

50376
1990
289

50376
1990
289

LA VITELLOGENESE CHEZ *NEREIS DIVERSICOLOR*

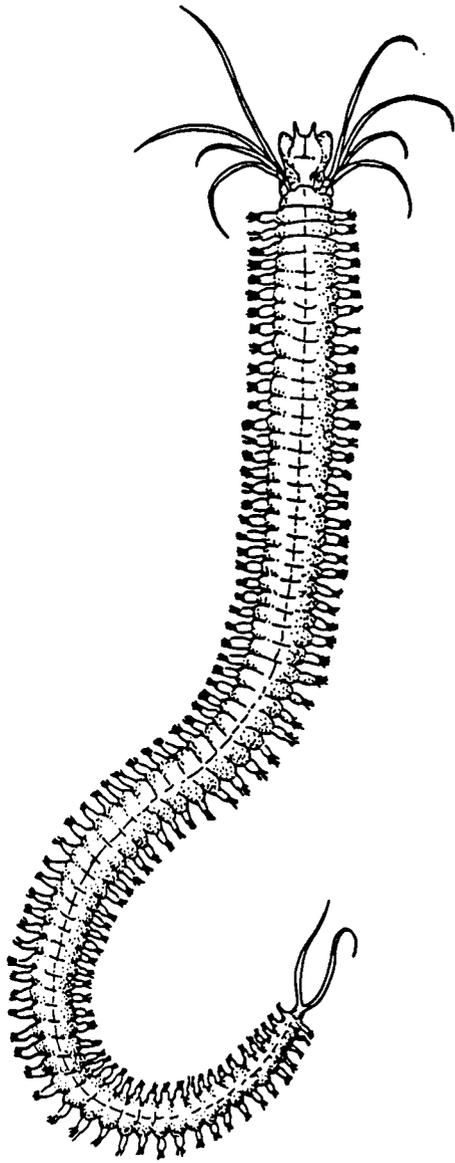
MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DU PROCESSUS
DE PROTEOLYSE IMPLIQUE DANS LA CONVERSION INTRAOVOCYTAIRE
DE LA VITELLOGENINE EN VITELLINES

Patrick Bonnier

LABORATOIRE D'ENDOCRINOLOGIE DES INVERTEBRES, URA CNRS 148
UNIVERSITE DE LILLE I, BATIMENT DE BIOLOGIE ANIMALE
59655 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX



Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire dirigé par le Professeur Maurice PORCHET, qu'il soit assuré de ma reconnaissance pour la confiance dont il a fait preuve en m'intégrant dans son équipe.



"Nereis diversicolor"

Guy HIMPENS

Que Messieurs Maurice PORCHET, Walter WAHLI, André VERBERT, Pierre SAUTIERE et Jean-Luc BAERT, soient assurés de ma profonde gratitude pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

*à Nathalie
et Lise*

Avant-Propos



"Les théories passent. La grenouille reste"

Jean Rostand
"Carnet d'un biologiste"

Chez les néréidiens, la gamétogenèse est un processus long et unique dans la vie de l'animal. Elle dure un ou deux ans selon les espèces. A l'issue de cette période, après libération des produits génitaux arrivés à maturité, les animaux meurent. L'acquisition de la maturité sexuelle s'accompagne de profonds remaniements éthologiques, voire anatomiques et morphologiques (épitoque) chez certaines espèces. Ces remaniements pubertaires sont placés sous le contrôle de facteurs endocriniens (Durchon, 1956).

La maturité ovocytaire est la résultante de deux métabolismes essentiels que sont chronologiquement la vitellogenèse et la corticogénèse. De nombreuses données "biologiques" ont indiqué que la coordination de ces événements repose sur une décroissance de l'activité neuroendocrine. Une forte activité hormonale du cerveau durant le stade juvénile permet d'initier le déroulement de la vitellogenèse, alors que la baisse ultérieure de cette activité induit la mise en place de la corticogénèse, critère définissant la submaturité (Porchet, 1976). De ce fait, et en absence de glandes endocrines différenciées, les néréidiens semblent présenter des dispositions qui en font un modèle original pour l'étude des mécanismes neuroendocrines régulant l'ovogénèse.

Afin d'aborder plus précisément le problème du contrôle endocrine de l'ovogénèse, des études "biochimiques", visant à caractériser les mécanismes biologiques menant à l'accumulation des protéines ovocytaires essentielles, ont été entreprises chez *Perinereis cultrifera*. Les résultats de ces travaux ont montré que la synthèse de la vitellogénine, et de manière moins affirmative, l'incorporation ainsi que la transformation de la vitellogénine dans l'ovocyte, subissaient une activation progressive au cours de l'ovogénèse ; activation concomitante de la décroissance de la production cérébrale de "néréidine" ou SIF (Spermatogenesis Inhibitor Factor) (Baert, 1986a).

Par la suite, l'étude de la vitellogenèse chez *Nereis diversicolor* (Bonnier, 1987) a renforcé l'idée que la transformation intraovocytaire de la vitellogénine était une cible potentielle du contrôle neuroendocrine. En effet, les résultats ont suggéré l'existence d'une activation du processus à un stade déterminé de l'ovogénèse. De ce fait, en tant que cible probable du contrôle neuroendocrine de l'ovogénèse, ce processus a fait l'objet d'une étude plus approfondie dont les résultats sont rapportés dans cette thèse.

Données Générales

LA VITELLOGENINE

Principaux aspects structuraux
et métaboliques

Chez les mammifères placentaires, l'embryon issu d'un oeuf alécithe se développe aux dépens de la mère en profitant de son métabolisme. Au contraire, chez les animaux ovipares, la croissance embryonnaire est assurée par des réserves stockées dans l'ovocyte. Le vitellus désigne une partie des substances accumulées au cours de la croissance ovocytaire et qui participeront à la constitution de l'embryon. Les protéines du vitellus, stockées dans les globules vitellins, sont généralement des phosphoglycoprotéines qui, tout en étant une source importante d'acides aminés, de phosphate et de glucide, transportent également des lipides, des vitamines, des stéroïdes et des minéraux nécessaires au développement de l'embryon.

Dans le vitellus, on trouve en grande quantité des éléments dérivés d'une protéine spécifique aux femelles : la vitellogénine. En plus de la vitellogénine, les VLDL (Very Low Density Lipoprotein) sont également présentes en quantité importante dans le vitellus des oiseaux. Chez les vertébrés, il a été également montré que le vitellus contenait des éléments mineurs tels que des protéines transportant des vitamines (la riboflavine et la thiamine), mais aussi des constituants du sérum : la sérum-albumine, la transferrine, les immunoglobulines, l'alpha 2-glycoprotéine et l'apolipoprotéine B (Norioka, 1985 ; White et Whitehead, 1987 ; Burley et Sleight, 1983). Chez les insectes, en plus de la vitellogénine, une protéine hautement lipidée, la lipophorine, est présente en faible quantité dans le vitellus (Kunkel et Nordin, 1985). Toujours chez les insectes, il faut noter aussi la présence d'une microvitellogénine chez *Manduca sexta* (Kawooya, 1986) et de protéines spécifiques de l'oeuf chez *Bombyx mori* (Zhu, 1986).

Ainsi, de nombreuses substances s'accumulent dans le vitellus. Toutefois, chez tous les animaux ovipares, les éléments protéiques majeurs du vitellus sont issus de la vitellogénine. Ces éléments protéiques ou vitellines représentent 60 à 90 % des protéines totales d'un ovocyte mûr. Par la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement à la vitellogénine et au processus appelé vitellogenèse qui mène au dépôt de la vitellogénine dans l'ovocyte.

I. La Vitellogénine

Le terme vitellogénine a été initialement adopté pour définir les protéines "sériques" qui sont spécifiques aux femelles et étroitement reliées aux composants protéiques du vitellus (Pan, 1969).

A. Le site de synthèse

La vitellogenèse est un processus purement hétérosynthétique. La vitellogénine est toujours élaborée hors de son lieu final de stockage (tableau 1). Chez les vertébrés, la vitellogénine est synthétisée par le foie des femelles (Wallace, 1985). Chez les insectes, la synthèse a lieu dans le corps gras (Bownes, 1986), sauf chez certains diptères (e.g. *Drosophila*) où en plus du corps gras, les cellules folliculaires synthétisent de la vitellogénine (Brennan, 1981 ; Isaac et Bownes, 1982). Chez les crustacés l'origine de la vitellogénine semble également être double ; les cellules hépatopancréatiques et l'ovaire ont été identifiés comme site de synthèse de la vitellogénine (Meusy et Payen, 1988). Les gonades et l'intestin des adultes des deux sexes élaborent la vitellogénine chez l'oursin (Shiu, 1986). Chez les nématodes, l'intestin des hermaphrodites a été identifié comme site de synthèse (Kimble et Sharrock, 1983). Enfin, chez les néréidiens, la synthèse de la vitellogénine a lieu dans les coelomocytes des femelles (Baert et Slomianny, 1987). Il apparaît que les cellules produisant la vitellogénine sont principalement d'origine endodermique.

B. Le gène de la vitellogénine

L'analyse de la structure du gène de la vitellogénine n'a été abordée que chez un nombre restreint d'espèces : la poule *Gallus gallus* (Van het ship, 1987), la truite *Salmo gairdneri* (Le Guellec, 1988), l'amphibien *Xenopus laevis* (Wahli, 1979 ; Gerber-Huber, 1987), les diptères *Drosophila melanogaster* (Hung et Wensink, 1983 ; Yan, 1987) et *D. grimshawi* (Hatzopoulos et Kambysellis, 1987), le criquet *Locusta migratoria* (Locke, 1987), l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Shiu, 1987) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Spieth et Blumenthal, 1985 ; Spieth, 1985a).

La vitellogénine est synthétisée à partir d'un seul gène chez l'oursin (*Shyu, 1987*) ou à partir d'une famille de plusieurs gènes chez le criquet (*Locke, 1987*), la poule (*Evans, 1988*), la drosophile (*Yan, 1987*), le xénope (*Wahli, 1979*) et le nématode (*Spieth et Blumenthal, 1985*). Au sein d'une espèce, les gènes possèdent une grande homologie entre eux et représentent une famille probablement formée par duplication. Bien que l'expression des gènes d'une même famille ne soit pas toujours coordonnée (*Wang and Williams, 1983 ; Hatzopoulos et Kambysellis, 1987 ; Tata, 1987*) et bien qu'il existe une certaine corrélation entre le nombre de gènes et la durée de la vitellogenèse (*Byrne, 1989*), la signification biologique de la multiplicité du gène de la vitellogénine au sein d'une espèce reste inconnue.

Le gène de la vitellogénine *vgtII* de la poule (*Van het ship, 1987*), *A2* du xénope (*Gerber Huber, 1987*), *vit5* du nématode (*Spieth, 1985a*) et les trois gènes *yp* de la drosophile (*Yan, 1987*) ont été séquencés. L'analyse comparative de l'organisation structurale de ces gènes a permis de les classer en deux groupes (*Wahli, 1988 ; Byrne, 1989*). Il existe une très grande homologie de structure entre les gènes codant pour la vitellogénine du nématode, du xénope et de la poule. Ils pourraient tous dériver d'un gène ancestral codant pour un polypeptide de grande taille i.e. 160 à 220 kDa (*Nardeli, 1987a, 1987b*). La séquence du gène de la vitellogénine de ce premier groupe se caractérise d'autre part, par certaines homologies avec celle du gène de l'apolipoprotéine B-100 et du facteur de Von Willebrand des mammifères (*Baker, 1988a, 1988b*). Les gènes de la vitellogénine chez la drosophile ne possèdent pas d'homologie structurale avec ceux du groupe précédent. Ils codent pour des polypeptides de petite taille i.e. 40 à 50 kDa, et ont des homologies structurales avec la famille des gènes des triacylglycérol lipases des mammifères (*Komaromy et Schotz, 1987*).

Espèces	Site de synthèse	Vitellogénine	Vitelline	Réf.
<u>Nématode</u> <i>C.elegans</i>	Intestin	170 kDa 180 kDa	YP 170 (170 kDa) YP 115 (115 kDa) YP 88 (88 kDa)	(1)
<u>Annélide</u> <i>P.cultrifera</i>	Coelomocytes	175 kDa	vitelline (16 à 98 kDa) P15 (15 kDa)	(2,3, 4)
<u>Echinoderme</u> <i>S.purpuratus</i>	Intestin Gonades	195 kDa	195 kDa 195 et 180 kDa	(5)
<u>Insectes</u> <i>L.migratoria</i>	Corps gras	180 kDa	vitelline (55 à 125 kDa)	(6)
<i>D.melanogaster</i>	Corps gras ovaire	50 kDa	50 kDa	(7,8)
<u>Vertébré</u> <i>X.laevis</i>	Foie	200 kDa	lipovitelline 1 (120 kDa) lipovitelline 2 (30 kDa) phosvitine (35 kDa) phosvettes (15 à 20 kDa)	(9)

TABLEAU 1 : Origine, structure et produits des clivages de la vitellogénine

Références : Sharrock, 1984 (1) ; Baert, 1984 (2) ; Baert et Slomianny, 1987 (3) ; Baert, 1988 (4) ; Shyu, 1986 (5) ; Chen, 1980 (6) ; Bownes et Hames, 1978 (7) ; Brennan, 1982 (8) ; Wiley and Wallace, 1981 (9).

C. La vitelline

Le terme vitelline est généralement utilisé pour définir les protéines issues de la vitellogénine qui sont stockées dans les ovocytes. Bien que chez certaines espèces la vitelline soit similaire à la vitellogénine néo-synthétisée, la vitellogénine est souvent modifiée avant de s'accumuler dans les globules vitellins (tableau 1).

1) Les vertébrés

Chez les vertébrés ovipares, la vitellogénine est sécrétée dans le sang sous la forme d'une lipophosphoglycoprotéine constituée d'un seul polypeptide de 170-200 kDa. Après son entrée dans l'ovocyte, elle subit une protéolyse qui aboutit à la formation de plusieurs éléments protéiques : la lipovitelline 1 (120 kDa), la lipovitelline 2 (30 kDa) et, les phosvitines (30 à 35 kDa) et les phosvettes (13 à 19 kDa) qui contiennent jusqu'à 10 % de phosphore (Wallace, 1985). Les phosvitines sont hétérogènes en masse et dans leur composition en acides aminés (Wang et Williams, 1980 ; Wiley et Wallace, 1981 ; Wang, 1983 ; Wallace et Begovac, 1985 ; Wallace et Morgan, 1986). Cette hétérogénéité semble provenir des variations de la séquence codante au sein de la famille des gènes de la vitellogénine, mais aussi de clivages supplémentaires subis par certaines phosvitines au cours de la maturation ovocytaire. Il faut noter que les phosvitines sont des éléments spécifiques aux vertébrés. On admet que ces constituants du vitellus sont une source de phosphore et de calcium pour la formation du squelette des embryons chez les vertébrés.

2) Les insectes

Chez les insectes, il n'existe pas de schéma général du clivage de la vitellogénine (Bownes, 1986). De plus, quand il y a clivage, le lieu où se déroule le phénomène varie selon les espèces. Il se fait, soit dans le corps gras, soit dans l'hémolymphe ou soit dans l'ovocyte. Les mêmes clivages peuvent avoir lieu au niveau du site de synthèse et se poursuivre après l'incorporation dans l'ovocyte. Il faut noter que chez les diptères supérieurs, la vitellogénine et la vitelline sont des protéines apparemment identiques composées des mêmes polypeptides d'environ 50 kDa.

3) Les néréidiens

Chez le néréidien *Perinereis cultrifera*, la vitellogénine (175 kDa) est clivée après incorporation dans l'ovocyte (Baert, 1985, 1986a). La protéolyse de la vitellogénine aboutit à l'accumulation dans l'ovocyte mûr, d'une protéine de 15 kDa (Baert, 1988) et d'un complexe lipoglycoprotéique de 400 kDa composé de plusieurs polypeptides de 98, 83, 22, 20 et 16 kDa (Baert, 1984).

4) Les nématodes

Chez le nématode *C.elegans* on distingue deux classes de vitellines. Dans la première classe majeure, la vitelline est équivalente à la vitellogénine (170 kDa) ; cette dernière ne subissant aucune modification post-traductionnelle. La vitelline de la seconde classe dérive d'une vitellogénine de 180 kDa issue du gène *vit-6*. Cette vitellogénine est glycosylée, phosphorylée et lipidée dans l'intestin, puis clivée dans le liquide coelomique en deux éléments vitellins de 115 et 88 kDa qui s'accumulent dans les gonades (Spieth et Blumenthal, 1985).

Il apparaît très difficile d'établir une règle générale en ce qui concerne la relation précurseur-produit entre la vitellogénine et la vitelline. Toutefois, des travaux portant sur la traduction dans l'ovocyte de xénope de l'ARN messager codant pour la vitellogénine de *X.laevis* (Berridge et Lane, 1976) et *L.migratoria* (Lane, 1983), ont montré que la vitellogénine traduite *in ovo* était clivée comme dans les conditions naturelles, c'est-à-dire, avant l'excrétion pour *Locusta* et après la réincorporation dans l'ovocyte pour *Xenopus*. Ces résultats, obtenus dans un système hétérologue, tendent à montrer que la relation précurseur-produit entre la vitellogénine et la vitelline est gouvernée principalement par la séquence du gène.

II. La Vitellogenèse

A. Régulation de l'expression du gène de la vitellogénine

Le gène de la vitellogénine s'exprime selon le sexe, le tissu et le stade de développement. L'activation de la transcription du gène "compétent" est contrôlée par une hormone spécifique. Les facteurs jusqu'à présent identifiés sont des stéroïdes, la 17 β -oestradiol chez les vertébrés et la 20-hydroxy-ecdysone chez certains insectes, mais aussi un terpénoïde, l'hormone juvénile chez la plupart des insectes.

Chez les vertébrés, l'administration de 17 β -oestradiol induit l'accumulation d'ARN messagers codant pour la vitellogénine dans le foie des femelles ou des mâles adultes. Il semble que l'hormone agisse à plusieurs niveaux de la biosynthèse de la vitellogénine. Elle active la transcription du gène par l'intermédiaire d'un récepteur capable de se fixer sur des séquences nucléotidiques spécifiques (élément de réponse à l'oestradiol) (Walker, 1984). L'hormone induit, par ailleurs, une augmentation du nombre de récepteurs nucléaires à l'oestradiol dans l'hépatocyte (Westley et Knowland, 1979 ; Hayward, 1980 ; Wright, 1983). L'oestradiol agit aussi au niveau post-transcriptionnel en modulant la stabilité de l'ARN messager codant pour la vitellogénine (Brock et Shapiro, 1983). Le retrait de l'hormone induit une dégradation rapide et préférentielle des ARN messagers codant pour la vitellogénine (Gordon, 1988). Enfin, il a été mis en évidence des facteurs oestradiol-dépendants se liant au gène de la vitellogénine et qui pourraient participer à la régulation de la transcription du gène (Jost, 1987 ; Bakker, 1988 ; Philipsen, 1988).

Chez la plupart des insectes, la synthèse de la vitellogénine par le corps gras est sous le contrôle de l'hormone juvénile (Hagedorn et Kundel, 1979 ; Engelmann, 1979 ; Chen et Hillen, 1983). Le contrôle de la synthèse de la vitellogénine par l'hormone juvénile III a été plus particulièrement étudié chez *L. migratoria*. Comme l'oestradiol, il semble que l'hormone juvénile agisse sur la transcription du gène par l'intermédiaire d'un récepteur (Roberts et Wyatt, 1983). De plus, l'analyse de la séquence nucléotidique située en amont des sites de transcription initiaux révèle la présence de plusieurs blocs qui pourraient être des cis-éléments de réponse à l'hormone juvénile (Locke, 1987 ; Wyatt, 1988). Pour certaines espèces

d'insectes e.g. *D.melanogaster* (Postlethwait et Handler, 1979), *Aedes aegypti* (Hagedorn, 1974 ; Borovsky, 1985) et *Bombyx mori* (Ono, 1975), il a été montré qu'en plus de l'hormone juvénile, la 20-hydroxy-ecdysone était impliquée dans le contrôle de la synthèse de la vitellogénine. Comme précédemment, il a été mis en évidence, en amont des gènes de la vitellogénine de *Drosophila melanogaster*, des séquences pouvant être des éléments de réponse aux ecdystéroïdes (Riddihough et Pelham, 1987 ; Yan, 1987) et qui présentent de grandes homologies avec les éléments de réponse aux stéroïdes chez les vertébrés.

Les travaux réalisés sur la régulation de la transcription du gène de la vitellogénine suggèrent que les mécanismes impliqués pourraient être du même type que ceux décrits pour la super famille des récepteurs nucléaires (Evans, 1988 ; Wahli, 1988). Des travaux sur l'activation hormonale de la synthèse de la vitellogénine par des cultures primaires d'hépatocytes de vertébrés ont même suggéré l'implication de plusieurs facteurs dans la régulation du gène de la vitellogénine. En effet, il semble que chez les amphibiens, les glucocorticoïdes et l'hormone thyroïdienne coopèrent avec la 17 β -oestradiol dans la régulation de la synthèse et de la sécrétion de la vitellogénine *in vitro* (Wangh, 1982a, 1982b).

Enfin, en ce qui concerne la compétence du gène à être transcrit, peu de choses sont connues. Le résultat le plus probant vient d'une étude récente sur l'induction de l'élaboration de la vitellogénine par une culture primaire d'hépatocytes post-embryonnaires de coquelet, qui a montré que la synthèse de la vitellogénine ne pouvait être induite directement par l'oestradiol, mais que l'addition d'hormone de croissance ou de prolactine à la culture primaire permettait sa sécrétion (Bohem, 1988).

B. Modifications post-traductionnelles et excrétion de la vitellogénine

Les vitellogénines excrétées sont des complexes protéiques de grande taille (250 à 550 kDa). Leur composition chimique riche et complexe reflète les multiples modifications post-traductionnelles subies par la vitellogénine néosynthétisée avant d'être libérée. Au cours de son transfert vers l'extérieur de la cellule via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, la molécule est généralement glycosylée, phosphorylée,

lipidée et même sulfatée au niveau de certaines tyrosines chez *Drosophila melanogaster* (Baeuerle, 1988). Par ailleurs, selon les espèces, la chaîne polypeptidique peut aussi être affectée par des clivages avant d'être sécrétée (voir § II.C).

Les vitellogénines néosynthétisées possèdent du côté NH₂-terminal une séquence peptidique signal d'environ 15 acides aminés. Cette séquence signal, qui joue un rôle fondamental lors de la translocation de la vitellogénine dans le réticulum endoplasmique, est beaucoup plus conservée que la partie codante du gène de la vitellogénine (Spieth, 1985b).

Les glycanes sont ancrés à la vitellogénine par des liaisons de type N-acétylglucosamine, excepté chez la drosophile où il s'agirait plutôt de O-glycanes (Yan, 1987). Alors que chez les vertébrés, les glycanes ont une structure complexe, chez les invertébrés, on trouve plutôt une structure de type polymannose (Baert, 1984 ; Kunkel et Nordin, 1985).

La vitellogénine des vertébrés subit une importante phosphorylation (2% de phosphore) essentiellement au niveau des sérines. Chez la poule, cette phosphorylation est rapide et a lieu peu avant la sécrétion de la molécule dans le sang (Schrim, 1973 ; Wang et Williams, 1982). Au contraire, chez les amphibiens, 30 % des phosphates sont attachés à la vitellogénine présente dans le réticulum endoplasmique, alors que le reste serait incorporé au niveau de la fraction microsomiale (Gottlieb et Wallace, 1981). Chez les insectes, la phosphorylation est plus limitée (0,6 % de phosphore) et semble avoir lieu dans le corps gras, mais aussi après incorporation dans l'ovocyte (Takahashi, 1987).

Bien que les vitellogénines transportent une quantité importante de lipides (jusqu'à 30 %) (voir tableau 1), rien n'est encore connu sur les phénomènes post-traductionnels de lipidation.

Les transformations post-traductionnelles aboutissent généralement à la formation d'un complexe phosphoglycolipoprotéique le plus souvent dimérique, chaque monomère étant composé de une ou plusieurs sous-unités polypeptidiques.

C. Incorporation de la vitellogénine dans l'ovocyte

La vitellogénine excrétée de son site de synthèse est acheminée jusqu'à l'ovocyte par le sang, l'hémolymphe ou le liquide coelomique. L'incorporation de la vitellogénine dans l'ovocyte se fait par endocytose sélective par l'intermédiaire d'un récepteur (Roth et Porter, 1964 ; Wallace et Jared, 1969 ; Roth, 1976 ; Di Mario et Mahowald, 1987). Le devenir de la vitellogénine dans l'ovocyte est différent selon qu'elle soit incorporée par endocytose ou directement injectée dans la cellule. En effet, après endocytose, la vitellogénine de *X. laevi* subit une hydrolyse ménagée, alors qu'après une injection directe dans le cytoplasme de l'ovocyte, elle est complètement dégradée (Dehn et Wallace, 1973). De la même manière, après incorporation simultanée par endocytose de la vitellogénine et de la sérum-albumine, cette dernière, qui est incorporée passivement (sans reconnaissance ligand-récepteur), est dégradée et non stockée comme la vitellogénine (Tyler, 1988a ; Opresko, 1979, 1980 ; Raikel et Léa, 1986). Ces résultats montrent l'importance de la liaison vitellogénine-récepteur pour orienter la molécule vers le stockage dans les globules vitellins.

L'incorporation de la vitellogénine par l'ovocyte a été essentiellement étudiée chez la poule (Yusko, 1981 ; Woods et Roth, 1984), l'amphibien (Wallace, 1980 ; Opresko et Wiley, 1987a), le poisson (Tyler, 1988b) et les insectes (Ferenz, 1981 ; König et Lanzrein, 1985 ; Osir et Law, 1986). Il ressort de ces études que l'ovocyte ne possède qu'un seul type de récepteur pour la vitellogénine, que ce récepteur a une faible affinité mais une grande spécificité pour la vitellogénine. Par ailleurs, il semble que l'ovocyte soit capable d'incorporer de la vitellogénine provenant d'espèces voisines, ce qui indique un certain degré de conservation du système d'incorporation de la vitellogénine. Des travaux sur le récepteur de la vitellogénine solubilisé suggèrent chez *X.laervis* et *Gallus gallus* que celui-ci est phylogénétiquement conservé tout comme l'est le gène de la vitellogénine chez ces deux espèces (Stifani, 1988, 1990). Il apparaît d'autre part, que le récepteur de la vitellogénine chez la poule est structuralement relié à ceux des LDL et VLDL (Low and Very Low Density Lipoprotein) tout comme à celui du récepteur des protéines transportant le cholestérol chez les mammifères (George, 1987).

Il a été montré que l'incorporation de la vitellogénine pouvait être modulée par le taux de la vitellogénine elle-même (*Hausman, 1971 ; Wallace et Misulovin, 1978 ; Kindle, 1988*). De plus, le taux d'incorporation est sensible à certains facteurs hormonaux tels que l'hormone juvénile chez certains insectes (*Bell et Barth, 1971 ; Kindle, 1988*), ou l'insuline (*Wallace, 1978 ; Maller, 1980*), et la choriogonadotropine (*Wallace, 1970 ; Wiley et Dumont, 1978*) chez *X.laevis*. Le mode d'action de ces facteurs sur l'incorporation de la vitellogénine est encore obscur. Toutefois, chez *X.laevis*, les hormones précédemment citées n'activent pas la synthèse du récepteur mais stimulent le taux d'endocytose par d'autres mécanismes (*Opresko et Wiley, 1987b*).

D. Transfert de la vitellogénine aux globules vitellins

Au cours de l'ovogénèse, les globules vitellins augmentent en nombre et en taille. Ce fait est dû à la fusion des vésicules d'endocytose contenant de la vitellogénine avec les globules vitellins (*Brummett et Dumont, 1977 ; Wall et Patel, 1987*). Le transfert de la surface de l'ovocyte vers les globules vitellins passe par des pré-globules vitellins semblables aux corps multi-vésiculaires observés dans différents types de cellules lors du transport des vésicules d'endocytose vers les lysosomes (*Wall et Patel, 1987*). L'inhibition de l'incorporation de la vitellogénine dans les globules vitellins par des ionophores à protons (e.g. la monensine et la nigericine) capables d'altérer le pH intra-vésiculaire (*Opresko et Wiley, 1987a ; Stynen, 1988*), suggère la participation du système lysosomal au transfert de la vitellogénine vers les globules vitellins. D'autre part, du fait qu'ils possèdent certaines des activités hydrolytiques rencontrées dans les lysosomes, (*Wal et Meleka, 1985 ; Purcell, 1988*) les globules vitellins ont été qualifiés de "lysosomes modifiés" (*Pasteels, 1973*). Il faut cependant noter que, bien que l'ovocyte soit capable de soustraire et de dégrader le matériel non spécifique des globules vitellins (cf. § II.C.), cette cellule ne semble pas posséder de lysosomes typiques.

Enfin, en ce qui concerne les mécanismes régissant le transfert de la vitellogénine aux globules vitellins, il a été montré chez *X. laevis* que la pepstatine A inhibe à la fois le clivage de la vitellogénine dans l'ovocyte et la fusion des vésicules d'endocytose aux globules vitellins (Opresko et Karpf, 1987). La fusion des vésicules endosomiales et donc le stockage de la vitellogénine dans les globules vitellins seraient régulés par la séparation de la vitellogénine de son récepteur sous l'action d'une protéase de type cathépsine D qui serait responsable du premier clivage subi par la vitellogénine après l'incorporation dans l'ovocyte. Il faut noter qu'un mécanisme équivalent a été mis en évidence lors de l'accumulation de l'apolipoprotéine B dans l'ovocyte (Nimpl, 1989).

III. Conclusion

L'accumulation de réserves dans l'ovocyte étant cruciale pour la reproduction des animaux ovipares, la vitellogenèse peut être considérée comme un processus capital pour la survie de ces espèces. De ce fait, il n'est pas surprenant qu'il semble y avoir eu une remarquable conservation du gène de la vitellogénine au cours de l'évolution. La structure de nombreux domaines du gène impliqués dans des mécanismes clés de la vitellogenèse a été particulièrement maintenue le long du règne animal. On peut notamment citer le peptide signal indispensable à l'excrétion de la protéine, le domaine de reconnaissance par le récepteur de l'ovocyte et les éléments de réponse aux hormones situés en amont du gène. La remarquable conservation de certaines séquences, jouant un rôle clé dans le processus de vitellogenèse, va de paire avec la sauvegarde au cours de l'évolution, d'un même schéma général de vitellogenèse.

La découverte de domaines similaires au niveau de protéines au rôle biologique connu a permis de suspecter certaines fonctions biologiques de la vitellogénine. Les analogies de structure de la vitellogénine avec l'apolipoprotéine B-100 ou avec le site de reconnaissance des triacylglycérol lipases, et d'autre part, de son récepteur avec celui des LDL, des VLDL et des protéines transportant le cholestérol chez les mammifères, suggèrent que la vitellogénine joue un rôle fondamental dans l'apport de réserves lipidiques à l'ovocyte. Les similitudes structurales de la vitellogénine du premier groupe avec le fibrinogène du homard (*Panulirus interruptus*) (Doolittle et Riley, 1990) et le facteur de Von Willebrand des mammifères connu, pour sa participation dans l'aggrégation des plaquettes sanguines indiquent que la vitellogénine possède également la capacité de participer à l'adhésion des cellules. Il a d'ailleurs été montré que des protéines participant à l'adhésion et donc vraisemblablement au mouvement des cellules embryonnaires, sont des polypeptides issus de la vitellogénine (Komazaki, 1987 ; Cervello et Matranga, 1989). La connaissance de nouvelles séquences du gène de la vitellogénine, notamment chez les invertébrés, ainsi que la recherche du gène ancestral chez les protozoaires ou même les bactéries, devraient apporter d'autres informations sur l'origine et la fonction biologique de la vitellogénine, voire sur les mécanismes du processus de vitellogenèse.

Résultats

I. La Vitelline

A. Identification de la vitelline

La vitelline est l'élément protéique majeur de l'ovocyte mature. Elle se caractérise communément par un poids moléculaire élevé et une nature lipoglycoprotéique. C'est sur la base de ces critères que nous avons cherché à identifier la vitelline dans l'ovocyte mature de *Nereis diversicolor*.

Afin de faciliter l'identification d'un élément protéique majeur de haut poids moléculaire, nous avons analysé les protéines solubles de l'ovocyte mature (210-260 μm de diamètre) par électrophorèse dans un gradient 5-25 % d'acrylamide (PAGGE : Poly Acrylamide Gradient Gel Electrophoresis). La figure 1 montre la présence d'une protéine de poids moléculaire élevé, environ 400 kDa, qui est l'élément protéique très largement prédominant de l'ovocyte mature. Nous avons pu établir que cet élément de 400 kDa avait une nature lipoglycoprotéique par des colorations spécifiques sur gel. Le noir Soudan et le réactif de Schiff ont permis de mettre en évidence respectivement, la présence de lipide et de glucide sur cette protéine.

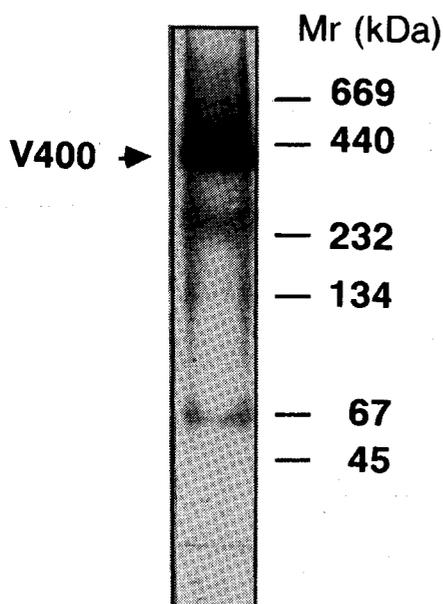


FIGURE 1 : Identification de la vitelline

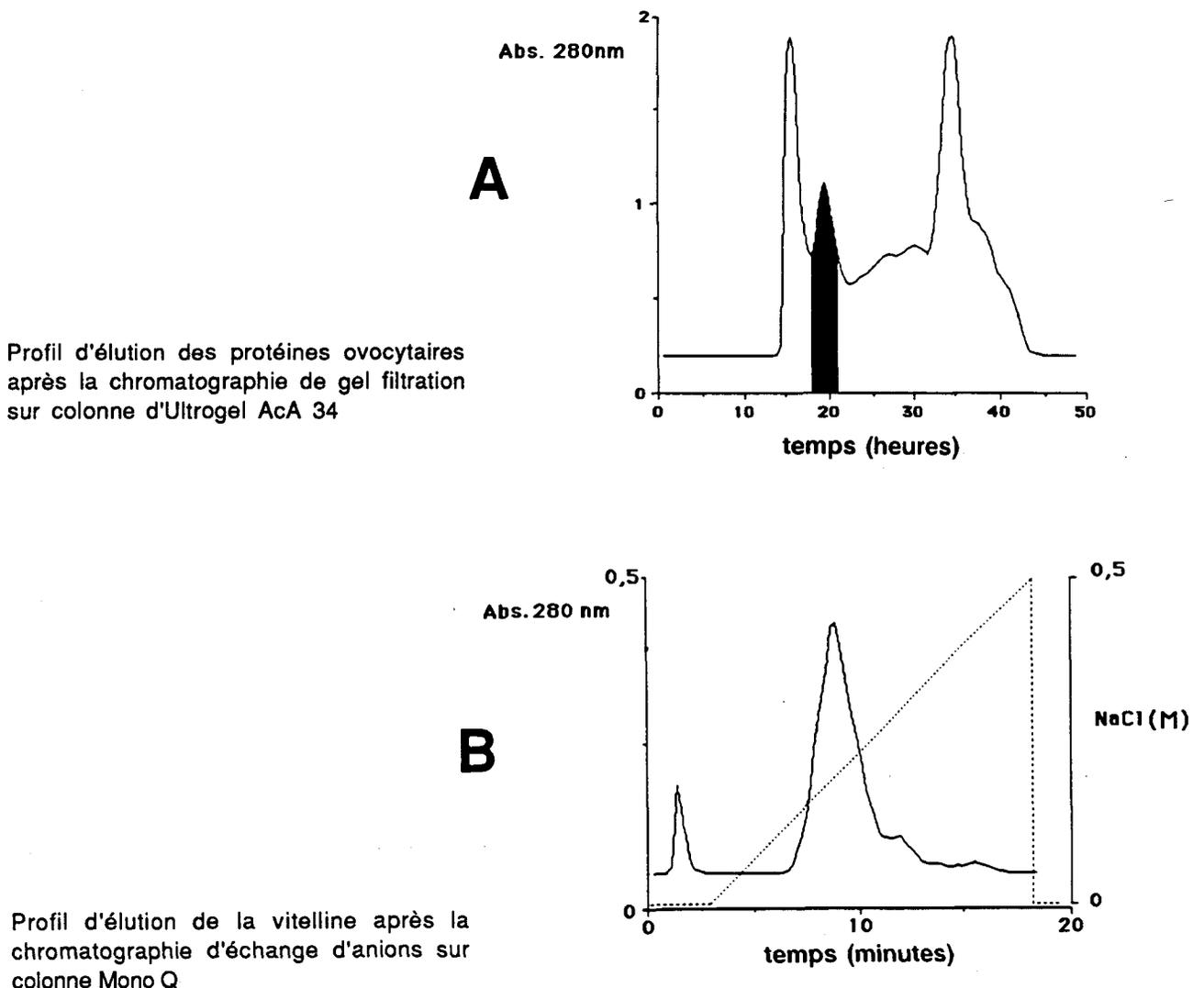
Analyse par PAGGE des protéines solubles des ovocytes matures (diamètre d'environ 230 μm)

Cette protéine possédant les propriétés structurales et chimiques généralement établies pour les vitellines, nous avons postulé qu'il s'agissait de la vitelline de *N. diversicolor* et appelé cette protéine **V400** (vitelline de 400 kDa).

B. Purification de la vitelline

V400 a été isolé de la fraction soluble d'ovocytes matures en deux étapes chromatographiques : une gel filtration suivie d'une chromatographie d'échange d'anions. Dans un premier temps, la fraction soluble ovocytaire est déposée sur une colonne d'Ultrogel AcA 34. Une analyse par PAGGE des fractions éluées montre que V400 est retrouvé au niveau du deuxième pic du chromatogramme présenté dans la figure 2A. Avant la deuxième étape, les fractions correspondant à ce pic sont rassemblées, puis concentrées et dessalées par dialyse sous vide. La solution concentrée est alors injectée sur une colonne mono Q équilibrée avec du tampon Tris/HCl pH 7,4. V400 est retenue par le gel au pH utilisé et s'éluie à une concentration de NaCl d'environ 170 mM (figure 2B).

FIGURE 2 : Purification de la vitelline



Bien que le pic de vitelline présente des épaulements, les différentes fractions constituant celui-ci donnent le même profil en PAGGE et semblent parfaitement homogènes. (figure 3).



FIGURE 3 : Contrôle de pureté de la vitelline
Analyse de la vitelline purifiée par PAGGE

C. Caractérisation de la vitelline

1) Poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire a été réalisée par électrophorèse sur gel dans un gradient 5-25 % d'acrylamide selon la méthode décrite par Slater (1969) et par chromatographie de gel filtration sur une colonne Superose 12. Par ces deux méthodes, le poids moléculaire de la vitelline isolée des ovocytes matures a été estimé à 400.000 daltons.

2) Point isoélectrique

La détermination du point isoélectrique de la vitelline a été réalisée par isoélectrofocalisation. La figure 4 montre que la vitelline purifiée se focalise en une très large bande entre les pI 5,9 et 6,5. Ce résultat, qui est à rapprocher de l'aspect du pic de vitelline obtenu après chromatographie d'échange d'anions (figure 2B), montre que V400, bien qu'apparemment homogène en masse, n'est manifestement pas homogène en charge.

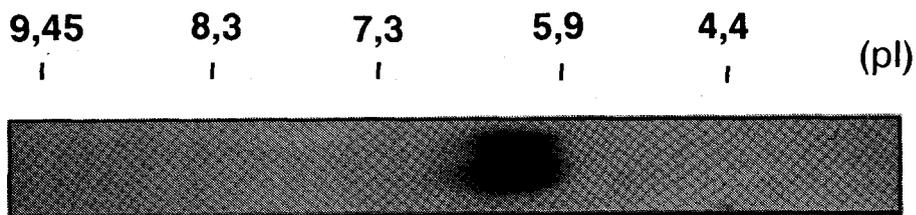


FIGURE 4 : Détermination du point isoélectrique de la vitelline
Analyse de la vitelline purifiée par IEF (pH 3-9)

3) Composition polypeptidique

Afin de déterminer la composition polypeptidique de V400, nous avons analysé la vitelline purifiée par électrophorèse dans un gradient 5-25 % d'acrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGGE). Comme le montre la figure 5, cinq bandes protéiques majeures sont visualisées sur le profil électrophorétique après traitement de la vitelline purifiée par le sodium dodécyl sulfate (SDS). Ces cinq polypeptides de poids moléculaire estimé à 110, 94, 22, 18 et 14 kDa ont été appelés respectivement YP110, YP94, YP22, YP18 et YP14.

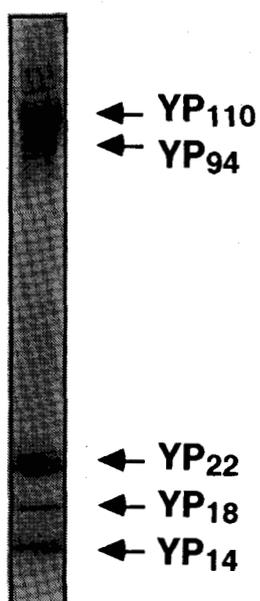


FIGURE 5 : Détermination de la composition polypeptidique de la vitelline
Analyse de la vitelline purifiée par SDS-PAGGE

Comme nous le verrons ultérieurement, la vitelline est issue d'un précurseur dimérique (§ II.B). Par voie de conséquence, les polypeptides identifiés dans V400 devraient être présents en double exemplaire au sein de la vitelline. Or, en tenant compte du poids moléculaire calculé pour les différents polypeptides, leur association conduirait à l'édification d'une protéine d'environ 515 kDa ; ce qui est largement supérieur au poids moléculaire de V400. Cette remarque nous a amené à postuler que certains polypeptides, identifiés lors de l'analyse de la vitelline purifiée en SDS-PAGGE, n'étaient pas des sous-unités à part entière de la molécule. Ce fait ne peut toutefois être imputé à une protéolyse artéfactuelle de la vitelline au cours de la purification. En effet, que ce soit par chromatographie, immunoaffinité ou électrophorèse préparative, la vitelline issue d'une même fraction soluble ovocytaire possède toujours la même composition polypeptidique.

II. La Vitellogénine

A. Identification de la vitellogénine

Dans tous les modèles jusqu'à présent étudiés, il a été montré que la vitelline a une origine extra-ovocytaire (tableau 1). En particulier chez *P. cultrifera*, l'étude par électrophorèse et fluorographie des protéines élaborées par l'ovocyte maintenu *in vitro* en présence de $^3\text{[H]}$ leucine a montré que cette cellule n'était pas capable de synthétiser la vitelline (Baert et Slomianny, 1987). Cependant, chez *N. diversicolor*, des études autoradiographiques, sur des coupes d'ovocytes maintenus en culture, ont montré que des protéines synthétisées par l'ovocyte s'accumulaient dans les globules vitellins et suggéré ainsi que la vitelline pouvait être élaborée par les ovocytes (Dhainaut, 1967). Afin d'établir si, oui ou non, l'ovocyte de *N. diversicolor* est capable de synthétiser la vitelline, nous avons repris la démarche expérimentale de Baert et Slomianny et étudié les protéines élaborées *in vitro* par l'ovocyte chez *N. diversicolor*.

Le fluorogramme de l'analyse en SDS-PAGGE de la fraction soluble des ovocytes, après plusieurs jours d'incubation, montre que bien que l'ovocyte soit capable *in vitro* de synthétiser un nombre important de protéines, aucun polypeptide précédemment identifié comme composant de la vitelline n'est marqué (figure 6). De plus, aucun marquage n'est détectable sur le fluorogramme de l'immunoprécipité obtenu à l'aide d'un sérum polyclonal anti-V400 préparé à partir de la molécule purifiée (non montré). Ces résultats indiquent clairement que la vitelline n'est pas élaborée par l'ovocyte, que ce soit sous la forme de V400 ou sous la forme d'un précurseur. En conséquence, en considérant l'origine extra-ovocytaire de la vitelline, les résultats obtenus par Dhainaut reflètent vraisemblablement la synthèse par l'ovocyte d'autres protéines des globules vitellins.

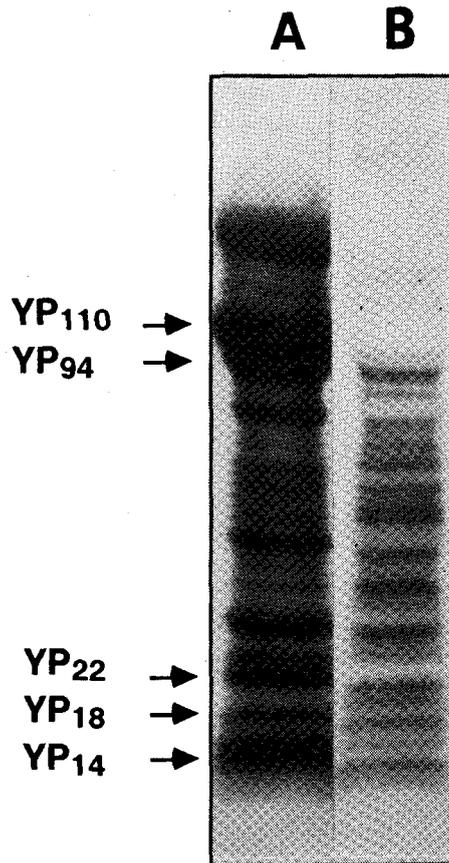


FIGURE 6 : Analyse électrophorétique des protéines synthétisées par l'ovocyte *in vitro*

Analyse par SDS-PAGGE des protéines solubles d'ovocytes matures (diamètre d'environ 230 μm) après trois jours d'incubation *in vitro* en présence de $^3\text{[H]}$ leucine

A : gel coloré par le bleu de Coomassie

B : fluorogramme

Chez les néréidiens, l'ovocyte est une cellule libre, en ce sens qu'elle n'est pas intégrée à un ovaire, mais flotte librement dans le liquide coelomique. De ce fait, si l'ovocyte ne fabrique pas la vitelline, cette protéine lui est nécessairement apportée sous la forme d'un précurseur ou vitellogénine par le liquide coelomique. Afin d'identifier la vitellogénine, et du fait de la faible représentation probable de cette protéine dans le liquide coelomique étant donné la longueur du processus de vitellogenèse, nous avons eu recours au marquage radioactif. Pour cela, nous avons injecté de la $^3\text{[H]}$ leucine dans la cavité coelomique de femelles matures et récupéré le liquide coelomique quelques jours après l'injection.

L'analyse par PAGGE et fluorographie du liquide coelomique radioactif montre la présence d'une protéine marquée d'environ 530 kDa (figure 7A, ligne 1). Comme cette protéine disparaît du liquide coelomique suite à une incubation avec du sérum anti-V400, elle a été interprétée comme étant la vitellogénine (Vg) de *N. diversicolor* (figure 7A, ligne 2). La composition polypeptidique de Vg a été obtenue en analysant par SDS-PAGGE et fluorographie l'immunoprécipité obtenu à partir du liquide coelomique radioactif. La figure 7B montre que la vitellogénine est composée d'un polypeptide unique de 175 kDa (YP175).

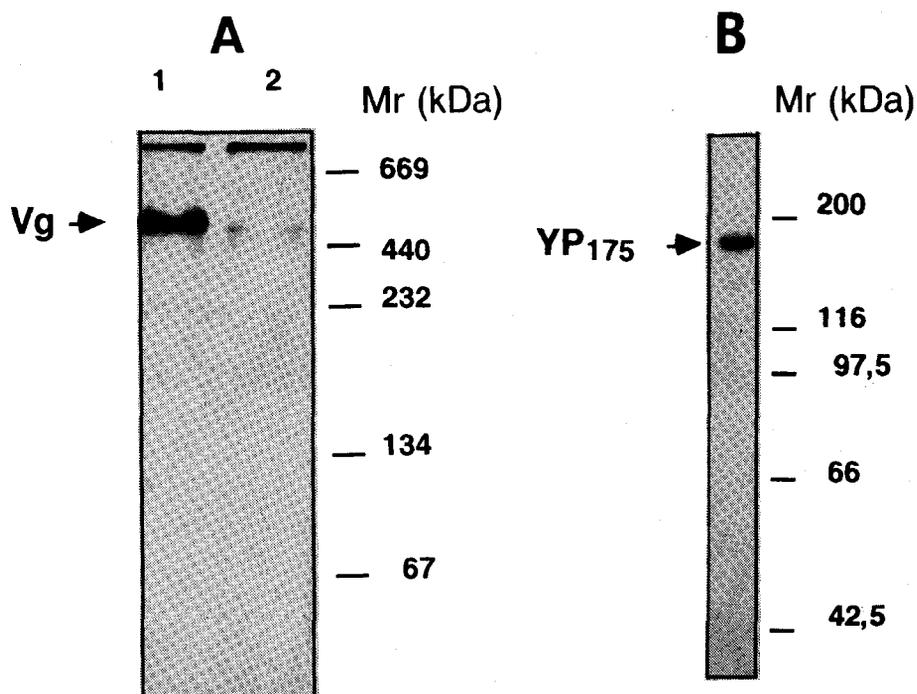


FIGURE 7 : Recherche de la vitellogénine dans le liquide coelomique

A : fluorogramme de l'analyse par PAGGE des protéines du liquide coelomique après trois jours de marquage *in vivo* par la $^3\text{[H]}$ leucine (ligne 1) et des protéines de la fraction du même liquide coelomique immunosupprimé après incubation avec le sérum anti-V400 (ligne 2)

B : fluorogramme de l'analyse par SDS-PAGGE de l'immunoprécipité obtenu après incubation du liquide coelomique avec le sérum anti-V400

B. Site de synthèse

Chez les néréidiens *P. cultrifera* (Baert et Slomianny, 1987) et *N. virens* (Fischer et Rabien, 1986), il a été montré que les coelomocytes synthétisaient de la vitellogénine. C'est donc vers cette catégorie cellulaire que nous avons orienté la recherche du site de synthèse de la vitellogénine chez *N. diversicolor*.

Nous avons incubé des coelomocytes *in vitro* en présence de $^3\text{[H]}$ leucine afin de marquer les protéines nouvellement synthétisées par ces cellules. Après plusieurs jours d'incubation, le milieu est récupéré et les protéines présentes sont analysées par PAGGE et fluorographie. La figure 8A montre que les coelomocytes synthétisent et sécrètent dans le milieu deux protéines majeures dont l'une a un poids moléculaire égal à celui de Vg (530 kDa).

De plus, cette protéine 530 kDa est immunologiquement liée à la vitelline puisqu'elle disparaît du milieu quand celui-ci est incubé en présence de sérum anti-V400 (figure 8B).

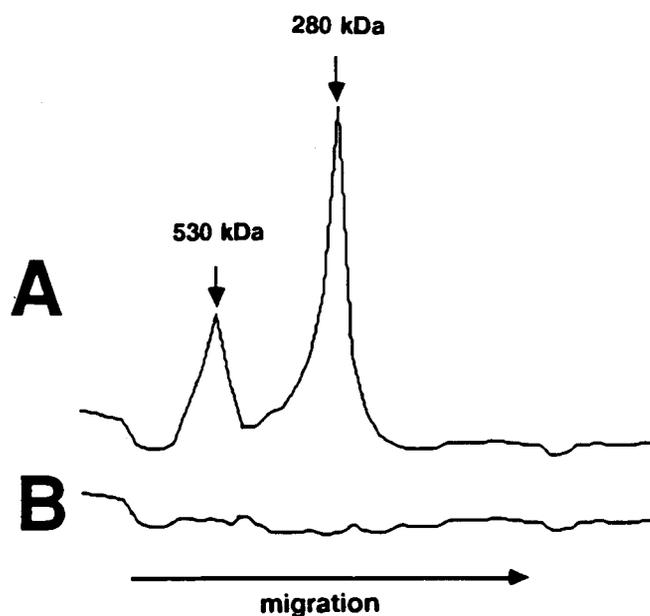


FIGURE 8 : Analyse électrophorétique des protéines synthétisées par les coelomocytes *in vitro*

Représentation densitométrique du fluorogramme de l'analyse par PAGGE des protéines du milieu culture, trois jours après l'incubation de coelomocytes *in vitro* en présence de $^3\text{[H]}$ leucine (A) et des protéines de la fraction immunosupprimée du même milieu de culture après incubation avec le sérum anti-V400 (B)

Par ailleurs, comme le montre l'analyse par SDS-PAGGE et fluorographie de l'immunoprécipité obtenu, elle est composée d'un seul polypeptide de poids moléculaire égal à celui de YP175 (figure 9). Cette protéine de 530 kDa possédant les caractéristiques de la vitellogénine identifiée dans le liquide coelomique, nous pouvons conclure que les coelomocytes de *N. diversicolor* sont, comme chez les autres néreidiens, capables d'élaborer et de sécréter de la vitellogénine.

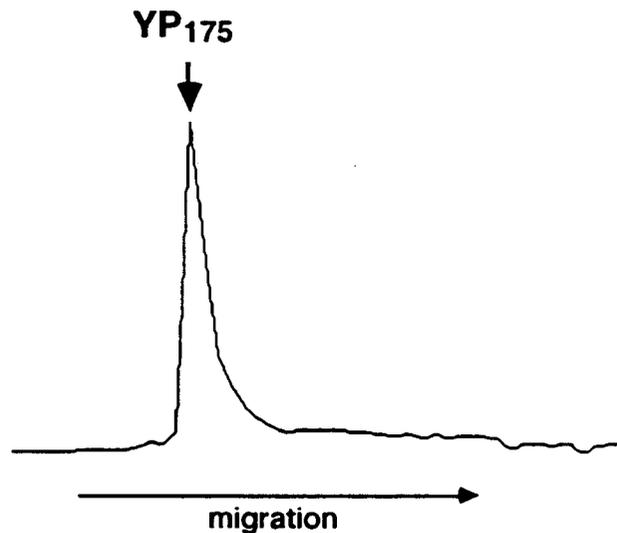


FIGURE 9 : Composition polypeptidique de la vitelline synthétisée par les coelomocytes

Représentation densitométrique du fluorogramme de l'analyse par SDS-PAGGE de l'immunoprécipité obtenu après incubation du milieu de culture avec le sérum anti-V400

Il faut également remarquer sur la figure 8A la présence d'une protéine d'environ 270 kDa dans les milieux d'incubation des coelomocytes qui, comme la vitellogénine, est immunologiquement liée à la vitelline (figure 8B) et composée d'un seul et même polypeptide de 175 kDa (figure 9). De ce fait, comme le poids moléculaire de cette protéine est égal à environ la moitié de celui de Vg, il est vraisemblable que la vitellogénine est une protéine dimérique et que cet élément correspond à la forme monomérique de Vg. Il est probable que la composition du milieu d'incubation des cellules ne soit pas parfaitement adaptée au maintien de la structure dimérique de la protéine et facilite la dissociation des deux monomères.

Pour garantir le rôle joué par les coelomocytes dans le processus de vitellogenèse, nous avons analysé la répartition du marquage radioactif au niveau des protéines ovocytaires après incubation *in vitro* d'un mélange d'ovocytes et de coelomocytes en présence de $^3\text{[H]}$ leucine. A cette fin, après quelques jours d'incubation, la fraction soluble des ovocytes est analysée par SDS-PAGGE et fluorographie. La figure 10A montre, dans ce cas, un marquage au niveau d'un polypeptide de 175 kDa, alors que lorsque les ovocytes sont incubés en absence de coelomocytes, aucun marquage n'est détectable à ce niveau (figure 10B). Ce résultat assure que les ovocytes sont capables d'incorporer la vitellogénine synthétisée et sécrétée par les coelomocytes.

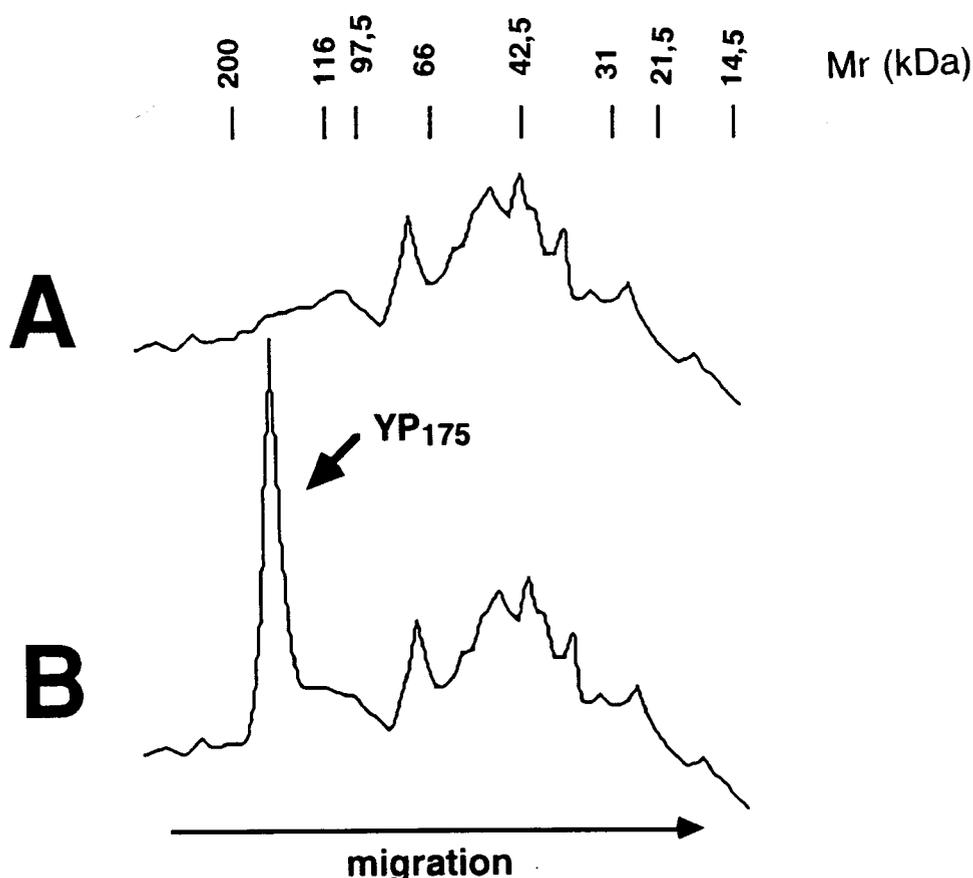


FIGURE 10 : Mise en évidence de l'incorporation de la vitellogénine par les ovocytes incubés *in vitro* en présence de coelomocytes

Représentation densitométrique du fluorogramme de l'analyse par SDS-PAGGE des protéines d'ovocytes incubés trois jours *in vitro* en présence de $^3\text{[H]}$ leucine

A: ovocytes incubés isolément

B: ovocytes incubés avec des coelomocytes

Les coelomocytes représentent une population cellulaire hétérogène. En effet, on y distingue les éléocytes et les granulocytes de type I, II et III (Dhainaut, 1984). Nous avons cherché à connaître plus précisément quel était, au sein de cette population cellulaire, le site de synthèse de la vitellogénine. Etant donné la difficulté de séparer rigoureusement chaque catégorie cellulaire, nous avons entrepris une étude immunocytologique. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal (An.Mo. 45-14) dirigé contre la vitellogénine (figure 11). Le marquage par immunofluorescence n'a été détecté que sur les ovocytes (figure 12A) et les éléocytes (figure 12B). Etant donné qu'au sein des coelomocytes, seuls les éléocytes sont marqués (figure 12B), ces cellules représentent probablement le site de synthèse de la vitellogénine.

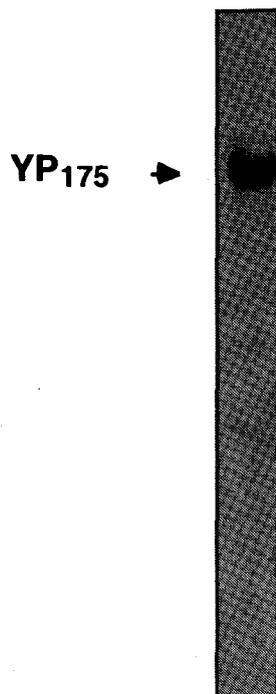
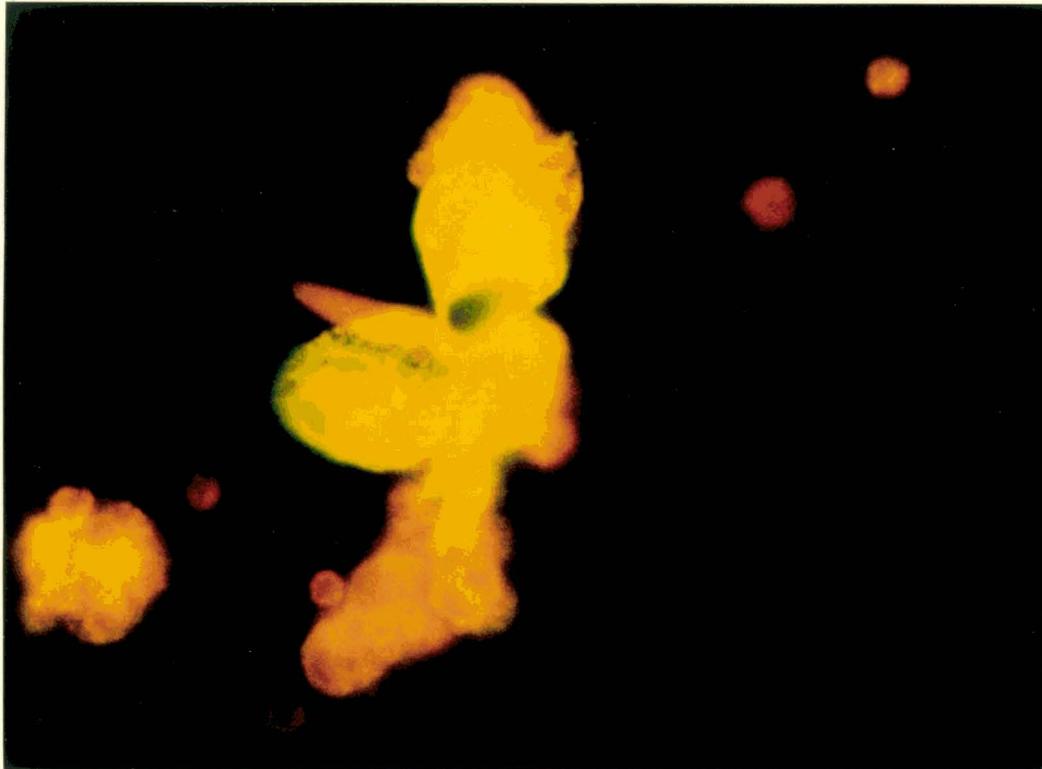
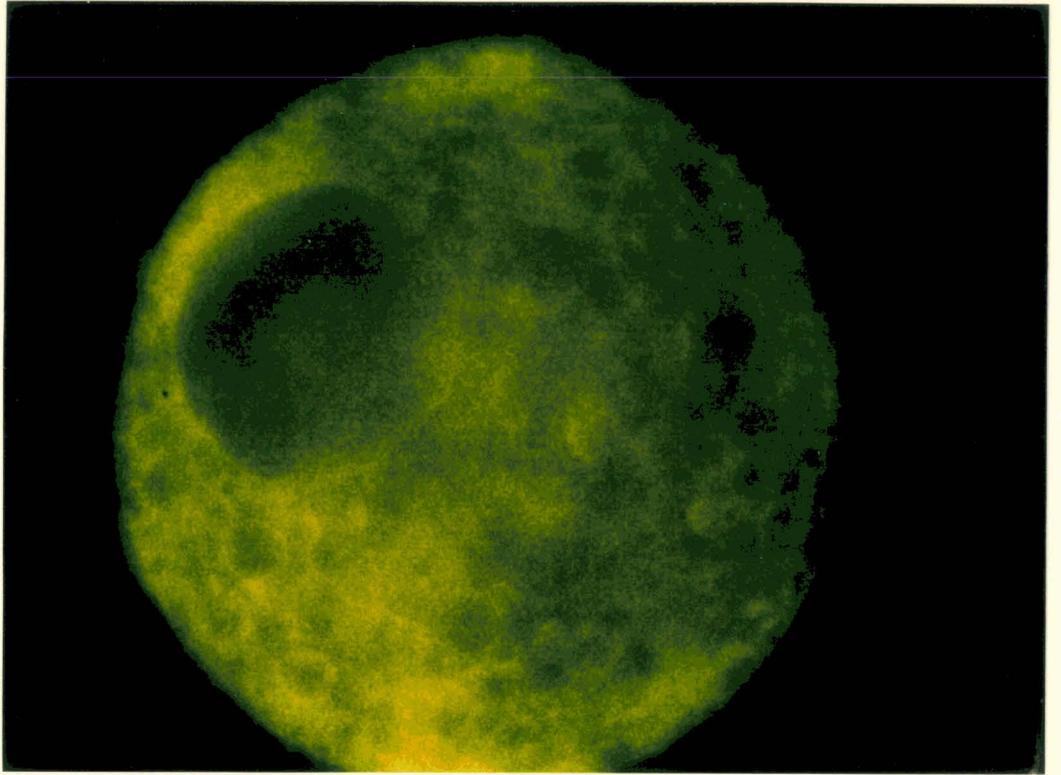


FIGURE 11 : Mise en évidence de la reconnaissance de la vitellogénine par l'anticorps monoclonal An.Mo. 45-14

Immunorévélation de la vitellogénine par An.Mo. 45-14 après transfert sur Immobilon des protéines d'ovocytes jeunes (diamètre d'environ 110 μm) préalablement analysées par SDS-PAGGE

A



B

FIGURE 12 : Identification immunocytoologique du site de synthèse de la vitellogénine

Réaction immunocytochimique avec l'anticorps anti-vitellogénine An. Mo. 45-14.
Marquage par immunofluorescence de :

A l'ovocyte

B les érythrocytes (en rouge orange, marquage négatif)

L'observation a été réalisée par le Dr. Porchet-Hennere

III. Transformation intraovocytaire de la vitellogénine

A. Mise en évidence du phénomène

Les chapitres précédents ont montré que la vitellogénine et la vitelline issue d'ovocytes matures avaient une structure différente, notamment une composition sous-unitaire et un poids moléculaire différents :

	poids moléculaire	composition polypeptidique
Vg	530 kDa	YP 175
V400	400 kDa	YP110 YP22 YP94 YP18 YP14
transformations présumées dans l'ovocyte	<u>perte de poids moléculaire</u>	<u>protéolyse de YP175</u>

TABLEAU 2 : Comparaison du poids moléculaire et de la composition polypeptidique de la vitellogénine et de la vitelline

Ces observations supposent une transformation structurale importante de la vitellogénine au cours de son transit intraovocytaire vers les globules vitellins.

Afin de démontrer que la vitellogénine subit effectivement une perte de poids moléculaire à la suite de son incorporation dans les ovocytes matures, après marquage *in vivo*, nous avons suivi par PAGGE et fluorographie, l'évolution, au cours du temps, de la radioactivité portée par les protéines ovocytaires de haut poids moléculaire (figure 13).

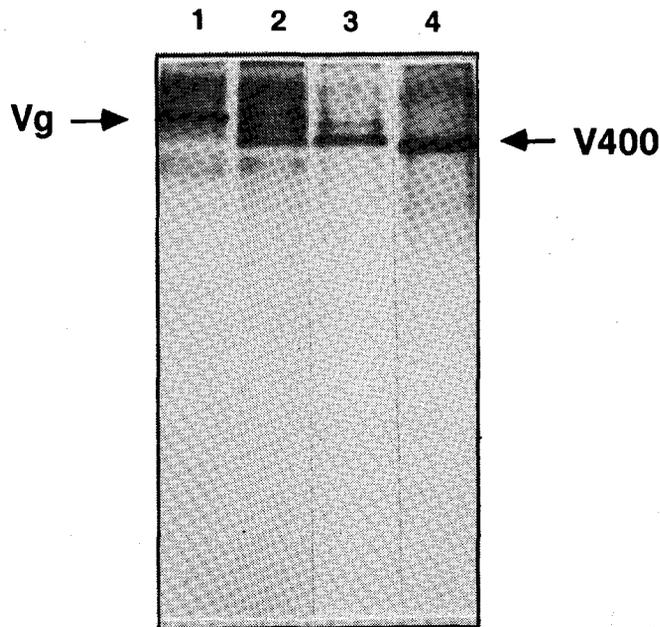


FIGURE 13 : Mise en évidence des pertes de poids moléculaire de la vitellogénine après incorporation dans l'ovocyte mature

Fluorogramme de l'analyse par PAGGE des protéines solubles d'ovocytes prélevés 1 (1), 2 (2), 6 (3) et 18 jours (4) après l'injection intracoelomique de $^3\text{[H]}$ leucine

De même, pour démontrer que la vitellogénine subit effectivement une protéolyse après son incorporation dans les ovocytes matures, l'évolution de la composition polypeptidique de la vitellogénine marquée a été suivie par analyse en SDS-PAGGE et fluorographie, après avoir extrait Vg des ovocytes par immunoprécipitation à l'aide du sérum anti-V400 (figure 14).

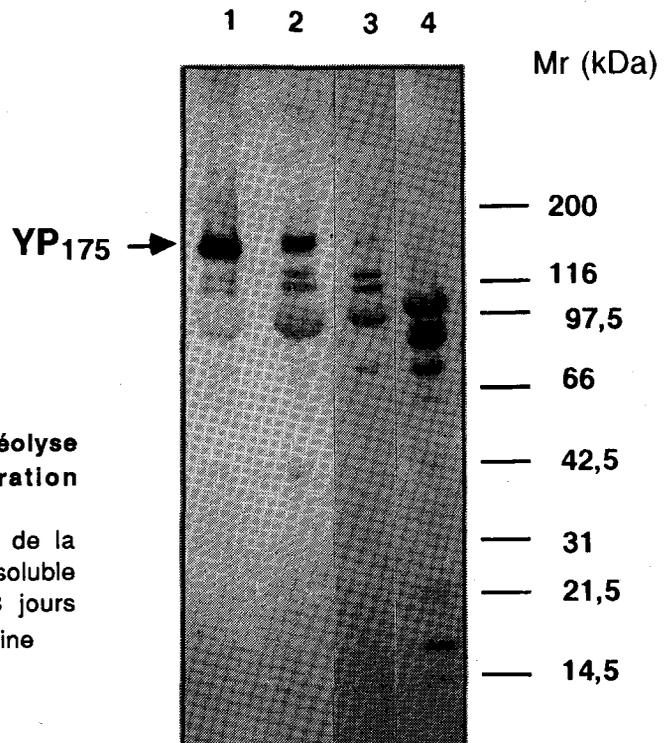


FIGURE 14 : Mise en évidence de la protéolyse de YP175 après incorporation dans l'ovocyte mature

Fluorogramme de l'analyse par SDS-PAGE de la vitelline isolée par immunoaffinité de la fraction soluble d'ovocytes prélevés 1 (1), 2 (2), 6 (3) et 18 jours (4) après l'injection intracoelomique de $^3\text{[H]}$ leucine

Au temps 1 jour, la figure 13, ligne 1, montre qu'au niveau des hauts poids moléculaires toute la radioactivité est portée par Vg. Après un même temps de marquage, la figure 14, ligne 1, montre que dans l'immunoprécipité, la radioactivité se situe essentiellement sur YP175. Comme la vitellogénine nouvellement incorporée dans l'ovocyte a la même structure que celle identifiée dans le liquide coelomique, il apparaît que Vg ne subit aucune transformation structurale significative entre la sécrétion par les coelomocytes et l'incorporation dans l'ovocyte. Pour des temps plus longs, la radioactivité se déplace vers des éléments de plus bas poids moléculaires aussi bien en PAGGE (figure 13, lignes 2 et 3) qu'en SDS-PAGE (figure 14, lignes 2 et 3). Ce mouvement de la radioactivité vers de plus bas poids moléculaires en PAGGE montre que, quelques jours après son incorporation, Vg est soumis à des pertes de poids moléculaires successives. Au niveau de la composition polypeptidique, le déplacement de la radioactivité, là aussi vers de plus bas poids moléculaires, traduit quant à lui une protéolyse de YP175. Enfin, à partir de 18 jours après l'injection, la radioactivité s'accumule sur V400, assurant que V400 est l'ultime produit de transformation de Vg (figure 13, ligne 4). Par contre, si on se réfère à la composition polypeptidique de la vitelline purifiée (voir figure 4), le profil fluorographique correspondant au temps 18 jours (figure 14, ligne 4) semble refléter une protéolyse ininterrompue des polypeptides constituant V400.

B. Etude du phénomène au cours du développement ovocytaire

L'analyse comparative par PAGGE des protéines ovocytaires, au cours de la vitellogenèse (figure 15), montre que la vitellogénine s'accumule dans les ovocytes d'animaux jeunes (diamètre ovocytaire d'environ 110 μm , ligne a) sans subir les pertes de poids moléculaire observées lors de l'incorporation dans les ovocytes matures. V400 commence à apparaître dans l'ovocyte à partir d'une taille d'environ 130 μm de diamètre (ligne b). Au fur et à mesure que l'ovocyte grossit, Vg disparaît des profils, alors que parallèlement V400 devient l'élément majeur de l'ovocyte (lignes c et d). Enfin, dans l'ovocyte mature, comme nous l'avons vu précédemment, V400 est le seul élément majeur de haut poids moléculaire ; Vg ayant totalement disparu du profil (ligne e).

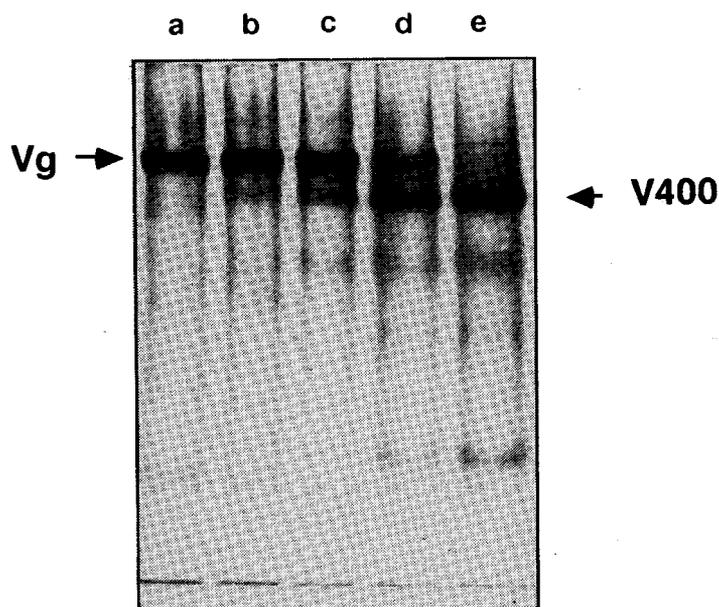


FIGURE 15 : Etude comparative des protéines ovocytaires au cours de la vitellogenèse

Analyse par PAGGE de la fraction soluble d'ovocytes ayant un diamètre d'environ 110 μm (a), 130 μm (b), 150 μm (c), 180 μm (d) et 230 μm (e)

Parallèlement, l'analyse par SDS-PAGGE des protéines d'ovocytes d'environ 110 μm de diamètre montre que YP175 est le polypeptide majeur dans les ovocytes à ce stade du développement (figure 16A, ligne 1), alors que conformément au marquage métabolique, il n'est plus détectable dans l'ovocyte mature (figure 16A, ligne 2). De plus, après analyse par SDS-PAGGE et transfert sur Immobilon-P des protéines d'ovocytes de 110 μm de diamètre, YP175 est le seul polypeptide révélé par les anticorps anti-V400 montrant ainsi que la vitelline n'est affectée par aucune protéolyse après incorporation dans les ovocytes d'animaux jeunes. (figure 16B).

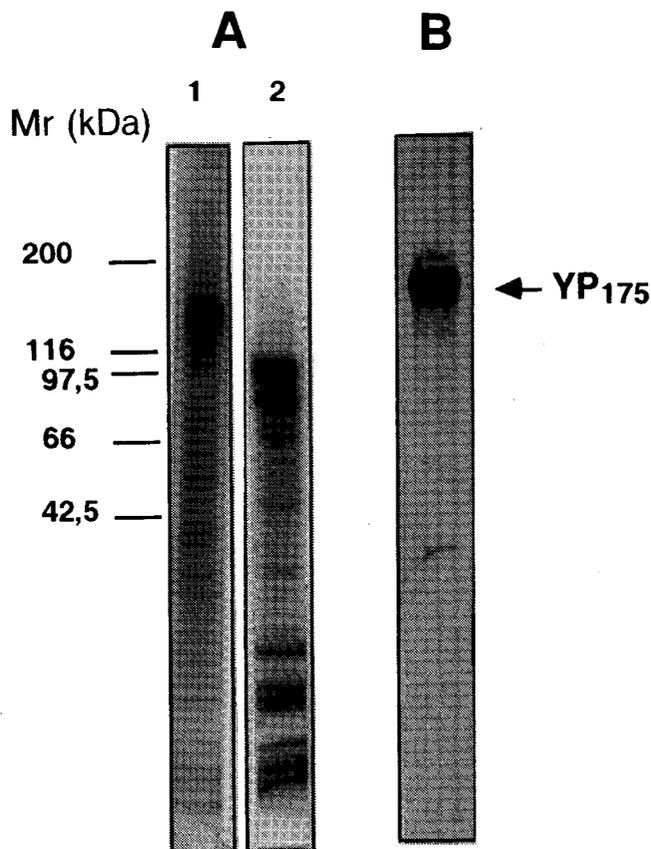


FIGURE 16 : Mise en évidence de l'absence de protéolyse de YP175 dans les ovocytes jeunes

A : Analyse par SDS-PAGGE de la fraction soluble d'ovocytes ayant un diamètre d'environ 110 μm (1) et 230 μm (2)

B : Immunorévélation de YP175 par le sérum anti-V400 après transfert sur Immobilon des protéines d'ovocytes jeunes (diamètre d'environ 110 μm) préalablement analysées par SDS-PAGGE

Cette étude comparative des protéines ovocytaires au cours du développement de la cellule permet de mettre en évidence le fait que la transformation de Vg en V400 ne s'enclenche qu'à un moment précis de l'ovogenèse. La vitellogénine qui entre dans l'ovocyte, et celle déjà incorporée, ne vont subir de profonds remaniements structuraux qu'à partir d'un stade déterminé qui correspond aux ovocytes dont le diamètre est supérieur à environ 110 μm . Etant donné que la vitellogénine commence à être incorporée dans l'ovocyte quand celui-ci atteint une taille d'environ 50 μm (*Dhainaut, 1970 ; Fischer, communication personnelle*), nos résultats suggèrent que pendant une longue période correspondant au début de la vitellogénèse, Vg s'accumule dans l'ovocyte sans subir aucune transformation structurale.

IV. Les polypeptides issus du clivage de la vitellogénine

A. Etude des clivages de la vitellogénine

L'étude des clivages de la vitelline a été réalisée par l'analyse de la composition polypeptidique de la vitelline isolée d'ovocytes à différents stades de développement. Dans ce but, la vitelline a été extraite des ovocytes par immunoaffinité à l'aide du sérum anti-V400, puis l'immunoprécipité obtenu a été analysé par SDS-PAGGE.

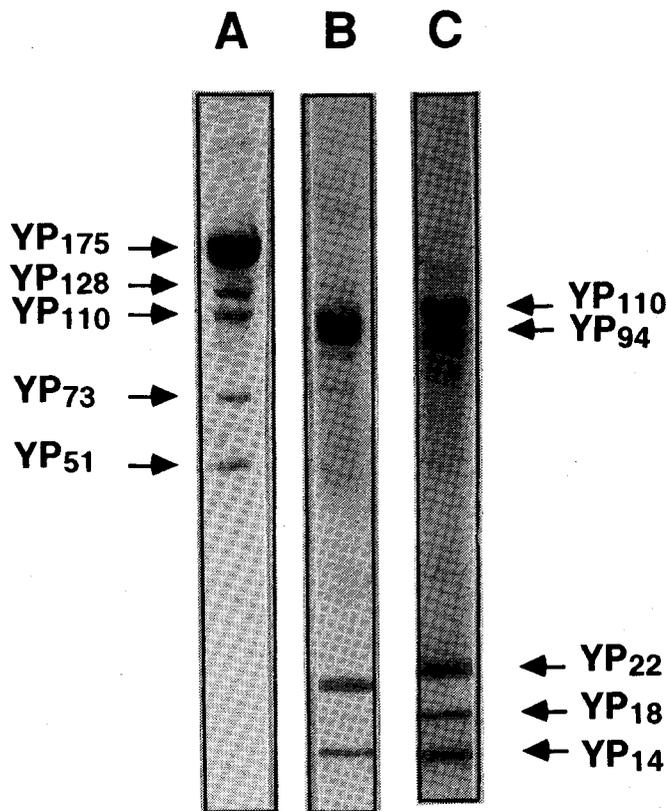


FIGURE 17 : Etude comparative de la composition polypeptidique de la vitelline au cours de la vitellogenèse

Analyse par SDS-PAGGE de la vitelline isolée par immunoaffinité à partir de la fraction soluble d'ovocytes ayant un diamètre d'environ 150 µm (A), 180 µm (B) et 230 µm (C)

Comme nous l'avons vu dans l'ovocyte jeune (environ 110 μm de diamètre), la vitellogénine ne subit aucun clivage et n'est composée que d'un polypeptide unique de 175 kDa.

Dans l'ovocyte un peu plus développé, (environ 150 μm de diamètre), la vitelline est composée de cinq éléments : YP175, YP110, et trois polypeptides dont le poids moléculaire est estimé à 128, 73 et 51 kDa et de ce fait appelés **YP128**, **YP73** et **YP51** (figure 17A). Ces quatre nouveaux polypeptides apparaissent nécessairement deux par deux suite au clivage de YP175. D'après leur poids moléculaire, la logique voudrait que YP175 donne d'une part, YP128 + YP51, et d'autre part, YP110 + YP73. YP110 serait une sous partie de YP128 et de même YP51 une sous partie de YP73. Le complément de YP51 dans YP73 serait le même que celui de YP110 dans YP128.

La vitelline issue d'ovocytes submatures (environ 180 μm) n'est composée que de trois polypeptides majeurs : YP110, YP22 et YP14 (figure 17B). Il faut noter que la somme des poids moléculaires de ces trois éléments (146 kDa) est très inférieure à celle de YP175 dont ils sont issus. Il est donc probable que YP73 se clive pour donner YP22, YP14 et un ou plusieurs éléments qui pourrait (ent) se détacher de la vitelline entraînant une perte de poids moléculaire d'environ 37 kDa.

Dans les ovocytes matures, apparaissent YP94 et YP18 (figure 17C). Comme la somme du poids moléculaire de ces deux éléments (112) est très proche de la valeur du poids moléculaire de YP110, et en tenant compte du fait qu'au fil de l'accroissement ovocytaire, YP110 disparaît progressivement des profils électrophorétiques, alors que parallèlement YP94 et YP18 deviennent de plus en plus présents, il est permis de suggérer que YP94 et YP18 sont issus du clivage de YP110.

Nos résultats, provenant de l'analyse des profils électrophorétiques de la vitelline purifiée à différents stades ovocytaires, ne nous permettent cependant pas d'établir, de manière définitive, la carte des clivages qui affectent YP175. Le raisonnement est en grande partie basé sur des calculs de poids moléculaires dont les valeurs, bien que significatives, ne sont pas rigoureusement exactes. En guise de complément, après isolement des polypeptides, l'établissement de leurs cartes peptidiques et le séquençage de l'extrémité N et C terminal devraient apporter des éléments de réponse déterminant à certaines questions en suspens. Néanmoins, nos résultats ont permis de mettre en évidence la forte probabilité d'un détachement polypeptidique au cours du clivage de YP175.

B. Etude des polypeptides se détachant lors du clivage de la vitellogénine

1) Identification

L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle PAGGE/SDS-PAGGE d'une fraction soluble d'ovocytes matures révèle la présence de plusieurs polypeptides majeurs ne rentrant pas dans la composition de V400 (figure 18), et absents dans les jeunes ovocytes.

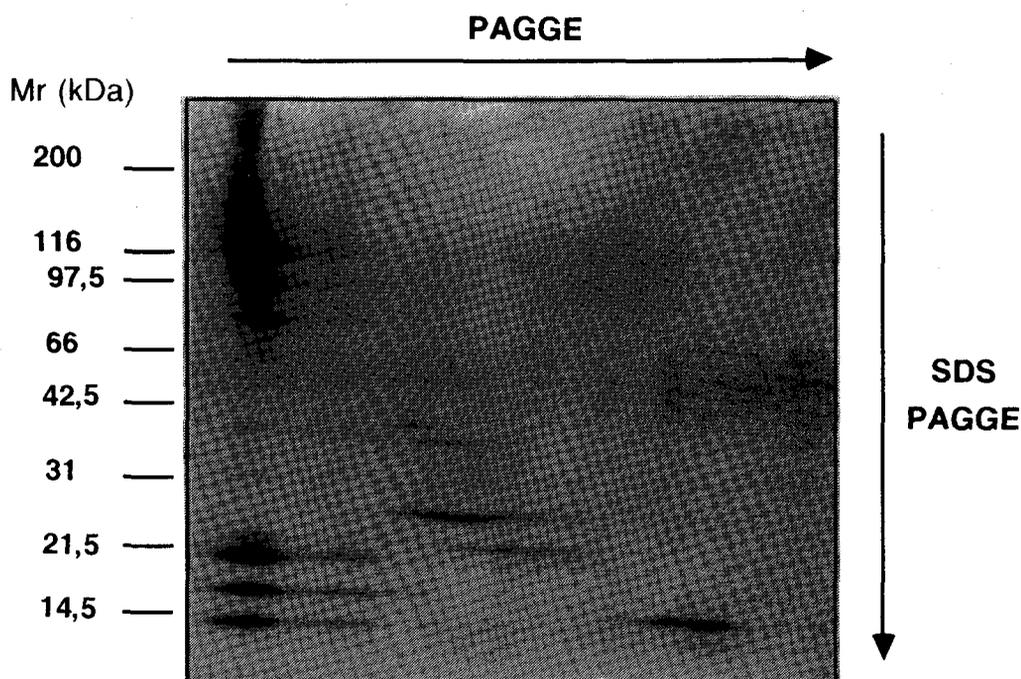


FIGURE 18 : Identification des polypeptides majeurs de l'ovocyte mature ne rentrant pas dans la composition de la vitelline

Analyse électrophorétique bidimensionnelle PAGGE/SDS-PAGGE de la fraction soluble d'ovocytes matures (diamètre d'environ 230 μm)

Comme ces éléments protéiques n'apparaissent dans l'ovocyte qu'à un stade où la protéolyse de YP175 est très avancée, il est possible, comme nous l'avons soupçonné, qu'il s'agisse d'éléments se détachant de Vg au cours des clivages. Cependant, à ce stade du développement ovocytaire, la corticogénèse qui est, avec la vitellogénèse, un métabolisme essentiel à la maturation ovocytaire, a déjà commencé. Il est donc envisageable que certaines des protéines identifiées ne soient pas des éléments du vitellus, mais des alvéoles ou granules corticaux.

De ce fait, dans le cadre de l'identification d'éventuel polypeptides libérés lors de la conversion de Vg en V400, nous avons cherché à isoler les globules vitellins par fractionnement cellulaire dans un gradient discontinu de saccharose. L'analyse par PAGGE des différentes fractions cellulaires obtenues montre la présence de V400 au niveau des organites contenus dans le coussin 0,9 M (figure 19).

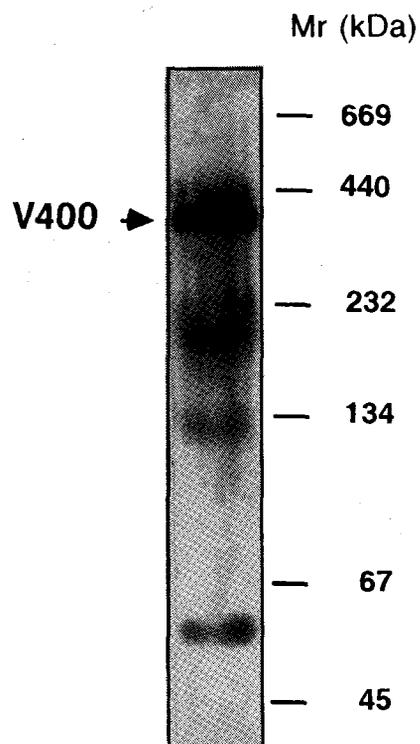


FIGURE 19 : Analyse électrophorétique des protéines des globules vitellins purifiés

Analyse par PAGGE des protéines de la fraction soluble des globules vitellins purifiés

Par la microscopie électronique, nous avons pu confirmer la présence des globules vitellins au niveau de cette fraction et juger satisfaisant le degré de pureté de cette préparation (figure 20).

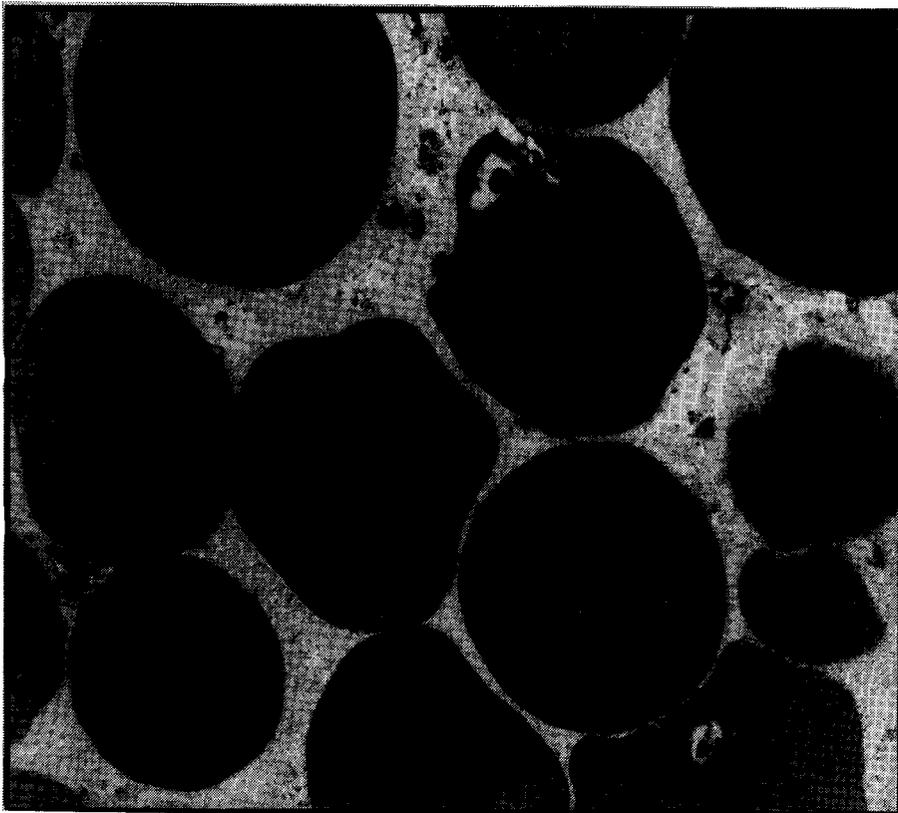


FIGURE 20 : Contrôle de pureté des globules vitellins isolés
par fractionnement cellulaire

Analyse en microscopie électronique des globules vitellins purifiés
x4500

L'observation a été réalisée par le Pr. A. Dhainaut

Après suppression de V400 de la fraction soluble des globules vitellins par immunoaffinité à l'aide du sérum anti-V400, l'analyse par électrophorèse en présence de SDS dans un gel d'acrylamide à 15 % (SDS-PAGE : SDS-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) de la fraction immunosupprimée (fraction **GVIS**) révèle la présence de quatre polypeptides majeurs ayant des poids moléculaires de 37, 28, 24 et 15 kDa et appelés respectivement **YP37**, **YP28**, **YP24** et **YP15** (figure 21).

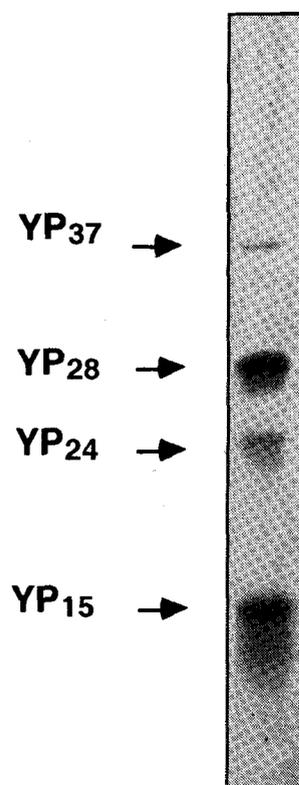


FIGURE 21 : Identification des polypeptides majeurs des globules vitellins ne rentrant pas dans la composition de la vitelline

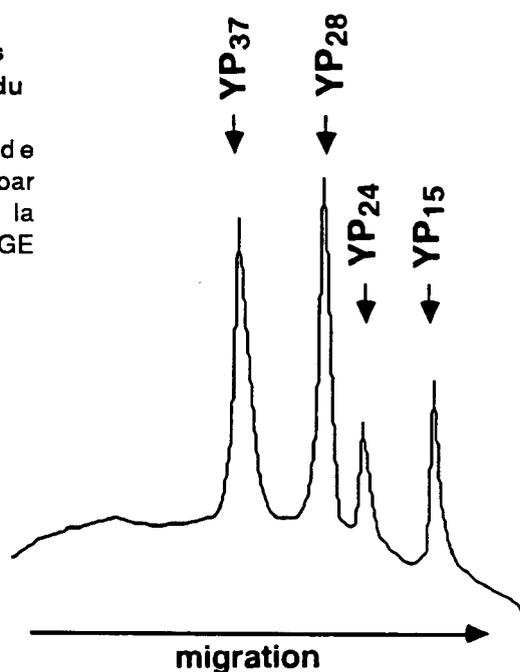
Analyse par SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide 15% des protéines de la fraction des globules vitellins dépourvus de V400 par immunoaffinité (fraction **GVIS**)

Si ces polypeptides sont issus de la vitellogénine, ils sont nécessairement immunologiquement reliés à Vg. Nous avons donc tester l'immunoréactivité de ces polypeptides avec un sérum polyclonal anti-Vg obtenu à partir de la vitellogénine isolée d'ovocytes jeunes en utilisant le même protocole chromatographique que celui ayant permis la purification de V400. A cette fin, après analyse par SDS-PAGE dans un gel d'acrylamide 15 % et transfert sur Immobilon-P des protéines de la fraction **GVIS**, nous avons cherché à identifier par le sérum anti-Vg les protéines immunologiquement reliées à la vitellogénine.

La figure 22 montre que YP37, YP28, YP24 et YP15 réagissent tous avec le sérum anti-Vg. Ainsi, en fonction de ce résultat, et étant donné que leur apparition dans les globules vitellins est concomitante de la protéolyse de Vg, il est vraisemblable qu'ils soient issus du clivage de cette protéine. Cependant, la somme des poids moléculaires de ces quatre polypeptides (104 kDa) est largement supérieure à la perte polypeptidique dont nous avons précédemment soupçonné l'existence (37 kDa). Ces éléments ne peuvent donc représenter des sous-parties indépendantes de YP175 ; d'où l'existence probable d'une relation précurseur-produit entre ces polypeptides.

FIGURE 22 : Identification des polypeptides indépendants de V400 et issus du clivage de YP175

Représentation densitométrique de l'immunorévélation des polypeptides issus de YP175 par le sérum anti-Vg après transfert des protéines de la fraction GVIS préalablement analysées par SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide à 15%



2) Etude métabolique *in vivo*

A un temps donné après l'injection intra-coelomique de ^3H leucine chez les femelles submatures, la vitelline est extraite des fractions solubles ovocytaires par immunoaffinité à l'aide du sérum anti-V400. Les polypeptides de la fraction immunosupprimée immunologiquement reliés à Vg sont à leur tour extraits par immunoaffinité à l'aide du sérum anti-Vg. L'immunoprécipité obtenu est ensuite analysé par SDS-PAGE dans un gel d'acrylamide à 15 % et la radioactivité incorporée dans les polypeptides est détectée par fluorographie.

Comme le montre la figure 23A, aucune protéine radioactive n'est détectable pour des temps de marquage courts (3 jours). Ce résultat prouve que YP37, YP28, YP24 et YP15 ne sont pas des protéines nouvellement synthétisées, mais des éléments vraisemblablement issus de la transformation secondaire d'un précurseur qui, étant donné les résultats précédents, est certainement la vitellogénine. Douze jours après l'injection, on observe un marquage important au niveau de YP37, mais aussi deux bandes radioactives plus discrètes au niveau de YP28 et YP15 (figure 23B). Après dix huit jours de marquage (figure 23C), alors que YP24 et YP15 sont les éléments portant l'essentiel de la radioactivité, la radioactivité portée par YP37 a totalement disparu et celle portée par YP28 a sensiblement diminué.

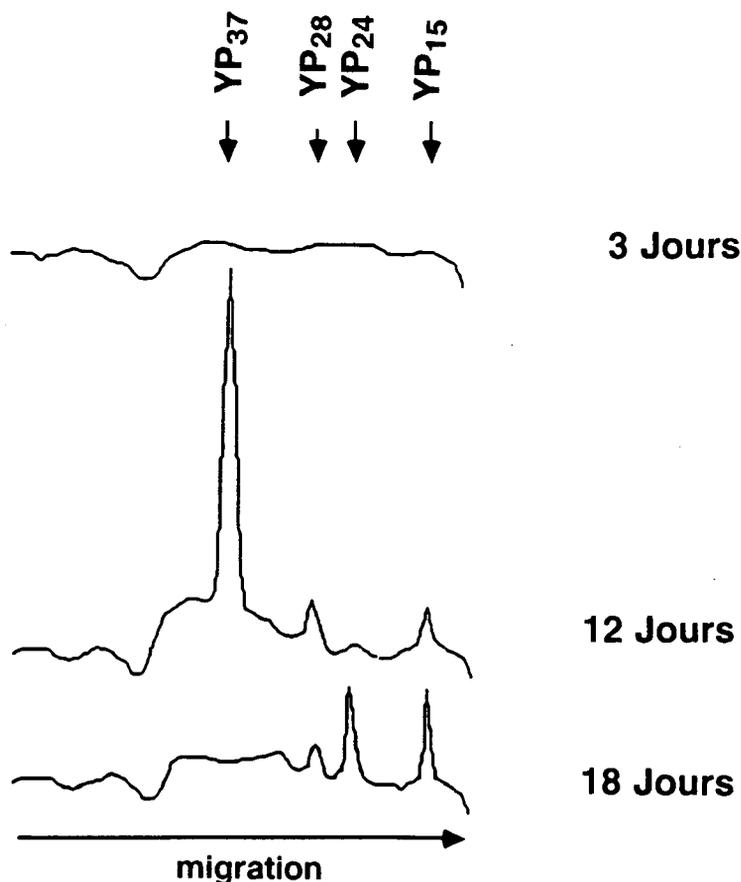


FIGURE 23 : Suivi, après marquage *In vivo*, de l'évolution au cours du temps des polypeptides indépendants de V400 et issus du clivage de YP175

Représentation densitométrique des fluorogrammes de l'analyse par SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide à 15% des polypeptides radiomarqués extraits à l'aide du sérum anti-Vg à partir des fractions solubles d'ovocytes dépourvus de V400 par immunoaffinité. Les ovocytes sont isolés de femelles matures 3, 12 et 18 jours après l'injection intracoelomique de $^3\text{[H]}$ leucine

L'évolution au cours du temps du marquage porté par YP37 montre que ce polypeptide issu de la protéolyse de Vg ne s'accumule pas dans les globules vitellins, mais qu'il disparaît quelque temps après s'être détaché de la vitellogénine. YP37 est donc probablement le précurseur de l'un, sinon des deux polypeptides nettement radiomarqués après le temps de marquage le plus long, c'est-à-dire YP24 et YP15.

Les conclusions de cette étude métabolique sont soutenues par le résultat illustré dans la figure 23 qui montre que parmi les quatre polypeptides présents dans les ovocytes ayant un diamètre d'environ 210 μm (figure 24A), seuls YP24 et YP15 s'accumulent dans les ovocytes plus mûrs, YP37 ayant tendance à disparaître. (figure 24B).

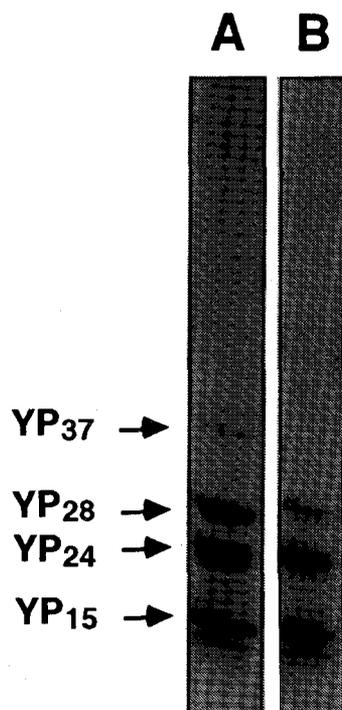


FIGURE 24 : Suivi, dans l'ovocyte mature, de l'évolution des polypeptides indépendants de V400 et issus du clivage de YP175

Analyse par SDS-PAGGE des protéines de la fraction soluble d'ovocytes ayant un diamètre d'environ 210 μm (A) et 230 μm (B) et préalablement dépourvus de V400 par immunoaffinité

Les résultats obtenus ne permettent toutefois pas de situer YP28 avec certitude dans la relation précurseur-produit qui unit les quatre éléments. Toutefois, la figure 24 et l'étude métabolique suggèrent fortement que ce polypeptide ne s'accumule pas dans les ovocytes matures, en faisant un précurseur potentiel de YP24 et/ou de YP15. Les résultats ne donnent cependant aucune indication sur son origine immédiate. Est-il un produit de transformation de YP37 ou directement issu du clivage de YP175 ? Des données supplémentaires s'avéraient donc nécessaires pour lever certaines incertitudes.

3) *Relations immunologiques*

Pour poursuivre l'étude des relations précurseur-produit reliant YP37, YP28, YP24 et YP15, nous avons cherché à établir les relations immunologiques existant entre ces différents polypeptides. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal anti-YP15 et de l'anticorps monoclonal An.Mo. 45-14.

a) Les anticorps

Lors de la sélection de l'anticorps monoclonal (An.Mo.45-14) dirigé contre la vitellogénine et utilisé dans la recherche du site de synthèse de la vitellogénine (voir § II.B.), nous avons pu mettre en évidence que l'épitope reconnu par cet anticorps était porté par YP28. Nous avons donc utilisé An.Mo.45-14 dans notre approche immunologique.

Un sérum polyclonal anti-YP15 a été préparé à partir de la protéine purifiée par chromatographie. YP15 a été isolé à partir de la fraction soluble d'ovocytes matures (figure 25A) en trois étapes chromatographiques : une chromatographie de gel filtration sur Ultrogel AcA 34, une chromatographie d'échange de cations et une chromatographie de gel filtration sur Superose 12. La première étape chromatographique est la même que celle réalisée lors de la purification

de la vitelline (§ I.B.). Comme le montre la figure 25B, l'analyse par SDS-PAGGE des fractions éluées révèle la présence de YP15 dans le troisième pic du chromatogramme présenté dans la figure 26A. Les fractions correspondant à ce pic sont rassemblées, puis concentrées et dessalées par dialyse sous vide. En vue de la deuxième étape, la solution concentrée est alors injectée sur une colonne mono S équilibrée avec du tampon phosphate pH 7,4. YP15 est retenu sur le gel et s'élué à une concentration de NaCl d'environ 35 mM (figure 26B). Les fractions contenant YP15 sont rassemblées, concentrées sous vide et la solution concentrée est injectée sur une colonne Superose 12 où YP15 s'élué sous la forme d'un pic homogène (figure 26C). L'analyse par SDS-PAGGE des fractions correspondant à ce pic montre que YP15 est le seul polypeptide présent dans la préparation (figure 25D).

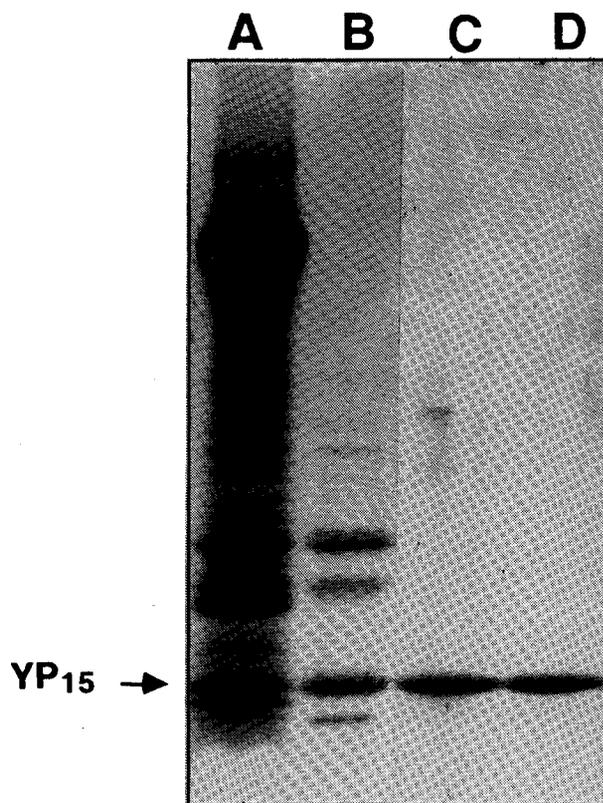
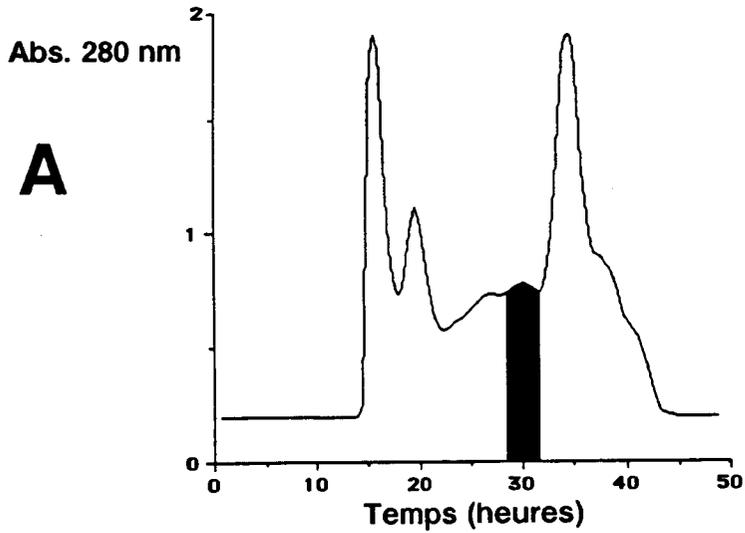


FIGURE 25 : Purification de YP15 : suivi électrophorétique

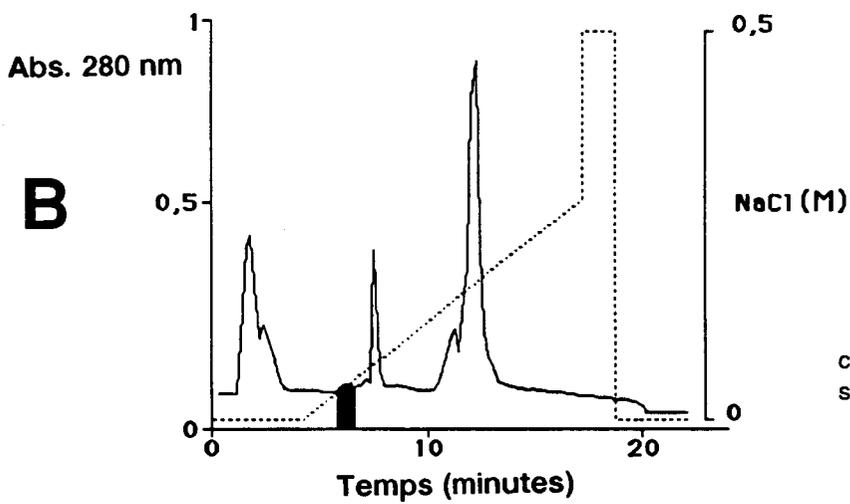
Analyse par SDS-PAGGE de la fraction soluble d'ovocytes matures (A) et des fractions contenant YP15 et éluées après les chromatographies :

- B : de gel filtration sur colonne d'Ultrogel AcA 34
- C : d'échange de cations sur colonne Mono S
- D : de gel filtration sur colonne Superose 12

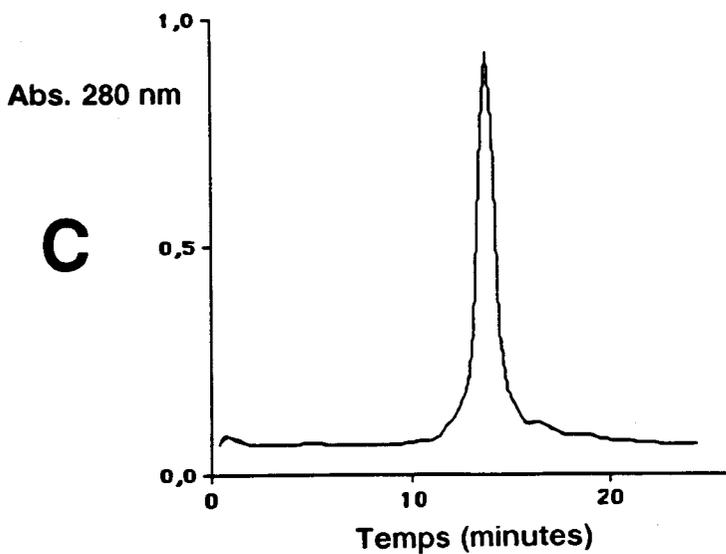
FIGURE 26 : Purification de YP15 : profils d'élution



Profil d'élution des protéines ovocytaires après la chromatographie de gel filtration sur colonne d'Ultrogel AcA 34



Profil d'élution de YP15 après la chromatographie d'échange de cations sur colonne Mono S



Profil d'élution de YP15 après la chromatographie de gel filtration sur colonne Superose 12

b) Relations immunologiques

Les protéines d'une fraction GVIS sont analysées en SDS-PAGGE et transférées sur Immobilon-P. La figure 27 montre la révélation de la feuille de transfert par les sérums polyclonaux anti-Vg (A) et anti-YP15 (B) et par An.Mo.45-14 (C). Il apparaît que YP37 est reconnu aussi bien par le sérum anti-YP15 que par An.Mo.45-14 et de ce fait serait le précurseur de YP28 et YP15. Sachant que le poids moléculaire de YP37 est le même que celui de la partie polypeptidique (37 kDa) dont nous avons soupçonné le détachement de YP175, il apparaît maintenant très probable que YP37 est le seul élément qui se détache initialement de la vitelline, suite aux clivages de YP175 et qu'après s'être séparé de la vitelline, il subirait à son tour un clivage et donnerait YP28 et YP15.

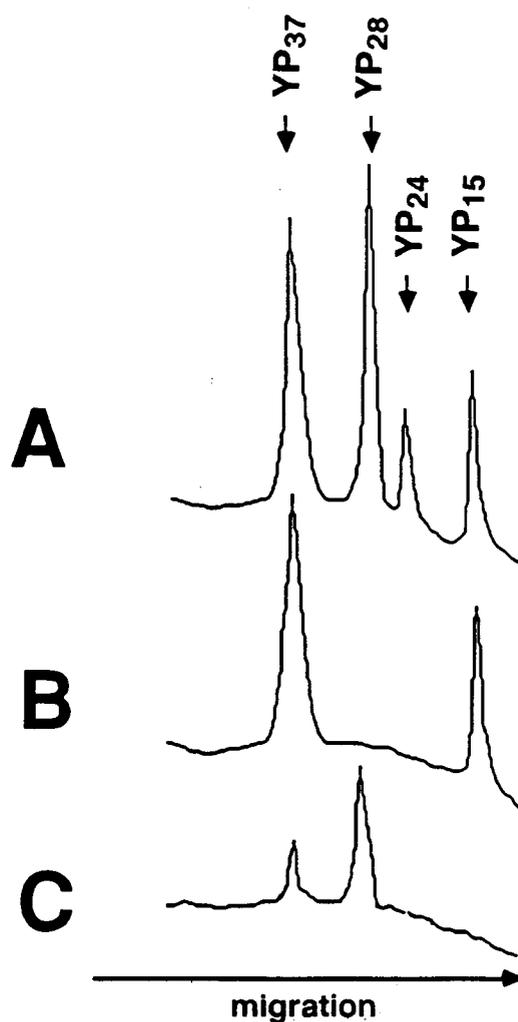


FIGURE 27 : Relations Immunologiques entre YP37, YP28, YP24 et YP15

Représentation densitométrique de l'immunorévélation des polypeptides de la fraction GVIS par le sérum anti-Vg (A), le sérum anti-YP15 (B) et l'anticorps An. Mo. 45-14 (C) après transfert sur Immobilon des protéines préalablement analysées par SDS-PAGGE

YP24 n'est reconnu ni par le sérum anti-YP15, ni par l'anticorps monoclonal An. Mo 45-14 (figure 27). Dans le cadre de l'hypothèse où seul YP37 se détache de la vitelline, étant donné, (i) son poids moléculaire, (ii), l'absence de relation immunologique avec YP15, (iii) le fait que YP28 ne s'accumule pas dans les globules vitellins avec YP15, YP24 est vraisemblablement issu de la transformation de YP28. L'absence de reconnaissance de YP24 par l'anticorps monoclonal An.Mo.45-14 pourrait alors s'expliquer par le fait que le passage de YP28 à YP24 entraînerait une perte ou une transformation de l'épitope reconnu par l'anticorps. Cependant, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une relation immunologique entre YP28 et YP24. En effet, après l'analyse par IEF d'une fraction GVIS et transfert des protéines sur Immobilon-P, on note, après révélation par An.Mo.45-14, au moins sept protéines reconnues par l'anticorps monoclonal (figure 28A).

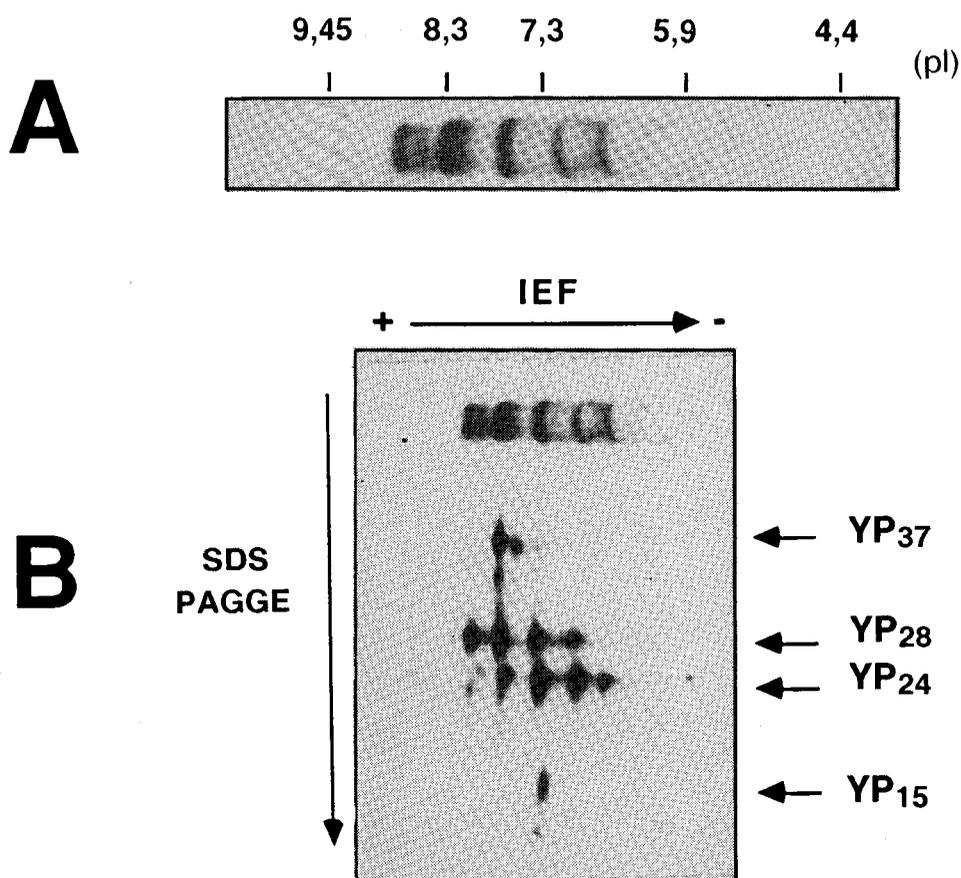


FIGURE 28 : Mise en évidence de la reconnaissance de YP24 par l'anticorps An.Mo. 45-14 dans des conditions non dénaturantes

A : Immunorévélation des polypeptides de la fraction GVIS par l'anticorps An. Mo. 45-14 après transfert sur Immobilon des protéines préalablement analysées par IEF

B : Immunorévélation des polypeptides de la fraction GVIS par le sérum anti-Vg après transfert sur Immobilon des protéines préalablement analysées par électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS-PAGGE

Le nombre de protéines reconnues s'explique au moins par l'importante hétérogénéité en charge de YP37 et surtout YP28, comme le montre la révélation par le sérum anti-Vg de ces protéines transférées sur Immobilon-P après une analyse par électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS-PAGGE (figure 28B). Le nombre important de protéines reconnues s'explique également par le fait que l'anticorps monoclonal est capable de reconnaître YP24 après analyse par IEF. En effet, on peut noter sur la première dimension que la protéine la plus acide, qui est reconnue par l'anticorps monoclonal, correspond dans la deuxième dimension à une des formes de YP24 (figure 28 B).

Ce résultat montre que An.Mo.45-14 est capable de reconnaître YP24 quand celui-ci est analysé par électrophorèse dans des conditions non dénaturantes. En fait, il est vraisemblable que l'épitope reconnu par An.Mo.45-14 est encore présent sur YP24 mais que, suite à un traitement par le SDS, et contrairement à YP28, un retour à des conditions non dénaturantes après transfert ne permet pas à la protéine de retrouver une structure telle que l'épitope puisse à nouveau être reconnu par l'anticorps.

4) *Origine de YP37*

Lors de l'étude des clivages de la vitellogénine (§ IV.A.), nous avons émis l'hypothèse que YP175 devait être coupé, dans un premier temps, au niveau de deux sites et générer deux couples de polypeptides (YP128, YP51) et (YP110, YP73). La poursuite de la protéolyse conduisant à la formation d'une vitelline composée de YP110, YP22 et YP14, nous avons postulé que YP73 devait donner secondairement YP22 et YP14 et émis l'hypothèse qu'une partie de YP73, estimée à 37 kDa, devait se détacher de la vitelline au cours de la protéolyse. Un polypeptide de 37 kDa (YP37) issu de YP175 et non associé à V400 ayant été mis en évidence, nous avons cherché à confirmer l'hypothèse selon laquelle celui-ci est initialement inclus dans YP73.

A cette fin, après analyse par SDS-PAGGE et transfert sur Immobilon-P de la vitelline issue d'ovocytes d'un diamètre d'environ 150 μm , (figure 29A, ligne 1), nous avons révélé la feuille de transfert par les anticorps spécifiques de YP37 : l'anticorps An. Mo. 45-14 et le sérum anti-YP15. La figure 29A, ligne 2, montre que l'anticorps An. Mo. 45-14 reconnaît YP175 mais aussi de manière plus discrète YP73 et YP51. D'autre part, on peut noter qu'il n'y a aucun marquage au niveau de YP128 et YP110. Si on analyse une quantité plus importante de protéines (figure 29B), on met cette fois en évidence un marquage significatif de YP73 et YP51, mais aussi deux bandes négatives qui sont repoussées par la masse de YP175 et qui correspondent vraisemblablement à YP128 et YP110.

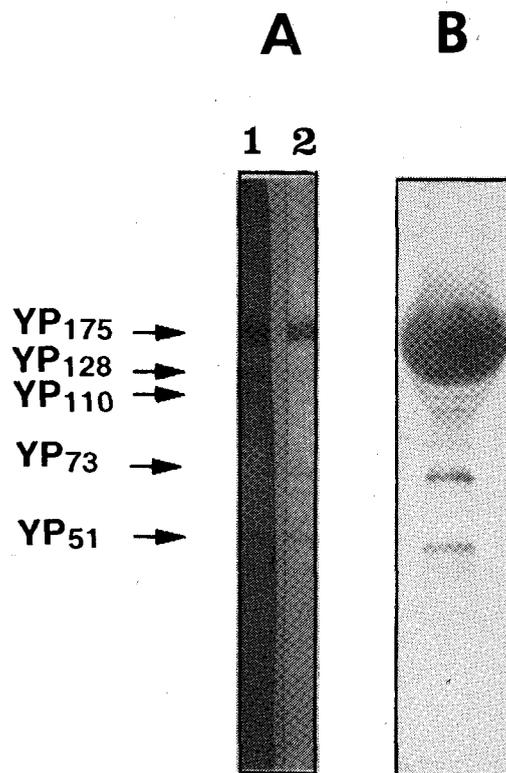
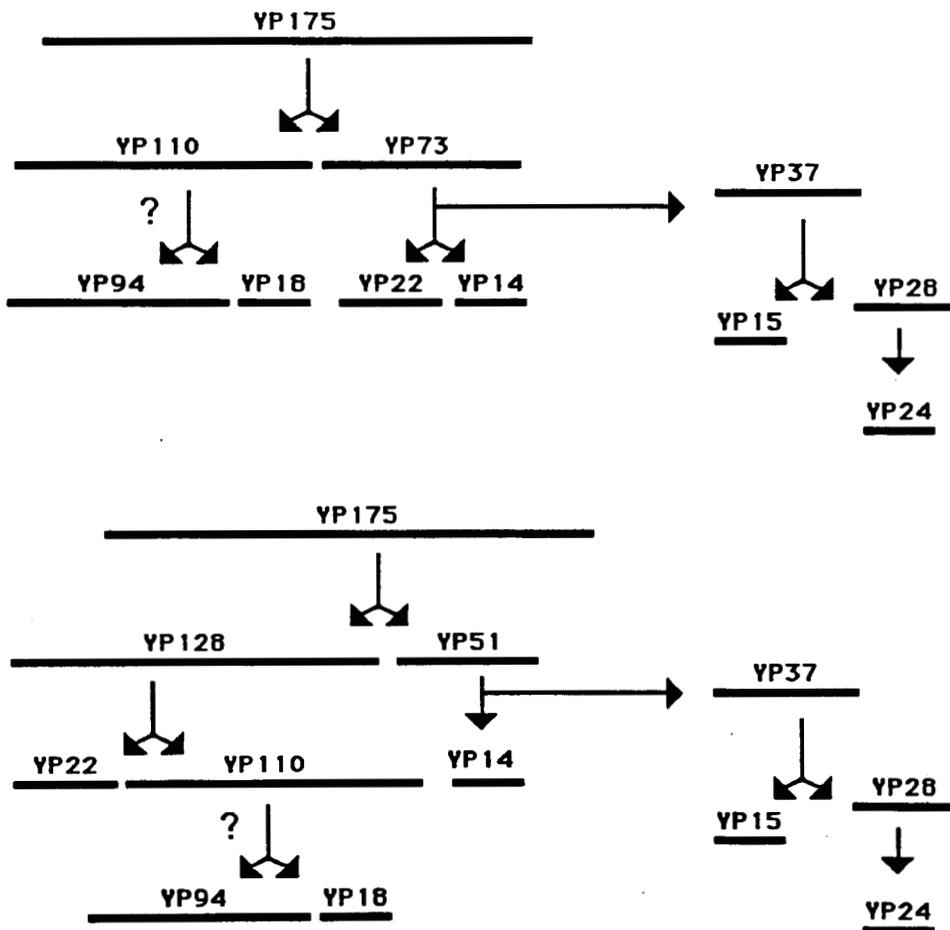


FIGURE 29 : Recherche de l'origine de YP37

Après l'analyse par SDS-PAGGE de la vitelline isolée d'ovocytes de 150 μm de diamètre, les polypeptides sont transférés sur Immobilon-P (A, ligne 1), puis révélés par l'anticorps An. Mo. 45-14 ou par le sérum anti-YP15 (A, ligne 2 et B) 15 (A, ligne 2 et B)

Nous pouvons donc maintenant affirmer que YP37 fait effectivement partie de la structure de YP73 et même de celle de YP51. Il se détacherait de la vitelline à la suite des clivages de ces deux éléments. En conséquence, YP73 peut être effectivement considéré comme le précurseur de YP37, YP22 et YP14, alors que YP51 générerait YP37 ainsi que, compte tenu des valeurs de poids moléculaire, YP14. Dans ce cas, YP128, complément de YP51 au sein de YP175, pourrait être considéré comme le précurseur de YP22 et YP110.

En tenant compte de l'ensemble de nos résultats, les clivages subis par YP175 peuvent se résumer de la manière suivante :



V. Activités protéolytiques associées aux globules vitellins

Les résultats précédents mettent en évidence l'existence, dans les ovocytes âgés, d'une activité protéolytique qui agit sur la vitellogénine. Cette activité ne s'exprime qu'à un moment donné du développement de l'ovocyte (diamètre ovocytaire > 100 μm). De ce fait, l'expression de cette activité traduit probablement un changement du métabolisme ovocytaire et pourrait être une cible de l'activité neuroendocrine qui régule la mise en place des différents processus biologiques liés au développement de l'ovocyte (Porchet, 1976).

En tant que cible potentielle du contrôle endocrine de l'ovogénèse, nous avons entrepris l'identification et la caractérisation de la (ou des) protéase (s) associée (s) aux globules vitellins dans l'ovocyte mature.

A. Mise en évidence d'activités protéolytiques dans les globules vitellins

Nous avons d'abord cherché à mettre en évidence la présence d'activités protéolytiques dans la fraction soluble des globules vitellins, en utilisant l'hémoglobine substrat. Les incubations ont été réalisées arbitrairement à 37°C et à un pH variant de 2 à 9.

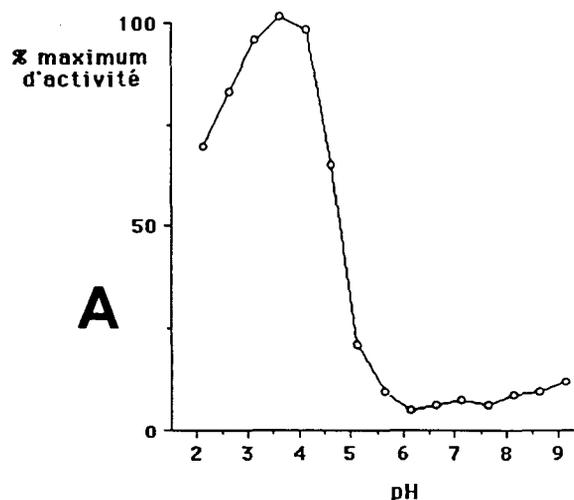


FIGURE 30 : Mise en évidence d'activités protéolytiques dans les globules vitellins en fonction du pH

Profil de l'hydrolyse de l'hémoglobine en fonction du pH, après incubation du substrat avec la fraction soluble des globules vitellins pendant 1 heure à 37°C

L'activité protéolytique est exprimée en pourcentage du maximum d'activité mesurée

La figure 30 montre la présence, dans la fraction soluble des globules vitellins, d'une activité protéolytique majeure capable d'hydrolyser l'hémoglobine avec un pH optimum de 3,5.

Pour savoir si cette activité protéolytique était capable d'agir sur la vitelline, nous avons incubé à 37°C des fractions solubles de globules vitellins à différents pH entre 2 et 9. A la suite de l'incubation, les fractions ont été analysées par SDS-PAGGE, afin de mettre en évidence l'éventuelle protéolyse des polypeptides constituant la vitelline. Après 24 heures d'incubation, l'analyse électrophorétique révèle une hydrolyse presque complète des polypeptides vitellins pour les pH 3 et 4 (figure 31).

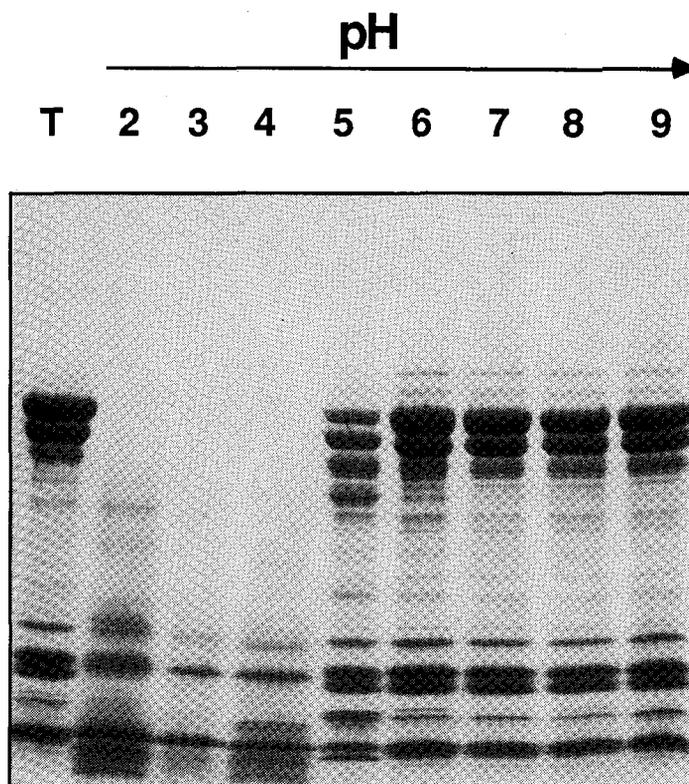


FIGURE 31 : Mise en évidence d'une activité protéolytique acide associée aux globules vitellins et capable d'hydrolyser la vitelline

Analyse par SDS-PAGGE des fractions solubles de globules vitellins incubées à différents pH (2 à 9), pendant 24 heures, à 37°C

Ce résultat, qui confirme d'une part la présence d'une activité protéolytique acide dans la fraction soluble des globules vitellins, montre d'autre part que cette activité est capable d'hydrolyser la vitelline.

Si on réalise une cinétique de l'hydrolyse sur des temps plus courts (0 à 1 heure) (figure 32), on s'aperçoit que la protéolyse de la vitelline à pH 3 génère des polypeptides qui comigrent avec des éléments déjà présents dans les globules vitellins non incubés, mais en plus faible quantité.

T 1 2 3

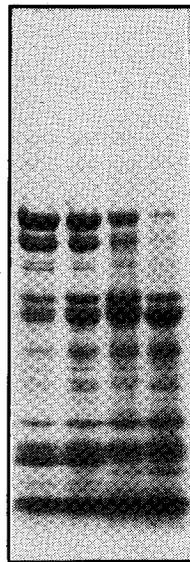


FIGURE 32 : Cinétique d'hydrolyse de la vitelline par l'activité protéolytique acide

Analyse par SDS-PAGGE des fractions solubles de globules vitellins incubées à pH 3, à 37°C, pendant 15 minutes (1), 30 minutes (2) et 60 minutes (3)

T : fraction non incubée

Il semble donc que l'activité protéolytique acide soit non seulement capable d'agir sur la vitelline, mais aussi de donner des éléments naturellement issus du clivage de la vitelline.

B. Caractérisation de l'activité protéolytique acide

Comme nous l'avons vu dans les données générales sur la vitellogenèse (§ II. D.), il est très probable que les clivages de la vitellogénine, au cours de son transit vers les globules vitellins dans les ovocytes de vertébrés, soient l'oeuvre de protéases lysosomiales. D'autre part, de nombreux travaux concernant la dégradation des vitellines au cours de l'embryogenèse ont montré que les protéases lysosomiales étaient impliquées dans ce processus (*Perona*, 1985, 1988 ; *Yokota et Kato*, 1988 ; *Medina*, 1988 ; *Medina et Vallejo*, 1989). Etant donné que l'activité protéolytique, qui semble participer à la protéolyse de la vitelline dans les globules vitellins de *N. diversicolor*, a un pH optimum acide (entre 3 et 4), nous avons suspecté la présence de cathépsines dans la fraction soluble des globules vitellins.

Si on se base sur le résidu essentiel du site actif (*Webb*, 1984), les protéases lysosomiales peuvent être classées selon deux types : les cystéine-protéases (EC 3. 4. 22) et les aspartique-protéases (EC 3. 4. 23) (*Bond et Butler*, 1987). Si la fraction soluble des globules vitellins est incubée à 37°C et à pH 3 en présence d'inhibiteurs spécifiques des aspartique-protéases et des cystéine-protéases lysosomiales, c'est-à-dire respectivement la pepstatine A et la leupeptine, seule la leupeptine inhibe l'hydrolyse de la vitelline (figure 33, ligne 2), la pepstatine A n'ayant aucun effet sur l'activité protéolytique (figure 33, ligne 1).

T+ T- 1 2 3

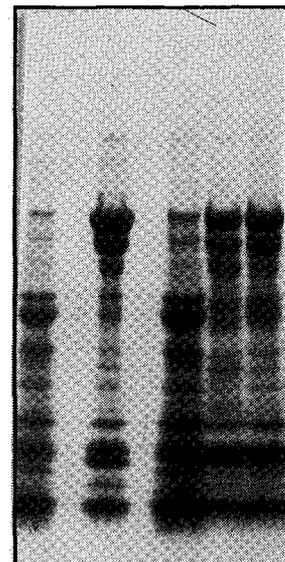


FIGURE 33 : Test d'inhibition de l'activité protéolytique acide associée aux globules vitellins

Analyse par SDS-PAGGE des fractions solubles de globules vitellins incubées à pH 3, à 37°C, pendant 1 heure et en présence de :

- 1 : 10 μ M de pepstatine
- 2 : 10 μ M de leupeptine
- 3 : 1 mM de HgCl₂

T- : fraction non incubée

T+ : fraction incubée sans inhibiteur

Ce résultat, confirmé par l'action inhibitrice de HgCl_2 (bloquant des fonctions thiol) (figure 33, ligne 3), suggère que l'activité protéolytique acide mise en évidence dans les globules vitellins est du type cystéine-protéase acide.

Les principales cystéine-protéases rencontrées dans les lysosomes étant les cathépsines B (EC 3. 4. 22.1), H (EC 3. 4. 22.16) et L (EC 3. 4. 22.15) (pour revue : *Barrett et Kirschke, 1981*), nous avons recherché la présence de ces trois types de protéases dans les globules vitellins.

1) la cathépsine B

Afin de mettre en évidence la présence de cathépsine B dans les globules vitellins, nous avons utilisé un substrat spécifique de cette enzyme :

Z-Arg-Arg-NH-Mec

(benzyloxycarbonyl-L-arginine-L-arginine-7-(4-methyl)coumarylamide)

(*Barrett, 1980*)

Comme le montre la figure 34a, en présence de la fraction soluble de globules vitellins, Z-Arg-Arg-NH-Mec, quelque soit le pH, n'est pas hydrolysé. Ce résultat suggère que les globules vitellins ne contiennent pas d'activité protéolytique de type cathépsine B.

2) la cathépsine L

La recherche de cathépsine L dans les globules vitellins a été réalisée en utilisant :

Z-Phe-Arg-NH-Mec

(benzyloxycarbonyl-L-phénylalanine-L-arginine-7-(4-methyl)coumarylamide)

(*Kirschke, 1982*)

Bien que beaucoup plus sensible à la cathépsine L, ce substrat est susceptible d'être clivé par la cathépsine B (*Barrett, 1980*). Toutefois, comme nous venons de mettre en évidence l'absence de cathépsine B dans les globules vitellins, ce substrat pourra ici, être considéré comme spécifique de la cathépsine L. La figure 34b montre que Z-Phe-Arg-NH-Mec est hydrolysé avec un pH optimum de 4,5 en présence de la fraction soluble de globules vitellins.

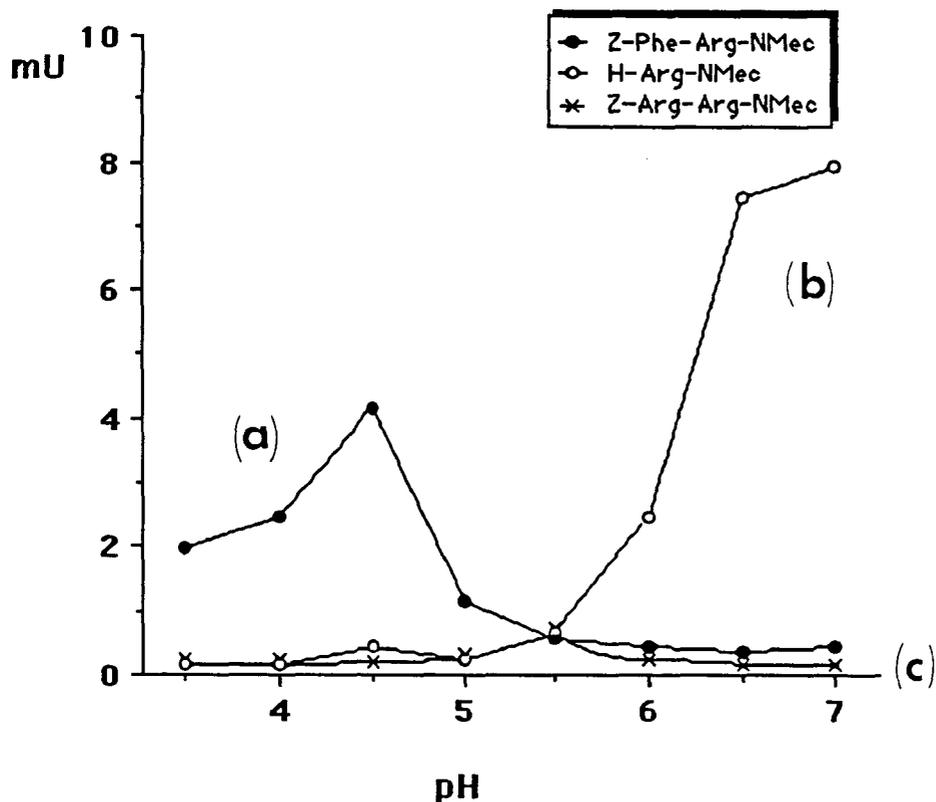


FIGURE 34 : Recherche d'activités protéolytiques de type cathépsine B,H et L dans les globules vitellins

Profil de l'hydrolyse de Z-Phe-Arg-NH-Mec (a), Z-Arg-Arg-NH-Mec (b) et Arg-NH-Mec (c) en fonction du pH, après incubation du substrat avec la fraction soluble de globule vitellin pendant 1 heure à 37°C.

L'influence de divers réactifs sur l'hydrolyse de Z-Phe-Arg-NH-Mec à pH 4,5 (tableau 3) a pu confirmer que cette activité était du type cathépsine L. En effet, l'E64 et la leupeptine qui sont des inhibiteurs des cystéine-cathépsine annulent complètement l'hydrolyse de Z-Phe-Arg-NH-Mec. D'autre part, l'effet activateur de la cystéine et du dithiothréitol et l'effet inhibiteur de HgCl₂ montrent l'importance jouée par un résidu cystéine libre dans l'activité de l'enzyme et de ce fait confirment qu'il s'agit d'une cystéine-protéase acide. Comme nous avons pu observer l'hydrolyse à un pH acide de la caséine en présence d'urée 3M par une fraction de globules vitellins (résultat non montré), il semblerait que les globules vitellins contiennent une activité protéolytique dont la spécificité de substrat est analogue à celle qui a été mise en évidence pour la cathépsine L du foie de rat. (Barrett et Kirschke, 1981).

REACTIFS	ACTIVITE (%)	
	Z-Phe-Arg-NH-Mec à pH 4,5	Arg-NH-Mec à pH 7
Contrôle	100	100
E64 (10µM)	0	100
Leupeptine (10µM)	0	100
TLCK (1mM)	100	110
Cystéine (10mM)	450	60
Dithiothréitol (10mM)	600	50
Iodoacétamide (5mM)	25	85
EDTA (5mM)	120	55
HgCl ₂ (10mM)	0	0
Puromycine (1mM)	Non déterminé	5
<i>Ortho</i> - Phénenthroline (5mM)	Non déterminé	0

TABLEAU 3 : Influence de divers réactifs sur l'hydrolyse par la fraction de globules vitellins de Z-Phe-Arg-NH-Mec à pH 4,5 et de Arg-NH-Mec à pH 7 .

Les incubations sont réalisées à 37°C pendant 1 h.

Abréviations : - E64 : L-trans-époxy succinylleucylamido-(4-guanidino)-butane.

- TLCK : L-1-chloro-3-(4-tosylamido)-7-amino-2-heptanone.

3) la cathépsine H

La cathépsine H peut agir soit comme une endopeptidase soit comme une aminopeptidase. Elle peut être sélectivement mise en évidence en utilisant un substrat possédant l'extrémité N-terminal libre tel que Arg-NH-Mec (L-arginine-7-(4-méthyl)coumarylamide) (Barrett, 1980). La figure 34c montre que Arg-NH-Mec est hydrolysé avec un pH optimum de 7 en présence de la fraction soluble de globules vitellins. Bien

que le pH optimum d'activité soit semblable à celui observé pour la cathépsine H (Barrett, 1980) l'absence d'effet inhibiteur de E64 et de la leupeptine et l'absence d'activation par la cystéine et le dithiothréitol (tableau 3) suggèrent que l'activité mise en évidence n'est pas du type cathépsine H. L'effet fortement inhibiteur de la puromycine à laquelle la cathépsine H est insensible (Kirschke, 1977) montre que l'activité aminopeptidase mise en évidence n'est certainement pas associée à une cathépsine H.

En fait, l'effet inhibiteur de chélateurs tels que l'EDTA et l'ortho-phénenthroline (tableau 3) suggère que l'activité arylpeptidasique est le fait d'une métallo-protéase dont on peut penser que le site actif contient un résidu cystéine important pour l'expression de l'activité enzymatique, étant donné l'effet inhibiteur de la cystéine, du dithiothréitol et de l'iodoacétamide (tableau 3).

C. Conclusion

La recherche d'activités protéolytiques dans les globules vitellins des ovocytes matures a permis de mettre en évidence deux activités majeures. L'influence des différents réactifs testés permet d'affirmer que ces deux activités ne sont pas associées à un même site actif. Les globules vitellins des ovocytes matures renferment une activité de type cathépsine L et une activité de type aminopeptidase portée par une métallo-enzyme.

L'identification d'une cathépsine L dans les globules vitellins rejoint les conclusions de nombreux travaux qui ont montré l'intervention de cathépsines dans la dégradation du vitellus protéique. Par contre, la mise en évidence d'une activité aminopeptidasique dans les globules vitellins peut paraître plus surprenante. Il faut toutefois noter qu'une aminopeptidase a été isolée du vitellus de l'oeuf de poule (Ichishima, 1989), mais que la fonction de cette protéase n'est pas encore définie.

L'isolement de ces deux activités protéolytiques paraît maintenant nécessaire pour étudier plus précisément leur rôle dans la protéolyse de YP175. Cette purification est envisageable puisque les deux activités sont suffisamment caractérisées pour tester de manière sensible et spécifique la présence de celles-ci dans un milieu.

Discussion

L'ensemble des résultats rapportés dans cette thèse permettent d'établir un schéma général de la vitellogénèse chez *N. diversicolor* qui diffère très peu de celui précédemment établi chez *P. cultrifera* par Baert (1986). Nos résultats confirment les travaux précédents chez *P. cultrifera* (Baert et Slomianny, 1987) et *N. virens* (Fischer et Rabiën, 1986) qui affirmaient que la vitellogénine était élaborée hors de l'ovocyte. De plus, nous avons pu, par immunocytochimie, identifier Vg dans les éléocytes et ainsi préciser quel était au sein des coelomocytes, le site de synthèse de la vitellogénine. Notre travail a également montré, comme chez *P. cultrifera* (Baert, 1985, 1986b), que la vitellogénine subissait de profonds remaniements de structure après son incorporation dans l'ovocyte. Le processus aboutit à la formation d'un complexe lipoglycoprotéique d'environ 400 kDa et de deux polypeptides de 24 et 15 kDa, tous deux issus du clivage d'un élément de 37 kDa qui se détache de la vitelline au cours de la protéolyse.

La protéolyse de Vg s'enclenche dans l'ovocyte à partir d'un stade qui correspond à des ovocytes d'environ 100 μm de diamètre. A ce stade, la protéolyse reste limitée à quelques coupures de YP175. Dans l'ovocyte submature (environ 180 μm), au moment où se met en place la corticogénèse, on note une hydrolyse plus importante de la partie glycoprotéique de la vitelline et l'apparition des polypeptides de faibles poids moléculaires. Cette protéolyse se poursuit dans l'ovocyte mature, au point que V400 subit continuellement des clivages intramoléculaires. Comme parallèlement l'ovocyte continue d'incorporer de la vitellogénine, V400 est constitué par un mélange de formes plus ou moins avancées dans la protéolyse. Ces remaniements de structure et le détachement de YP37 qui, comme le montre l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle IEF/SDS-PAGGE, est très hétérogène en charge, entraînent inévitablement une hétérogénéité de charge de V400 et expliquent l'étalement assez important du pic de la vitelline à l'issue de la chromatographie d'échange d'anions (figure 2) et l'aspect diffus en IEF de la bande de vitelline purifiée (figure 4).

Nos résultats ont montré qu'une partie de YP175, estimée à 37 kDa, se détachait au cours de la protéolyse. Etant donné que la vitellogénine est une protéine dimérique, le détachement de YP37 entraîne une perte de

poids moléculaire d'environ 75 kDa. Or, la différence de poids moléculaire entre Vg et V400 est d'environ 150 kDa. Le détachement de YP37 ne peut donc expliquer à lui seul cette différence. Comme nous l'avons vu précédemment, la vitelline a été identifiée, par coloration sur gel après électrophorèse, comme étant une protéine portant des glucides et des lipides. De ce fait, le reste du poids moléculaire perdu par Vg, après l'incorporation dans l'ovocyte, peut être impliqué à une perte de lipide ou/et de glucide. Une analyse quantitative de la composition glucidique et lipidique des deux molécules purifiées permettrait de vérifier cette hypothèse.

La signification biologique de la transformation intraovocytaire de vitellogénine est mal connue. Chez les vertébrés ovipares, le clivage de la vitellogénine semble étroitement lié à l'orientation de la molécule vers son lieu de stockage au cours du transit intraovocytaire (Opresko et Karpf, 1987). L'hypothèse émise pour expliquer le clivage de la vitellogénine dans l'ovocyte de vertébré ne semble pas s'appliquer au phénomène observé chez *N. diversicolor* pour deux raisons : (i) La vitellogénine ne subit pas une protéolyse limitée comme chez les vertébrés, mais de nombreux clivages qui modifient sans cesse la composition polypeptidique de la vitelline. (ii) La protéine s'accumule dans les ovocytes jeunes sans subir de clivage. Toutefois, en ce qui concerne l'absence de clivage chez les animaux jeunes, il n'a jamais été démontré que la vitellogénine s'accumule à ce stade dans des globules vitellins. Au contraire, nous nous sommes aperçu, lors d'essais d'isolement de globules vitellins à partir d'ovocytes jeunes, que la fraction contenant Vg était constituée d'un nombre important de vésicules endosomiales et de globules de plus grandes tailles présentant une structure non homogène et granulaire. Il n'est donc pas exclu qu'à ce stade, les vésicules contenant la vitellogénine n'aient pas encore véritablement fusionné pour former des globules vitellins tels que ceux rencontrés dans les ovocytes matures. Ainsi, même si chez *N. diversicolor* la protéolyse de la vitellogénine n'est pas limitée à quelques clivages comme chez les vertébrés, il est possible que les premières coupures de la vitellogénine soient impliquées dans le processus de fusion des vésicules endosomiales. Par contre, la poursuite des clivages au sein de V400 suggère que le phénomène observé pourrait correspondre à l'engagement d'une dégradation prématurée du vitellus au cours de l'ovogenèse. La protéolyse intramoléculaire de V400 aboutit à la formation

d'un complexe ayant une structure analogue à celle observée dans les globules vitellins lors des premiers stades de l'embryogenèse chez l'oursin (*Kari et Rottmann, 1985, Yokota and Kato, 1988*) et chez *Bombyx mori* (*Indrasith, 1987*).

La mise en évidence dans les globules vitellins d'activités protéolytiques de type cystéine-protéase lysosomiale, capables d'agir sur la composition polypeptidique de V400 en générant des polypeptides apparemment issus du clivage naturel de la vitelline, renforce l'idée que le processus de transformation de la vitellogénine pourrait correspondre à une dégradation prématurée du vitellus. En effet, ce type d'activité a été identifié comme l'agent responsable de la dégradation du vitellus dans l'embryon d'oursin (*Yokota and Kato, 1988*) et de drosophile (*Medina, 1988*).

Dans le cadre de cette hypothèse, il reste maintenant à comprendre pourquoi les protéases responsables de la dégradation du vitellus s'exprimeraient au cours de l'ovogenèse chez *N. diversicolor*, alors que chez les autres espèces ovipares leur action ne s'enclenche qu'après la fécondation.

Conclusion

L'étude de la conversion intraovocytaire de la vitellogénine en vitellines chez *N. diversicolor* a permis de mettre en évidence que la transformation de la vitellogénine n'a pas lieu systématiquement après l'incorporation de la protéine dans l'ovocyte. Dans les ovocytes de jeunes femelles, la vitellogénine s'accumule sans être affectée par des modifications significatives. L'enclenchement du processus et plus particulièrement, la protéolyse de YP175, peut être considéré comme le reflet d'un stade particulier du développement de l'ovocyte. Il est manifeste que des activités protéolytiques vont s'exprimer dans les globules vitellins à partir d'un stade de l'ovogénèse que l'on peut caractériser par un diamètre ovocytaire d'environ 110 μm . Les raisons pour lesquelles l'ovocyte est incapable, à un stade défini, de transformer la vitellogénine qu'il incorpore sont à déterminer. Il est probable que l'acquisition de cette capacité découle d'une différenciation de la cellule. Elle résulte vraisemblablement d'un changement du métabolisme de l'ovocyte à la suite de l'action d'un ou de plusieurs facteurs hormonaux. Il faut en effet rappeler que le développement ovocytaire est intimement relié à l'activité endocrine du cerveau définie par la production d'une hormone appelée "néréidine" ou SIF. Toutefois, la lenteur du processus de vitellogenèse chez les néréidiens ne facilite pas l'appréhension des mécanismes hormonaux qui pourraient être impliqués dans l'activation de la transformation intraovocytaire de la vitellogénine.

La mise en évidence d'activités protéolytiques dans les globules vitellins des ovocytes matures, ouvre une nouvelle voie d'étude de la transformation intraovocytaire de la vitellogénine en vitellines. L'intervention de ces activités sur l'hydrolyse de YP175 reste à déterminer. En particulier, rien n'indique que ce type d'activité soit impliqué dans les premières coupures qui affectent la vitellogénine. Cependant, en possession de la carte des clivages de YP175, il devrait être possible d'identifier l'activité protéolytique impliquée dans les premiers clivages après avoir purifié les protéases présentes dans les globules vitellins des ovocytes matures et testé leur action sur la vitellogénine purifiée.

L'obtention de sondes immunologiques et nucléotidiques spécifiques des protéases devrait permettre de définir si la mise en place du processus coïncide avec la synthèse des activités protéolytiques ou si celles-ci sont déjà présentes dans les globules vitellins, et que leur expression résulte d'une activation ou de la levée d'une inhibition. Dans tous les cas, il est raisonnable de penser qu'il sera possible d'obtenir un test biologique suffisamment sensible pour appréhender les mécanismes hormonaux impliqués dans l'activation de la conversion de la vitellogénine en vitellines chez les néréidiens.

Matériels et Méthodes

I. Matériel biologique

Les *Nereis diversicolor* ont été récoltées dans l'estuaire de l'Aa, à Petit Fort Philippe ou à Grand Fort Philippe. Au laboratoire, les femelles sont séparées des mâles et triées en fonction du diamètre ovocytaire moyen (Durchon, 1952). Les animaux sont conservés à 15°C dans l'eau de mer.

II. Isolement des cellules

Les coelomocytes, les ovocytes et le liquide coelomique sont prélevés de l'animal par ponction du contenu de la cavité coelomique. Le liquide coelomique est séparé des cellules par centrifugation à 2000 g pendant 5 minutes et conservé à -20°C. Les ovocytes et les coelomocytes contenus dans le culot sont remis en suspension dans du tampon phosphate 25 mM, pH 7,4 contenant du NaCl 565 mM (PBS-565). Les ovocytes sont séparés des coelomocytes par filtration sur un tamis de nylon ayant des mailles de 48 µm de diamètre. Les ovocytes étant des cellules de grande taille (100 à 230 µm de diamètre) sont retenus sur le tamis alors que les coelomocytes plus petits (jusqu'à 20 µm de diamètre) passent à travers les mailles. Après séparation, les cellules sont lavées plusieurs fois par le PBS-565.

III. Maintien des cellules *in vitro*

Une semaine avant la mise en culture des cellules, les animaux sont isolés en chambre stérile dans de l'eau de mer stérile contenant des antibiotiques. Les ovocytes et les coelomocytes sont isolés des animaux comme précédemment, puis lavés successivement par le PBS-565 stérile et le milieu d'incubation. Les cellules sont incubées à une température constante de 15°C dans 1,5 ml de milieu 199 contenant des sels de Hanks (Eurobio) dont les concentrations finales en NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ et Na₂SO₄ sont ajustées respectivement à 450 mM, 10 mM, 11mM, 53 mM et 28 mM. Le milieu modifié est complété de L glutamine (0,63 mM final), de glucose (5 g/l), de pénicilline (2000 UI/l) et d'HEPES pH 8,0 (20 mM final) pour amener le pH du milieu à 7,6. Le milieu est renouvelé tous les trois jours.

IV. Marquage radioactif des protéines

1) *Marquage in vitro*

Le marquage radioactif des protéines *in vitro* se fait par addition de L-[3,4,5-³H] leucine (1850 MBq/mmmole, C.E.A.) au milieu d'incubation des cellules, à la dose de 1,48 MBq/ml. Le taux de sécrétion protéique dans les milieux est déterminé par comptage de la radioactivité portée par la fraction macromoléculaire. Pour cela, les macromolécules sont extraites par précipitation à l'acide trichloroacétique à 20 % (p/v) après addition de leucine froide et de sérum-albumine bovine comme entraîneur. Après 30 minutes de précipitation à 4°C, le milieu est filtré sur fibre de verre. Après séchage des filtres, la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation.

2) *Marquage in vivo*

Le marquage radioactif des protéines *in vivo* se fait par injection intracoelomique de ³[H] leucine (1850 MBq/mmmole), à la dose de 1,85 MBq par gramme de poids frais. Pour l'analyse, le liquide coelomique et les ovocytes sont extraits de l'animal comme il a été décrit précédemment.

V. Isolement des globules vitellins

Les ovocytes lavés dans le PBS-565 sont fragilisés par incubation à 4°C dans du PBS-565 contenant de l'EDTA 4 mM. Les lysats d'ovocytes sont ensuite filtrés sur un tamis de nylon ayant des mailles de 48 µm afin de séparer les débris membranaires et les ovocytes intacts de la fraction contenant les organites cellulaires qui passent à travers les mailles du tamis. Cette dernière fraction ajustée à une concentration de 0,25 M en saccharose est déposée au sommet d'un tube de rotor SW40 contenant des coussins successifs de saccharose de 1,5 ; 1,25 ; 0,9 et 0,5 M, puis recouverte d'un coussin de PBS-565. Le tube est centrifugé à 100.000 g pendant 90 minutes. Le coussin 0,9 M contenant les globules vitellins est prélevé, puis dilué avec du PBS-565 et centrifugé à 2000 g pendant 5 minutes afin de séparer les membranes endoplasmiques des globules vitellins. Après plusieurs centrifugations, le culot de globules vitellins est séché et stocké à -20°C.

La pureté des préparations est vérifiée en microscopie électronique. A cette fin, le culot de globules vitellins est fixé à 4°C pendant 4 heures dans une solution de glutaraldéhyde 2,5 % (v/v) dans du tampon phosphate 100mM, pH 7,2, salé (PBS), puis post-fixé à température ambiante pendant une heure dans le tétr oxyde d'osmium à 1 % dans du PBS. L'inclusion est effectuée dans l'epon. Les coupes ultra-fines contrastées par le citrate de plomb ont été observées au microscope électronique Jeol 120 CX par le Pr. Dhainaut.

VI. Préparation des fractions solubles d'ovocytes et de globules vitellins

Les ovocytes, fragilisés par congélation-décongélation, sont repris par du tampon Tris/HCl 20 mM, pH 7,4 contenant du NaCl 100 mM (TBS-100) et du saccharose 0,25 M et homogénéisés dans un appareil de Dounce. Avant d'être centrifugé à 100.000 g pendant une heure à 4°C, l'homogénat est recouvert d'un coussin de TBS-100 sans saccharose afin d'éliminer les lipides de la fraction 0,25 M saccharose. A l'issue de la centrifugation, la fraction 0,25 saccharose, qui constitue la fraction soluble ovocytaire, est récupérée et filtrée (Millex de 0,45 µm Millipore).

Les fractions solubles de globules vitellins sont préparées de la même manière, si ce n'est que la délipidation n'est pas nécessaire. Il faut noter que dans le cadre de l'étude des activités protéolytiques associées aux globules vitellins, les organites sont homogénéisés dans du TBS-100 contenant 0,1 % (p/v) de Triton X100

La teneur en protéine est déterminée avec le réactif de Biorad selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant la gamma globuline (Sigma) comme standard.

VII. Méthodes chromatographiques

Les protéines sont détectées en sortie de colonne par leur absorbance à 280 nm et identifiées par analyse électrophorétique.

Entre les étapes chromatographiques, les fractions protéiques sont dialysées et concentrées sur un appareil Micro-proDiCon (Bioblock)

1) *Chromatographie de gel filtration*

a) sur Ultrogel AcA34

La fraction soluble ovocytaire est déposée au sommet d'une colonne (1,1×90 cm) d'Ultrogel AcA34 (IBF). L'élution est réalisée à un débit de 4 ml par heure dans le TBS-100, à 4°C.

b) sur Superose 12

La préparation est injectée sur une colonne Superose 12 (Pharmacia) raccordée à une FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia). L'élution est réalisée à un débit de 0,7 ml/minute dans le TBS-100.

2) *Chromatographie d'échange d'ions*

La préparation est injectée sur une colonne mono Q (Pharmacia) pour l'échange d'anions ou mono S (Pharmacia) pour l'échange de cations, les colonnes étant raccordées à une FPLC. L'élution est réalisée à un débit de 1 ml/minute.

VIII. Méthodes électrophorétiques

1) *Electrophorèse native*

L'électrophorèse des protéines natives est réalisée dans un gel en gradient 5-25 % d'acrylamide (PAGGE), selon la méthode de Slater (1969). La migration se fait dans le système tampon de Davis (1964) à un courant constant de 80 V dans le gel de concentration, puis de 130 V dans le gel de séparation. Les gels sont calibrés avec un mélange de protéines standards : la thyroglobuline (669 kDa), la ferritine (440 kDa), la catalase (232 kDa), l'albumine dimère (134 kDa), l'albumine (67 kDa) et l'ovalbumine (45 kDa).

Les protéines sont détectées par le bleu de Coomassie R 250 à 0,1 % dans une solution isopropanol 25 % (v/v) /acide acétique 10 % (v/v) /eau 65 % (v/v). Les gels sont décolorés par l'acide acétique 10 % (v/v).

Les lipoprotéines sont détectées par le noir Soudan à 0,5 % dans une solution acétone 20 % (v/v) /acide acétique 15 % (v/v) /eau 65 % (v/v) (Part, 1969). Les gels sont décolorés par l'acide acétique 10 % (v/v).

Les glycoprotéines sont détectées par le réactif de Schiff selon la méthode de Zacharius (1969).

Les protéines marquées par la $^3\text{[H]}$ leucine sont détectées par fluorographie. Après coloration, le gel est incubé 30 minutes dans l'Amplify (Amersham) sous agitation, puis séché et mis en contact à -70°C avec du papier royal-X-Omat (Kodak) préalablement traité par un éclair de lumière orange diffus selon la méthode de Laskey et Mills (1975).

2) *Electrophorèse en présence de sodium dodecyl sulfate*

L'électrophorèse dénaturante des protéines est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970), dans un gel en gradient d'acrylamide 5-25 % (SDS-PAGGE) ou un gel homogène à 15 % d'acrylamide (SDS-PAGE) contenant 0,1 % de SDS. Les gels sont calibrés avec un mélange de protéines standards de poids moléculaire connu allant de 200 kDa à 14,4 kDa (Biorad).

La migration se fait à un ampérage constant de 0,8 mA/cm³ de gel dans le gel de concentration et de 0,2 mA/cm³ de gel dans le gel de séparation. Les protéines sont détectées par le bleu de Coomassie R 250 et le marquage radioactif par fluorographie comme précédemment.

3) *Electrofocalisation*

L'électrofocalisation (IEF) des protéines natives est réalisée dans un gel d'acrylamide à 5 % de 1 mm d'épaisseur, contenant 3 % d'ampholines de pH 3,5 à 9,5 (Ultra PAG, Pharmacia). Après 120 minutes de migration à 4,7 V x 0,13 mA/cm², les protéines sont fixées dans une solution aqueuse d'acide trichloroacétique 11,5 % (p/v) et d'acide perchlorique 3,45 % (p/v), puis colorées par le bleu de Coomassie à 0,1 % dans une solution 25 % éthanol (v/v) /8 % acide acétique (v/v) /67 % eau (v/v) contenant 0,1 % de Cu₂SO₄. Les gels sont décolorés par la solution 25 % éthanol (v/v) /8 % acide acétique (v/v) /67 % eau (v/v).

4) *Electrophorèse bidimensionnelle*

Après la première dimension, la piste excisée du gel est équilibrée sous agitation deux fois 10 minutes dans un tampon Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8 contenant 2,3 % de SDS, 2 % de β mercaptoéthanol (v/v) et 10 % de glycérol (p/v) et préalablement chauffé à 70°C. La bande est ensuite déposée au sommet d'un gel de polyacrylamide-SDS et maintenue par de l'agarose à 1 % dans le tampon d'équilibration. La migration dans la deuxième dimension et la détection des protéines se font comme précédemment (§ VIII.2.).

5) *Electrophorèse préparative*

A 9 volumes de la fraction soluble ovocytaire est additionné 1 volume de noir Soudan à 0,1 % dans l'éthylène glycol. Le mélange est ensuite analysé par PAGGE dans un gel de 1,5 mm d'épaisseur et à l'issue de la migration, la vitelline, apparaissant sous forme d'une bande grisâtre, est excisée du gel et reprise par du TBS-100. Le gel est alors broyé et le broyat centrifugé à 5000 tr/mn. Le surnageant coloré contenant les protéines éluées est prélevé et conservé à -20°C.

6) *Transfert électrophorétique des protéines*

Après l'électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions natives, le gel est équilibré dans le tampon de transfert Tris 25 mM, glycine 192 mM, pH 8,3. Les protéines sont transférées sur une feuille d'Immobilon-P (millipore) dans une cuve de transfert (Biorad) contenant le même tampon que celui utilisé lors de l'équilibration, à un courant constant de 250 mA pendant 4 heures. Les protéines transférées sont détectées par l'amido black à 0,1 % dans une solution méthanol 45 % (v/v) /acide acétique 10 % (v/v) /eau 45 % (v/v). La feuille d'Immobilon-P est décolorée par l'eau.

Après l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, le transfert des protéines sur une feuille d'Immobilon s'opère de la même manière dans le tampon de transfert contenant 15 % (v/v) de méthanol et 0,01 % de SDS.

Après électrofocalisation, les protéines sont transférées sur une feuille d'Immobilon par simple diffusion dans le tampon de transfert.

IX. Méthodes immunologiques

1) *Production des anticorps*

Les sérums polyclonaux ont été obtenus en utilisant la méthode de Vaitukaitis (1971). Trois semaines après l'injection de la protéine purifiée chez le lapin, des prélèvements de sang sont effectués régulièrement. La présence d'anticorps est contrôlée par la méthode d'immunodiffusion d'Ouchterlony (1949).

Les anticorps monoclonaux ont été produits par le Dr. Porchet-Henneré, après injection de coelomocytes de *N. diversicolor* chez une souris BALB/c (Porchet-Henneré, 1987). Une première sélection des hybridomes est réalisée par ELISA, en testant la réactivité des surnageants de culture sur des protéines d'une fraction soluble d'ovocytes jeunes préalablement adsorbées sur une plaque de microtitration (Falcon). Les hybrides positifs sont clonés par dilution limite et à nouveau sélectionnés en testant les surnageants de culture sur les protéines d'ovocytes jeunes transférées sur Immobilon-P après SDS-PAGGE. Les hybrides reconnaissant la vitellogénine sont sélectionnés et sous-clonés par dilution limite.

2) *Immunoaffinité*

a) préparation du gel d'affinité

Les anticorps du sérum anti-V400 ou anti-Vg sont fixés sur un gel protéine A-Sépharose 4B (Pharmacia) préalablement gonflé dans le TBS-100, par incubation à température ambiante pendant 2 heures sous agitation. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le gel est lavé plusieurs fois par le TBS-100 contenant 0,1 % (p/v) de Triton X100. Le

gel est ensuite incubé sous agitation pendant une nuit à 4°C avec une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 1,5 % (v/v) afin de fixer de manière covalente les anticorps à la protéine A. Les groupements aldéhydes libres sont ensuite neutralisés par lysine sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le gel d'affinité est lavé plusieurs fois par le TBS-100 contenant 0,1 % (p/v) de Triton X100.

b) Extraction des protéines par immunoaffinité

La fraction à traiter est amenée à une concentration de 1mg/ml avec le TBS-100, puis mise en contact avec le gel d'affinité dans un rapport 40 μ l de la fraction diluée pour 5 mg de gel d'affinité. Après deux heures de contact sous agitation à température ambiante, la suspension est centrifugée 2 minutes à 1000g. Le surnageant correspondant à la fraction immunosupprimée est prélevé et le culot est lavé à plusieurs reprises par le TBS-100 contenant 0,1 % (p/v) de Triton X100. Les protéines adsorbées sur le gel sont éluées par traitement du culot avec 50 μ l de tampon de Laemmli à 100 °C pendant 3 minutes. Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines immunoprécipitées est analysé par SDS-PAGE.

3) *Immunorévélation des protéines après transfert sur Immobilon-P*

Après transfert des protéines, les sites de fixation libres sont bloqués par incubation des feuilles d'Immobilon-P pendant une heure à température ambiante dans du tampon Tris/HCl 20 mM pH 7,4, contenant du NaCl 500 mM (TBS-500) et du lait en poudre à 5 % (Gloria). L'incubation avec les anticorps se fait à 4°C pendant une nuit dans du TBS-500 contenant 1 % de lait en poudre et 0,05 % (p/v) de Tween 20. Les anticorps n'ayant pas réagi sont éliminés par plusieurs lavages successifs dans le même tampon et les anticorps ayant réagi sont détectés par des anticorps anti-IgG marqués à la peroxydase. L'activité peroxydase est révélée en incubant la feuille de transfert dans un mélange de 50 ml de TBS-100, 3 ml de 4-chloro-1-naphtol à 0,3 % dans le méthanol et 10 μ l de H₂O₂.

4) Immunocytochimie

Ce travail a été réalisé par le Dr. Porchet-Henneré.

Les cellules étalées sont fixées pendant 15 minutes à température ambiante dans du tampon phosphate 100 mM, pH 7,2, contenant du NaCl 250 mM (PBS-250) et 3 % (v/v) de paraformaldéhyde, 0,1 % (v/v) de glutaraldéhyde et 0,1 % (v/v) d'acide picrique, puis lavées plusieurs fois dans du PBS-250. Les lames sont ensuite incubées en présence de l'anticorps monoclonal An. Mo. 45-14 (surnageant de culture) pendant une nuit à 4°C puis lavées dans du PBS-250. Le marquage par l'anticorps secondaire est réalisé en incubant les lames pendant une heure à température ambiante avec des anticorps anti-igG conjugués au FITC (Biosys) dilués au 1/200 dans du PBS-250 contenant 0,01 % de Bleu Evans (contre colorant de fluorescence), puis lavés dans le PBS-250. Les lames immunomarquées sont montées dans le glycérol à 50 % (v/v), dans le PBS-250 et observées au microscope Olympus BH2 équipé pour l'épifluorescence.

X. Dosages des activités protéolytiques

Les tampons utilisés sont le tampon formiate (pH 2 à 4), le tampon acétate (pH 4 à 6), le tampon phosphate (pH 6 à 8) et le tampon bicarbonate (pH 8 à 10)

1) Dosage avec l'hémoglobine

100 µl d'une fraction soluble des globules vitellins (environ 1 mg de protéine) sont ajoutés à 100 µl d'une solution d'hémoglobine bovine (Sigma) à 2 % dans du tampon 100 mM. Le mélange est incubé à 37°C pendant une heure. La réaction est arrêtée par l'addition de 200 µl d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 6 % (p/v). Après 30 minutes à température ambiante, les protéines non hydrolysées sont séparées de la fraction TCA-soluble par centrifugation à 3000g pendant 30 minutes. L'activité protéolytique est mesurée en dosant, par la ninhydrine, les peptides de la fraction TCA-soluble.

2) Dosage avec des substrats synthétiques

Ce travail a été réalisé avec l'aide du Dr. J. Albani.

Le dosage des activités protéolytiques à l'aide de substrats fluorophores a été choisi en raison de la sensibilité et de la facilité d'utilisation de ces composés.

100 μ l d'une fraction soluble des globules vitellins (environ 1 mg de protéines) sont ajoutés à 100 μ l d'une solution Z-Phe-Arg-NH-Mec, Z-Arg-Arg-NH-Mec et Arg-NH-Mec (Tébu) 10 μ M dans du tampon 100 mM. Le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 200 μ l d'une solution de monochloroacétate de sodium 200 mM. L'activité protéolytique est mesurée par la fluorescence de la méthylcoumarine libérée (excitation 370 nm, émission 460 nm). Le dosage a été réalisé dans un appareil de fluorescence Perkin Elmer thermostaté à 20°C.

1 unité d'activité correspond à l'hydrolyse d'une μ mole de substrat par minute et par mg de protéines.

L'ensemble du travail scientifique a été réalisé en collaboration avec J.L. BAERT.

Il a participé pour une grande part à l'élaboration des expériences et à la discussion des résultats.

Qu'il soit assuré de ma reconnaissance pour son enthousiasme et sa disponibilité.

Références bibliographiques

BAERT J.L. (1985)

Multiple forms of vitellin in young oocyte of *Perinereis cultrifera* (polychaete annelid) : occurrence and relation to vitellin maturation in the oocyte.

Comp. Biochem. Physiol. **81B**, 851.

BAERT J.L. (1986a)

Vitelline et organisation de la vitellogenèse protéique chez *Perinereis cultrifera* (Annélide polychète).

Thèse Doc. Etat, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois.

BAERT J.L. (1986b)

Evidence for vitellin maturation within oocytes of *Perinereis cultrifera* (polychaete annelid).

Comp. Biochem. Physiol. **83B**, 847

BAERT J.L. (1988)

A 15,00-Mr protein proteolytically derived from vitellogenin within oocyte of *Perinereis cultrifera* (polychaete annelid). Identification, purification and partial characterization.

Eur. J. Biochem. **177**, 625

BAERT J.L., SAUTIERE P. et PORCHET M. (1984)

Purification and characterization of oocyte vitellin from *Perinereis cultrifera* (polychaete annelid).

Eur. J. Biochem. **142**, 527

BAERT J.L. et SLOMIANNY M.C. (1987)

Heterosynthetic origin of the major yolk protein, vitellin, in a nereid, *Perinereis cultrifera* (polychaete annelid).

Comp. Biochem. Physiol. **88B**, 1191

BAEUERLE P. A., LOTTSPREICH F. et HUTTNER W.B. (1988)

Purification of yolk protein 2 of *Drosophila melanogaster* and identification of its site of tyrosine sulfation.

J. Biol. Chem. **263**, 14925

BAKER M.E. (1988a)

Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human LDL and human lipoprotein lipase ?

Biochem. J. **255**, 1057

BAKER M.E. (1988b)

Invertebrates vitellogenin is homologous to human Willebrand factor.

Biochem. J. **256**, 1059

BAKKER O., PHILIPSEN J.N.J, HENNIS B.C. et AB G. (1988)

Estrogen-inducible binding of a nuclear factor to the vitellogenin upstream région.

Mol. Cell. Biol. **8**, 4557

BARRET A.J. (1980)

Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates.

Biochem. J. **187**, 909

BARRETT A.J. et KIRSCHKE H. (1981)

Cathepsin B, Cathepsin H and Cathepsin L.

Methods Enzymol. **80**, 535

BELL W.J. et BARTH R.H. (1971)

Initiation of yolk deposition by juvenil hormone.

Nature **230**, 220

BERRIDGE M.V. et LANE C.D. (1976)

Translation of *Xenopus* liver messenger RNA in *Xenopus* oocytes : vitellogenin synthesis and conversion to yolk platelet proteins.

Cell **8**, 283

BOHEM K. D., HOOD R.L. et ILAN J. (1988)

Induction of vitellogenin in primary monolayer cultures of cockerel hepatocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**, 3480

BOND J.S. et BUTLER P.E. (1987)

Intracellular proteases.

Ann. Rev. Biochem. **56**, 333

BONNIER P. (1987)

Vitelline et principales protéines marquant l'ovogenèse chez *Nereis diversicolor*.

Mémoire de DEA, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois

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

BOWNES M. (1986)

Expression of the genes coding for vitellogenin (yolk protein).

Annu. Rev. Entomol. **31**, 507

BOWNES M. et HAMES D.B. (1978)

Analysis of yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. translation in a cell-free system and peptide analysis.

Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. **96**, 327

BRENNAN M.D., WEINER A.J., GORALSKI T.J. et MAHOWALD A.P. (1982)

The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*.

Dev. Biol. **89**, 225

BROCK M.L. et SHAPIRO D.J. (1983)

Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation.

Cell **34**, 207

BRUMMET A.R. et DUMONT J.N. (1977)

Intracellular transport of vitellogenin in *Xenopus* oocytes : an autoradiographic study.

Dev. Biol. **60**, 482

BURLEY R.W. et SLEIGH R.W. (1983)

Hydrophobic chromatography of proteins in urea solutions. The separation of apoproteins from lipoprotein of avian egg yolk.

Biochem. J. **209**, 143

BYRNE B. M., GRUBER M. et AB G. (1989)

The evolution of egg yolk proteins.

Biophys. Molec. Biol. **53**, 33

CERVELLO M. et MATRANGA V. (1989)

Evidence of a precursor-product relationship between vitellogenin and toposome, a glycoprotein complex mediating cell adhesion.

Cell. Differ. Dev. **26**, 67

CHEN T T. (1980)

Vitellogenin in locusts (*Locusta migratoria*) : Translation of vitellogenin mRNA in *Xenopus* oocytes and analysis of the polypeptides products.

Archs. Biochem. Biophys. **201**, 266

CHEN T.T. et HILLEN L.J. (1983)

Expression of the vitellogenin genes in insectes.

Gamete Res. **7**, 179

DAVIS B.J. (1964)

Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.

Ann. N.V. Acad. Sci. **121**, 404

DEHN P.F. et WALLACE R.A. (1973)

Sequestered and injected vitellogenins : alternative routes of protein processing in *Xenopus* oocytes.

J. Cell. Biol. **58**, 721

DHAINAUT A. (1967)

Etude de la vitellogenèse chez *Nereis diversicolor* O.F.Müller (annélide polychète) par autoradiographie a haute résolution.

C.R. Acad. Sci. **265D**, 434

DHAINAUT A. (1970)

Contribution à l'étude de la gamétogenèse des néreidiens dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale.

Thèse Doct. Etat, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois

- DHAINAUT A. (1984)**
Aspect cytophysiologique des colomocytes de néréidiens (annélide polychète).
Archs. Anat. Microsc. Morph. Exp. **73**, 133
- DI MARIO P. J. et MAHOWALD A.P. (1987)**
Female sterile (1) yolkless : a recessive female sterile mutation in *Drosophila melanogaster* with depressed numbers of coated pits and coated vesicles within the developing oocytes.
J. Cell. Biol. **105**, 199
- DOOLITTLE R.F. et RILEY M. (1990)**
The amino-terminal sequence of lobster fibrinogen reveals common ancestry with vitellogenins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **167**, 16
- DURCHON M. (1952)**
Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les annélides polychètes : l'épitoquie et la stolonisation.
Ann. Sci. Nat. **14**, 119
- DURCHON M. (1956)**
Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoquie chez les néréidiens.
Ann. Sci. Nat. Zool. et Biol. Anim. **10**, 269
- ENGELMANN F. (1979)**
Insect vitellogenin : identification, biosynthesis and role in vitellogenesis.
Adv. Insect. Physiol. **14**, 49
- EVANS M. I., SILVA R. et BURCH J.B.E. (1988)**
Isolation of chicken vitellogenin I and III cDNAs and the developmental regulation of five oestrogen-responsive genes in the embryonic liver.
Genes and Dev. **2**, 889
- EVANS R.M. (1988)**
The steroid and thyroid hormone superfamily.
Science **240**, 889
- FERENZ H.J., LUBZENS E. et GLASS H. (1981)**
Vitellin and vitellogenin incorporation by isolated oocytes of *Locusta migratoria migratorioides*.
J. Insect Physiol. **27**, 869
- FISCHER A. et RABIEN H. (1986)**
Molecules and cellular functions driving oocyte growth in nereid annelids.
Advances in invertebrates reproduction. Vol. IV (ed. M. PORCHET, J.C. ANDRIES et A. DHAINAUT), pp 195-205. Elsevier Scientific Publishing Corporation
- GEORGE R., BARDER D.L. et SCHNEIDER W.J. (1987)**
Characterization of the receptor for low and very low density lipoproteins.
J. Biol. Chem. **262**, 16838

GERBER-HUBER S., NARDELLI D., HAEFLIGER J.A., COOPER D.N., GIVEL F., GERMOND J.E., ENGEL J., GREEN M. et WAHLI W. (1987)

Precursor-product relationship between vitellogenin and the yolk proteins as derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene.

Nucleic Acids Res. **12**, 8595

GORDON D.A., SHELNESS G.S., NICOSIA M. et WILLIAMS D.L. (1988)

Estrogen-induced destabilisation of yolk precursor protein mRNAs in avian liver.

J. Biol. Chem. **263**, 2625

GOTTLIEB T.A. et WALLACE R.A. (1981)

Intracellular phosphorylation of vitellogenin in the liver of estrogen-stimulated *Xenopus laevis*.

J. Biol. Chem. **256**, 4116

HAGEDORN H.H. (1974)

The control of vitellogenesis in the mosquito, *Aedes aegypti*.

Am. Zool. **14**, 1207

HAGEDORN H.H. et KUNKEL J.G. (1979)

Vitellogenin and vitellin in insects.

Annu. Rev. Entomol. **24**, 475

HATZOPOULOS P. et KAMBYSELLIS M.P. (1987)

Isolation and structural analysis of *Drosophila grimshawi* vitellogenin genes.

Mol. Gen. Genet. **206**, 475

HATZOPOULOS P. et KAMBYSELLIS M.P. (1987)

Differential and temporal expression of the vitellogenin genes in *Drosophila grimshawi*.

Mol. Gen. Genet. **210**, 564

HAUSMAN S.J., ANDERSON K.M. et TELFER W.H. (1971)

The dependence of *Cecropia* yolk formation in vitro on specific blood proteins.

J. Cell. Biol. **48**, 303

HAYWARD M.A., MITCHELL M.A. et SHAPIRO D.J. (1980)

Induction of estrogen receptor and reversal of the nuclear/cytoplasmic receptor ratio during vitellogenin synthesis and withdrawal in *Xenopus laevis*.

J. Biol. Chem. **255**, 11308

HUNG M.C. et WENSINK P.C. (1983)

Sequence and structure conservation in yolk proteins and their genes.

J. Molec. Biol. **164**, 481

**ICHISHIMA E., YAMAGATA Y., CHIBA H.,
SAWAGUCHIK et TANAKA T. (1989)**

Soluble and Bound Forms of aminopeptidase in
hen's egg yolk

Agric. Biol. Chem. **53**, 1867

**INDRASITH L.S., FURUSAWA T., SHIKATA M. et
YAMASHITA O. (1987)**

Limited degradation of vitellin and egg-specific
protein in *Bombyx* eggs during embryogenesis.

Insect. Biochem. **17**, 539

ISAAC P.G. et BOWNES M. (1982)

Ovarian and fat body vitellogenin synthesis in
Drosophila melanogaster.

Eur. J. Biochem. **123**, 527

**JOST J.P., SALUZ H., JIRICNY J. et MONCHARMONT
B. (1987)**

Estradiol-dependent trans-acting factor binds
preferentially to a dyad-symmetry structure within
the third intron of the avian vitellogenin gene.

J. Cell. Biochem. **35**, 69

KARI B. E. et ROYMAN W.L. (1985)

Analysis of change in a yolk glycoprotein complex
in the developing sea urchin embryo.

Dev. Biol. **108**, 18

KAWOoya J.K., OSIR E.O. et LAW J.H. (1986)

Physical and chemical properties of
microvitellogenin. A protein from the egg of the
tobacco hornworm moth. *Menduca sexta*.

J. Biol. Chem. **261**, 10844

KIMBLE J. et SHARROCK W.J. (1983)

Tissue specific synthesis of yolk proteins in
Caenorhabditis elegans.

Dev. Biol. **96**, 189

KINDLE H., KÖNIG R. et LANZREIN B. (1988)

In vitro uptake of vitellogenin by follicles of the
cockroach *Nauphoeta cinerea* : comparison of
artificial media with haemolymph media and role of
vitellogenin concentration and of juvenil hormone.

J. Insect Physiol. **34**, 541

**KIRSCHKE H., KEMHAVI A. A., BOHLEY P. et
BARRETT A.J. (1982)**

Action of rat liver cathepsin L on collagen and
other substrats.

Biochem. J. **201**, 301

**KIRSCHKE H., LANGNER J., WIEDERANDERS B.,
ANSORGE S., BOHLEY P. et HANSON H. (1977)**

An endoaminopeptidase from rat liver lysosomes.

Acta Biol. Med. Ger. **36**, 185

KOMAROMY M.C. et SCHOTZ M.C. (1987)

Cloning of rat hepatic lipase cDNA : evidence for a lipase gene family.

Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 1526

KOMAZAKI S. (1987)

A yolk-granule component acts as an adhesive material for dissociated gastrula cells of the newt, *Cynops pyrrhogaster*.

Dev. Growth Differ. **29**, 517

KÖNIG R. et LANZREIN B. (1985)

Binding of vitellogenin to specific receptor in oocyte membrane preparations of the oviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*.

Insect. Biochem. **15**, 735

KUNKEL J.G. et NORDIN J.H. (1985)

Yolk proteins.

Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and pharmacology (eds. G.A. KERKUT et L.J. GILBERT), pp 83-111, Pergamon Press, Oxford/New York.

LAEMMLI U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**, 680

LANE C.D., CHAMPION J., COLMAN A., JAMES C.T. et APPELBAUM S.W. (1983)

The fate of *Xenopus* and locust vitellogenins made in *Xenopus* oocytes ; An export-import processing model.

Eur. J. Biochem. **130**, 529

LASKEY R.A. et MILLS A.D. (1975)

Quantitative film detection of ^3H et ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography.

Eur. J. Biochem. **56**, 335

LE GUELLEC K., LAWLESS K., VALOTAIRE Y., KRESS M. et TENNISWOOD M. (1988)

Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

Gen. Comp. Endocrinol. **71**, 359

LOCKE J., WHITE B.N. et WYATT G.R. (1987)

Cloning and 5' end nucléotide sequences of two juvenil hormone-inducible vitellogenin genes of the African migratory locust.

DNA **6**, 331

MEDINA M., LEON P. et WALLEJO C.G. (1988)

Drosophila cathepsin B-like protease. A suggested role in yolk degradation.

Arch. Biochem. Biophys. **263**, 355

MEDINA M. et VALLEJO C.G. (1989)

The maternal origin of acid hydrolases in *Drosophila* and their relation with yolk degradation.

Dev. Growth Differ. **31**, 241

MEUSY J.J. et PAYEN G.G. (1988)

Female reproduction in malacostracan crustacea.

Zool. Science **5**, 217

NARDELI D., GERBER-HUBER S., VAN HET SCHIP F.D., GRUBER M., AB G. et WAHLI W. (1987a)

Vertebrate and nematode genes coding for yolk proteins are derived from a common ancestor.

Biochemistry **26**, 6397

NARDELI D., VAN HET SCHIP F.D., GERBER-HUBER S., HAEFLIGER J.A., GRUBER M., AB G et WAHLI W. (1987a)

Comparison of the organization and fine structure of a chicken and *Xenopus laevis* vitellogenin gene.

J. Biol. Chem. **262**, 15377

NIMPE J., RADOSAYLJEVIC M. et SCHNEIDER W.J. (1989)

Specific postendocytic proteolysis of apolipoprotein B in oocytes does not abolish receptor recognition.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**, 906

NORIOKA N., OKADA T., HAMAZUME Y., MEGA T. et IKENAKA T. (1985)

Comparison of the amino acid sequences of the hen plasma-, yolk-, and with-riboflavin binding proteins.

J. Biochem. **97**, 19

ONO S.E., NAGAYAM H. et SHIMURA K. (1975)

The occurrence and synthesis of female-and egg-specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*.

Insect. Biochem. **5**, 313

OPRESKO L.K. et KARPFF R.A. (1987)

Specific protoolysis regulates fuston endocytic compartments in *Xenopus*. between.

Cell **51**, 557

OPRESKO L.K. et WILEY H.S (1987a)

Receptor mediated endocytosis in *Xenopus* oocyte. I. Characterisation of the vitellogenin receptor system.

J. Biol. Chem. **262**, 4109

OPRESKO L.K. et WILEY H.S (1987b)

Receptor mediated endocytosis in *Xenopus* oocyte. II. Evidence for two novel mechanisms of hormonal regulation.

J. Biol. Chem. **262**, 4116

OPRESKO L.K., WILEY H.S. et WALLACE R.A. (1979)

The origin of yolk-DNA in *Xenopus* oocyte.

J. Exp. Zool. **209**, 367

OPRESKO L.K., WILEY H.S. et WALLACE R.A. (1980)

Differential postendocytotic compartmentation in *Xenopus* oocytes is mediated by a specifically bound ligand.

Cell **22**, 47

OSIR E.O. et LAW J.H. (1986)

Studies of binding and uptake of vitellogenin by follicles of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Archs. Insect Biochem. Physiol. **3**, 513

OUCHTERLONY Ö (1949)

Antigen-antibody reaction in gels.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. **26**, 507

PAN M.L., BELL W.J. et TELFER W.H. (1969)

Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body.

Science **165**, 393

PART J.P., LAMY J.N. et WEILL J.D. (1969)

Coloration des lipoprotéines après électrophorèse en gel de polyacrylamide

Bull. Soc. Chim. Biol. **51**, 1367

PASTEELS J.J. (1973)

Yolk and lysosomes.

Lysosomes in biology and pathology
Vol. III (ed. J. DINGLE), pp 216-234.
Amsterdam : North Holland

PERONA R., BES J.C. et VALLEJO C.G. (1988)

Degradation of yolk in the brine shrimp *Artemia*
Biochemical and morphological studies on the involvement of the lysosomal system.

Biol. Cell **63**, 361

PERONA R. et VALLEJO C.G. (1985)

Acid hydrolases during *Artemia* development. A role in yolk degradation.

Comp. Biochem. Physiol. **81B**, 993

PHILIPSEN J.N.J., HENNIS B.C. et AB G. (1988)

In vivo footprinting of the estrogen-inducible vitellogenin II gene from chicken.

Nucleic. Acids Res. **16**, 9663

PORCHET M. (1976)

Données actuelles sur le contrôle endocrine de la maturation génitale des néréidiens (Annélides polychète).

Ann. Biol. **7-8**, 329

PORCHET-HENNERE E., NEJMEDDINE A., BAERT J.L. et DHAINAUT-COURTOIS N. (1987)

Sélective immunostaining of type 1 granulocytes of the polychaete annelid *Nereis diversicolor* by a monoclonal antibody against a cadmium-binding protein (MP II)

Biol. Cell **60**, 259

POSTLETHWAIT J.H. et HANDLER A.M. (1979)

The roles of juvenil hormone and 20-hydroxyecdysone during vitellogenesis in isolated abdomens of *Drosophila melanogaster*.

J. Insect Physiol. **25**, 455

PURCELL J.P., KUNKEL J.G. et NORDIN J.H. (1988)

Yolk hydrolase activities associated with polypeptide and oligosaccharide processing of *Blatella germanica* vitellin.

Archs. Insect Biochem. Physiol. **8**, 39

RAIKEL A.S. et LEA A.O. (1984)

Internalized proteins directed into accumulative compartements of mosquito oocytes by the specific ligand, vitellogenin.

Tissue & Cell **18**, 559

RIDDIHOUGH G. et PELHAM H.R.B. (1987)

An ecdysone element in the *Drosophila* hsp27 promoter.

EMBO J. **6**, 3729

ROBERTS P.E. et WYATT G.R. (1983)

Juvenil hormone binding by components of fat body cytosol from vitellogenic locust.

Mol. Cell. Endocrinol. **31**, 53

ROTH T.F., CUTTING J.A. et ATLAS S.B. (1976)

Protein transport : a selective membrane mechanism.

J. Supra-molec. Struct. **4**, 527

ROTH T.F. et PORTER K.R. (1964)

Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*.

J. Cell. Biol. **20**, 313

SCHRIM J., GRUBER M. et AB G. (1973)

Post-translational phosphorylation of phosvitin.

FEBS Lett. **30**, 167

SHARROCK W.J. (1984)

Cleavage of two yolk proteins from a precursor in *Caenorhabditis elegans*.

J. Molec. Biol. **174**, 419

SHYU A.B., BLUMENTHAL T. et RAFF R.A. (1987)

A single gene encoding vitellogenin in the sea urchin *Strongylacentratus purpuratus* : sequence at the 5' end.

Nucleic Acids Res. **15**, 10405

SHYU A.B., RAFF R.A. et BLUMENTHAL T. (1986)

Expression of the vitellogenin gene in female and male sea urchin.

Proc. Natn. Acad. U.S.A. **83**, 3865

SLATER G.G. (1969)

Stable pattern formation and determination of molecular size by pore-limited-electrophoresis.

Anal. Chem. **41**, 1039

SPIETH J. et BLUMENTHAL T. (1985)

The *Caenorhabditis elegans* gene family includes a gene encoding a distantly related protein.

Molec. Cell. Biol. **5**, 2495

SPIETH J., DENISON K., ZUCKER E. et BLUMENTHAL T. (1985a)

The nucleotide sequence of a nematode vitellogenin gene.

Nucleic Acids Res. **13**, 7129

SPIETH J., DENISON K., KIRTLAND S., CANE J. et BLUMENTHAL T. (1985b)

The *C. elegans* vitellogenin genes : short sequence repeats in the promoter regions and homology to the vertebrates genes.

Nucleic Acids Res. **13**, 5283

STIFANI S., GEORGE R. et SCHNEIDER W.J. (1988)

Solubilization and characterization of the chicken oocyte vitellogenin receptor.

Biochem. J. **250**, 467

STIFANI S., NIMPF J. et SCHNEIDER W.J. (1990)

Vitellogenesis in *Xenopus laevis* and chicken : cognate ligands and oocyte receptors.

J. Biol. Chem. **265**, 882

STYNEN D. WOODRUFF R.I. et TELFER W.H. (1988)

Effects of ionophores on vitellogenin uptake by *Hyalophora* oocytes.

Archs. Insect Biochem. Physiol. **8**, 261

TAKAHASHI S.Y. (1987)

Post-translational processing, by phosphorylation, of vitellogenin and vitellin of the silkworm, *Bombyx mori*.

Comp. Biochem. Physiol. **87B**, 255

TATA J.R., NG W.C., PERLMAN A.J. et WOLFFE A.P. (1987)

Activation and regulation of the vitellogenin gene family.

Gene regulation by steroid hormones Vol. III (ed. A.K. ROY and J.H. CLARK), pp 205-233. Springer-Verlag New York Inc.

TYLER C.R., SUMPTER J.P. et BROMAGE M.R. (1988a)

Selectivity of protein sequestration by vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*.

J. Exp. Zool. **248**, 199

TYLER C.R., SUMPTER J.P. et BROMAGE M.R. (1988b)

In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*.

J. Exp. Zool. **246**, 171

VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. et ROSS G.T. (1971)

A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.

J. Clin. Endocr. **33**, 988

VAN HET SHIP F.D., SAMALLO J., BROOS J., OPHUIS J., MOJET M., GRUBER M. et AB G. (1987)

Nucleotide sequence of a chicken vitellogenin and derived amino acid sequence of the encoded yolk precursor protein.

J. Molec. Biol. **196**, 245

WAHLI W. (1988)

Evolution and expression of vitellogenin genes.

Trends Genetic **4**, 227

WAHLI W., DAWID I.B., WYLER T., JAGGI R.B., WEBER R. et RYFFEL G.U. (1979)

Vitellogenin in *Xenopus laevis* is encoded in a small family of gene.

Cell **16**, 535

WALKER P., GERMOND J.E., BROWN-LUEDI M., GIVEL F. et WAHLI W. (1984)

Sequence homologies in the region preceding the transcription initiation site of the liver estrogen-responsive vitellogenin and the apo-VLDLII genes.

Nucleic Acids Res. **12**, 8611

WALL D.A. et MELEKA I. (1985)

An unusual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes.

J. Cell. Biol. **101**, 1651

WALL D.A. et PATEL S. (1987)

Multivesicular bodies play a key role in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes.

Dev. Biol. **119**, 275

WALLACE R.A. (1985)

Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates.

Developmental biology, Vol. I (ed. L.W. BROWDER), pp127-177. Plenum Publishing Corporation

WALLACE R.A. et BEGOVAC P.C. (1985)

Phosvitins in *Fundulus* oocytes and eggs.

J. Biol. Chem. **260**, 11268

WALLACE R.A., DEUFEL R.A. et MISULOVIN Z. (1980)

Protein incorporation by isolated amphibian oocyte. VI. Comparison of autologous and xenogenic vitellogenins.

Comp. Biochem. Physiol. **65B**, 151

WALLACE R.A. et JARED D.W. (1969)

Studies on amphibian yolk. VIII. The estrogen-induced hepatic synthesis of a serum lipophosphoprotein and its selective uptake by the ovary and transformation into yolk platelet proteins in *Xenopus laevis*.

Dev. Biol. **19**, 498

WALLACE R.A., JARED D.W. et NELSON B.L. (1970)

Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. I. Preliminary studies.

J. Exp. Zool. **175**, 259

WALLACE R.A. et MISULOVIN Z. (1978)

Long-term growth and differentiation of *Xenopus* oocytes in a defined medium.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 5534

WALLACE R.A., MISULOVIN Z., JARED D.W. et WILEY H.S. (1978)

Développement of a culture médium for growing *Xenopus laevis* oocytes.

Gamete Res. **1**, 269

WALLACE R.A. et MORGAN J.P. (1986)

Chromatographic resolution of chicken phosphovitin Multiple macromolecular spieces in a classic vitellogenin derived phosphoprotein.

Biochem. J. **240**, 871

WANG S., SMITH D.E. et WILLIAMS D.L. (1983)

Purification of avian vitellogenin III : comparison with vitellogenin I and II.

Biochemistry **22**, 6206

WANG S. et WILLIAMS D.L. (1980)

Identification, purification and characterization of distinct avian vitellogenins.

Biochemistry **19**, 1557

WANG S. et WILLIAMS D.L. (1982)

Biosynthesis of the vitellogenins. Identification and characterization of nonphosphorylated precursors to avian vitellogenin I and vitellogenin II.

J. Biol. Chem. **257**, 3837

WANG S. et WILLIAMS D.L. (1983)

Differential responsiveness of avian vitellogenin I and vitellogenin II during primary and secondary stimulation with estrogen.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **112**, 1049

WANGH L.J. et SCHNEIDER W. (1982a)

Thyroid hormones are corequisites for estradiol-17 β *in vitro* induction of *Xenopus* vitellogenin synthesis and secretion.

Dev. Biol. **89**, 287

WANGH L.J. (1982b)

Glucocorticoids act together with estrogens and thyroid hormones in regulating the synthesis and secretion of *Xenopus* vitellogenin, serum albumin and fibrinogen.

Dev. Biol. **89**, 294

WESTLEY B. et KNOWLAND J. (1979)

Estrogen causes a rapid, large and prolonged rise in the level of nuclear estrogen receptor in *Xenopus laevis* liver.

Biochem. Biophys. Res. Commun **88**, 1167

WITHE H.B. et WHITEHEAD C.C. (1987)

Role of avidin and other biotin-proteins in the deposition and distribution of biotin in chicken eggs.

Biochem. J. **241**, 8626

WILEY H.S. et DUMONT J.N. (1978)

Stimulation of vitellogenin uptake in stage V *Xenopus* oocytes by treatment with chorionic gonadotropin *in vitro*.

Biol. Reprod. **18**, 762

WILEY H.S. et WALLACE R.A. (1981)

The structure of vitellogenin. Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple forms of yolk proteins.

J. Biol. Chem. **256**, 8626

WOODS J.W. et ROTH T.F. (1984)

A specific subunit of vitellogenin that mediates receptor binding.

Biochemistry **23**, 5774

WRIGHT C.V.E., WRIGHT S.C. et KNOWLAND J. (1983)

Partial purification of estradiol receptor from *Xenopus laevis* liver and levels of receptor in relation to estradiol concentration.

EMBO J. **2**, 973

WYATT G.R. (1988)

Vitellogenin synthesis and the analysis of juvenil hormone action in locust fat body.

Can. J. Zool. **66**, 2600

YAN Y.L., KUNERT C.J. et POSTLETHWAIT J.H. (1987)

Sequence homologies among the three yolk polypeptides (YP) genes in *Drosophila melanogaster*.

Nucleic Acids Res. **15**, 67

YOKOTA Y. et KATO K.H. (1988)

Degradation of yolk proteins in sea urchin eggs and embryos.

Cell. Differ. **23**, 191

YUSKO S., ROTH T.F. et SMITH T. (1981)

Receptor-mediated vitellogenin binding to chicken oocytes.

Biochem. J. **200**, 43

ZACHARIUS R.M., ZELL I.L., MORRISON J.H. et WOODLOCK J.J. (1969)

Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels.

Anal. Biochem. **30**, 148

ZHU J., INDRASITH L.S. et YAMASHITA O. (1986)

Characterization of vitellin, egg specific protein and 30 kDa protein from *Bombyx* eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis.

Biochim. Biophys. Acta **882**, 427

Table des Matières

	Pages
Avant propos	5
Données Générales	8
I. La vitellogénine	10
A. Le site de synthèse	10
B. Le gène de la vitellogénine	10
C. La vitelline	11
II. La vitellogenèse	15
A. Régulation de l'expression du gène	15
B. Modifications post-traductionnelles et excrétion de la vitellogénine	16
C. Incorporation de la vitellogénine dans l'ovocyte	18
D. Transfert de la vitellogénine aux globules vitellins	19
III. Conclusion	21
Résultats	22
I. La vitelline	23
A. Identification de la vitelline	23
B. Purification de la vitelline	24
C. Caractérisation de la vitelline	26
II. La vitellogénine	29
A. Identification de la vitellogénine	29
B. Site de synthèse	32
III. Transformation intraovocytaire de la vitellogénine	37
A. Mise en évidence du phénomène	37
B. Etude du phénomène au cours du développement ovocytaire	40
IV. Les polypeptides issus du clivage de la vitellogénine	43
A. Etude des clivages de la vitellogénine	43
B. Etude des polypeptides se détachant de la vitellogénine	45
V. Activités protéolytiques associées aux globules vitellins	60
A. Mise en évidence d'activités protéolytiques dans les globules vitellins	60
B. Caractérisation de l'activité protéolytique acide	63
C. Conclusion	67

Discussion	68
Conclusion	72
Matériels et Méthodes	75
I. Matériel biologique	76
II. Isolement des cellules	76
III. Maintien des cellules <i>in vitro</i>	76
IV. Marquage radioactif des protéines	77
V. Isolement des globules vitellins	77
VI. Préparation des fractions solubles d'ovocytes et de globules vitellins	78
VII. Méthodes chromatographiques	78
VIII. Méthodes électrophorétiques	79
IX. Méthodes immunologiques	82
X. Dosages des activités protéolytiques	84
Références bibliographiques	87