

50376
1992
81

64468

50376
1992
81

Université des Sciences et Technologies de Lille

UFR de Biologie

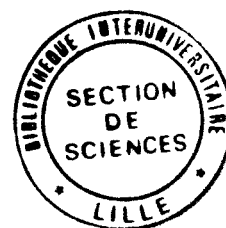
N° d'ordre : 889

THESE

présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université en Sciences de la Vie et de la Santé

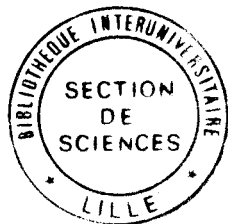
par

Mostafa BRITEL



VITELLOGENINE ET OVOHEMERYTHRINE, PROTEINES MAJEURES IMPLIQUEES DANS LA VITELLOGENESE CHEZ LA SANGSUE *THEROMYZON TESSULATUM*

*Identification, purification, caractérisation et expression des
molécules au cours du cycle vital*



Soutenue le 10 Avril 1992 devant la commission d'examen :

Président et Rapporteur : Professeur M. PORCHET

Rapporteur : Docteur P. SAUTIERE

Examineurs : Professeur J. MALECHA

Docteur J.C. BEAUVILLAIN

Docteur J.L. BAERT

A Naïma et Amale

J'exprime tous mes remerciements

à Monsieur le Professeur M. PORCHET, Directeur de l'URA 148, qui, après m'avoir accepté dans son laboratoire, me fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de mon travail et de présider le jury de cette thèse. Je tiens à vous exprimer ma très profonde reconnaissance.

à Monsieur le Docteur P. SAUTIERE, Directeur de l'URA 409. Votre implication dans ce travail a été déterminante dans la caractérisation de l'ovohémérythrine. Je vous remercie vivement d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail et de me faire l'honneur d'accepter d'être membre de ce jury. Soyez assuré de ma gratitude et de ma respectueuse considération.

à Monsieur le Professeur J. MALECHA, auquel je suis très reconnaissant pour sa participation à ma formation, ainsi que pour ses conseils et ses critiques. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude et de mon sincère attachement.

à Monsieur le Docteur J. L. BAERT, pour le temps qu'il a consacré à ma formation, pour sa disponibilité et pour ses conseils scientifiques. Son enthousiasme et sa rigueur scientifique seront toujours pour moi un exemple. Je tiens à vous en remercier et à vous assurer de ma sincère et respectueuse amitié.

à Monsieur le Docteur J. C. BEAUVILLAIN. Je vous suis reconnaissant d'avoir bien voulu juger ce travail.

à Madame le Professeur C. DELBART, (SERLIA, Institut Pasteur de Lille) dont la précieuse collaboration dans ce travail a permis l'identification des constituants lipidiques associés à la vitelline et à la vitellogénine. Je vous remercie pour le chaleureux accueil que vous m'avez réservé à chacune de mes visites, ainsi que pour les conseils que vous m'avez prodigués. Soyez assuré de ma sincère gratitude et de ma profonde considération.

Je tiens également à remercier le Professeur D. GUILLOCHON et le Docteur J. M. PIOT pour les conversations fructueuses et les conseils judicieux qu'ils m'ont prodigués en ce qui concerne l'étude de l'ovohémérythrine. Je remercie aussi MM. S. DEMUYNCK et A. NEJMEDDINE pour l'aide apportée à ce sujet.

Je ne saurais oublier dans mes remerciements toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de cette thèse. Je pense en particulier à M. C. SLOMIANNY, B. LEU, Y. HIMPENS, F. BONET, M. MASSON, G. MONTAGNE, D. LAZARECKI et A. LEPRETRE. Au cours de ces années j'ai souvent abusé de votre temps, soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Je rends hommage à toutes celles et tous ceux qui m'ont apporté leur connaissance, aide et amitié. Je tiens à vous remercier et à vous exprimer ma reconnaissance.

INTRODUCTION

Chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* la maturation génitale s'accompagne d'une augmentation de masse considérable due à une importante rétention d'eau (Malecha, 1979, 1983), certains individus peuvent ainsi doubler de volume. Ce phénomène est contrôlé par une hormone antidiurétique sécrétée par les ganglions cérébroïdes (Malecha, 1983) et vraisemblablement apparentée à l'ocytocine (Malecha *et al.*, 1989a). La maturation génitale se fait en deux temps, en effet *T. tessulatum* est hermaphrodite protandre. Chez elle la formation des gamètes mâles précède celle des œufs. Si la rétention d'eau observée lors de la spermatogenèse est modérée, elle est par contre maximale au cours de l'ovogenèse. Afin de pouvoir préciser les interrelations probables entre la maturation génitale femelle et la rétention d'eau, il était nécessaire de disposer de connaissances suffisamment précises sur les mécanismes de l'ovogenèse. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de la vitellogenèse et de son contrôle chez *T. tessulatum*.

La vitellogenèse est un processus métabolique majeur qui mène à la formation des réserves nécessaires pour assurer le développement embryonnaire. Alors que chez les Annélides Polychètes, l'étude cytologique et biochimique de la vitellogenèse a fait l'objet de nombreux travaux récents (voir revue dans Eckelberger, 1988), il n'est pas de même pour les deux groupes de clitellates, les Oligochètes (voir revue dans Jamieson, 1981, 1988) et les Hirudinées (voir revue dans Sawyer, 1986). Chez les clitellates, les œufs sont généralement pondus à l'intérieur d'un cocon sécrété par le clitellum et abondamment pourvu de substances de réserves aux dépens desquelles se développera l'embryon, rendant de ce fait inutile l'accumulation de vitellus dans les ovocytes. Cependant des œufs plus riches en vitellus se rencontrent chez les oligochètes microdrites (Jamieson, 1981, 1988). Peu d'espèces ont été étudiées et les données que l'on possède sur leurs réserves vitellines proviennent d'études cytochimiques ou en microscopie électronique (Lechenault, 1968 ; Dumont, 1969). Chez les Hirudinées on ne trouve des œufs très riches en vitellus que chez les glossiphoniidés, famille à laquelle appartient *T. tessulatum*. Des travaux relativement anciens traitent de la croissance

ovocytaire et du rôle nourricier des cellules folliculaires chez la sangsue glossiphoniidés *Glossiphonia complanata* (Eisenstadt, 1964, 1965 ; Eisenstadt et Brodskii, 1963 ; Eisenstadt *et al.*, 1967 ; Gintsburg, 1966, 1967a, b, 1971 ; Gruzova et Zaichikova, 1967). Ils ont montré que les synthèses d'ADN cytoplasmique et d'ARN ribosomal sont en grande partie dues aux noyaux des cellules folliculaires et que la zone périnucléaire des ovocytes est le lieu d'intenses synthèses de protéines et d'ARN. Les recherches de Damas (1964a, b, 1965, 1977) chez la même espèce ont surtout mis l'accent sur les interrelations entre les ovocytes et une zone centrale anhiste des cordons ovariens appelée rachis. Cependant aucune donnée n'existe sur la nature chimique du vitellus ainsi que sur son origine hétéro-ou autosynthétique. L'un des buts de notre travail est de répondre à cette double interrogation.

Après la présentation des éléments essentiels du cycle vital et de la gamétogenèse, nous aborderons dans ce travail :

- l'identification et la caractérisation des protéines de réserve de l'œuf et de leurs précurseurs extraovariens,
- la cinétique d'accumulation de ces protéines dans le coelome et les ovaires,
- les lieux de synthèse de ces précurseurs ainsi que le rôle de certains organes susceptibles de réguler leur expression.

RESULTATS

LE CYCLE VITAL ET LES PRINCIPALES ETAPES DE LA MATURATION GENITALE DE *T. TESSULATUM*

La sangsue glossiphoniidée *T. tessulatum* est parasite des oiseaux aquatiques chez lesquels elle prélève du sang en s'introduisant dans les fosses nasales*. Adulte elle peut atteindre une taille de 2 à 3 cm et une masse de 150 mg à plus d'1g. Elle est semelpare : elle se reproduit une fois au cours de sa vie puis meurt (Wilkialis, 1970 ; Wilkialis et Davies, 1980a, b).

Les grandes étapes de la vie de *T. tessulatum* sont définies en prenant comme repères les repas de sang (Malecha, 1983), lesquels sont généralement au nombre de trois (Pl. I). Les prises de nourriture définissent les stades suivants : stade 0 de l'éclosion au premier repas, stade 1 après le premier repas, stade 2 après le deuxième repas, stade 3 après le troisième repas. Généralement la maturité sexuelle survient à l'issue du troisième repas chez des animaux âgés de 1 an environ (Hotz, 1938 ; Malecha, 1979). Cependant, si à la suite de repas incomplets le poids atteint après le troisième repas est inférieur à 150 mg, un quatrième repas peut être nécessaire et le cycle dans la nature s'étend alors sur 2 ans (Wilkialis et Davies, 1980a). Dans ce dernier cas, on considère que le cycle de ces sangsues comporte un stade 2 supplémentaire (Malecha *et al.*, 1989b). Le stade 3 est très long et peut durer 1 an. Il a été subdivisé en prenant en compte les différentes étapes de la reproduction (Malecha *et al.*, 1989b) (Pl. II). Les appareils reproducteurs mâle et femelle sont schématisés sur la figure 1. L'évolution de la spermatogenèse définit les stades 3A et 3B, celle de l'ovogenèse les stades 3C et 3D (Malecha *et al.*, 1989b). Les stades 3B et 3D ont été subdivisés pour tenir compte d'une manière très précise de l'évolution des gonades.

Les différentes étapes de l'évolution de la spermatogenèse ont été utilisées pour subdiviser le stade 3B (Pl. III a).

* Le film de J. MALECHA , "Croissance et reproduction de la sangsue *Theromyzon tessulatum*" retrace les différentes étapes du cycle vital de cette espèce (Production USTLFA. Distribution Service du Film de Recherche Scientifique 96 Bd Raspail 75272 PARIS Cedex 06)

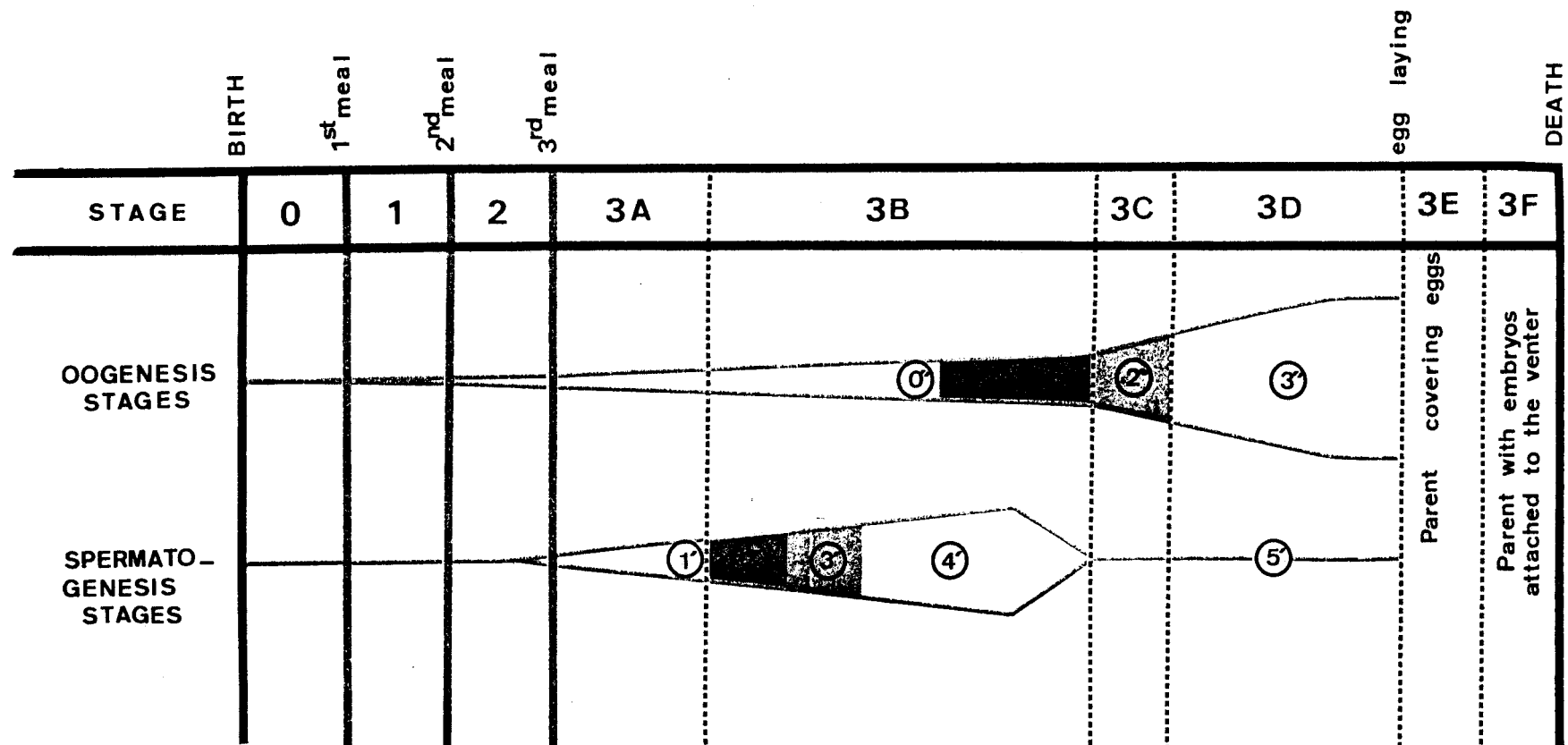


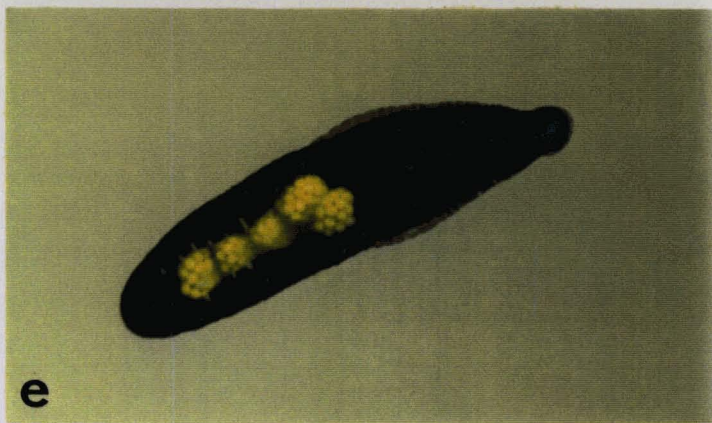
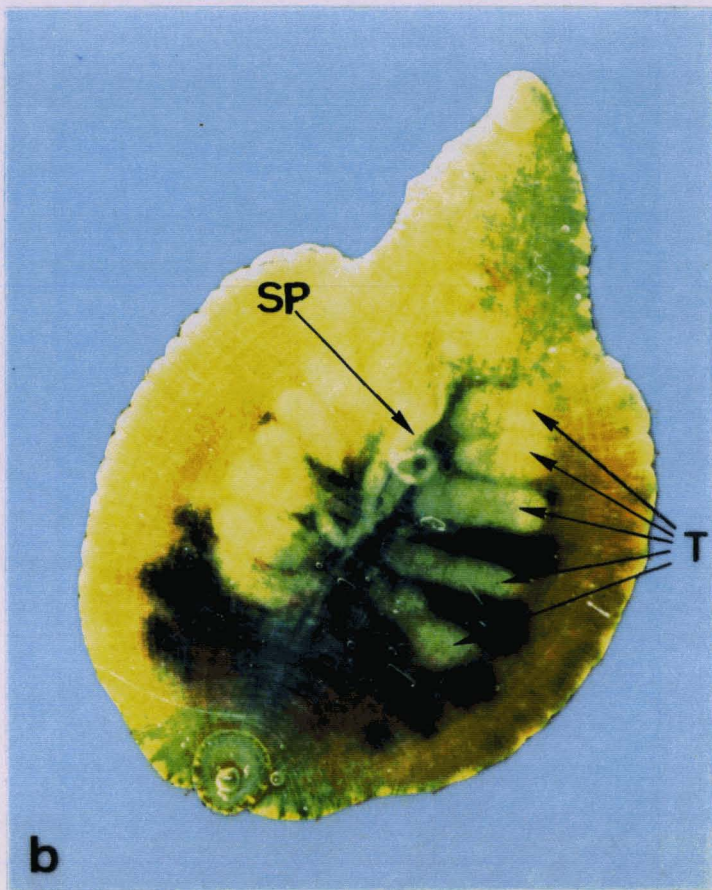
PLANCHE I

Représentation schématique du cycle biologique de *T. tessulatum*. Il n'est pas tenu compte, dans ce schéma, de la durée des différents stades (d'après Malecha *et al.*, 1989b).

PLANCHE II

Principales étapes du stade 3 de *T. tessulatum* en vue ventrale

- a) Stade 3A. Le tube digestif est rempli de sang. Les organes génitaux ne sont pas discernables par transparence (X 10).
- b) Stade 3B. Les testicules (T) sont nettement visibles ainsi que les spermiductes (SP). Le tube digestif contient encore du sang (X 10).
- c) Stade 3D. Les testicules ont régressé, le tube digestif est vide et les ovaires bourrés d'ovocytes mûrs sont observables par transparence. L'orifice génital ♀ (OG♀) apparaît très nettement à la suite du développement de cellules glandulaires (X 10).
- d) Ponte du 2ème cocon. Le premier cocon (1) est juste au-dessus de la ventouse caudale, le second (2) est en cours de remplissage (X 10).
- e) Stade 3E. La sangsue couve ici cinq cocons (X 2,5). (Je remercie M. Guillon, du Service du Cinéma Scientifique, pour cette photographie).



La spermatogenèse est assurée par 6 paires de testicules (fig. 1). Elle a été divisée en cinq stades (Malecha *et al.*, 1989b) en tenant compte des cellules germinales les plus évoluées (Hagadorn, 1962 ; Malecha, 1970).

stade 1' : il va du début de la différenciation des testicules jusqu'à l'étape montrant des groupes isogéniques de 2 à 32 spermatogonies autour d'un cytophore très réduit.

stade 2' : le cytophore est de plus grande taille, irrégulier et entouré de 64 spermatocytes I.

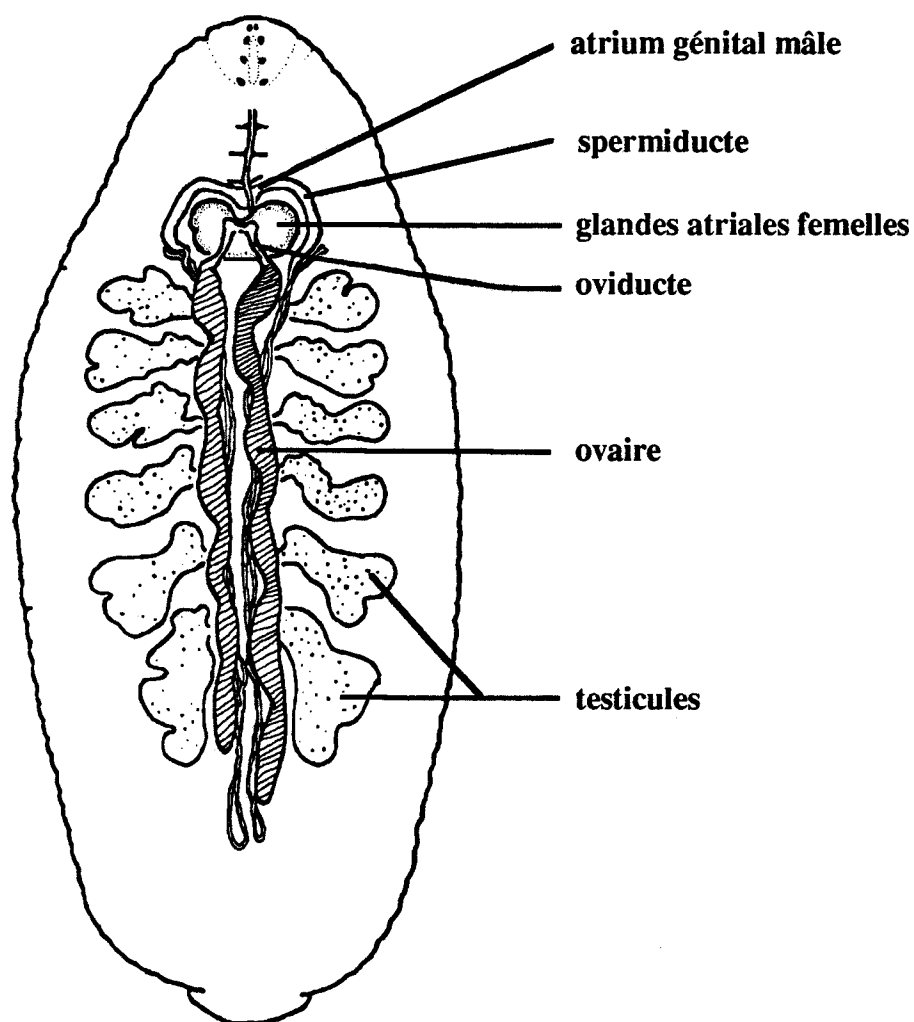
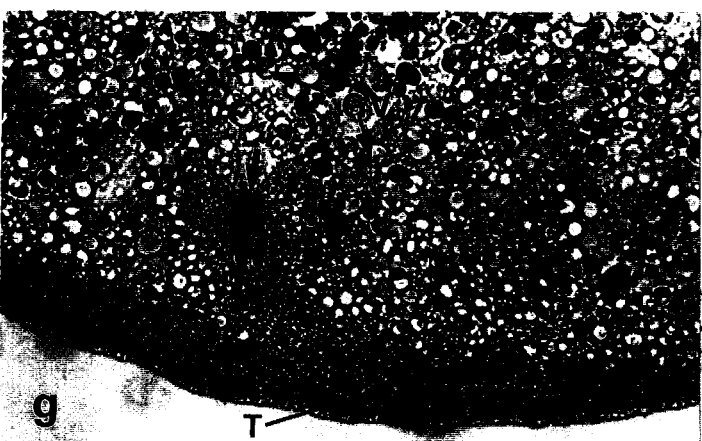
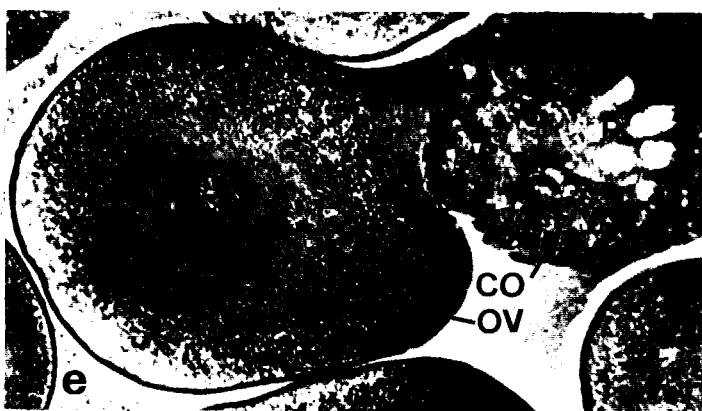
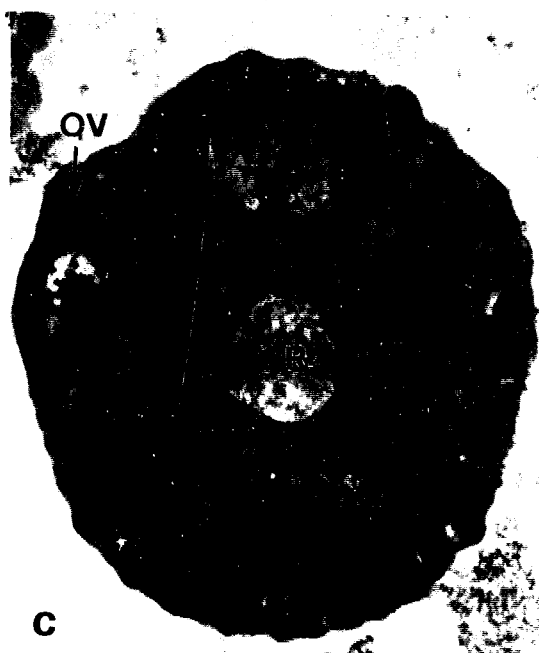
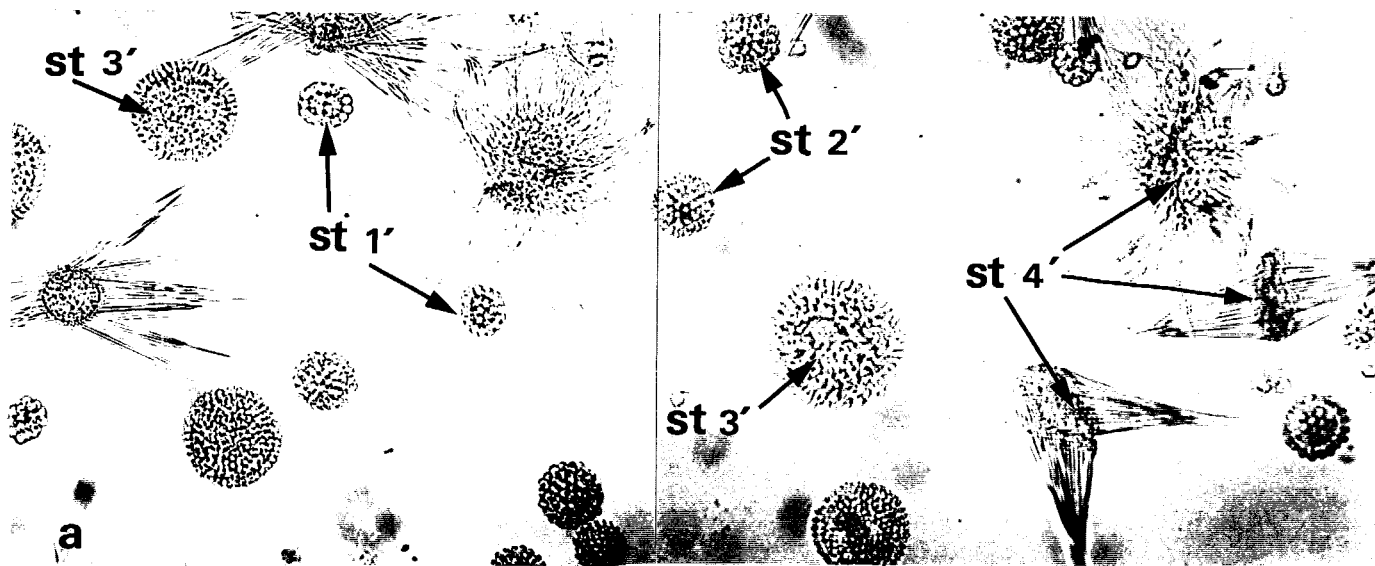


Figure 1 : Représentation schématique de l'appareil génital de *Theromyzon* (d'après Hagadorn, 1962)

PLANCHE III

Principales étapes de la gamétogenèse chez *T. tessulatum*

- a) Contenu d'un testicule de stade 4' observé en contraste de phase. Les différents stades de la spermatogenèse peuvent y être observés : st 1' : stade 1', st 2' : stade 2', st 3' : stade 3', st 4' : stade 4' (X 330).
- b) Coupe transversale d'un ovaire au stade 0". R : rachis. (Coloration : Azan de Heidenhain) (X 330).
- c) Coupe transversale d'un ovaire au stade 1". Ov : ovocyte en croissance, R : rachis. (Coloration : Azan de Heidenhain) (X 330).
- d) Cordons ovariens (CO) *in toto* au stade 1". Ov : ovocyte. (Coloration : carmin chlorhydrique) (X 32).
- e) Coupe transversale d'un ovaire au stade 2". Les ovocytes (OV) sont d'un diamètre supérieur à celui du cordon (CO). R : rachis. (Coloration : Azan de Heidenhain) (X 175).
- f) Coupe sagittale d'un ovocyte de stade 3" passant par le pôle animal. Les globules vitellins (GV) occupent la majeure partie de la cellule à l'exception du téloplasme (T), zone cytoplasmique qui en est dépourvue. (Coloration : Azan de Heidenhain) (X 175).
- g) Coupe d'un ovocyte au niveau du pôle animal, montrant le téloplasme (T), le noyau (flèche) en métaphase de 1ère division de maturation et les globules vitellins (GV). (Coloration : Azan de Heidenhain) (X 450).



stade 3' : le cytophore arrondi est à son maximum de développement. Il est entouré de cellules plus petites que les précédentes : spermatocytes II et spermatides jusqu'à la formation de l'ébauche du flagelle.

stade 4' : les spermatozoïdes sont bien formés et encore attachés au cytophore. Ceux arrivés à maturité commencent à s'accumuler dans les canaux déférents.

stade 5' : les testicules sont en dégénérescence. Les spermatozoïdes mûrs sont stockés dans les canaux déférents.

L'évolution de l'ovogenèse a été utilisée pour définir le stade 3C et subdiviser le stade 3D (Pl. III b, c, d, e, f, g).

Ses principales étapes sont très voisines de celles décrites chez *Glossiphonia complanata* par Damas (1964b, 1969, 1977). La fonction femelle est assurée par des cordons ovariens qui flottent librement dans deux ovisacs (fig. 1). Une partie des cellules constituant ce cordon se développe en ovocytes, les autres en cellules nourricières. Tous les ovocytes évoluent d'une manière synchrone et se détachent du cordon au cours de la phase de grand accroissement.

L'ovogenèse a été scindée en quatre stades (Malecha *et al.*, 1989b) suivant les critères utilisés par Hagadorn (1962) chez *T. rude*.

stade 0" : les futurs ovocytes sont de la même taille que les autres cellules du cordon ovarien (Pl. III b).

stade 1" : les ovocytes sont reconnaissables à leur taille plus importante. Ils forment de petites saillies sur le cordon ovarien (Pl. III c, d).

stade 2" : c'est le début de la croissance rapide des ovocytes. Ceux-ci sont de grande taille, de couleur blanche et masquent, par leur développement, les autres cellules au centre du cordon ovarien. Ce stade est très bref (Pl. III e).

stade 3" : ce stade s'étend du début de l'accumulation du vitellus caractérisé par sa couleur jaune jusqu'à la maturité complète suivie par la ponte (Pl. III f, g). La quantité d'ovocytes produits dépend de la taille de l'animal, en

moyenne 400 d'un diamètre de 727 à 767 μm (Wilkialis et Davies, 1980b).

La couvaison des cocons caractérise le stade 3E. Celui-ci est séparé du stade 3D par la ponte.

Le transport des sangsues néonates jusqu'au premier repas de ces dernières définit le stade 3F. Il peut durer plus de 5 mois, soit jusqu'à ce que le parent trouve un hôte favorable pour les jeunes sangsues qu'il porte. L'adulte meurt quelques jours après leur départ (Wilkialis et Davies, 1980b).

Pour les études biochimiques qui vont suivre et qui nécessitent du matériel en quantité relativement importante, *T. tessulatum* s'est révélée être un très bon modèle. Comme toutes les glossophoniidés elle produit en nombre des œufs hétérolécithes mais en outre c'est le seul genre à être pourvu de vastes cavités coelomiques (Hotz, 1938), cavités oblitérées chez les autres sangsues par du mésenchyme, ce qui permet le prélèvement de quantités conséquentes de liquide coelomique.

LE SYSTEME VITELLINE-VITELLOGENINE

I - IDENTIFICATION ET PURIFICATION DE LA VITELLINE

La vitelline est généralement définie comme étant une lipoglycoprotéine de masse moléculaire élevée (200 à 600 kDa) et représente la majeure partie des protéines ovocytaires (Hagedorn et Kunkel, 1979 ; Meusy, 1980 ; Baert *et al.*, 1984 ; Wallace, 1985 ; Byrne *et al.*, 1989). C'est sur la base de ces données que nous avons cherché à identifier la vitelline dans les ovaires de *T. tessulatum*.

A - ANALYSE DES PROTEINES OVOCYTAIRES

L'analyse des protéines ovocytaires a été effectuée par électrophorèse, dans un gradient 5-25% de polyacrylamide. Ce choix a été motivé par la possibilité de séparer les protéines natives en fonction de leur masse moléculaire. La séparation des protéines de l'homogénat d'ovaires de *T. tessulatum* en PAGGE ("Poly Acrylamide Gradient Gel Electrophoresis") permet de visualiser, après coloration au bleu de Coomassie (fig. 2 A), un certain nombre de bandes protéiques. Parmi les protéines de masse moléculaire élevée, une protéine majeure de 490 kDa est observée. De plus, cette protéine est colorée par le noir Soudan (fig. 2 B) et par le réactif de Schiff (fig. 2 C), deux colorants spécifiques, respectivement, de la coloration des lipides et des glucides. Ces résultats montrent que nous sommes en présence d'une lipoglycoprotéine. Ainsi cette protéine de masse moléculaire élevée possède toutes les caractéristiques d'une vitelline, en conséquence nous l'avons appelée vitelline (V490). Toutefois, on peut remarquer l'existence de protéines plus lourdes qui, bien que relativement mineures, apparaissent également comme des lipoglycoprotéines. Afin de mieux les caractériser, nous avons analysé celles de l'ovaire par électrophorèse bidimensionnelle, méthode faisant intervenir une première migration électrophorétique en milieu non dénaturant et une deuxième dimension en présence de dodécyle sulfate de sodium (SDS-PAGGE). Le résultat de cette analyse montre l'existence d'un seul polypeptide majeur

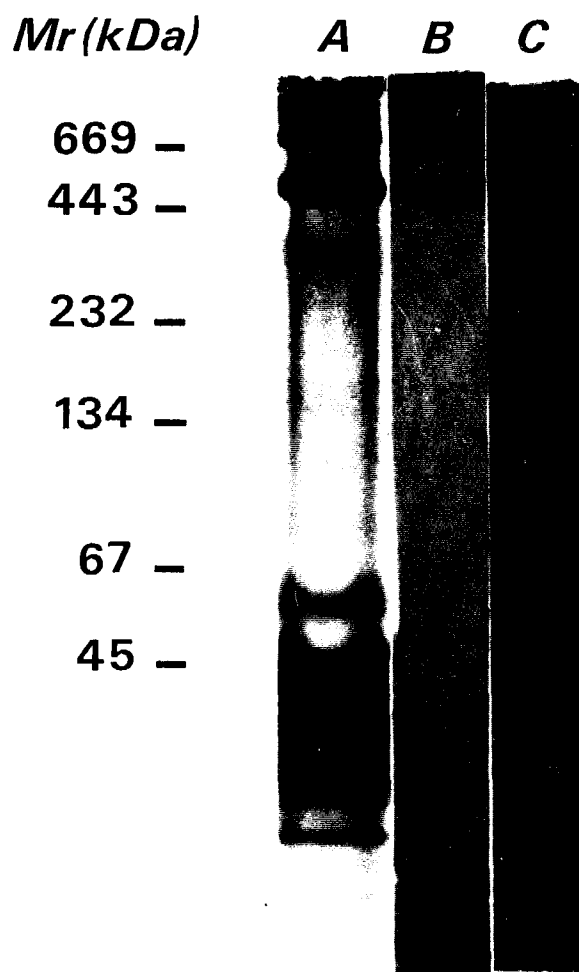


Figure 2 : Analyse électrophorétique en milieu non dénaturant des protéines de l'homogénat d'ovaires dans un gradient d'acrylamide 5-25 % (PAGGE).
 A : Gel coloré par le bleu de Coomassie.
 B : Gel coloré par le Noir Soudan.
 C : Gel coloré au PAS.

d'environ 165 kDa aussi bien dans la vitelline que dans les lipoglycoprotéines plus lourdes (fig. 3). Cette donnée permet donc de suggérer que les lipoglycoprotéines natives les plus lourdes représentent des agrégats de la vitelline. Il est à noter que la présence d'aggrégats dans la fraction vitelline n'est pas rare et a été décrite chez de nombreux invertébrés (Chinzei *et al.*, 1981 ; Engelmann *et al.*, 1976 ; Pereira et De Bianchi, 1983 ; Masuda et Oliveira, 1985 ; Baert, 1985).

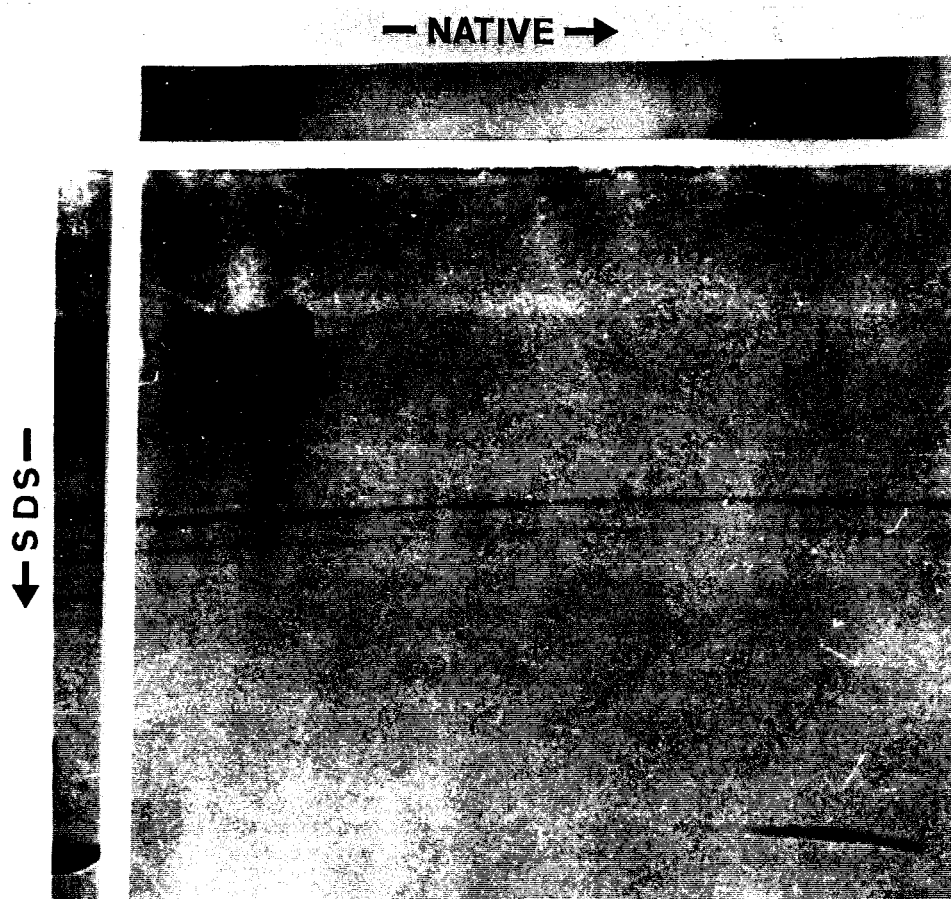


Figure 3 : Electrophorèse bidimensionnelle des protéines de l'homogénat d'ovaires. La première migration est effectuée en milieu non dénaturant dans un gradient d'acrylamide 5-30 %. La deuxième dimension est réalisée par SDS-PAGE.

B - PURIFICATION DE LA VITELLINE

Le procédé mis au point pour purifier la vitelline est relativement simple (pour plus de détails voir chapitre matériel et méthodes). En effet, au cours de la préparation des homogénats d'ovaires, nous avons constaté que la vitelline était très peu soluble dans des milieux de faible force ionique. Nous avons donc exploité cette propriété pour purifier cette macromolécule. Ainsi les ovaires isolés sont lavés puis homogénéisés dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8 contenant du NaCl à 0,15M. L'homogénat d'ovaires est ensuite filtré sur un

tamis de nylon, ce qui permet d'éliminer les résidus membranaires des ovaires. Après la filtration, l'homogénat est déposé sur un coussin de saccharose à 0,7M, puis centrifugé à 5000 x g pendant 5 mn. A l'issue de la centrifugation, la majeure partie de la vitelline, comme le montre l'analyse électrophorétique présentée dans la figure 4 B, n'est plus détectée dans la fraction soluble ovocytaire (FSO), mais se trouve dans le culot obtenu (fig. 4 C). Afin d'éliminer les contaminants protéiques encore présents dans la fraction vitelline, le culot est repris dans le tampon d'homogénéisation et la suspension

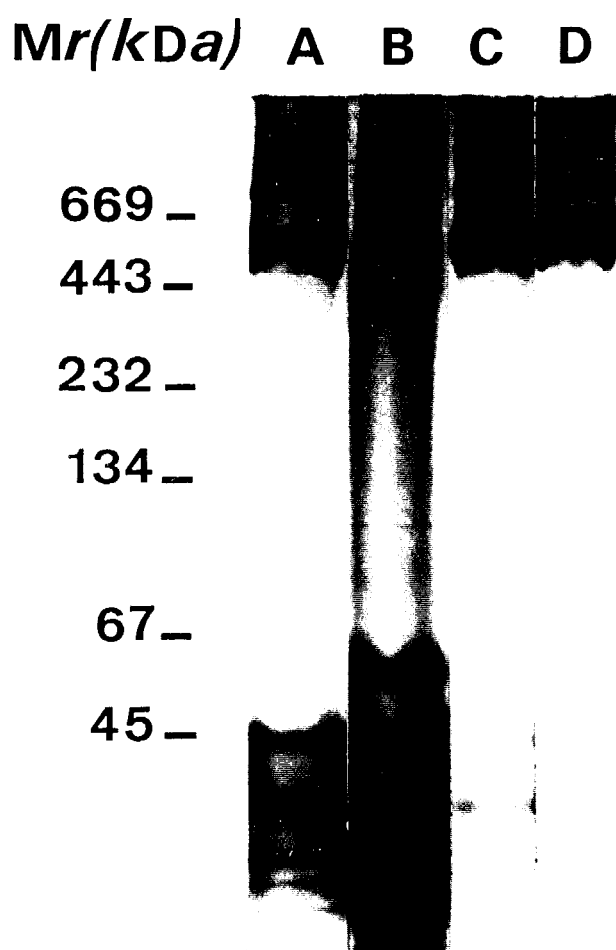


Figure 4 : Purification de la vitelline.

Analyse en PAGGE des fractions protéiques obtenues au cours de la purification de V490. (A) homogénat d'ovaires, (B) fraction soluble ovocytaire (FSO), (C) culot obtenu après centrifugation de l'homogénat d'ovaires, (D) vitelline purifiée.

est centrifugée. Cette opération est ensuite répétée deux fois. Après le dernier lavage, le culot est solubilisé dans un tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8 contenant du NaCl à 1M. L'analyse de cette préparation en PAGGE montre que seule la vitelline est présente à la fois sous la forme de 490 kDa et sous celle d'aggrégats (fig. 4 D).

II - IDENTIFICATION ET PURIFICATION DE LA VITELLOGENINE

Dans la plupart des espèces étudiées jusqu'à maintenant la vitellogenèse a été définie comme étant un processus purement hétérosynthétique. C'est le cas chez les néréidiens où la vitellogénine est synthétisée par les coelomocytes (Baert et Slomianny, 1987 ; Bonnier, 1990). Chez les insectes la vitellogénine est synthétisée au niveau du corps gras (Engelmann, 1979 ; Hagedorn et Kunkel, 1979), alors que chez les vertébrés ovipares, la vitellogénine est synthétisée par le foie (Wallace, 1985). Toutefois, chez la drosophile, le processus de la vitellogenèse est mixte, puisque les cellules folliculaires de l'ovaire, ainsi que le corps gras interviennent dans la synthèse de la vitelline (Bownes et Hames, 1978 ; Postlethwait *et al.*, 1980 ; Gutzeit, 1980). Partant de cette base, nous avons cherché à identifier une vitellogénine au niveau du liquide coelomique, milieu dans lequel baignent les ovaires.

A - IDENTIFICATION DE LA VITELLOGENINE

Afin d'identifier une macromolécule apparentée à la vitelline au niveau du liquide coelomique, les protéines de ce liquide et de l'homogénat d'ovaires ont été séparées en PAGGE, transférées sur une feuille d'Immobilon-P et testées pour leur réactivité envers un anticorps polyclonal dirigé contre la vitelline purifiée. L'immunorévélation de ce transfert par le sérum anti-vitelline montre que seule la vitelline (sous la forme de 490 kDa et d'aggrégats) est détectée dans les ovaires (fig. 5 A) ; alors que le sérum reconnaît une protéine du liquide coelomique, dont la masse moléculaire est apparemment supérieure à celle de la vitelline (fig. 5 B). Par ailleurs, cette macromolécule est également colorée par le noir Soudan et le réactif de Schiff, ce qui indique une nature lipoglycoprotéique (fig. 6). Ces résultats, nous permettent de définir cette protéine immunoréactive du liquide coelomique comme le précurseur extraovocytaire de la vitelline ou vitellogénine.

Figure 5 : Recherche d'une protéine apparentée à la vitelline dans le liquide cœlomique. Les protéines des ovaires (A) et du liquide cœlomique (B), ont été séparées en PAGGE et transférées sur une feuille d'Immobilon-P. L'immunorévélation a été effectuée par le sérum polyclonal anti-V490.

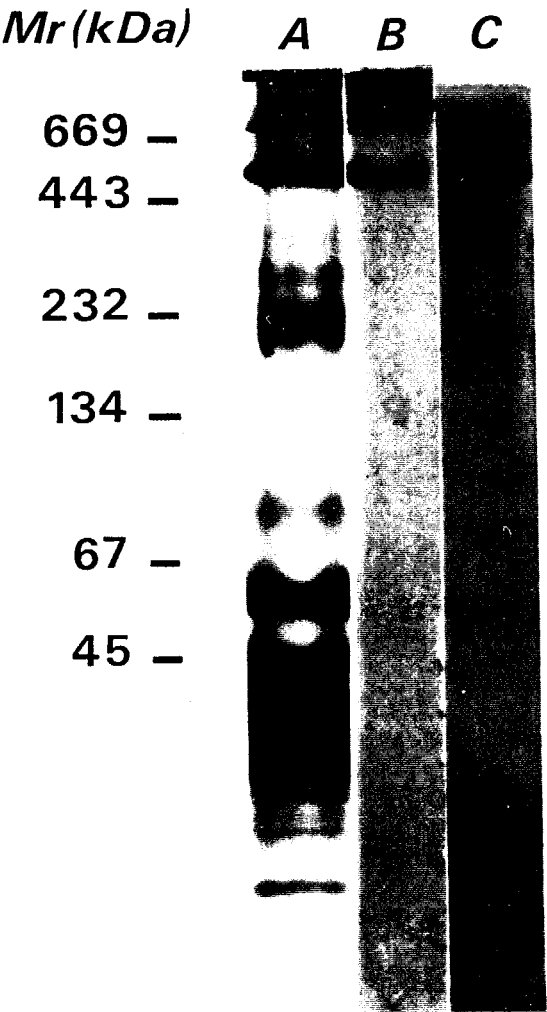
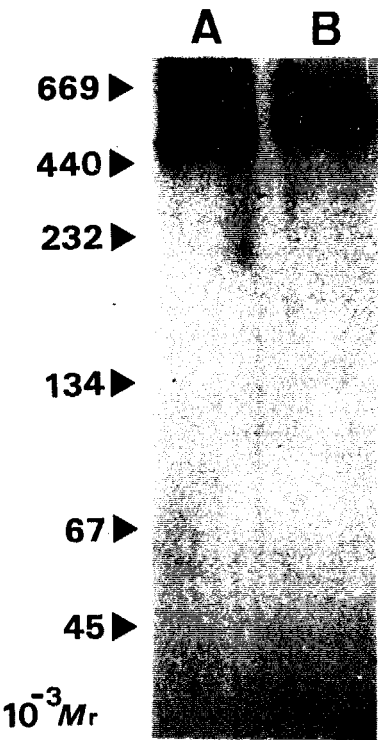
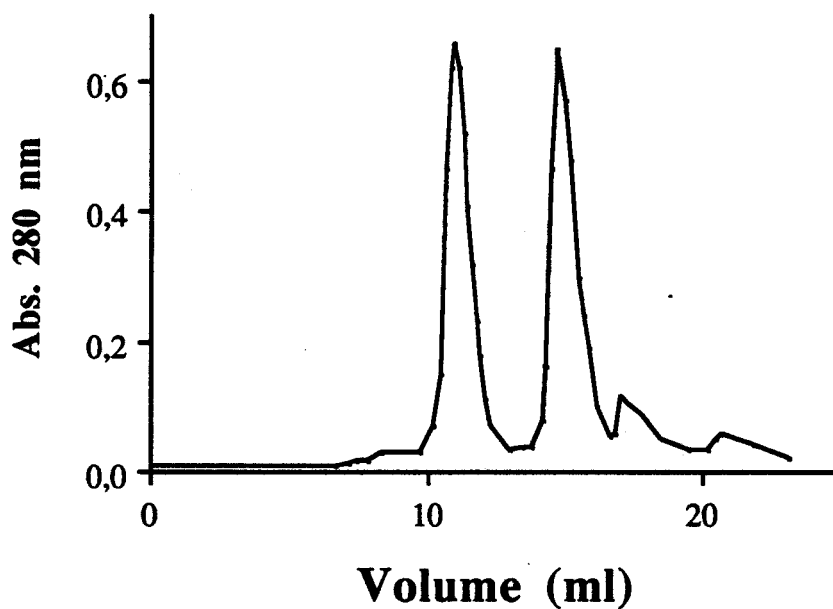
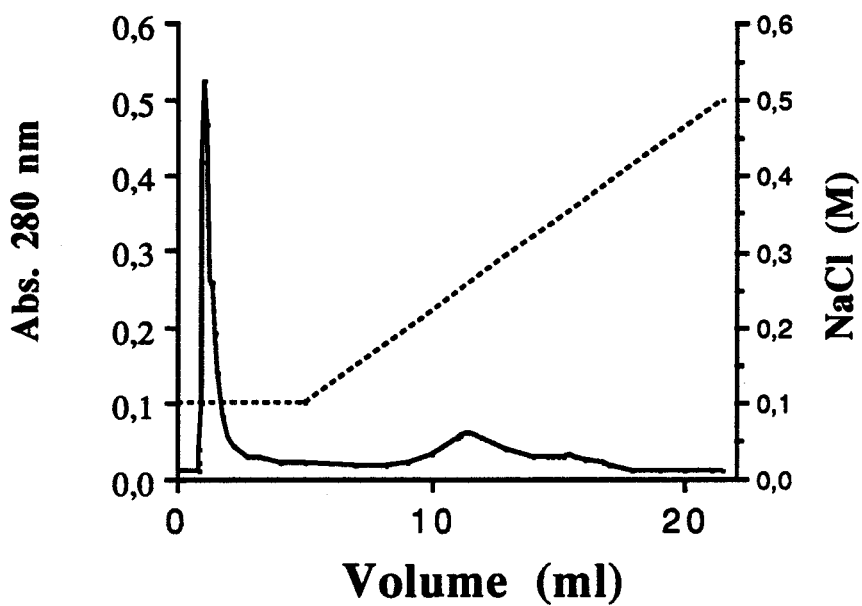


Figure 6 : Identification de la vitellogénine. Les protéines du liquide cœlomique ont été analysées en PAGGE et colorées par le bleu de Coomassie (A), le Noir Soudan (B) et le réactif de Schiff (C).

Figure 7 : Purification de la vitellogénine.



A : Profil d'élution des protéines du liquide coelomique après chromatographie de gel filtration sur une colonne Superose 12. Abs.: Absorbance.



B : Profil d'élution sur une colonne d'échange d'anions MonoQ de la fraction de masse moléculaire élevée issue de la gel filtration. Abs.: Absorbance.

B - PURIFICATION DE LA VITELLOGÉNINE

Contrairement à la vitelline, la vitellogénine est soluble dans les milieux de faible force ionique, ce qui a demandé la mise au point d'un protocole de purification plus élaboré (voir chapitre matériel et méthodes). Dans une première étape, les protéines du liquide cœlomique de *T. tessulatum* sont soumises à une chromatographie de gel filtration. Deux fractions protéiques majeures sont ainsi séparées (fig. 7 A), la vitellogénine étant retrouvée dans celle correspondant aux protéines de masses moléculaires élevées (fig. 8 B). Afin d'éliminer les protéines contaminantes encore présentes dans cette fraction, celle-ci a ensuite été chromatographiée sur une colonne d'échange d'anions. Dans les conditions utilisées, un pic majeur correspond à la fraction non retenue (fig. 7 B) et l'analyse électrophorétique de cette fraction montre uniquement la présence de la vitellogénine à ce niveau (fig. 8 C).

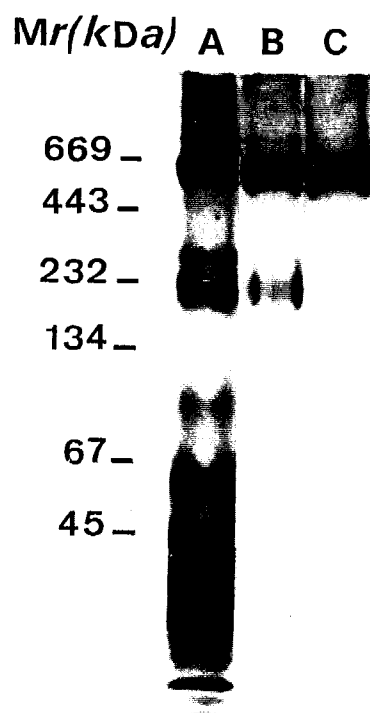


Figure 8 : Analyse en PAGGE des fractions obtenues au cours de la purification de la vitellogénine. (A) protéines totales du liquide cœlomique, (B) fraction protéique correspondant au pic de masse moléculaire élevée issu de la gel filtration, (C) fraction protéique non retenue lors de la chromatographie d'échange d'anions.

III - CARACTERISATION COMPAREE DE LA VITELLINE ET DE LA VITELLOGENINE

A - MASSE MOLECULAIRE NATIVE

La détermination de la masse moléculaire a été effectuée en PAGGE. La masse moléculaire de la vitelline native a été estimée à 490 kDa, alors que celle de la vitellogénine a été déterminée approximativement à 520 kDa (Vg520) (fig. 9).

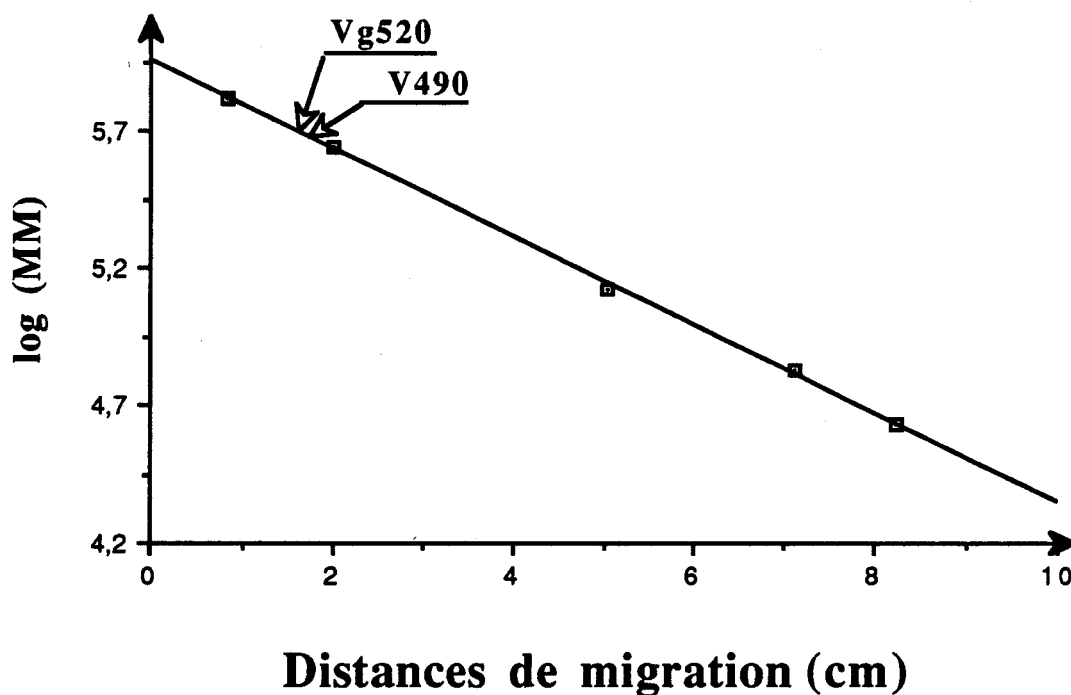


Figure 9 : Détermination de la masse moléculaire de la vitellogénine et de la vitelline purifiées. Après analyse en PAGGE, les distances de migration ont été exprimées en fonction du logarithme décimal de la masse moléculaire. Les témoins utilisés sont : thyroglobuline (669kDa) ; ferritine (440kDa) ; albumine dimère (134kDa) ; albumine monomère (67kDa) et ovalbumine (45kDa).

B - POINT ISOELECTRIQUE

La détermination du point isoélectrique de la vitellogénine et de la vitelline a été réalisée par isoélectrofocalisation. Le point isoélectrique des molécules purifiées a été estimé à 7,6 pour la vitellogénine et 7,4 pour la vitelline (fig. 10).

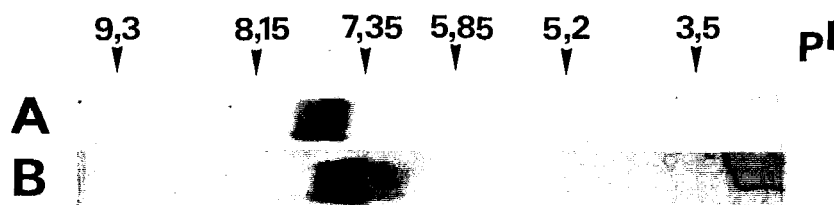
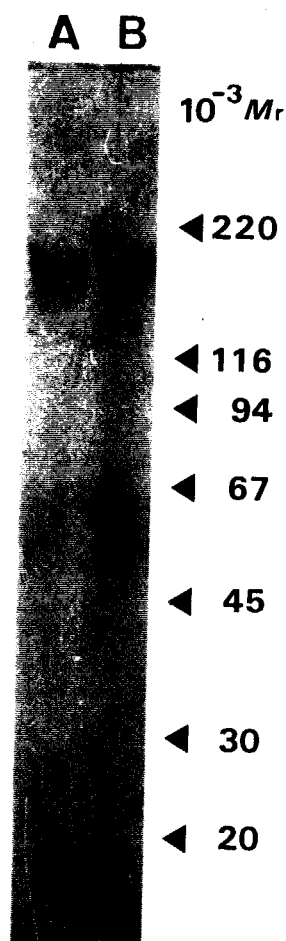


Figure 10 : Analyse par électrofocalisation de la vitellogénine (A) et de la vitelline (B) : gel d'acrylamide à 5 % contenant des ampholines pH 3,5-9,5.

C - COMPOSITION SOUS-UNITAIRE

Afin de déterminer la composition sous-unitaire de ces deux macromolécules, nous les avons analysées en SDS-PAGE. Cette analyse a mis en évidence un seul polypeptide d'environ 165 kDa, aussi bien au niveau de la vitelline (fig. 11 A) qu'au niveau de la vitellogénine (fig. 11 B). Ce polypeptide de 165 kDa a été appelé YP165 ("yolk protein" de 165 kDa).

Figure 11 : Détermination de la composition sous-unitaire de V490 (A) et Vg520 (B). Les molécules purifiées ont été analysées en SDS-PAGE.



D - COMPOSITION EN LIPIDES

(En collaboration avec le Pr. C. Delbart, SERLIA, Institut Pasteur de Lille)

Les lipides associés de façon non covalente à la partie glycoprotéique ont été extraits selon la méthode de Folch *et al.* (1957). Quantitativement le pourcentage en masse de la fraction lipidique a été estimé à 31,8% au niveau de la vitellogénine et à 24% au niveau de la vitelline. Tenant compte de la masse moléculaire de ces deux lipoglycoprotéines, on peut estimer la participation des lipides à environ 165 kDa au sein de la vitellogénine et à 118 kDa au sein de la vitelline, ce qui indique une perte de lipides lors de la transformation de Vg520 en V490. Du point de vue analytique la fraction lipidique des deux molécules se compose de stérols, de glycérides et de phospholipides (Tableau I). Cependant il faut signaler que les glycérides sont majoritairement sous la forme de triglycérides, alors que les stérols sont pour la plus grande partie estérifiés. En ce qui concerne les phospholipides, ceux-ci renferment essentiellement de la

Lipides	Vg520		V490	
	%	kDa	%	kDa
Lipides totaux	31,8	165	24	118
Glycérides	35,2	58,1	44,2	52,2
Stérols	33,3	54,9	29,9	35,3
Phospholipides	31,5	52	25,8	30,4
Sphingomyéline	1,6	2,7	2,3	2,7
Phosphatidyl choline	12,8	21,1	10,3	12,2
Phosphatidyl sérine	2	3,3	3	3,5
Phosphatidyl inositol	2,1	3,5	2,2	2,6
Phosphatidyl éthanolamine	11,2	18,5	6,5	7,7
Phosphatidyl glycérol	1,5	2,5	1,5	1,8

Tableau I: Comparaison de la composition et du taux de participation des lipides dans V490 et Vg520. Les lipides totaux sont exprimés en pourcentage en tenant compte de la masse de V490 et Vg520. Les constituants lipidiques sont exprimés en pourcentage par rapport aux lipides totaux. L'estimation de la participation des lipides dans les molécules natives a été calculée en tenant compte d'une masse moléculaire de 490 kDa pour la vitelline et de 520 kDa pour la vitellogénine. Ces valeurs correspondent à la moyenne de trois déterminations.

phosphatidyl choline et de la phosphatidyl éthanolamine, mais on trouve aussi de la phosphatidyl sérine, du phosphatidyl inositol, du phosphatidyl glycérol et de la sphingomyéline (Tableau I). Toutefois la teneur de ces différents composants lipidiques, exprimée en pourcentage de la masse, varie significativement au niveau de ces deux lipoprotéines. Etant donné que Vg520 et V490 diffèrent à la fois par leur masse moléculaire et par le pourcentage des lipides totaux, l'expression des résultats en pourcentage ne permet pas de comparer et d'apprécier directement les variations des taux lipidiques au sein des deux lipoglycoprotéines. C'est pourquoi nous avons préféré exprimer la participation des différentes classes lipidiques en masse moléculaire native des deux macromolécules (Tableau I). Ce mode d'expression permet de comparer

directement la participation de chaque constituant au niveau de la vitelline et de la vitellogénine. Ainsi les glycérides, qui représentent environ 58 kDa de la masse moléculaire de Vg520 et 52 kDa de la masse moléculaire de V490, restent relativement stables. Par contre, les stérols et les phospholipides, qui participent respectivement pour 55,1 kDa et 52,1 kDa à la masse moléculaire de la vitellogénine, voient leur représentation baisser significativement au sein de la vitelline, puisque ceux-ci représentent respectivement 35,4 kDa et 30,4 kDa. Ainsi la perte des lipides n'affecte pas les différents compartiments dans les mêmes proportions, mais touche beaucoup plus les phospholipides et les stérols que les glycérides. De plus, pour les phospholipides, on peut constater que la phosphatidyl choline et la phosphatidyl éthanolamine, qui représentent respectivement 21,1 kDa et 18,5 kDa de la masse moléculaire de la vitellogénine, n'atteignent que 12,2 kDa et 7,7 kDa au niveau de la vitelline (fig. 12).

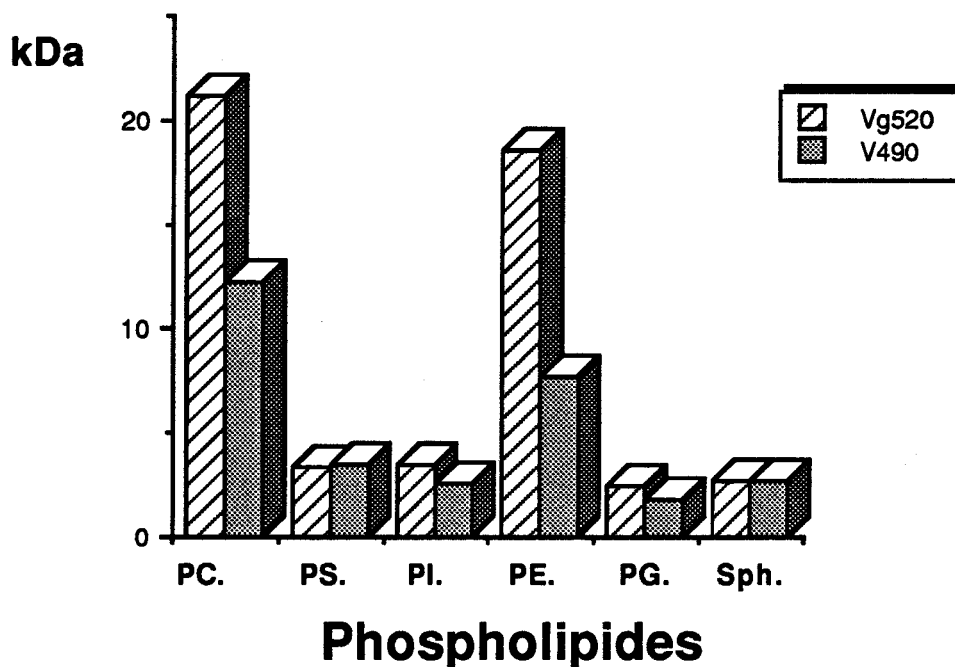


Figure 12: Comparatson de la participation des différents composants phospholipidiques (en kDa) au sein de la vitellogénine (Vg520) et de la vitelline (V490). PC. (phosphatidyl choline), PS. (phosphatidyl sérine), PI. (phosphatidyl inositol), PE. (phosphatidyl éthanolamine), PG. (phosphatidyl glycerol) et Sph. (sphingomyéline).

E - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

(En collaboration avec le Dr. P. Sautière, Institut de Recherche sur le Cancer, URA CNRS 409 , Lille)

Dans la composition en acides aminés de la vitellogénine et de la vitelline, nous ne constatons aucune différence significative (Tableau II).

Acides aminés	<i>Theromyzon tessulatum</i>		<i>Perinereis cultrifera</i>	<i>Nereis virens</i>	<i>Locusta migratoria</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	V490	Vg520	vitelline	vitelline	vitellogénine	vitellogénine
Asx	9,8	10,4	7,7	7,3	10,6	8,2
Thr	6,8	6,5	8,3	6,7	4,9	6,2
Ser	7,9	7,8	5	5,2	8,5	7,4
Glx	10,4	11	10,2	11,2	12,7	17,1
Pro	5,7	5,9	7,6	8,3	5,6	4
Gly	5,6	5,4	5,2	4,5	5,6	2,8
Ala	5,2	4,5	9	9,9	7,8	4,8
Val	8,4	8,7	8,6	7,3	7	7,3
Met	1,3	1,3	2,5	0,1	1,4	2,1
Ile	6,2	6,3	8,1	6,8	4,9	5,5
Leu	10,9	11	9,4	11,6	10,6	8,8
Tyr	4,2	3,7	3	2	4,9	3,3
Phe	4,6	3,8	3,2	3,3	2,8	4,4
His	2,4	2,6	1,8	1,8	2,1	2,1
Lys	6,5	6,7	5,4	5,9	5,6	7,7
Arg	4,2	4,5	4,6	4	4,9	6,2
Cys	nd	nd	0,4	0,4	nd	1,3
Trp	nd	nd	nd	4,6	nd	0,9

Tableau II: Composition en acides aminés de V490 et Vg520 et de la vitelline des annélides polychètes *P. cultrifera* (Baert *et al.*, 1984), *N. virens* (Fischer et Schmitz, 1981), de la vitellogénine de l'insecte *L. migratoria* (Harnish et White, 1982b) et du nématode *C. elegans* (Spieth *et al.*, 1985). Les résultats sont exprimés en moles %.

L'acide aspartique/asparagine, l'acide glutamique/glutamine, la leucine et la valine constituent les acides aminés majeurs. Peu de différences sont observées quand on compare la composition en acides aminés de la vitelline de *T. tessulatum* à celle de vitellines d'autres invertébrés (Tableau II).

F - COMPOSITION EN SUCRES

(En collaboration avec le Pr. B. Fournet, UMA 111 Université de Lille I)

La partie glycanique associée à la vitellogénine représente 1,9% du poids de la molécule, alors qu'au niveau de la vitelline, les sucres représentent environ 2,4%. Du point de vue quantitatif, il y a une nette prédominance du mannose (32,6 moles/mole de vitellogénine et 37,8 moles/mole de vitelline). Toutefois, en plus du mannose, on trouve aussi du glucose, de la glucosamine et de la galactosamine (Tableau III), ainsi que quelques sucres sous forme de trace, comme le fucose, le xylose et le galactose. Excepté la galactosamine, tous les autres résidus se trouvent dans des proportions comparables au niveau de Vg520 et V490.

Oses	Vitellogénine		Vitelline	
	µg/100 µg	moles/mole	µg/100 µg	moles/mole
Man	1,39	32,6	1,13	37,8
Glc	0,42	10,1	0,35	11,4
GlcNac	0,31	6,4	0,27	6,9
NalNac	0,32	3,5	0,15	7,1

Tableau III: Composition en monosaccharides de la vitellogénine et de la vitelline déterminée par chromatographie en phase gazeuse. L'expression des résultats est en mole d'oses/mole de vitelline et vitellogénine et en tenant compte d'une masse moléculaire de 490 kDa pour la vitelline et de 520 kDa pour la vitellogénine.

IV - DISCUSSION

Cette étude a permis de montrer que la vitelline de *T. tessulatum* est au moins pour partie d'origine extraovocytaire. En effet, le précurseur de la vitelline ou vitellogénine a été détecté immunologiquement au niveau du liquide cœlomique. Toutefois si la vitelline a été purifiée par précipitation à faible force ionique, il a fallu mettre au point une méthode faisant intervenir une chromatographie de gel filtration et une chromatographie sur échangeur d'anions pour purifier la vitellogénine. La vitelline et la vitellogénine ont été identifiées comme des lipoglycoprotéines de masse moléculaire élevée, composées d'un même polypeptide de 165 kDa (YP165). Néanmoins les deux macromolécules diffèrent par leur solubilité et leur masse moléculaire native estimée à 520 kDa pour la vitellogénine et 490 kDa pour la vitelline. Ainsi il apparaît que des modifications ont eu lieu pendant ou après l'incorporation de la vitellogénine dans l'ovaire. En ce qui concerne la partie protéique, la composition sous-unitaire ainsi que la composition en acides aminés se sont révélées analogues. De même, de grandes similitudes ont été observées dans la composition glucidique des deux macromolécules. Ces résultats laissent donc penser que la partie glycoprotéique de la vitellogénine ne subit pas de modifications significatives après son incorporation dans l'ovaire. Par contre, des différences ont été observées dans la partie lipidique. En effet, les lipides représentent 31,8% de la masse de la vitellogénine et seulement 24% de la vitelline. Compte tenu de la masse moléculaire de la vitellogénine (520 kDa) et de la vitelline (490 kDa), la participation des lipides au niveau de ces deux molécules est calculée à 165 kDa pour la vitellogénine et à 118 kDa pour la vitelline. Ce résultat permet de conclure à l'existence d'une perte de lipides par la vitellogénine au cours de sa transformation en vitelline. Nos résultats ont également clairement montré que les pertes ne touchent pas les différents compartiments lipidiques dans les mêmes proportions mais que les plus affectés sont les stérols et les phospholipides. De plus, à l'intérieur du compartiment phospholipidique, les pertes atteignent surtout la phosphatidyl choline et la phosphatidyl éthanolamine. Par conséquent, et tenant compte de la stabilité de la partie glycoprotéique, on peut conclure que la perte des lipides, qui touche la vitellogénine lors de son incorporation dans l'ovaire, est responsable de la différence de masse moléculaire native entre la vitellogénine et la vitelline. Ces pertes lipidiques sont probablement aussi responsables de la différence de solubilité et de point isoélectrique de Vg520 (7,6) et de V490 (7,4). Des

différences de points isoélectriques et de solubilité entre vitellogénine et vitelline ont déjà été signalées chez certains insectes (Engelmann *et al.*, 1976 ; Engelmann, 1979 ; Pereira et De Bianchi, 1983 ; Jensen *et al.*, 1981). Malheureusement, excepté chez *Philosamia cynthia* (Chino *et al.*, 1977) et *Locusta migratoria* (Chinzei *et al.*, 1981) où la quantité des lipides associés à la vitellogénine a été trouvée légèrement supérieure à celle des lipides associés à la vitelline, les études ont porté essentiellement sur la partie protéique et par conséquent ont négligé l'analyse des constituants lipidiques. De même, chez les néréidiens (Baert, 1988 ; Bonnier, 1990), une perte de lipide semble également jouer un rôle dans la différence de la masse moléculaire observée entre vitellogénine et vitelline. En conséquence, une perte de lipide par la vitellogénine au niveau de l'ovaire pourrait être un phénomène assez général chez les invertébrés. Quoiqu'il en soit, ce phénomène a été mis en évidence chez *T. tessulatum* et la question du rôle de ces lipides est posée. Il faut signaler que les lipides perdus par la vitellogénine sont de même nature que ceux qui interviennent dans la composition des membranes, c'est à dire des stérols et des phospholipides. De ce fait on peut penser que Vg520, par son apport de lipides vers l'ovaire, pourrait participer à la formation de membranes au niveau de l'ovocyte en fournissant les constituants nécessaires. Il faut rappeler que l'ovocyte à la fin de sa croissance atteint un diamètre supérieur à 700 μm (Wilkialis et Davies, 1980b). Ainsi dans le cadre de cette hypothèse, la vitellogénine jouerait un double rôle : tout d'abord, comme molécule de réserve, ensuite comme transporteur de lipides. Sur ce point, il faut signaler que des analogies ont récemment été décrites entre les vitellogénines d'un invertébré *Caenorhabditis elegans* et d'un vertébré *Xenopus laevis*, avec l'ApoB-100, une protéine transporteur de lipides chez les mammifères (Baker, 1988), ce qui suggère la complexité de la fonction de la vitellogénine, en plus de son rôle de réserve protéique pour le développement de l'embryon.

Tenant compte des masses moléculaires de Vg520 et V490 et de la participation des lipides au sein de ces deux macromolécules, on peut estimer que la partie glycoprotéique représente 355 kDa pour la vitellogénine (520 kDa - 165 kDa = 355 kDa) et 372 kDa pour la vitelline (490 kDa - 118 kDa = 372 kDa) ce qui laisse penser que deux exemplaires du polypeptide YP165 (2 x 165 kDa = 330 kDa) composent la vitellogénine et la vitelline native. La protéine majeure du vitellus chez *T. tessulatum* serait donc une protéine dimérique au même titre que la plupart des vitellines décrites jusqu'à présent. D'autres éléments permettent également de comparer la vitellogénine

et la vitelline de *T. tessulatum* aux molécules de réserves provenant d'autres origines. En effet, le taux des lipides dans Vg520 (31,8% en poids) est proche de celui des lipovitellines des crustacés (30%) (Wallace *et al.*, 1967). Par contre, ce taux est beaucoup plus important que celui qu'on trouve chez les tiques (8%) (Chinzei *et al.*, 1983), et chez les insectes (7-16%) (Engelmann, 1979 ; Postlethwait et Giorgi, 1985). La teneur en sucres (environ 2% de la masse de la vitelline et de la vitellogénine chez *T. tessulatum*) ne s'éloigne pas de celles trouvées chez les vitellines des insectes (1 à 4%) (Engelmann, 1979) ou chez la vitelline du néréidien *Perinereis cultrifera* (4,8%) (Baert *et al.*, 1984). Ces sucres sont aussi largement constitués de mannose et de glucosamine (Nordin *et al.*, 1984 ; Baert *et al.*, 1984). De même, la composition des acides aminés de la vitelline de *T. tessulatum*, ou de son précurseur, ne montre pas de différences significatives comparées aux vitellines des autres invertébrés. Néanmoins, il faut noter une certaine particularité dans la structure polypeptidique de la vitelline de *T. tessulatum*. En effet, si la vitelline de la sangsue est composée d'un seul type de polypeptide de 165 kDa, la plupart des vitellines, aussi bien d'invertébrés que de vertébrés, sont composées de plusieurs polypeptides de masses moléculaires différentes (Byrne *et al.*, 1989 ; Harnish et White, 1982a). Généralement chez la plupart des insectes, la vitellogénine est synthétisée sous forme d'un polypeptide de masse moléculaire élevée (160 kDa à 220 kDa) qui subit des clivages, soit au niveau de la cellule productrice, soit pendant le transport vers l'ovaire pour donner naissance à la vitellogénine circulante (Postlethwait et Giorgi, 1985). Une situation de même type est également rencontrée chez le nématode *C. elegans* (Sharrock, 1984). A l'opposé, chez les néréidiens *P. cultrifera* et *N. diversicolor* (Baert et Slomianny, 1987 ; Bonnier, 1990) et chez les vertébrés (Wallace, 1985), le clivage de la sous-unité de la vitellogénine se fait spécifiquement au niveau de l'ovaire. Une absence de protéolyse de la sous-unité de la vitellogénine a été signalée chez quelques insectes, comme la drosophile, mais dans ce cas les polypeptides sont de taille plus petite (50 kDa) (Postlethwait et Giorgi, 1985). Ainsi, par sa taille (165 kDa), le polypeptide qui compose la vitellogénine chez la sangsue est proche de ceux retrouvés chez la plupart des invertébrés (160-220 kDa) ; mais, comme chez la drosophile, ce polypeptide ne semble pas subir de clivage ce qui fait de la sangsue un cas particulier.

V - CONCLUSION

Cette étude visant à identifier, purifier et caractériser la vitelline et la vitellogénine de *T. tessulatum*, permet de dégager un certain nombre de points importants. La vitelline, composant majeur du vitellus, est un complexe lipoglycoprotéique de 490 kDa. Le précurseur de la vitelline ou vitellogénine qui se trouve au niveau du liquide cœlomique est une lipoglycoprotéine de 520 kDa. Bien que de masses moléculaires différentes, les deux macromolécules se composent d'un seul et même polypeptide, YP165, qui semble exister en deux exemplaires au sein des molécules natives. La partie glycoprotéique de la vitellogénine ne semble pas subir de transformation suite à son incorporation dans l'ovaire. Par contre, si les mêmes constituants interviennent dans la composition lipidique des deux molécules, leur taux est différent, ce qui reflète une perte de lipides lors de la transformation de la vitellogénine en vitelline. Cette différence dans la composition lipidique est vraisemblablement à l'origine de toutes les caractéristiques qui différencient la vitellogénine de la vitelline, comme la masse moléculaire native, le point isoélectrique et la solubilité.

AUTRE MOLECULE IMPLIQUEE DANS LE PROCESSUS DE VITELLOGENESE

Les analyses électrophorétiques des homogénats d'ovaires ont montré la présence d'un polypeptide majeur, YP165, composant sous-unitaire de V490. Toutefois, un produit de faible masse moléculaire (environ 13 kDa), présent en quantité importante, est également observé dans les ovaires (fig. 13 A). Celui-ci pouvant correspondre à une molécule de réserve, nous avons recherché sa présence dans les globules vitellins.

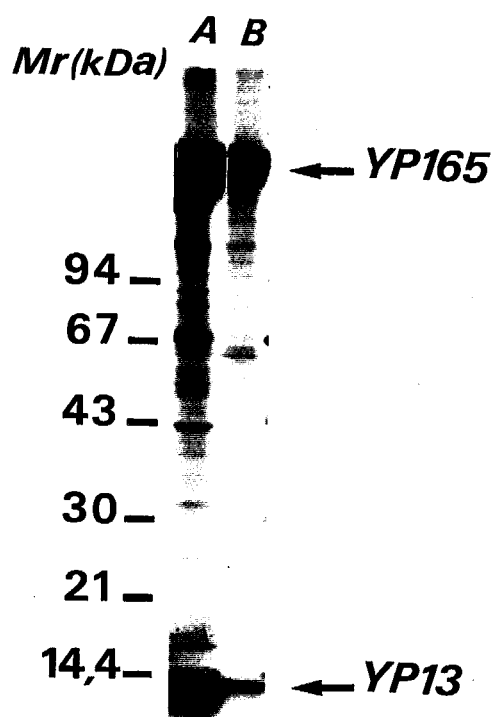


Figure 13 : Identification d'une protéine vitelline de faible masse moléculaire. Analyse en SDS-PAGGE des protéines de l'homogénat d'ovaires (A) et des globules vitellins (B).

I - MISE EN EVIDENCE ET PURIFICATION

A -ETUDE AU NIVEAU DES OVAIRES

1 : IDENTIFICATION

L'isolement des globules vitellins a été effectué par fractionnement cellulaire dans un gradient discontinu de saccharose (voir chapitre matériel et méthodes), et leur pureté a été vérifiée en microscopie électronique (fig. 14 a).

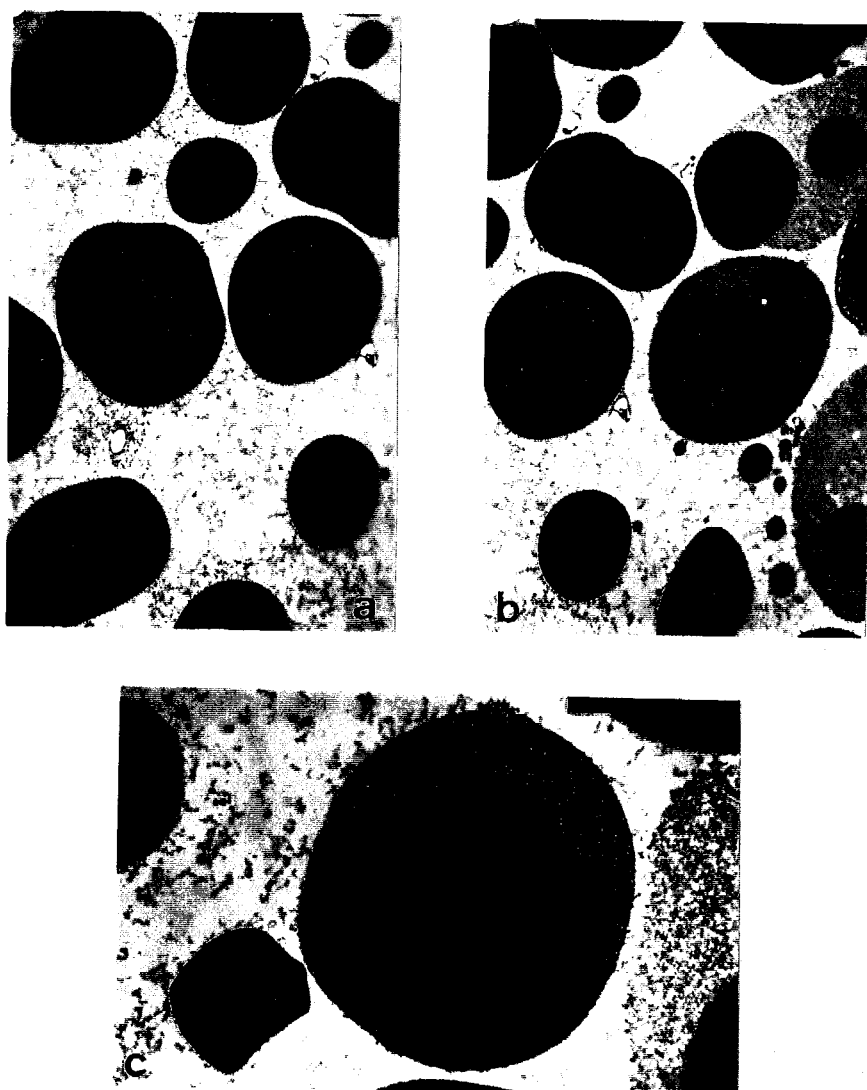


Figure 14 : Contrôle de pureté des globules vitellins isolés par fractionnement cellulaire. Analyse en microscopie électronique.

a - Aspect le plus fréquemment rencontré. Remarquer la présence de matériel fibrillaire dans l'espace interglobulaire (X 3600).

b et c - Globules vitellins hétérogènes. Le matériel fibrillaire montre une nette tendance à la dispersion dans nos conditions expérimentales (b X 3600, c X 7200).

L'examen des globules vitellins met en évidence l'hétérogénéité de structure de certains d'entre eux. Ils sont alors constitués d'un centre dense entouré d'un matériel d'aspect fibrillaire (fig. 14 b, c) qui a tendance à se disperser dans l'espace interglobulaire. Les protéines présentes au sein de cette fraction ont été analysées en SDS-PAGE. Le résultat de cette analyse montre, en plus de YP165, la présence d'un polypeptide de 13 kDa (fig. 13 B). Celui-ci, dénommé YP13, peut donc être défini comme une protéine de réserve stockée dans les globules vitellins et, de ce fait, considérée comme une protéine vitelline.

2 : PURIFICATION DE YP13

La figure 15 présente de manière schématique la stratégie que nous avons adoptée pour isoler YP13. Dans un premier temps, nous avons récupéré la fraction soluble ovocytaire (FSO) issue de la purification de V490. Cette fraction, comme le montre la figure 16 A, est constituée essentiellement de YP13, mais reste contaminée par YP165 et d'autres polypeptides. FSO a ensuite été chromatographiée sur une colonne de concanavale-A-Sépharose, ce qui permet d'éliminer le composant sous-unitaire de V490 encore présent, les

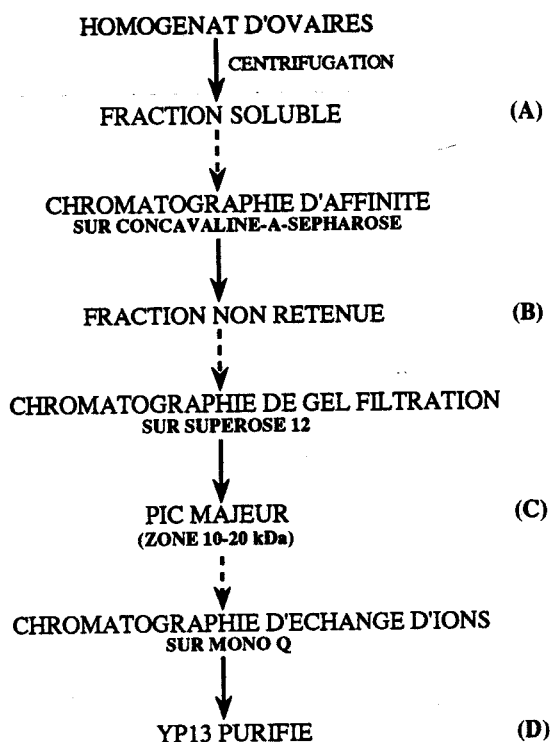


Figure 15 : Représentation schématique de la stratégie adoptée pour la purification de YP13.

autres protéines ne réagissant pas avec ce support (fig. 16 B). L'effluent contenant YP13 a ensuite été soumis à une chromatographie de gel filtration (fig. 17 A). L'analyse en SDS-PAGGE des protéines contenues dans le pic majeur ainsi obtenu montre que seuls YP13 et un polypeptide légèrement plus lourd sont présents (fig. 16 C). Ce dernier polypeptide a pu être éliminé à l'issue d'une chromatographie d'échange d'anions (fig. 17 B). Dans les conditions utilisées, un pic majeur est élué à une concentration en NaCl voisine de 75mM. Comme le montre la figure 16 D, une seule bande protéique est observée lorsque le contenu de cette fraction majeure est analysé en SDS-PAGGE.

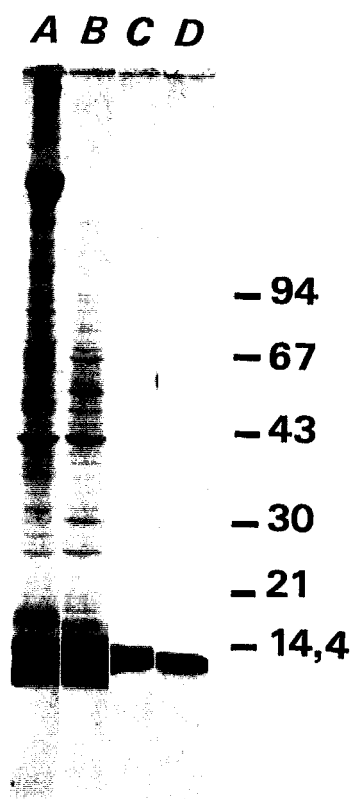


Figure 16 : Analyse en SDS-PAGGE des fractions obtenues au cours de la purification de YP13.

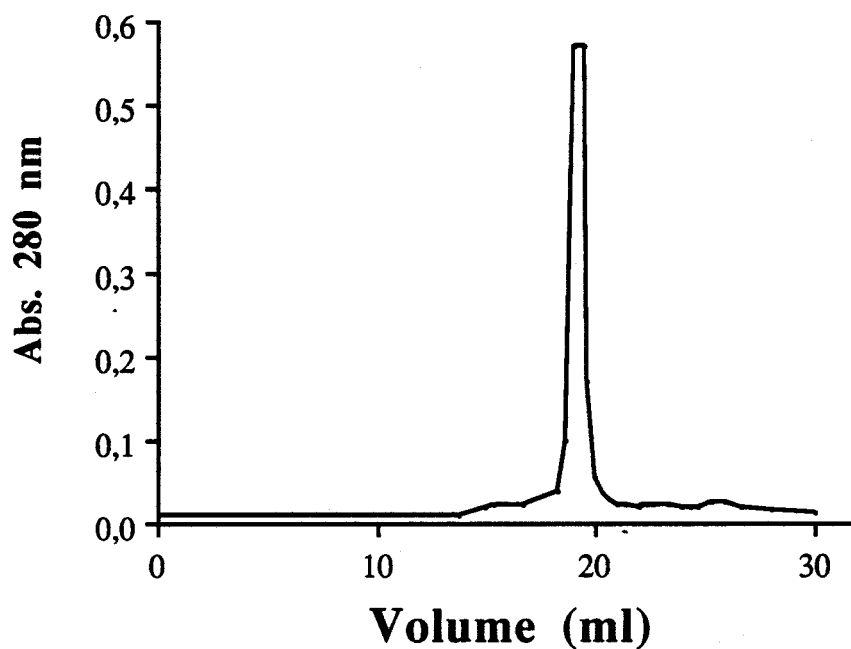
A : Fraction soluble ovocytaire.

B : Fraction non retenue sur la colonne de concanavaline-A-Sépharose.

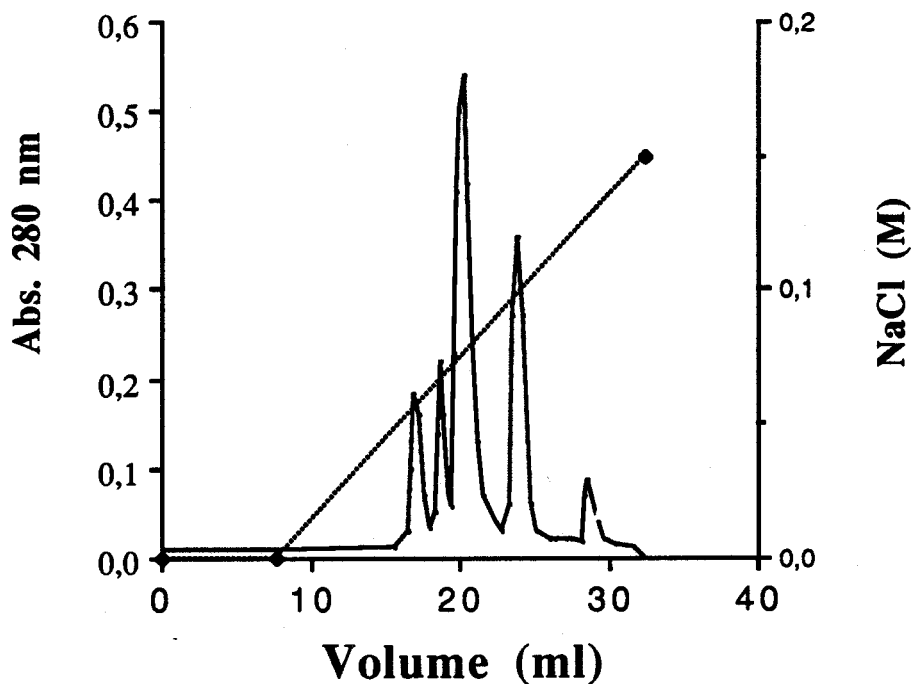
C : Fraction correspondant au pic majeur de la gel filtration.

D : YP 13 purifié : pic majeur de la chromatographie d'échange d'anions MonoQ.

Figure 17 : Purification de YP13.



A : Profil d'élution de la fraction non retenue sur concanavale-A-Sépharose fractionnée sur une colonne de gel filtration Superose 12.

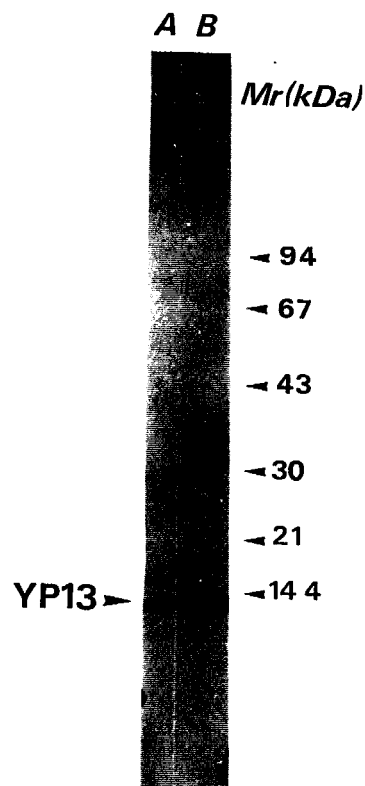


B : Profil d'élution de la fraction protéique majeure de la gel filtration sur une colonne d'échange d'anions MonoQ.

3 : ANTICORPS ANTI-YP13

Nous avons immunisé un lapin contre le polypeptide YP13 purifié. La présence des immunoglobulines anti-YP13, ainsi que leur spécificité ont été testées sur les protéines de l'homogénat d'ovaires séparées par électrophorèse et transférées sur une feuille d'Immobilon-P. L'immunorévélation de ce transfert montre que seul YP13 est reconnu (fig. 18 A).

Figure 18 : Spécificité du sérum anti-YP13 et identification d'un précurseur de YP13 dans le liquide cœlomique. Les protéines de l'ovaire (A) et du liquide cœlomique (B) ont été séparées en SDS-PAGE et transférées sur une feuille d'Immobilon-P. L'immunodétection a été effectuée par le sérum polyclonal anti-YP13.



B - ETUDE AU NIVEAU DU LIQUIDE CŒLOMIQUE

1 : IDENTIFICATION

Les analyses électrophorétiques des protéines du liquide cœlomique ont montré la présence d'un polypeptide majeur de 13 kDa, similaire à YP13 (fig. 19 A). Afin de pouvoir définir ce polypeptide comme le précurseur éventuel de YP13, nous avons testé la réactivité des anticorps anti-YP13 envers les protéines du liquide cœlomique et de l'homogénat d'ovaires fractionnées en SDS-PAGE et transférées sur une feuille d'Immobilon-P. Après l'application du sérum anti-YP13, l'immunorévélation montre que les anticorps reconnaissent à la fois YP13 dans les ovaires et un polypeptide de 13 kDa

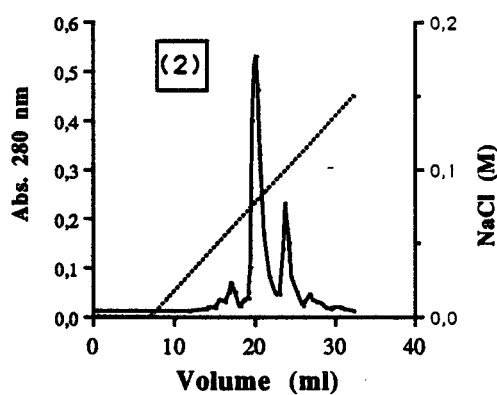
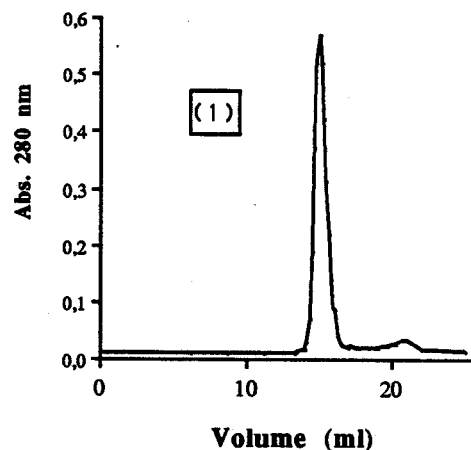
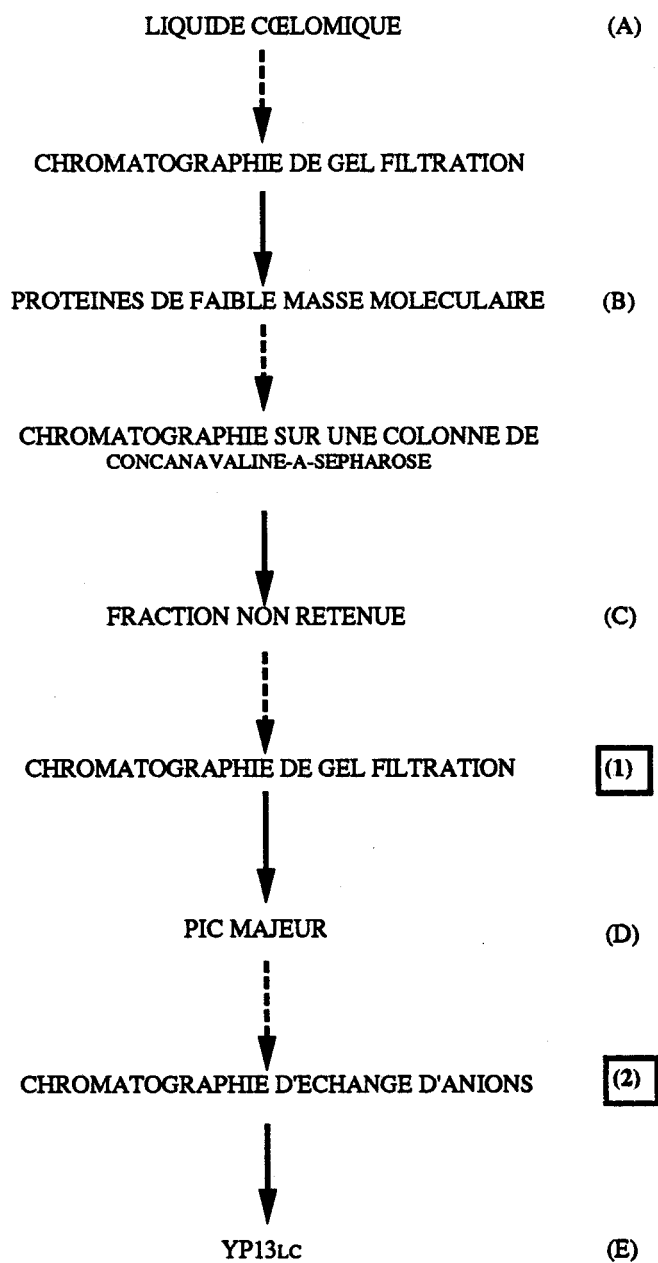


Figure 20 : Représentation schématique de la stratégie adoptée pour la purification de YP13_{LC} et profils d'élutions des chromatographies de gel filtration et d'échange d'anions.

présent dans le liquide cœlomique (fig. 18 B). Ainsi, cette protéine du liquide cœlomique, qui possède une masse moléculaire et des épitopes similaires à YP13, peut être considérée comme le précurseur de YP13, donc protéine de type vitellogénine. Pour distinguer la forme ovarienne de celle du liquide cœlomique, nous les avons appelées respectivement YP13_O et YP13_{LC}.

2 : PURIFICATION

La première étape de purification correspond à la chromatographie de gel filtration utilisée pour la purification de Vg520 (voir chapitre II B, page 16). Comme le montre l'analyse électrophorétique présentée dans la figure 19 B, YP13_{LC} est retrouvé dans le deuxième pic majeur du chromatogramme. Puis, comme le montre la figure 20, la purification a été achevée en utilisant les mêmes étapes chromatographiques qui ont servi à isoler YP13_O (fig. 19 C-D-E).

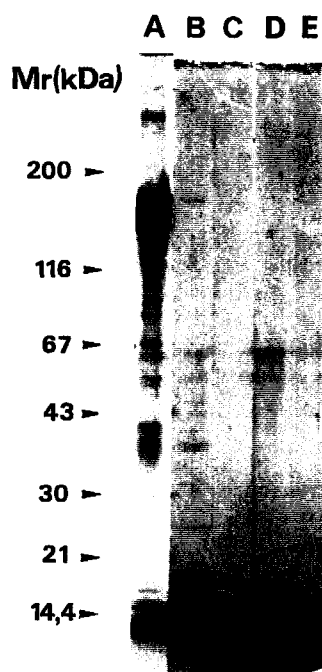


Figure 19 : Analyse en SDS-PAGGE des fraction obtenues au cours de la purification de YP13_{LC}.

A : Protéines totales du liquide cœlomique.

B : Protéines de faible masse moléculaire obtenues après la gel filtration du liquide cœlomique.

C : Fraction non retenue sur la concanavaline-A-Sépharose.

D : Pic majeur de la seconde chromatographie de gel filtration.

E : Pic majeur de la chromatographie d'échange d'anions MonoQ.

II - CARACTERISATION

A - MASSE MOLECULAIRE ET POINT ISOELECTRIQUE

1 : MASSE MOLECULAIRE

Dans le système SDS-PAGGE, la masse moléculaire de YP13 a été déterminée à environ 13 kDa. Pour la détermination de la masse moléculaire native, on a utilisé la chromatographie de gel filtration. Un seul pic est obtenu après le passage des fractions purifiées sur une colonne Superdex G75 (non montré). La masse moléculaire native de YP13_O et YP13_{LC} a été estimée à environ 13 kDa.

2 : POINT ISOELECTRIQUE

L'analyse par isoélectrofocalisation des fractions purifiées montre la présence de 2 isoformes au sein de chaque fraction (fig. 21). Le point isoélectrique de ces isoformes a été déterminé approximativement à 6,6 et à 6,8.

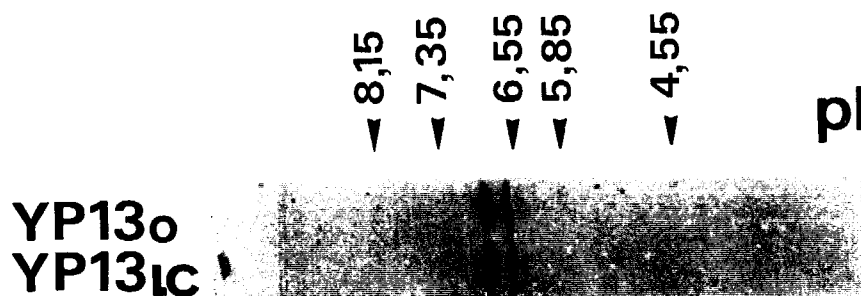


Figure 21 : Isoélectrofocalisation de YP13_O et YP13_{LC}. Gel à 5 % d'acrylamide dans un gradient de pH 3-9 (Phast gel, Pharmacia).

B - COMPOSITION CHIMIQUE

1 : LIPIDES ET SUCRES

YP13_O et YP13_{LC} ne se colorent pas au réactif de Schiff. De plus, ces deux protéines ne se fixent pas sur la concanavaline-A. Ces résultats tendent donc à montrer que ces deux molécules ne portent pas de glycannes. De même, ces polypeptides ne semblent pas contenir de lipides, en effet YP13_O et YP13_{LC} ne se colorent pas au noir Soudan.

2 : ACIDES AMINES ET SEQUENCE N-TERMINALE

(En collaboration avec Dr. P. Sautiere, Institut de Recherche sur le Cancer, URA CNRS 409, Lille)

Le résultat de la composition en acides aminés est donné dans le tableau IV. Les deux polypeptides sont riches en lysine, acide aspartique/asparagine, acide glutamique/glutamine, phénylalanine et en histidine. Par contre, ils sont pauvres en cystéine, méthionine et arginine. Aucune différence significative n'est observée entre YP13_O et YP13_{LC}, par contre d'importantes variations sont observées quand on compare la composition en acides aminés de YP13 à celle de la vitelline (V490) (Tableau IV).

L'utilisation d'un séquenceur automatique a permis de séquencer 33 acides aminés de l'extrémité NH₂-terminale de YP13_O (fig. 22). Cette séquence s'est révélée très proche de celle des hémérythrines et de la MP11, une métalloprotéine qui complexe les métaux lourds chez *N. diversicolor* (Nejmeddine *et al.*, 1988) et dont la séquence est proche des hémérythrines (Demuynck *et al.*, 1991). En effet, la séquence de YP13 possède respectivement une homologie de 67% et 52% avec la myohémérythrine et l'hémérythrine de *Themiste zostericola*, alors que l'homologie atteint 73% avec la MP11 (fig. 22).

Acides aminés	YP13O	YP13 LC moles %	V490
Asx	11,6	11,8	9,8
Thr	6,2	5,8	6,8
Ser	5	5,5	7,9
Glx	10,7	10,6	10,4
Pro	3,7	3,6	5,7
Gly	3,9	4,1	5,6
Ala	7,7	7	5,2
Cys/2	0,4	0,2	nd
Val	4,6	4,9	8,4
Met	1,4	1,6	1,3
Ile	4,2	4,2	6,2
Leu	6,5	6,5	10,9
Tyr	3,7	3,6	4,2
Phe	8,9	8,7	4,6
His	7	8,1	2,4
Lys	13,2	12,8	6,5
Arg	1,4	1,1	4,2
Trp	nd	nd	nd

Tableau IV: Composition en acides aminés de YP13O, YP13_{LC} et de V490. Ces résultats correspondent à la moyenne de trois déterminations.

1 10 20 30

1: - Y D I P E P F R W D E S F K V F Y E K L D E Q H K G L F D A I F D

2: G W E I P E P Y V W D E S F R V F Y E Q L D E E H K K I F K G I F C

3: G F P I P D P Y G W D P S F R T F Y S I I D D E H K T L F N G I F H

4: G F E I P E P Y K W D E S F Q V F Y E K L D E E H K Q I F N A I F

Figure 22 : Séquence NH₂-terminale de YP13 (1), de la myohémérythrine de *Themiste zostericola* (Klippenstein *et al.*, 1976) (2), de l'hémérythrine de *Themiste zostericola* (Ferrel et Kitto, 1971) (3), et de la MP II de *Nereis diversicolor* (Demuyne *et al.*, 1991) (4).

Les caractères gras correspondent aux acides aminés conservés au niveau des 4 molécules. Les caractères soulignés correspondent aux acides aminés de l'ovohémérythrine retrouvés au niveau d'autres protéines.

3 : METAUX ASSOCIES A YP13

Sachant que l'hémérythrine et la myohémérythrine sont des protéines respiratoires non héméniques, porteuses de molécules de fer, nous avons recherché la présence de ce métal et également d'hème au niveau de YP13_O et YP13_{LC}. Ainsi le spectre d'absorption d'une solution de YP13 purifié (fig. 23) est analogue à celui d'une hémérythrine (Nocek *et al.*, 1984 ; Zhang *et al.*, 1991). Sur le spectre on observe un large pic d'absorption dans la zone de 500 nm, zone d'absorption commune aux métalloprotéines à fer. Par contre, aucun pic n'a été observé dans la zone d'absorption de l'hème (410 nm).

Par ailleurs, l'ajout d'un agent chélateur comme l'EDTA ne change pas le spectre d'absorption. Par contre, le dithionite de sodium, un puissant agent réducteur, fait disparaître la zone d'absorption à 500 nm (fig. 23). Ces résultats permettent de conclure que le métal est fortement lié à la partie protéique et se trouve sous forme oxydée (Fe^{3+}). Toutefois, l'élimination de la zone d'absorption de 500 nm peut être le résultat de la réduction de l'oxygène dans le cas où celui-ci est fixé par YP13. Cependant un essai pour éliminer l'oxygène par action de l'azote n'a permis de changer ni le spectre ni la couleur de l'échantillon (couleur mauve), ce qui suggère que YP13 ne transporte pas d'oxygène et que nous sommes en présence d'une protéine non respiratoire.

Pour confirmer ces résultats suggérant la présence de fer au niveau de YP13, nous avons effectué le dosage de ce métal sur une préparation de YP13_O et YP13_{LC} par la technique de spectrométrie d'absorption atomique de flamme. Ce dosage a confirmé la présence de fer au niveau des deux polypeptides. Ce métal a été estimé à 0,5 mole de fer par mole de YP13.

Après avoir caractérisé YP13_O et YP13_{LC}, on peut conclure qu'il s'agit d'une même molécule présente dans deux compartiments différents (coelome et ovaires). L'originalité de cette molécule proche des hémérythrines est sa présence comme substance de réserve dans l'ovaire, c'est pourquoi nous l'avons appelée ovohémérythrine (OvoHr).

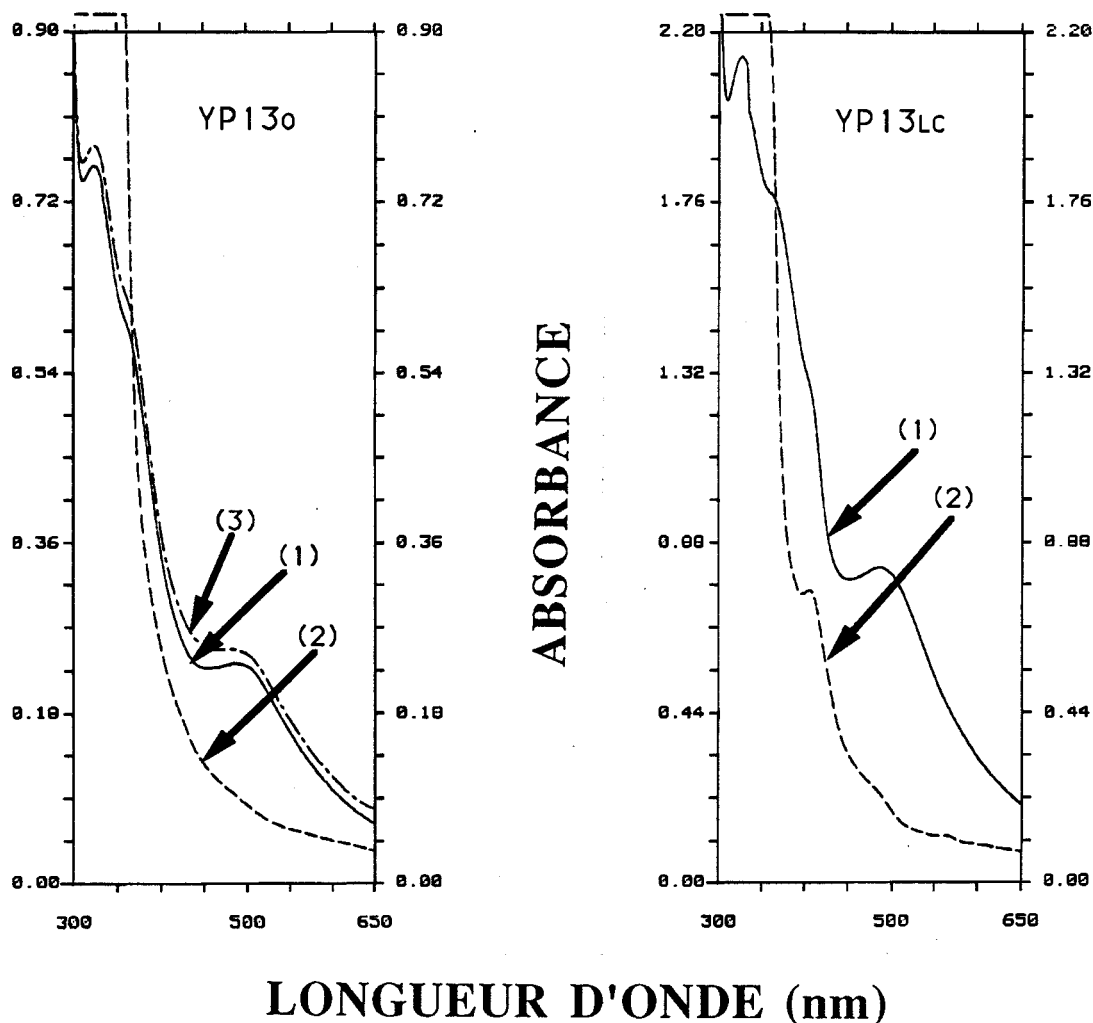


Figure 23 : Spectre d'absorption de YP13_O et de YP13_{LC} avant (1) et après l'addition de dithionite de sodium (2) et de l'EDTA (3).

III - DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude a permis d'identifier dans les ovaires et plus précisément dans les globules vitellins une protéine vitelline, (l'ovohémérythrine), de faible masse moléculaire et qui ne contient ni sucres ni lipides, mais porteuse de fer. Ce matériel semble constituer la part essentielle de la partie granulaire des globules vitellins. Dans nos conditions expérimentales une prolongation du

séjour des globules dans le tampon (PBS) entraîne une coloration mauve caractéristique de ce dernier, conséquence d'une solubilisation progressive de l'ovohémérythrine. Un précurseur de cette protéine de l'ovaire, possédant les mêmes caractéristiques, a été identifié dans le liquide coelomique. En se basant sur l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que l'ovohémérythrine est au moins en partie d'origine extraovocytaire et que celle-ci ne subit aucune transformation significative à la suite de son incorporation dans l'ovaire.

La détermination des 33 acides aminés du côté N-terminal de l'ovohémérythrine a révélé une grande homologie de cette molécule avec la myohémérythrine, l'hémérythrine et la MP II. Ainsi plusieurs acides aminés se trouvent conservés dans toutes ces métalloprotéines, parmi lesquels l'histidine en position 25 qui intervient dans la fixation du fer (Zhang *et al.*, 1991 ; Holmes *et al.*, 1991 ; Holmes et Stenkamp, 1991). Par ailleurs, la myohémérythrine et l'hémérythrine de plusieurs espèces, ainsi que la MP II, possèdent une glycine à l'extrémité N-terminale, alors qu'au niveau de l'ovohémérythrine on constate la délétion de cet acide aminé. De telles délétions ont été aussi constatées au niveau des sous-unités alpha et bêta de l'hémérythrine chez les brachiopodes *Lingula unguis* et *Lingula reevii* (Zhang et Kurtz, 1991 ; Yano *et al.*, 1991). Outre l'importante homologie dans la séquence N-terminale de l'ovohémérythrine, de la myohémérythrine, de l'hémérythrine et de la MP II, toutes ces molécules sont non héméniques et fixent assez fortement le fer. Celui-ci se trouve sous forme ferrique (Fe^{3+}) dans l'ovohémérythrine. La quantité de ce métal lié à l'ovohémérythrine apparaît plus faible (0,5 moles de fer par mole d'ovohémérythrine), que pour la MP II (1,33 moles de fer par mole de MP II, Demuynck *et al.*, 1991), et la myohémérythrine et l'hémérythrine qui lient chacune deux atomes de fer (Subramanian *et al.*, 1968 ; Liberatore *et al.*, 1974 ; Zhang *et al.*, 1991). Cependant, il faut rester prudent quant à l'interprétation de ce résultat, car une perte de fer par la molécule au cours des différentes étapes de purification, ou en cours de stockage, n'est pas exclue. Des dosages complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ce résultat.

La masse moléculaire de l'ovohémérythrine déterminée en SDS-PAGGE, comme la masse moléculaire native déterminée en chromatographie de gel filtration, ont été estimées à 13 kDa. Ceci permet de conclure que l'ovohémérythrine est une protéine monomérique. De même, la myohémérythrine et la MP II sont des protéines monomériques dont la masse moléculaire est proche de 13 kDa, tandis que l'hémérythrine est une protéine

octamérique (dont la sous-unité est de 13 kDa). Analysée en isoélectrophorèse l'ovohémérythrine révèle la présence de 2 isoformes, dont les points isoélectriques ont été déterminés à 6,6 et 6,8. Ces différences de charges peuvent être soit d'origine génétique et donc le résultat de différences dans la structure primaire des isoformes, soit d'origine post-traductionnelle. Les résultats disponibles actuellement ne permettent pas de privilégier l'une des deux hypothèses, d'autant que du côté N-terminal aucune variation dans la séquence n'a été détectée. Par ailleurs, l'élimination du fer, ainsi que l'application de la phosphatase alcaline sur une préparation de l'ovohémérythrine, n'ont eu aucun effet sur la présence des isoformes.

Enfin, on peut s'interroger sur la finalité de la présence d'une ovohémérythrine aussi bien dans le liquide coelomique que dans les ovaires. Tout d'abord, le rôle d'une vitelline est d'apporter les éléments nécessaires au développement de l'embryon, ainsi l'ovohémérythrine pourrait être dégradée et les acides aminés et le fer issus de cette dégradation utilisés par l'embryon. Toutefois, le fait que cette molécule soit une métalloprotéine lui permettrait de servir de fixateur et transporteur de fer, voire de jouer un rôle dans la détoxification de la sangsue. En effet, après la digestion de chaque repas de sang, la sangsue se trouve en présence d'une grande quantité de fer libre, que l'ovohémérythrine serait chargée de fixer. Ce rôle serait proche de celui de la MPII qui intervient dans la détoxification en fixant les métaux (Nejmeddine *et al.*, 1988 ; Demuynck *et al.*, 1991), en plus de ses propriétés bactériostatiques (Dhainaut *et al.*, 1989). Par contre, la myohémérythrine et l'hémérythrine sont des protéines respiratoires. Ainsi, il semble que ces molécules se sont adaptées au cours de l'évolution aux besoins de l'animal, et suivant les cas, elles auraient un rôle détoxifiant ou respiratoire.

C'est la première fois qu'on a mis en évidence chez un animal des métalloprotéines de type hémérythrine qui, par leur métabolisme, correspondent à un système vitelline-vitellogénine, mais ne possèdent aucune des caractéristiques chimiques définies pour une vitelline.

EVOLUTION DU TAUX DE VITELLOGENINE ET D'OVOHEMERYTHRINE AU COURS DU CYCLE VITAL

Le but de cette partie de notre travail est de préciser le stade auquel se fait l'initiation de la synthèse de Vg520 et de l'ovohémérythrine et de suivre leur évolution quantitative au cours du cycle de vie de la sangsue. Cette étude est un préalable pour envisager l'étude du contrôle endocrine de la vitellogenèse.

Pour cela, nous avons tout d'abord analysé les protéines du liquide coelomique à différents stades du développement par électrophorèse en présence de SDS, puis dosé les vitellogénines par ELISA.

I - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DU LIQUIDE CŒLOMIQUE

Nous avons analysé, en SDS-PAGGE, une quantité constante (environ 20 µg) de protéines du liquide coelomique des animaux de stades 2 et 3 (fig. 24). Au stade 2 on remarque l'absence de YP165, alors qu'après le 3ème repas, ce polypeptide est détecté en faible quantité (fig. 24, stade 3B₁). Par contre, l'ovohémérythrine est présente aussi bien au stade 2 qu'au début de stade 3 (fig. 24). Ces résultats permettent donc de suggérer que contrairement à l'ovohémérythrine qui est déjà décelable au stade 2, Vg520 est synthétisé seulement après le 3ème repas. Par ailleurs, par rapport aux autres protéines, la proportion de Vg520 augmente progressivement au cours des stades 3B et 3C, mais baisse au stade 3D, tandis que la proportion de l'ovohémérythrine ne semble pas varier de manière significative au cours du stade 3 (fig. 24). L'analyse des protéines du liquide coelomique en SDS-PAGGE a permis de suivre les variations de chaque polypeptide au cours du cycle vital. Cependant, elle ne permet pas de quantifier la participation de la vitellogénine et de l'ovohémérythrine à ce milieu. Disposant d'anticorps spécifiques anti-V490 et anti-ovohémérythrine, nous avons utilisé la technique ELISA pour doser les vitellogénines dans le liquide coelomique.

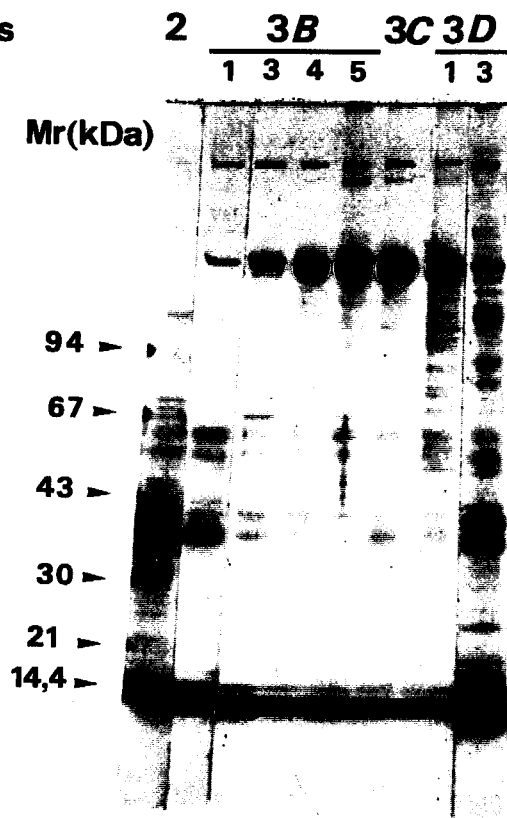


Figure 24 : Profil électrophorétique des protéines du liquide coelomique aux stades 2 et 3. Analyse en SDS-PAGE d'une quantité constante d'environ 20 μg des protéines du liquide coelomique des animaux de stades 2, 3B₁, 3B₃, 3B₄, 3B₅, 3C, 3D₁ et 3D₃.

II - DOSAGE DE LA VITELLOGENINE ET DE L'OVOHEMERYTHRINE PAR ELISA ("Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay")

A - Vg520

Les résultats obtenus au cours du stade 3 sont donnés dans le tableau V. On constate que la concentration de Vg520 au stade 3B₂₋₃ est de 7,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Cette concentration croît au cours du stade 3B pour atteindre au stade 3C

STADES	Vg520. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	OvoHr $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	N
3B ₂₋₃	7,9 $\pm$ 4,7	31,6 $\pm$ 6,4	17
3B ₄	23,9 $\pm$ 13,6	33 $\pm$ 9	14
3B ₅	33,2 $\pm$ 4,4	39,4 $\pm$ 14,4	13
3C	37,3 $\pm$ 10	35,1 $\pm$ 12,8	17
3D ₁₋₂	25,4 $\pm$ 13,6	23,2 $\pm$ 8	13
3D ₃	1 $\pm$ 0,7	5 $\pm$ 2	9

Tableau V : Dosage de Vg520 et OvoHr par la technique ELISA. La moyenne, donnée en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, est suivie de l'écart type.

N: Correspond au nombre de sangsues utilisées pour chaque dosage.

environ 37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Au stade 3D, la tendance se renverse et le taux de Vg520 baisse fortement pour atteindre seulement 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ au stade 3D₃. Nous avons également cherché à doser Vg520 dans le liquide coelomique des animaux de stade 2 et de début de stade 3. Toutefois, à ces stades le volume du liquide coelomique est très faible (quelques microlitres). De ce fait, avant le prélèvement du liquide coelomique nous avons injecté dans la cavité coelomique 50 à 100 μl du tampon Tris/HCl 20mM, pH 7,4 contenant du NaCl à 0,15M. Cette opération a permis de récupérer du liquide coelomique dilué. Le dosage de Vg520 dans ces échantillons s'est révélé négatif pour le stade 2. Par contre, la présence de Vg520 a été décelée après le 3ème repas (stades 3A-3B₁). Partant d'un liquide coelomique dont il est impossible de préciser la dilution, le résultat de ce dosage ne peut être exprimé dans les mêmes unités que précédemment. Nous avons donc exprimé la quantité de Vg520 par rapport aux protéines totales du liquide coelomique. Ainsi la vitellogénine (Vg520) constitue environ 4% du matériel protéique au stade 3A-3B₁, valeur faible par rapport à celle estimée au stade 3C, environ 40%.

B - OVOHEMERYTHRINE.

Pour le dosage de l'ovohémérytrine, nous avons utilisé les mêmes échantillons que ceux qui ont servi au dosage de Vg520. Au stade 3B₂₋₃, la concentration de l'ovohémérytrine est de 31,6 µg/µl (Tableau V). Cette concentration progresse légèrement pour atteindre 39,4 µg/µl au stade 3B₅ et comme pour Vg520, la concentration de l'ovohémérytrine décroît au cours du stade 3D. Les dosages de celle-ci au stade 2 se sont avérés positifs, de même que ceux effectués aux stades 3A-3B₁. Toutefois, comme dans le cas de Vg520 le résultat ne peut être exprimé en concentration. Ainsi l'ovohémérytrine constitue respectivement 87,7% et 71,8% des protéines totales du liquide cœlomique aux stades 2 et 3A-3B₁. En comparant les variations des taux des deux vitellogénines, il ressort tout d'abord que Vg520 n'est pas présent dans le liquide cœlomique des animaux de stade 2, tandis que l'ovohémérytrine constitue l'essentiel du matériel protéique à ce stade. Après le 3ème repas, Vg520 commence à apparaître dans le liquide cœlomique et voit son taux progresser fortement au cours des stades 3B et 3C; par contre, la concentration de l'ovohémérytrine qui est importante après le dernier repas (31,6 µg/µl) ne progresse que très peu pour atteindre des valeurs de 35 à 40 µg/µl au stade 3C, soit très proches de celles déterminées pour Vg520. En ce qui concerne les variations du taux des deux vitellogénines, le seul point d'évolution synchrone correspond à la forte baisse de celles-ci au cours du stade 3D, c'est à dire au cours de l'accumulation du vitellus dans les ovocytes.

III - DOSAGE DES PROTEINES TOTALES DU LIQUIDE CŒLOMIQUE ET DES OVAIRES

Le dosage des protéines totales du liquide cœlomique doit permettre dans un premier temps d'apprécier le taux de participation des vitellogénines au sein des protéines du liquide cœlomique. Dans un deuxième temps, après la mesure du volume du liquide cœlomique, ce dosage permettra de quantifier les protéines totales du liquide cœlomique ainsi que les vitellogénines. Et enfin, connaissant la quantité totale de protéines dans le liquide cœlomique, on pourra la comparer directement à celle des ovaires.

A - LIQUIDE CÉLOMIQUE

1 : CONCENTRATION DES PROTEINES DANS LE LIQUIDE CÉLOMIQUE

Après le prélèvement du liquide célomique, les protéines ont été dosées et comme le montre la figure 25 la quantité moyenne des protéines présentes au stade 3B₂₋₃ est d'environ 55 µg/µl. Cette concentration augmente progressivement pour atteindre un maximum au stade 3C, soit environ 86 µg/µl, puis elle décroît tout au long du stade 3D, pour atteindre 12,7 µg/µl. Comme le montrent ces résultats, les vitellogénines qui constituent 50 à 90% des protéines totales du liquide célomique (fig. 25) sont donc les constituants protéiques majeurs de ce milieu.

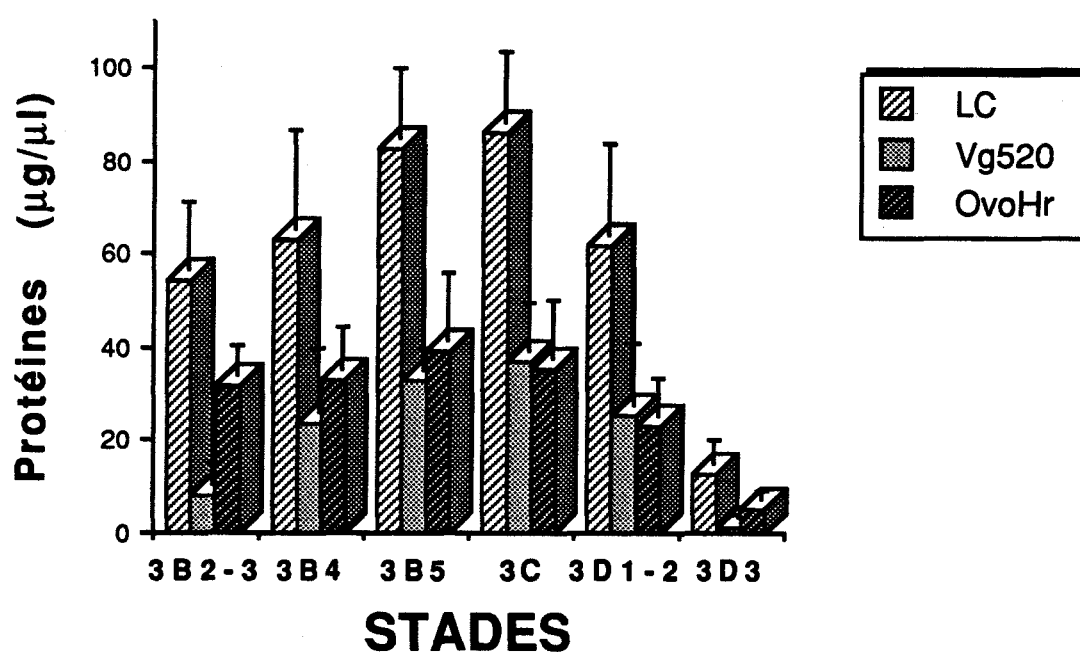


Figure 25 : Dosage des protéines totales du liquide célomique (LC) par la technique de Bradford (1976). Vg520 et l'ovohémérythrine sont quantifiées par la technique ELISA. Les résultats sont exprimés en µg/µl.

2 : VOLUME DU LIQUIDE CŒLOMIQUE

Dans le but d'estimer la quantité des protéines dans le liquide cœlomique de chaque sangsue et de préciser si la baisse de la concentration des protéines, observée au niveau du liquide cœlomique au cours du stade 3D, est liée à une augmentation du volume de ce compartiment ou à une incorporation des vitellogénines dans les ovaires, nous avons cherché à estimer le volume total du liquide cœlomique des différents stades étudiés. Pour réaliser cette étude, nous avons injecté une quantité fixe d'un colorant, le bleu Evans, dans la cavité cœlomique des animaux de stades 3B₅, 3C et 3D. Connaissant la quantité du colorant injecté, le volume total du liquide cœlomique a été déterminé à partir de la valeur de dilution du bleu Evans (voir chapitre matériel et méthodes). Comme le montre la figure 26, la part du liquide cœlomique dans le poids de

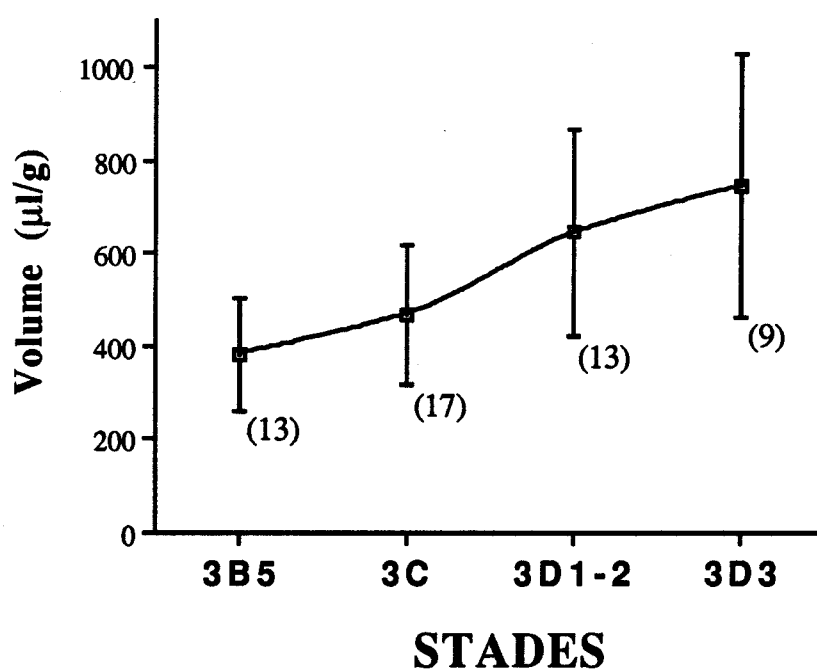


Figure 26 : Evolution du volume du liquide cœlomique en fonction des stades. Arbitrairement la masse de chaque sangsue est ramenée à 1g et le volume cœlomique corrigé en conséquence. La masse réelle des sangsues se situe entre 234 mg et 704 mg. (En dessous de chaque écart-type est indiqué le nombre d'animaux ayant servi aux déterminations).

l'animal croît au cours des stades 3B₅-3D. La forte baisse de la concentration en protéines observée au stade 3D (passage de 86 µg/µl à 12,7 µg/µl) ne peut cependant être uniquement attribuée à l'augmentation du volume du liquide cœlomique qui n'est que de 20 à 30%. Par ailleurs, la connaissance du volume du liquide cœlomique nous a permis de quantifier les protéines totales, la Vg520 et l'ovohémérythrine présentes dans chaque sangsue en fonction des stades. Comme le montre le tableau VI, la quantité totale des protéines du liquide cœlomique au stade 3B₅ et 3C (environ 18 mg) ainsi que celle de Vg520 (environ 7 mg) et d'ovohémérythrine (environ 7,5 mg), reste stable, puis baisse au cours du stade 3D, pour arriver à la fin de ce stade à 3,8 mg pour les protéines totales et respectivement à 0,3 mg et 1,4 mg pour Vg520 et l'ovohémérythrine.

STADES	LC. mg.	Vg520. mg.	OvoHr mg.	N
3B ₅	17,9 ± 5,8	7,2 ± 2,4	8,3 ± 3,2	13
3C	17,9 ± 8,2	7,3 ± 2,9	7,4 ± 4,4	17
3D ₁₋₂	14,3 ± 5,1	5,6 ± 2,8	5,4 ± 2,2	13
3D ₃	3,8 ± 2,1	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,6	9

Tableau VI : Détermination de la quantité de protéines totales, de Vg520 et de OvoHr dans le liquide cœlomique. Les résultats exprimés en mg (± écart-type) ont été obtenus en multipliant la concentration en protéines par le volume du liquide cœlomique de chaque animal.

N : correspond au nombre d'animaux ayant servi à ces dosages.

B - OVAIRE

1 : DOSAGE DES PROTEINES DES OVAIRES

Les ovaires isolés sont lavés puis homogénéisés dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, contenant du NaCl à 1M. Le dosage des protéines est effectué avec le réactif de Biorad. La quantité des protéines dans les deux ovaires de *T. tessulatum* reste relativement stable aux stades 3B₅ et 3C, environ 0,5 mg (fig. 27). Elle augmente fortement au cours du stade 3D, pour atteindre son maximum en 3D₃, soit plus de 12 mg. La hausse de la quantité de protéines ovariennes coïncide avec la disparition de Vg520 et l'ovohémérythrine du liquide coelomique. Une relation évidente s'établit donc entre la disparition des vitellogénines du liquide coelomique au stade 3D et l'accumulation de réserves par les ovaires.

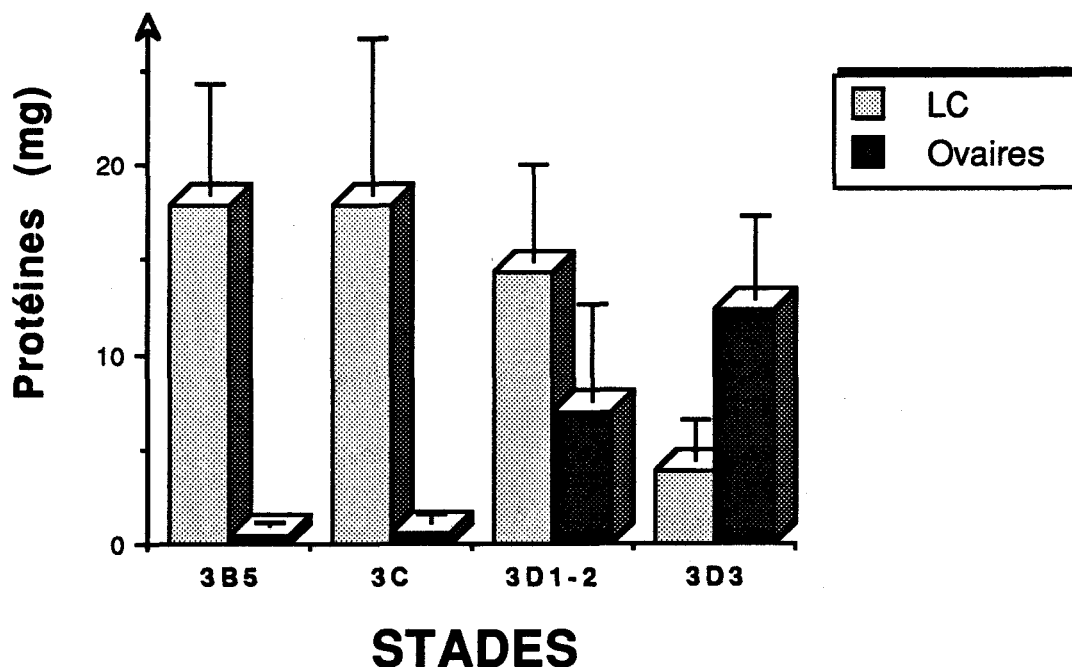


Figure 27 : Comparaison de la quantité des protéines totales du liquide coelomique (LC) et des ovaires. Le résultat est exprimé en mg. Les barres verticales correspondent aux écarts-types.

2 : ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES OVARIENNES

Pour déterminer les proportions respectives des deux vitellines dans les ovaires, leurs homogénats ont été analysés en SDS-PAGGE. Bien qu'en très faible quantité, ces protéines sont détectées au niveau des ovaires dès le stade 3B₃, c'est à dire au début de l'ovogenèse (fig. 28). Le taux des vitellines dans les ovaires des sangsues de stades 3B₃ à 3C est relativement faible, surtout quand on le compare à celui des stades 3D (fig. 28). Ce résultat permet de conclure que l'augmentation de la quantité des protéines dans les ovaires au stade 3D est due essentiellement à l'incorporation des vitellines. Ces vitellines proviennent des précurseurs qui se trouvent dans le liquide cœlomique, provoquant la baisse du taux des vitellogénines dans ce milieu (fig. 27).

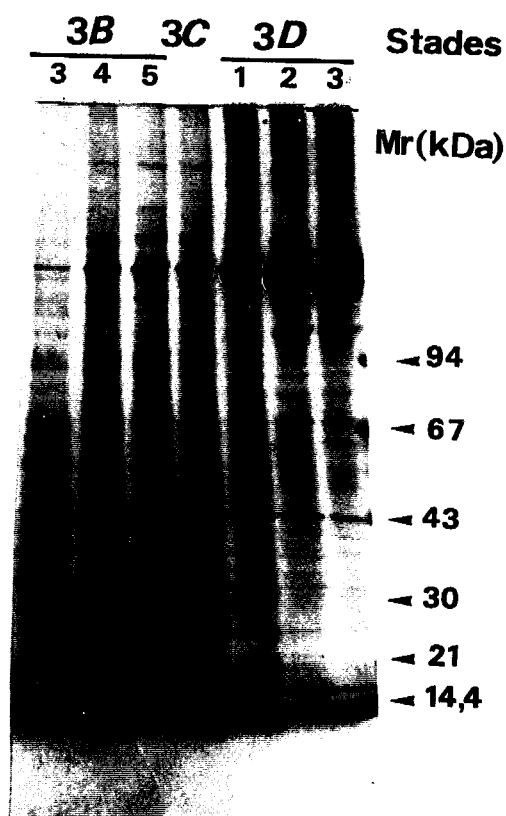


Figure 28 : Analyse en SDS-PAGGE des protéines ovariennes provenant d'animaux à différents stades du cycle vital de la sangsue. La quantité de protéines analysées est d'environ 20 µg par échantillon (sauf pour le stade 3B₃).

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

De cette étude il ressort que Vg520 n'est présent dans le liquide coelomique qu'après le 3ème repas de sang. Il est connu que les sangsues ne peuvent entrer en reproduction que si, après le dernier repas, leur poids dépasse 100-150 mg ; un repas supplémentaire, dans le cas contraire, est nécessaire (Wilkialis et Davies, 1980a). Les résultats laissent penser que ce dernier repas, s'il est quantitativement suffisant, joue un rôle primordial dans l'initiation de la synthèse de Vg520 et le processus de reproduction de l'animal. Par contre, l'initiation de la synthèse de l'ovohémérythrine ne dépend pas exclusivement du 3ème repas. En effet, ce polypeptide est présent dans le liquide coelomique au moins dès le stade 2. Nous n'avons pas cherché la présence de l'ovohémérythrine chez des animaux de stades 0 et 1, en raison des difficultés techniques pour prélever le liquide coelomique. Cependant l'analyse électrophorétique de broyats d'animaux entiers de stade 0 et de stade 1 a montré la présence de ce polypeptide (résultats non montrés). Ainsi, ce polypeptide est présent durant toute la vie de la sangsue ce qui permet de conclure que l'ovohémérythrine n'est pas une protéine spécifique de la reproduction. Cependant, un lien entre l'initiation de la synthèse de la molécule et la prise de repas n'est pas exclu. Dans ce cas on peut supposer que cette métalloprotéine serait chargée de fixer le fer libéré par la digestion du sang.

Après son apparition au stade 3A, la concentration de Vg520 dans le liquide coelomique croît fortement au cours des stades 3B et 3C et atteint 37 µg/µl. La synthèse de Vg520 est d'autant plus considérable que l'augmentation de sa concentration se fait parallèlement à un important accroissement du volume du liquide coelomique (Malecha, 1979). En effet, de 0 mg à la prise du 3ème repas, la quantité de Vg520 passe à environ 7 mg au stade 3C. Contrairement à Vg520, l'ovohémérythrine constitue déjà l'essentiel du matériel protéique au stade 2 (87% des protéines totales du liquide coelomique). Au stade 3B₂₋₃, sa concentration est de 31,6 µg/µl et ne progresse que légèrement pour atteindre 35 à 40 µg/µl en 3B₅-3C. La concentration de l'ovohémérythrine semble être ajustée au volume de la cavité coelomique. Cette stabilité de la concentration de l'ovohémérythrine, au cours des stades 3B-3C, ne reflète pas l'importance de ce métabolisme. En effet, en tenant compte de l'accroissement du volume du liquide coelomique, on peut conclure que la quantité de l'ovohémérythrine passe de quelques µg au début du stade 3 à environ 7 mg au stade 3C, valeur équivalente à celle trouvée pour Vg520. A la

lumière de ces résultats, il est permis de conclure que Vg520 et l'ovohémérythrine obéissent à deux métabolismes distincts.

Par ailleurs, on peut conclure que les stades 3A, 3B et 3C correspondent à une période de stockage provisoire des vitellogénines dans le liquide coelomique en absence de toute incorporation. Après cette période, au cours du stade 3D, la concentration des vitellogénines baisse alors que le volume du liquide coelomique augmente encore. Les vitellogénines qui disparaissent du liquide coelomique sont alors incorporées dans les ovaires qui voient leur teneur protéique croître d'une manière considérable à la fin du stade 3D.

L'incorporation de Vg520 et de l'ovohémérythrine se fait à un moment précis et pendant une période courte. Le début de cette phase correspond à un stade où la spermatogenèse est achevée. Ce décalage entre la maturation des gamètes males et femelles montre l'existence d'un système de contrôle très complexe. Par ailleurs, il existe un décalage entre l'initiation des synthèses et l'incorporation des vitellogénines. Sachant que les synthèses se poursuivent pendant la période d'incorporation (voir chapitre suivant), on peut conclure que ces deux processus ne semblent pas être sous la dépendance d'un même système de contrôle.

Pour résumer, l'ensemble de ces résultats permet de faire les constatations suivantes :

1) l'initiation de la synthèse des deux vitellogénines n'est pas synchrone, ce qui laisse présager un contrôle endocrine assez complexe. Celle de Vg520 est vraisemblablement déclenchée par le 3ème repas.

2) une phase d'accumulation des vitellogénines dans le liquide coelomique au cours des stades 3A à 3C.

3) une phase d'incorporation au cours du stade 3D. L'incorporation de Vg520 et de l'ovohémérythrine dans les ovaires semble être simultanée et se fait approximativement à la même vitesse.

Par ailleurs, la prise du 3ème et dernier repas de sang a deux conséquences :

1) l'initiation de la synthèse de Vg520 et peut-être la réinitiation de celle de l'ovohémérythrine,

2) une importante rétention d'eau dans les tissus (Malecha, 1979, 1983).

Y a-t-il un lien direct entre l'accumulation des vitellogénines dans le liquide coelomique et la rétention d'eau ? En d'autres termes, le gonflement des sangsues est-il dû à une augmentation de la pression osmotique du milieu intérieur consécutive à la synthèse des vitellogénines ? Certaines données sont

opposées à cette hypothèse ; tout d'abord l'ablation du cerveau provoque une chute rapide en quelques dizaines de minutes du volume du liquide cœlomique quel que soit le stade d'évolution de l'animal (Malecha, 1983). De plus, on remarque qu'au stade 3D, le volume du liquide cœlomique croît, alors que le taux des vitellogénines a fortement baissé. Les travaux effectués sur la diurèse ont montré que celle-ci est sous le contrôle d'une substance hormonale antidiurétique, sécrétée par le cerveau et plus précisément par le follicule 4 (Malecha, 1979, 1983), et vraisemblablement apparentée à l'ocytocine (Malecha *et al.*, 1989a).

ETUDE DE LA SYNTHÈSE DE Vg520

Les dosages ELISA et l'analyse électrophorétique du liquide coelomique ont montré que Vg520, qui apparaît dans le liquide coelomique juste après la prise du 3ème repas, voit son taux progresser au cours des stades 3B et 3C, puis baisser au cours du stade 3D. Dans un premier temps nous avons voulu savoir si cette baisse, qui correspond à l'incorporation des vitellogénines par les ovaires, est accompagnée d'un arrêt de synthèse de Vg520, ou bien au contraire, d'une poursuite de la synthèse pendant le stade 3D.

I - LA SYNTHÈSE AU COURS DU STADE 3

Pour réaliser ce travail, nous avons injecté de la leucine tritiée dans la cavité coelomique des animaux de stades 3B₄ à 3E, puis 24 h après, les ovaires et le liquide coelomique ont été récupérés et les protéines analysées par électrophorèse et fluorographie. Comme le montre le fluogramme présenté dans la figure 29, la sous-unité de Vg520 et V490 (YP165) est marquée aussi bien au niveau du liquide coelomique que des ovaires et ceci quel que soit le stade de développement des sangsues. Ce résultat permet de conclure que la synthèse de YP165 se poursuit au cours du stade 3D et même après la ponte des œufs (stade 3E).

II - CAPACITE DE SYNTHÈSE DES OVAIRES

L'hétérosynthèse est le processus de vitellogenèse le plus rencontré dans le règne animal. Cependant, chez quelques invertébrés ce processus est mixte, une partie de la synthèse de la vitellogénine est réalisée dans les ovaires. C'est le cas chez la drosophile (Bownes et Hames, 1978 ; Brennan *et al.*, 1982) et chez l'oursin (Shyu *et al.*, 1986).

Chez *Theromyzon*, la présence de la vitellogénine dans le liquide coelomique indique une origine au moins partiellement hétérosynthétique de Vg520. Néanmoins, la participation des ovaires à la synthèse de cette molécule ne pouvant être exclue, nous avons cherché à déterminer leur capacité de synthèse protéique.

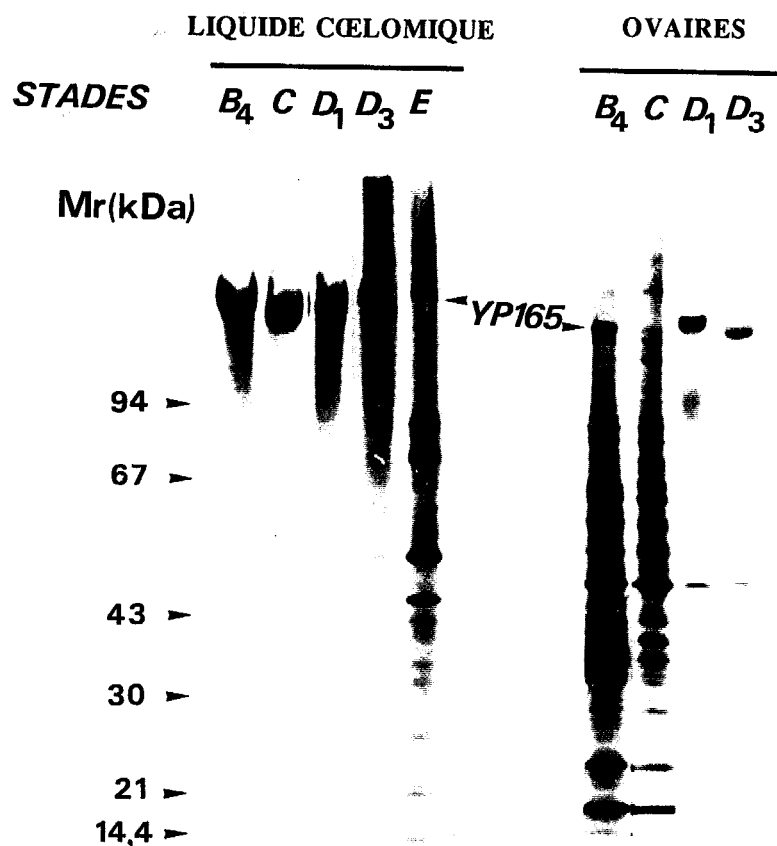


Figure 29 : Protéines radiomarquées présentes dans le liquide cœlomique et les ovaires de sangsues de stade 3B₄ à 3E après injection intracœlomique de leucine tritiée. Après l'injection de leucine tritiée dans la cavité cœlomique, les animaux ont été laissés à température constante (17°C) pendant 24 h, puis le liquide cœlomique et les ovaires ont été prélevés et les protéines analysées en SDS-PAGGE et fluorographie.

Pour étudier les synthèses protéiques intraovariennes nous avons prélevé des ovaires sur des animaux de stades 3D₁₋₂ et incubé ceux-ci dans un milieu de culture en présence de leucine tritiée pendant 24 h. Les protéines ovariennes ont ensuite été séparées en SDS-PAGGE et révélées en fluorographie. Le

fluorogramme obtenu (fig. 30 A), montre un marquage significatif sur de nombreux polypeptides. Toutefois, aucun marquage n'a été détecté au niveau de YP165. Nous avons également incubé des ovaires de même stade dans leur milieu naturel : le liquide coelomique. Après 24 h d'incubation en présence de leucine tritiée, les protéines ovariennes ont été analysées comme précédemment. Comme dans le cas d'une incubation dans un milieu de culture synthétique, YP165 n'apparaît pas marqué (fig. 30 B). Enfin, dans une autre série expérimentale, nous avons injecté la leucine tritiée à des sangsues de stades 3B₄

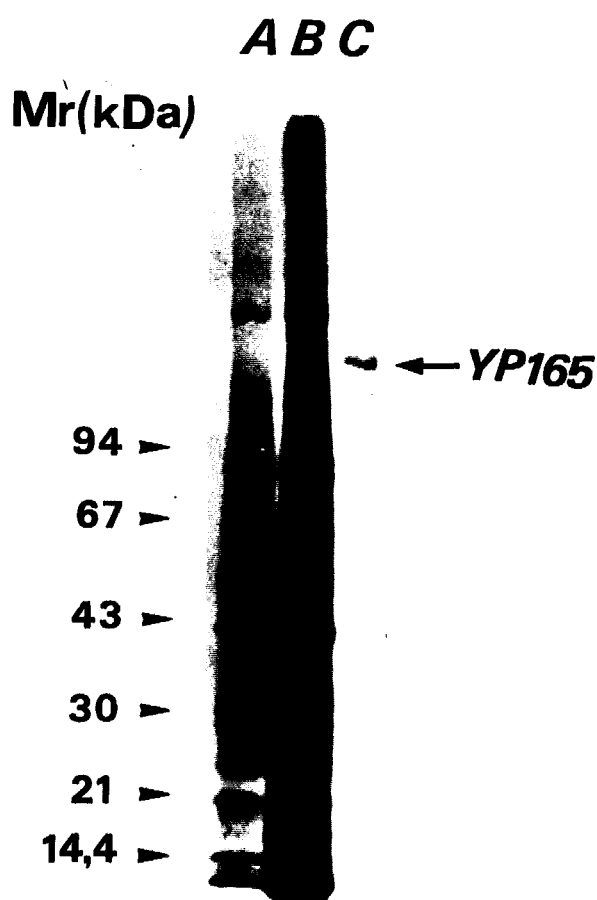


Figure 30 : Mise en évidence de l'incorporation de la vitellogénine par les ovaires incubés *in vitro*.

Fluorogramme de l'analyse par SDS-PAGE des protéines ovariennes. Les ovaires ont été prélevés sur des animaux de stade 3 D₁₋₂ et incubés pendant 24 h dans :

- A : un milieu de culture 199 en présence de leucine tritiée,
- B : le liquide coelomique en présence de leucine tritiée,
- C : le liquide coelomique contenant de la vitellogénine radiomarquée.

à 3C et après 24 h récupéré le liquide cœlomique de ces animaux afin de disposer d'un milieu où la vitellogénine est marquée. Après une incubation de 24 h des ovaires de stade 3D₁₋₂ dans ce milieu, YP165 apparaît marqué au niveau des ovaires (fig. 30 C). Ces résultats montrent que des ovaires maintenus *in vitro*, soit dans un milieu de culture synthétique soit dans du liquide cœlomique, sont capables de synthétiser des protéines et d'incorporer de la vitellogénine. Ils permettent de conclure que les ovaires ne participent pas à la synthèse de la vitellogénine mais qu'ils incorporent Vg520 présent dans le milieu.

III - RECHERCHE DU SITE DE SYNTHÈSE

A - ÉTUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE

Le sérum polyclonal anti-vitelline a été utilisé pour rechercher le type cellulaire responsable de la synthèse de la vitellogénine. Cette étude immunocytochimique pratiquée sur des coupes d'animaux entiers a permis à plusieurs reprises de marquer les cœlomocytes (fig. 31), cellules adhérentes à la paroi de l'animal. Dans certains cas un immunomarquage a été détecté au niveau des testicules et oviductes.

B - ÉTUDES MÉTABOLIQUES

Pour tenter de confirmer les résultats obtenus en immunocytochimie, nous avons étudié les synthèses protéiques des cœlomocytes. Nous avons ainsi réalisé des études métaboliques *in vitro* à partir des cœlomocytes isolés et *in vivo* en réalisant des cinétiques de marquage sur temps court.

1 : INCUBATION *IN VITRO* DES CŒLOMOCYTES

Les cœlomocytes libres dans le cœlome ont été isolés après récupération et centrifugation du liquide cœlomique d'animaux en période de vitellogenèse. Ces cellules ont ensuite été incubées *in vitro* dans du milieu 199 en présence de leucine tritiée. Après 24 h d'incubation, le milieu et les cœlomocytes ont été récupérés puis les protéines totales et les immunoprécipités obtenus à l'aide de l'anticorps anti-V490 ont été analysés par SDS-PAGE et fluorographie. Après coloration par le bleu de Coomassie, YP165 est observé dans l'immunoprécipité

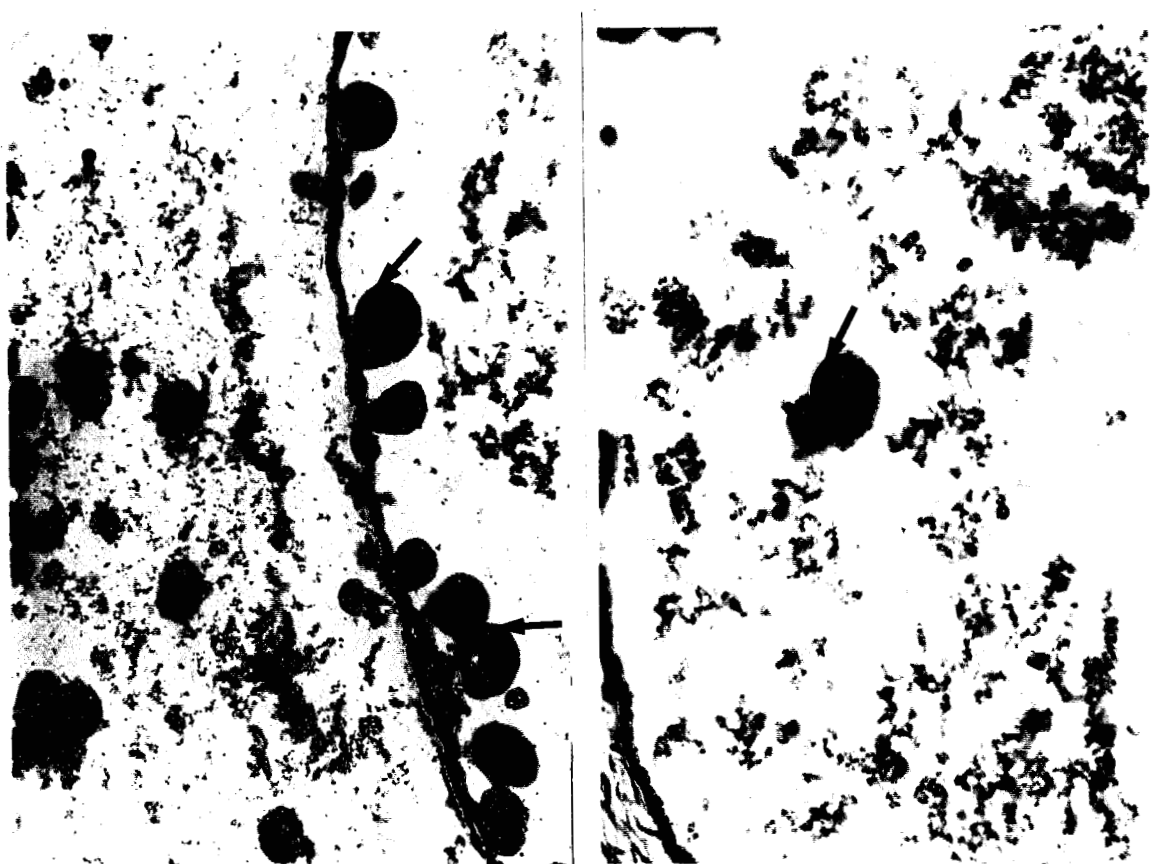


Figure 31 : Identification du site de synthèse de Vg520 par immunocytochimie.
Immunomarquage des cœlomocytes par le sérum polyclonal anti-V490 (flèche).

réalisé à partir du milieu de culture (fig. 32 A). Néanmoins aucune radioactivité n'est observée au niveau de cette protéine après fluorographie (non montré). Dans les cœlomocytes, une faible quantité de protéine réactive avec l'anticorps anti-V490 est détectée (fig. 32 B). Par ailleurs, aucun marquage n'est observé au niveau de YP165 après analyse électrophorétique des protéines totales des cœlomocytes (fig. 32 C). Toutefois de nombreuses protéines sont radioactives, ce qui indique que les cœlomocytes sont métaboliquement actifs dans les conditions utilisées. Nous avons également réalisé ce type d'expérience dans le liquide cœlomique, milieu naturel des cœlomocytes. Comme précédemment, aucune radioactivité n'a pu être détectée au niveau de YP165 (fig. 32 D), montrant ainsi l'absence de synthèse de la vitellogénine dans ce type cellulaire.

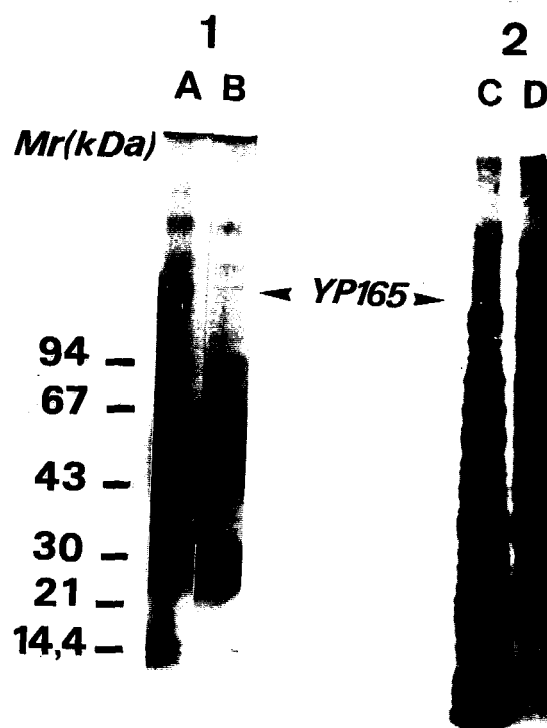


Figure 32 : Etude de la vitellogénine au niveau des coelomocytes.

Les coelomocytes libres ont été incubés pendant 24 h en présence de leucine tritiée dans le milieu de culture 199 et dans le liquide coelomique.

- 1: Analyse en SDS-PAGE de l'immunoprécipité obtenu par le sérum anti-V490 à partir des protéines du milieu d'incubation 199 (A) et des coelomocytes (B). Le gel est coloré par le bleu de Coomassie.
- 2: Fluorogramme d'une analyse en SDS-PAGE des protéines des coelomocytes incubés 24 h *in vitro*, en présence de leucine tritiée dans le milieu de culture 199 (C) et dans le liquide coelomique (D).

2 : CINETIQUE DE MARQUAGE *IN VIVO*

Nous avons injecté de la leucine tritiée dans la cavité coelomique de sangsues de stades 3B₅-3C. Après des temps de marquage de 1, 3 et 5 h, les coelomocytes libres, les oviductes, les testicules, les ovaires et le liquide coelomique ont été prélevés et analysés par SDS-PAGE et fluorographie. Après 1 h de marquage, aucune radioactivité n'est observée au niveau de YP165 dans les compartiments analysés. Par contre, après 3 h, YP165 se trouve

marqué aussi bien au niveau du liquide cœlomique que des cœlomocytes (fig. 33 A et B), résultat confirmé par immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps anti-V490 (fig. 33 C et D). Cinq heures après l'injection de la leucine, YP165 se trouve marqué au niveau de tous les organes analysés

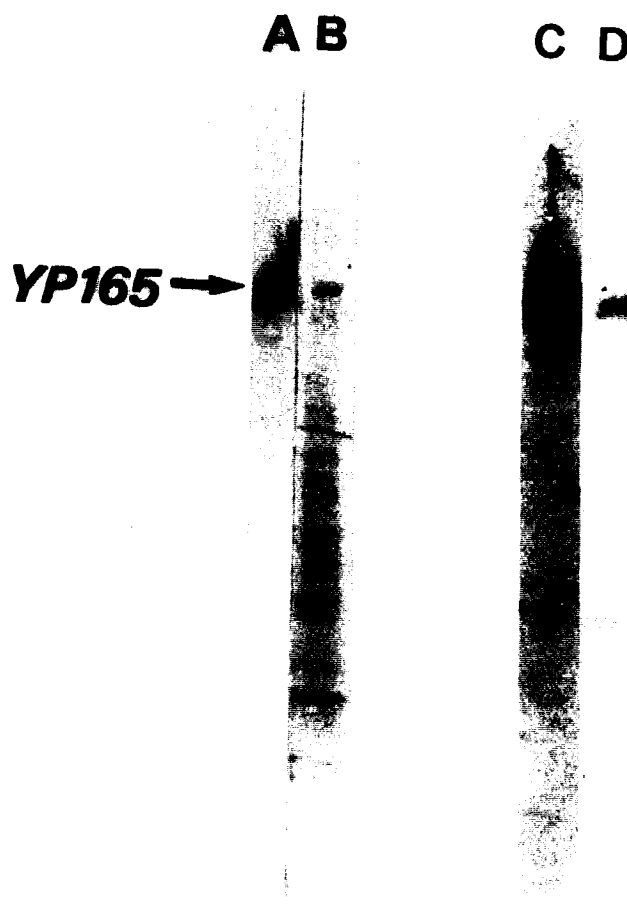


Figure 33 : Marquage *in vivo* de YP165.
 Fluorogramme des protéines néosynthétisées (analyse en SDS-PAGE)
 après une incubation de 3 h en présence de leucine tritiée.
 A : Liquide cœlomique.
 B : Cœlomocytes.
 C : Immunoprécipitation à l'aide du sérum anti-V490 des protéines du
 liquide cœlomique.
 D : Immunoprécipitation à l'aide du sérum anti-V490 des protéines des
 cœlomocytes.

(fig. 34). Il faut toutefois signaler que ce type d'expérience n'a pas toujours permis de montrer un marquage précoce de YP165 uniquement dans les cœlomocytes et le liquide cœlomique. Dans de nombreux cas YP165 a également été détecté au niveau des testicules. Néanmoins, nous n'avons jamais pu déceler un marquage de YP165 à un niveau cellulaire précédant celui dans le liquide cœlomique.

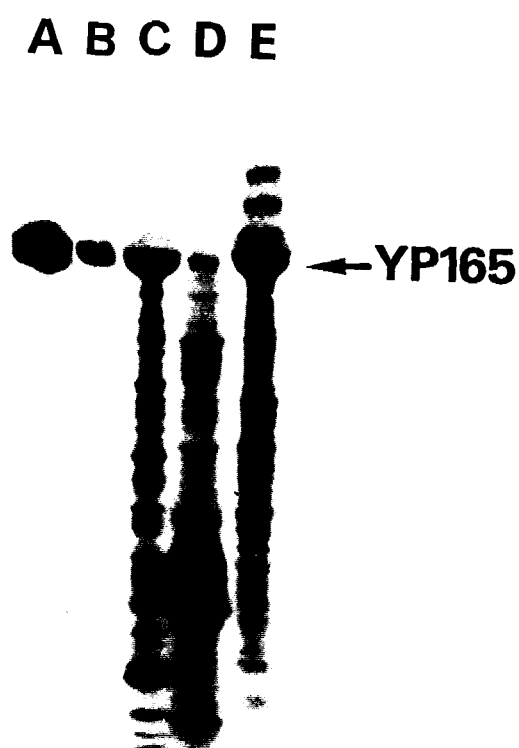


Figure 34 : Marquage *in vivo* de Yg520.
 Fluorogramme des protéines néosynthétisées (analyse en SDS-PAGE)
 après une incubation de 5 h en présence de leucine tritiée.
 A : Liquide cœlomique.
 B : Cœlomocytes.
 C : Testicules.
 D : Oviducte.
 E : Ovaires.

3 : DISCUSSION

Deux types de cœlomocytes sont présents dans la cavité cœlomique de *T. tessulatum* : les cellules adhérentes à la paroi du cœlome et celles flottant librement dans le liquide cœlomique. Les études immunocytochimiques ont mis en évidence un immunomarquage plus important au niveau des cœlomocytes adhérents. A l'opposé, les études métaboliques réalisées *in vitro* et *in vivo* ont porté essentiellement sur les cœlomocytes libres étant donné les difficultés d'isolement des cellules adhérentes à la paroi du cœlome. Dans ce cas, les résultats obtenus ont été peu concluants. En effet, nous n'avons jamais pu montrer une synthèse de vitellogénine après une incubation *in vitro* de ces cellules dans un milieu commercial ou dans du liquide cœlomique. Les études métaboliques réalisées *in vivo* ont toutefois permis de mettre en évidence un radiomarquage au niveau de la vitellogénine dans les cœlomocytes libres. Néanmoins, dans tous les cas, ce marquage a été observé conjointement à celui de la vitellogénine dans le liquide cœlomique et le plus souvent parallèlement à la détection de vitellogénine marquée dans les testicules. Or ni les cœlomocytes libres ni les testicules ne sont capables de synthétiser cette macromolécule lors d'incubation *in vitro*. Il semble donc probable que malgré les nombreux lavages auxquels sont soumis les cellules ou organes après leur récupération, ceux-ci sont encore contaminés par de la vitellogénine circulante. Cette hypothèse permettrait d'expliquer aussi bien la présence de vitellogénine marquée dans ces compartiments lors des études métaboliques *in vivo* que celle de vitellogénine non marquée dans les milieux de culture lors des études métaboliques *in vitro*. De ce fait, il est vraisemblable que seuls les cœlomocytes adhérents à la paroi du cœlome soient les cellules productrices de vitellogénine. Les cellules libres dans le liquide cœlomique pourraient correspondre soit à une forme dégénérescente des cellules adhérentes, soit à une forme peu active. Il faut signaler que des variations dans le contenu en phosphatase alcaline des cœlomocytes de la sangsue *Haemopsis marmorata* ont été observées par Barnes et Bick (1983) montrant ainsi l'hétérogénéité fonctionnelle de cette population cellulaire.

IV - CONTROLE ENDOCRINE DE LA VITELLOGENESE

A ce jour très peu d'informations sont connues sur le contrôle endocrine de l'ovogenèse chez les Hirudinés. Les travaux entrepris ont pour la plupart consisté à observer l'évolution macroscopique et microscopique des produits génitaux chez des animaux ayant subi des ablations ganglionnaires (Hagadorn, 1962 ; Van Damme, 1976, 1978) et n'ont pas permis de définir les répercussions métaboliques. Pour aborder ce point nous avons pratiqué différentes ablations juste après le 3ème et dernier repas des sangsues :

- ablation des ganglions cérébroïdes. Cette partie du système nerveux est connue pour exercer une influence gonadotrope de nature hormonale sur la maturation génitale mâle chez les glossiphoniidés (Hagadorn, 1962) et les hirudidés (Hagadorn, 1966, 1967, 1969 ; Malecha, 1967, 1970). Par contre, les données relatives à leur action sur l'ovogenèse sont très réduites. Chez *T. rude*, Hagadorn (1962) a montré que l'ablation du cerveau en hiver, avant l'activation des gonades qui survient en février, maintient les ovaires en inactivité. Cette même opération pratiquée en période de reproduction n'entraîne aucune dégénérescence et la vitellogénèse semble se poursuivre. Il n'a pu cependant démontrer la nature hormonale de cette action gonadotrope du cerveau.

- ablation des 2 ganglions segmentaires génitaux. Chez les Hirudinées le nombre de neurones est constant dans tous les ganglions segmentaires (400 cellules environ) sauf dans ceux des deux segments génitaux (Macagno, 1980). Les cellules surnuméraires des ganglions segmentaires 5 et 6 (GS5 et GS6) apparaissent tardivement au cours du développement de la jeune sangsue sous le contrôle des ébauches génitales mâles (Baptista *et al.*, 1990). Elles sont connues pour être immunoréactives à l'anticorps anti-FMRF (Baptista et Macagno, 1988 ; Kuhlman *et al.*, 1985 ; Evans et Calabrese, 1989) et anti-ocytocine (Verger-Bocquet *et al.*, 1991). Par contre, rien n'est connu en ce qui concerne leur rôle sur l'appareil génital.

- ablation des ovaires. Cette opération a pour but de rechercher une influence éventuelle de l'absence de ces gonades sur la synthèse des vitellogénines.

- ablation de l'oviducte. Cet organe est entouré de glandes unicellulaires dont le rôle est jusqu'à présent inconnu. Comme elles sont quelquefois marquées par l'anticorps polyclonal anti-vitelline, il était utile de vérifier si elles jouaient un rôle éventuel dans sa synthèse.

Un lot de sangsues témoins a été laissé dans les mêmes conditions que les animaux opérés. Chaque opération a été faite sur une dizaine d'animaux. 24 heures avant de les sacrifier, de la leucine tritiée a été injectée dans la cavité coelomique de ces animaux. La synthèse de Vg520 a été jugée après analyse du liquide coelomique par SDS-PAGGE et fluorographie.

A : DECEREBRATION

Deux mois après les opérations, les témoins ont atteint le stade 3B₃ à 3B₅ et la sous-unité de la vitellogénine (YP165) se trouve marquée aussi bien au niveau du liquide coelomique que des ovaires (fig. 35 A-B). Par contre, les

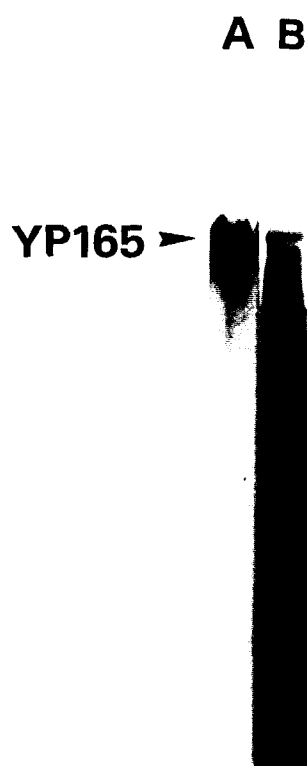


Figure 35 : La synthèse de Vg520 chez les sangsues témoins.
Deux mois après les opérations effectuée après le 3ème repas, les sangsues témoins ont subi une injection intracoelomique de leucine tritiée. 24 h après, les protéines du liquide coelomique et des ovaires ont été analysées en SDS-PAGGE et fluorographie.
A : Fluorographie des protéines du liquide coelomique.
B : Fluorographie des protéines ovariennes.

animaux décérébrés n'ont pas évolué, ils sont restés au stade 3A, avec un tube digestif rempli de sang. Par ailleurs, après l'analyse électrophorétique des protéines du liquide coelomique, la vitellogénine n'est détectée ni après coloration par le bleu de Coomassie (fig. 36) ni après fluorographie (non montré). Cinq mois après les opérations, aucune évolution n'est observée, alors que les animaux témoins ont atteint le stade de la ponte (3D - 3E). Pour compléter cette étude, nous avons effectué le même type d'expérience sur des animaux en période de vitellogenèse (stade 3B₄-3D). Après des temps de décérébration de 1 et 7 jours YP165 est radiomarké au niveau du liquide coelomique (fig. 37), alors qu'après 20 et 25 jours YP165 n'est plus détecté sur le fluorogramme (fig. 37), par contre certains polypeptides sont marqués.

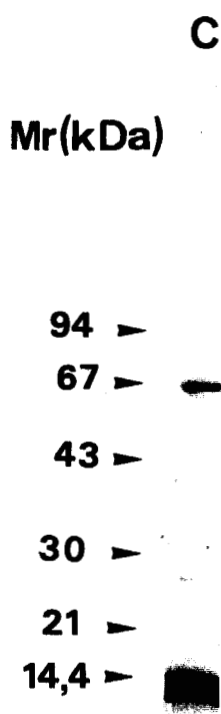


Figure 36 : Mise en évidence de l'influence du cerveau sur la synthèse de Vg 520. Analyse en SDS-PAGE des protéines du liquide coelomique deux mois après la décérébration effectuée après la prise du 3ème repas. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

Nous avons également effectué des marquages métaboliques après des temps de décérébration de 14 jours. Dans ce cas, on constate des fluctuations individuelles importantes : certains animaux synthétisent encore la vitellogénine alors que d'autres ne produisent plus cette molécule (non montré). Au niveau des ovaires, YP165 n'apparaît marqué que pour les temps de décérébration de 1 et 7 jours (fig. 37).

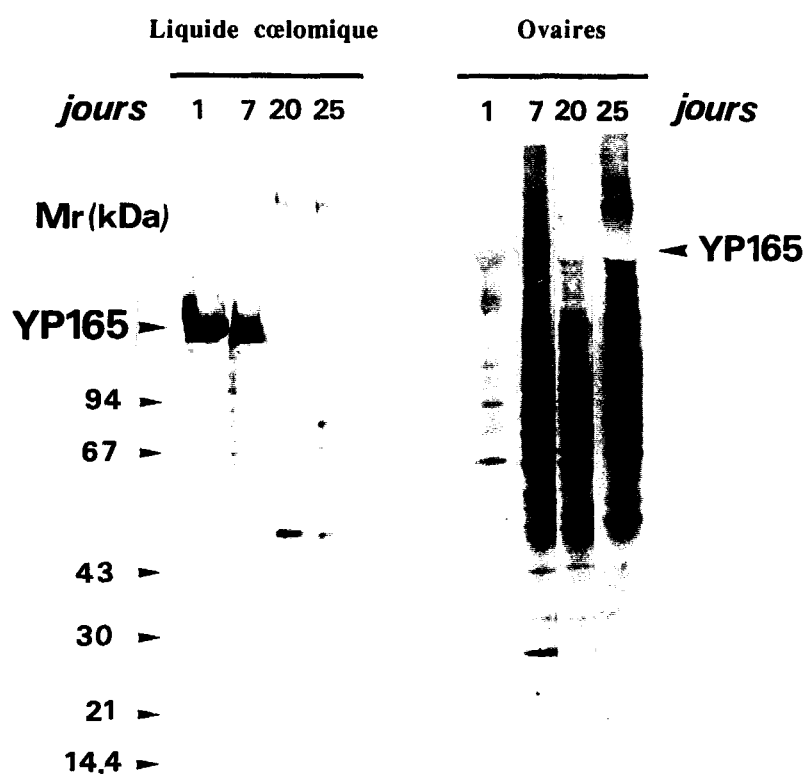


Figure 37 : Influence de la décérébration sur la vitellogenèse
 SDS-PAGGE et fluorographie des protéines du liquide cœlomique et des ovaires prélevés sur des sangsues de stades 3D après des temps de décérébration de 1, 7, 20 et 25 jours. L'injection de leucine tritiée intervient 24 h avant le sacrifice des animaux.

B - AUTRES OPERATIONS

1 : ABLATION DES GANGLIONS GENITAUX

Deux mois après l'ablation des ganglions génitaux, les sangsues sont au même stade de développement que les témoins. La vitellogénine est marquée aussi bien au niveau du liquide coelomique que des ovaires (fig. 38). Après 5 mois, les animaux opérés sont en fin de stade 3D. Cependant les ovaires de ces animaux sont en voie de dégénérescence. Etant donné que les ganglions génitaux interviennent dans le processus mécanique de la ponte, les animaux opérés n'ont pas pondu, ce qui explique vraisemblablement l'état de dégénérescence des ovaires. On peut donc conclure que l'ablation des ganglions génitaux n'intervient pas de manière significative dans le contrôle du processus de la vitellogenèse.

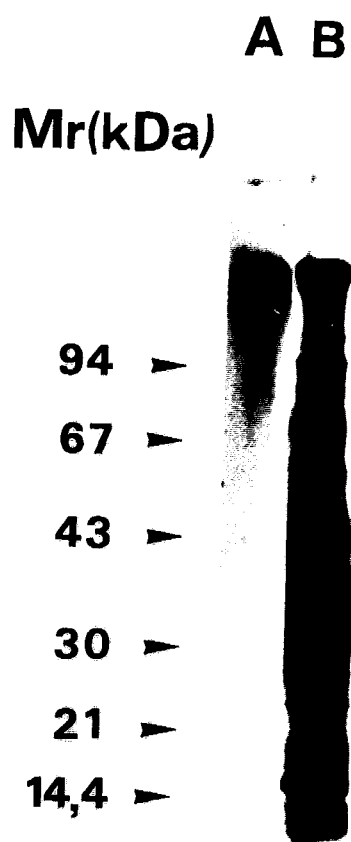


Figure 38 : Influence de l'ablation des ganglions génitaux sur la vitellogenèse. SDS-PAGGE et fluorographie des protéines du liquide coelomique (A) et des ovaires (B) prélevés sur des animaux 2 mois après les opérations. L'injection de leucine tritiée est effectuée 24 h avant le sacrifice des animaux.

2 : OVARIECTOMIE

Deux mois après les opérations, les sangsues ont atteint le stade 3B₃₋₄. La vitellogénine se trouve marquée au niveau du liquide coelomique (fig. 39 A). Cinq mois après les opérations les testicules sont dégénérés, indiquant la fin de la spermatogenèse. Cependant, en absence d'ovaires, il est impossible de déterminer le stade de développement de ces animaux. Néanmoins, après l'injection de leucine tritiée, YP165 se trouve marqué dans le liquide coelomique (fig. 39 B). Ainsi la synthèse de Vg520 se poursuit malgré l'ovariectomie pratiquée juste après la prise du 3ème repas.

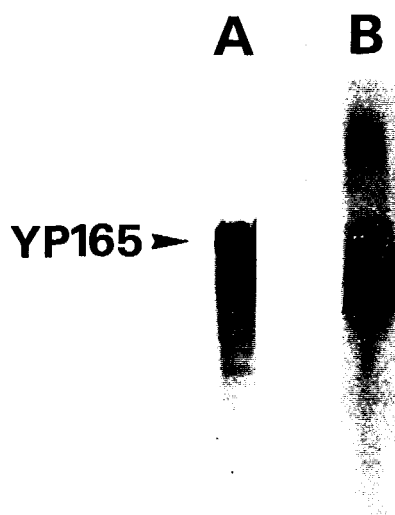


Figure 39 : Influence de l'ovariectomie sur le vitellogenèse.
SDS-PAGGE et fluorographie des protéines du liquide coelomique après 24 h de marquage par la leucine tritiée, 2 mois (A) et 5 mois (B) après l'ovariectomie.

3 : OVIDUCTOMIE

Deux mois après l'oviductomie, les sangsues sont au même stade de développement que les témoins (3B₃₋₅) et la vitellogénine se trouve marquée dans le liquide cœlomique et les ovaires (fig. 40 A-B). Après 5 mois d'évolution, les animaux opérés ont atteint le stade 3D-3E et la vitellogénine se trouve marquée dans le liquide cœlomique et plus faiblement au niveau de l'ovaire (fig. 40 C-D). De ce fait, l'oviductomie ne semble donc pas affecter le déroulement de la vitellogenèse. Il faut signaler que chez certaines des sangsues opérées le déclenchement de la ponte a eu lieu. Elles ont déposé des cocons vides, les ovocytes restant dans l'animal du fait de l'ablation de l'oviducte.

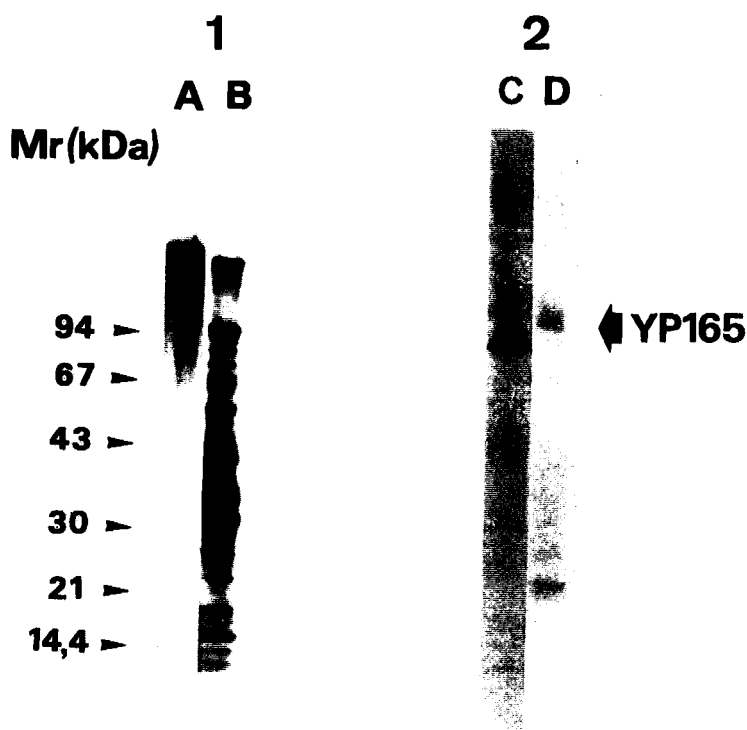


Figure 40 : Influence de l'oviductomie sur la vitellogenèse.
 SDS-PAGE et fluorographie des protéines du liquide cœlomique et des ovaires après 24 h de marquage *in vivo* en présence de leucine tritiée.
 1: deux mois après l'oviductomie.
 A : Liquide cœlomique.
 B : Ovaires.
 2: cinq mois après l'oviductomie.
 C : Liquide cœlomique.
 D : Ovaires.

V - DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de cette étude nous avons montré que la synthèse de Vg520 s'effectue tout au long du stade 3 et est encore active après la ponte des cocons, l'absence apparente d'un arrêt de synthèse pouvant être liée au fait que *Theromyzon* ne se reproduit qu'une seule fois dans sa vie. Par ailleurs, nous avons également mis en évidence la non participation des ovaires à la synthèse de Vg520. En effet, l'incubation des ovaires *in vitro* en présence d'un précurseur radioactif n'a pas permis de montrer un marquage au niveau de YP165, le composant sous-unitaire de Vg520. De ce fait, il est possible de conclure que la vitellogénèse chez *Theromyzon* est un processus purement hétérosynthétique de même type que celui rencontré chez d'autres invertébrés tels que le nématode *Caenorabditis elegans* (Kimble et Sharrock, 1983 ; Sharrock, 1984), les néréidiens (Baert et Slomianny, 1987 ; Bonnier, 1990) et la plupart des insectes (Engelmann, 1979 ; Hagedorn, 1979 ; Postlethwail et Giorgi, 1985) ainsi que chez les vertébrés inférieurs (Wallace, 1985).

Pour déterminer le site de synthèse de Vg520, nous avons mené une approche immunohistologique à l'aide d'un anticorps polyclonal et réalisé des études métaboliques aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Les résultats obtenus ont permis de conclure à la participation possible des cœlomocytes aux synthèses de Vg520 (voir paragraphe III-3). Les cœlomocytes ont également été définis comme site de synthèse de la vitellogénine chez les néréidiens (Fischer et Rabien, 1986 ; Baert et Slomianny, 1987 ; Cury *et al.*, 1987 ; Bonnier, 1990). Il faut signaler que chez ces annélides polychètes tout comme chez *Theromyzon*, il n'existe aucun organe équivalent au foie des vertébrés ou au corps gras des insectes, site de production de la vitellogénine chez ces animaux (Wallace, 1985 ; Bownes, 1986). Par ailleurs, nous n'avons pu obtenir aucun élément en faveur d'une expression de Vg520 au niveau de l'intestin, lieu de synthèse de la vitellogénine chez le nématode *C. elegans* (Sharrock, 1984) et l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Shyu *et al.*, 1986). Il est donc probable que la vitellogénine soit produite exclusivement au niveau des cœlomocytes chez *T. tessulatum*. Néanmoins, des études complémentaires mériteraient d'être réalisées afin de confirmer cette interprétation.

Les études métaboliques, que nous avons réalisées, ont montré la présence dans le liquide cœlomique de Vg520 nouvellement synthétisé quelques heures après l'injection intracœlomique de leucine tritiée. Cette observation

indique que les cœlomocytes réalisent leurs synthèses protéiques à partir d'éléments micromoléculaires puisés dans le liquide cœlomique et que la vitellogénine est rapidement exportée après sa synthèse. Ce processus ne semble pas devoir s'appliquer pour l'ovohémérythrine. En effet, après quelques heures ou plusieurs jours de marquage aucune radioactivité n'est décelée au niveau de cette molécule dans le liquide cœlomique dans les conditions d'exposition des fluorographies permettant de visualiser Vg520 (1 semaine). Pourtant, les dosages ELISA ont montré que l'ovohémérythrine, tout comme Vg520, est synthétisé activement pendant le stade 3. De ce fait et sachant que cette protéine n'est pas issue directement de l'apport alimentaire (aucune immunoréactivité n'a été détectée au niveau des composants protéiques du sang de canard), il est possible d'envisager que l'ovohémérythrine :

- 1) n'est pas élaboré dans les cœlomocytes comme Vg520,
- 2) est élaboré dans un site éloigné du cœlome ou dans des cellules qui utilisent des réserves autres que celles du cœlome pour réaliser les synthèses protéiques.

Malheureusement, les études immunohistochimiques réalisées à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre l'ovohémérythrine n'ont pas donné de résultats significatifs. Il n'est donc pas encore possible de préciser le site de synthèse de cette molécule. Il est possible que l'ovohémérythrine soit exportée immédiatement après sa synthèse hors des cellules, rendant de ce fait impossible sa détection par immunohistochimie. Pour résoudre ce problème la technique d'hybridation *in situ* sera mise en œuvre.

Dans une première approche visant à déterminer le contrôle endocrine de la vitellogénèse chez *T. tessulatum*, nous avons réalisé une série d'opérations et recherché les éventuelles répercussions sur le déroulement de ce processus métabolique. Ainsi, l'ablation des ganglions génitaux, l'ovariectomie et l'oviductomie réalisées immédiatement après le troisième repas n'ont eu aucune influence significative sur la gamétogenèse. En effet, dans tous les cas, la synthèse de Vg520 a été observée et, à l'exception de l'ovariectomie, les ovaires sont arrivés à maturité dans un délai analogue à celui des animaux non opérés. La seule conséquence a été une perturbation de la ponte qui a été soit incomplète dans le cas de l'oviductomie, soit empêchée chez les animaux ayant subi l'ablation des ganglions génitaux mâles et femelles (ces ganglions contrôlent les mouvements musculaires au niveau des segments 11 et 12 où se situent les orifices génitaux). A l'opposé, la décérébration a nettement perturbé l'évolution normale au cours du stade 3. Lorsque cette opération est réalisée

immédiatement après le 3ème repas de sang, la maturation génitale des sangsues est complètement bloquée, confirmant ainsi les résultats obtenus par Hagadorn (1962) chez *T. rude*. En fait, dans ces conditions, le repas de sang n'est pas digéré et l'absence de développement ne peut pas être considéré comme un résultat significatif. Par contre, lorsque cette opération est réalisée chez des animaux ayant digéré leur repas de sang (stade 3B₄-3D), un arrêt de la vitellogenèse est observé. Deux semaines après la décérébration, Vg520 marqué n'est plus détecté ni dans le liquide coelomique ni dans les ovaires. Il semble donc que la décérébration affecte aussi bien l'incorporation de Vg520 dans les ovaires que la synthèse de cette macromolécule, l'arrêt tardif de cette synthèse étant probablement le reflet de la stabilité des ARNm codant pour la vitellogénine. L'ensemble de ces résultats suggère donc que la synthèse et l'incorporation de la vitellogénine pourraient être sous le contrôle d'un facteur activateur produit par le cerveau.

CONCLUSION

Parmi les molécules de réserve accumulées par l'ovocyte de *T. tessulatum*, deux sont majeures. L'une est une lipoglycoprotéine de 490 kDa et répond à la définition d'une vitelline, l'autre est un polypeptide de 13 kDa, porteur de fer et dont la séquence NH₂-terminale possède une grande homologie avec les hémérythrines, nous l'avons donc appelée ovohémérythrine.

Le précurseur de la vitelline est en solution dans le liquide cœlomique et possède une masse moléculaire de 520 kDa. Nous avons montré que les ovaires ne synthétisent pas la vitelline et que le précurseur de celle-ci est produit par les cœlomocytes de la paroi du cœlome. Ainsi, la vitellogenèse chez *Theromyzon* est un processus purement hétérosynthétique, de même type que celui retrouvé chez les vertébrés et la plupart des invertébrés. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour approfondir nos connaissances sur l'hétérogénéité des cœlomocytes et préciser le type ou le stade cellulaire responsable de la synthèse de Vg520.

L'initiation de la synthèse de Vg520 coïncide avec la prise du 3ème repas. Après son apparition dans le liquide cœlomique, la concentration de la vitellogénine augmente progressivement pour atteindre son maximum au stade 3C. Au moment de l'initiation de la synthèse de la vitellogénine, les ovaires sont encore très petits (stade 0") et les ovocytes ne se sont pas encore différenciés. Au cours de cette période (stades 3A à 3C), la vitellogénine est stockée dans le liquide cœlomique qui voit son volume augmenter sensiblement. Au stade 3D, la vitellogénine présente dans le liquide cœlomique est incorporée en quelques jours par les ovocytes.

En ce qui concerne le contrôle de la synthèse de la vitellogénine, la prise du dernier repas joue un rôle primordial dans son initiation. La décérébration des sangsues immédiatement après la prise du 3ème repas inhibe le processus de vitellogenèse. De plus, l'ablation du cerveau chez des animaux en période de vitellogenèse (stades 3B₄-3D) conduit à l'arrêt de la synthèse et de l'incorporation de la vitellogénine. Ainsi, le cerveau est nécessaire à la synthèse de Vg520, cependant des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'influence de la prise du dernier repas et du cerveau sur la vitellogenèse. Comme le ganglion supracœsophagien de *Theromyzon* est constitué de neurones de grande taille et en nombre réduit, il est possible d'intervenir individuellement au niveau de chaque cellule soit en procédant à des ablations sélectives, soit en injectant différentes substances. Une telle étude permettrait d'identifier les neurones intervenant dans le contrôle de la vitellogenèse et faciliterait la recherche d'une éventuelle hormone gonadotrope.

Comme pour la vitelline le précurseur de l'ovohémérythrine a été retrouvé dans le liquide coelomique et l'incubation des ovaires *in vitro* a révélé que ceux-ci ne participent pas à la synthèse de l'ovohémérythrine. Ces deux observations permettent de conclure que ce polypeptide est d'origine purement hétérosynthétique. Cependant du fait de l'absence de marquage de l'ovohémérythrine lors des incubations en présence d'un précurseur radioactif, il ne nous a pas été possible d'identifier son site de synthèse. De plus, les études immunocytochimiques en utilisant l'anticorps anti-OvoHr n'ont pas donné de résultats significatifs vraisemblablement à cause d'une absence de stockage intracellulaire. La recherche du site de synthèse de cette molécule se poursuit actuellement en utilisant des techniques d'hybridation *in situ*. Contrairement à Vg520, l'ovohémérythrine est synthétisée avant le stade 3 et est présente pendant toute la vie de *Theromyzon*. Faible aux stades 0, 1 et 2, la quantité de l'ovohémérythrine augmente dans le liquide coelomique au cours du stade 3 pour atteindre une concentration équivalente à celle de Vg520. Après la période de stockage dans le liquide coelomique, l'ovohémérythrine comme la vitellogénine est incorporée dans les ovocytes au stade 3D. Cependant l'initiation de la synthèse de ces deux molécules n'est pas synchrone ; Vg520 et l'ovohémérythrine ne sont vraisemblablement pas sous la dépendance d'un même système de contrôle. Il n'est toutefois pas exclu que la synthèse de l'ovohémérythrine soit stimulée par le repas de sang, toutefois dans ce cas chacun des trois repas pris au cours de la vie de la sangsue jouerait ce rôle et pas seulement le dernier comme pour Vg520.

A l'issue du 3ème repas la concentration de la vitellogénine croît fortement et cela malgré une forte augmentation du volume du liquide coelomique due à une rétention d'eau, alors que l'ovohémérythrine semble ajuster sa concentration pour que celle-ci reste constante. Des études complémentaires sur ce sujet sont nécessaires pour expliquer les interrelations qui peuvent exister entre ces trois paramètres. En plus de la connaissance du site de synthèse, l'achèvement de la détermination de la séquence de l'ovohémérythrine permettrait de la comparer aux différentes molécules impliquées dans la fixation des métaux et de suivre ainsi l'évolution de ce type de molécules dans le règne animal. Outre sa capacité à fixer le fer, il serait intéressant de voir si l'ovohémérythrine est en mesure de se lier à d'autres métaux et de rechercher le(s) rôle(s) de cette molécule chez la sangsue adulte et au cours du développement embryonnaire.

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

Les sangsues *T. tessulatum* proviennent d'un élevage réalisé *ab ovo* dans notre laboratoire, ce qui permet de disposer d'animaux dont le stade d'évolution est bien connu. Elles sont nourries sur des canards de barbarie (*Cairina moschata* L.).

A - PRELEVEMENT ET PREPARATION DES OVAIRES, DES CŒLOMOCYTES ET DU LIQUIDE CŒLOMIQUE

Les animaux sont anesthésiés à l'acétone chloroforme à 0,1% dans l'eau. Après incision longitudinale de l'animal :

- les ovaires sont prélevés en coupant à la limite de l'oviducte, puis sont lavés dans le tampon TBS (Tris/HCl 50mM, pH 7,4, NaCl 0,15M) ou PBS (phosphate 50mM, pH 7,4, NaCl 0,15M). Pour les analyses électrophorétiques et le dosage des protéines, les ovaires sont homogénéisés dans un Potter dans le tampon Tris/HCl 50mM, pH 8,8, NaCl 1M. Pour la purification de la vitelline, on utilise un tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8 contenant 0,15M de NaCl.

- de nombreuses incisions dans les poches cœlomiques permettent de libérer et de prélever le liquide cœlomique. Les cœlomocytes libres dans le liquide cœlomique sont récupérés après centrifugation de celui-ci. Après le lavage des cœlomocytes dans les mêmes tampons de lavage que ceux utilisés pour les ovaires, ils sont homogénéisés dans un appareil de Dounce, dans le tampon Tris/HCl 50mM, pH 7,4, NaCl 0,15M, Triton X-100 0,5% (P/V), PMSF 1mM, EDTA 5mM.

B - DETERMINATION DU VOLUME DU LIQUIDE CŒLOMIQUE

Cette opération est pratiquée sur des animaux préalablement pesés. 25 µl de bleu Evans à 0,5 µg/µl sont injectés dans la cavité cœlomique de l'animal. Le liquide cœlomique est récupéré 10 à 20 mn après l'injection du colorant puis 10 µl de chaque liquide cœlomique sont dilués dans 1 ml d'eau. La lecture de la densité optique se fait à 600 nm. Parallèlement à ce dosage, nous avons établi une courbe étalon à partir de dilutions connues de bleu Evans (fig. 41). Le report de la DO de chaque échantillon sur la courbe étalon permet de

déterminer la quantité du bleu Evans mesurée (Q_m) dans 10 μ l du liquide cœlomique.

Le volume total du liquide cœlomique est alors déterminé en utilisant la formule de Lee (1961).

$$V = V_m \times \frac{Q_i}{Q_m} - V_i$$

V_m = Volume du liquide cœlomique mesuré (10 μ l)

V_i = Volume du bleu Evans injecté à l'animal (25 μ l)

Q_m = Quantité de bleu Evans mesurée (déterminée à partir de la courbe étalon)

Q_i = Quantité de bleu Evans injectée à l'animal (12,5 μ g)

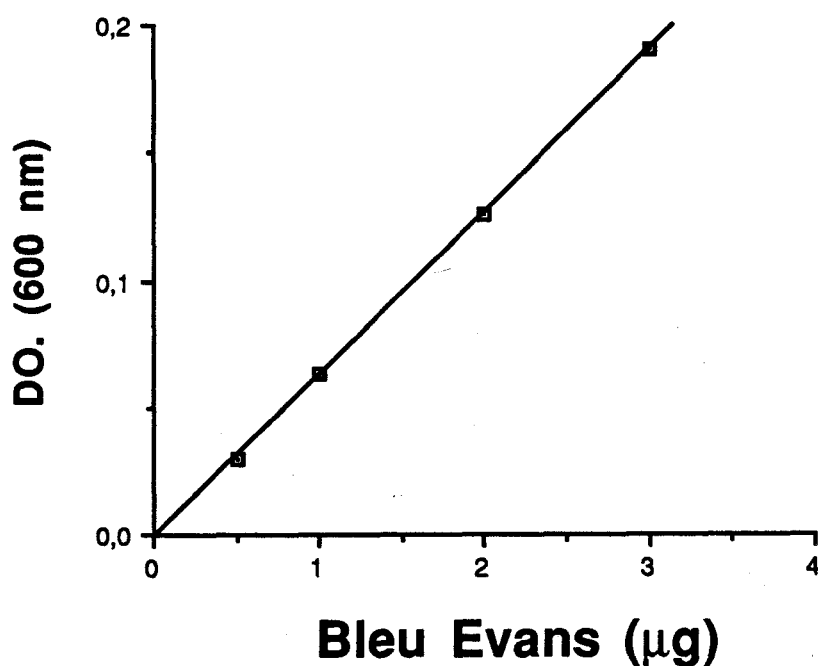


Figure 41 : Courbe étalon du bleu Evans à 600 nm.

II - MARQUAGE RADIOACTIF

A - MARQUAGE *IN VIVO*

Le marquage radioactif des protéines se fait par injection intracœlomique d'environ 1,2 MBq de L - (3,4,5 - ^3H) leucine (2,22 TBq/mmmole, CEA) par sangsue.

B - MARQUAGE *IN VITRO*

Les ovaires et les cœlomocytes sont incubés dans 0,5 ml de milieu, en présence de leucine tritiée à la dose de 1,6 MBq/ml. Le milieu utilisé est le milieu 199 (Eurobio) ou du liquide cœlomique prélevé sur des sangsues de stades 3B₄ à 3D₁₋₂. Les incubations ont été effectuées dans une chambre stérile à température constante de 15°C pendant 24 heures.

III - ISOLEMENT DES GLOBULES VITELLINS

Les ovocytes sortis de l'ovisac sont placés dans du tampon PBS et incisés un à un pour libérer leur contenu cellulaire. Celui-ci est filtré sur un tamis de nylon d'un diamètre de 48 μm , afin de séparer les débris membranaires de la fraction contenant les organites cellulaires. Cette dernière fraction ajustée à une concentration de 0,25M en saccharose est déposée au sommet d'un tube de rotor SW40 contenant un gradient discontinu de saccharose de 1,8-1,5-1,25-0,9 et 0,5M préparé dans le tampon PBS. Le tube est centrifugé à 100000 x g pendant 60 mn. Les globules vitellins sont récupérés au-dessus du coussin 1,8M et leur pureté est vérifiée en microscopie électronique.

IV - METHODES ELECTROPHORETIQUES

A - ELECTROPHORESE NATIVE

L'électrophorèse en milieu non dénaturant est réalisée dans un gradient 5-25% d'acrylamide (PAGGE), selon la méthode de Slater (1969), en utilisant 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 protéines sont colorées par le bleu de Coomassie R-250 à 0,1% (P/V) dans l'isopropanol

25%/acide acétique 10%/eau 65% pendant 2 h, puis décolorées par l'acide acétique à 10%. Les lipoprotéines sont détectées par le noir Soudan à 0,5% (P/V) dans l'acétone à 20%/acide acétique 15%/eau 65% (Part *et al.*, 1969). Les glycoprotéines sont révélées par le réactif de Schiff, selon la méthode de Zacharius *et al.* (1969).

Un mélange de protéines témoins de masse moléculaire 669 kDa (thyroglobuline), 440 kDa (ferritine), 232 kDa (catalase), 134 kDa (albumine dimère), 67 kDa (albumine) et 45 kDa (ovalbumine) est toujours analysé conjointement aux échantillons. Une courbe d'étalonnage est alors obtenue en portant le logarithme de la masse moléculaire des protéines témoins en fonction de leur distance de migration. Le report de la distance de migration d'une protéine analysée sur la courbe donne ainsi une valeur de masse moléculaire apparente.

B - ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence du dodécyle sulfate de sodium (SDS) est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Des gels de 0,75 mm d'épaisseur sont utilisés. Le gel de séparation est constitué par un gradient d'acrylamide 5-25% (SDS-PAGE). Avant le dépôt, les protéines sont traitées 3 mn au bain-marie bouillant dans le tampon d'échantillon: Tris/HCl 62,5mM ; pH 6,8, SDS 2% (P/V), saccharose 13% (P/V) et β -mercaptoéthanol à 5% (V/V). Les gels sont calibrés avec un mélange de protéines de masse moléculaire 200 kDa (myosine), 116 kDa (β -galactosidase), 94 kDa (phosphorylase-B), 67 kDa (albumine), 43 kDa (ovalbumine), 30 kDa (anhydrase carbonique), 20 kDa (inhibiteur de trypsine) et 14,4 kDa (α -lactalbumine).

La migration se fait à un ampérage constant de 4,5 mA sur la nuit. Le gel est coloré puis décoloré comme précédemment. La détection des bandes radioactives est effectuée par fluorographie. Le gel coloré par le bleu de Coomassie est traité par l'Amplify (Amersham) pendant 30 mn sous agitation. Le gel séché sur papier Whatman est mis en contact avec une plaque photographique (papier Royal-X-Omat de Kodak) préalablement exposée à un éclair de lumière orange diffuse (filtre Wratten 21 et papier Whatman 1). L'exposition est effectuée à - 70°C.

C - ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

Dans une première dimension, les protéines sont séparées par électrophorèse dans un gradient 5-30% d'acrylamide en milieu non dénaturant (gel de 0,75 mm d'épaisseur). Après la migration, la zone du gel où s'est effectuée la séparation des protéines est excisée. La bande de gel est équilibrée dans le tampon Tris/HCl 62,5mM ; pH 6,8 ; SDS 2% (P/V) ; β -mercaptoéthanol 1% (V/V) ; glycérol 10% (P/V), pendant 20 mn sous agitation. La bande de gel est ensuite déposée sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGGE, 1 mm d'épaisseur) et maintenue par de l'agarose à 1% (P/V) dans le tampon d'équilibration. La migration électrophorétique est réalisée comme au paragraphe précédent.

D - ELECTROFOCALISATION

L'électrofocalisation (IEF) de Vg520 et V490 natifs est réalisée dans un gel d'acrylamide à 5% contenant 3% d'ampholines à pH 3,5-9,5 (Ultrapag Pharmacia-LKB). La migration des protéines s'effectue à 0,39 V x 0,14 mA par cm² pendant 120 mn. L'électrofocalisation de l'ovohémérythrine native est réalisée dans un appareil Phast System (Pharmacia), en utilisant des gels de type Phast Gel IEF 3-9. Les conditions d'utilisations, la coloration et la décoloration, correspondent aux recommandations du fabricant. Un mélange de protéines témoins de points isoélectriques différents (Pharmacia) est analysé conjointement aux échantillons.

E - TRANSFERT ELECTROPHORETIC DES PROTEINES

Suite à une électrophorèse native (PAGGE), le gel est équilibré dans le tampon de transfert, Tris 25mM/glycine 192mM. Les protéines sont transférées sur une feuille d'Immobilon-P (Millipore) dans une cuve de transfert Biorad, contenant le même tampon que celui utilisé pour l'équilibration (courant constant de 250 mA pendant 3 h). Les protéines transférées sont détectées par l'amidoblack à 0,1% (P/V) dans une solution méthanol 45% (V/V), acide acétique 10% (V/V). Suite à une analyse électrophorétique en milieu dénaturant (SDS-PAGGE), le gel est équilibré dans le tampon de transfert Tris 25mM /glycine 192mM /méthanol 17% (V/V) /SDS 0,01% (P/V). Le transfert des protéines sur une feuille d'Immobilon-P s'opère comme précédemment.

V - METHODES IMMUNOLOGIQUES

A - OBTENTION DES SERUMS ANTI-V490 ET ANTI-Ovohr

Nous avons utilisé la méthode de Vaitukaitis *et al.* (1971). L'injection des produits purifiés est réalisée chez des lapins de race New Zealand. Après 3 semaines, des prélèvements de sang sont effectués régulièrement et la présence d'anticorps est contrôlée par immunorévélation après transfert des protéines sur une feuille d'Immobilon-P.

B - IMMUNOREVELATION DES PROTEINES APRES TRANSFERT SUR IMMOBILON-P

Après le transfert des protéines, les sites de fixation libres sont saturés par incubation de la feuille d'Immobilon-P pendant 1 h à température ambiante dans le tampon TBS/lait/Tween (Tris/HCl 20mM, pH 7,4, NaCl 0,15M, lait en poudre (Gloria) à 1% (P/V), Tween-20 à 0,05% (P/V)). L'incubation avec le premier anticorps se fait à température ambiante, pendant 2 h dans le tampon TBS/lait/Tween. Après plusieurs lavages, la membrane est incubée pendant 1 h avec un anticorps anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase (Institut Pasteur, Diagnostics Pasteur). L'activité de la peroxydase est révélée en incubant la feuille de transfert dans un mélange de 50 ml de TBS, 3 ml de 4-chloro-1-naphtol à 3% (P/V) dans le méthanol et 10 µl d'eau oxygénée à 30%.

C - DOSAGE ELISA DES VITELLOGENINES

Le test ELISA est réalisé sur des plaques Falcon 3912 à 96 puits. Les liquides cœlomiques sont dilués dans un tampon carbonate 0,1M, pH 9,5, le facteur de dilution variant en fonction de la concentration de l'antigène dosé (pour le dosage de Vg520, le facteur de dilution du liquide cœlomique varie entre 10^3 et 10^6 , tandis qu'il se situe entre 10^4 et 2.10^5 pour le dosage de l'ovohémérythrine). Par puits sont ensuite déposés 100 µl de l'échantillon à doser parallèlement aux antigènes purifiés, à différentes concentrations. Après 2 h d'incubation à 37°C, les puits sont lavés avec du tampon de lavage PBS/Tween (phosphate 50mM, pH 7,4 contenant 0,15M NaCl et 0,05% (P/V)

Tween-20). Les sites non spécifiques sont alors saturés par le tampon PBS/Tween/SAB (PBS/Tween 0,05% (P/V)/sérum albumine bovine 1% (P/V)), pendant 30 mn à 37°C. Après plusieurs lavages, les anticorps anti-V490 et anti-OvoHr sont appliqués à une dilution de 1/16000 dans le tampon PBS/Tween/SAB et laissés en contact pendant 2 h à 37°C. Après le lavage des plaques, les anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase sont appliqués à la dilution 1/5500 dans le tampon PBS/Tween/SAB. Après une incubation d'une heure et demi à 37°C, les complexes antigène-anticorps sont révélés par une réaction colorée utilisant 6 mg d'OPD (O-phénylènediamine, Sigma) dans 12 ml du tampon citrate 0,15M à pH 5,5 et 10 µl d'eau oxygénée à 30%. Après 10 à 15 mn, la lecture de la densité optique (DO) s'effectue à 490 nm sur Microelisa Minireader MR 590 (Dynatech). Une réponse linéaire entre la DO et la quantité d'antigène est obtenue entre 1 et 40 ng pour Vg520 et entre 1 et 200 ng pour l'ovohémérythrine (fig. 42 et 43). Par ailleurs, nous avons également testé par ELISA la réactivité du sérum anti-V490 sur l'ovohémérythrine et celle du sérum anti-OvoHr sur Vg520. Aucune réaction croisée n'a été obtenue (fig. 42 et 43).

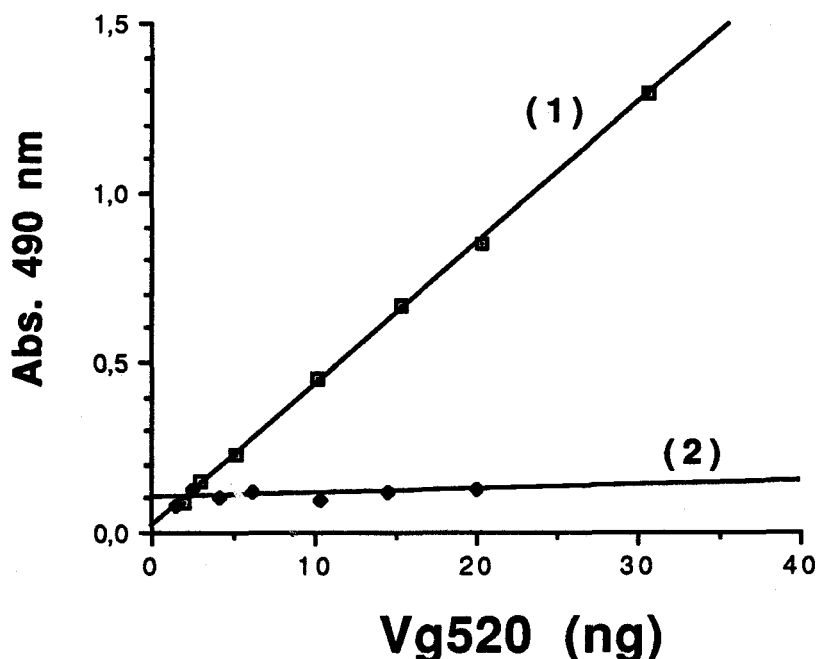


Figure 42 : Courbe étalon du dosage par la technique ELISA de Vg520 par le sérum polyclonal anti-V490 (1) et par le sérum polyclonal anti-OvoHr (2).

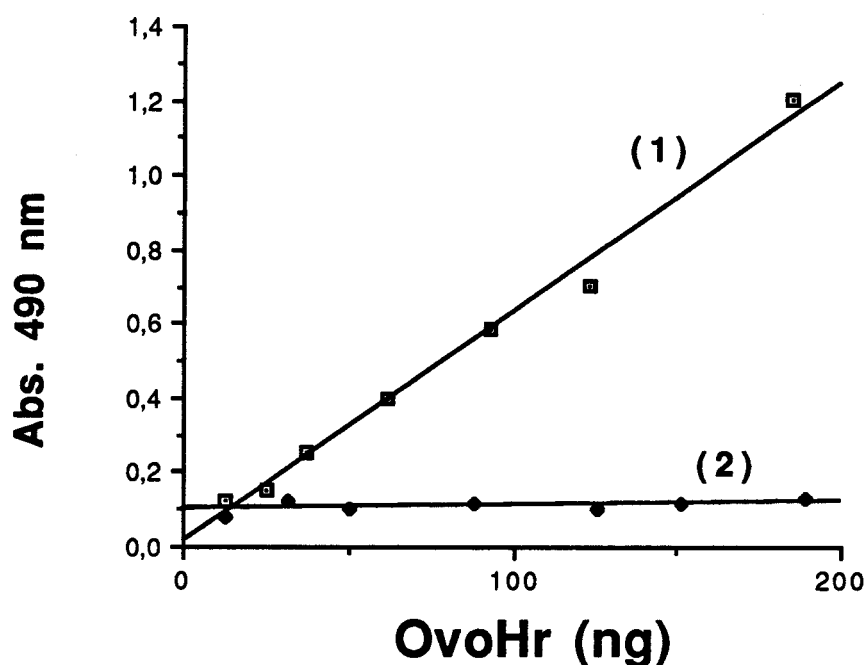


Figure 43 : Courbe étalon du dosage ELISA de OvoHr en utilisant le sérum anti-OvoHr (1) et le sérum anti-V490 (2).

D - IMMUNOPRECIPITATION

La fraction à traiter est mise en contact avec 5 μ l du sérum polyclonal anti-V490 et 3 mg du gel d'affinité (protéine-A-Sepharose). Après 2 h de contact sous agitation à température ambiante, la suspension est centrifugée 2 mn à 1000 x g. Le surnageant correspondant à la fraction immunosupprimée est prélevé et le culot est lavé à plusieurs reprises par le tampon TBS. Les protéines adsorbées sur le gel sont éluées par traitement du culot par 50 μ l de tampon de Laemmli à 100°C pendant 3 mn. Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines immunoprécipitées est analysé par SDS-PAGE.

E - METHODES IMMUNOHISTOCHIMIQUES

Les coupes ont été traitées selon la technique indirecte d'immunoperoxydase comprenant une première incubation avec l'antisérum spécifique (1/200-12 h à 4°C) suivie, après lavage, d'une incubation d'1 h avec

une dilution au 1/100 d'Ig de mouton anti-Ig de lapin conjuguées à la peroxydase de Raifort (Institut Pasteur, Diagnostics Pasteur). La visualisation de la peroxydase a été effectuée en plongeant les lames dans une solution de 4-chloro-1-naphtol (40 mg/100 ml de tampon Tris 0,1M/pH 7,6/0,01% de H₂O₂).

VI - PURIFICATION DES PROTEINES

A - U490

Les ovaires sont homogénéisés dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, NaCl 0,15M dans un appareil de Dounce. L'homogénat d'ovaires est ensuite filtré sur un tamis de nylon dont le diamètre des pores est de 10 µm. Après la filtration, l'homogénat est déposé sur un coussin de saccharose à 0,7M préparé dans le tampon d'homogénéisation, puis centrifugé à 5000 x g pendant 5 mn. A l'issue de la centrifugation on obtient la fraction soluble ovocytaire (FSO) et un culot. La majeure partie de la vitelline se trouve dans le culot. Celui-ci est repris dans le tampon d'homogénéisation et la suspension est centrifugée à 5000 x g pendant 5 mn. Cette opération est ensuite répétée deux fois. Après le dernier lavage, le culot est solubilisé dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, NaCl 1M.

B - Ug520

Le liquide coelomique est fractionné sur une colonne de gel filtration Superose 12 HR 10/30 en FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography", Pharmacia). L'élution est effectuée par le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, NaCl 0,1M à un débit de 0,4 ml/mn.

Les protéines contenues dans la fraction de masse moléculaire plus élevée sont ensuite chromatographiées sur une colonne d'échange d'anions Mono Q HR 5/5 (Pharmacia), préalablement équilibrée par le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, NaCl 0,1M. L'élution de Ug520 est effectuée par ce même tampon, à un débit de 1 ml/mn. Après le passage de 5 ml de tampon, les protéines fixées sont éluées par un gradient de NaCl 0,1 - 0,5M dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8.

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

C - YP13₀

Les protéines de la fraction soluble ovocytaire (FSO) issue de la centrifugation de l'homogénat d'ovaires (voir chapitre VI-1) sont chromatographiées sur une colonne de concanavoline-A-Sepharose, équilibrée dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, NaCl 0,15M, MnCl₂ 1mM. Les protéines de la fraction non retenue sont fractionnées sur la colonne de gel filtration Superose 12 équilibrée dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, NaCl 50mM. La fraction correspondant au pic majeur est ensuite chromatographiée sur une colonne d'échanges d'anions Mono Q préalablement équilibrée dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8. L'élution des protéines est effectuée par un gradient de NaCl de 0-0,15M dans le même tampon à un débit de 1 ml/mn. Le pic majeur contenant YP13₀ purifié est élué à environ 75mM de NaCl.

D - YP13_{LC}

Après la chromatographie de gel filtration du liquide cœlomique, la fraction qui correspond au pic de plus faible masse moléculaire est repassée sur une colonne de concanavoline-A-Sepharose, équilibrée dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, NaCl 0,15M, MnCl₂ 1mM. La suite de la purification correspond aux mêmes étapes que celles utilisées pour la purification de YP13₀.

VII - ANALYSES CHIMIQUES

A - LES SUCRES

(En collaboration avec le Pr. B. Fournet, UMA 111, Université de Lille I)

Les compositions glucidiques de Vg520 et V490 sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse (0,5M HCl/MeOH, 24 h, 80°C), selon la méthode décrite par Kamerling *et al.* (1975), modifiée par Montreuil *et al.* (1986).

B - LES LIPIDES

(En collaboration avec le Pr. C. Delbart, SERLIA, Institut Pasteur, Lille)

Une quantité voisine de 5 mg de lipoglycoprotéines purifiées est utilisée pour l'extraction des lipides. Cette extraction a été réalisée par le mélange chloroforme/méthanol selon la méthode de Folch *et al.* (1957), puis les lipides extraits sont pesés. Les stérols, les glycérides et les phospholipides ont été dosés par méthode enzymatique (Boehringer Mannheim, RFG). L'analyse quantitative des phospholipides a été effectuée après séparation sur couche mince selon la méthode décrite par Nouvelot *et al.* (1977).

C - LES ACIDES AMINES

(En collaboration avec le Dr. P. Sautière, Institut de Recherche sur le Cancer, URA CNRS 409, Lille)

La détermination de la composition en acides aminés des protéines purifiées a été réalisée après hydrolyse réalisée dans un tube scellé sous vide à 110°C, pendant 24 h dans HCl 6M. L'ajout d'une goutte de phénol à 1% permet d'éviter une dégradation excessive de la tyrosine. L'analyse des acides aminés a été effectuée sur un analyseur d'acides aminés Beckman 6300.

La séquence NH₂-terminale de l'ovohémérythrine a été déterminée par dégradation d'Edman automatisée dans un microséquenceur Applied Biosystems 470A en phase gazeuse, en utilisant le programme standard 03 RTPH. Les phenylthiohydantoïnes dérivés des acides aminés, ont été identifiés par l'analyseur Applied Biosystems 120A équipé d'un intégrateur-calculateur Shimadzu CR4A

D - LE FER

Le dosage de fer a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique de flamme sur un appareil Perkin-Elmer 2380 équipé d'un mélange air-acétylène.

VIII - TECHNIQUES DIVERSES

A - DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines est effectué avec le réactif de Biorad selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant des gammaglobulines comme standard.

B - MASSE MOLECULAIRE NATIVE DE L'OVOHEMERYTHRINE

La détermination de la masse moléculaire native de l'ovohémérytrine a été effectuée sur une colonne de gel filtration Superdex G75 16/60 (Pharmacia) en FPLC, dont la séparation est optimale entre 3000 et 70000 daltons. La calibration a été effectuée par la SAB (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), le chymotrypsinogène-A (25 kDa) et la ribonucléase-A (13,7 kDa).

C - ELIMINATION DU FER DE L'OVOHEMERYTHRINE

L'élimination du fer de l'ovohémérytrine purifiée a été obtenue en utilisant une méthode décrite par Groskopf *et al.* (1966). La solution de l'ovohémérytrine est ajustée en HCl à 0,2N final. Après décoloration de la solution, les protéines sont précipitées par 8 volumes d'acétone froid. Après centrifugation, le culot est suspendu de nouveau dans une solution d'HCl 0,2N puis reprecipité par l'acétone comme précédemment. Cette opération est ensuite répétée trois fois. Après la dernière précipitation, le culot est lavé trois fois par l'acétone puis séché. Le culot est alors repris dans le tampon Tris/HCl 20mM, pH 8,8, NaCl 0,15M, contenant 50mM de soude.

L'absence de fer au niveau de cette solution a été confirmée après le dosage de celui-ci en spectrométrie d'absorption atomique de flamme.

D - SPECTRE D'ABSORPTION DE L'OVOHEMERYTHRINE

Le spectre d'absorption de l'ovohémérytrine purifiée a été effectué sur un appareil Perkin-Elmer lambda 5.

BIBLIOGRAPHIE

BAERT J.-L. (1985).

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

Comp. Biochem. Physiol., **81B**, 851-856.

BAERT J.-L. (1988).

A 15 000-Mr protein proteolytically derived from vitellogenin within oocyte of *Perinereis cultrifera* (Polychaete annelid). Identification, purification and partial characterization.

Eur. J. Biochem., **177**, 625-630.

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

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

Eur. J. Biochem., **142**, 527-532.

BAERT J.-L., SLOMIANNY M.-C. (1987).

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

Comp. Biochem. Physiol., **88B**, 1191-1199.

BAKER M.E. (1988).

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

Biochem. J., **255**, 1057-1060.

BAPTISTA C.A., GERSHON T.R., MACAGNO E.R. (1990).

Peripheral organs control central neurogenesis in the leech.

Nature, **346**, 855-858.

BAPTISTA C.A., MACAGNO E.R. (1988).

The role of the sexual organs in the generation of postembryonic neurons in the leech *Hirudo medicinalis*.

J. Neurobiol., **19**, 707-726.

BARNES B.M., BICK K.L. (1983).

Histochemistry of the hemocel tissues of the leech *Haemopsis marmorata*.

Trans. Am. Microsc. Soc., **102**, 194-212.

BONNIER P. (1990).

La vitellogénèse chez *Nereis diversicolor*. Mise en évidence et caractérisation du processus de protéolyse impliqué dans la conversion intraovocytaire de la vitellogénine en vitellines.

Thèse d'Université (Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois).

BOTTKE W. (1982).

Isolation and properties of vitellogenic ferritin from snails.

J. Cell Sci., **58**, 225-240.

BOWNES M. (1986).

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

Ann. Rev. Entomol., **31**, 507-531.

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**, 327-330.

BRADFORD M.M. (1976).

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding.

Anal. Biochem., **72**, 248-254.

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

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

Dev. Biol., **89**, 225-236.

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

The evolution of egg yolk proteins.

Progr. Biophys. Molec. Biol., **53**, 33-69.

CHINO H., YAMAGATA M., SATO S. (1977).

Further characterization of lepidopteran vitellogenin from haemolymph and mature eggs.

Insect Biochem., **7**, 125-131.

CHINZEI Y., CHINO H., TAKAHASHI K. (1983).

Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*.

J. Comp. Physiol., **152**, 13-21.

CHINZEI Y., CHINO H., WYATT G.R. (1981).

Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*.

Insect Biochem., **11**, 1-7.

CURGY J.-J., VENNIN M., BAERT J.-L. (1987).

The extra-oocyte synthesis of the egg yolk precursor, vitellogenin, in *Perinereis cultrifera* (Annelida, Polychaeta) : evidence from cell-free translation of mRNA.

Biol. Cell, **59**, 187-192.

DAMAS D. (1964a).

Succinodeshydrogénases ovariennes de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhynchobdelle), en rapport avec la phase d'accroissement des œufs.

C. R. Acad. Sci. Paris, **258**, 1895-1896.

DAMAS D. (1964b).

Structure et rôle du rachis ovarien chez *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhynchobdelle).

Bull. Soc. Zool. Fr., **89**, 147-155.

DAMAS D. (1965).

Mode de nutrition des cellules mâles et femelles de *Glossiphonia complanata* (Hirudinée, Rhynchobdelle) durant la spermatogenèse et l'ovogenèse.

Bull. Soc. Zool. Fr., **90**, 337-338.

DAMAS D. (1969).

Appareil génital et fécondation par voie hypodermique chez *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhynchobdelle). Etude histophysiologique.

Thèse Fac. Sci. Univ. Paris.

DAMAS D. (1977).

Anatomie microscopique et évolution de l'appareil génital femelle de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhynchobdelle), au cours du cycle annuel. Etude histologique et ultrastructurale.

Arch. Zool. Exp. Gén., **118**, 29-42.

DAVIS B.J. (1964).

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

Ann. N.Y. Acad. Sci., **121**, 404-427.

DEMUYNCK S., SAUTIERE P., VAN BEEUMEN J., DHAINAUT-COURTOIS N. (1991).

Homologies entre les hémérythrines des sipunculiens et une métalloprotéine complexant le cadmium (MP II) d'une annélide polychète, *Nereis diversicolor*.

C. R. Acad. Sci., Paris, **312**, 317-322.

DHAINAUT A., RAVEILLON B., M'BERI M., PORCHET-HENNERE E., DEMUYNCK S. (1989).

Purification of an antibacterial protein in the coelomic fluid of *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). Similitude with a cadmium-binding protein.

Comp. Biochem. Physiol., **94C**, 555-560.

DUMONT J.N. (1969).

Oogenesis in the Annelid *Enchytraeus albidus* with special reference to the origin and cytochemistry of yolk.

J. Morphol., **129**, 317-343.

ECKELBARGER K.J. (1988).

Oogenesis and female gametes.

In: The ultrastructure of Polychaeta (Westheide W., Hermans C.O., eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, Microfauna marina, **4**, 281-307.

EISEINSTADT T.B. (1964).

Etude cytologique de l'ovogenèse. I. Morphologie de la gonade de *Glossiphonia complanata* L. d'après les données de la microscopie optique et électronique.

Citologija, 6, 19-21.

EISEINSTADT T.B. (1965).

Quelques particularités de l'ultrastructure des ovocytes en rapport avec la synthèse du vitellus.

Zh. Obshch. Biol., 26, 230-236.

EISEINSTADT T.B., BRODSKII V.J. (1963).

The fine structure of the ovular membranes of the leech.

Dokl. Akad. Nauk SSSR, 148, 7-70

EISEINSTADT T.B., BRODSKII V.J., GAZARJAN K.G. (1967).

Etude autoradiographique de la synthèse d'ARN et de protéines dans les gonades d'animaux avec différents types d'ovogenèse.

Citologija, 9, 397-406.

ENGELMANN F. (1979).

Insect vitellogenin : identification, biosynthesis and role in vitellogenesis.

Adv. Insect Physiol., 14, 49-108.

ENGELMANN F., FRIEDEL T., LADDUWAHETTY M. (1976).

The native vitellogenin of the cockroach *Leucophaea maderae*.

Insect Biochem., 6, 211-220.

EVANS B.D., CALABRESE R.L. (1989).

Small cardioactive peptide-like immunoreactivity and its colocalization with FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*.

Cell Tissue Res., 257, 187-199.

FERRELL R.E.,KITTO G.B. (1971).

Structural studies on *Dendrostomum pyroides* Hemerythrin

Biochem., 10, 2923-2929.

FISCHER A., RABIEN H. (1986).

Molecules and cellular functions driving oocyte growth in nereid annelids.

In: Advances in invertebrate reproduction, (Porchet M., Andriès J.-C., Dhainaut A., eds) Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, Vol. IV, pp. 195-205.

FISCHER A., SCHMITZ K. (1981).

Preparation, properties and composition of *Nereis* vitellin, the yolk protein of the annelid *Nereis virens*.

Differentiation, **19**, 103-108.

FOLCH J., LEES A.M., MEATH J.A., LEBARON F.N. (1957).

Preparation of lipid extracts from brain tissues.

J. Biol. Chem., **191**, 833-841.

GINTSBURG G.I. (1966).

Incorporation of some aminoacids into the egg cell during oogenesis of *Glossiphonia complanata* L.

Zh. Obshch. Biol., **27**, 575-582.

GINTSBURG G.I. (1967a).

Autoradiographic study of the nucleic acids biosynthesis during the oogenesis of *Glossiphonia complanata* L.

Zh. Obshch. Biol., **28**, 322-334.

GINTSBURG G.I. (1967b).

Particularités de la participation du noyau des ovocytes à la biosynthèse des acides nucléiques.

Struktura i funkcii kletochnojojadra, Izdat Nauka, 209-213.

GINTSBURG G.I. (1971).

Incorporation of H^3 -thymidine into the cytoplasm of oocytes during various periods of their growth.

Sov. J. Devl. Biol. , **2**, 63-69.

GROSKOPF W.R., HOLLEMAN J.W., MARGOLIASH E., KLOTZ I.M. (1966).

Amino acid composition and terminal sequences of *Golfingia gouldii* hemerythrin.
Biochem., 5, 3779-3782.

GRUZOVA M.M., ZAICHIKOVA Z.P. (1967).

La cryosphère dans l'ovogenèse de *Glossiphonia complanata*.
Citologija, 9, 388-396.

GUTZEIT O. (1980).

Yolk synthesis in ovarian follicles of *Drosophila*.
Wilhelm Roux's Arch., 189, 221-224.

HAGADORN I.R. (1962).

Functional correlates of neurosecretion in the Rhynchobdellid leech, *Theromyzon rude*.
Gen. Comp. Endocrinol., 2, 516-540.

HAGADORN I.R. (1966).

Neurosecretion in the Hirudinea and its possible role in reproduction.
Amer. Zool., 6, 251-261.

HAGADORN I.R. (1967).

Hormonal control of spermatogenesis in *Hirudo medicinalis*.
IV° Symposium International sur la neurosécrétion, Strasbourg, Springer-Verlag, New-York, pp. 219-228.

HAGADORN I.R. (1969).

Hormonal control of spermatogenesis in *Hirudo medicinalis*. II. Testicular response to brain removal during the phase of testicular maturity.
Gen. Comp. Endocrinol., 12, 469-478.

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

Vitellogenin and vitellin in insects.
Ann. Rev. Entomol., 24, 475-505.

HARNISH D.G., WHITE B.N. (1982a).

Insect vitellins : identification, purification, and characterization from eight orders.
J. Exp. Zool., **220**, 1-10.

HARNISH D.G., WHITE B.N. (1982b).

An evolutionary model for the insect vitellins.
J. Molec. Evol., **18**, 405-413.

HOLMES M.A., LE TRONG I., TURLEY S., SIEKER L.C., STENKAMP R.E. (1991).

Structures of deoxy and oxy hemerythrin at 2.0 Å resolution.
J. Mol. Biol., **218**, 583-593.

HOLMES M.A., STENKAMP R.E. (1991).

Structures of met and azidomet hemerythrin at 1.66 Å resolution.
J. Mol. Biol., **220**, 723-737.

HOTZ H. (1938).

Protoclepsis tessellata (O.F. Müller). Ein beitrage zur kenntnis von bau und lebensweise der Huridineen.
Rev. Suisse Zool., **45**, 1-380.

JAMIESON B.G.M. (1981).

In: The ultrastructure of Oligochaeta, Acad. Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, pp. 462.

JAMIESON B.G.M. (1988).

Oligochaete ultrastructure: Some comparisons with the Polychaeta.
In: The ultrastructure of Polychaeta (Westheide W., Hermans C.O., eds)
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 397-428.

JENSEN P.V., HANSEN B.L., HANSEN G.N., THOMSEN E. (1981).

Vitellogenin and vitellin from the Blowfly *Calliphora vicina* : occurrence, purification and antigenic characterization.
Insect Biochem., **11**, 129-135.

KAMERLING J.P., GERWIG G.J., VLIEGENTHART J.F.G., CLAMP J.R. (1975).

Characterization by gas liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids.

Biochem. J., **151**, 491-495.

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

Tissue specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*.

Dev. Biol., **96**, 189-196.

KLIPPENSTEIN G.L., COTE J.L., LUDLAM S.E. (1976).

The primary structure of myohemerythrin.

Biochem., **15**, 1128-1136.

KUHLMAN J.R., LI C., CALABRESE R.L. (1985).

FMRF-amide-like substances in the leech. I. Immunocytochemical localization.

J. Neurosci., **5**, 2301-2309.

LAEMMLI U.K. (1970).

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

Nature, **227**, 680-685.

LECHENAULT H. (1968).

Etude cytochimique et ultrastructurale de l'ovocyte d'*Eisenia foetida* (Sav.).

Z. Zellforsch., **90**, 96-112.

LEE R.M. (1961).

The variation of blood volume with age in the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forsk).

J. Insect Physiol., **6**, 36-51.

LIBERATORE F.A., TRUBY M.F., KLIPPENSTEIN G.L. (1974).

The quaternary structure of *Phascolosoma agassizii* coelomic hemerythrin.

Arch. Biochem. Biophys., **160**, 223-229.

MACAGNO E.R. (1980).

Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia.

J. Comp. Neurol., **190**, 283-302.

MALECHA J. (1967).

Etude en culture organotypique de l'influence endocrine de la masse nerveuse péripharyngienne sur la maturation testiculaire chez *Hirudo medicinalis* L.

C. R. Acad. Sci. Paris, **265**, 1806-1808.

MALECHA J. (1970).

Etude, en culture organotypique, du contrôle hormonal de la spermatogenèse chez *Hirudo medicinalis* (Hirudinée Gnathobdelliforme).

Gen. Comp. Endocrinol., **14**, 313-320.

MALECHA J. (1979).

Mise en évidence d'une action du système nerveux central sur les échanges d'eau chez l'Hirudinée Rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.).

C. R. Acad. Sci. Paris, **288**, 693-696.

MALECHA J. (1983).

L'osmorégulation chez l'hirudinée rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). Localisation expérimentale de la zone sécrétrice d'un facteur de régulation de la balance hydrique.

Gen. Comp. Endocrinol., **49**, 344-351.

MALECHA J., VERGER-BOCQUET M., LEPRETRE A., TRAMU. G.(1989a).

Mise en évidence d'une action des anticorps anti-ocytocine sur les échanges d'eau chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.).

C. R. Acad. Sci. Paris, **309**, 127-130.

MALECHA J., VERGER-BOCQUET M., TRAMU G. (1989b).

Mise en évidence et évolution, au cours du cycle biologique, de neurones producteurs d'une substance apparentée à la motiline porcine dans le ganglion supracéphagien de la sangsue *Theromyzon tessulatum*.

Can. J. Zool., **67**, 636-640.

MASUDA H., OLIVEIRA P.L. (1985).

Characterization of vitellin and vitellogenin from *Rhodnius prolixus*. Identification of phosphorylated compounds in the molecule.

Insect Biochem., **15**, 543-550.

MEUSY J.-J. (1980).

Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in Crustacea : A review.

Reprod. Nutr. Develop., **20**, 1-21.

MONTREUIL J., BOUQUELET S., DEBRAY H., FOURNET B., SPIK G., STRECKER G. (1986).

Glycoproteins

In: Carbohydrate analysis, a practical approach. (Chaplin, M.F.,

Kennedy J.F., eds), IRL Press, Oxford. Washington DC, pp. 143-204.

NEJMEDDINE A., DHAINAUT-COURTOIS N., BAERT J.-L., SAUTIERE P., FOURNET B., BOULENGUER P. (1988).

Purification and characterization of a cadmium-binding protein from *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta).

Comp. Biochem. Physiol., **89C**, 321-326.

NOCEK J.M., KURTZ D.M., PICKERING R.A., DOYLE M.P. (1984).

Oxidation of deoxyhemerythrin to semi-methemerythrin by nitrite.

J. Biol. Chem., **259**, 12334-12338.

NORDIN J.H., GOCHOCO C.H., WOJCHOWSKI D.M., KUNKEL J.G. (1984).

A comparative study of the size-heterogeneous high mannose oligosaccharides of some insect vitellins.

Comp. Biochem. Physiol., **79B**, 379-390.

NOUVELOT A., SEZILLE G., DEWAILLY P., FRUCHART J.G. (1977).

Chromatographie monodimensionnelle des lipides polaires sur couche mince de gel de silice en gradient discontinu d'humidité.

Rev. Fr. Corps Gras, **7**, 365-366.

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

Coloration des lipoprotéines après électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Bull. Soc. Chim. Biol., **51**, 1367-1369.

PEREIRA S.D., DE BIANCHI A.G. (1983).

Vitellogenin and vitellin of *Rhynchosciara americana*: further characterization and time of synthesis.

Insect Biochem., **13**, 323-332.

POSTLETHWAIT J.H., BOWNES M., JOWETT T. (1980).

Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*.

Dev. Biol., **79**, 379-387.

POSTLETHWAIT J.H., GIORGI F. (1985).

Vitellogenesis in insects.

In: Developmental Biology, a comprehensive synthesis. Vol. 1, Oogenesis (Browder L.W., ed), Plenum Publ., pp. 85-125.

SAWYER R.T. (1986).

In: Leech biology and behaviour. Clarendon Press. Oxford.

SHARROCK W.J. (1984).

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

J. Mol. Biol., **174**, 419-431.

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

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

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **83**, 3865-3869.

SLATER G.G. (1969).

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

Anal. Chem., **41**, 1039-1041.

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

The nucleotide sequence of a nematode vitellogenin gene.

Nucl. Ac. Res., **13**, 7129-7137.



SUBRAMANIAN A.R., HOLLEMAN J.W., KLOTZ I.M. (1968).

The primary structure of *Golfingia gouldii* hemerythrin. Interpeptide overlaps and sequences from chymotryptic peptides.

Biochem., 7, 3859-3867.

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

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

J. Clin. Endoc., 33, 988-991.

VAN DAMME N. (1976).

Maturation génitale précoce par destruction des ganglions buccaux chez la sangsue *Erpobdella octoculata* L. (Hirudinée-Pharyngobdelle).

C. R. Acad. Sci. Paris, 283, 967-969.

VAN DAMME N. (1978).

Rôle des ganglions buccaux dans la reproduction chez la sangsue *Erpobdella octoculata* L. (Hirudinée-Pharyngobdelle).

Arch. Biol. Bruxelles, 89, 451-482.

VERGER-BOCQUET M., SALZET M., WATTEZ C., MALECHA J. (1991).

Mise en évidence et caractérisation d'une substance apparentée à l'ocytocine dans les cellules surnuméraires des ganglions génitaux de la sangsue *Erpobdella octoculata*.

C. R. Acad. Sci. Paris, 313, 307-310.

WALLACE R.A. (1985).

Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates.

In :Developmental biology, (Browder L.W., ed.), Plenum Publ. Corp., Vol. I, pp. 127-177.

WALLACE R.A., WALKER S.L., HAUSCHKA P.V. (1967).

Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of Decapods.

Biochem., 6, 1582-1590.

WILKIALIS J. (1970).

Investigations on the biology of leeches of the Glossiphoniidae family.
Zool. Pol., **20**, 29-54.

WILKIALIS J., DAVIES R.W. (1980a).

The population ecology of the leech (Hirudinoidea: Glossiphoniidae) *Theromyzon tessulatum*.
Can. J. Zool., **58**, 906-912.

WILKIALIS J., DAVIES R.W. (1980b).

The reproductive biology of *Theromyzon tessulatum* (Glossiphoniidae: Hirudinoidea), with comments on *Theromyzon rude*.
J. Zool., Lond., **192**, 421-429.

YANO H., SATAKE K., UENO Y., KONDO K., TSUGITA A. (1991).

Amino acid sequence of the hemerythrin α subunit from *Lingula unguis*.
J. Biochem., **110**, 376-380.

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

Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels.
Anal. Biochem., **30**, 148-152.

ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C., VINCENDON G. (1972).

Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methyl glucosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycolipids and glycoproteins.
J. Chromatogr., **69**, 291-304.

ZHANG J.-H., KURTZ D.M. (1991).

Two distinct subunits of hemerythrin from the brachiopod *Lingula reevii*: An apparent requirement for cooperativity in O₂ binding.
Biochem., **30**, 9121-9125.

ZHANG J.-H., KURTZ D.M., XIA Y.M., DEBRUNNER P.G. (1991).

Reconstitution of the diiron sites in hemerythrin and myohemerythrin.
Biochem., **30**, 583-589.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
---------------------------	---

RESULTATS	3
------------------------	---

LE CYCLE VITAL ET LES PRINCIPALES ETAPES DE LA MATURATION GENITALE DE <i>T. TESSULATUM</i>	3
---	---

LE SYSTEME VITELLINE-VITELLOGENINE	10
---	----

I - IDENTIFICATION ET PURIFICATION DE LA VITELLINE	10
--	----

A - ANALYSE DES PROTEINES OVOCYTAIRES	10
---	----

B - PURIFICATION DE LA VITELLINE	12
--	----

II - IDENTIFICATION ET PURIFICATION DE LA VITELLOGENINE	14
---	----

A - IDENTIFICATION DE LA VITELLOGENINE	14
--	----

B - PURIFICATION DE LA VITELLOGENINE	16
--	----

III - CARACTERISATION COMPAREE DE LA VITELLINE ET DE LA VITELLOGENINE	17
--	----

A - MASSE MOLECULAIRE NATIVE	17
------------------------------------	----

B - POINT ISOELECTRIQUE.....	18
------------------------------	----

C - COMPOSITION SOUS-UNITAIRE	18
-------------------------------------	----

D - COMPOSITION EN LIPIDES	19
----------------------------------	----

E - COMPOSITION EN ACIDES AMINES	22
--	----

F - COMPOSITION EN SUCRES	23
---------------------------------	----

IV - DISCUSSION.....	24
----------------------	----

V - CONCLUSION.....	27
---------------------	----

AUTRE MOLECULE IMPLIQUEE DANS LE PROCESSUS DE VITELLOGENESE	28
--	----

I - MISE EN EVIDENCE ET PURIFICATION	29
--	----

A - ETUDE AU NIVEAU DES OVAIRES.....	29
--------------------------------------	----

1 : IDENTIFICATION.....	29
-------------------------	----

2 : PURIFICATION DE YP13	30
--------------------------------	----

3 : ANTICORPS ANTI-YP13	33
-------------------------------	----

B - ETUDE AU NIVEAU DU LIQUIDE CÉLOMIQUE.....	33
---	----

1 : IDENTIFICATION.....	33
-------------------------	----

2 : PURIFICATION	34
------------------------	----

II - CARACTERISATION.....	35
---------------------------	----

A - MASSE MOLECULAIRE ET POINT ISOELECTRIQUE.....	35
---	----

1 : MASSE MOLECULAIRE.....	35
----------------------------	----

2 : POINT ISOELECTRIQUE.....	35
B - COMPOSITION CHIMIQUE	36
1 : LIPIDES ET SUCRES.....	36
2 : ACIDES AMINES ET SEQUENCE N-TERMINALE	36
3 : METAUX ASSOCIES A YP13.....	38
III - DISCUSSION ET CONCLUSION	39

EVOLUTION DU TAUX DE VITELLOGENINE ET D'OVOHEMERYTHRINE AU COURS DU CYCLE

VITAL	42
I - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DU LIQUIDE CÉLOMIQUE.....	42
II - DOSAGE DE LA VITELLOGENINE ET DE L'OVOHEMERYTHRINE PAR ELISA ("Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay")	43
A - Vg520.....	43
B - OVOHEMERYTHRINE.....	45
III - DOSAGE DES PROTEINES TOTALES DU LIQUIDE CÉLOMIQUE ET DES OVAIRES.....	45
A - LIQUIDE CÉLOMIQUE	46
1 : CONCENTRATION DES PROTEINES DANS LE LIQUIDE CÉLOMIQUE.....	46
2 : VOLUME DU LIQUIDE CÉLOMIQUE.....	47
B - OVAIRE.....	49
1 : DOSAGE DES PROTEINES DES OVAIRES	49
2 : ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES OVARIENNES.....	50
IV - DISCUSSION ET CONCLUSION	51

ETUDE DE LA SYNTHÈSE DE Vg520	54
I - LA SYNTHÈSE AU COURS DU STADE 3.....	54
II - CAPACITÉ DE SYNTHÈSE DES OVAIRES	54
III - RECHERCHE DU SITE DE SYNTHÈSE.....	57
A - ETUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE.....	57
B - ETUDES METABOLIQUES	57
1 : INCUBATION <i>IN VITRO</i> DES CÉLOMOCYTES.....	57
2 : CINÉTIQUE DE MARQUAGE <i>IN VIVO</i>	59
3 : DISCUSSION	62
IV - CONTRÔLE ENDOCRINE DE LA VITELLOGÈNESE.....	63

A - DECEREBRATION.....	64
B - AUTRES OPERATIONS	67
1 : ABLATION DES GANGLIONS GENITAUX.....	67
2 : OVARIECTOMIE	68
3 : OVIDUCTOMIE.....	69
V - DISCUSSION ET CONCLUSION	70

CONCLUSION..... 71

MATERIEL ET METHODES 75

I - MATERIEL BIOLOGIQUE	75
A - PRELEVEMENT ET PREPARATION DES OVAIRES, DES CŒLOMOCYTES ET DU LIQUIDE CŒLOMIQUE.....	75
B - DETERMINATION DU VOLUME DU LIQUIDE CŒLOMIQUE.....	75
II - MARQUAGE RADIOACTIF	77
A - MARQUAGE <i>IN VIVO</i>	77
B - MARQUAGE <i>IN VITRO</i>	77
III - ISOLEMENT DES GLOBULES VITELLINS.....	77
IV - METHODES ELECTROPHORETIQUES.....	77
A - ELECTROPHORESE NATIVE.....	77
B - ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS	78
C - ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE	79
D - ELECTROFOCALISATION.....	79
E - TRANSFERT ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES.....	79
V - METHODES IMMUNOLOGIQUES.....	80
A - OBTENTION DES SERUMS ANTI-V490 ET ANTI-OvoHr.....	80
B - IMMUNOREVELATION DES PROTEINES APRES TRANSFERT SUR IMMOBILON-P	80
C - DOSAGE ELISA DES VITELLOGENINES	80
D - IMMUNOPRECIPITATION	82
E - METHODES IMMUNOHISTOCHIMIQUES.....	82
VI - PURIFICATION DES PROTEINES.....	83
A - V490.....	83
B - Vg520.....	83
C - YP13 _O	84
D - YP13 _{LC}	84
VII - ANALYSES CHIMIQUES.....	84
A - LES SUCRES	84

B - LES LIPIDES.....	85
C - LES ACIDES AMINES	85
D - LE FER	85
VIII - TECHNIQUES DIVERSES.....	86
A - DOSAGE DES PROTEINES	86
B - MASSE MOLECULAIRE NATIVE DE L'OVOHEMERYTHRINE.....	86
C - ELIMINATION DU FER DE L'OVOHEMERYTHRINE.....	86
D - SPECTRE D'ABSORPTION DE L'OVOHEMERYTHRINE.....	86
BIBLIOGRAPHIE	87
SOMMAIRE	101

Ce travail a fait jusqu'à présent l'objet :

de deux présentations aux colloques :

- Second international conference of leech scientists, OTTAWA (Canada), juin 1988 (communication sur poster).
- Congrès international de la société zoologique de France, REIMS, juillet 1991 (communication orale)

et des publications suivantes :

- Yolk protein in leech : Identification, purification and characterization of vitellin and vitellogenin. Eur. J. Biochem. **201**, 191-198 (1991).
- La vitellogenèse chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*. Nature et évolution quantitative du composé majeur du vitellus. Bull. Soc. Zool. Fr. (sous presse)



RESUME

Chez la sangsue semelpare *Theromyzon tessulatum*, le troisième et dernier repas de sang déclenche la gamétogenèse mâle et femelle ainsi qu'une importante rétention d'eau. Ce dernier phénomène atteint son apogée juste avant l'accumulation du vitellus dans les ovocytes. La vitellogenèse représente un métabolisme cible dont la connaissance s'avère indispensable à la compréhension des interrelations entre les différents événements physiologiques de cette phase de maturation de la sangsue.

Dans le cadre de l'étude de la vitellogenèse, nous avons identifié et purifié la vitelline et son précurseur extraovarien, la vitellogénine. Ces deux lipoglycoprotéines se distinguent par la solubilité, la quantité de lipides associés et la masse moléculaire. Ces différences sont probablement liées à une perte de lipides lors de la transformation intraovocytaire de la vitellogénine en vitelline. Une autre protéine majeure du vitellus a également été mise en évidence et purifiée. Contrairement à la vitelline, ce n'est pas une lipoglycoprotéine mais une protéine monomérique complexant le fer. En raison de nombreuses similitudes avec les hémérythrines, cette protéine a été dénommée ovohémérythrine. Tout comme la vitelline, l'ovohémérythrine est issue d'un précurseur extraovarien qui a été purifié à partir du liquide coelomique.

L'ovohémérythrine est retrouvée dans le coelome quel que soit le stade de développement de la sangsue, par contre la vitellogénine n'apparaît dans ce milieu qu'après le troisième repas de sang. Toutefois, à partir de ce stade, l'évolution quantitative de ces molécules est similaire : elles s'accumulent dans le liquide coelomique pendant la phase active de rétention d'eau puis sont incorporées par les ovocytes peu avant la ponte. Une étude préliminaire du contrôle de la vitellogenèse a permis de montrer que seuls les ganglions cérébroïdes agissent à la fois sur l'osmorégulation et les synthèses de vitellogénine.