %, Trilinolein 25 %; Trilinolenin 25 %), Sigma

Révélation des taches

Dans notre travail, nous avons utilisé deux méthodes de révélation :

- 1- Saturation en vapeur d'iode. L'iode se fixe sur les doubles liaisons et les lipides prennent une teinte brune.
- 2- Pulvérisation des plaques à la rhodamine (1 V de rhodamine 6G à 50 mg/litre additionné d'1 V d'une solution de NaOH 4N). L'examen des plaques se fait sous lumière UV (365 nm). Cette deuxième technique présente l'avantage de ne pas être destructive des lipides révélés.

b) Séparation des différentes classes de phospholipides

Les techniques sont les mêmes que celles concernant les lipides neutres. Le seul changement porte sur le système solvant constitué comme suit : chloroforme-éthanol-eau-triéthylamine (30:34:8:35 V/V/V/V). Ce système solvant a été utilisé par KORTE et CASEY (1982).

Identification des taches de phospholipides

Les témoins commerciaux utilisés sont :

- . L- α -phosphatidylinositol, Sigma
- . L- α -lysophosphatidylcholine, Sigma
- . L- α -phosphatidyl-L-serine, Sigma
- . L- α -phosphatidyl-DL-glycerol, Sigma
- . L- α -phosphatidylcholine/sphingomyeline, Sigma

2.3.5. Séparation des acides gras

a) Préparation des méthyl esters d'acides gras

Lorsque les lipides totaux ont été extraits (voir chapitre : Extraction des lipides totaux), le résidu sec de ces lipides est traité de façon à ce que les acides gras soient transformés en leur méthyl esters prêts à être injectés en chromatographie en phase gazeuse (GLC).

a) Saponification

La préparation des acides méthyl estérifiés est faite directement à partir du résidu sec de l'extrait lipidique. 5 ml d'une solution KOH/CH₃OH 2N sont ajoutés à ce résidu sec. L'ensemble est porté à une température de 80°C pendant 3 heures.

Dans ces conditions nous obtenons des acides gras sous forme de savons solubles dans l'eau et du glycérol à l'état libre. Pour séparer les acides gras de l'insaponifiable, nous procédons à un déphasage par addition d'eau et d'éther. Ce mélange se sépare en deux phases :

- phase étherée contenant l'insaponifiable,
- phase aqueuse renfermant les acides gras sous forme de savons.

L'acidification de la phase aqueuse par de l'HCl suivie d'un déphasage par addition d'éther permet d'avoir les acides gras dans la phase étherée. Cette dernière phase est séchée et méthanolysée par la suite.

β) Méthanololyse

Les acides gras sous leur forme de savons sont repris par une solution : $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{C}_6\text{H}_6$ (100:5:5 V/V/V). L'ensemble est porté à 70°C pendant 3 heures. Un déphasage par addition d'heptane permet d'obtenir les acides gras méthyl estérifiés dans la phase heptanoïque.

Cette technique servant à obtenir les acides gras méthyl estérifiés a été utilisée par LEE et PUPPIONE (1978) pour extraire les acides gras des glycérides et des phospholipides. Souvent nous avons préféré passer directement par la méthanololyse sans avoir accès à la saponification.

Pour la purification des méthyl esters ainsi obtenus, une chromatographie sur gel de silice permet de séparer ces méthyl esters d'acides gras des autres contaminants.

Une plaque de gel de silice est tout d'abord placée dans une cuve saturée en solvant de migration (benzène) afin de la nettoyer. Après migration du solvant pendant une nuit, la plaque est activée à 110°C pendant 10 minutes.

L'échantillon de méthyl esters d'acides gras est placé sur la ligne de départ du gel de séparation.

Après migration dans le benzène, la plaque est pulvérisée à la rhodamine et la tache correspondant aux acides gras méthyl estérifiés est repérée grâce à l'utilisation de témoins. Le gel de silice renfermant cette tache est mis dans l'heptane. Après centrifugation de l'ensemble (3 000 g pendant 10 minutes), le surnageant est récupéré alors que le gel de silice subit deux autres lavages suivis d'une centrifugation chacun. Les surnageants issus des trois centrifugations sont additionnés entre eux. Cette dernière solution renfermant les méthyl esters d'acides gras est alors prête à être injectée en G.L.C.). La quantité injectée est de l'ordre de quelques μg d'acide gras qui, dans notre cas est comprise entre 0,5 et 5 μl de la solution heptanoïque finale.

b) Chromatographie des méthyl esters d'acides gras

La chromatographie en phase gazeuse est la plus utilisée pour la séparation des acides gras.

Sur le chromatogramme, ces acides gras sont identifiés par comparaison de leur distance de rétention (relative ou absolue) à

celle d'acides gras d'échantillons biologiques connus ou de standards de commerce. Les analyses ont été faites dans le laboratoire du Pr Fournet (Bâtiment C 9 de Biochimie).

Etude quantitative des acides gras

La quantité de chacun des acides gras contenus dans l'échantillon est déterminée grâce à l'utilisation d'un témoin dont la quantité est connue. La hauteur de chacun des pics sur le chromatogramme est proportionnelle à la quantité respective de chaque acide gras. Si la quantité "t" du témoin utilisé correspond à une hauteur h_t de son pic, celle d'un acide gras donné correspond à la hauteur h_x telle que :

$$x = \frac{t \times h_x}{h_t}$$

x = quantité de l'acide gras injectée.

Ceci est valable dans le cas où on n'a pas de saturation en acides gras.

Nous avons aussi travaillé avec des chromatographes auxquels est associé un intégrateur. Ce dernier nous donne l'intégrale de la surface de chacun des pics sortant sur le chromatogramme. Il nous suffira donc de faire la somme des intégrales des différents pics et d'en déduire l'importance relative de chaque acide gras. Par cette méthode, on peut facilement calculer la quantité injectée d'un acide gras donné en faisant la comparaison avec le témoin utilisé.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est l'une des méthodes servant à séparer les acides gras des lipides neutres et des phospholipides.

Caractéristiques de l'appareil utilisé

Chromatographe : Girdel série 300

Colonne : capillaire - CP sil 0,32 mm de diamètre intérieur
x 25 m

Gaz vecteur : Helium (Pression d'entrée : 0,5 Bar)

Température : 120°C à 240°C, 2°C/mn

2.3.6. Spectrographie de masse

Cette technique nous a servi pour déterminer des acides gras non identifiés après passage sur G.L.C.

Le spectrographe de masse permet de convertir la molécule du méthyl ester d'acide gras à déterminer en un certain nombre de fragments identifiables. Le spectre donne les masses de la molécule ionisée et de ses fragments.

C'est par couplage d'une colonne capillaire imprégnée de silicone OV101 (0,3 mm x 25 m) au spectre de masse Riber-Mag 10-10 (énergie d'ionisation 70 ev) que les analyses sont effectuées.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- température du détecteur et de l'injecteur : 220°C.
- gradient de température : 120°C à 240°C à 3°C/mn
- gaz vecteur : Hélium à 0,05 Bar

Des répertoires de références permettent de donner la nature de la molécule à partir du spectre de masse.

2.3.7. Techniques de radioactivité

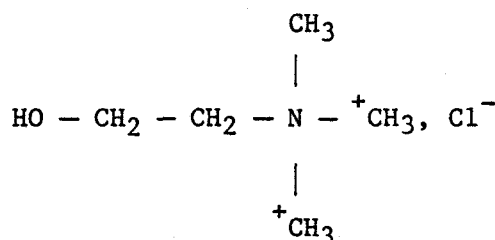
a) Isotopes utilisés

Ce sont : glycérol [^3H]

choline [^3H]

Phosphore [^{32}P]

- [$1(3)-^3\text{H}$] glycérol (Radiochemical Center Amersham ; radioactivité spécifique 2,5 Ci/mM. Dans une solution d'éthanol (5 ml) = 5 mCi (185 MBq).
- Choline ^3H (C.E.A.). Activité spécifique : 85 Ci/mM
[Methyl- ^3H] Choline chloride



solution éthanol = 1 ml

- Phosphore ^{32}P (radiochemical Center Amersham) 1 mCi/ml ; 37 MBq
Orthophosphate dans une solution acide d'HCl

b) Administration des molécules marquées

Suivant que les manipulations se déroulent *in vivo* ou *in vitro*, les modalités d'administration des précurseurs radioactifs diffèrent.

a) In vivo

Les doses de précurseurs utilisés seront données dans chaque chapitre. Les doses sont proportionnelles au poids du corps (en poids frais) de l'animal. L'injection se fait dans la cavité coelomique de l'animal à travers les téguments et à l'aide d'une seringue Hamilton de 100 μl de volume.

B) In vitro

Les différentes doses du précurseur seront données ultérieurement. Le précurseur radioactif est mélangé au milieu de culture des cellules, réparti ensuite entre les différents lots.

c) Dosage de la radioactivité

■ Protocole expérimental

Après séparation des différentes classes de lipides sur gel de silice, les taches correspondantes sont grattées et mises dans des tubes en plastique destinés au comptage. Dans chaque tube, on ajoute 5 ml de lipofluor (J.T. Baker Chemicals B-V, Deventer, Hollande). Ces tubes placés ensuite dans des piluliers sont rangés dans des portoirs et passés au compteur à scintillation (LKB Wallac 125 Rack Beta).

d) Détermination de la radioactivité macromoléculaire

Un aliquote de l'échantillon (50 μ l) (fractions solubles ovocytaires, milieux d'incubation des coelomocytes) est additionné avec 100 μ l d'une solution de sérum albumine bovine à 500 μ g/ml et de 500 μ l de TCA à 20 %. L'ensemble est placé à 4°C pendant 2 heures puis filtré sur filtre de fibres de verre (Whatman GF 83). L'acido-soluble est éliminé par lavage du filtre avec du TCA à 5 % puis par un lavage à l'eau distillée. Le filtre est ensuite séché et la radioactivité est déterminée au compteur à scintillation.

e) Autoradiographie

Les doses de radioactivité sont celles utilisées pour les études biochimiques. Après incorporation, les pièces subissent une fixation par le glutaraldéhyde et l'Osmium. Après un lavage soigné pour éliminer le précurseur non incorporé, elles subissent une déshydratation rapide pour limiter les pertes de lipides puis sont incluses dans un mélange epon-araldite.

Pour l'autoradiographie en microscopie photonique, les coupes semi-fines sont recouvertes d'une émulsion photographique Ilford K 5 ou Kodak NTB 3.

Pour l'autoradiographie à haute résolution, la procédure utilisée est celle décrite antérieurement (DHAINAUT et PORCHET, 1977a). Dans ce cas, l'émulsion utilisée est l'Ilford L 4. La durée d'exposition varie entre 3 et 6 semaines.

PREMIERE PARTIE

LIPIDES NEUTRES

La première partie du travail porte sur le contrôle endocrine du métabolisme des lipides neutres dans 2 espèces de Néréidiens : N. diversicolor et P. cultrifera. Le choix de ces 2 espèces résulte du fait que l'évolution de leur ovogenèse en l'absence d'hormone présente des caractéristiques différentes (Dhainaut, 1984b) : les ovocytes de P. cultrifera subissent une croissance accélérée, ceux de N. diversicolor s'acheminent vers la dégénérescence.

Grâce aux travaux antérieurs de Fontaine (1982, 1984) et de Belhamra (1985), diverses données relatives au métabolisme des LN étaient disponibles, tant in vivo qu'in vitro chez P. cultrifera. Par contre, N. diversicolor n'avait jamais été étudiée sous cet angle. Pour cette raison, il était indispensable avant d'aborder l'étude expérimentale du contrôle endocrine, de procéder à l'étude métabolique au cours de l'ovogenèse naturelle. Les résultats obtenus (in vivo et in vitro) sont résumés dans le premier chapitre.

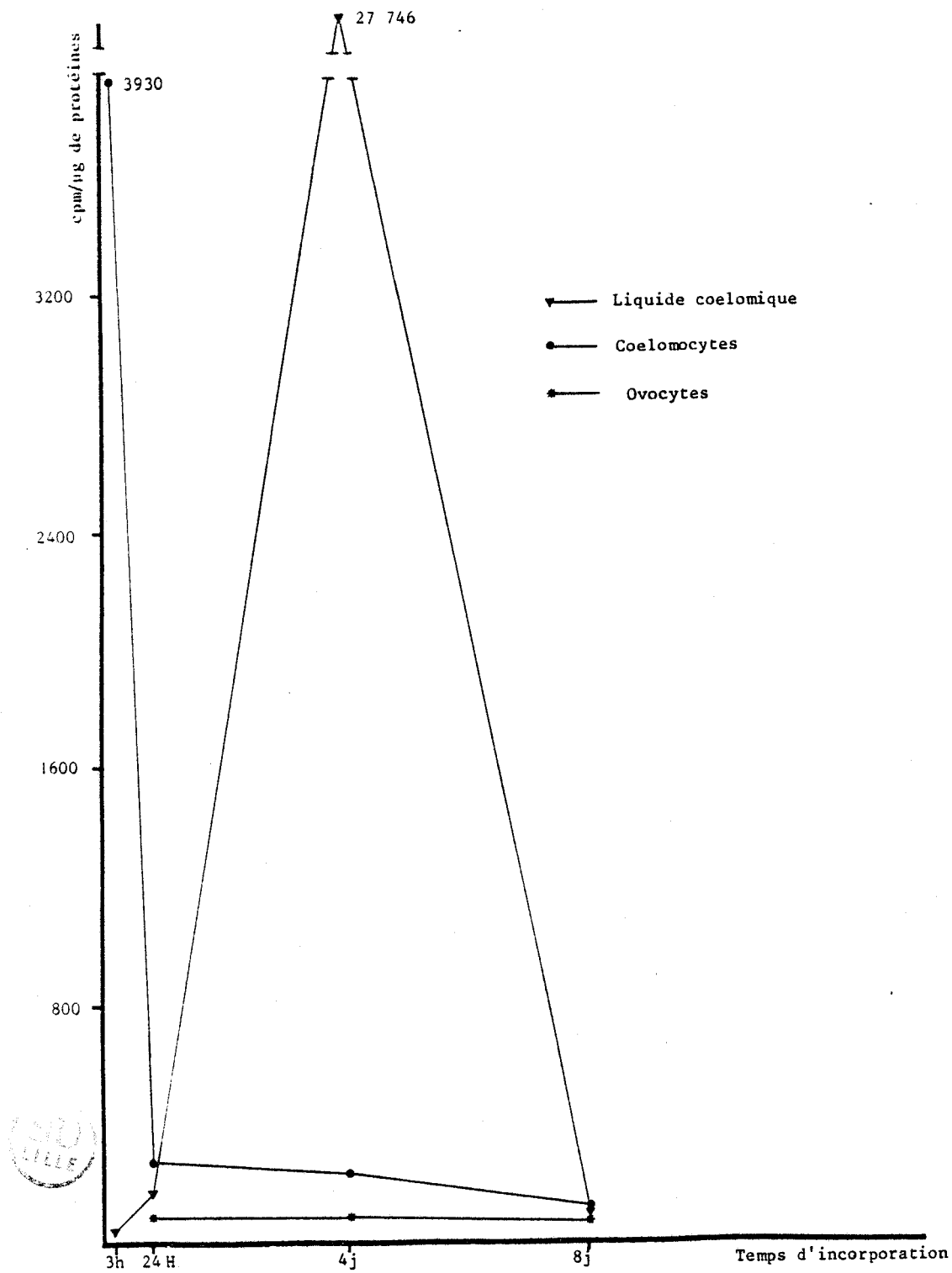


Figure 2 - Radioactivité dans la totalité des lipides neutres des compartiments coelomiques de *N. diversicolor* (diamètre ovocyttaire = 130 μm) en fonction du temps d'incorporation de ^3H -glycérol *in vivo*. Les résultats sont représentés en cpm/μg de protéines dans chaque compartiment coelomique.

I.1. CINETIQUE DE LA SYNTHÈSE DES LIPIDES NEUTRES (OVOGENÈSE NATURELLE) CHEZ NEREIS DIVERSICOLOR

I.1.1 In vivo

Les animaux de diamètre ovocytaire = 130 μ m ont servi pour cette expérience. Le précurseur radioactif (3 H-glycérol) est injecté dans la cavité coelomique des animaux (20 μ Ci par ver). Pour différents temps d'incorporation (3h, 24h, 4j et 8j), les taux de synthèses ont été enregistrés à la fois pour la totalité et pour chaque classe de lipides neutres au niveau des coelomocytes, ovocytes et liquide coelomique.

a - Coelomocytes

Trois heures après l'injection du précurseur, les coelomocytes montrent un taux élevé de radioactivité pour la totalité des lipides neutres (fig. 2). Cette radioactivité s'abaisse ensuite progressivement jusque 8 jours.

L'examen des différentes classes montre des évolutions parallèles pour les glycérides, stérols et WE (fig. 3). Une exception est enregistrée au niveau des acides gras libres qui montrent un pic à 4 jours (fig. 3b).

Tableau 1 - Evolution de la distribution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres des coelomocytes de N. diversicolor en fonction du temps d'incorporation du 3 H-glycérol in vivo.

Classes	% de distribution de la radioactivité			
	3 heures	24 heures	4 jours	8 jours
MG	1,9	12,6	7,7	10,4
DG	3,4	14,4	9,9	22,6
SL	4,9	10,8	17	9,4
AGL	2,9	15,8	48,4	13,2
TG	31,9	17,6	7,8	6,1
WE	31,2	19,4	5,1	24
SE	23,3	9,6	4	14,1

Le tableau 1 montrant l'évolution des pourcentages souligne ce stade critique de 4 jours. On constate aussi que les classes TG, SE et WE

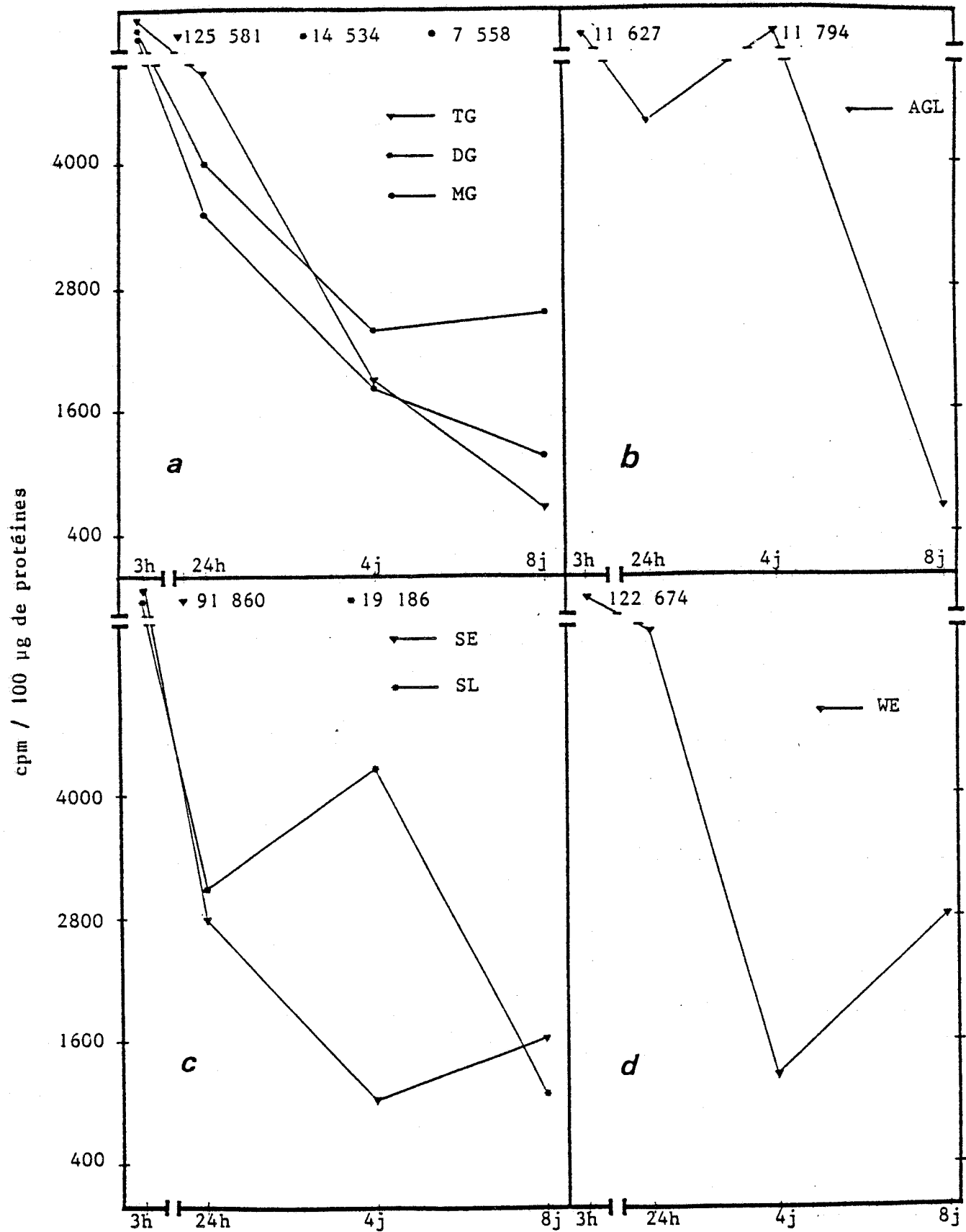


Figure 3 - Evolution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres des coelomocytes de *N. diversicolor* (diamètre ovocyttaire = 130µm) en fonction du temps d'incorporation de ^3H -glycérol *in vivo*. Les résultats sont exprimés en cpm/100 µg de protéines ovocyttaires.

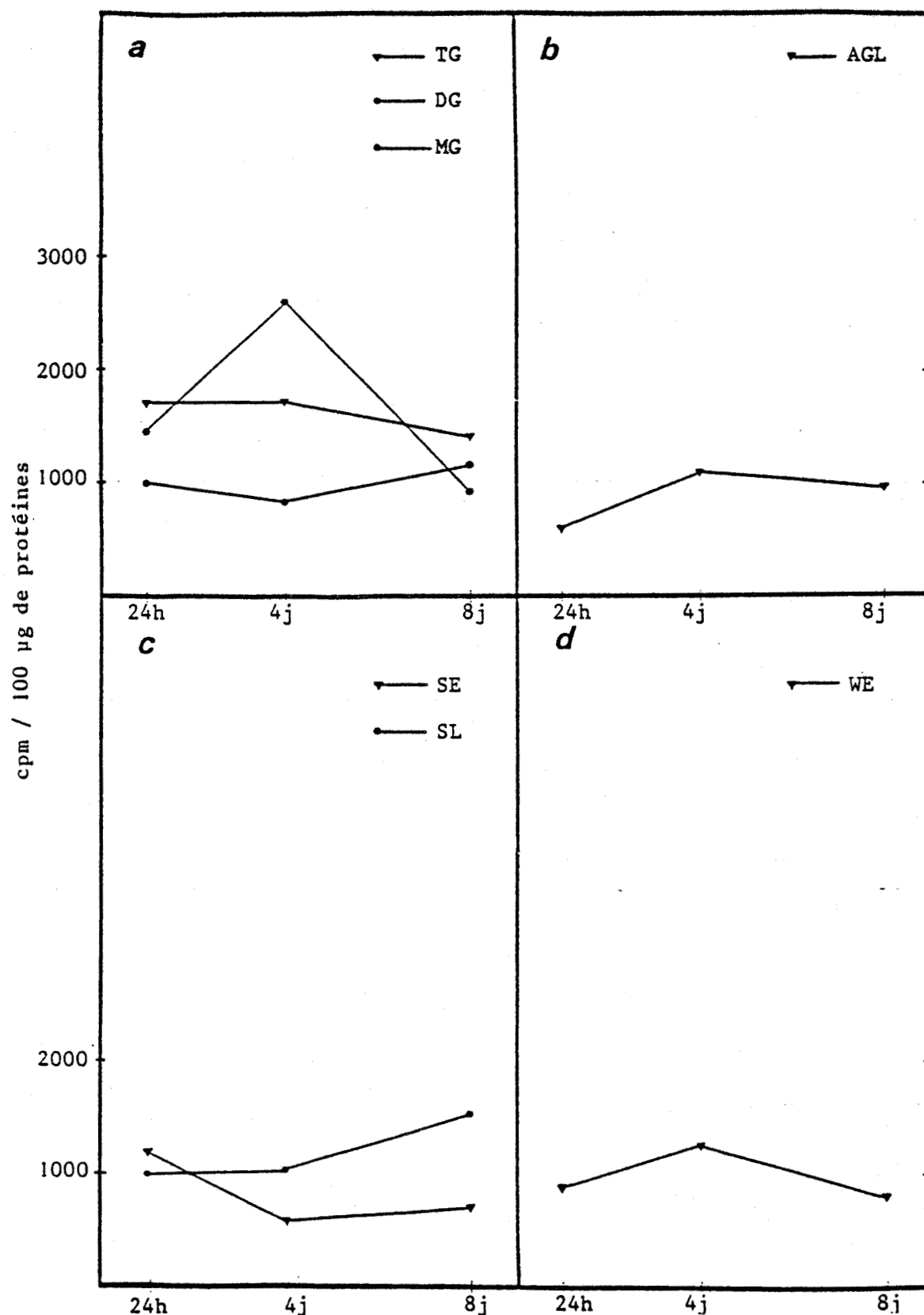


Figure 4 - Evolution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres des ovocytes de *N. diversicolor* (diamètre ovocytaire = 130µm) en fonction du temps d'incorporation de ^3H -glycérol *in vivo*. Les résultats sont exprimés en cpm/100 µg de protéines ovocytaires.

qui montrent des pourcentages importants à 3 heures d'incorporation chutent par la suite au profit des autres classes. L'évolution des pourcentages des WE et SE s'oppose à celle des AGL et SL. Quant à celle des glycérides, les MG et DG vont dans le même sens en s'opposant globalement aux TG.

b - Ovocytes

Nous remarquons une stabilité globale dans la synthèse des lipides neutres entre 24 et 8 j d'incorporation (fig. 2).

Tableau 2 - Evolution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres des ovocytes de N. diversicolor en fonction du temps d'incorporation de ^3H -glycérol in vivo.

Classes	% de distribution de la radioactivité		
	24 heures	4 jours	8 jours
MG	12,9	9,4	15,9
DG	18,4	28,9	12,4
SL	12,2	10,9	20
AGL	9,9	12,1	13
TG	21,4	19,1	19,4
WE	10,7	13,3	10,1
SE	14,4	6,2	9,2

Le tableau 2 de l'évolution des pourcentages de distribution de la radioactivité montre cependant des fluctuations entre ces classes. Au niveau des glycérides, nous constatons une évolution parallèle des mono et triglycérides qui s'oppose à celle des DG. Le même phénomène est constaté entre les stérols et les WE. Quant aux AGL, ils augmentent légèrement en pourcentage en fonction du temps d'incorporation.

c - Liquide coelomique

La figure 2 montre que le taux de radioactivité dans les lipides du liquide coelomique est faible à 3 heures après l'injection de ^3H -glycérol. Il augmente pour atteindre son maximum à 4 jours d'incorporation. A ce stade les stérols et les WE sont prédominants. Le taux de radioactivité baisse ensuite (fig. 2). A 8 jours, toutes les classes lipidiques sont faiblement représentées (fig. 4).

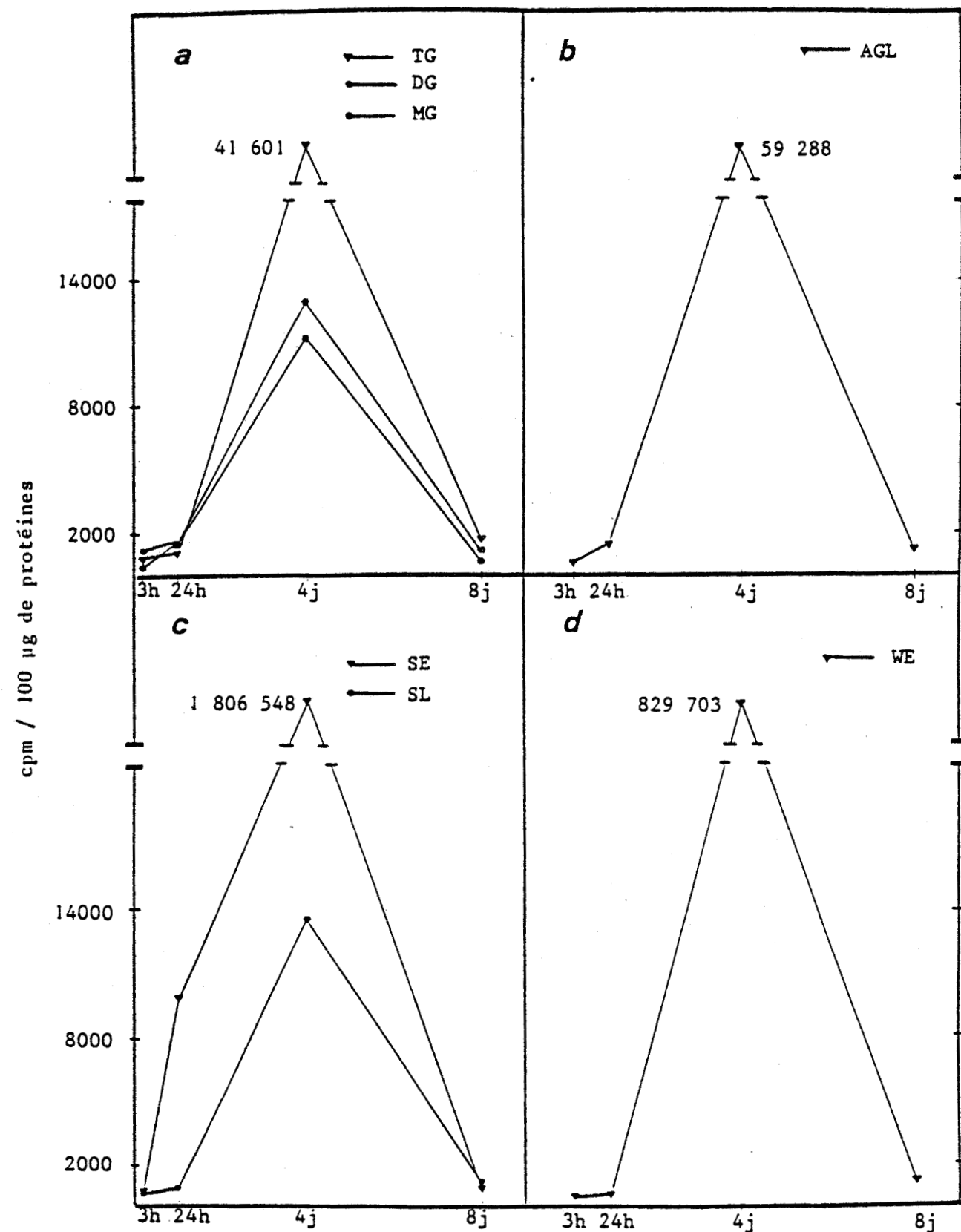


Figure 5 - Evolution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres du L.C. de *N. diversicolor* (diamètre ovocytaire = 130 µm) en fonction du temps d'incorporation de ^3H -glycérol *in vivo*. Les résultats sont exprimés en cpm/100 µg de protéines du L.C.

Tableau 3 - Evolution de la distribution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres dans le liquide coelomique de N. diversicolor en fonction du temps d'incorporation de ^3H -glycérol in vivo.

Classes	% de distribution de la radioactivité			
	3 heures	24 heures	4 jours	8 jours
MG	7,4	8,4	0,4	7,2
DG	23,5	7,7	0,4	12,9
SL	13,9	5,8	0,5	12,4
AGL	13,5	8,6	2,1	25,1
TG	15,6	6,1	1,5	18,7
WE	11,3	3,4	29,9	13,4
SE	14,8	60,6	65,1	9,9

d - Discussion

In vivo, les coelomocytes de N. diversicolor présentent des synthèses de lipides neutres radioactifs dès les premières heures qui suivent l'injection avec le ^3H -glycérol. Ces lipides synthétisés sont constitués surtout de triglycérides, de WE (wax esters) et de stérols estérifiés. Après 24 heures la radioactivité des coelomocytes chute considérablement tandis qu'elle apparaît dans le liquide coelomique. L'évolution des taux de radioactivité laisse présager que les coelomocytes sont à l'origine du matériel radioactif observé dans le liquide coelomique quoiqu'il ne soit pas exclu que d'autres tissus ou organes (tube digestif, etc...) puissent intervenir dans la composition de ce milieu. Ces lipides seraient ensuite prélevés du liquide coelomique au profit d'autres compartiments. Toutefois, les synthèses ovocytaires apparaissent relativement peu actives, beaucoup plus faibles que celles des coelomocytes. Toutefois quand un autre mode d'expression des résultats est choisi (poids sec, Belhamra, 1985), il apparaît que les synthèses ovocytaires sont plus faibles par rapport à celles des coelomocytes. Deux hypothèses peuvent être formulées :

- Il existe une compétition entre les différents compartiments de l'animal (coelomocytes, muscles ... etc). Le précurseur injecté serait rapidement utilisé au détriment des ovocytes. Les besoins métaboliques somatiques doivent s'avérer particulièrement importants chez les animaux qui, comme dans le cas de nos conditions expérimentales, sont soumis au jeûne.
- Les synthèses ovocytaires sont lentes. Effectivement la durée de l'ovogénèse est très longue (environ une année) par rapport à la période d'incorporation expérimentale de quelques jours.

Les résultats de l'étude in vivo attirent également l'attention sur la capacité des Annélides Polychètes de synthétiser des stérols. Ce fait avait déjà été signalé par Voogt (1974) chez N. diversicolor, Nephtys hombergii et Spirographis spallanzani à partir de l'incorporation de ^{14}C -acétate. Chez P. cultrifera, Fontaine (1982) a également constaté l'importance des stérols estérifiés (30 à 40 % des lipides neutres) dans le liquide coelomique.

Les Annélides diffèrent en cela des Nématodes qui apparaissent incapables de synthétiser les stérols de novo (Bolla et al., 1972 ; Cole et Krusberg, 1968 ; Comley et Jaff, 1981 ; Dutky et al., 1967 ; Hieb et Routhstein, 1968). Ces animaux en conséquence doivent recourir à la nutrition pour élaborer leurs stérols. Toutefois Chitwood et al. (1985) ; Cole et Krusberg (1967) ; Orcutt et al. (1978) mentionnent que les Nématodes phytoparasites sont probablement capables de procéder à la déalkylation des phytostérols. Les Mollusques semblent également limités dans leur capacité à synthétiser des stérols (Goad, 1981) qui proviennent de l'alimentation. Chez la moule Mytilus galloprovincialis, Lubet (1985) montre que les stérols libres constituent environ 18 % des lipides neutres du manteau et presque 62 % dans les branchies.

Chez les Insectes, divers auteurs (Lambreton, 1965 ; Nelson et Sukkestad, 1968 ; Turunen, 1973 ; Williams et al., 1974 ; Downer, 1978) ont montré que la synthèse des stérols de novo n'existe pas.

I.2 In vitro (culture des ovocytes)

Dans les conditions d'expérimentation in vivo, il est difficile de séparer les interactions existant entre les trois compartiments : coelomocytes, liquide coelomique, ovocytes. Pour préciser l'importance des synthèses endogènes de lipides neutres par les ovocytes, nous avons réalisé une culture de ces cellules après les avoir séparées des coelomocytes et liquide coelomique. Différents temps d'incubation dans le milieu de culture sont réalisés (2h, 5h, 8h, 11h et 17h). Le précurseur utilisé est le ^3H -glycérol à raison de 30 $\mu\text{Ci/ml}$ de milieu. Le diamètre ovocytaire des vers utilisés est de 130 μm . La quantité du milieu de culture par boîte est 1,5 ml.

Résultats

La figure 6 montre l'évolution des synthèses de la totalité des lipides neutres ainsi que celle de leurs différentes classes en fonction du temps d'incorporation de ^3H -glycérol dans les ovocytes. Les données acquises

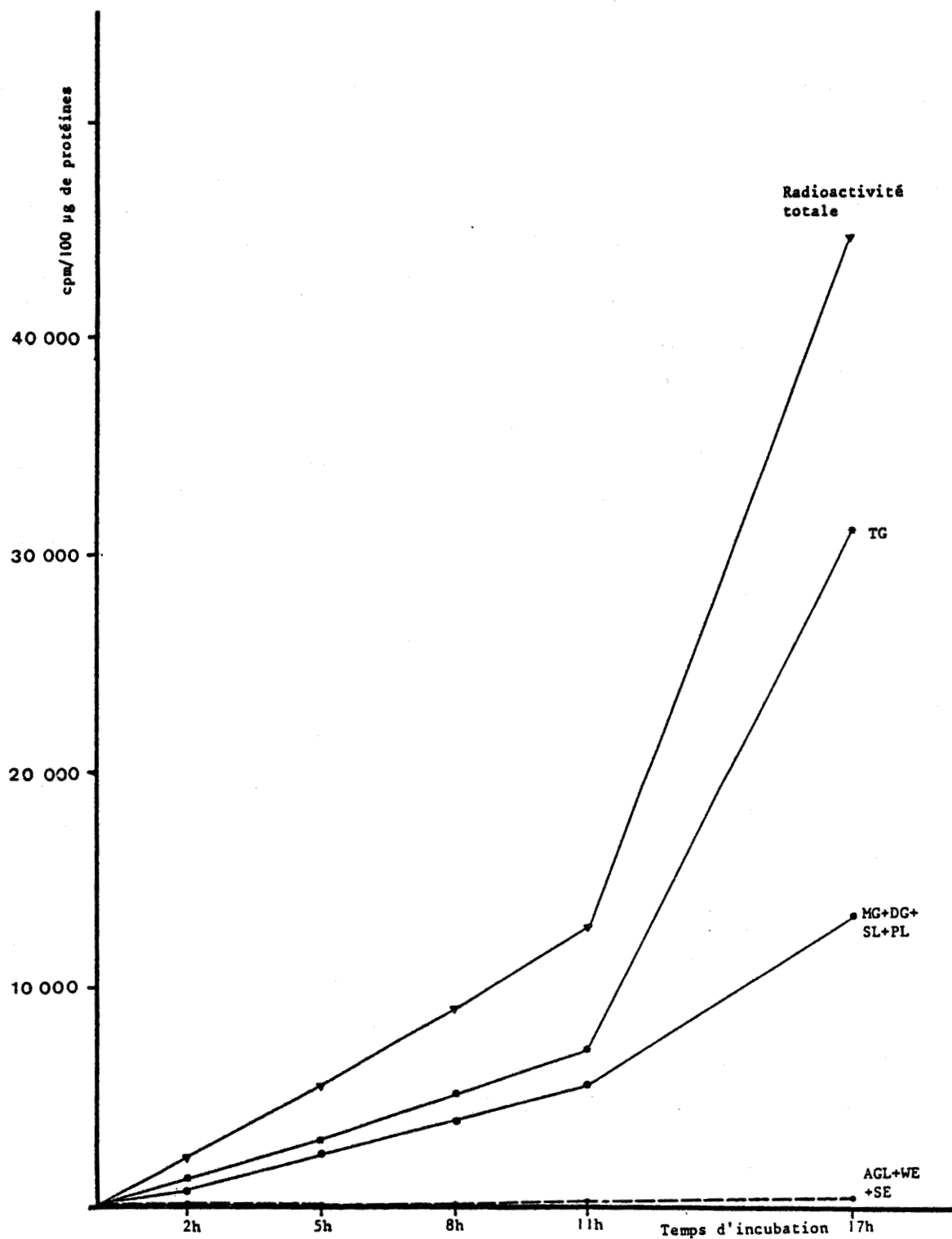


Figure 6 - Cinétique de synthèse des lipides neutres des ovocytes de *N. diversicolor* (diamètre ovocytaire = 130µm) en culture par incorporation de ^3H -glycérol.

Les résultats sont exprimés en cpm/100 µg de protéines ovocytaires.

indiquent que ces lipides accroissent régulièrement leur synthèse jusque 11 heures d'incorporation. Les processus semblent ensuite s'accélérer entre 11 et 17 heures. Cette augmentation concerne les différentes classes de lipides neutres, les synthèses de TG étant prépondérantes.

I₂. COMPARAISON DU METABOLISME DES LIPIDES NEUTRES EN PRESENCE ET EN ABSENCE DE L'HORMONE CEREBRALE

Les animaux subissent l'ablation du cerveau et évoluent ensuite en l'absence de l'hormone cérébrale pendant des durées variant suivant l'expérimentation. Les vers sont alors ponctionnés et les cellules coelomiques mises en culture en conditions an hormonales. Pour chaque temps d'incubation, une comparaison est effectuée avec des cellules témoins provenant d'animaux de même état génital mais non décérébrés. Chez ces derniers, deux cerveaux jeunes sont additionnés au milieu de culture afin de se rapprocher des conditions hormonales naturelles.

a - Coelomocytes

a₁. Chez Nereis diversicolor

a_{1.1}. Temps de décérébration : 3 jours

Des animaux de l'ordre de 130 μ m de diamètre ovocytaire sont utilisés. Chez les opérés le temps de décérébration est de 3 jours.

α - Incorporation : 3 heures

L'examen de la figure 7 présentant les taux de synthèses des lipides dans les coelomocytes après 3 heures d'incorporation de ³H-glycérol, montre une baisse de ces synthèses après décérébration. Les différences enregistrées pour la totalité des lipides neutres sont significatives. De même en se référant aux différentes classes de lipides, nous remarquons une chute de synthèses chez les opérés sauf peut-être les WE. Les rapports des synthèses des opérés sur les témoins (D/N) (tableau 4) montrent bien le degré de ces variations. Pour l'ensemble des lipides, la chute chez les décérébrés est de l'ordre de 4/10e par rapport aux témoins. Le tableau 4 illustrant les pourcentages de distribution de la radioactivité entre les classes de lipides, ne montre pas de modifications significatives entre les synthèses de lipides des coelomocytes d'animaux décérébrés et celles des témoins. Pour les deux séries expérimentales en comparaison, les TG forment environ 60 % de la radioactivité dans les lipides.

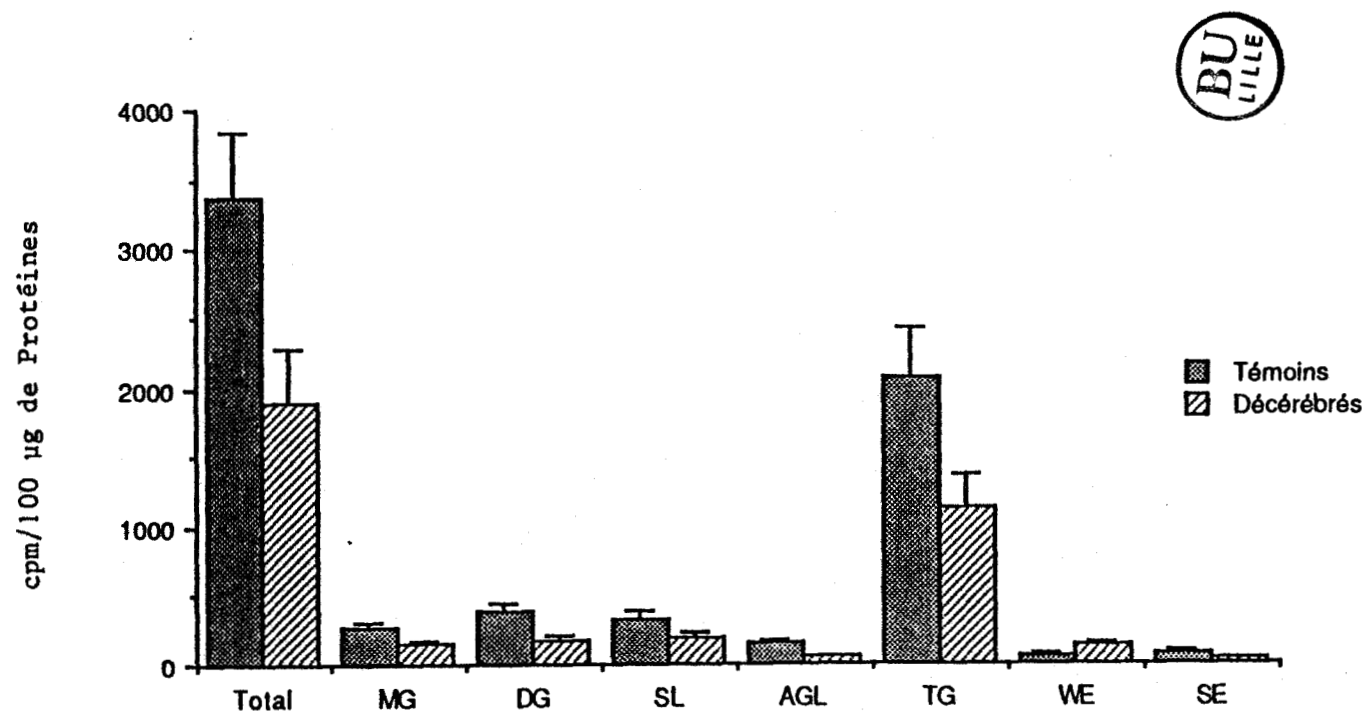


Figure 7 - Influence de la décérébration sur la synthèse des classes de lipide neutres dans les coelomocytes de *N. diversicolor* (130 µm). Les animaux expérimentés évoluent depuis 3 jours en absence d'hormone cérébrale.

Les coelomocytes sont maintenus en culture pendant 3 h en présence de ^3H -glycérol. Résultats exprimés en cpm/100 µg de protéines coelomocytaires. Moyennes de 3 échantillons $\pm$ SD

Tableau 4 - Distribution de la radioactivité entre les classes de lipides neutres des coelomocytes *in vitro* (3 h d'incorporation). Les coelomocytes sont issus d'animaux décérébrés pendant 3 jours et de témoins. Le rapport D/N correspond à celui du taux de synthèses des coelomocytes des décérébrés sur ceux des témoins. Moyennes de 3 valeurs $\pm$ SD.

Classes	% de distribution de la radioactivité		D/N
	Décérébrés	Témoins	
MG	8 $\pm$ 13	8 $\pm$ 2	0,6
DG	10 $\pm$ 2	11 $\pm$ 3	0,5
SL	10 $\pm$ 2	10 $\pm$ 4	0,6
AGL	3 $\pm$ 0,5	5 $\pm$ 1	0,3
TG	60 $\pm$ 12	62 $\pm$ 10	0,5
WE	7 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,6	2
SE	2 $\pm$ 0,6	2 $\pm$ 1	0,4
Total	100	100	0,6

β - Incorporation : 9 heures

Les animaux expérimentés subissent une décérébration de 3 jours. Le diamètre ovocytaire des animaux est de 116-130 μ m. Les coelomocytes des vers décérébrés et ceux des témoins sont mis en culture en présence de ^3H -glycérol (4 μ Ci/ml).

L'examen de la figure 8 illustrant le taux de synthèses de ces lipides, laisse apparaître des différences significatives après ablation du cerveau. En fait une chute est enregistrée dans les synthèses globales des lipides neutres chez les opérés. Il en est de même pour les différentes classes ou tout au moins les plus radioactives. Les rapports D/N : taux de synthèse chez les décérébrés sur celui des témoins (tableau 5) montre bien la chute d'incorporation de la radioactivité dans les lipides après décérébration.

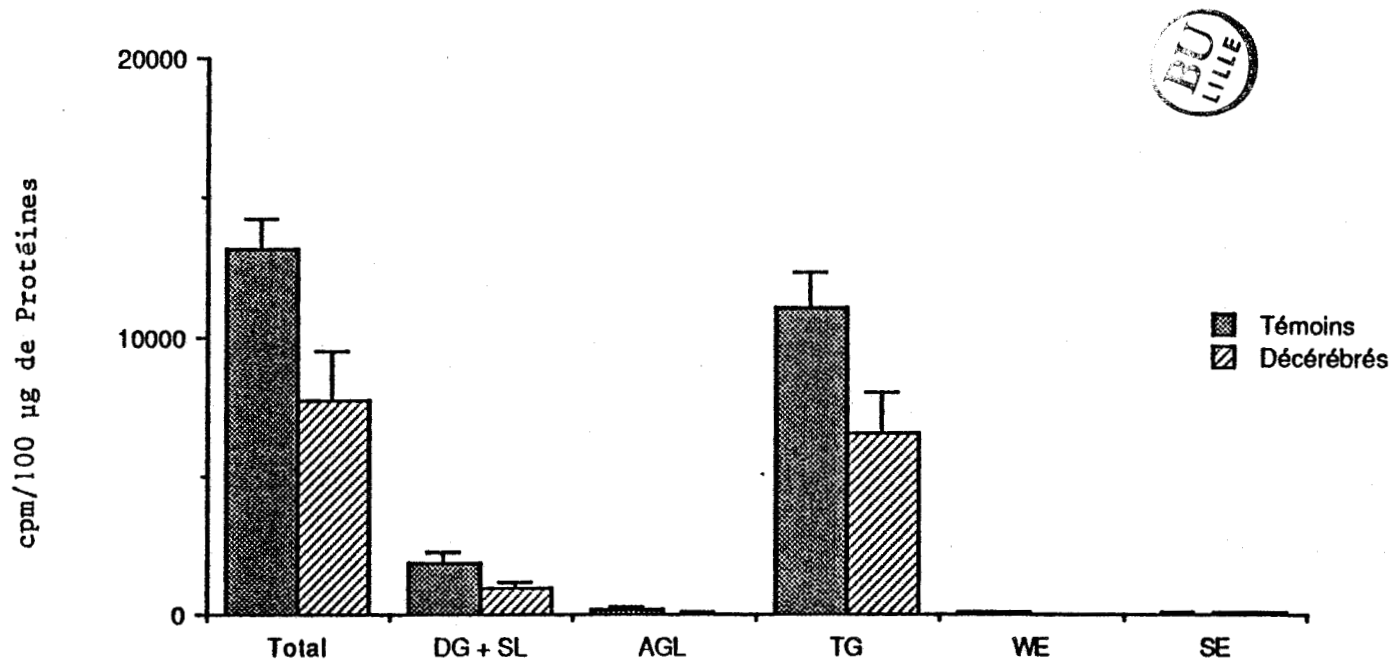


Figure 8 - Influence de la décérébration sur la synthèse des lipides neutres dans les coelomocytes (de *N. diversicolor*) par incorporation de ^3H -glycérol pendant 9 h *in vitro*. Coelomocytes provenant d'animaux décérébrés depuis 3 jours et d'animaux témoins. Stade ovocytaire initial des animaux (130 µm). Résultats en cpm/100 µg de protéines coelomocytaires. Moyennes $\pm$ SD à partir de 3 échantillons.

Tableau 5 - Distribution de la radioactivité entre les classes de lipides neutres des coelomocytes en culture après incorporation de ^3H -glycérol. Les coelomocytes sont issus de *N. diversicolor* (diamètre ovocytaire = 116-130 μm) décérébrés pendant 3 jours et des témoins. Le temps d'incorporation = 9 heures. D/N = rapport du taux de synthèse des décérébrés sur celui des témoins. Moyenne de 3 valeurs $\pm$ SD.

Classes	% de distribution de la radioactivité		D/N
	Décérébrés	Témoins	
DG + SL	13 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3	0,5
AGL	04 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,9	0,2
TG	86 $\pm$ 22	83 $\pm$ 9	0,6
WE	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,4
SE	1 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1	1,6
Total	100	99	0,6

Le tableau 5 montre que l'incorporation de ^3H -glycérol dans les lipides neutres des coelomocytes en culture est sans différences significatives entre les expérimentés et les témoins. Les coelomocytes en comparaison présentent environ 98 % de leur radioactivité dans les lipides neutres sous forme de glycérides et essentiellement les TG.

a_{1.2}. Temps de décérébration : 8 jours

Des *N. diversicolor* de 130 μm de diamètre ovocytaire sont utilisées. Les coelomocytes issus d'animaux décérébrés et ceux d'animaux témoins sont mis séparément en culture pendant 24 heures en présence de ^3H -glycérol (6 $\mu\text{Ci/ml}$ de milieu).

Résultats

La figure 9 montre que le taux de synthèse des lipides neutres est globalement accentué dans les coelomocytes d'animaux décérébrés par rapport aux témoins. Cette élévation de synthèse chez les opérés intéresse surtout les TG.

En revanche, le tableau 6 des distributions de la radioactivité dans les classes de lipides n'indique pas de changements apparents entre coelomocytes témoins et ceux des animaux décérébrés. Pour les deux séries en comparaison les TG représentent l'essentiel de la radioactivité.

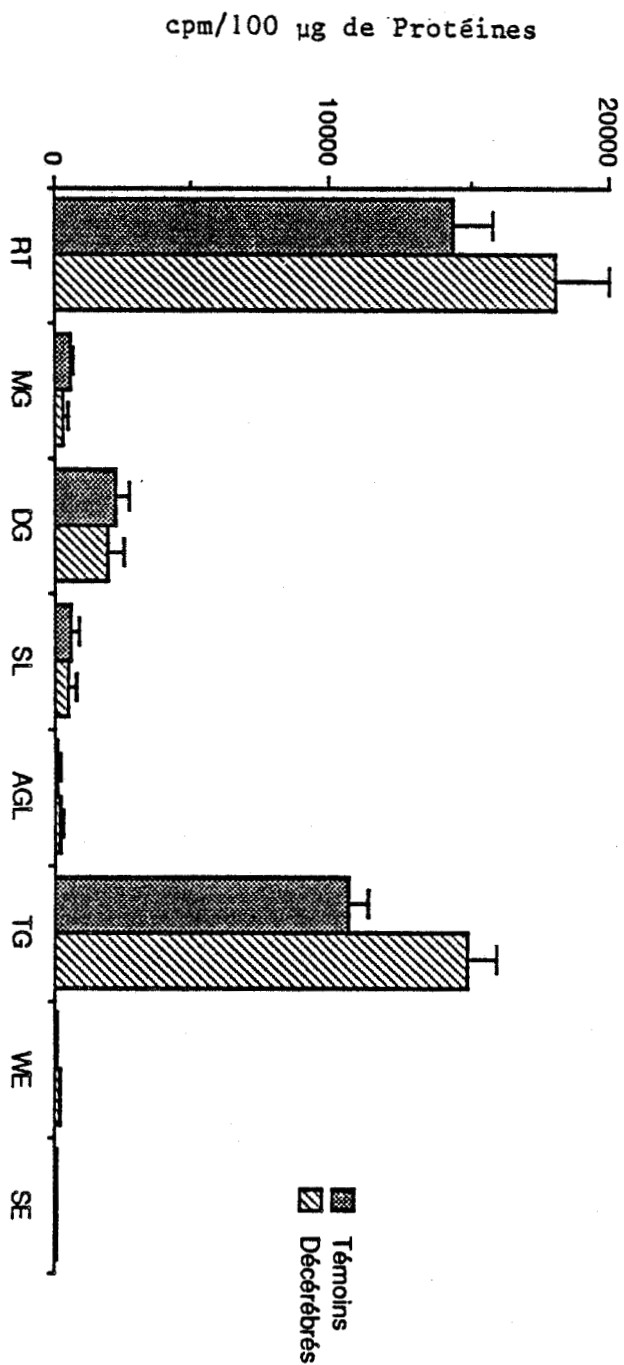


Figure 9 - Incorporation de ^3H -glycérol dans les lipides neutres des coelomocytes de *N. diversicolor* en culture pendant 24 heures.

Coelomocytes provenant d'animaux décérébrés depuis 8 jours et des témoins. Diamètre ovocytaire initial des animaux = 130 μm .

Résultats donnés en cpm/100 μ g de protéines coelomocytaires $\pm$ SD à partir de 3 échantillons.

Tableau 6 - Distribution de la radioactivité dans les lipides neutres des coelomocytes en culture après incorporation de ^3H -glycérol. Les coelomocytes sont issus de N. diversicolor (diamètre ovocytaire = 130 μm) décérébrés depuis 8 jours et des témoins. Le temps d'incorporation = 24 heures.
Moyennes de 3 valeurs $\pm$ SD.

Classes	% de distribution de la radioactivité	
	Décérébrés	Témoins
MG	1,7 $\pm$ 1	3,7 $\pm$ 1
DG	10,6 $\pm$ 3,2	15,9 $\pm$ 3
SL	2,8 $\pm$ 1,5	4,4 $\pm$ 1,6
AGL	1 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,4
TG	82 $\pm$ 6	74 $\pm$ 5,2
WE	1 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,3
SE	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
Total	99,5	99,7

Remarque : Ces résultats déduits à partir d'une culture de coelomocytes pendant une durée relativement longue diffèrent de ceux précédemment obtenus puisque dans cette série expérimentale les synthèses de TG des coelomocytes issus d'animaux décérébrés deviennent plus élevées que chez les témoins. Toutefois cette série a fait appel à un temps d'incorporation de 24 heures. Une nouvelle expérimentation serait nécessaire pour préciser l'importance de ces deux paramètres.

a₂. Chez Perinereis cultrifera

Des animaux de 130 μm de diamètre ovocytaire ont été utilisés. L'expérience porte sur trois lots d'animaux décérébrés depuis 12 jours et trois lots d'animaux témoins. Les coelomocytes sont alors récupérés puis mis en culture pendant 3 h en présence de ^3H glycérol.

Résultats

Il s'avère d'après l'examen de la figure que le taux de synthèse des lipides neutres à partir de ^3H -glycérol diminue dans les coelomocytes des décérébrés par rapport aux témoins. Cette chute au niveau de la totalité des lipides neutres est enregistrée dans chaque classe et plus particulièrement les TG et les DG.

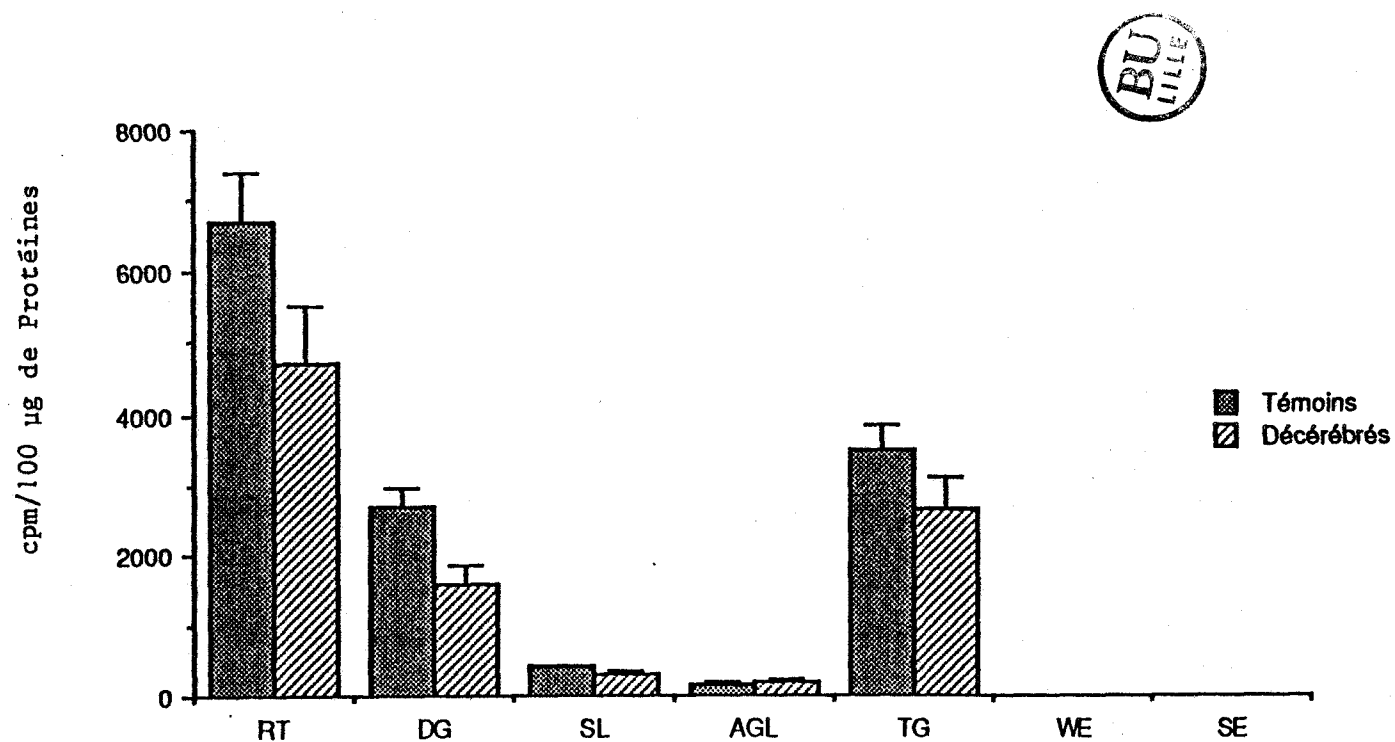


Figure 10 - Influence de la décérébration sur la synthèse des lipides neutres dans les coelomocytes de *P. cultrifera* en culture. Temps d'incorporation de ^3H -glycérol = 9 h.
Coelomocytes provenant d'animaux décérébrés depuis 12 jours et d'animaux témoins (diamètre ovocytaire initial = 130 μm).
Résultats donnés en cpm/100 μg de protéines coelomocytaires $\pm$ SD à partir de 3 échantillons.

Tableau 7 - Distribution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres des coelomocytes de *P. cultrifera* (130 μ m de diamètre ovocytaire) en culture après 9 heures d'incorporation de 3 H-glycérol. Les coelomocytes issus d'animaux décérébrés pendant 12 jours et d'animaux témoins sont étudiés dans les mêmes conditions. Dans cette expérience, les MG n'ont pas été pris en compte. Moyenne de 3 valeurs $\pm$ SD.

Classes	Répartition de la radioactivité		D/N
	Décérébrés	Témoins	
DG	40 $\pm$ 4	33 $\pm$ 6	0,6
SL	6 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 1	0,8
AGL	2 $\pm$ 0,5	4 $\pm$ 0,4	1,4
TG	52 $\pm$ 5	56 $\pm$ 9	0,7
WE	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,3
SE	-	-	

Par rapport aux témoins, les coelomocytes issus d'animaux ayant subi une décérébration de 12 jours ne présentent pas de modifications significatives dans la répartition de la radioactivité dans les classes de lipides (tableau 7).

b - Ovocytes

b₁. Chez Nereis diversicolor

b_{1.1}. Temps de décérébration : 3 jours

Des animaux de 130 μ m de diamètre ovocytaire ont été utilisés. L'expérience porte sur trois lots d'animaux décérébrés pendant 3 jours et trois lots d'animaux témoins; les ovocytes sont alors séparés des coelomocytes et liquide coelomique puis mis en culture pendant trois heures en présence de 3 H-glycérol.

L'examen de la figure 11 comparant les taux de synthèses des lipides dans les ovocytes expérimentés et témoins indique une baisse de cette synthèse chez les premiers (363 $\pm$ 32 et 448 $\pm$ 35 cpm/100 μ g de protéines respectivement chez les opérés et témoins dans les lipides neutres). Des différences significatives sont également remarquées dans les différentes classes notamment les TG.

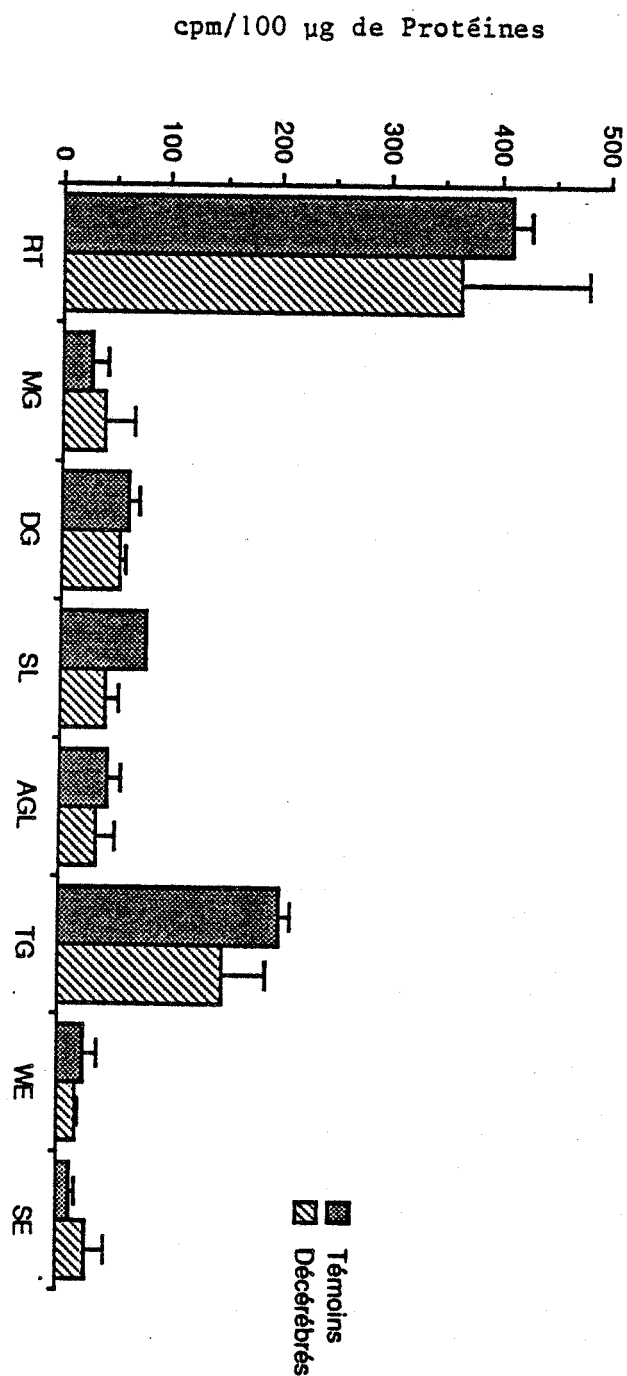


Figure 11 - Incorporation de ^3H -glycérol dans les classes de lipides neutres des ovocytes de *N. diversicolor* en culture pendant 3 h.

Les ovocytes ($130 \mu\text{m}$ de diamètre initial) proviennent d'animaux décérébrés depuis 3 jours et d'animaux témoins.

Résultats exprimés en cpm/100 μg de protéines ovocytaires $\pm$ SD à partir de 3 échantillons.

Tableau 8 - Distribution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres d'ovocytes de 130 μm de diamètre isolés en culture en présence de ^3H -glycérol (1 $\mu\text{Ci/ml}$ de milieu de culture). Les ovocytes sont issus de *N. diversicolor* décérébrés pendant 3 jours et d'animaux témoins. Temps d'incorporation = 3 heures. D/N = rapport des taux de synthèses de lipides neutres dans les ovocytes des décérébrés par rapport aux témoins. Moyennes de 3 valeurs $\pm$ SD.

Classes	% de distribution de la radioactivité		D/N
	Décérébrés	Témoins	
MG	11 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2	1,5
DG	15 $\pm$ 5	14 $\pm$ 3	0,8
SL	12 $\pm$ 3	17 $\pm$ 7	0,5
AGL	9 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	0,7
TG	42 $\pm$ 8	45 $\pm$ 13	0,7
WE	5 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	0,7
SE	7 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	2
Total	101	100	0,8

Le tableau 8 ne montre pas de modifications significatives dans la répartition de la radioactivité entre les classes de lipides dans les ovocytes d'animaux décérébrés et d'animaux témoins.

b_{1.2}. Temps de décérébration : 8 jours

Les animaux utilisés ont un diamètre ovocytaire = 130 μm . L'expérimentation porte sur des vers décérébrés pendant 8 jours et des témoins. Les ovocytes isolés sont ensuite mis en culture pendant 24 heures en présence de ^3H -glycérol (5 $\mu\text{Ci/ml}$ de milieu). Pour chaque série expérimentale, trois lots d'ovocytes ont été réalisés.

Résultats

En ce qui concerne le taux de synthèse des lipides, l'examen de la figure 12 montre une chute dans les synthèses globales des lipides neutres chez les opérés. Cette diminution est provoquée par les glycérides et essentiellement les TG.

La comparaison des pourcentages de distribution de la radioactivité dans les classes de lipides des ovocytes des décérébrés et ceux des témoins montre des différences significatives pour chaque classe (tableau 9). En effet, nous remarquerons que chez les opérés l'importance des TG diminue au profit des autres classes.

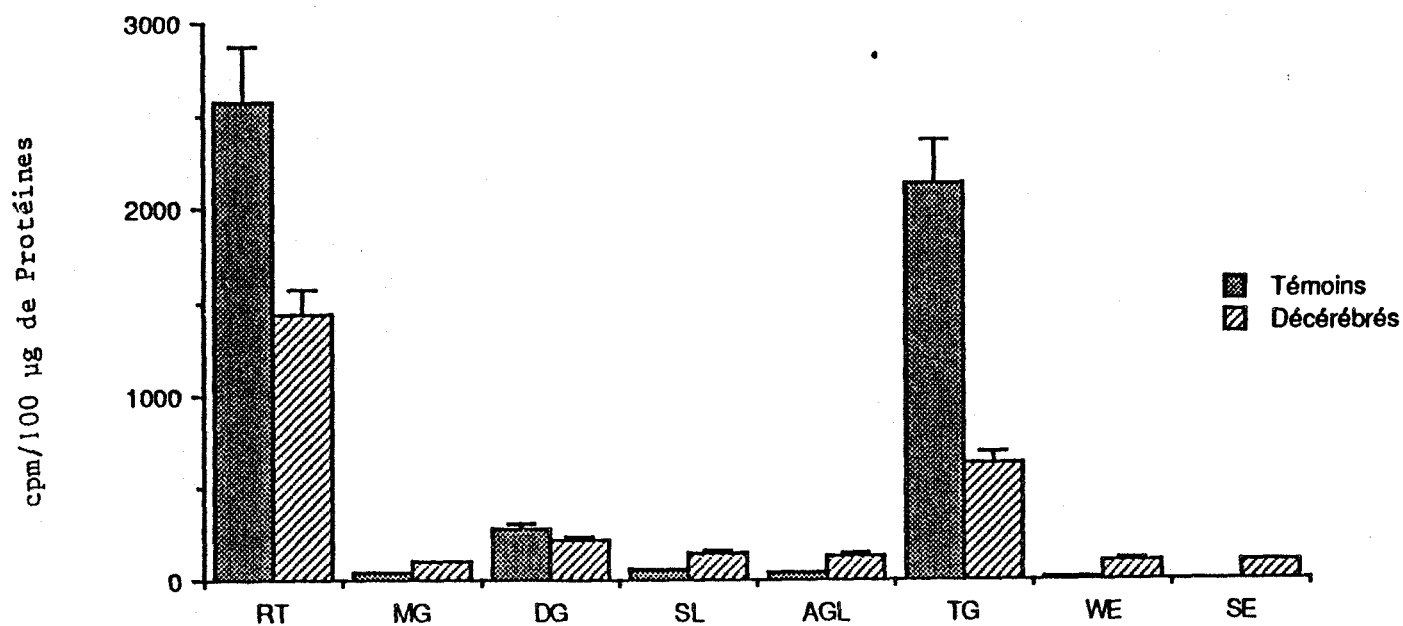


Figure 12 - Influence de la décérébration sur l'incorporation de ^3H -glycérol dans les lipides neutres des ovocytes de *N. diversicolor* en culture pendant 24 h
Les ovocytes sont issus d'animaux décérébrés depuis 8 jours et d'animaux témoins.
Résultats exprimés en cpm/100µg de protéines ovocytaires. Valeurs moyennes $\pm$ SD à partir de 3 échantillons.

Tableau 9 - Distribution de la radioactivité entre les classes de lipides neutres des ovocytes après 24 heures d'incorporation de ^3H -glycérol dans le milieu de culture ($5 \mu\text{Ci/ml}$). Les ovocytes ($130 \mu\text{m}$ de diamètre) proviennent de N. diversicolor décérébrées depuis 8 jours et d'animaux témoins.
Moyennes de 3 valeurs $\pm$ SD.

Classes	% de distribution de la radioactivité	
	Décérébrés	Témoins
DG	16 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2
SL	11 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,3
AGL	10 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,3
TG	47 $\pm$ 5	85 $\pm$ 9
WE	8 $\pm$ 1	0,5
SE	7 $\pm$ 1	0,2
Total	99	101

b₂. Chez Perinereis cultrifera

Les animaux utilisés ont un diamètre ovocytaire de $130 \mu\text{m}$. Les vers subissant la décérébration sont répartis en trois lots et évoluent alors en absence de cerveau pendant 12 jours. Les ovocytes sont ensuite récupérés et incubés dans un milieu de culture contenant du ^3H -glycérol ($8 \mu\text{Ci/ml}$ de milieu). Le temps d'incorporation est de 9 heures.

Résultats

La capacité de synthèse des lipides neutres par les ovocytes est accompagnée d'une légère chute enregistrée chez les opérés (fig. 13). Cette différence n'apparaît pas significative.

Le tableau 10 des pourcentages de distribution de la radioactivité dans les classes de lipides ne montre pas de différences significatives entre ovocytes issus d'animaux décérébrés et ceux des témoins. Pour les deux séries en comparaison, l'important de l'incorporation de ^3H -glycérol est au niveau des TG.

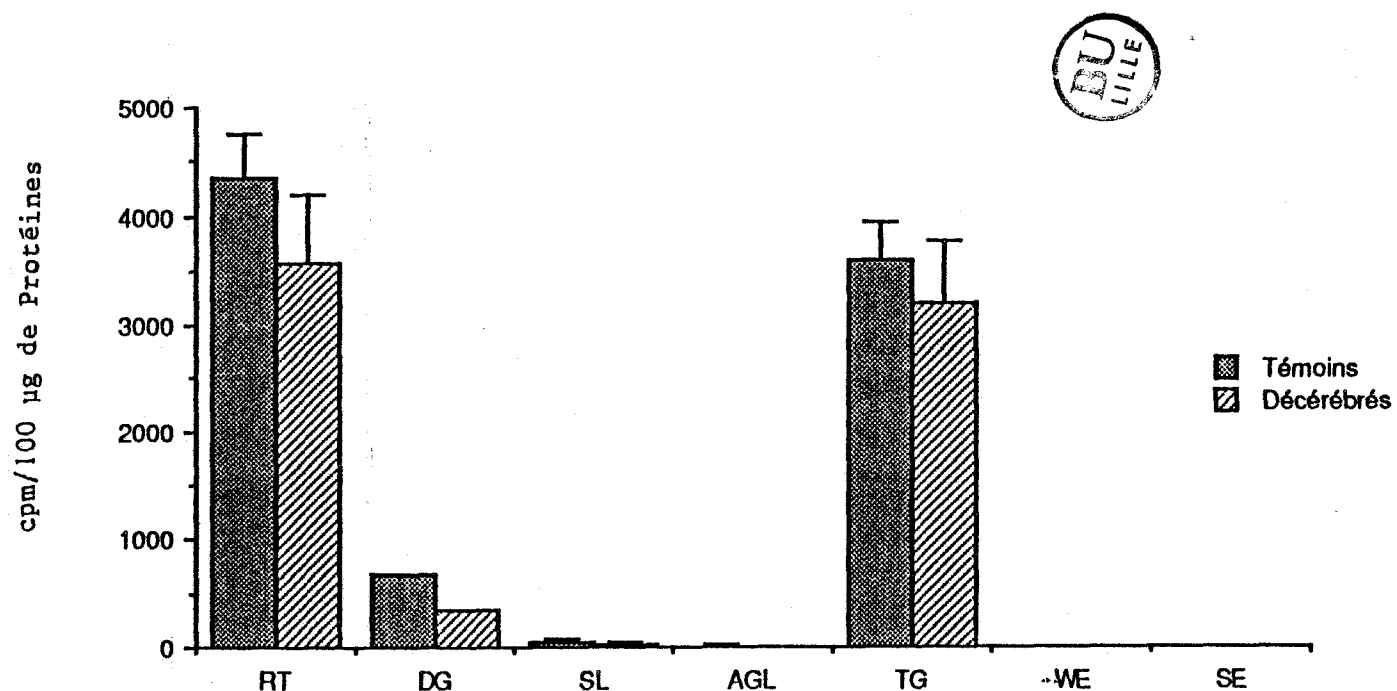


Figure 13 - Influence de la décérébration sur la synthèse des lipides neutres dans les ovocytes de *P. cultrifera* par incorporation de 3H-glycérol pendant 9h *in vitro*. Ovocytes (Diamètre initial = 130 µ) provenant d'animaux décérébrés depuis 12 jours et d'animaux témoins. Résultats exprimés en cpm/100 µg de protéines ovocytaires. Valeurs moyennes à partir de 3 échantillons $\pm$ SD.

Tableau 10- Distribution de la radioactivité dans les classes de lipides neutres des ovocytes après 9 heures d'incorporation de ^3H -glycérol in vitro. Ovocytes (130 μm de diamètre) de P. cultrifera décérébrées depuis 12 jours et témoins.

D/N : rapport des taux de synthèses de lipides des opérés sur ceux des témoins.
Moyennes de 3 valeurs $\pm$ SD.

Classes	% de distribution de la radioactivité		D/N
	Décérébrés	Témoins	
DG	10 $\pm$ 3	15 $\pm$ 1	0,5
SL	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,4	0,6
AGL	0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,4
TG	89	83 $\pm$ 0,5	0,9
WE	0,1	0,1	0,8
SE			
Total	100	99	0,8

I₃. ACTION STIMULATRICE DE L'HORMONE CEREBRALE SUR LE METABOLISME DES LIPIDES NEUTRES DES COELOMOCYTES ET DES OVOCYTES DE NEREIS DIVERSICOLOR

L'étude précédente a montré que les ovocytes et les coelomocytes ayant évolué dans un environnement dépourvu d'hormone cérébrale subissent une baisse de leur capacité de synthèse de lipides neutres par rapport aux cellules témoins. Dans cette seconde partie, nous avons recherché si, à partir d'un même lot de cellules, des différences métaboliques pouvaient être enregistrées in vitro en fonction du conditionnement hormonal. Celui-ci a été instauré selon deux procédures : (a) addition de prostomiums entiers dans les flacons de culture ; (b) addition de sécrétions cérébrales obtenues in vitro.

a - Coelomocytes en culture

a₁. Influence de la présence de prostomiums entiers sur les synthèses de lipides neutres

. Méthodologie .

45 N. diversicolor dont les diamètres ovocytaires s'étagent de 103 à 130 μm ont fourni les coelomocytes. Ces derniers, après avoir été séparés du liquide coelomique et des ovocytes sont remis en suspension et répartis en trois lots équivalents. Ils sont ensuite incubés dans le milieu de culture en présence de ^3H -glycérol (3 $\mu\text{Ci/ml}$ de milieu) pendant 9 heures. Les séries expérimentales sont les suivantes :

- a : coelomocytes seuls ;
- b : coelomocytes + deux cerveaux ;
- c : coelomocytes + cinq cerveaux.

Les cerveaux sont prélevés sur des animaux d'un diamètre ovocyttaire inférieur à 80 μm , donc biologiquement très actifs.

Remarques : Pour enregistrer les synthèses en période de "stabilité hormonale", le ^3H -glycérol n'est ajouté qu'après 5 heures de culture.

Pour éliminer dans les comptages le risque d'intégration du précurseur non incorporé, les monoglycérides migrant dans une zone proche du dépôt n'ont pas été pris en considération dans cette série expérimentale.

Résultats : Ils sont présentés sur la figure 14. Une augmentation des synthèses des lipides neutres est observée en fonction du nombre de cerveaux ajoutés au milieu de culture. La différence est surtout sensible entre les cultures sans cerveaux et celles en contenant deux ; l'accroissement des synthèses est ensuite peu important entre 2 et 5 cerveaux. L'examen des différentes classes montre que ce sont les TG dont la synthèse est particulièrement amplifiée par l'action des sécrétions cérébrales.

a₂. Influence des sécrétions cérébrales sur la libération des lipides neutres par les coelomocytes

Précédemment, nous avons mis en évidence une influence des sécrétions cérébrales sur la synthèse des lipides neutres par les cellules coelomiques. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'action éventuelle de l'hormone sur les modalités de libération dans le milieu de culture des lipides synthétisés.

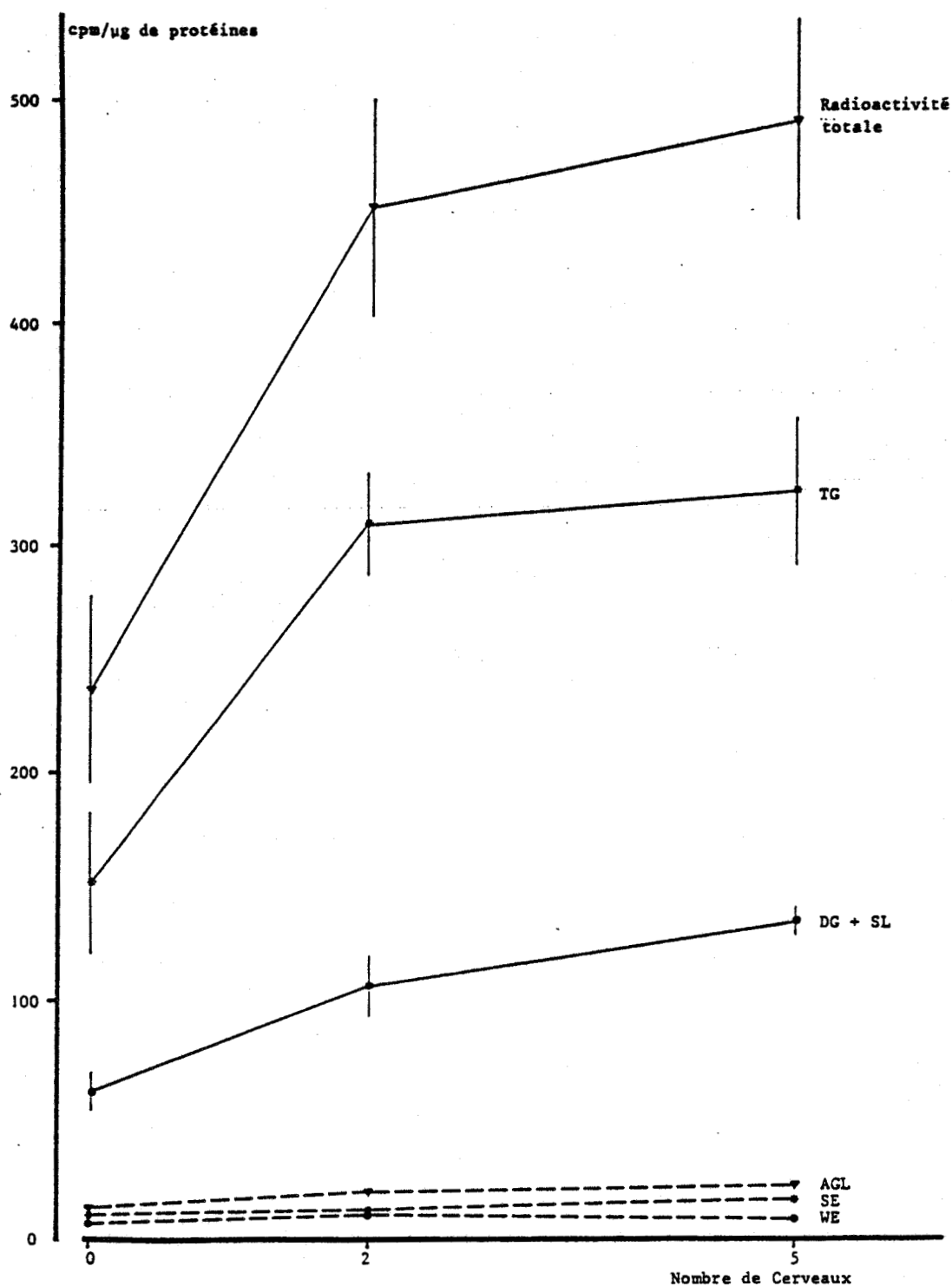


Figure 14 - Influence du nombre de cerveaux ajoutés au milieu de culture sur les synthèses des lipides neutres par les coelomocytes de *N. diversicolor* (diamètre ovocytaire : 103 à 130 μm) après 9h d'incorporation de ^3H -glycérol. Résultats exprimés en cpm/ μg de protéines coelomocytaires. Valeurs moyennes de 3 échantillons $\pm$ SD

Méthodologie : Dans cette expérience, les sécrétions cérébrales sont fournies par des cerveaux de Nereis virens. Les études réalisées dans le laboratoire ont montré que ceux-ci sont quatre à cinq fois plus actifs que ceux de N. diversicolor dans le test de l'inhibition de la spermatogenèse. La technique de mise en culture des cerveaux est relatée dans le chapitre Matériel et méthodes.

Incubation des coelomocytes : Les cellules proviennent de N. diversicolor d'un diamètre ovocytaire de 130 μm . A partir d'un "pool", les coelomocytes sont répartis en différents lots cultivés dans des conditions identiques. Les paramètres sont les suivants :

- quantité de milieu de culture : 1,5 ml ;
- précurseur : ^3H -glycérol à raison de 25 $\mu\text{Ci/ml}$;
- temps d'incubation : 48 heures.

Les cellules après culture sont lavées afin d'éliminer le précurseur non incorporé. A la solution de lavage (eau de mer tamponnée) est ajouté du glycérol froid (10 mM). Les coelomocytes sont ensuite placés dans un milieu de culture froid dans lequel ils seront maintenus pendant 20 heures. Les différents milieux sont soumis à des quantités de sécrétions cérébrales (SC) variées.

- 1° lot : coelomocytes
- 2° lot : coelomocytes + 50 μl de SC
- 3° lot : coelomocytes + 100 μl de SC
- 4° lot : coelomocytes + 200 μl de SC

Les différents milieux sont ensuite récupérés pour procéder à l'extraction des lipides libérés par les coelomocytes.

Résultats

La figure 15 montre qu'après 20 heures de culture, les coelomocytes ont libéré des lipides radioactifs dans le milieu ; ceux-ci ne montrent aucune différence après addition de 50 μl de SC par rapport aux témoins. L'augmentation du taux de lipides libérés devient significativement importante après l'addition d'une quantité de 100 à 200 μl de SC. A noter que cet accroissement caractérise essentiellement les TG ; les variations des DG et SL-AGL restant très faibles.

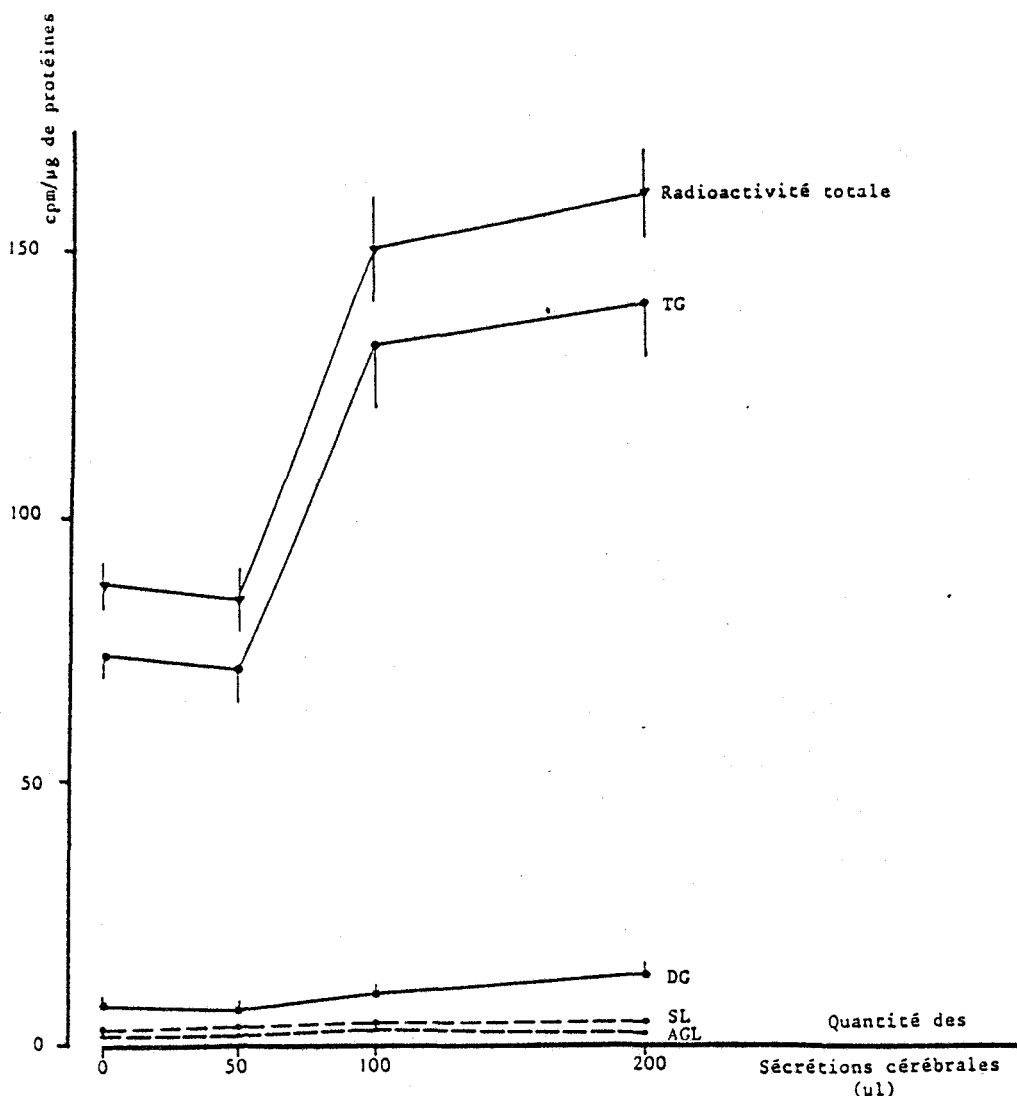


Figure 15 - Influence de la quantité des sécrétions cérébrales sur la libération des lipides neutres par les coelomocytes de *N. diversicolor* (diamètre ovocytaire=130 μm) en culture. Après 2 jours de leur incubation en culture en présence de ^3H - glycérol, les coelomocytes sont alors extraits et placés pendant 20h dans un milieu de culture froid. Les lipides radioactifs synthétisés par les coelomocytes puis relâchés dans le milieu sont comptés. Résultats exprimés en cpm/μg de protéines coelomocytaires. Valeurs moyennes à partir de 3 échantillons $\pm$ SD

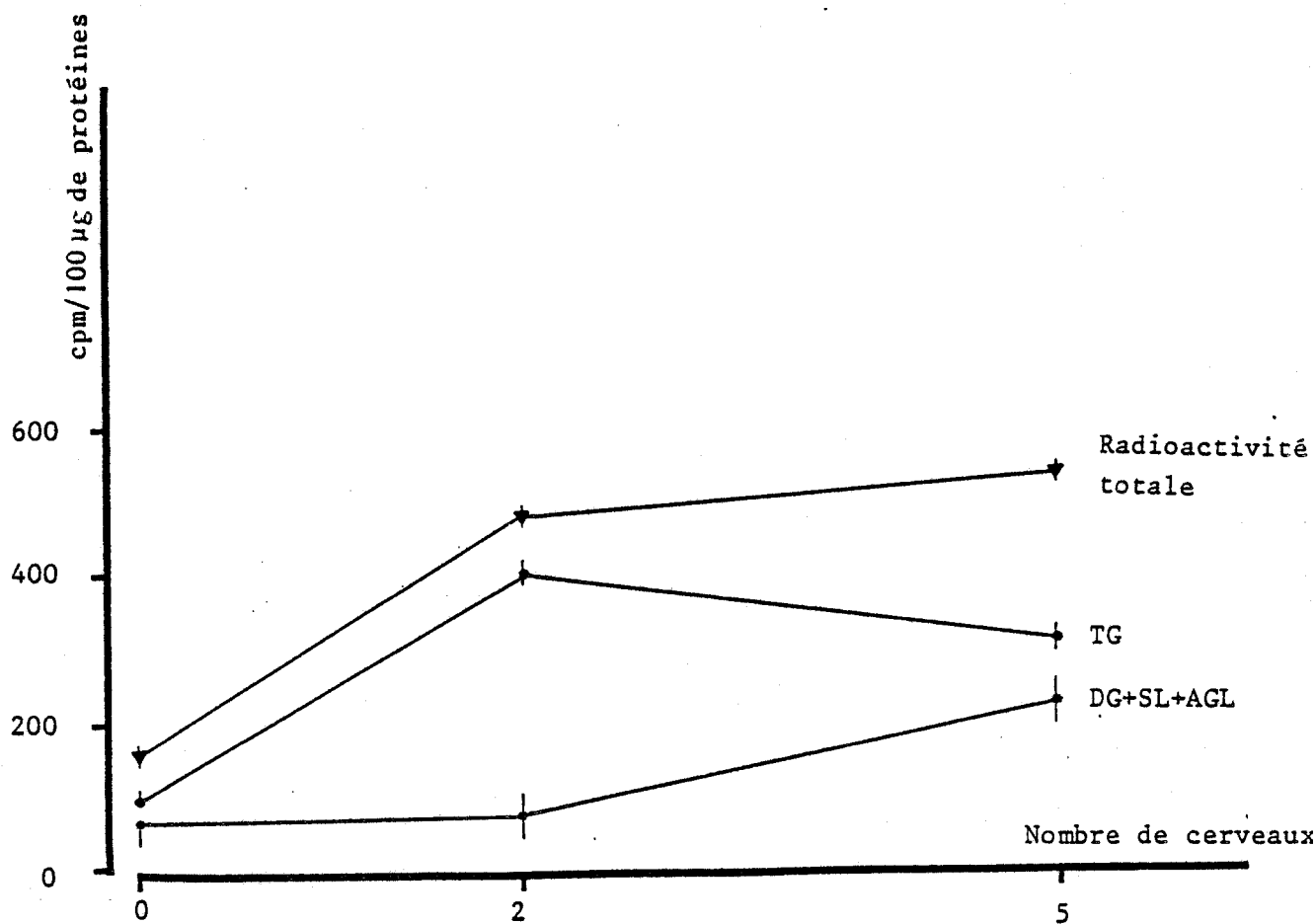


Figure 16 - Influence du nombre de cerveaux ajoutés au milieu de culture sur les synthèses de LN par les ovocytes (130 μ m) de *N. diversicolor* après 9 h d'incorporation de ^3H -glycérol. Résultats exprimés en cpm/100 μ g de protéines ovocytaires à partir de 3 échantillons. Valeurs moyennes $\pm$ SD.

b - Ovocytes en culture

b₁. Influence de l'addition de prostomiums sur les synthèses de lipides neutres

Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour les coelomocytes en culture en présence de prostomiums entiers. Les ovocytes utilisés dans cette expérience ont un diamètre de 130 μm . le temps d'incubation est de 9 heures à 14°C.

Résultats

L'examen de la figure 16 montre un accroissement en fonction du nombre de cerveaux en ce qui concerne les synthèses de lipides neutres par les ovocytes. Comme pour les coelomocytes, la différence est surtout sensible entre les cultures anhormonales et celles contenant 2 cerveaux. Dans ces conditions, il est à noter une évolution dissemblable entre les TG et le groupe DG, SL et AGL. Lors de l'addition de 5 cerveaux, on assiste à une baisse des synthèses de TG. Il est possible qu'un taux trop important d'hormone cérébrale perturbe le métabolisme de cette classe de lipides neutres.

b₂. Influence des sécrétions cérébrales sur les synthèses de lipides neutres

Méthodologie : Les prostomiums mis en culture proviennent de jeunes N. diversicolor (diamètre ovocytaire < 77 μm). Le temps de leur incubation est de 3 jours. Les sécrétions cérébrales obtenues sont ensuite ajoutées à des milieux d'incubation d'ovocytes à différentes quantités. Ces ovocytes dont le diamètre est de 130 μm proviennent d'un même "pool" résultant du ponctionnement de 30 vers. Les différents lots d'ovocytes réalisés sont :

- 1° lot : ovocytes seuls
- 2° lot : ovocytes + 50 μl de SC
- 3° lot : ovocytes + 100 μl de SC
- 4° lot : ovocytes + 200 μl de SC
- 5° lot : ovocytes + 400 μl de SC

Dans chaque boîte de culture contenant 1,5 ml de milieu sont ajoutés 50 μCi de ^3H -glycérol. Le temps d'incorporation est de 10 heures.

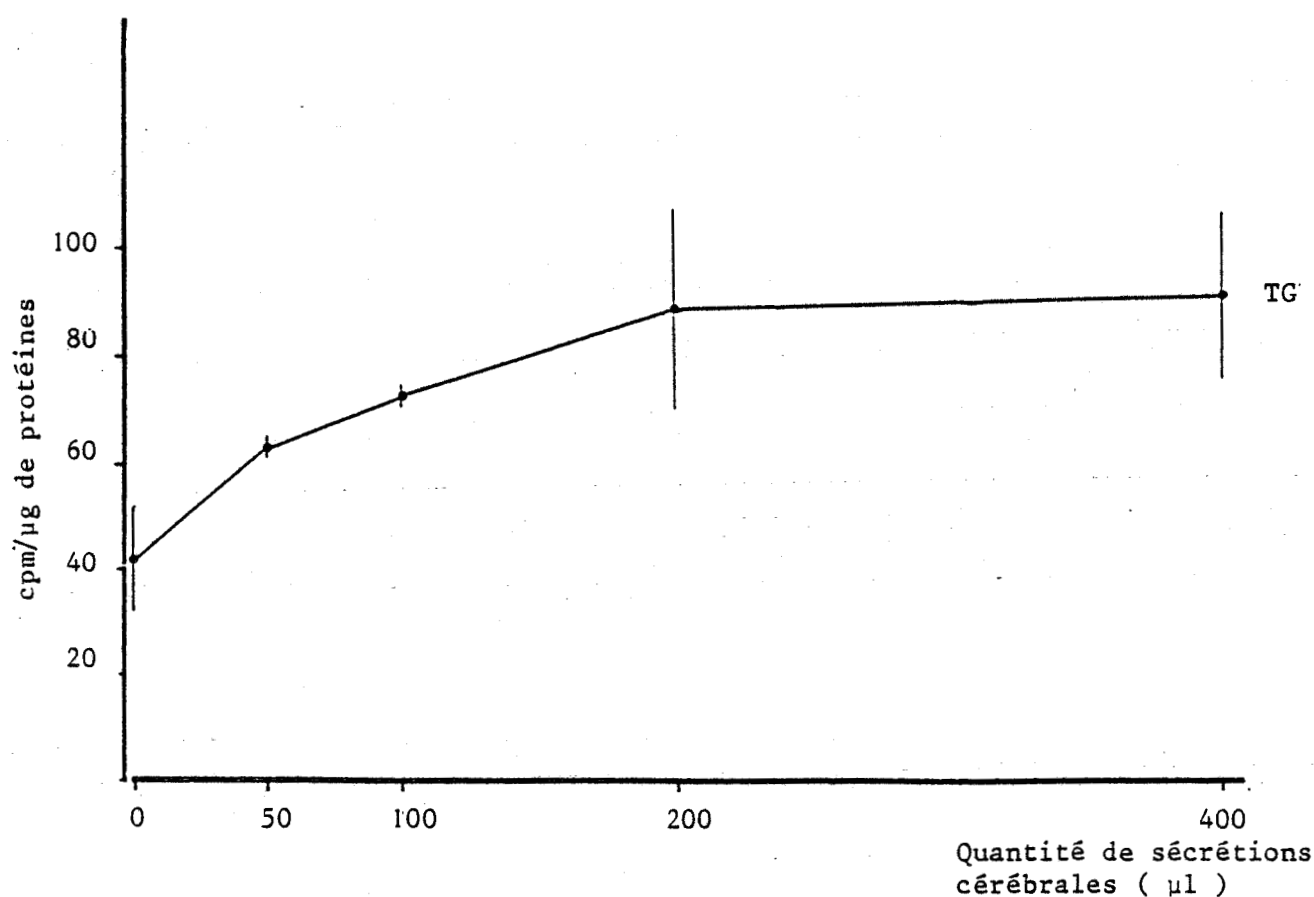


Figure 17 - Influence des quantités des sécrétions cérébrales sur la synthèse des triglycérides des ovocytes (130 μ m de diamètre) de *Nereis diversicolor* en culture. Incorporation de 3 H-glycérol pendant 10 heures. Résultats exprimés en cpm/ μ g de protéines ovocytaires à partir de 3 échantillons.

Valeurs moyennes $\pm$ SD



Résultats

L'examen de la figure 17 montre que la radioactivité dans les TG augmente en fonction de la quantité de SC ajoutée dans le milieu d'incubation. L'accroissement est progressif jusqu'à une dose de 200 μ l. La courbe s'infléchit ensuite en un plateau pour les doses supérieures. Les autres classes lipidiques présentent des fluctuations plus difficilement interprétables.

I.4. DISCUSSION

A Coelomocytes

1. Synthèse et libération des lipides neutres par les coelomocytes

L'étude in vitro confirme l'existence d'une synthèse de lipides neutres par les coelomocytes de N. diversicolor et de P. cultrifera. Toutefois quelques différences sont enregistrées par rapport aux données de l'étude in vivo. C'est ainsi que chez N. diversicolor les synthèses des stérols estérifiés apparaissent beaucoup plus faibles in vitro qu'in vivo. Ceci pourrait résulter du métabolisme in vitro. On peut également envisager l'hypothèse que les stérols estérifiés proviendraient d'un compartiment différent de celui des coelomocytes : téguments, tube digestif...

L'étude in vitro a également permis de montrer que les LN synthétisés par les coelomocytes sont libérés dans le milieu de culture sous forme de triglycérides. Ces résultats confirment les observations réalisées par Fontaine (1982) chez P. cultrifera, selon une méthodologie différente. Cet auteur procède à une injection dans des animaux "froids", de coelomocytes issus d'animaux ayant reçu une injection de ^{14}C -glycérol. Après 24 heures, les lipides neutres radioactifs relâchés dans le liquide coelomique des vers receveurs sont représentés par les triglycérides.

Chez les insectes par contre, dès 1967 Mayer et Candy montrent que ce sont les diglycérides qui représentent la principale forme de transfert. Chez Locusta migratoria par exemple Wheeler (1984) constate que les lipides sont transportés du corps gras jusqu'aux muscles du vol, via l'hémolymphe, essentiellement sous forme de DG-lipoprotéines. Cette association avec les protéines étant rendue obligatoire par la faible solubilité des DG qui, insolubles dans l'eau, ont besoin d'un transporteur pour être véhiculés dans l'hémolymphe (Wheeler et Goldsworthy, 1985). Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres espèces par Chino et al. (1969) et Thomas

(1984). Dans quelques cas la libération des lipides peut faire intervenir les TG. In vitro, Wlodawer et Lagwinska (1967) ont montré que le corps gras de la wax moth libère dans l'hémolymphe des AGL, qui pour une partie sont resynthétisés en TG et pour une autre sont transportés en liaison avec des protéines.

2. Régulation endocrine de la libération des lipides neutres

Nous avons montré que l'administration des sécrétions cérébrales (SC) dans le milieu d'incubation des coelomocytes in vitro stimule la libération de lipides neutres et particulièrement les TG. Le seuil de stimulation nécessite une dose assez élevée de sécrétions cérébrales (50 μ l de N. virens en culture) alors que 25 μ m de la même solution suffisent à bloquer la spermatogenèse (Bulet, non publié). Le taux de lipides libérés s'élève ensuite en fonction de la dose de SC. Ceci nous conduit à penser que les coelomocytes pourraient être régulés par l'hormone cérébrale en ce qui concerne le métabolisme des lipides neutres. Ces résultats s'opposent dans une certaine mesure à ceux obtenus par Baert (non publiés) en ce qui concerne la libération de la vitellogénine par les coelomocytes. En effet, le métabolisme ne varie pas d'une façon sensible lors de l'addition de sécrétions cérébrales ou au cours d'une culture prolongée en conditions an hormonales. Il importe toutefois de rappeler que les recherches relatives à la vitellogénine ont été effectuées sur P. cultrifera celles sur les lipides neutres sur N. diversicolor. On peut également penser que les 2 voies métaboliques pourraient être différentes. La vitellogénine est incorporée uniquement et de façon spécifique par les ovocytes dans un processus de très longue durée. Par contre, on peut penser que seule une faible partie de lipides neutres est capturée par les ovocytes. Comme chez les insectes, il est vraisemblable que l'activité musculaire fait appel à ce type de réserve. A la nécessité d'une mobilisation rapide pourrait correspondre la nécessité d'une régulation hormonale s'exerçant à court terme. Chez les insectes, au moins deux types de substances hormonales sont impliqués dans la mobilisation lipidique et le transport des lipides. L'octopamine induit à court terme la "release" des lipides du corps gras in vitro (Orchard et al., 1982 ; Van Heusden et al., 1984). L'octopamine semble d'autre part agir comme neurotransmetteur permettant la libération des hormones adipokinétiques. Le rôle de ces dernières est maintenant bien connu. Goldsworthy (1983), Wheeler et Goldsworthy (1985) ont notamment démontré chez la blatte que ces hormones agissent sur le corps gras et provoquent ainsi une augmentation de la libération des DG. Ces derniers sont ensuite transportés vers les muscles du vol où ils sont

utilisés pour produire de l'énergie. A côté de ces processus de régulation à court terme, un autre type d'hormone régulatrice a aussi été mis en évidence au cours de l'ovogenèse, ce sont en effet les hormones des corps allates qui sont impliquées dans la mobilisation des lipides du corps gras à la fois chez Phormia regina (Orr, 1964) et chez Leucophaea maderae (Gilbert, 1967). Chez les Néréidiens, la présence d'octopamine a été pressentie (Dhainaut-Courtois et Biserte, inédit) mais rien n'est connu sur le rôle physiologique de ce neurotransmetteur chez les Annélides. D'autre part les sécrétions cérébrales constituent un mélange complexe de divers substances (neuropeptides, neurotransmetteurs). Nos résultats pour l'instant montrent que les lipides des coelomocytes sont régulés par des commandes d'origine cérébrale mais la détermination précise de la/des substances impliquées reste à définir.

B - Ovocytes

a - Synthèse des LN

Dans ce travail, ce processus a été plus particulièrement étudié chez les ovocytes de N. diversicolor. Il apparaît que les TG constituent la classe de lipides neutres préférentiellement synthétisés après incorporation de ^3H -glycérol. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus chez P. cultrifera par Belhamra (1985), Dhainaut et Belhamra (1986). Dans cette espèce, les ovocytes isolés en culture synthétisent un taux important de TG après incorporation de glycérol et d'acide oléique. Par contre, avec l'acide butyrique, les MG constituent la classe des lipides neutres la plus activement synthétisée. L'étude en autoradiographie à haute résolution a montré qu'après incorporation de glycérol radioactif, le marquage est localisé surtout au niveau des lobules lipidiques disséminés dans l'ooplasme.

b - Contrôle endocrine

Chez N. diversicolor les ovocytes provenant d'animaux ayant subi une décérébration présentent un taux de synthèse de LN plus faible que chez ceux issus d'animaux témoins. Les différences sont significatives et semblent être plus accentuées au niveau des TG. Chez P. cultrifera toutefois, nous n'avons remarqué qu'une légère baisse de synthèse chez les opérés par rapport aux témoins mais dont les différences apparaissent peu marquées. Chez cette même espèce, Fontaine (1982) mentionne que les conditions an hormonales semblent n'avoir que peu d'effet sur le stockage des réserves ovocytaires.

Ces différences entre ces 2 espèces pourraient s'expliquer par l'évolution différente des ovocytes en conditions an hormonales (Dhainaut, 1984b). Après décérébration, les ovocytes de N. diversicolor présentent tout d'abord des modifications nucléaires, puis des anomalies apparaissent dans le cytoplasme (formation de lamelles annelées), enfin ces ovocytes dégèrent. Par contre les ovocytes de P. cultrifera ayant atteint un diamètre de 130 μm subissent une croissance accélérée et ne présentent que des anomalies mineures par rapport à l'ovogenèse naturelle. Dans cette espèce, la croissance des ovocytes apparaîtrait moins sensible au contrôle hormonal.

Chez les invertébrés, les renseignements concernant la régulation du métabolisme lipidique sont encore peu nombreux. Chez le Crabe Hemigrapsus nudus Neiland et Scheer (1953) ont constaté une diminution du taux de lipides chez les animaux épédonculés par rapport aux témoins, les deux lots d'animaux étant gardés au jeûne. O'Connor et Gilbert (1969) chez Orconectes viridis et chez Gecarcinus lateralis notent au contraire, une augmentation de la synthèse des lipides durant la première période induite par l'épédonculation. Il est intéressant de rappeler que chez les Crustacés, les sécrétions des pédoncules oculaires, qui semblent avoir un rôle stimulateur dans les synthèses des lipides, exercent, comme chez les Néréidiens, un rôle inhibiteur de l'ovogenèse.

Chez les Insectes, il a été démontré qu'une régulation endocrine s'exerce au niveau du métabolisme des lipides ovocytaires. Chez la blatte Eublaberus posticus, Sroka et Barth (1975) constatent que les diglycérides constituent 30 % du total des lipides après la métamorphose. Il survient ensuite une période de synthèse rapide durant laquelle les triglycérides constituent 70 % des lipides totaux de l'ovaire. Ces variations suggèrent que la composition des lipides est contrôlée physiologiquement par un processus hormonal faisant intervenir l'hormone juvénile. L'ablation des corps allates (Sroka et Barth, 1976) provoque en effet une réduction des synthèses lipidiques des cellules du corps gras, notamment en ce qui concerne les diglycérides. Par contre, au niveau des ovaires, les DG s'accumulent alors de façon anormale.

DEUXIEME PARTIE

METABOLISME DES PHOSPHOLIPIDES

METABOLISME DES PHOSPHOLIPIDES

Le second chapitre porte sur le métabolisme des phospholipides (PL). Ses objectifs découlent de questions posées à la suite d'observations effectuées en autoradiographie et qui révélaient une importante radioactivité au niveau des coelomocytes après incorporation de précurseurs de la synthèse des PL.

Il convenait donc dans un premier temps de comparer les capacités de synthèse respectives des coelomocytes et des ovocytes. L'étude in vitro permettait notamment d'analyser ces synthèses lorsque chaque type cellulaire se trouve isolé.

Les synthèses cellulaires de PL peuvent être soit liées à la prolifération des systèmes membranaires, soit être impliquées dans les processus sécrétoires de composés associés à des PL.

Des expériences ont donc porté sur les possibilités de libération de matériel par des coelomocytes isolés in vitro. La réponse ayant été positive, les investigations se sont alors orientées sur l'analyse et la signification physiologique des complexes phospholipidiques synthétisés et libérés par les coelomocytes.

Le dernier objectif a été d'établir une comparaison avec les résultats obtenus sur les lipides neutres, à savoir l'existence éventuelle d'un contrôle endocrine sur la synthèse des PL.

II-A. OVOGENESE NATURELLE

II-A₁ COELOMOCYTES

a - Incorporation de la choline ³H in vivo (fig. 18, Tableau 11)

Des Perinereis cultrifera (diamètre ovocytaire = environ 190 µm) sont utilisées. Deux temps d'incorporation sont réalisés (2 jours et 6 jours). Le précurseur : choline ³H (85 Ci/mM) est ajouté dans la cavité coelomique de l'animal à raison de 40 µCi par ver ; pour les incorporations de 6 jours, les vers reçoivent une deuxième injection de choline-³H (40 µCi) deux jours après la première. Les vers sont ensuite sacrifiés pour récupérer les cellules coelomiques. Pour la méthodologie de l'extraction et la séparation des PL voir la partie matériel et méthodes.

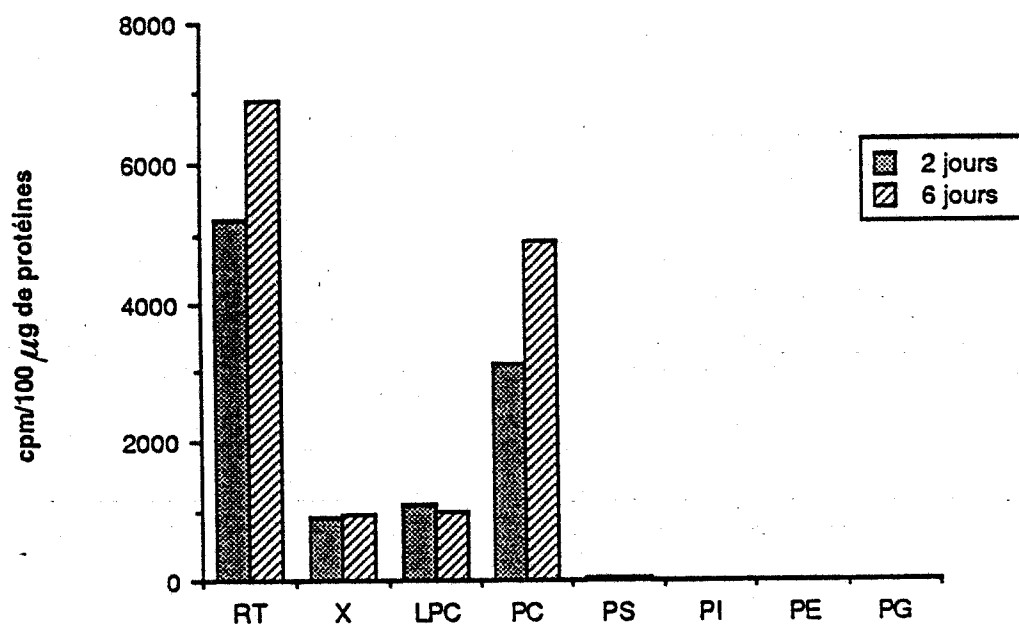


Figure 18 - Radioactivité dans les phospholipides des coelomocytes de *P. cultrifera* (diamètre ovocytaire = 190 µm) après 2 jours et 6 jours d'incorporation de ^3H -choline *in vivo*. RT : radioactivité totale dans les phospholipides.



Résultats

Tableau 11 - Evolution du pourcentage de distribution de la radioactivité dans les PL synthétisés par incorporation de la choline- ^3H dans les coelomocytes de *P. cultrifera* *in vivo* (2 jours et 6 jours). LPC : lysophosphatidylcholine ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PG : phosphatidylglycérol ; PI : phosphatidylinositol ; PS : phosphatidylserine ; X : non connu.

Pourcentage de distribution de la radioactivité

Classes	2 jours	6 jours
X	17,4	13,4
LPC	21,3	14,4
PC	60	71,2
PS	0,6	0,5
PI	0,3	0,2
PE	0,1	0,1
PG	0,1	0,1
Total	99,9	99,9

Après incorporation de la choline ^3H , les coelomocytes orientent leur métabolisme lipidique vers la synthèse de la PC, la LPC et la classe X. Cette radioactivité dans les PL augmente en fonction du temps d'incorporation (fig. 18). On note cependant une certaine stabilité dans les principales classes de PL à l'exception de la PC dont le pourcentage augmente de façon sensible (Tableau 11).

b - Incorporation in vitro

Cette expérience a eu pour but d'analyser les synthèses de coelomocytes isolés. Deux manipulations ont été effectuées. Dans la première, les coelomocytes sont isolés de façon à éviter les interrelations avec les autres composants coelomiques et notamment les ovocytes. Dans la deuxième, des ovocytes ont été ajoutés à la culture de coelomocytes.

b₁. Synthèse des phospholipides par les coelomocytes en culture (Tableau 12)

Des P. cultrifera d'un diamètre ovocytaire d'environ 180 μ m ont servi pour cette expérience. De la choline- 3 H est ajoutée dans le milieu de culture (12 μ Ci/ml). Le temps d'incubation est de 48 h. Trois lots de coelomocytes ont été réalisés.

Tableau 12 - Comparaison des synthèses de PL réalisées par les coelomocytes de P. cultrifera isolés (A) ou en présence d'ovocytes (B) après culture pendant 48 h en présence de choline- 3 H.

Résultats : a = cpm/100 μ g de protéines

b = % de distribution de la radioactivité.

Classes	A		B	
	a	b	a	b
X	8 377 $\pm$ 1 915	6,9 $\pm$ 1,6	3 538 $\pm$ 1 364	8 $\pm$ 3
LPC	16 996 $\pm$ 3 394	14,1 $\pm$ 2,8	5 952 $\pm$ 2 596	13 $\pm$ 6
PC	90 950 $\pm$ 11 050	75,5 $\pm$ 9,2	34 118 $\pm$ 5 815	77 $\pm$ 13
PS	2 206 $\pm$ 839	1,8 $\pm$ 0,7	312 $\pm$ 265	0,7 $\pm$ 0,6
PI	1 078 $\pm$ 608	0,9 $\pm$ 0,5	117 $\pm$ 77	0,3 $\pm$ 0,2
PE	366 $\pm$ 249	0,3 $\pm$ 0,2	92 $\pm$ 70	0,2 $\pm$ 0,1
PG	151 $\pm$ 4	0,1	40 $\pm$ 14	0,1
AG	84 $\pm$ 7	0,07	30 $\pm$ 2	0,07
LN	174 $\pm$ 22	0,1	85 $\pm$ 8	0,2
Total	120 382 $\pm$ 18 088	99,7	44 284 $\pm$ 8 844	99,5

Dans ces conditions, la classe "PC" est la plus activement synthétisée par les coelomocytes (75 % de la radioactivité). Le reste des lipides synthétisés apparaît surtout sous forme de LPC et d'une classe restée non identifiée (X).

Les coelomocytes maintenus en culture sont donc capables de réaliser une autosynthèse des PL.

b₂. Association coelomocytes et ovocytes en culture (Tableau 12)

Dans cette expérience, parallèle à la précédente, nous avons voulu analyser une modification éventuelle provoquée par la présence d'ovocytes sur les synthèses des PL par les coelomocytes.

Les résultats sont présentés dans le tableau 12. Le pourcentage de distribution de la radioactivité ne révèle pas de modifications sensibles par rapport à l'expérience précédente. Le point notable est la très nette diminution du taux de PL radioactifs dans les coelomocytes (120382 et 40284 cpm/100 µg de protéines caractérisent respectivement la radioactivité des lipides synthétisés par les coelomocytes seuls ou en présence d'ovocytes). De cette différence, deux hypothèses peuvent être formulées :

- a - Baisse des synthèses des coelomocytes par une compétition avec les ovocytes dans l'absorption du précurseur.
- b - Les phospholipides synthétisés par les coelomocytes sont transférés en direction des ovocytes.

Pour confirmer cette deuxième hypothèse, des manipulations sur la libération des PL par les coelomocytes ont été effectuées.

b₃. Libération des PL par les coelomocytes

b_{3.1}. Choline-³H

L'importance et la nature des PL relâchés par les coelomocytes dans le milieu de culture ont été recherchées par analyse de celui-ci après élimination des cellules.

Les coelomocytes en culture proviennent des P. cultrifera au stade 180 µm de diamètre ovocytaire environ.

Tableau 13 - Nature des PL libérés par les coelomocytes dans le milieu de culture après 48 heures d'incorporation avec "³H-choline". Résultats exprimés en cpm/100 µg de protéines coelomocytaires, et en pourcentage de la radioactivité. Moyennes ± SD à partir de 3 expériences.

Classes	cpm/100 µg de protéines	% de distribution de la radioactivité
X	2 394 ± 434	14,2 ± 2,6
LPC	2 921 ± 781	17,3 ± 4,6
PC	10 991 ± 986	65,1 ± 5,8
PS	68 ± 23	0,4 ± 0,1
PI	42 ± 22	0,2 ± 0,1
PE	13 ± 7	0,1 ± 0,04
PG	130 ± 83	0,8 ± 0,5
Total	16 558 ± 2 333	98,1

La plus grande partie de la radioactivité dans les PL du milieu à partir de la choline- ^3H est répartie entre les trois classes rangées dans l'ordre croissant d'incorporation (X, LPC et PC). On note que la quantité de radioactivité liée aux PL libérés dans le milieu représente par μg de protéines environ le 1/7 de celle restant associée aux coelomocytes (ce rapport dérive de la quantité de lipides synthétisés et restant dans les coelomocytes (120 382 cpm/100 mg de protéines) sur celle libérée dans le milieu de culture (16 558 cpm/100 μg de protéines)).

b_{3.2}. $^{32}\text{-P}$ Phosphore

Une manipulation parallèle à la précédente a été réalisée en utilisant du $^{32}\text{-P}$ comme précurseur. Les coelomocytes de P. cultrifera de 207 μm de diamètre ovocytaire environ, sont incubés pendant 24 heures en présence de $^{32}\text{-P}$ Phosphore in vitro.

L'analyse des lipides radioactifs du milieu de culture est faite après élimination des cellules.

Résultats

Tableau 14 - Radioactivité des PL dans le milieu de culture des coelomocytes de P. cultrifera après 24 heures d'incorporation du $^{32}\text{phosphore}$

Classes	Radioactivité de l'échantillon analysé (cpm)	% de répartition de la radioactivité
X	1 647	70
LPC	136	6
PC	345	15
PS	181	8
PI	22	1
PE	9	-
PG	-	-

Au niveau du milieu de culture, nous remarquons la présence de PL radioactifs. Ceux-ci sont principalement sous forme de classe "X" suivie de PC.

En conclusion, à partir des deux précurseurs utilisés, les coelomocytes apparaissent capables de synthétiser des PL. Une partie de ceux-ci est libérée dans le milieu d'incubation. La nature des lipides marqués ainsi libérés dépend du précurseur utilisé. Ainsi la PC et la classe "X" sont importantes dans le milieu de culture en utilisant respectivement la ^3H -choline et le 32 -Phosphore.

b₄. Association des PL libérés à des protéines.

Les PL synthétisés peuvent être libres ou associés à des protéines. Pour préciser ce point, le milieu de culture des coelomocytes est récupéré. Les protéines subissent alors une précipitation au T.C.A. (voir Matériel et Méthodes). Le précipité qui en résulte est utilisé pour l'extraction des lipides. Lors de l'extraction de ces derniers, le précipité protéique est additionné d'un entraîneur (homogénat de coelomocytes froids) pour éviter les pertes de lipides marqués au cours de leur extraction.

Tableau 15 - PL associés dans le milieu de culture des coelomocytes ayant incorporé la ^3H -choline (48 heures).
Résultats : en cpm/100 μg de protéines coelomocytaires et en pourcentage de distribution de la radioactivité dans les classes de PL.

Classes	cpm/100 μg de protéines	% de distribution de la radioactivité
X	1 672	16
LPC	1 319	12,6
PC	7 216	69,2
PS	78	0,7
PI	53	0,5
PE	47	0,4
PG	47	0,4
Total	10 432	99,8

Les résultats du tableau 15 montrent qu'au moins une partie des PL libérés par les coelomocytes sont associés à des protéines. PC, LPC et la classe "X" sont proportionnellement les classes les plus importantes.

Par rapport aux PL totaux libérés par les coelomocytes (tableau 13 du paragraphe b₃), il peut être estimé qu'environ 60 % des PL sont associés à des protéines. Il est important de remarquer que la répartition des classes de lipides n'est pas accompagnée de différences significatives entre la forme liée et la totalité des PL dans le milieu de culture des coelomocytes.

b₅. Identification des protéines associées aux PL.

Cette manipulation a été faite en collaboration avec J.-L. Baert.

b_{5.1}. Incorporation de ³H-choline

Des coelomocytes de P. cultrifera (diamètre ovocytaire $\approx 160 \mu\text{m}$) ont été mis en culture pendant 3 jours. Les coelomocytes sont répartis en deux lots. L'un d'eux est incubé en présence de ³H-leucine (50 $\mu\text{Ci/ml}$), l'autre de ³H-choline (40 $\mu\text{Ci/ml}$). Les deux milieux de culture sont ensuite analysés par électrophorèse en gel polyacrylamide en milieu non dénaturant. La radioactivité est détectée par fluorographie après 11 jours d'exposition.

La figure 19a montre qu'après incorporation de leucine, deux bandes protéiques de poids moléculaires d'environ 530 et 320 kDa sont marquées. Ces deux protéines correspondent aux deux formes de vitellogénine VG₁ (530 kDa) et VG₂ (320 kDa) (Baert, 1986). Dans la série d'incorporation de la choline, on observe également la présence de deux bandes radioactives comigrantes avec celles marquées à la leucine.

b_{5.2}. ³²-Phosphore

Des coelomocytes de P. cultrifera au stade 190-200 μm de diamètre ovocytaire sont incubés pendant 2 jours en présence de ³²-P in vitro. Le milieu de culture des coelomocytes est alors séparé des cellules puis analysé par électrophorèse en gel polyacrylamide en milieu non dénaturant. La radioactivité est détectée par fluorographie. L'analyse des résultats (fig. 19c) montre le même profil fluorographique que lors de l'incorporation de la choline-³H (fig. 19b). Les deux bandes protéiques radioactives migrent au niveau VG₁ et VG₂.

Conclusion : il résulte de ces résultats que, pour une partie au moins, les PL libérés par les coelomocytes dans le milieu de culture sont associés aux molécules de vitellogénine.

Figure 19 - Fluorogrammes des électrophorèses en gel polyacrylamide en milieu non dénaturant des protéines d'un milieu de culture de coelomocytes de *P. cultrifera* incubés pendant 3 jours en présence de :

a) ^3H -leucine.

b) ^3H -choline.

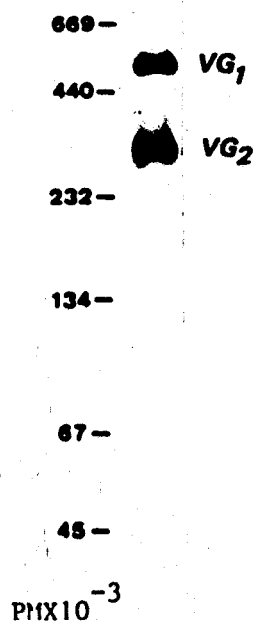
Les coelomocytes proviennent d'animaux submaturs (160 μm).

c) ^{32}P . Les coelomocytes sont issus d'animaux au stade 190-200 μm de diamètre ovocytaire.

20 μl du milieu sont analysés par électrophorèse dans un gradient 5-25 % d'acrylamide. Exposition de 11 jours pour la fluorographie.

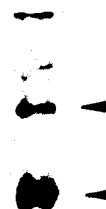
³H-LEUCINE

a



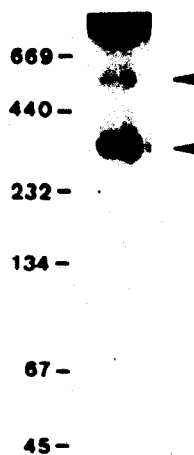
³H-CHOLINE

b



³²P

c



PMX10⁻³

II-A₂. OVOCYTES

Différents précurseurs ont été utilisés pour l'étude de la synthèse des PL par les ovocytes.

a - ³²-Phosphore

Des ovocytes d'environ 130 et 207 µm de diamètre, provenant de deux lots de P. cultrifera sont incubés pendant 24 heures en présence de ³²-p.

Tableau 16 - Comparaison des pourcentages des différentes classes de PL radioactives en fonction du stade ovocytaire après 24 heures d'incorporation avec du ³²p.

% de distribution de la radioactivité

Classes	130 µm	207 µm
X	41	10
LPC	6	10
PC	10	33
PS	4	5
PI	33	37
PE	3	4
PG	3	1
Total	100	100

Cette expérience révèle une différence marquée des classes de PL les plus activement synthétisés en fonction de l'âge de l'animal.

La classe "X" est la plus élaborée chez les vers jeunes tandis que ce sont la PC et la PI qui deviennent prédominantes chez les vers âgés.

b - ³H-choline

L'étude avec ce précurseur a porté à la fois sur l'incubation des ovocytes in vivo et in vitro.

b₁. In vivo (ovocytes isolés après incubation)

Pour la méthodologie et les conditions expérimentales, se référer à l'incorporation des coelomocytes in vivo en présence de la choline-³H (paragraphe II-A₁. a). Le diamètre des ovocytes est d'environ 190 µm.

Tableau 17 - Evolution de la radioactivité dans les PL à partir de l'incorporation de la choline-³H dans les ovocytes de P. cultrifera in vivo. Temps d'incorporation : 2 jours et 6 jours. Résultats exprimés en cpm/100 µg de protéines ovocytaires (a) et en pourcentage de répartition de la radioactivité dans les classes de PL.

Classes	2 jours		6 jours	
	a	b	a	b
X	53	26	28	13
LPC	38	19	89	42
PC	108	54	91	43
PS+PI+PE+PG				
Total	199	99	208	98

Dans les ovocytes, environ 99 % de la radioactivité issue de l'incorporation de choline-³H se trouve répartie entre les classes "X", LPC et PC. Ces lipides synthétisés augmentent avec le temps d'incorporation allant jusqu'à 6 jours. La radioactivité dans les lipides, qui à 2 jours d'incorporation est présentée principalement par les PC suivies de la classe "X", se trouve ensuite orientée vers les LPC et les PC. Le taux des PL est très faible par rapport aux coelomocytes (comme le montre la fig. 20).

b₂. In vitro

b_{2.1}. Ovocytes isolés en culture

Des ovocytes d'environ 180 µm de diamètre sont incubés pendant 48 heures avec la choline-³H (12 µCi/ml). Il s'agit d'une série expérimentale parallèle à celle des coelomocytes, précédemment exposée.

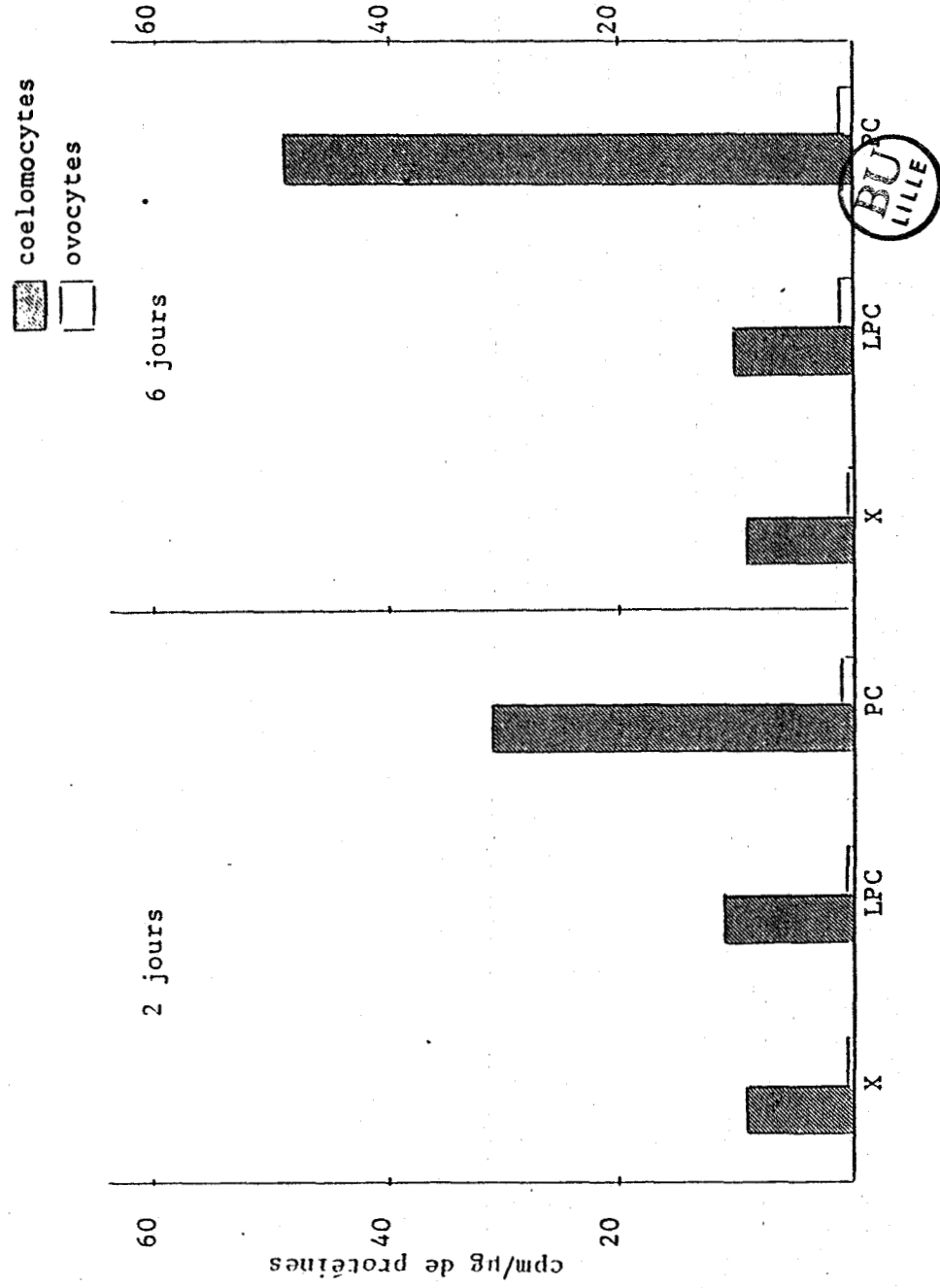


Figure 20 - Radioactivité dans les importantes classes de PL synthétisés dans les coelomocytes et dans les ovocytes. 2 jours et 6 jours d'incorporation de ^3H -choline *in vivo*.

Les résultats sont exprimés en cpm/μg de protéines respectivement dans les coelomocytes et dans les ovocytes.

Tableau 18 - Incorporation de choline- ^3H dans les phospholipides des ovocytes (environ 180 μm de diamètre) de P. cultrifera, en culture pendant 48 heures. Résultats donnés en cpm/100 μg de protéines et en pourcentage de distribution de la radioactivité.

Classes	cpm/100 μg de protéines	% de distribution de la radioactivité
X	206	6
LPC	737	21
PC	2353	67
PS	26	1
PI	9	
PE	92	3
PG	4	
AG	14	
LN	71	2
Total	3512	100

D'après ces résultats, les ovocytes sont capables de synthétiser des PL à partir de choline- ^3H in vitro. Cette synthèse consiste surtout en PC puis en LPC. Ces deux classes ensemble forment 88 % de la radioactivité des lipides. A remarquer que là aussi, le taux de PL synthétisés est faible par rapport à celui des coelomocytes isolés en culture (tableau 18) : 3512 cpm/100 μg de protéines pour les ovocytes contre 120382 cpm/100 μg de protéines pour les coelomocytes.

b_{2.2}. Absorption des lipides du milieu de culture (des coelomocytes) par les ovocytes.

Dans le but d'illustrer la contribution des coelomocytes dans l'ovogenèse lipidique, nous avons incubé des ovocytes dans un milieu de culture dans lequel des coelomocytes ont préalablement relâché leurs produits de synthèse.

b_{2.2.a}. Variation du milieu de culture en présence d'ovocytes

Des coelomocytes de P. cultrifera (diamètre ovocyttaire d'environ 160 μm) sont mis en culture pendant 3 jours en présence de choline- ^3H (40 $\mu\text{Ci/ml}$). Les cellules sont ensuite séparées du milieu qui servira pour l'incubation des ovocytes (116 à 130 μm de diamètre) pendant 2 jours. La teneur et la distribution des PL ont été analysées avant et après incubation des ovocytes.

Résultats : tableau 19 et figure 21.

Tableau 19 - Evolution de la distribution de radioactivité dans les lipides du milieu de culture des coelomocytes avant et après incubation des ovocytes.

Classes	Avant incubation des ovocytes	Après incubation des ovocytes
X	13,3	5,2
LPC	4,2	4,8
PC	77	27,8
PS	0,6	1,9
PI	1	2,1
PE	0,6	1,7
PG	1,3	10,4
AG	1,7	36,7
LN	0,4	9,3
Total	100,1	99,9

Dans le milieu de culture avant incubation des ovocytes, les classes PC et "X" constituent respectivement 77 % et 13 % environ de la radioactivité des lipides synthétisés (tableau 19). Après incubation des ovocytes dans le milieu, la radioactivité globale chute de presque 4 fois (fig. 21). La répartition des lipides marqués du milieu change aussi après incubation des ovocytes (tableau 19). On constate une forte diminution du pourcentage de PC et une augmentation sensible du taux d'acides gras, de PG et de LN.

b_{2.2.b}. Analyse biochimique des PL incorporés par les ovocytes

Les ovocytes ayant été incubés dans le "milieu de culture coelomocytes" ont été analysés (tableau 20). Leur radioactivité se répartit pour 95 % entre PC, LPC et "X". La classe de PC regroupe à elle seule 74 %. Cette dernière classe semble donc constituer la forme de l'accumulation principale des PL dans l'ovocyte à partir de choline-³H. Ceci expliquerait l'importante diminution de cette classe dans le milieu de culture en présence d'ovocytes.

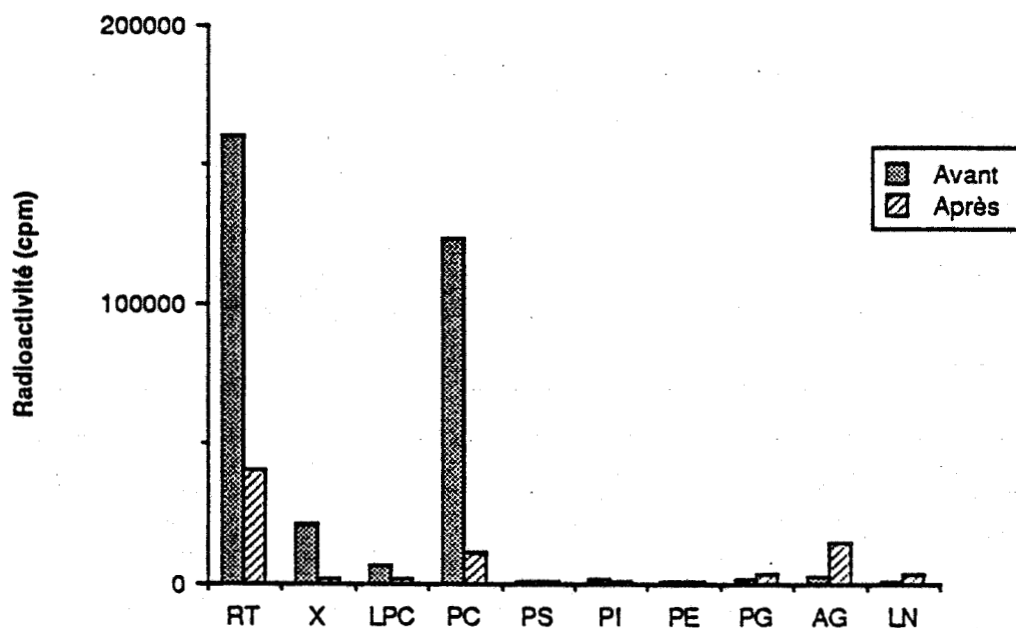


Figure 21 - Radioactivité dans les phospholipides synthétisés et relachés par les coelomocytes de *P. cultrifera in vitro*. Les cellules coelomiques sont alors extraites après 3 jours d'incorporation de choline (^3H) et le milieu de culture contenant les produits de sécrétion des coelomocytes a servi pour l'incubation des ovocytes pendant 2 jours. L'analyse des phospholipides dans le milieu est faite avant et après l'incubation des ovocytes. (Le nombre de cpm correspond à la valeur totale de la radioactivité du milieu de culture).

Tableau 20 Distribution de la radioactivité dans les différentes classes de PL des ovocytes incubés dans le "milieu de culture coelomocytes" (voir texte).

Classes	Radioactivité (cpm)	% de distribution de la radioactivité
X	2 000	9
LPC	2 480	11
PC	16 400	74
PS	260	1
PI	100	
PE	180	1
PG	240	1
AG	280	1
LN	140	
Total	22 080	98

b_{2.2.c}. Analyse fluorographique

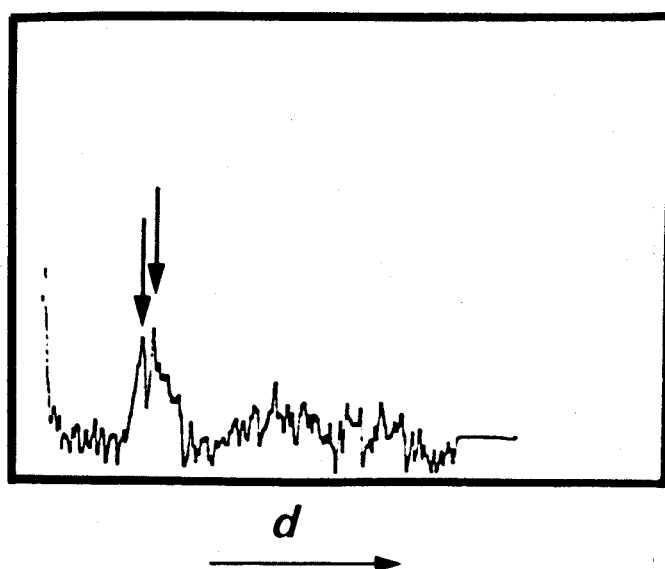
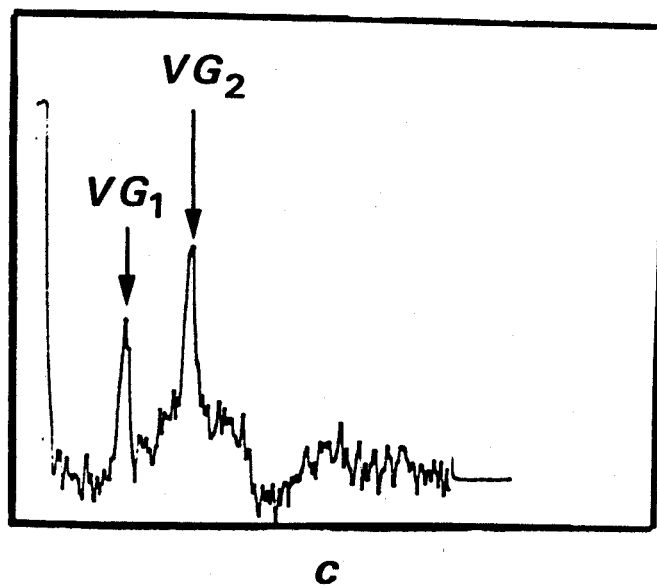
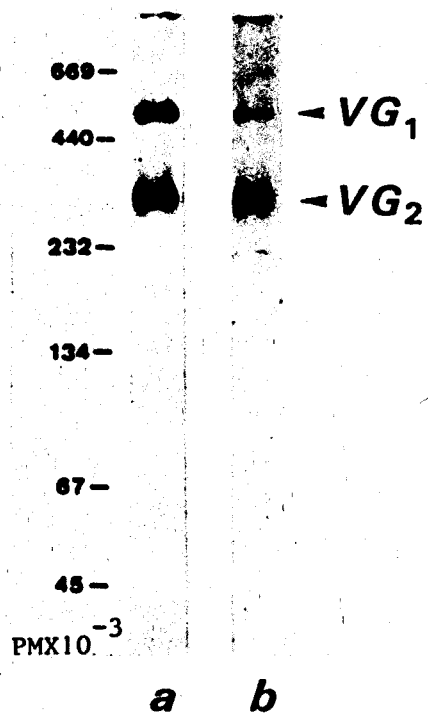
En collaboration avec J.-L. Baert, une analyse électrophorétique, réalisée en milieu non dénaturant, a porté sur les produits de sécrétions dans le "milieu de culture coelomocytes" après 3 jours d'incorporation de choline-³H. D'autre part, la fraction soluble des ovocytes incubés dans ce milieu pendant 2 jours a également été analysée.

L'électrophorèse, gradient 5-25 % d'acrylamide, a porté sur des aliquotes de 20 µl. Les protéines marquées sont détectées par fluorographie.

Les résultats sont présentés par la figure 22. Pour le milieu de culture, un marquage important est porté sur les deux formes de vitellogénine (VG₁ et VG₂) dont les poids moléculaires respectifs sont 530 et 320 kDa. La fraction soluble ovocytaire montre un marquage plus faible au niveau de deux bandes protéiques dont les poids moléculaires sont situés entre VG₁ et VG₂. Il s'agit vraisemblablement de la vitelline V₂ et la vitelline V₃ qui sont deux formes de conversion de V₁ (ou VG₁) en V₃, la forme mature de la vitelline dans les ovocytes.

Figure 22 - Fluorogrammes et enregistrements densitométriques.

- a et b : fluorogrammes des électrophorèses des protéines des milieux d'incubation des coelomocytes de *P. cultrifera* (diamètre ovocytaire $\approx 160 \mu\text{m}$) après 3 jours de culture *in vitro*, respectivement en présence de ^3H -leucine (a) et de ^3H -choline (b).
- c. Enregistrement densitométrique du fluorogramme (b).
- d. Enregistrement densitométrique du fluorogramme de l'électrophorèse des protéines des ovocytes ($\approx 130 \mu\text{m}$) placés en culture pendant 2 jours dans le milieu d'incubation des coelomocytes ayant incorporé de la ^3H -choline.
(Les coelomocytes ont été retirés du milieu lors de l'incubation des ovocytes).



c - Incorporation de ^3H -glycérol

L'expérimentation s'est déroulée sur la N. diversicolor (diamètre ovocytaire = 116-130 μm). Les ovocytes en présence de ^3H -glycérol (30 $\mu\text{Ci/ml}$ de milieu) sont incubés pendant 24 heures dans le milieu de culture.

Résultats

Tableau 21 - Radioactivité incorporée dans les phosphoglycérides et les lipides neutres après incubation des ovocytes avec du glycérol- ^3H pendant 24 h. Résultats donnés en cpm/100 μg de protéines ovocytaires et en pourcentage de distribution de la radioactivité dans les classes de lipides.

Classes	cpm/100 μg de protéines	% de distribution de la radioactivité
X+LPC+PC	1 107 $\pm$ 4	2,3 $\pm$ 1
PS	1 720 $\pm$ 70	3,6 $\pm$ 0,4
PI	826 $\pm$ 209	1,7 $\pm$ 0,6
PE	372 $\pm$ 156	0,8 $\pm$ 0,4
PG	521 $\pm$ 93	1,1 $\pm$ 0,4
AG	621 $\pm$ 160	1,3 $\pm$ 0,3
LN	42 144 $\pm$ 3 059	89 $\pm$ 2,4
Total	47 311 $\pm$ 4 571	99,8
PL totaux	4 546 $\pm$ 1 320	9,5 $\pm$ 3,5

Les ovocytes incorporent du glycérol- ^3H dans leur phosphoglycérides (PG) (9,5 % des lipides synthétisés) dont 38 % sous forme de PS. Les classes (X, LPC et PC) additionnées enregistrent 24 % de la radioactivité des PG. Toutefois, le métabolisme du glycérol- ^3H dans les ovocytes apparaît essentiellement dirigé vers la synthèse des lipides neutres (89 %).

II-A₃ ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE

Parallèlement aux études biochimiques relatives à l'incorporation de la choline- ^3H , une étude autoradiographique a été menée en utilisant le même précurseur. Les quantités de précurseur marqué sont les mêmes que pour les séries destinées à l'analyse biochimique.

PLANCHE I

Incorporation de ^3H -choline par des ovocytes et des coelomocytes de *P. cultrifera*.

Figure 1 - Incorporation de ^3H -choline *in vivo* pendant 6 jours.

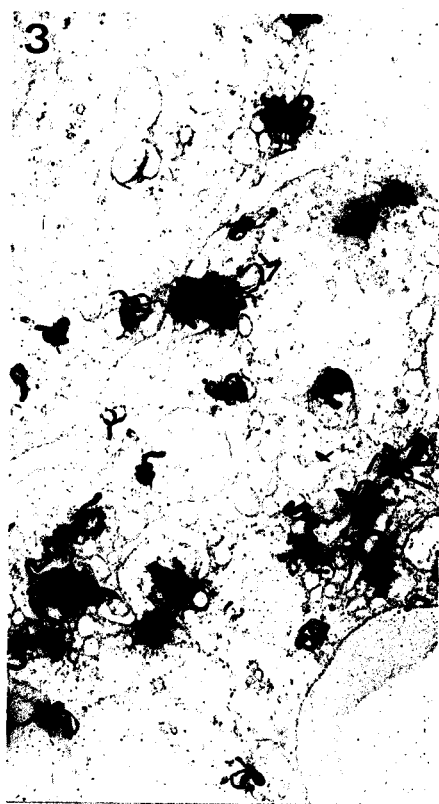
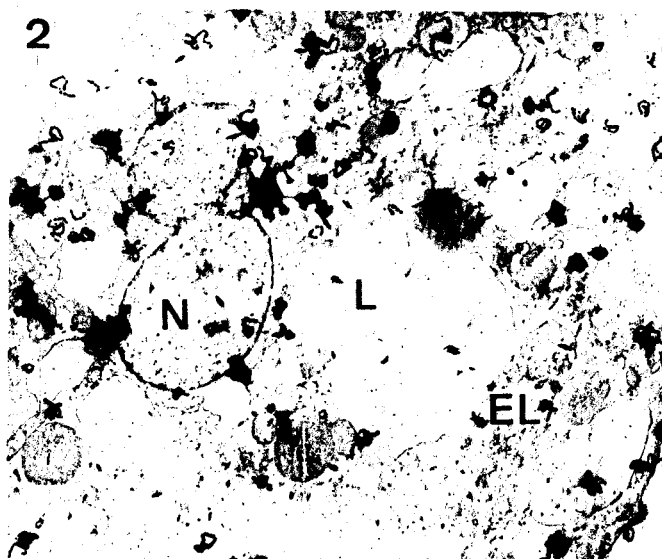
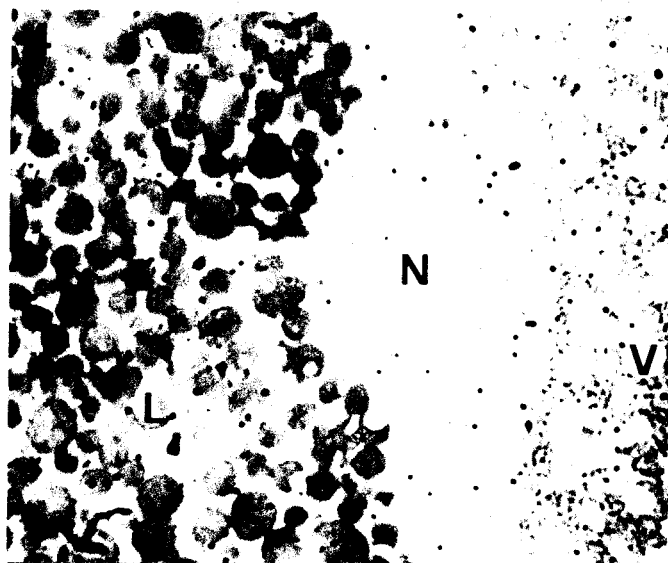
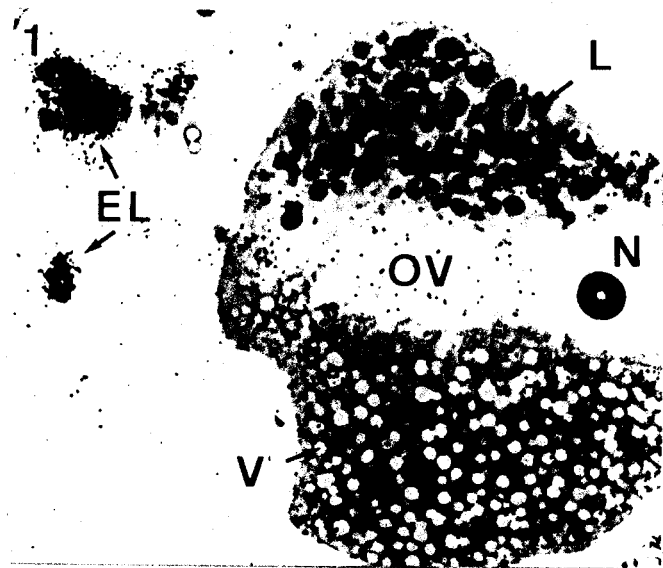
Les éléocytes (EL) se caractérisent par un marquage beaucoup plus intense que celui des ovocytes (OV). La ségrégation des constituants lipidiques (L) et vitellins (V) de l'ovocyte a été provoquée par centrifugation au cours de la préparation des cellules. N : noyau. X 800.

Figure 2 - Distribution de la radioactivité dans un éléocyte ayant incorporé de la choline (^3H) *in vitro* pendant 17 heures. X 6000.

Figure 3 - Dans les éléocytes, le marquage est particulièrement intense dans la zone corticale de la cellule au niveau des vésicules qui pourraient intervenir dans les processus de libération des phospholipides. X 12000.

Figure 4 - Ovocytes ayant été placés pendant 2 jours dans un milieu de culture enrichi par les sécrétions phospholipidiques de coelomocytes ayant préalablement incorporé de la choline (^3H). Le marquage est obtenu à la fois au niveau des structures lipidiques (L) et vitellines (V). Le noyau (N) est pratiquement dépourvu de marquage. X 1500.

Figure 5 - Incorporation *in vitro* pendant 17 heures de choline (^3H) par des ovocytes isolés (OV). La radioactivité est localisée uniquement au niveau des systèmes membranaires et notamment de l'appareil de Golgi (G). Les lipides (L) et le vitellus (V) ne présentent pas de marquage. EO : enveloppe ovocytaire. X 8000.



a - Etude in vivo

Après 6 jours d'incorporation, les coelomocytes sont caractérisés par la présence d'un marquage très intense (Pl. I, fig. 1). Dans les ovocytes, le marquage est beaucoup plus faible et paraît disséminé à la fois au niveau des lobules lipidiques et vitellins.

b - Etude in vitro

b₁. Coelomocytes isolés

Dès 12 heures d'incorporation, les coelomocytes et plus particulièrement les éléocytes présentent un marquage important (Pl. I, fig. 2), seuls les lobules lipidiques de ces cellules et le noyau restent faiblement marqués. La radioactivité apparaît particulièrement intense à certains endroits de la zone corticale des éléocytes. Ces zones sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules de petite taille et à contenu de faible densité (Pl. I, fig. 3). Ces éléments pourraient être impliqués dans les processus de libération vers l'extérieur du matériel sécrétoire élaboré par les éléocytes.

b₂. Ovocytes placés en incubation dans un milieu de culture enrichi par les sécrétions des coelomocytes

Un marquage assez important est observé au niveau de ces ovocytes. Il se répartit entre les zones riches en lobules vitellins et celles contenant les lobules lipidiques (Pl. I, fig. 4). L'analyse autoradiographique ayant été réalisée seulement en microscopie photonique, il reste difficile de préciser si les grains d'argent sont localisés sur ces structures ou dans la mince couche cytoplasmique les entourant.

Ce marquage toutefois diffère par sa distribution d'une série parallèle dans laquelle l'incorporation de la choline-³H par les coelomocytes est remplacée par de la leucine-³H. Dans ce cas le marquage est particulièrement important dans la zone cytoplasmique corticale, zone où s'effectue la séquestration de la vitellogénine et son assemblage en lobules vitellins (Fischer et Dhainaut, 1985). Par contre, pratiquement aucune radioactivité n'est observée dans la zone des lipides.

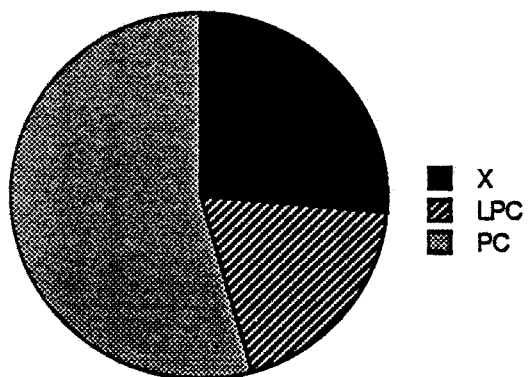
b₃. Ovocytes isolés ayant incorporé de la choline-³H

Après 17 heures d'incorporation, ni les lobules vitellins ni les lobules lipidiques n'apparaissent marqués. La radioactivité est localisée sur les synthèses membranaires et notamment au niveau de l'appareil de Golgi (Pl. I, fig. 5), ce qui implique que les biosynthèses membranaires de cet organe sont particulièrement importantes à ce stade ovocytaire.

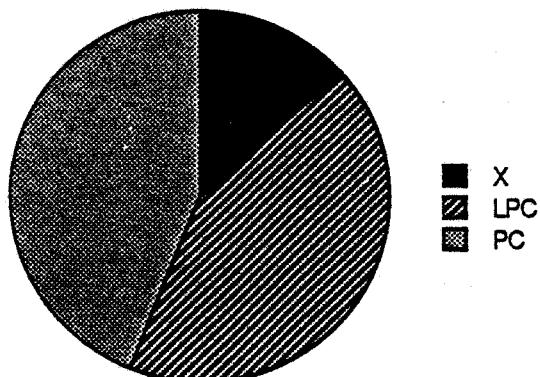
Figure 23 - Répartition de la radioactivité, en pourcentage, dans les différentes classes de phospholipides des ovocytes chez *P. cultrifera* a, b, c) et *N. diversicolor* (d, e).

- a - Après 2 jours d'incorporation de ^3H -choline *in vivo* (diamètre ovocytaire = environ 190 μm).
- b - Après 6 jours d'incorporation de ^3H -choline *in vivo* (diamètre ovocytaire = environ 190 μm).
- c - Après 48 heures d'incorporation de ^3H -choline *in vitro* (diamètre ovocytaire = environ 130 μm).
- d - Après 24 heures d'incorporation de ^{32}P *in vitro* (diamètre ovocytaire : environ 130 μ).
- e - Après 24 heures d'incorporation de ^3H -glycérol *in vitro* (diamètre ovocytaire : 116-130 μm).

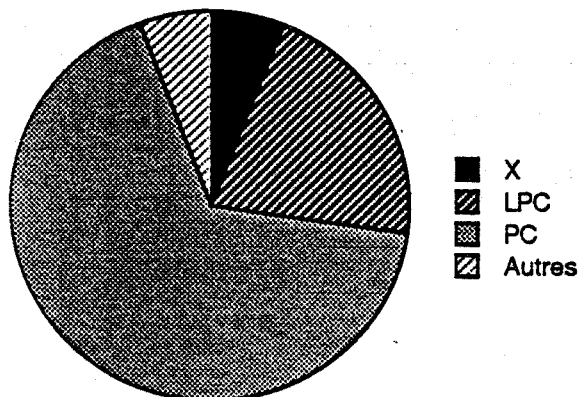
a



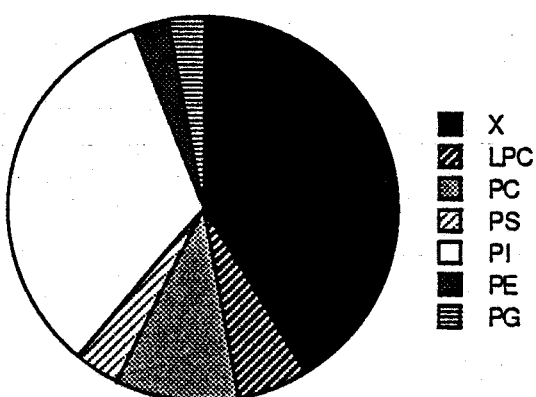
b



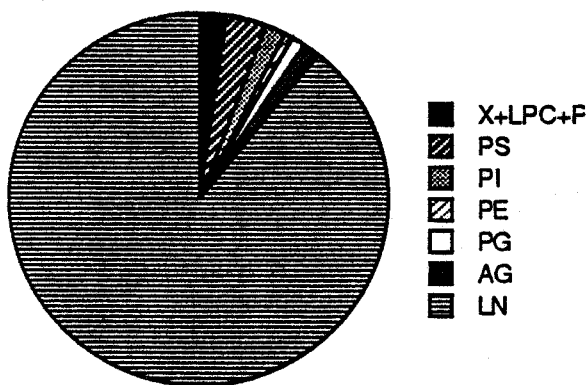
c



d



e



II-B. RECHERCHE D'UN CONTROLE ENDOCRINE DU METABOLISME DES PHOSPHOLIPIDES

1 - ACTION STIMULATRICE DE L'HORMONE CEREBRALE SUR LA LIBERATION DES PHOSPHOLIPIDES PAR LES COELOMOCYTES

Dans le but de rechercher l'influence de l'hormone cérébrale sur la libération des PL par les coelomocytes, nous avons réalisé des cultures de ces cellules coelomiques en présence de différentes doses de sécrétions cérébrales. Une suspension de coelomocytes, issus des ponctions de 6 P. cultrifera (diamètre ovocytaire d'environ 160 μ m) est répartie en trois lots semblables. Les différentes incubations sont :

- 1) Coelomocytes témoins.
- 2) Coelomocytes + 100 μ l de sécrétions cérébrales.
- 3) Coelomocytes + 300 μ l de sécrétions cérébrales.

Le temps d'incorporation de la choline- 3 H ajoutée dans les milieux de culture (30 μ Ci/ml) est 48 heures. Les sécrétions cérébrales (SC) proviennent de la culture (3 jours) de cerveaux jeunes de N. diversicolor. Ces SC sont ajoutées aux milieux d'incubations au temps ($t = 0$) de la culture des coelomocytes.

Tableau 22 - Evolution de la distribution de radioactivité (en pourcentage) dans les PL synthétisés puis relâchés par les coelomocytes dans le milieu de culture en fonction de la quantité des sécrétions cérébrales ajoutée dans le milieu.

Classes	Quantité de SC ajoutée dans le milieu de culture (en μ l)		
	0	100	300
X+LPC	52	40	50
PC	35	50	40
PS+PI	8	7	5
PE	1,5	1	2
PG	4	2	3
Total	100,5	100	100

L'examen des résultats (fig. 24) montre une légère augmentation des synthèses totales de PL en fonction des sécrétions cérébrales ajoutées. Cependant l'évolution est variable selon les différentes classes de PL et il est difficile d'émettre une conclusion.

2 - INFLUENCE CEREBRALE SUR LES OVOCYTES

^3H -glycérol et ^3H -choline ont été utilisés dans cette étude.

2.1. Effet de la décérébration sur les synthèses de PL des ovocytes de N. diversicolor

Des N. diversicolor (diamètre ovocyttaire = 116 à 130 μm) sont décérébrées. Après 8 jours d'évolution, les ovocytes sont isolés et mis en culture pendant 24 heures en présence de ^3H -glycérol (20 $\mu\text{Ci/ml}$). Des ovocytes issus d'animaux normaux, d'un même état génital, ont servi de témoins.

Tableau 23 - Incorporation de la radioactivité dans les lipides des ovocytes de 116-130 μm chez N. diversicolor après 24 h d'incorporation de ^3H -glycérol (20 $\mu\text{Ci/ml}$). Les ovocytes sont issus d'animaux décérébrés pendant 8 jours et des normaux (témoins). Résultats exprimés en : a) cpm/100 μg de protéines ; b) % d'incorporation par rapport aux lipides totaux. Moyennes $\pm$ SD à partir de 3 échantillons.

Classes	Décérébrés		Témoins	
	a	b	a	b
X+LPC+PC	706 $\pm$ 223	3,3 $\pm$ 1,5	1 107 $\pm$ 402	2,3 $\pm$ 1,3
PS	907 $\pm$ 216	4,3 $\pm$ 1,4	1 720 $\pm$ 70	3,6 $\pm$ 0,5
PI	556 $\pm$ 43	2,6 $\pm$ 0,3	826 $\pm$ 209	1,7 $\pm$ 0,7
PE	195 $\pm$ 35	0,9 $\pm$ 0,2	372 $\pm$ 158	0,8 $\pm$ 0,5
PG	395 $\pm$ 212	1,9 $\pm$ 1,4	521 $\pm$ 93	1,1 $\pm$ 0,3
AG	682 $\pm$ 9	3,2 $\pm$ 0,1	621 $\pm$ 160	1,3 $\pm$ 0,4
LN	17 707 $\pm$ 576	83,7 $\pm$ 3,8	42 144 $\pm$ 3 059	89 $\pm$ 3
Total	21 148 $\pm$ 2 400	99,9	47 311 $\pm$ 4 571	99,8

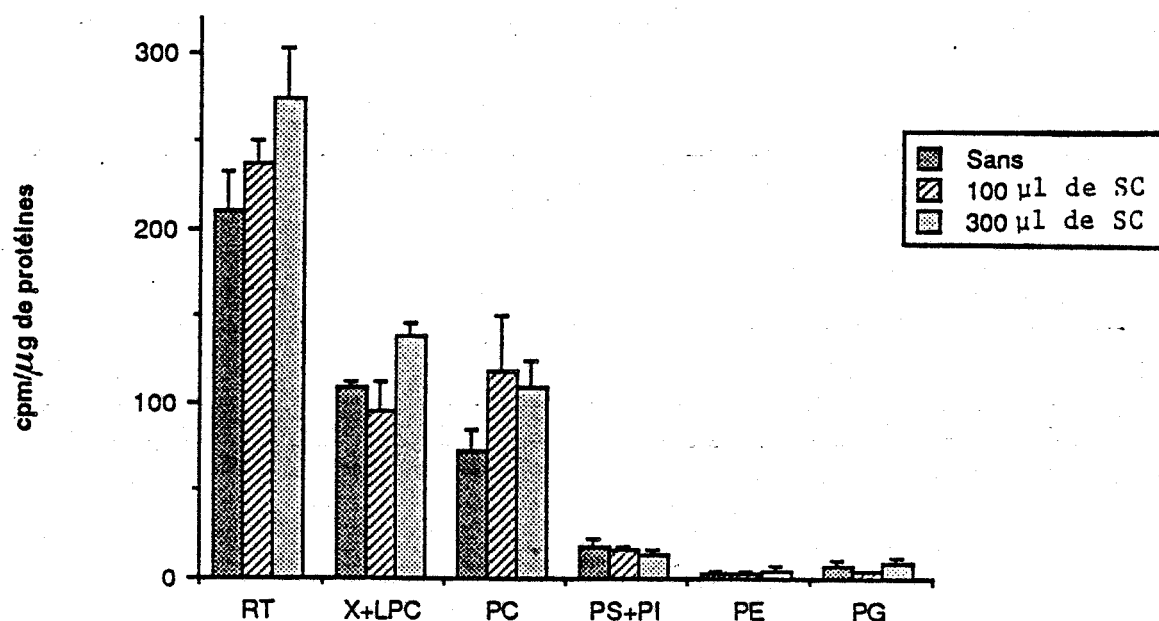


Figure 24 - Evolution de la radioactivité dans les PL synthétisés dans les coelomocytes puis relâchés dans le milieu de culture en fonction des doses de sécrétions cérébrales (SC) ajoutées dans le milieu.

L'analyse des PL radioactifs dans le milieu est réalisée après 48 h d'incorporation de ^3H -choline.

Les résultats sont exprimés en cpm/μg de protéines ovocytaires.

Moyennes $\pm$ SD à partir de 3 échantillons.



Les ovocytes issus d'animaux décérébrés depuis 8 jours ou d'animaux témoins incorporent du glycérol- ^3H dans leurs lipides neutres et PL pendant 24 heures. La majeure partie de la radioactivité dans ces lipides est localisée au niveau des lipides neutres : 87 % chez les expérimentés et 90,5 % chez les témoins. La synthèse de ces lipides neutres diminue dans les ovocytes des vers décérébrés. Quant aux PL, les différences des synthèses n'apparaissent pas significatives. Mais il est toutefois intéressant de signaler une légère chute chez les expérimentés dans la synthèse des PS : 1720 et 907 cpm/100 μg de protéines environ, taux des synthèses respectives chez les témoins et expérimentés.

2.2. Action stimulatrice de l'hormone cérébrale sur la synthèse des PL des ovocytes de P. cultrifera

Des animaux (P. cultrifera) de 168 μm environ de diamètre ovocytaire sont utilisés pour cette expérience. D'un même "pool" d'ovocytes, nous avons réalisé deux séries expérimentales, l'une est additionnée de sécrétions cérébrales, l'autre en est dépourvue. Les sécrétions cérébrales proviennent de la culture des cerveaux de N. diversicolor (diamètre ovocytaire < 80 μm). Le temps d'incubation des ovocytes est de 48 heures avec la choline- ^3H utilisée comme précurseur (30 $\mu\text{Ci/ml}$).

Résultats : tableau 24 et figure 25.

Tableau 24 - Effet des sécrétions cérébrales sur la synthèse des PL des ovocytes de P. cultrifera en culture pendant 48 heures en présence de ^3H -choline. Résultats exprimés en pourcentage de radioactivité par rapport aux PL totaux. Moyennes $\pm$ SD à partir de 3 expériences.

Classes	% de distribution de la radioactivité	
	+ Sécrétions cérébrales	Témoins
X	1,1 $\pm$ 0,7	2 $\pm$ 0,3
LPC	18 $\pm$ 8	25,7 $\pm$ 2,6
PC	39,8 $\pm$ 3,5	34,2 $\pm$ 4
PS+PI	35,9 $\pm$ 3,3	28,8 $\pm$ 4,3
PE	1,9 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 1,3
PG	3,2 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 1,3
Total	99,9	100

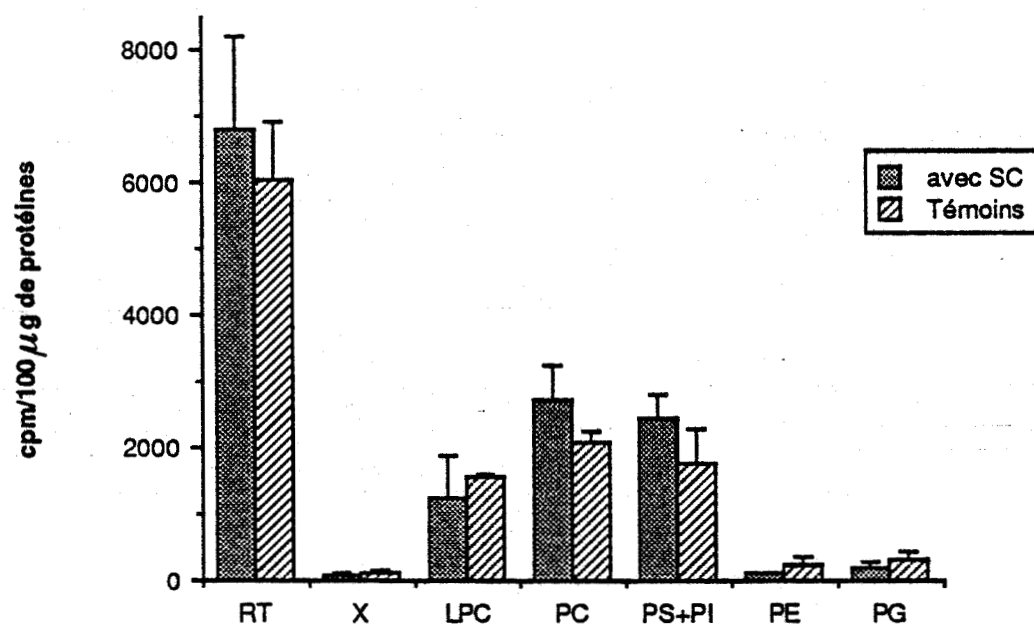


Figure 25 - Influence des sécrétions cérébrales sur la synthèse des PL dans les ovocytes de *P. cultrifera* après 48 h d'incorporation de ^3H -choline *in vitro*.

Les résultats sont exprimés en cpm/100 µg de protéines ovocytaires.

Moyennes $\pm$ SD à partir de 3 échantillons.

SC : sécrétions cérébrales.



Les ovocytes semblent montrer une légère augmentation du taux de synthèse des PL en présence des sécrétions cérébrales dans le milieu de culture. Les synthèses globales de PL sont de l'ordre de 6817 et 6063 cpm/ μ g de protéines, respectivement avec ou sans sécrétions cérébrales dans le milieu de culture des ovocytes (fig. 25). Toutefois, étant donné les faibles différences des valeurs enregistrées, ces résultats doivent être interprétés avec prudence et demandent une confirmation.

DISCUSSION

A - Voie métabolique des précurseurs utilisés

Des précurseurs marqués par des isotopes sont fréquemment utilisés pour étudier les voies de biosynthèse conduisant à la formation des phospholipides chez les animaux.

Ces précurseurs peuvent être divisés en deux groupes. Certains sont communs à tous les phosphatides (phosphore, certains acides gras ou glycérol), d'autres définissent un type de phosphatide particulier comme la choline, l'éthanolamine, la sérine, l'inositol etc...

La première catégorie donne une vue générale des voies biosynthétiques directes des phosphatides, tandis que les radioisotopes spécifiques donnent des détails au niveau des voies de formation des phospholipides.

1 - 32 -Phosphore (32 P)

Des ovocytes de P. cultrifera (diamètre ovocytaire d'environ 130 μ m) incubés in vitro sont capables d'incorporer du 32 P-orthophosphate dans les PL. Bien que le taux de radioactivité incorporée dans les classes de PL soit faible, la majeure partie de ces synthèses est présentée par les classes "X" et PI.

En ce qui concerne la classe "X", en plus de sa capacité d'incorporer le 32 P et la choline- 3 H, elle répond positivement à la réaction avec l'orcinol. Ce dernier permet de révéler les glucides qui montrent alors une teinte "violet". De ce fait, nous émettons l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'une base-choline telle que UDP-choline ou CDP-choline. Cette dernière est en effet un précurseur des PL dans la voie directe (Van der Bosh, 1974 ; Holub et Kuksis, 1978).

Pour des temps plus longs d'incorporation de ^{32}P (Belhamra, 1985), on constate une diminution de l'importance de ces deux classes au profit des PC et PE. Les résultats suggèrent une transformation entre ces deux groupes de PL comme cela a été démontré chez les Crustacés (Chapelle et al., 1975, 1976, 1977, 1979 ; Brichon et al., 1980).

Chez les Invertébrés marins, l'incorporation du ^{32}P a été particulièrement étudiée chez les Crustacés (Shiek, 1969 ; Farkas et al., 1973 ; Tret'yak et Limarenk, 1977). Des travaux plus précis ont été faits par Chapelle et al. (1975, 1976, 1977, 1979) et Brichon et al. (1980) chez les Crabes Eriocheir et Carcinus.

Dans différents organes et dans l'hémolymphe, il apparaît que les synthèses de la PI et d'acide phosphatidique sont importantes durant les premières heures d'incorporation du ^{32}P alors que le taux des PE et des PC reste faible. Pour des temps d'incorporation plus longs ces 2 classes deviennent à leur tour les plus activement synthétisées.

2 - ^3H -glycérol

L'incorporation de ^3H -glycérol dans les ovocytes de N. diversicolor s'effectue dans les lipides neutres et les PL (9,5 % de la radioactivité des lipides totaux synthétisés par l'ovocyte en culture). La forte synthèse des lipides neutres est probablement en relation avec l'accumulation des TG dans l'ovocyte (Fontaine, 1982 ; Belhamra, 1985). Les PL les plus synthétisés sont les PS et les PI. Chez les Crustacés, O'Connor et Gilbert (1969) avaient montré que l'hépatopancréas de G. lateralis synthétise des PL à partir du glycérol (70 % des lipides totaux). Chez le Homard, Shiek (1969) avait trouvé une incorporation semblable de glycérol au niveau des PC et des PE. Les ovaires apparaissent également capables de synthétiser les PC et les PE à partir de ^3H -glycérol (Lui et al., 1974).

3 - ^3H -choline

In vivo et in vitro, l'incorporation s'effectue principalement dans les PL ("X", LPC et PC). Cette étude avec la choline ne permet pas de nous informer sur les voies de synthèse des PL ; elle confirme cependant l'existence de la voie directe de synthèse des PC dans les ovocytes et coelomocytes après incorporation de ^3H -choline. Il est donc vraisemblable que la voie directe impliquant les diglycérides et du CDP-choline, existe chez les Nereidae comme chez les Vertébrés (Van den Bosh, 1974 ; Holub et Kuksis, 1978).

B - Signification physiologique

1 - Coelomocytes

L'analyse biochimique montre que les coelomocytes synthétisent activement in vivo et in vitro différentes classes de PL. L'importance de ces synthèses est également prouvée par les résultats d'autoradiographie après incorporation de ^3H -choline.

D'après ces données, deux hypothèses peuvent être formulées.

- a) Synthèse importante des phospholipides par les systèmes membranaires à savoir le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi. Chez les Insectes, Della Ciopa et Engelman (1985) ont montré un taux important de choline dans les phosphatidylcholines microsomales. La prolifération des membranes est stimulée par l'hormone juvénile.
- b) Les PL sont associés aux produits de sécrétion des coelomocytes : cette deuxième hypothèse est démontrée par analyse in vitro des produits libérés par les coelomocytes dans le milieu de culture; En effet après 48 heures d'incorporation, environ 12 % des PL synthétisés par les coelomocytes se trouvent dans le milieu de culture. Ces PL sont susceptibles d'être absorbés par les ovocytes. Après adjonction d'ovocytes dans le milieu de culture des coelomocytes, une chute significative du taux de PL dans celui-ci est enregistrée.

Les analyses électrophorétiques et fluorographiques des composantes protéiques libérées dans le milieu de culture par les coelomocytes montrent que les PL sont associés à la molécule de vitellogénine (VG_1 et VG_2). A noter aussi que dans aucun cas, nous n'avons pu déceler de bande radioactive autre que la vitellogénine dans le milieu d'incubation des coelomocytes. De ce fait, nous pouvons formuler l'hypothèse que chez P. cultrifera la molécule de vitellogénine est constituée en partie de PL, alors que le reste est sous forme non associée dans le milieu.

Chez les Insectes, Thomas et al (1966) avaient montré que l'incubation in vitro du corps gras de Hyalophora cecropia, de Leucophaea maderae et de Periplaneta americana, s'accompagne d'une incorporation des précurseurs marqués dans les PL. Lorsque le corps gras marqué est placé dans un milieu non radioactif contenant de l'hémolymphe, les PL radioactifs sont libérés dans le milieu. La majeure partie de ceux-ci consiste en PC, PE et PS. L'analyse électrophorétique de l'hémolymphe dans le milieu d'incubation montre que les PL libérés à partir du corps gras sont conjugués à des protéines spécifiques de l'hémolymphe. Une de ces lipoprotéines est analogue à la H.D.L. (lipoprotéine à haute densité) du sang des Mammifères.

A partir de l'hémolymphe de Cynthia, Chino et al. (1967, 1969) ont purifié deux lipoprotéines dont l'une, DGLP-II a été considérée comme vitellogénine (Chino et al., 1976). Chez les papillons : H. cecropia et H. gloveri, Thomas et Gilbert (1968, 1969) avaient isolé trois fractions désignées comme : LDL, HDL et VHDL. Cette dernière paraît correspondre principalement à une vitellogénine. Chez Nauphoeta cinerea, les analyses comparatives entre la vitellogénine et la vitelline révèlent de petites différences au niveau de leur composition en PL (Imboden et al., 1987). Ces auteurs citent aussi que chez Nauphoeta, la vitelline contient significativement moins de phosphatidylcholine et lysophosphatidylcholine que la vitellogénine. Les lipides totaux forment 7,4 % pour la vitellogénine et 4,8 % pour la vitelline.

Régulation hormonale

Chez les Annélides, l'addition de sécrétions cérébrales dans le milieu de culture des coelomocytes semble sans effet marqué sur la libération des PL. Cette influence endocrine a été également testée sur la synthèse de vitellogénine par les coelomocytes de P. cultrifera (Baert, 1986). Cet auteur a montré qu'il ne semble pas exister de relations marquées entre le taux de ces synthèses et la teneur en néréidine. L'addition de cerveaux actifs ou de sécrétions cérébrales dans le milieu de culture des coelomocytes n'a pas d'incidence significative sur les processus de synthèse. De même la décérébration ne semble pas exercer non plus d'effet sur ce processus.

2 - Ovocytes

Dans nos expériences, le taux de phospholipides radioactifs apparaît toujours beaucoup plus faible dans les ovocytes que dans les coelomocytes, que ce soit in vitro ou in vivo. Cette différence est sans doute renforcée d'une certaine manière par l'expression des résultats en cpm par μg de protéines. Cette méthode a été choisie pour sa précision très supérieure à celle d'un dosage de poids humide ou de poids sec. Cependant, les ovocytes sont beaucoup plus riches que les coelomocytes en protéines ce qui peut fausser le rapport. Toutefois, les données autoradiographiques confirment que le marquage des coelomocytes est nettement supérieur à celui des ovocytes (Pl. I, fig. 1). Cette différence est d'ailleurs compréhensible si on considère que les ovocytes constituent, au moins pour une partie, le site de stockage d'un matériel exporté depuis le compartiment de synthèse. Nous avons montré en effet que la radioactivité des phospholipides élaborés par les coelomocytes se retrouve dans les précurseurs de la protéine majeure V_5 .

Dans le cas des ovocytes isolés, l'incorporation de la choline peut être envisagée selon plusieurs voies métaboliques, et aboutir en théorie soit à la formation de réserves lipidiques, soit à la synthèse de biomembranes. L'étude autoradiographique a révélé que le marquage de lobules lipidiques dans le cas de l'incorporation de la choline est très faible par comparaison à l'incorporation du glycérol- ^3H (Dhainaut et Belhamra, 1986). Par contre dans le cas des ovocytes isolés, la quasi totalité du marquage se retrouve au niveau des systèmes membranaires et notamment de l'appareil de Golgi (Pl. I, fig. 5). Deux hypothèses peuvent être émises à ce sujet : (a) Les ovocytes examinés sont au stade d'élaboration des alvéoles corticaux, or la membrane de ces derniers est différenciée à partir de l'appareil de Golgi (Dhainaut, 1984b). (b) La quantité importante de la radioactivité dans les PI après incorporation du ^{32}P dans l'ovocyte, est peut-être associée aux processus des échanges ioniques et la phosphorylation enzymatique (Michell, 1975 ; Nishizuka, 1984). Ces processus conditionnent sans doute de façon importante la vitellogenèse.

TROISIEME PARTIE

ACIDES GRAS

Les acides gras des animaux marins ont fait l'objet de plusieurs études, surtout depuis l'introduction de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Toutefois, chez les Annélides peu de travaux ont été réalisés sur le sujet. Les Néréidiens dans ce domaine méritent une place spéciale puisque Fontaine (1982) a analysé chez P. cultrifera la composition en acides gras des lipides neutres du liquide coelomique, des coelomocytes et des ovocytes. Nous avons repris et poursuivi ce travail dans le but de rechercher une modification éventuelle de la composition en acides gras en fonction du conditionnement hormonal. Les résultats obtenus dans l'étude du métabolisme des lipides neutres ont révélé en effet des variations globales du taux d'acides gras entre des ovocytes et des coelomocytes soumis ou non à l'influence de l'hormone cérébrale. Nos recherches effectuées à la fois chez N. diversicolor et P. cultrifera ont visé à une exploration méthodique des différentes catégories d'acides gras. Ce travail a été effectué en grande partie dans le laboratoire du Pr Fournet que nous tenons particulièrement à remercier ici.

A - ETUDE QUALITATIVE

Pour la méthodologie d'extraction et de séparation des acides gras, on se reportera au chapitre "Matériel et Méthodes". Les différents acides gras rencontrés dans les ovocytes et (ou les coelomocytes sont indiqués dans le tableau 25. La première colonne du tableau indique le symbole de l'acide gras et la deuxième colonne indique son nom usuel. Les acides gras sont rangés par ordre d'apparition sur le chromatogramme (fig. 26) et en fonction de leur degré de saturation (Tableau 25).

Tableau 25

Acides gras saturés	
14 : 0	acide myristique
15 : 0	acide pentadécanoïque
16 : 0	acide palmitique
17 : 0	acide margarique
18 : 0	acide stéarique
20 : 0	acide arachidique
22 : 0	acide béhénique
Acides gras monoinsaturés	
16 : 1	acide palmitoléique
17 : 1	acide heptadécénoïque
18 : 1	acide oléique
18 : 1 vacc	acide vaccénique
20 : 1	acide gadoléique
22 : 1	acide érucique
Acides gras polyinsaturés	
18 : 2	acide linoléique
20 : 2	acide eicosadiénoïque
18 : 3	acide linolénique
20 : 3	acide eicosatriénoïque
20 : 4	acide arachidonique

B - ETUDE QUANTITATIVE

B₁. Conditions naturelles

a - Coelomocytes

a₁. N. diversicolor

Les animaux utilisés ont un diamètre ovocytaire de 130 μ m. Nos résultats sont exprimés dans le tableau 26 en mg d'acides gras pour 10⁴ mg de protéines (a) et en fonction du pourcentage des classes d'acides gras.

Le tableau 26 montre que les acides gras saturés sont importants. Ceux-ci sont surtout représentés par l'acide palmitique (16:0) et l'acide béhénique (22:0). Nous remarquons aussi une teneur importante en acides gras monoinsaturés.

L'indice d'insaturation dérive de la formule suivante : $(\% \text{ des monoinsaturés} \times 1) + (\% \text{ des diinsaturés} \times 2) + \dots / 100$. Dans le cas présent, il est égal à 0,41. Les acides gras polyinsaturés présentent 4 % des acides gras des coelomocytes à ce stade de maturation (130 μ m de diamètre ovocytaire).

a₂. P. cultrifera

Deux lots d'animaux ont été étudiés dans cette expérimentation :

- Vers de 130 μ m de diamètre ovocytaire récoltés le mois de décembre.
- Vers d'un diamètre ovocytaire de 220 μ m récoltés à la fin du mois de mars.

Résultats : Tableau 26.

Les coelomocytes provenant respectivement d'animaux de 130 μ m et 220 μ m de diamètre ovocytaire présentent un taux important d'acides gras saturés et monoinsaturés. Les principaux acides gras classés par ordre d'importance décroissant sont : l'ac. palmitique (16:0), l'ac. vaccénique (18:1 Vacc) et l'ac. oléique (18:1).

Chez P. cultrifera, en comparant les deux séries de coelomocytes, nous remarquons qu'une faible diminution du taux d'acides gras par rapport au taux de protéines est enregistrée chez les plus âgés. Concernant le pourcentage des différents acides gras, nous ne remarquons pratiquement pas de différence entre les deux séries de coelomocytes. Il est à noter que certains acides gras présents en faible quantité dans les coelomocytes jeunes,

Tableau 26 - Acides gras des coelomocytes de *N. diversicolor* (diamètre ovocytaire 130 μm) et de *P. cultrifera* (diamètre ovocytaire 130 et 220 μm).

Résultats exprimés en :

a - mg d'acide gras par 10^4 mg de protéines coelomocytaires.

b - pourcentages de répartition par rapport à la totalité des acides gras dans les coelomocytes.

	<u>N. diversicolor</u>		<u>P. cultrifera</u>			
	130 μm		130 μm		220 μm	
	a	b	a	b	a	b
AG saturés						
14 : 0	70	2	traces		41	1
15 : 0	31	1				
16 : 0	973	28	2100	38	1788	37,5
17 : 0	65	2	79	1	82	2
18 : 0	245	7	300	5	357	7
20 : 0	63	2	9	0,2		
22 : 0	802	23				
Total partiel	2249	65	2488	44,2	2268	47,6
AG monoinsaturés						
16 : 1	227	7	400	7	258	5
17 : 1			53	1		
18 : 1	203	6	700	13	561	12
18 : 1 vacc	290	8	1100	20	968	20
20 : 1	179	5	300	5	319	7
22 : 1	161	5				
Total partiel	1060	31	2553	46	2106	44
AG polyinsaturés						
18 : 2	42	1	22	0,4		
20 : 2	71	2				
18 : 3			200	4	251	5
20 : 3			200	4	140	3
20 : 4	31	1				
Total partiel	144		422	8,4		8
Indice d'insaturation	0,41		0,76		0,71	

disparaissent dans les cellules des vers âgés, c'est le cas de l'acide arachidique (20:0), de l'ac. heptadécénoïque (17:1), et de l'ac. linoléique (18:2).

b - Ovocytes

b₁. N. diversicolor

Les ovocytes ayant servi à cette expérience proviennent des mêmes animaux qui ont fourni les coelomocytes (paragraphe B₁ - a₁). Les résultats sont exprimés en pourcentages d'importance des acides gras (tableau 27). Il indique dans les ovocytes une forte teneur des acides gras saturés. L'ac. béhénique (22:0) et l'ac. palmitique (16:0) sont les plus importants. Les acides gras monoinsaturés sont surtout présentés par l'ac. palmitoléique (16:1), l'ac. oléique (18:1) et l'ac. vaccénique (18:1 vacc). Quant aux acides gras polyinsaturés, il ne forment que 6,8 % des acides gras totaux. Dans les ovocytes, l'indice d'insaturation est de 0,44.

b₂. P. cultrifera

La composition et la teneur en acides gras des ovocytes ont été étudiées sur trois stades dont les diamètres ovocytaires sont : 130, 220 et 280 µm. Le premier groupe de vers a été récolté au mois de décembre 1986 le 2ème et le 3ème provient d'une récolte effectuée à la fin du mois de mars 1987.

Résultats : tableau 27, figure 27.

Les lipides totaux des ovocytes présentent une grande proportion d'acides gras saturés, viennent ensuite les acide gras monoinsaturés. Par ordre d'importance décroissant les acides gras sont rangés de la façon suivante : ac. palmitique (16:0), ac. oléique (18:1), ac. vaccénique (18:1 vacc), ac. gadoléique (20:1) et ac. linolénique (18:3). La comparaison des acides gras en fonction de l'âge des ovocytes ne montre pas de différence apparente en ce qui concerne leur pourcentage (tableau 27). L'analyse de la fig 27 illustrant le taux d'acides gras par quantité de protéines en fonction de l'âge des ovocytes révèle une faible baisse entre 130 et 220 µm de diamètre ovocytair, puis une baisse plus marquée entre 220 et 280 µm. L'évolution du taux d'acides gras en fonction de l'âge semble être parallèle sauf pour l'ac. linolénique (18:3) qui est mieux représenté au stade 220 µm. Cette apparente diminution résulte en fait d'une teneur accrue en protéines ovocytaires à l'approche de la maturation.

Tableau 27 - Distribution des acides gras, en pourcentage, dans les ovocytes de N. diversicolor et de P. cultrifera.

	<u>N. diversicolor</u>	<u>P. cultrifera</u>		
	130 μ m	130 μ m	220 μ m	280 μ m
AG saturés				
14 : 0	1,3	traces	0,8	traces
15 : 0	0,7			
16 : 0	23,7	38	33,7	40
17 : 0	1,6	2,5	2,6	2,7
18 : 0	5,5	10	9,2	10,2
20 : 0	4,3			
22 : 0	27,7			
Total partiel	64,8	50,5		52,9
AG monoinsaturés				
16 : 1	6,2	2,5	3,4	2,6
17 : 1		0,8		
18 : 1	6,7	14	15,9	13,7
18 : 1 vacc	6,7	14	15,4	14,6
20 : 1	3,7	7,6	6,3	7,3
22 : 1	3,5			
Total partiel	28,1	38,9	41	38,2
AG polyinsaturés				
18 : 2	2,5	0,8	traces	traces
20 : 2	3,3			
18 : 3	0,1	6	9,6	6,2
20 : 3	0,1	3,8	3	2,7
20 : 4	0,8			
Total partiel	6,8	10,6	11,6	8,9
Indice d'insaturation	0,44	0,74	0,82	0,68



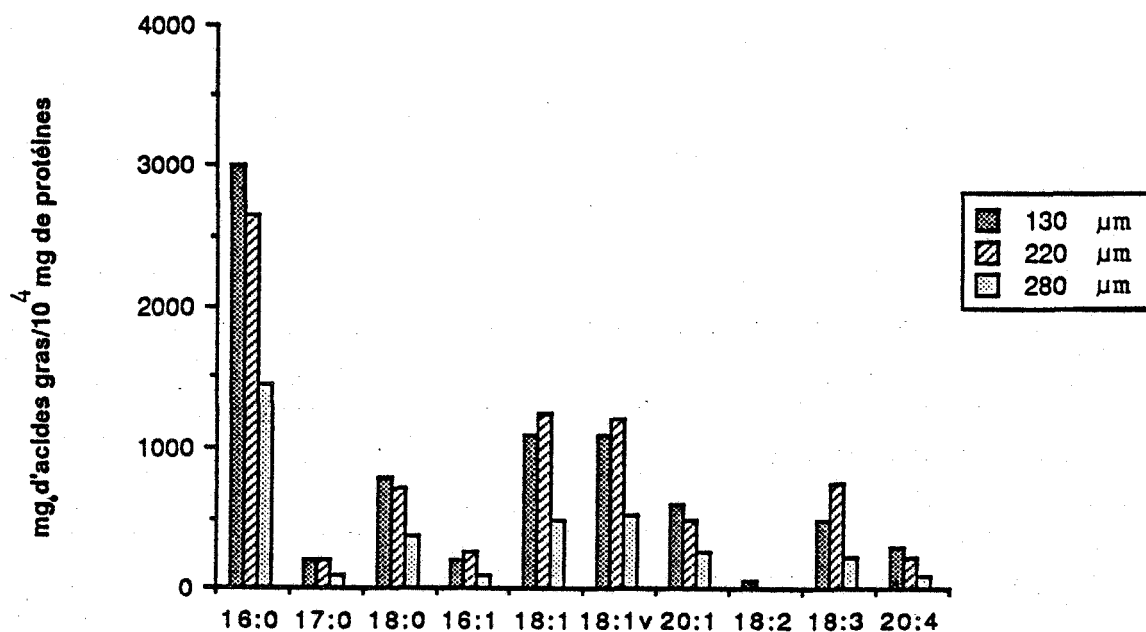


Figure 27 - Evolution de la teneur en acides gras dans les ovocytes de *P. cultrifera* en fonction du stade génitale des animaux : les acides gras des ovocytes de diamètre moyen égal à 130, 220 et 280 μm ont été analysés.
Les résultats sont exprimés en mg d'acides gras par 10^4 mg de protéines ovocytaires.

B₂. Recherche d'un contrôle endocrine sur la composition en acides gras dans les ovocytes et les coelomocytes

a - Coelomocytes

a₁. Chez N. diversicolor

Des animaux de 130 μ m de diamètre ovocytaire sont utilisés. Un premier lot d'animaux a subi l'ablation du cerveau puis a ensuite évolué pendant 16 jours en absence de l'hormone cérébrale. Un deuxième lot d'animaux de même diamètre ovocytaire que le premier a servi de témoin. Le tableau 28 montre la composition en acides gras des lipides totaux dans les coelomocytes issus d'animaux décérébrés et ceux des témoins. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux (tableau 28). La fig. 28 illustre des résultats exprimés en mg d'acides gras par 10⁴ mg de protéines coelomocytaires chez les opérés et les témoins.

Résultats : tableau 28, fig. 28.

Par rapport aux témoins, les coelomocytes d'animaux décérébrés montrent une augmentation du pourcentage d'acides gras saturés par rapport aux acides gras monoinsaturés. Cette augmentation est surtout marquée par l'acide béhénique (22:0) qui passe de 23 à 39 % ; la chute du taux d'acides gras monoinsaturés chez les décérébrés entraîne une baisse de l'indice d'insaturation.

a₂. Chez P. cultrifera

Des vers de 130 μ m de diamètre ovocytaire sont répartis en deux lots : le premier sert de témoin alors que le deuxième est formé d'animaux ayant subi une décérébration puis évoluant ensuite pendant 20 jours.

Les animaux ont été récoltés au mois de décembre 1986.

Résultats : tableau 28, figure 29.

Le tableau 28 montre une légère augmentation du pourcentage des acides gras saturés dans les coelomocytes d'animaux décérébrés par rapport à ceux des témoins, et une diminution des acides gras monoinsaturés. Quant à la quantité d'acides gras par quantité de protéines (Fig. 29), nous constatons une légère diminution dans les coelomocytes des décérébrés.

Tableau 28 - Influence de la décérébration sur le pourcentage des acides gras des coelomocytes de N. diversicolor et de P. cultrifera.

	<u>N. diversicolor</u>		<u>P. cultrifera</u>	
	Témoins	Décérébrés	Témoins	Décérébrés
AG saturés				
14 : 0	2	traces	traces	
15 : 0	1	1		
16 : 0	28	26	38	45,4
17 : 0	2	1	1	1,4
18 : 0	7	9	5	6,8
20 : 0	2	1	0,2	
22 : 0	23	39		
Total partiel	65	77	44,2	53,6
AG monoinsaturés				
16 : 1	6,5	4	7	4,5
17 : 1			1	0,5
18 : 1	6	4	13	11,3
18 : 1 vacc	8	5	20	18,1
20 : 1	5	3	5	6,8
22 : 1	5	2		
Total partiel	30,5	18	46	41,2
AG polyinsaturés				
18 : 2	1	Traces		0,4
20 : 2	2	5		
18 : 3			4	2,2
20 : 3			4	2,2
20 : 4	1	0,2		
Total partiel	4	5,2	8	4,8
Indice d'insaturation	0,4	0,29	0,76	0,56

4
mg d'acides gras/10 mg de protéines

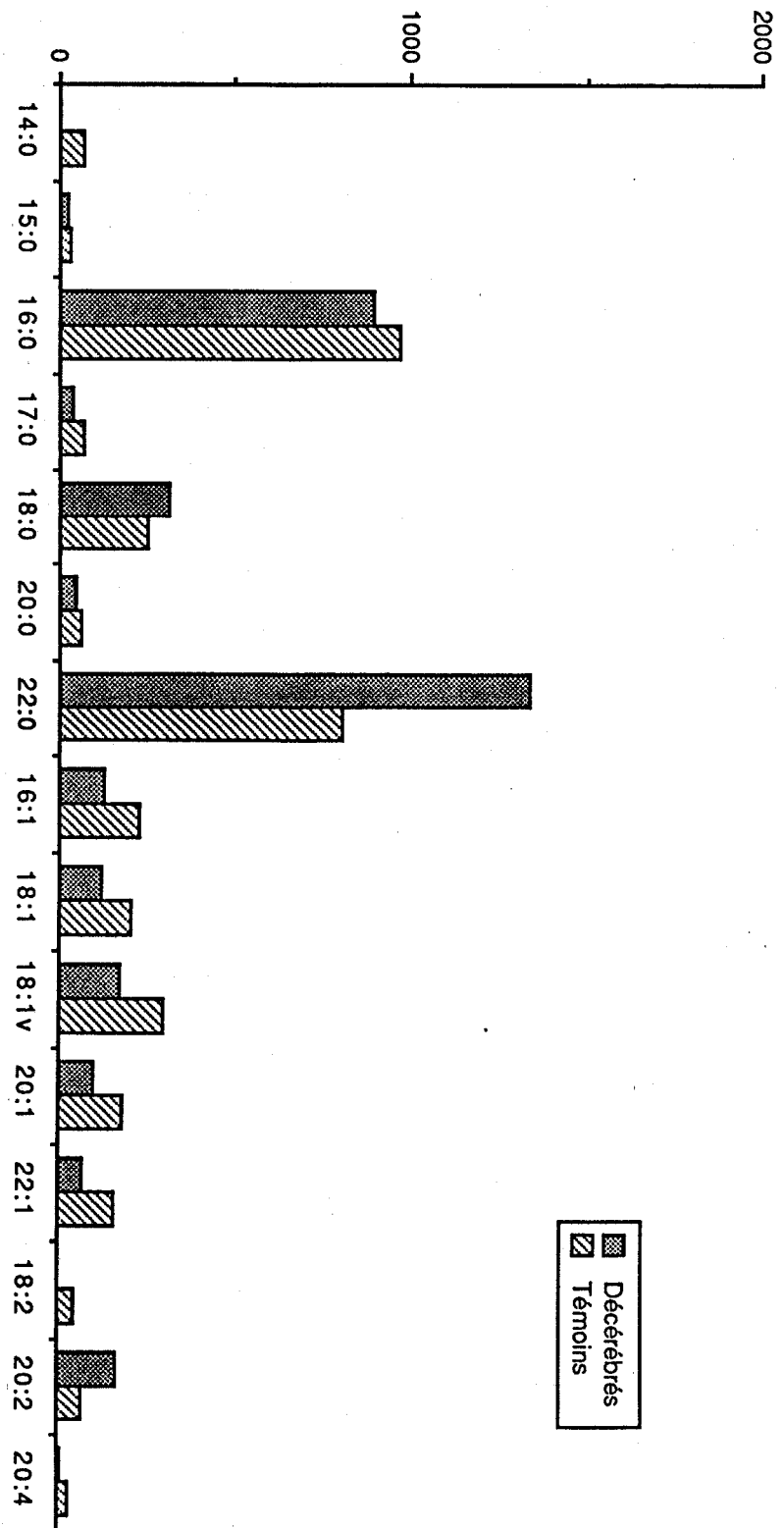


Figure 28 - Influence de la décérébration sur la teneur en acide gras des coelomocytes de *N. diversicolor*
Les animaux opérés (stade initial 130 μ m) ont évolué pendant 16 jours avant l'analyse de leurs A.G.
Résultats exprimés en mg d'A.G. par 10^4 mg de protéines coelomocytaires



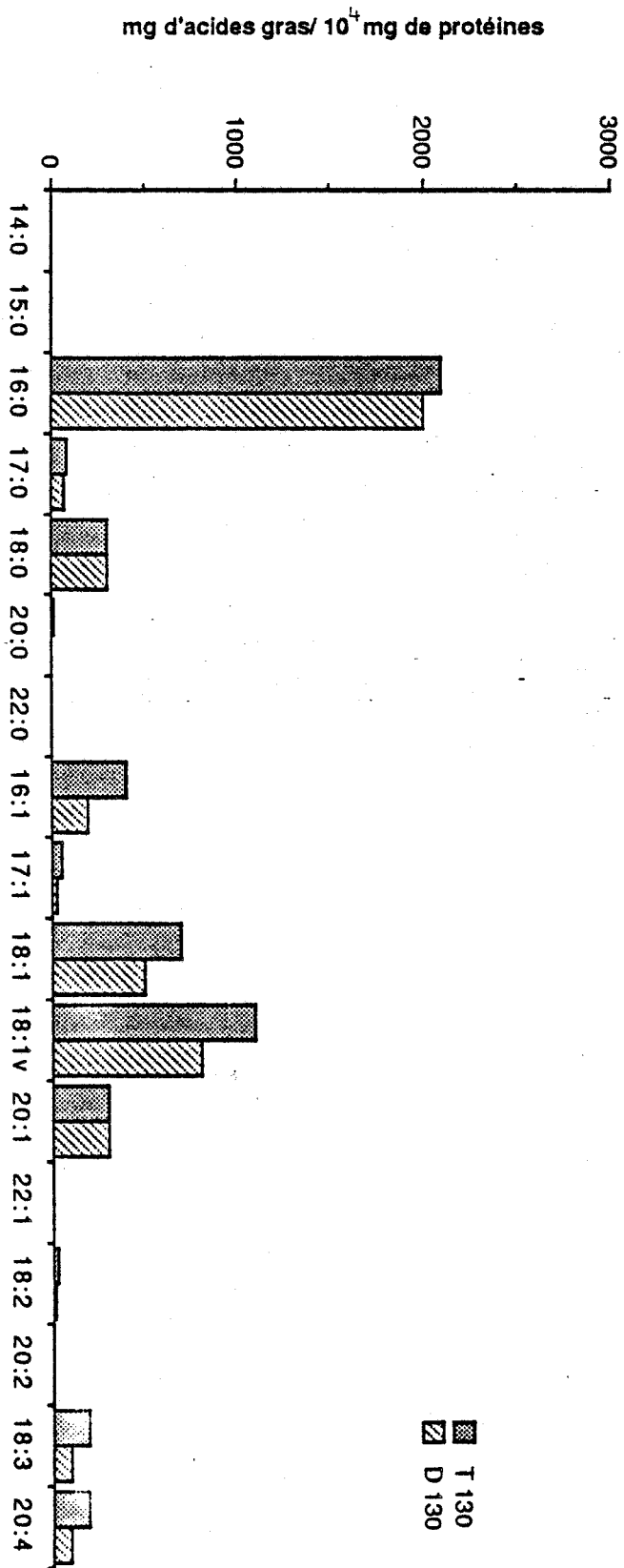


Figure 29 - Influence de la décérébration sur la teneur en acides gras des coelomocytes de *P. cultrifera* (diamètre ovocytaire initial = 130 μ m). Temps de décérébration = 20 jours.
Les résultats sont exprimés en mg.d'Ag par 10⁴ mg de protéines coelomocytaires.

b - Ovocytes

b₁. Chez N. diversicolor

Deux lots d'animaux de 130 μ m de diamètre ovocytaire sont utilisés : les vers du premier lot subissent l'ablation du cerveau et évoluent en absence de l'hormone cérébrale pendant 16 jours. Le deuxième lot sert de témoin. Les ovocytes isolés chez les animaux décérébrés et ceux des témoins subissent l'extraction des lipides totaux qui sont saponifiés puis méthanolysés pour donner des acides gras sous leur forme méthyl-estérifiée.

Le tableau 29 montre les pourcentages de répartition des divers acides gras dans les ovocytes des animaux décérébrés et ceux des témoins.

La figure 30 illustre des résultats exprimés en mg d'acide gras par 10⁴ mg de protéines ovocytaires.

Nous remarquons que l'ac. palmitique (16:0) et l'ac. béhénique (22:0) sont les plus importants à la fois dans les ovocytes expérimentés et témoins.

Par rapport au taux de protéines, les ovocytes d'animaux décérébrés présentent plus d'acides gras que ceux des témoins : 3825 contre 2210 mg d'acides gras par 10⁴ mg de protéines. Cette teneur élevée observée chez les opérés concerne les différentes catégories d'acides gras. Par contre, les pourcentages de répartition (tableau 29) ne montrent pas de différence entre les décérébrés et les témoins. Dans les deux séries d'ovocytes, les acides gras saturés sont prédominants (environ 65 %) suivis des acides gras monoinsaturés (environ 27 %) puis des acides gras polyinsaturés (environ 8 %).

b₂. Chez P. cultrifera

Des animaux de 130 μ m de diamètre ovocytaire récoltés au mois de décembre ont été répartis en 2 lots. Les animaux du premier lot sont décérébrés puis évoluent ensuite pendant 20 jours en absence d'hormone cérébrale. Ceux du deuxième lot servent de témoins (130 μ m). Un troisième groupe d'animaux (160 μ m de diamètre ovocytaire) récoltés à la fin du mois de mars a également été étudié. Les vers de ce groupe sont décérébrés puis évoluent ensuite pendant 15 jours en absence d'hormone cérébrale.

Les ovocytes sont alors récupérés et subissent l'extraction des acides gras à partir des lipides totaux. Le tableau 29 montre que la majeure proportion des acides gras est formée par les acides gras saturés suivis des monoinsaturés. L'ac. palmitique (16:0) compte, selon les séries

Tableau 29 - Influence de la décérébration sur le pourcentage des acides gras des ovocytes chez *N. diversicolor* et *P. cultrifera*.

T 130 = animaux témoins au stade 130 μm de diamètre ovocytaire.

D 130 : animaux décérébrés au stade 130 μm de diamètre ovocytaire.

D 160 : animaux décérébrés au stade 160 μm de diamètre ovocytaire.

	<i>N. diversicolor</i>		<i>P. cultrifera</i>		
	T 130	D 130	T 130	D 130	D 160
AG saturés					
14 : 0	1,3	1,4			
15 : 0	0,8	0,8			
16 : 0	23,7	23	38	42	38
17 : 0	1,6	1,6	2,5	2	3
18 : 0	5,5	5,4	10	11,6	12
20 : 0	4,3	4,7		0,2	
22 : 0	27,7	28			
Total partiel	64,9	64,9	50,5	55,8	53
AG monoinsaturés					
16 : 1	6,2	7	2,5	2	3
17 : 1			0,8	0,6	
18 : 1	6,7	5,7	14	13,5	14
18 : 1 vacc	8	7,5	14	11,6	13
20 : 1	3,7	3,4	7,6	9,6	8
22 : 1	3,5	3,5			
Total partiel	28,1	27,1	38,9	37,3	38
AG polyinsaturés					
18 : 2	2,5	2	0,8	0,7	
20 : 2	3,2	3,4			
18 : 3	0,1	0,2	6	3,8	6
20 : 3	0,1	0,2	3,8	2	3
20 : 4	0,8	1,3			
Total partiel	6,7	7,1	10,6	6,5	9
Indice d'insaturation	0,43	0,44	0,74	0,59	0,68

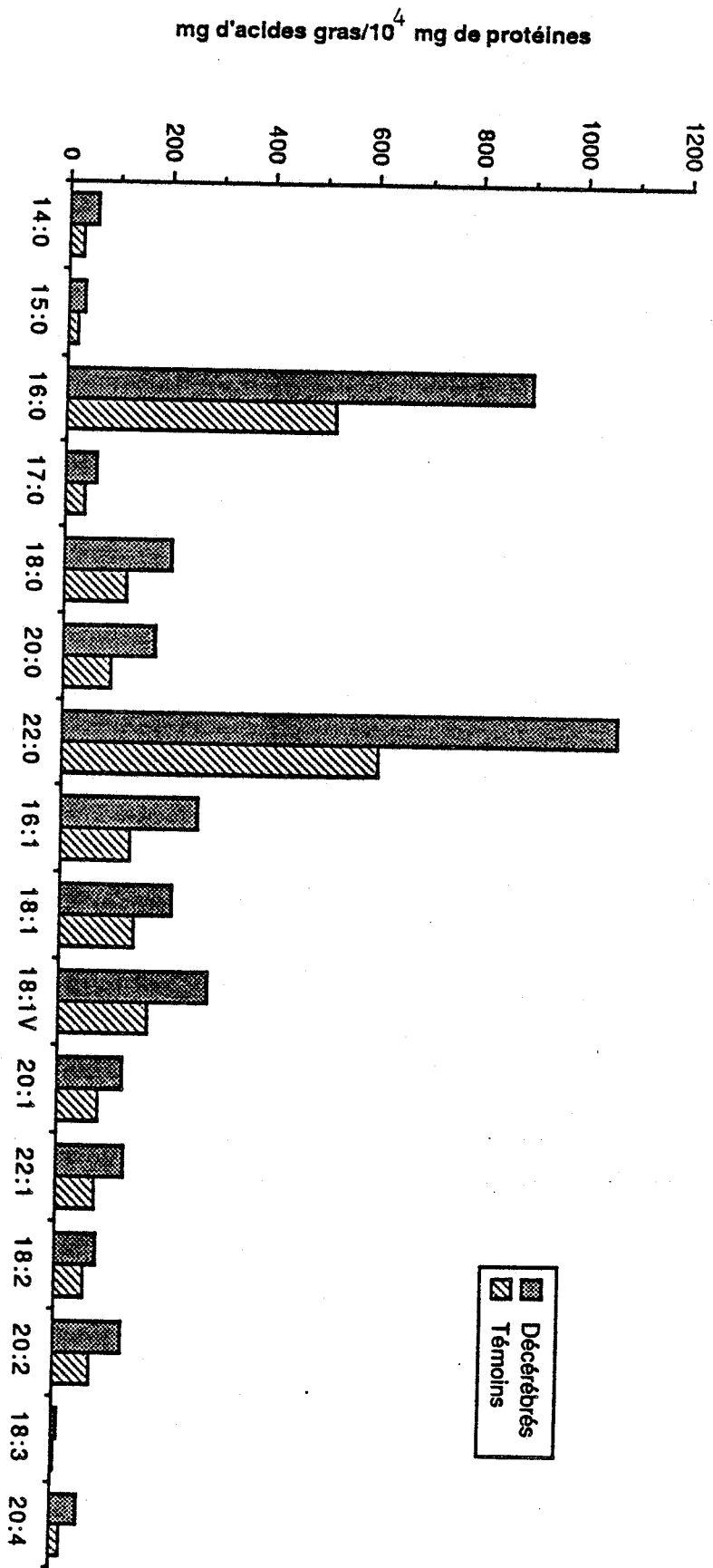
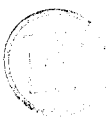


Figure 30 - Influence de la décérébration sur la teneur en acide gras des ovocytes de *N. diversicolor* (diamètre ovocytaire initial = 130 μ m). Temps de décérébration = 16 jours.
 Résultats exprimés en mg d'A.G. par 10^4 mg de protéines ovocytaires.



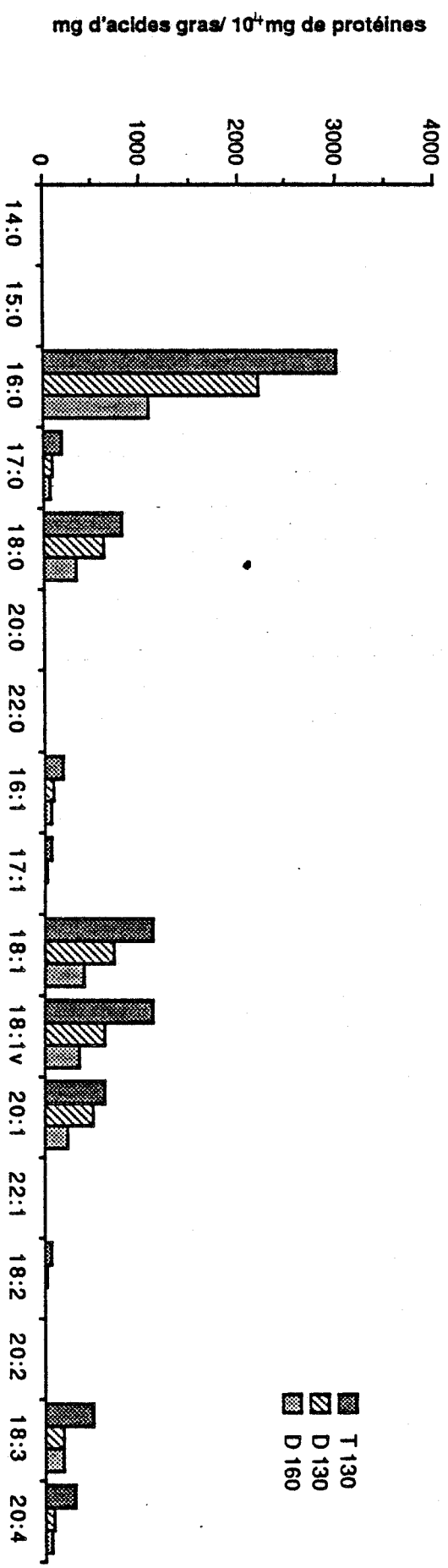


Figure 31 - Influence de la décérébration sur la teneur en acides gras des ovocytes de *P. cultrijerva*

T 130 : ovocytes témoins au stade 130 μ m.

D 130 : ovocytes d'animaux décérébrés au stade 130 μ m.

D 160 : ovocytes d'animaux décérébrés au stade 160 μ m.

Résultats exprimés en mg d'AG/10⁴ mg de protéines ovocytaires



entre 38 % et 42 % de la composition des acides gras totaux. Par ordre d'importance décroissant nous retrouvons ensuite l'ac. stéarique (18:0), l'ac. oléique (18:1) et l'ac. vaccénique (18:1 vacc).

La comparaison des pourcentages par rapport aux acides gras totaux ne montre pas de différence apparente entre les ovocytes d'animaux décérébrés et ceux des témoins. En revanche, nous remarquons une baisse du taux d'acides gras après décérébration (fig. 31). Cette chute est plus importante lorsque la décérébration a porté sur des animaux parvenus au stade 160 μ m de diamètre ovocytaire. La figure 31 montre également une évolution parallèle du taux d'acides gras pour les trois séries d'ovocytes en comparaison.

C - DISCUSSION

Cette étude des acides gras a porté sur les coelomocytes et les ovocytes de deux espèces de Néréidiens : N. diversicolor et P. cultrifera.

Nous avons recherché plus particulièrement une différence éventuelle à la suite d'une modification des conditions hormonales.

Une remarque s'impose au préalable sur l'expression de nos résultats, à savoir que la valeur en acides gras est ramenée aux taux de protéines. Ce rapport a été choisi car l'expression en fonction du poids (sec ou humide) est souvent moins précise d'où source d'erreur, mais il faut être sensible au fait que le taux de protéines évolue en fonction de l'activité physiologique des cellules étudiées. Une diminution du taux d'acides gras par rapport aux taux de protéines ne signifie donc pas que la quantité d'acides gras diminue en valeur absolue mais que la synthèse et le stockage des acides gras s'effectuent d'une façon moins active que celle des protéines.

Comparaison entre ovocytes et coelomocytes

Chez N. diversicolor, les ovocytes et les coelomocytes possèdent les mêmes acides gras saturés et monoinsaturés. Quant aux acides gras polyinsaturés : l'acide linoléique (18:3) et l'acide eicosatriénoïque (20:3), présents en très faible quantité dans les ovocytes (0,1 % de la totalité des acides gras), ils n'ont pas été retrouvés dans les coelomocytes.

Les distributions des acides gras ne montrent pas de différence apparente entre les deux types de cellules. Toutefois, lorsque la teneur en acides gras est ramenée aux taux de protéines, la quantité d'acides gras ovocytaires saturés et monoinsaturés, est plus faible que celle des coelomocytes.

Chez P. cultrifera, les ovocytes contiennent par contre beaucoup plus

d'acides gras que les coelomocytes (résultats exprimés par rapport aux taux de protéines).

Dans les cellules germinales des Invertébrés, le rôle physiologique des acides gras polyinsaturés est considérable. Chez les Echinodermes par exemple, Meijer et al. (1984) montrent que l'acide arachidonique (20:4) et l'acide eicosapentaénoïque (20:5) induisent la maturation des ovocytes de l'étoile de mer.

Dans notre matériel, nous n'avons pas rencontré l'acide eicosapentaénoïque (20:5) mais par contre l'acide arachidonique (20:4) est présent dans les ovocytes et les coelomocytes.

Comparaison entre les deux espèces étudiées

Les coelomocytes et les ovocytes de P. cultrifera apparaissent quantitativement beaucoup plus riches en acides gras (par rapport aux taux de protéines) que ceux de N. diversicolor. Cette différence est due à une teneur importante en acides gras mono et polyinsaturés ; les acides gras saturés ne présentent pas de différence apparente entre les deux espèces.

L'étude qualitative montre que certains acides gras rencontrés dans les ovocytes de N. diversicolor semblent absents chez P. cultrifera. C'est le cas de l'acide myristique (14:0), de l'acide pentadécanoïque (15:0), de l'acide arachidique (20:0), de l'acide béhénique (22:0) et de l'acide gadoléique (20:1). Par contre, l'acide heptadécénoïque (17:1) est présent uniquement chez P. cultrifera. Ces différences dans la composition en acides gras pourraient résulter d'une alimentation différente. Ces deux espèces vivant dans deux faciès différents. En effet, il a été constaté chez les Invertébrés que la nature de l'alimentation est liée à la composition en acides gras de l'animal. Chez les Mollusques par exemple, Benninger et Stephan (1985) ont montré chez Tapes decussatus et T. philipinarum que les acides gras des triglycérides révèlent des modifications saisonnières liées au cycle annuel de la température, processus conditionnant vraisemblablement la nourriture. Chez Mesodesma macroïdes, De Moreno et al. (1976) ont constaté que l'augmentation des acides gras polyinsaturés pendant l'été est en rapport avec la reproduction du plancton.

Les acides gras polyinsaturés sont quantitativement importants dans différents organes des Crustacés (importance des 20:5 et 20:6 de la série W_3). Ici encore, les changements dans la teneur de ces acides gras semblent être liés à la nourriture et aux besoins en acides gras essentiels des différents organes. Les oeufs ont le plus fort taux en acides gras essentiels (Clarke, 1979) ; les phospholipides y sont caractérisés par une grande te-

neur en acides gras insaturés (essentiellement C_{20} et C_{22}) de la série de l'acide linoléique (W_3). Il a été émis l'hypothèse que chez les Crustacés, l'utilisation des acides gras de la série W_3 représente l'un des mécanismes d'adaptation de ces animaux aux changements de salinité et de température du milieu environnant (Chapelle, 1986).

Les pics correspondant à la série W_3 n'ont pas été déterminés avec précision dans notre matériel. L'étude des acides gras à nombre d'atomes de carbone important (supérieur à 20) reste à approfondir.

Contrôle endocrine

Au niveau des coelomocytes, la décérébration provoque chez les 2 espèces étudiées, une diminution du pourcentage des AG monoinsaturés au profit des AG saturés. Rapportés aux protéines, seuls l'acide béhénique augmente par rapport aux témoins chez N. diversicolor ; chez P. cultrifera, la baisse est générale.

Au niveau des ovocytes, une des hypothèses formulées au départ de notre étude était que l'évolution physiologique rapide des ovocytes provoquée par la suppression du contrôle endocrine pouvait s'accompagner d'une modification dans la répartition des différentes classes d'acides gras. En fait, un des résultats de notre étude a été d'enregistrer une assez grande stabilité dans cette répartition. Si peu de modifications qualitatives ont été décelées, par contre des fluctuations quantitatives ont été décelées. Chez N. diversicolor, la suppression de l'activité endocrine cérébrale s'accompagne d'une augmentation du stockage des AG par rapport à la quantité de protéines élaborées. Cette augmentation est enregistrée essentiellement au niveau des acides les plus fréquents, tels l'acide palmitique et l'acide béhénique. Chez P. cultrifera à l'inverse une baisse est constatée.

Cette diminution chez P. cultrifera peut être interprétée en fonction des dosages obtenus par Caner (1981). Celui-ci a constaté que la concentration en lipides est parallèle à la courbe de l'évolution hormonale ; un niveau élevé d'activité hormonale étant corrélatif d'une synthèse lipidique importante. Au cours de l'ovogenèse, les synthèses des protéines et des glucides augmentent plus rapidement que les lipides (fig. 1). Leur prépondérance devient marquante au moment de la maturité lorsque l'hormone a cessé d'être sécrétée. Dans la même espèce, l'étude menée par Baert (1986) montre que les protéines vitellines participent pour une part importante à la composition du matériel protéique de l'ovocyte mature. La cinétique d'accumulation de la vitelline dans l'ovocyte s'amplifie considérablement sur la période de la submaturité. Il est possible d'estimer qu'un ovocyte jeune (120-

130 μm) ne contient que 16 % environ des réserves en vitelline présentes dans un ovocyte mature (260 μm). Plus de 80 % du contenu en vitelline d'un ovocyte est donc fourni à cette cellule pendant la période du grand accroissement. Si les conditions de régulation endocrine de la synthèse et l'accumulation de la vitellogénine restent pour l'instant difficiles à préciser, il semble apparaître, par contre, que la synthèse des lipides nécessite un taux élevé d'hormone, ce processus s'oppose par là à la corticogénèse qui ne se déclenche qu'à l'approche de la maturité génitale (Dhainaut et Porchet, 1977b), lors de la chute des sécrétions hormonales.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

Les données relatives à l'accumulation des lipides au cours de l'ovogenèse des Néréidiens se sont progressivement accumulées au cours des dernières années.

Par des méthodes de dosages, Caner (1981) établit tout d'abord le profil d'accumulation des lipides par rapport aux autres composants ovocytaires : glucides et protéines. Toujours chez P. cultrifera, Fontaine (1982) procède ensuite à l'analyse des différentes classes de lipides neutres et suit l'évolution de celles-ci au cours des différentes phases de l'ovogenèse. Le travail de Belhamra (1985) est orienté davantage sur le métabolisme des divers composants coelomiques. En utilisant des précurseurs radioactifs, il étudie les synthèses de lipides neutres à la fois in vivo et in vitro. Il aborde d'autre part le problème des phospholipides.

Ces résultats autorisaient à passer à une seconde étape d'investigation : rechercher l'influence d'un contrôle endocrine éventuel sur le métabolisme des lipides. Cette analyse a fait appel en grande partie à des incorporations de précurseurs radioactifs (^3H -glycérol, ^3H -choline) in vitro. Cette méthodologie permet de standardiser les conditions d'expérimentation et d'effectuer des comparaisons, soit entre des cellules issues d'animaux ayant subi l'ablation du cerveau et des témoins, soit entre des cellules auxquelles sont ajoutées des doses variées de sécrétions hormonales. Etant donné les relations unissant les coelomocytes et les ovocytes, les études métaboliques ont porté sur chacun de ces compartiments.

La première partie de notre travail a porté sur les synthèses de lipides neutres (LN), à la fois chez N. diversicolor et P. cultrifera. Après incorporation de ^3H -glycérol les coelomocytes présentent d'importantes synthèses de lipides neutres. Ceux-ci sont constitués en majeure partie par des triglycérides (TG) puis viennent par ordre d'importance les DG, SL, MG et AGL.

Comme cela avait été montré par Belhamra (1985) chez P. cultrifera, les ovocytes isolés de N. diversicolor présentent également la capacité d'effectuer des synthèses de lipides, ici encore représentés en majeure partie par des TG. Il est toutefois à souligner que le taux de synthèses ovocytaires est beaucoup plus faible que celui des coelomocytes. Plusieurs raisons peuvent être évoquées à ce sujet. Les ovocytes dans les conditions normales bénéficient vraisemblablement d'une partie de lipides élaborés par les

coelomocytes. D'autre part, il est logique d'admettre que les coelomocytes, régulant la composition du milieu intérieur, présentent un "turn over" lipidique rapide. Par opposition, les synthèses ovocytaires destinées en grande partie au stockage des réserves sont lentes. En effet, la durée de l'ovogenèse est très longue (environ une année) comparée à une incorporation expérimentale s'échelonnant sur quelques heures ou quelques jours. Il est intéressant de noter au passage la capacité que possèdent les Polychètes de synthétiser les stérols. En effet beaucoup d'Invertébrés, tels les Nématodes (Bolla et al., 1972 ; Cole et Krusberg, 1968..) et les Insectes (Lambremont, 1965 ; Downer, 1978..) sont incapables de synthétiser ces éléments qui sont fournis uniquement par l'alimentation.

La suppression du facteur endocrine provoque chez N. diversicolor une chute marquée des synthèses de LN et plus particulièrement des TG. Cette chute intéresse à la fois les coelomocytes et les ovocytes. Chez P. cultrifera, si une baisse sensible est encore observée au niveau des coelomocytes, peu de variations sont enregistrées chez les ovocytes. Ces données rejoignent les observations de Fontaine (1982) qui mentionne que les conditions anhormonales semblent n'exercer que peu d'effets sur le stockage des réserves ovocytaires. Cette différence de réactions au niveau des ovocytes pourrait s'expliquer par suite de la différence d'évolution de ces ovocytes en condition anhormonale (Dhainaut, 1984b). Après décérébration, les ovocytes de N. diversicolor évoluent dans le sens de la dégénérescence, donc d'un arrêt du stockage des réserves. Par contre, les ovocytes de P. cultrifera subissent une croissance accélérée et ne présentent que des anomalies mineures par rapport à l'ovogenèse naturelle.

A l'issue de leurs synthèses, les coelomocytes libèrent dans le milieu de culture des LN représentés essentiellement par les TG (Fontaine, 1982 et cette étude). Ce processus diffère en cela des Insectes (Meyer et Candy, 1967 ; Wheeler, 1984) chez lesquels les LN sont libérés essentiellement sous forme de DG.

Cette libération de TG apparaît conditionnée par le taux d'hormone cérébrale. Des courbes de type dose-réponse sont obtenues à partir des coelomocytes de N. diversicolor lors de l'addition au milieu de culture de prostomiums ou de sécrétions cérébrales. Ce mécanisme rappelle celui observé sur le corps gras des Insectes après action de l'octopamine (Orchard et al., 1983 ; Wheeler et Goldsworthy, 1985).

Il est à noter que les résultats obtenus sur les LN s'opposent dans une certaine mesure à ceux obtenus par Baert (non publiés) en ce qui concerne la libération de la vitellogénine par les coelomocytes. En effet ce métabolisme ne varie pas de façon sensible lors de l'addition des sécrétions cé-

rébrales ou au cours d'une culture prolongée en conditions an hormonales. On peut envisager à ce sujet l'hypothèse que 2 processus métaboliques différents existeraient chez les coelomocytes. La vitelline (lipoglycoprotéine complexe) est incorporée uniquement et de façon spécifique par les ovocytes durant une période très longue. Par contre les lipides neutres (molécules relativement simples) sont vraisemblablement utilisés par plusieurs compartiments différents. Comme chez les Insectes, il est vraisemblable que l'activité musculaire fait appel à ce type de réserves. A la nécessité d'une mobilisation rapide pourrait correspondre la nécessité d'une régulation hormonale à court terme.

La deuxième partie de notre étude a porté sur le métabolisme des phospholipides (PL). Pour des raisons techniques, ce travail a été effectué essentiellement chez P. cultrifera. Il a été entrepris à la suite d'observations préalables réalisées en autoradiographie et qui avaient révélé un taux de radioactivité important au niveau des coelomocytes après incorporation de précurseurs de la synthèse des PL.

L'analyse biochimique montre que les coelomocytes synthétisent activement in vivo et in vitro différentes classes de PL après incorporation de ^{32}P -phosphate. Les classes de PL les plus marquées sont les phosphatidylcholines et une classe X non identifiée.

L'incorporation de ^3H -choline est suivie d'une synthèse de phosphatidylcholine, de lysophosphatidylcholine et de X.

Deux hypothèses pouvaient être formulées au sujet de ces synthèses de PL :

- (a) édification de systèmes membranaires liés à la prolifération de réticulum endoplasmique comme cela a été démontré dans le corps gras des In-tes par Della Ciopa et Engelman (1985) ;
- (b) association à des produits de sécrétions libérés dans le liquide coelomique ou le milieu de culture.

La mise en évidence d'une libération de PL à partir des coelomocytes a permis de conclure à la deuxième hypothèse. En outre, il a été démontré par précipitation au TCA que ces phospholipides sont associés à des protéines. Une identification plus complète de ces phospholipides a été réalisée en comparant les produits de 2 lots d'incubation, l'un réalisé en présence de ^3H -choline, l'autre de ^3H -leucine. La radioactivité est détectée par fluorographie après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Dans ces cas, deux bandes protéiques de poids moléculaires d'environ 530 et 320 kDa sont marquées. Ces deux bandes correspondent aux deux formes de vitellogénine

décrites par Baert (1986a). Il résulte de ces résultats que pour une partie au moins, les PL libérés par les coelomocytes sont associés aux molécules de vitellogénines.

De plus, nous avons pu démontrer que ces phospholipides associés, libérés dans le milieu de culture sont absorbés par l'ovocyte. L'addition d'ovocytes au milieu de culture se traduit par une diminution de la radioactivité de ce milieu. L'analyse de ces ovocytes en CCM y révèle la présence de phospholipides radioactifs. Enfin, la fluorographie réalisée sur les électrophorèses des protéines ovocytaires montre la présence de bandes radioactives proches de celle de la vitelline.

Les ovocytes isolés de P. cultrifera apparaissent également capables de réaliser leur propre synthèse de PL. L'incorporation in vitro de ^3H -choline consiste surtout en synthèse de phosphatidylcholines et lysophosphatidylcholines. Ce taux de synthèse ovocytaire est beaucoup plus faible que celui constaté au niveau des coelomocytes. La localisation de ces PL synthétisés a été recherchée par autoradiographie à haute résolution. Il s'avère que la radioactivité apparaît localisée essentiellement au niveau des synthèses membranaires et notamment de l'appareil de Golgi. Ceci confirme l'hypothèse émise par Dhainaut et Belhamra (1986) dans leur étude sur les ovocytes isolés de N. diversicolor, à savoir que deux types de synthèses endogènes sont effectuées par les ovocytes isolés : une synthèse de LN, lesquels sont stockés dans les lobules lipidiques et une synthèse de PL liés aux systèmes membranaires en cours de différenciation.

L'existence d'un contrôle endocrine au niveau des synthèses de PL a été recherchée, soit par décérébration, soit par addition de différentes doses d'hormone cérébrale selon la méthode utilisée pour l'étude de LN. Seules des fluctuations assez peu marquées ont été enregistrées. On peut pour l'instant, émettre, mais avec prudence, l'hypothèse que les synthèses de PL ne seraient pas contrôlées directement par l'activité hormonale. Cette proposition rejoint les observations de Baert qui n'observe pas, dans les cultures de coelomocytes, de variations importantes de la production de la vitellogénine en fonction du taux d'hormone cérébrale.

La troisième partie du travail a porté sur l'évolution des acides gras (AG) au cours de l'ovogenèse naturelle et expérimentale. Les résultats obtenus dans notre première partie montraient en effet des variations globales du taux d'AG dans des ovocytes et des coelomocytes soumis ou non à l'influence de l'hormone cérébrale.

Les résultats obtenus montrent qu'entre les coelomocytes et les ovocytes d'une même espèce, il existe peu de différences dans la distribution

des différentes classes d'AG. Chez N. diversicolor par exemple, il apparaît que dans les deux types de cellules, les AG saturés sont les plus importants et qu'ils sont représentés essentiellement par l'acide palmitique et l'acide béhénique. Par contre, quantitativement (le taux d'AG est ramené à celui des protéines), il s'avère que le taux d'AG des coelomocytes est supérieur à celui des ovocytes chez N. diversicolor. Chez P. cultrifera, par contre, les ovocytes contiennent beaucoup plus d'AG que les coelomocytes. Une comparaison entre les deux espèces fait apparaître un certain nombre de différences dans la composition en AG. C'est ainsi que les acides : myristique, pentadécanoïque, arachidique et béhénique sont présents dans les ovocytes de N. diversicolor alors qu'ils semblent absents dans ceux de P. cultrifera. Par contre l'acide heptadécénoïque n'est présent que chez ces derniers. Ces variations pourraient correspondre à des différences dans les régimes alimentaires de ces 2 espèces. C'est ainsi que chez les Mollusques, Beninger et Stephan (1985) et De Moreno et al. (1976) constatent des fluctuations saisonnières dans la composition en acides gras, qui résultent vraisemblablement d'une modification du régime alimentaire. Chez les Crustacés, la composition en AG paraît également liée à des adaptations physiologiques (Chapelle, 1986).

En l'absence d'hormone cérébrale, des remaniements ont été observés au niveau d'AG des coelomocytes. Dans les deux espèces étudiées, on constate une diminution du pourcentage des AG monoinsaturés au profit des AG saturés.

Au niveau des ovocytes, une grande stabilité dans la répartition des différentes classes d'AG caractérise l'évolution en l'absence d'hormone. Ce résultat est assez surprenant étant donné la diversité des processus métaboliques déclenchés par l'évolution expérimentale.

Par contre, par rapport aux taux de protéines une évolution quantitative a été observée.

Chez N. diversicolor, la suppression de l'activité endocrine s'accompagne d'une augmentation du taux d'AG par rapport à la quantité de protéines élaborées. il est possible que dans cette espèce, où les ovocytes sont voués à la dégénérescence en condition an hormonale, les synthèses protéiques s'arrêtent avant celles des acides gras.

Chez P. cultrifera au contraire, on constate une régression constante de la quantité d'AG. Ces résultats recourent les données que nous avons recueillies dans cette espèce en comparant des ovocytes à différents stades de l'ovogenèse naturelle. A l'approche de la maturation, donc quand l'activité cérébrale s'annule, le taux d'AG diminue progressivement.

Ces données rejoignent les résultats des dosages effectués par Caner (1981) (Fig. 1) chez P. cultrifera. Il constate qu'un niveau élevé de l'activité hormonale est corrélatif d'une synthèse lipidique importante. Puis par rapport aux constituants ovocytaires, l'accumulation des lipides décroît quand se ralentit l'activité cérébrale.

En conclusion, l'hormone cérébrale semble exercer une action stimulatrice sur les synthèses de lipides. Ce processus est particulièrement net chez N. diversicolor où il concerne à la fois les ovocytes et les coelomocytes. Chez ces derniers, le facteur hormonal stimule également in vitro la libération de lipides neutres représentés essentiellement par des TG. Chez P. cultrifera l'action hormonale est surtout sensible au niveau des coelomocytes. Les synthèses de phospholipides par contre ne semblent pas directement corrélées par l'activité cérébrale.

Les modalités d'action du facteur endocrine restent pour l'instant uniquement du domaine des hypothèses. Parmi celles-ci on peut envisager à titre de réflexion le problème des récepteurs ou celui d'un contrôle (direct ou indirect) sur les chaînes métaboliques.

BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal H.C. et Rao K.D.P., 1969. Variations in the neutral lipids of Dysdercus koenigii (Hemiptera) during its life cycle. J. Insect Physiol., 15, 161-166.
- Baert J.-L., 1985. Multiple forms of vitellin in young oocytes of Perinereis cultrifera (Polychaete Annelid) : Occurrence and relation to vitellin maturation in the oocyte. Comp. Biochem. Physiol., 81B, 851-856.
- Baert J.-L., 1986a. Evidence for vitellin maturation within oocytes of Perinereis cultrifera (Polychaeta Annelid). Comp. Biochem. Physiol., 83B, 847-853.
- Baert J.-L., 1986b. Vitelline et organisation de la vitellogénèse protéique chez Perinereis cultrifera (Annélide Polychète). Thèse Doctorat Sciences Naturelles, Université de Lille I.
- Baert J.-L., Sautière P. and Porchet M., 1984. Purification and Characterization of oocyte vitellin from Perinereis cultrifera (Polychaeta Annelid). Eur. J. Biochem., 142, 527-532.
- Barth C.A., 1983. Regulation and Interaction of cholesterol, Bile Salt and lipoprotein synthesis in liver. Kohn wochenschr, 61, 1163-1170.
- Beenackers A.M.Th., 1969. The influence of Corpus allatum and Corpus cardiacum on lipid metabolism in Locusta migratoria. Gen. comp. Endocrinol., 13, 492.
- Beijnink F.B., Van der Sluis I. and Voogt P.A., 1984. Turn over 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.
- Belhamra A., 1985. Contribution à l'étude du métabolisme des lipides neutres et des phospholipides au cours de la gamétogénèse des Néréidiens (Annélides Polychètes). Thèse 3ème Cycle, Université de Lille I.
- Beninger P.G. and Stephan G., 1985. Seasonal variations in the fatty acids of triacylglycerols and phospholipids of two populations of adult clams (Tapes decussatus L. and T. philippinarum) reared in a common habitat. Comp. Biochem. Physiol., 81B, 591-601.
- Bertout M., 1973. Relations entre l'évolution du nucléole et l'activité endocrine cérébrale au cours de l'ovogénèse de Nereis diversicolor dans les conditions naturelles et expérimentales. Wilhelm Roux' Archiv, 173, 183-207.

- Bertout M. et Dhainaut A., 1971. Etude cytochimique et autoradiographique de l'ovogénèse de Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. Gen. Comp. Endocrinol., 17, 371-387.
- Blight E.G. and Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917.
- Boeva N.P. and Mrochkov K.A., 1981. Changes in fatty acid composition of Krill lipids in preparation of food-stuffs by various methods. Rybnoye khoz'aystvo, 9, 70-71.
- Boilly-Marer Y., 1962. Inhibition des transformations hétéronéréidiennes par le cerveau d'espèces sans épitoque (Néréidiens). C. R. Acad. Sc., 254, 2830-2832.
- Bolla R.I., Weinstein P.P. and Lou C., 1972. In vitro nutritional requirements of Nippostrongylus brasiliensis. I. Effects of sterols, sterol derivatives and heme compounds on the free-living stages. Comp. Biochem. Physiol., 78B, 805-811.
- Bollade D. et Boucrot P., 1973. Incorporation d'acides gras radioactifs alimentaires dans les lipides chez Periplaneta americana. Insect. Biochem. 3, 123-137.
- Borovsky D., Thomas B.R., Carlson D.A., Whisenton L.R. et Fuchs M.S., 1985. Juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone as primary and secondary stimuli of vitellogenesis in Aedes aegypti. Arch. Insect Biochem. Physiol., 2, 75-90.
- Bottino N.R., 1975. Lipid composition of two species of Antarctic krill : Euphausia superba and E. crystallorophias. Comp. Biochem. Physiol., 50B, 479-484.
- 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.
- Bulet P., Hoflack B., Verbert A. et Porchet M., 1983. Simple procedure to isolate coelomocyte-free oocytes from coelomic fluid of Perinereis cultrifera Grube (Annelida ; Polychaeta). Experientia, 39, 436-437.
- Caner F., 1981. Contribution à l'étude biochimique de l'ovogénèse de Perinereis cultrifera (Annélide Polychète). Thèse 3ème Cycle, Lille I.
- Cardon C., 1979. Etudes biochimiques de la sexualisation et de la régénération chez les Annélides. I. Isolement des substances : inhibitrice (hormone cérébrale) et régulatrice (feed-back) de la sexualisation chez deux Annélides Polychètes : Nereis diversicolor et Perinereis cultrifera. II. Isolement du facteur inhibiteur de la régénération chez l'Annélide Oligochète Eisenia foetida. Thèse Doctorat Etat, Lille.

- Chapelle S., 1986. Aspects of phospholipid metabolism in Crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 48B, 423-439.
- Chapelle S., Brichon G., Abdul Malak and Zwingelstein G., 1986. Influence of salinity on ^3H -serine incorporation into lipids of the Chinese crab Eriocheir sinensis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B, 511-515.
- Chapelle S. and Zwingelstein G., 1984. Phospholipid composition and metabolism of Crustacean gills as related to changes in environmental salinities: relationship between Na^+ - K^+ -ATPase activity and phospholipids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 363-372.
- Chen T.T. et Wytt G.R., 1981. Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in Locusta migratoria. In : The regulation of insect development and behavior, F. Sehnael and A. Zabra Eds, Technical University of Wroclaw Press, Wroclaw, Poland, pp. 535-536.
- Chino H., Murakami S. and Harashima K., 1969. Diglyceride-carrying lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 1-26.
- Chino H., Yamagata M; et Sato S., 1977. Further characterization of Lepidopteran vitellogenin from haemolymph and mature eggs. *Insect Biochem.*, 7, 125-131.
- Chinzei Y., Chino H. and Wyatt G.R., 1981. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from Locusta migratoria. *Insect Biochem.*, 11, 1-7.
- Chitwood D.J., Hutzell P.A. and Lusby W.R., 1985. Sterol composition of the corn cyst nematode, Heterodera zeae, and corn roots. *J. Nematol.*, 17, 64-68.
- Chitwood D.J., Lusby W.R. and Salt T.A., 1987. Sterol metabolism in the Nematodes Panagrellus redivivus, Turbatrix aceti and Caenorhabditis elegans. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86B, 103-107.
- Clark R.B., 1969. Endocrine influence in Annelids. *Gen. Comp. Endocrinol.*, suppl. 2, 572-581.
- Clark R.B. and Ruston R.J.G., 1963. The influence of brain extirpation on oogenesis in Polychaetes N. diversicolor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3, 529-541.
- Clarke A., 1979. Lipid content and composition of the Pink shrimp, Pandalus montagui (Leach) (Crustacea : Decapoda). *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 38, 1-17.
- Cole R.J. and Krusberg L.R., 1968. Sterol metabolism in Turbatrix aceti. *Life Sci.*, 7, 713-724.

- Comley J.C.W. and Jaff J.J., 1981. Isoprenoid biosynthesis in adult Brugia pahangi and Dirofilaria immitis. J. Parasitol., 67, 609-616.
- Dales R.P., 1957. Preliminary observations on the role of coelomic cells in food storage and transport in certain polychaetes. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 36, 91-110.
- Dakhama A., 1983. Contribution à l'étude cytophysiologique de l'intestin des Néréidiens (Annélides Polychètes). Thèse 3ème Cycle, Lille I.
- Della-Cioppa G and Engelmann F., 1984a. 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., and Engelmann F., 1984b. Juvenile hormone regulation of phospholipid synthesis in the endoplasmic reticulum of vitellogenic fat body cells from Leucophaea maderae. Insect Biochem., 14, 27-36.
- De Moreno J.E., Moreno V.J. and Brenner R., 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, Mesodesma macroides. I. Composition of the lipids. Lipids, 11, 334-340.
- Denning G.M., Figard P.H., Kaduce T.L. and Spector A.A., 1983. Role of triglycerids in endothelial cell arachidonic acid metabolism. J. Lipid Res., 24, 993-1001.
- De Renobales M. and Blomquist G.J., 1984. Biosynthesis of medium chain fatty acids in Drosophila melanogaster. Arch. Biochem. Biophys., 228, 407-414.
- De Vooy 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., 1964. Contribution à l'étude du métabolisme de l'ARN, par incorporation de ³H-uracile, au cours de l'ovogénèse chez N. diversicolor. Bull. Soc. Zool. Fr., 89, 408-413.
- Dhainaut A., 1967. Etude de la vitellogénèse chez Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète) par autoradiographie à haute résolution. C. R. Acad. Sci., 265D, 434-436.
- Dhainaut A., 1968. Etude par autoradiographie des mucopolysaccharides acides au cours de l'ovogénèse de N. pelagica L. (Annélide Polychète). J. Microsc., 7, 1075-1080.
- Dhainaut A., 1970a. Contribution à l'étude de la gamétogénèse des Néréidiens dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. Thèse Doct Sci. Nat., Lille I.

- Dhainaut A., 1970b. Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution oocytaire de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). I. Ovogénèse naturelle. Z. Zellforsch., 96, 375-389.
- Dhainaut A., 1970c. Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution oocytaire de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). II. Evolution expérimentale en absence d'hormone cérébrale. Z. Zellforsch., 104, 390-404.
- Dhainaut A., 1984a. Aspects cytophysiologiques des coelomocytes de Néréidiens (Annélides Polychètes). Arch. Anat. Microsc. Morphol. exp., 73, 133-150.
- Dhainaut A., 1984b. Oogenesis in polychaetes. Ultrastructural differentiation and metabolism of nereid oocytes. Fortschritte Zool., 29, 184-205.
- Dhainaut A. and Belhamra A., 1986. Evidence for sytnthesis in vitro of neutral lipids by isolated oocytes of Perinereis cultrifera (Annelida, Polychaeta). A biochemical and autoradiographic study. Int. J. Invert. Reprod. Develop., 10, 275-284.
- Dhainaut A. et Porchet M., 1977a. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de P. cultrifera (Annélide Polychète) 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 P. cultrifera (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. III. Etude autoradiographique des ovocytes submatures. Biol. Cell., 28, 241-250.
- Dhainaut A., Porchet M. et Fontaine F., 1980a. Identité immunologique et métabolique entre le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes de Perinereis cultrifera (Annélide Polychète). Int. J. Invert. Reprod. 2, 285-296.
- Dhainaut A., Porchet M. et Fontaine F., 1980b. La vitellogénèse chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). Bull. Soc. Zool. F., 105, 395-400.
- Dhainaut A., Porchet M., Fischer A. and Baert J.-L., 1984. Biochemical and metabolic aspects of oocyte differentiation in Nereids (Annelida, Polychaeta). Adv. Invert. Reprod., 3, 3-16.
- Downer R.G., 1978. Functional role of lipids in insects. In "Biochemistry of Insects". Rockstein M. Ed., Acad. Press New York, pp. 57-92.
- Durchon M., 1948. Epitoque expérimentale chez deux Polychètes : P. cultrifera et N. irrorata. C. R. Acad. Sci., 227, 157-158.
- Durchon M., 1949. Inhibition de l'épitoque par le prostomium chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). C. R. Acad. Sci., 229, 81-82.

- Durchon M., 1952. Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim., 15, 119-206.
- Durchon M., 1956. Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoquie chez les Néréidiens. Ann. Sc. Nat. Zool. Biol. Anim., 18, 269-273.
- Durchon M., 1967. Rôle du système nerveux dans la régénération chez les Annélides. Bull. Soc. Zool. Fr., 92, 319-331.
- Durchon M. et Dhainaut A., 1964. Influence de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur la croissance des ovocytes. Etude en culture organotypique. C. R. Acad. Sci., 259, 917-919.
- Durchon M., Montreuil J. et Boilly-Marer Y., 1963. Résultats préliminaires sur la nature chimique de l'hormone inhibitrice du cerveau des Néréidiens. C. R. Acad. Sci., 257, 1807-1808.
- Durchon M. et Porchet M. 1971. Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle naturel. Gen. comp. Endocrinol., 16, 555-565.
- Dutky S.R., Robbins W. E. and Thompson J.V., 1967. The demonstration of sterols as requirements for the growth development and reproduction of the DD-136 nematode. Nematologica, 13, 140.
- Fast P.A., 1970. Insect lipids. Prog. chem. Fats 11, 181-242.
- Fauvel P., 1959. Classe des Annélides Polychètes. In : Traité de Zoologie de P.P. Grassé, Masson Ed, V, 1, 13-196.
- Fischer A., 1979. A vitellin-like antigen in the coelomic fluid of maturing Nereis virens females. Naturwiss. 66, 316.
- Folch J., Lees M. and 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 Perinereis cultrifera Grube. Les relations métaboliques entre le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes chez les Annélides Polychètes. Etude comparative avec les autres invertébrés. Thèse 3ème Cycle, Lille I.
- Fontaine F., Gevaert M.-H. and Porchet M., 1984a. 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. and Porchet M., 1984b. Acylglycerol metabolism in the coelomic constituents during vitellogenesis of Perinereis cultrifera (Annelida, Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., 77B, 581-584.

- Forneris S., Guidetti M.L. and Sarra C., 1981. Quantitative determination of eicosapentanoic acid in some species of aquatic animals. *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.*, 10, 155-158.
- Fried B., and Bradford J.D., 1984. Histochemical and thin-layer chromatographic analyses of Neutral Lipids in various host sites infected with Leucochloridiomorpha constantiae (Trematoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 175-177.
- Giddings G.G. and Hill L.H., 1975. The effect of treatment on lipid fractions and basic fatty acid of the muscle blue crab (Callinectes sapidus) *J. Food Sci.*, 40, 1127-1129.
- Gilbert L.I., 1967. Changes in lipid content during the reproductive cycle of Leucophaea maderae and effects of juvenile hormone on lipid metabolism in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.*, 21, 237-257.
- Goad L.J., 1981. Sterol biosynthesis and metabolism in marine invertebrates. *Pure appl. Chem.*, 53, 837-852.
- Goldsworthy G.J., 1983. The endocrine control of flight metabolism in Locusts. *Adv. Insect Physiol.*, 17, 149-204.
- Hack M.H., Gussan A. E. and Lowe M.E., 1962. Comparative lipid biochemistry. I. Phosphatides of invertebrates (Porifera to Chordata). *Comp. Biochem. Physiol.*, 5, 217-221.
- Hauenschild C., 1956. Hormonale Hemmung der Geschlechtsreife und Metamorphose bei dem Polychaeten Pl. dumerilii. *Naturforsch.*, 11b, 125-132.
- Hieb W.F. and Rothstein M., 1968. Sterol requirement for reproduction of a free-living nematode. *Science*, 160, 778-780.
- Isay S.V. and Busarova N.G., 1984. Study on fatty acid composition of marine organisms. I. Unsaturated fatty acids of Japan sea invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B, 803-810.
- Jarzebski A., Wenne R. and Habermehl G., 1986. Anatomical distribution of lipids and sterols in Macoma balthica (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B, 135-137.
- Jenkin H., Townsend D., Makino S., and Yang T., 1971. Comparative lipid analysis of Aedes aegypti and monkey kidney cells (MK-2) cultivated in vitro. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 55, 970-1002.
- Johns R.B., Nichols P.D. and Perry G.J., 1980. Fatty acid components of nine species of molluscs of the littoral zone from Australian waters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65B, 207-214.
- Joseph G.D., 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II : Mollusca Progress in Lipid Research, 21, 109-153. Pergamon Press Oxford.

- Kallapur V.L., Ramamohanrao Y. and Narasubhai A.V., 1984. Triacylglycerol synthesis in the premolt field crab Paratelphusa hydrodromus (Milne-Edwards)(Crustacea). Arch. Int. Physiol. Biochim., 92, 119-124.
- Komai Y., Matsukawa S; and Satake M., 1973. Lipid composition of nervous tissue of the invertebrates Aplisia kurodai (Gasteropoda) and Cambarus clarki (Arthropoda). Biochim. Biophys. Acta, 316, 271-281.
- Koning A.J., 1972. Phospholipids of marine origin. VI. The octopus (Octopus vulgaris). J. Sci. Fd. Agric., 23, 1471-1475.
- Korte K. and Casey L., 1982. Phospholipid and Neutral Lipid separated by one dimensional T.L.C. J. Chromatogr., 232, 47-53.
- Kramer J.K.G., Fouchard R.C. and Farnworth E.R. (1983). A complete separation of lipids by Three-Directional T.L.C.. Lipids, 18, 896-899.
- Lambremont E.N., Stein C.I. and Bonnet A.F., 1965. Synthesis and metabolic conversion of fatty acids by the larvalboll weevil. Comp. Biochem. Physiol., 16, 289-302.
- Lautier J., 1974. Influences externes et internes sur les teneurs en lipides et en eau de l'hépatopancréas du crabe : Pachygrapsus marmoratus (Fabricius, 1987). Thèse 3ème Cycle, Montpellier.
- Lee R.F. and Puppione D.L., 1978. Serum lipoproteins in the spiny lobster, Panulirus interruptus. Comp. Biochem. Physiol., 59B, 239-243.
- Lewis R.W., 1967. Fatty acid composition of some marine animals from various depths. J. Fish. Bd. Canada, 24, 1101-1115.
- Lilly M.L. and Bottino N.R., 1981. Identification of arachidonic acid in Gulf of Mexico shrimp and degree of biosynthesis in Pinaeus setiferus. Lipids, 16, 871-875.
- Loulodes S.J., Vaughn J.L. and Daugherty K.A., 1973. Fatty acid profiles of cells from the insect cell line IPRL-21 (Spodoptera frugiperda) and of the tissue culture medium after repeated use. In vitro, 8, 473-479.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.Q. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Lubet P., Brichon G., Besnard J.Y. and Zwingelstein G., 1985. Composition and metabolism of lipids in some tissues of the mussel Mytilus galloprovincialis L. (Mollusca Bivalvia). In vivo and in vitro incorporation of 1(3)- ³H -glycerol. Comp. Biochem. Physiol. 82B, 425-431.
- Lubet P., Brichon G., Besnard J.Y. and Zwingelstein G., 1986. Sexual differences in the composition and metabolism of lipids in the mantle of the mussel Mytilus galloprovincialis LMK (Mollusca Bivalvia). Comp. Biochem. Physiol., 84B, 279-285.

- Luukkonen A., Brummer-Korvenkontio M. and Renkonen O., 1973. Lipid of cultured mosquito cells (Aedes albopictus) comparison with cultured mammalian fibroblasts (BHK cells). Biochem. biophys. Acta, 326, 256-261.
- Mayer R.J. and Candy D.J., 1967. Changes in haemolymph lipoproteins during locust flight. Nature, Lond., 215, 987.
- Mayer R.J. and Candy D.J., 1969. Control of haemolymph lipid concentration during locust flight. An adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. J. Insect Physiol., 15, 611-620.
- McLaughlin J., 1971. Biochemical studies on Eisenia foetida, the brandling worm. I. Tissue lipids and sterols. Comp. Biochem. Physiol., 38B, 147-163.
- McMeans E., Yang T., Anderson L.E. and Jenkin H.M., 1975. Comparison of lipid composition of Aedes aegypti and Aedes albopictus cells obtained from logarithmic and stationary phases of growth. Lipids, 10, 99-104.
- Meijer L. and Guerrier P., 1984. Maturation and fertilization in starfish oocytes. Int. Rev. Cytol., 86, 129-196.
- Meijer L., Guerrier P. and Maclouf J., 1984. Arachidonic acid, 12- and 15-hydroxyeicosatetraenoic Acids, Eicosapentaenoic Acid, and phospholipase A₂ induce starfish oocyte maturation. Develop. Biol., 106, 368-378.
- Miller K.W. and Small D.M., 1983. Surface-to-Core and interparticle equilibrium distributions of triglycerid-rich lipoproteins lipids. J. Biol. Chem., 258, 13772-13784.
- Mueller H.W., Loeffler E. and 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.
- Moore J.W., 1976. The proximate and fatty acid composition of some estuarine crustaceans. Estuarine coast mar. Sci., 4, 215, 224.
- Neiland K.A. and Scheer B.T., 1953. The influence of fasting and sinus gland removal on body composition of Hemigrapsus nudus. Physiol. Comp. Oecol., 3, 321-326.
- Nelson D.R. and Sukkestad D.R., 1968. Fatty acid composition of the diet and larvae and biosynthesis of fatty acids from ¹⁴C-acetate in the cabbage looper, Trichoplusia ni. J. Insect Physiol., 14, 293-300.
- O'Connor J.D. and Gilbert L.I., 1969. Alterations in lipid metabolism associated with premolt activity in a land crab and fresh water crayfish. Comp. Biochem. Physiol., 29, 889-904.
- Orchard I., 1987. Adipokinetic hormones. An update. J. Insect Physiol., 33, 451-463.

- Orchard I., Carlisle J.A., Loughton B.G., Gole J.W.D. and Downer R.G.H., 1982. In vitro studies on the effects of Octopamine on Locust fat body. Gen. comp. Endocrinol., 48, 7-13.
- Orcutt D.M., Fox J.A. and Jake C.A., 1978. The sterol, fatty acid and hydrocarbon composition of Globodera solanacearum. J. Nematol., 10, 264-269.
- Orr C.W.M., 1964. The influence of nutritional and hormonal factors on egg development in the blowfly Phormia regina (Meig). J. Insect Physiol., 10, 53-64.
- Paradis M. and Ackman R.G., 1976. Localization of marine source of odd chain-length fatty acids. I. The amphipod Pontoporeia femorata (Kröyer). Lipids, 11, 863-870.
- Peled Y. and Tietz A., 1973. Fat transport in the locust, Locusta migratoria : the role of protein synthesis. Biochem. Biophys. Acta, 296, 499-509.
- Pocock D.M.E., Marsden J.R. and 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.
- Pollero R.J., Huca G. and Brenner R.R., 1985. Role of hemocytes and plasma on lipid transport in the freshwater mollusc Diplodon delodontus. Comp. Biochem. Physiol., 82A, 339-343.
- Porchet M., 1970. Relations entre le cycle hormonal cérébral et l'évolution ovocytaire chez Perinereis cultrifera. Gen. comp. Endocrinol., 15, 220-231.
- Porchet M., 1974. Activité endocrine cérébrale chez les Nereidae. Données quantitatives, influence sur la teneur en glucides des ovocytes et du liquide coelomique, mécanisme régulateur de la sécrétion hormonale. Thèse Doct. Etat, Lille I.
- Porchet M., 1976. Données actuelles sur le contrôle endocrine de la maturation génitale des Néréidiens (Annélides Polychètes). Ann. Biol., 7-8, 329-377.
- Porchet M. and Cardon M., 1976. The inhibitory feed-back mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in Nereis. Gen. comp. Endocrinol., 30, 378-390.
- Porchet M. et Dhainaut A., 1980. Régulation interne de l'activité endocrine cérébrale chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). Bull. Soc. Zool. Fr., 105, 109-114.
- Porchet M., Dhainaut A. et Cardon C., 1981. Conditions endocrines de la reproduction chez les Annélides marines. Oceanis, 7, 739-747.

- Porchet M., Gaillet N., Sauber F., Charlet M. and Hoffmann J.A., 1984. Ecdysteroids in Annelids. "Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate hormones". Hoffmann J. and Porchet M., Eds, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 436-438.
- Porchet M. and Spik G., 1978. Biochemical analysis of Nereidae gametogenesis. Evolution of glycoconjugates during naturel oogenesis of P. cultrifera. Comp. Biochem. Physiol., 59B, 179-181.
- Porchet M., Spik G. et Dhainaut A., 1977. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de Perinereis cultrifera (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. I. Etude biochimique. Biol. Cell., 28, 225-232.
- Rapport M.M. and Alonzo N.F. (1960). The structure of plasmalogens. V. Lipids of marine invertebrates. J. Biol. Chem., 235, 1953-1956.
- Setsuko E., Masahiro A., Aybe K., Kokubo T., Yamoto S. and Mitsuhashi T., 1980. Total lipids, fatty acids and sterols from three species of Crustacea. Tokyo Gakugei Daigaku Kiyo, Dai-4-bumon 32, 91-94.
- 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., Lille I.
- Sroka P. and Barth R.H., 1975. Initiation and regulation of oocyte growth by the brain and corpora allata of the cockroach, Nauphoeta cinerea. J. Insect Physiol., 21, 321-330.
- Sroka P. and Barth R.H., 1976. Hormonal control of diglyceride metabolism during vitellogenesis in the cockroach, Eublaberus posticus. J. Insect Physiol., 22, 951-954.
- Stadler M.J., 1969. Studies on assimilation, mobilization, and transport of lipids by the fat body and haemolymph of Pyrrhocoris apterus. J. Insect Physiol., 15, 2319-2344.
- Stanley-Samuelson D.W. and Dadd R.H., 1983. Long-chain polyunsaturated fatty acids : patterns of occurrence in insects. Insect Biochem., 13, 549-558.
- Stanley-Samuleson D.W., Keddie B.A. and Volkman L.E., 1986. Fatty acid composition of whole bodies, specific tissues and cell lines of two Lepidopteran insects. Comp. Biochem. Physiol., 85B, 369-373.
- Stanley-Samuelson D.W. and Loher W., 1983. Arachidonic and other long-chain polyunsaturated fatty acids in the spermatophores and spermathecae of Teleogryllus commodus : significance in prostaglandin mediated reproductive behavior. J. Insect Physiol., 29, 41-45.

- Stanley-Samuleson D.W. and Pipa R.L., 1984. Phospholipid fatty acids from exocrine and reproductive tissues of male American cockroaches, Periplaneta americana (L.). Arch. Insect Biochem. Physiol., 1, 161-166.
- Stephen W.F. Jr and Gilbert L., 1969. Fatty acid biosynthesis in the silkworm, Hyalophora cecropia. J. Insect Physiol., 15, 1833-1854.
- Takahashi H. and Yamada M., 1976. Lipid composition of seven species of crustacean plankton. Nippon Suisan Gakkaishi, 42, 769-776.
- Takagi T., Eaton C.A. and Ackman R.G., 1980. Distribution of fatty acids in lipids of the Common Atlantic sea urchin Strongylocentrotus droebachiensis. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37, 195-202.
- Thomas K.K., 1974. Lipid composition of the fat body and haemolymph and its relation to lipid release in Oncopeltus fasciatus. J. Insect Physiol., 20, 845-858.
- Thomas K.K., 1984. Studies on the absorption of lipid from the gut of desert locust, Schistocerca gregaria. Comp. Biochem. Physiol., 77A, 707-712.
- Thomas K.K. and Gilbert L.I., 1967. In vitro studies on the release and transport of phospholipids. J. Insect Physiol., 13, 963-980.
- Tietz A., 1962. Fat transport in locust. J. Lipid Res., 3, 421-426.
- Tietz A., 1967. Fat transport in the locust : the role of diglycerides. Eur. J. Biochem., 2, 236-242.
- Tocher D.R. and Sargent J.R., 1984. Analyses of lipids and fatty acid in roes of some Northwest European Marine Fish. Lipid, 19, 492-499.
- Turunen S., 1973. Role of labelled dietary fatty acid and acetate in phospholipids during the metamorphosis of Pieris brassicae. J. Insect Physiol., 19, 2327-2340.
- Van Heusden M.C., Van der Horst D.J. and Beenackers A.M.Th., 1984. In vitro studies on hormone-stimulated lipid mobilization from fat body and interconversion of haemolymph lipoproteins of Locusta migratoria. J. Insect Physiol., 30, 685-693.
- 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., Ratcliffe M.R. and 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.

- Wheeler C.H. and Goldsworthy G.J., 1985a. Lipid transport to the flight muscle in *Locusta*. In *Insect locomotion*, Gewecke M. and Wendler G. eds, Paul Parey, Berlin, 121-129.
- Wheeler C.H. and Goldsworthy G.J., 1985b. Specificity and localisation of lipoprotein lipase in the flight muscles of *Locusta migratoria*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 366, 1071-1077.
- Wheeler G.H., Mundy J.E. and Goldsworthy G.J., 1984. Locust haemolymph lipoproteins visualised in the electron microscope. *J. comp. Physiol., B*, 154, 281-286.
- Wheeler G.H., Van der Horst D.J. and Beenackers 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. and 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. and Bayors W.A., 1947. A comparative study of the lipids in some marine annelids. *Biol. Bull.*, 93, 99-101.
- Williams M.L., Bygrave F.L. and Birt L.M., 1974. Phospholipid synthesis in developing flight muscle of *Lucilia*. *Insect Biochem.*, 4, 161-172.
- Wimer L.T. and Lumb R.H., 1967. Lipid composition of the developing larval fat body of *Phormia regina*. *J. Insect Physiol.*, 13, 889-898.
- Wlodawer P. and Lagwinska E., 1967. Uptake and release of lipids by the isolated fat body of the wax moth larva. *J. Insect Physiol.*, 13, 319-331.
- Wyatt G.R. and Pan M.L., 1978. Insect plasma proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 779-817.
- Wootton J.M. and Wirght L.D., 1962. Comparative study of sterol biosynthesis in annelids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 5, 253-264.
- Yang T.K., McMeans E., Anderson L.E. and Jenkin H.M., 1976. Neutral lipids of *Aedes albopictus* cells cultured in vitro. *J. Invert. Pathol.*, 27, 161-169.
- Zama K., Maruya T. and Takahashi K., 1976. Lipids of the Crustacea. I. Lipids of the muscle and egg of the prawn (*Pandalopsis japonica*). *Bull. Fac. Hokkaido Univ.*, 27, 181-190.