Article original

**Analyse des réserves nutritives protéiques
du clitellum et de l'albumen du cocon
chez *Eisenia fetida* Sav (annélide oligochète).
Mise en évidence d'une glycolipoprotéine
comparable à une vitellogénine**

L Rouabah-Sadaoui *, R Marcel **

Laboratoire d'écophysiologie d'invertébrés du sol, université des sciences et technologies de Lille,
59655 Villeneuve-d'Ascq cedex

(Received 25 January 1995; accepted 30 May 1995)

Résumé — Dans le clitellum d'*Eisenia fetida*, durant la puberté, le taux des protéines totales diminue notablement et celui des protéines solubles augmente. Dans l'albumen des cocons, l'accroissement des protéines totales et des protéines solubles correspond au développement des embryons. Trois protéines majeures (A, B et C) sont séparées par électrophorèse à partir des protéines solubles : A (poids moléculaire = 420 kDa) est de nature glycolipoprotéique, B (PM = 350 kDa) et C (PM = 150 kDa) sont des glycoprotéines. Seule la glycolipoprotéine A est présente au cours du développement des embryons : elle a les mêmes caractères qu'une vitellogénine, bien qu'elle soit absente dans les ovocytes. Après sa dénaturation, 4 polypeptides sont séparés. Deux d'entre eux, a et c, sont impliqués dans la constitution de cette «vitellogénine».

protéine / *Eisenia* / cocon / ver de terre

Summary — Analysis of proteinic nutrients in clitellum and cocoon's albumen in *Eisenia fetida* Sav (Annelida Oligochaeta). Evidence for a vitellogenin-like glycolipoprotein. In the clitella of *Eisenia fetida*, the amount of total proteins decreased dramatically during puberty. In contrast, the level of soluble proteins increased during the same period. In the cocoons, the increase of total proteins and soluble proteins corresponded to the development of the embryos. Among the soluble proteins of the mature clitellum, 3 major proteins (A, B and C) were separated by electrophoresis: A, glycolipoprotein (molecular weight = 420 kDa), B, glycoprotein (MW = 350 kDa) and C, also glycoprotein (MW = 150 kDa). Only A was present in the cocoons during all the stages of development. Although this protein

* Adresse actuelle : Institut des sciences biologiques, université de Constantine, Constantine, Algérie.

** Correspondance et tirés à part

is not incorporated in the oocyte, it has the same characteristics as a typical vitellogenin. After denaturation of the soluble proteins, 4 polypeptides were obtained. Two of them, a and c, are involved in the making of this 'vitellogenin'.

protein / *Eisenia* / cocoon / earthworm

INTRODUCTION

Les oligochètes pondent leurs œufs dans un cocon sécrété par le clitellum, différenciation de l'épiderme dorsal située dans la partie antérieure du corps (du 25^e au 37^e segment chez *Eisenia fetida*). Très saillant chez les lombriciens, le clitellum est considéré comme un caractère sexuel secondaire (Avel, 1959). À ce titre, il se développe à la puberté et régresse pendant les périodes de repos génital : diapause des espèces hétérodynames, régénération ou variations saisonnières d'activité. De nombreuses études ont montré qu'il était sous la dépendance d'un facteur neurohormonal (Avel, 1929 ; Herlant-Meewis, 1956 ; Berjon, 1965), de nature peptidique (Marcel et Cardon, 1982). Les œufs des espèces terri- coles sont oligolécithes (Dawydoff, 1959). La vitellogenèse aboutit à la mise en réserve, dans le cytoplasme ovocytaire, d'une petite quantité de produits essentiellement lipidiques (Lechenault, 1968), consommés lors de la segmentation. La suite de l'embryogenèse demande un apport extérieur d'éléments nutritifs, stockés dans l'albumen du cocon. Celui-ci est formé d'une substance visqueuse enveloppée dans une enveloppe élastique glycoprotéique (Marcel *et al*, 1985). L'épithélium clitellaire est formé de 3 types cellulaires, plus ou moins stratifiés (Grove, 1925). Les mucocytes sont en surface. Au-dessous, s'étend une couche de «cellules à gros granules» recouvrant des «cellules à fins granules» plus volumineuses et plus nombreuses que les précédentes. Les fonctions de ces diverses catégories cellulaires ont été établies, chez *E. fetida*, sur la base de colorations histo-

miques, par Grove et Cowley (1928). Les cellules à mucus élaborent un manchon protégeant le cocon pendant sa formation. L'enveloppe du cocon résulte de la sécrétion des «cellules à gros granules», tandis que l'albumen provient des «cellules à fins granules». Liquéfié par des cellules particulières du stomodeum de la gastrule, l'albumen s'accumule dans l'archentéron au cours de la période comprise entre le 4^e et le 12^e jour après la fécondation (Devriès, 1973). Le 18^e jour, les jeunes vers éclosent, en sortant par l'extrémité antérieure du cocon (Grove et Cowley, 1926). Les lombriciens montrent donc une sorte de vitellogenèse externe, opposée à la vitellogenèse intra-ovocytaire, connue chez la plupart des autres annélides. L'albumen joue alors, pour l'embryon, le rôle d'un vitellus.

Au moyen de techniques histochimiques, Defretin et Demailly (1953) ont recherché chez *Lumbricus terrestris* la nature des constituants des cellules clitelliennes. D'après ces auteurs, la sécrétion des «cellules à gros granules» paraît riche en sucres aminés. Celle des «cellules à fins granules» a donné des résultats négatifs dans la plupart des réactions essayées, ce qui a laissé non résolu le problème de la composition chimique de l'albumen. Les rares analyses effectuées chez les oligochètes, avec des méthodes biochimiques, concernent l'animal entier et non le clitellum isolé ou l'albumen des cocons. Durchon et Lafon (1951), comparant les compositions globales de quelques annélides polychètes à celle de *L. terrestris*, dosent l'azote total et en déduisent les teneurs en protides. De Jorge *et al* (1965), De Jorge et Sawaya (1967), étudiant quelques oligochètes brésiliens, mesu-

rent, entre autres, les taux des protéines sanguines et musculaires. Enfin, Rouabah-Sadaoui (1984) entreprend l'étude des variations cytologiques et biochimiques du clitellum et des cocons d'*E fetida*.

Ainsi, les lombriciens présentent un modèle très original de «vitellogenèse externe», qu'il nous a paru intéressant d'étudier. Mais, au préalable, il était nécessaire de connaître la composition chimique de l'albumen, dès son origine, lors de la différenciation pubertaire de l'épithélium clitellaire, et son évolution, dans le cocon, au fur et à mesure du développement des embryons. Le but de ce premier article est d'étudier la composition protéique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les vers, de l'espèce *E fetida* Sav, ont été récoltés dans les bacs d'élevage à différents stades de maturation sexuelle, caractérisée par l'absence ou la présence du clitellum. Pour les analyses, on distingue 3 groupes d'individus :

- les immatures, qui ne présentent aucune différenciation clitellaire apparente ;
- les submatures («stade prépubertaire», suivant Michon, 1954) dont la région clitellaire montre une coloration plus claire caractéristique ;
- les mûrs, au clitellum turgescent et fonctionnel.

Les vers ont été soumis à un jeûne de quelques jours avant l'ablation des régions clitellaires, sous anesthésie au chlorothone à 0,2%. Le tube digestif a été retiré et les portions dorsales (épithélium et musculature sous-jacente) ont été broyées dans l'eau distillée au moyen d'un homogénéiseur Dounce. Après centrifugation à 2 900 g, pendant 10 min, le surnageant a été lyophilisé.

Les poids secs des régions clitellaires ont été déterminés, sur des échantillons lyophilisés, par pesée sur une balance fermée dont l'atmosphère interne a été préalablement déshydratée, pendant 24 h, en présence de potasse.

Plusieurs couples de vers sexuellement actifs ont été, par ailleurs, isolés et les cocons récoltés tous les jours. Après lavage à l'eau, ces

cocons ont été mis à incuber, entre 2 rondelles de papier filtre humide, dans des boîtes de Pétri, à l'étuve à 24°C, puis analysés à différents moments : 1, 5, 10, 15 et 20 j après la ponte. Ces dates ont été choisies en fonction des données embryologiques établies par Devriès (1973). Les cocons ont été ouverts à ces différents moments et le contenu (albumen et embryons) séparé de l'enveloppe, puis lyophilisé. Les teneurs en protéines totales des clitellums et des cocons à différents stades d'incubation (de 1 à 20 j après la ponte) ont été calculées par dosage de l'azote (méthode de Kjeldahl) et par spectrophotométrie à 540 nm suivant la méthode de Geiger et Bessman (1972). Cette seconde technique a aussi été utilisée pour doser les protéines solubles. La centrifugation à 10 000 g, pendant 10 min, des homogénats de clitellum ou d'albumen permet de recueillir un surnageant contenant la fraction protéique soluble. L'étude électrophorétique a été effectuée sur gel de polyacrylamide (gradient 5 à 25%) en milieu non dénaturant (pH 8,8) ou en milieu dénaturant. Dans ce second cas, les échantillons ont été traités par du dodécylsulfate de sodium (SDS), suivant le protocole de Laemmli (1970). Enfin, une électrophorèse bidimensionnelle, réunissant les 2 techniques précédentes et appliquée aux protéines solubles du clitellum mûr et au contenu des cocons de 10 j, a permis de déterminer la composition polypeptidique des protéines natives. Les poids moléculaires des protéines et polypeptides ont été déterminés en appliquant la formule : $\log M = f(\text{distance de migration})$.

RÉSULTATS

Teneurs en protéines

Toutes les teneurs en protéines, totales ou solubles, sont exprimées en % du poids sec.

Les protéines sont tout d'abord dosées dans les clitellums aux 3 stades de développement cités précédemment. Les résultats sont reportés dans le tableau I : les valeurs transcrites lignes 1 et 2, pour les protéines totales, ligne 3 pour les protéines solubles, représentent chacune la moyenne de 6 mesures. Les 2 méthodes de dosage utilisées (Kjeldahl et Geiger-Bessman) ont

Tableau I. Teneurs en protéines dans les clitellums au cours de la maturation, exprimées en % par rapport au poids sec $\pm$ écart type ($n = 6$, $P \leq 0,01$ – poids sec moyen d'un clitellum mûr : $1,02 \pm 0,05$ mg, submature : $0,89 \pm 0,03$ mg, immature : $0,78 \pm 0,03$ mg).

			<i>Clitellums</i>		
			<i>Immature</i>	<i>Submature</i>	<i>Mûr</i>
Protéines	1	Kjeldahl	$82 \pm 1,6$	$76 \pm 1,8$	$62 \pm 1,8$
totales	2	Geiger-Bessman	$79 \pm 1,7$	$71 \pm 1,7$	$59 \pm 1,7$
3	Protéines solubles		$36 \pm 1,5$	$38 \pm 1,7$	$40 \pm 1,6$
4	Protéines insolubles ^a		43	33	19

^a Calculées par différence entre 2 et 3.

fourni des chiffres très comparables, les différences étant comprises entre 3 et 5%. Par ailleurs, les écarts types calculés sont faibles et pratiquement identiques dans tous les cas. La teneur en protéines totales (lignes 1 et 2) décroît notablement au cours de la maturation, la diminution étant plus forte au cours de la phase pubertaire, pendant laquelle s'effectue la clitellogenèse. Les différences sont constamment significatives, pour $P = 0,01$. À l'inverse, les taux des protéines solubles augmentent pendant cette période (ligne 3), bien que les différences

ne soient significatives, pour $P = 0,1$, qu'entre les stades mûrs et immatures.

Dans le dosage des protéines des cocons, 6 mesures sont effectuées à chaque stade. Les moyennes des dosages dans les cocons à différents stades d'incubation (de 1 à 20 j après la ponte) par la méthode de Geiger-Bessman, reportées dans le tableau II, présentent une faible dispersion : les écarts types sont petits et identiques. Au développement des embryons correspond une augmentation quasi linéaire des quantités relatives des protéines totales,

Tableau II. Teneurs en protéines dans les cocons en incubation, exprimées en % de matières sèches $\pm$ écart type ($n = 6$, poids sec moyen d'un cocon frais pondu : $0,91 \pm 0,06$ mg).

<i>Albumen des cocons de</i>					
	<i>1 j</i>	<i>5 j</i>	<i>10 j</i>	<i>15 j</i>	<i>20 j</i>
1 – Protéines totales	$58 \pm 1,4$	$62 \pm 1,5$	$68 \pm 1,6$	$70 \pm 1,5$	$74 \pm 1,5$
2 – Protéines solubles	$32 \pm 1,5$	$33 \pm 1,4$	$34 \pm 1,6$	$39 \pm 1,5$	$40 \pm 1,5$
3 – Protéines insolubles ^a	26	29	34	31	34

^a Calculées par différence entre 1 et 2.

ainsi que des protéines solubles. Toutefois, les protéines solubles s'accroissent modérément. À la fin de l'incubation, le jeune ver, prêt à naître, a presque autant de protéines que le clitellum immature : respectivement 74 et 79% de protéines totales, 36 et 40% de protéines solubles.

Analyse électrophorétique

Les dosages ayant montré l'existence d'une quantité importante de protéines solubles, aussi bien dans le clitellum que dans les cocons, nous avons essayé d'en caracté-

ser certaines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Électrophorèse en milieu non dénaturant

La comparaison des électrophorégrammes provenant des fractions solubles des clitellums en cours de maturation (fig 1a, lignes 1, 2 et 3) révèle, après coloration par le bleu de Coomassie, la présence de 3 protéines majeures, notées A, B et C, dans les clitellums mûrs (ligne 3). Aucune de ces protéines n'est repérable dans les clitellums immatures (ligne 1). Elles commencent à

Fig 1. Électrophorèse dans un gradient 5–25% d'acrylamide. A, B et C : protéines majeures séparées dans différents échantillons. **a.** Analyses du clitellum immature (1), submature (2), mûr (3), de cocons de 1 j (4), de 5 j (5), de 10 j (6), de 15 j (7) et de 20 j (8). **b.** Coloration par le réactif de Schiff de polysaccharides du clitellum mûr (3) et de cocons de 10 j (6). **c.** Coloration par le noir Soudan des lipides du clitellum mûr (3) et de cocons de 10 j (6).

apparaître dans les clitellums submatures (ligne 2). La protéine A a un poids moléculaire estimé à 450 kilodaltons. Le réactif de Schiff montre la présence d'une partie glycanique dans cette protéine A (fig 1b, ligne 3). La coloration par le noir Soudan (fig 1c, ligne 3) met en évidence une partie lipidique, au niveau de cette même molécule A. La protéine B (masse moléculaire d'environ 350 kDa) est, elle aussi, de nature glycoprotéique (fig 1b, ligne 3), mais non lipoprotéique (fig 1c, ligne 3). Enfin, la protéine C a une masse moléculaire de l'ordre de 150 kDa. Elle est de même nature glycoprotéique (fig 1b, ligne 3), mais non lipoprotéique (fig 1c, ligne 3).

Parallèlement, les fractions solubles des cocons âgés de 1 à 20 j sont analysées de la même manière, sur gel de polyacrylamide en milieu non dénaturant (fig 1a, lignes 4–8). On observe l'apparition progressive, entre 1 et 15 j, de protéines de différentes masses moléculaires. Toutefois, une protéine majeure, d'environ 450 kDa, est visible, à tous les stades étudiés. Les colorations par le réactif de Schiff (fig 1b, ligne 6) et par le noir Soudan (fig 1c, ligne 6) permettent d'en affirmer la nature glycolipoprotéique. Elle peut ainsi être assimilée à la protéine A détectée dans les clitellums mûrs et submatures. Mais les protéines B et C, précédemment observées dans les électrophorèses de ces mêmes clitellums, sont absentes des fractions solubles des cocons, quel qu'en soit le stade de développement (fig 1a, lignes 4–8).

Électrophorèse en milieu dénaturant

Après action du SDS, l'électrophorèse des protéines solubles du clitellum mûr montre (fig 2a, ligne 3) la présence de 4 polypeptides majeurs dont l'un, noté d, a une masse moléculaire approximativement égale à 94 kDa et les 3 autres, a, b et c, ont une masse moléculaire supérieure à cette valeur. Ces 4 polypeptides, et principale-

ment b et c, commencent à apparaître dans les clitellums en début de puberté (ligne 2) et sont pratiquement inexistants chez les juvéniles (ligne 1). L'analyse des fractions protéiques solubles des contenus des cocons, dénaturées par le SDS (fig 2b, lignes 4–8) révèle la présence de 2 polypeptides majeurs, de mêmes masses moléculaires que les molécules a et c séparées dans le gel n° 3. Ces 2 polypeptides sont présents quelle que soit la durée d'incubation des cocons (lignes 4–8). Les polypeptides b et d pourraient être réunis dans une molécule protéique demeurée dans la fraction insoluble des cocons. Pour vérifier ou infirmer cette hypothèse, les culots de centrifugation des homogénats d'albumen sont traités par le SDS. Les protéines ainsi dénaturées et solubilisées des culots de cocons et de leurs enveloppes sont analysées sur les gels de polyacrylamide. Le profil électrophorétique apparaît sur la figure 3a, lignes 3–7, où ils sont comparés à ceux des protéines solubles des cocons de 10 j (ligne 1) et des clitellums mûrs (ligne 2). Les polypeptides b et d n'existent pas dans les protéines insolubles des cocons. Ces molécules sont également absentes dans les enveloppes des cocons, au moins dans la partie solubilisée par le SDS (fig 3b, lignes 1 et 2).

Ainsi, des 3 protéines A, B et C trouvées dans les clitellums submatures et mûrs, seule A se retrouve dans les cocons. Elle pourrait être constituée de 2 sous-unités, libérées par le SDS, a et c. Quant aux polypeptides b et d, ils pourraient entrer dans la constitution des protéines natives B et C, présentes dans les clitellums et absentes des cocons. Pour essayer de vérifier cette hypothèse, est réalisée une électrophorèse bidimensionnelle des protéines solubles du clitellum mûr et du contenu de cocons âgés de 10 j. La première dimension est effectuée en milieu non dénaturant, la seconde en présence de SDS. Les électrophorégrammes montrent (fig 4) que la fraction

Fig 2. Analyses sur gel de polyacrylamide (gradient 5–25%) en milieu dénaturant (SDS) des protéines de clitellum immature (1), submature (2), mûr (3), de cocons de 1 j (4), de 5 j (5), de 10 j (6), de 15 j (7) et de 20 j (8).

protéique A se résoud en 2 polypeptides a et c, aussi bien dans le clitellum (1 sur la figure 4) que dans le cocon (2 sur la figure 4). Les protéines B et C, quant à elles, migrent respectivement sous la forme des spots b et d (1 sur la figure 4).

Au total, cette dernière expérience confirme bien l'hypothèse émise : la protéine A serait formée de 2 polypeptides a et c. Elle serait transférée du clitellum mûr

dans l'albumen au moment de la formation du cocon.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Il a été ainsi démontré que la teneur en protéines totales diminue progressivement pendant la maturation du clitellum. Il y a toutefois une synthèse, modérée, de protéines

Fig 3. Analyses sur gel de polyacrylamide (gradient 5–25%) en milieu dénaturant (SDS) des protéines solubilisées des culots de cocon et de leurs enveloppes. **a.** Cocon de 10 j (1), clitellum mûr (2), culots d'albumen de cocons de 1 j (3), de 5 j (4), de 10 j (5), de 15 j (6) et de 20 j (7). **b.** Enveloppe de cocons de 1 j (1), de 20 j (2), cocon de 10 j (3). Le cocon de 10 j : a (1) et b (3) et le clitellum mûr : a (2) servent de témoin.

solubles. En revanche, on observe une diminution considérable de l'importance des protéines insolubles. Celles-ci sont vraisemblablement constituées de protéines de structure, protéines contractiles des musculatures circulaire et longitudinale, dont la quantité est relativement beaucoup plus importante dans un tégument de ver immature que dans un clitellum mûr, turgescant.

Sur *Lumbricus* entier, d'état sexuel non précisé, Durchon et Lafon (1951) obtiennent 56,9% de protéines totales en % du poids sec. Nos chiffres sont du même ordre de grandeur pour les clitellums mûrs (59%). En revanche, leurs résultats s'éloignent notablement de ceux que nous obtenons dans les clitellums prépubères ou infantiles (respectivement 71 et 79% du poids sec).

Fig 4. Analyse bidimensionnelle des protéines de clitellum et du cocon par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (gradient 5–25%). **a.** 1^{re} dimension (horizontale) : séparation des protéines natives du clitellum mûr (1) et du cocon de 10 j (2), en milieu non dénaturant ; le clitellum mûr présente les protéines A, B et C alors que seule A se retrouve dans le cocon. **b.** 2^e dimension (verticale) : analyse en présence de SDS. La fraction protéique A se résoud en 2 polypeptides a et c ; les protéines B et C migrent sous forme des spots b et d.

Les lombrics qu'ils ont analysés étaient vraisemblablement des adultes mûrs. La comparaison avec les recherches de De Jorge et Sawaya (1967) est beaucoup plus délicate. En effet, ces auteurs ont surtout étudié la composition du sang de quelques espèces d'oligochètes terricoles et les dosages des protéines sont exprimés en

mg/100 ml de sang. Dans d'autres analyses, De Jorge et Sawaya (1967) indiquent les teneurs en azote, pour 100 mg de poids frais, dans des tronçons de *Pheretima*. À partir de ces chiffres, le calcul permet d'évaluer les concentrations en protéines, en % du poids sec, ces auteurs ayant mesuré les teneurs en eau. Dans ces conditions, les

valeurs obtenues, 59 à 60%, sont comparables à celles que nous avons trouvées chez *Eisenia*. Chez les oligochètes aquatiques, *Tubifex tubifex* et *Limnodrilus hoffmeisteri*, Whitten et Goodnight (1966) ont recherché la composition en protéines qu'ils comparent à celle de *L. terrestris* et *E. rosea* établie par French *et al* (1957). Toutes ces valeurs sont, elles aussi, du même ordre de grandeur (de 53 à 61% du poids sec) que les nôtres. Ainsi, les protéines du clitellum mûr d'animaux entiers adultes représentent environ 60% du poids sec.

La variation des teneurs en protéines totales dans les cocons, au cours de l'incubation, traduit une augmentation progressive : de 58% du poids sec, le 1^{er} jour après la ponte, jusqu'à 74%, le 20^e, à l'approche de l'éclosion. Ces valeurs sont à rapprocher, respectivement, de celles obtenues dans les clitellums mûrs (59%) et dans les clitellums immatures (79%). Cet accroissement, pendant l'embryogenèse, correspond sans doute à une synthèse de protéines (en particulier de protéines contractiles) mais elle pourrait être due aussi, en partie, à la diminution relative des autres constituants, glucidiques et lipidiques, consommés par les larves.

Defretin et Demailly (1953) n'ont pu, avec des méthodes histochimiques, identifier les constituants des cellules à fins granules responsables de la sécrétion du contenu du cocon chez le lombric. Ils concluaient toutefois à l'existence d'une sécrétion protéique par suite de la présence d'ARN et de phosphatases alcalines. En revanche, Richards (1974), puis Morris (1983) démontrent la présence de protéines et de glycoprotéines dans les cellules à fins granules. Nos analyses (dosages et électrophorèses) établissent définitivement la nature en grande partie protéique des sécrétions constituant la gelée nutritive du cocon, confirmant les résultats antérieurs obtenus par des méthodes histochimiques.

L'analyse électrophorétique en milieu non dénaturant montre l'apparition de 3 protéines de haut poids moléculaire, au moment de la puberté. Elles représentent la majeure partie du matériel protéique contenu dans le clitellum mûr. De ces 3 fractions protéiques, A, B et C, seule la fraction A se retrouve dans le cocon, quel qu'en soit le stade d'incubation. Les glycoprotéines B et C, présentes dans le clitellum, pourraient intervenir dans la constitution de l'enveloppe du cocon dont la nature est glycoprotéique (Marcel *et al*, 1985). Quant à la molécule A, elle pourrait être constituée par 2 polypeptides, qu'une électrophorèse bidimensionnelle peut séparer sous forme des spots c et a (fig 1c). Cette glycolipoprotéine, de masse moléculaire élevée (= 450 kDa), pourrait être assimilée à une vitellogénine, car elle en possède les caractéristiques : glycolipoprotéine soluble, d'origine exogène, possédant un haut poids moléculaire et servant de réserve pour le développement des embryons. Elle représenterait ainsi une partie essentielle du «vitellus» externe. Elle pourrait être comparée aux vitellogénines des arthropodes ou à celle des autres annélides. Mais dans ces cas, lors de la vitellogenèse, la vitellogénine exogène se transforme en une vitelline intraovocytaire. Chez *Eisenia*, il n'y a pas de vitellogenèse dans l'ovocyte (Lechevalier, 1968) ; les réserves demeurent externes jusqu'à ce qu'elles soient ingurgitées dans le tube digestif de la larve pour y être digérées. Le métabolisme des lombriciens n'implique donc pas un stade «vitelline».

RÉFÉRENCES

- Avel M (1929) Recherches expérimentales sur les caractères sexuels somatiques des lombriciens. *Bull Biol Fr Belg* 63, 149-318
- Avel M (1959) CI des oligochètes. In : *Traité de zoologie*, V (PP Grassé, ed), Masson, 224-270
- Berjon J (1965) Application de la culture organotypique sur milieux artificiels à la discrimination des fonc-

- tions endocrines des ganglions cérébroïdes du lombricien *Eisenia foetida* Sav. *Cr Acad Sci, Fr*, 260, 2612-2614
- Dawydoff C (1959) Ontogenèse des annélides. In : *Traité de zoologie*, V (PP Grassé, ed), Masson, 594-686
- De Jorge FB, Sawaya MC (1967) Comparative biochemical studies on the Oligochaetes *Pheretima hawayana*, *Glossoscolex grandis* and *Rhinodrilus* sp. *Comp Biochem Physiol* 22, 359-369
- De Jorge FB, Haeser PE, Ditadi ASF, Petersen JA, Ulhoa Cintra AB, Sawaya P (1965) Histochemical studies on the giant earthworm *Glossoscolex giganteus* (Leuckart). *Comp Biochem Physiol* 16, 491-496
- Defretin R, Demailly E (1953) Sur quelques caractères histochimiques des divers types de cellules glandulaires du clitellum du lombric. *C R Soc Biol* 147, 1251-1253
- Devriès J (1973) La formation et la destinée des feuillets embryonnaires chez le lombricien *Eisenia foetida* (annélide oligochète). *Arch Anat Micr Morph Exp* 62, 15-38
- Durchon M, Lafon M (1951) Quelques données biochimiques sur les annélides. *Ann Sc Nat Zool* 11e S, 13, 427-451
- French CE, Liscinski SA, Miller DR (1957) Nutrient composition of earthworm. *J Wildl Mgmt* 21, 348
- Geiger PJ, Bessman SP (1972) Protein determination by Lowry's method in the presence of sulphhydryl reagents. *Anal Biochem* 49, 467-473
- Grove AJ (1925) On the reproductive processes of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Quart J Microsc Sci* 69, 245-290
- Grove AJ, Cowley LF (1926) On the reproductive processes of the brandling worm *Eisenia foetida* (Sav). *Quart J Microsc Sci* 71, 31-45
- Grove AJ, Cowley LF (1928) The relation of the glandular elements of the clitellum of the brandling worm (*Eisenia foetida* Sav) to the secretion of the cocoon. *Quart J Microsc Sci* 71, 31-45
- Herlant-Meewis H (1956) Phénomènes de neurosécrétion et ponte chez *Eisenia foetida*. *C R Acad Sci Fr* 243, 823-825
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lechenault H (1968) Étude cytochimique et ultrastructurale de l'ovocyte d'*Eisenia foetida* Sav. *Z Zellforsch* 90, 96-112
- Marcel R, Cardon C (1982) Régénération céphalique et clitellogénèse sont-elles gouvernées par la même neurohormone chez le lombricien *Eisenia foetida* ? *J Physiol* 78, 574-578
- Marcel R, Cardon C, Degand P (1985) Le cocon d'*Eisenia foetida* Sav (annélide oligochète). Étude ultrastructurale et biochimique. *Arch Anat Microsc Morph Exp* 74, 181-191
- Michon J (1954) Contribution expérimentale à l'étude de la biologie des Lumbricidae. Les variations pondérales au cours des différentes modalités du développement postembryonnaire. Thèse doct sciences, Poitiers, 192 p
- Morris GM (1983) The cocoon-producing cells of *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta) a histochemical and ultrastructural study. *J Morph* 177, 41-50
- Richards KS (1974) The histochemistry of the small granular, protinaceous cells (albumen cells) of the epidermis of some lumbricids (Oligochaeta: Annelida). *Ann Histochem* 19, 239-251
- Rouabah-Sadaoui L (1984) Contribution à l'étude biologique et biochimique du clitellum et du cocon d'*Eisenia foetida* Sav (annélide oligochète). Thèse 3^e cycle, Lille
- Whitten BK, Goodnight CJ (1966) The comparative chemical composition of 2 aquatic oligochaetes. *Comp Biochem Physiol* 17, 1205-1207