

ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE PROTEINE MEMBRANAIRE
OVOCYTAIRE CAPABLE DE FIXER SPECIFIQUEMENT LA VITELLOGENINE

JUGAN P. VAN HERP F.

RESUME - La solubilisation de membranes ovocytaires chez l'écrevisse *Orconectes limosus* a permis de mettre en évidence par SDS-PAGE et par électroblotting un composant de poids moléculaire de 30 kDa, capable de fixer spécifiquement la vitellogénine. La nature protéique de ce site de liaison nous est suggérée par sa sensibilité à l'action d'enzymes protéolytiques comme la pronase. Un anticorps polyclonal a été produit contre le composé membranaire de 30 kDa et la spécificité tissulaire de cet anticorps a été éprouvée par ELISA.

mots-clés : isolement, caractérisation, protéine membranaire ovocytaire, vitellogénine, écrevisse

ABSTRACT - After solubilization of ovocyte-membranes from the crayfish *Orconectes limosus*, a component with a molecular weight of 30 kDa and capable to fix vitellogenin specifically, could be characterized by SDS-PAGE and by electroblotting. Because this isolated component is sensible to the digestion of proteolytic enzymes such as pronase, we assume that we are dealing with a protein. A polyclonal antiserum is produced against this component and its tissue-specificity is verified by ELISA.

key-words : isolation, characterization, membrane-protein, vitellogenin, crayfish

L'endocytose est un mécanisme général utilisé par les cellules pour prélever de manière spécifique des molécules présentes dans le milieu extracellulaire (Roth & Porter, 1964; Goldstein et al., 1976). L'un des systèmes les plus connus est l'internalisation de la vitellogénine par les ovocytes en vitellogenèse (Roth et al., 1976). La fixation de la vitellogénine sur des récepteurs membranaires ovocytaires est à l'origine de cette sélectivité (Yusko et al., 1981; Köning & Lanzrein, 1985; Röhrkasten & Ferenz, 1986 a et b; Opresko & Wiley, 1987). La caractérisation du récepteur ovocytaire à la vitellogénine a été effectuée chez la poule (Wood & Roth, 1980).

Chez les Crustacés, la croissance ovarienne est sous le contrôle d'une hormone inhibitrice de la vitellogenèse (VIH) (Kleinholz, 1985; Payen, 1986). Cette hormone régule le processus d'endocytose ovocytaire de la vitellogénine (Jugan & Soyez, 1985). Le mécanisme d'action cellulaire de cette hormone n'est pas connu, mais il est possible que la VIH affecte la distribution et le recyclage des récepteurs ovocytaires à la vitellogénine.

Dans le but d'étudier cette interaction avec plus de précision, nous avons isolé et partiellement caractérisé, chez l'écrevisse *Orconectes limosus*, une protéine membranaire ovocytaire de 30 kDa et capable de fixer

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences,
Université Catholique, Toernooiveld,
6525 ED Nimègue, Pays-Bas

spécifiquement la vitellogénine (VTG). Un anticorps polyclonal a été produit contre cette protéine et la spécificité tissulaire de cet anticorps a été éprouvée par microtitration (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Matériel et méthodes

Des ovocytes en vitellogenèse, provenant d'un ovaire de l'écrevisse *Orconectes limosus*, sont homogénéisés dans un tampon phosphate de sodium (300 ovocytes/1 ml de tampon). Les membranes sont séparées du cytoplasme par centrifugation (10 000 g) et sont solubilisées dans un tampon Tris-HCl contenant du SDS (2%) et du β -mercaptoethanol (5%). Après une centrifugation (40 000 g) le surnageant contenant les protéines membranaires solubilisées est soumis à une électrophorèse en condition dénaturante (Laemmli, 1970).

Les protéines membranaires séparées par électrophorèse sont transférées du gel de polyacrylamide à une feuille de nitrocellulose suivant la technique de l'électroblotting.

Les bandes de nitrocelluloses sont incubées en présence de vitellogénine marquée à la peroxydase. La détection de la peroxydase est effectuée à l'aide d'un substrat, le 4-chloro-1-naphthol. Différentes conditions ont été testées: compétition par la vitellogénine native, par l'hémocyanine, prétraitement par la pronase.

Après localisation de la protéine membranaire fixant spécifiquement la vitellogénine, une électrophorèse préparative a été réalisée. Cent μ g de protéine ont été isolés par élution et injectés à un lapin. L'anticorps produit a été testé en immunoblotting et par microtitration ELISA.

Résultats et conclusion

Parmi de nombreux constituants protéiques extraits des membranes ovocytaires et séparés par électrophorèse (Pl. I, Fig. a), un composé de poids moléculaire 30 kDa est capable de fixer la vitellogénine marquée à la peroxydase (Pl. I, Fig. b). La spécificité de la liaison a été vérifiée par compétition avec de la vitellogénine non marquée (Pl. I, Fig. c) et avec de l'hémocyanine (Pl. I, Fig. d): seule la vitellogénine native déplace la liaison de la vitellogénine marquée, l'hémocyanine est sans effet. La dégradation préalable des protéines membranaires par la pronase (Pl. I, Fig. e) inhibe la liaison de la vitellogénine sur le site de 30 kDa.

Un anticorps de lapin a été produit contre cette protéine de 30 kDa. Cet anticorps a été testé en immunoblotting (Pl. I, Fig. f). Des membranes solubilisées provenant d'ovaire, de testicule, de muscle et d'hépatopancréas ont été testées par ELISA en utilisant les anticorps purifiés à partir de l'antisérum total et marqués à la peroxydase (Fig. 2 a-d). Seules les membranes ovariennes réagissent avec l'anticorps.

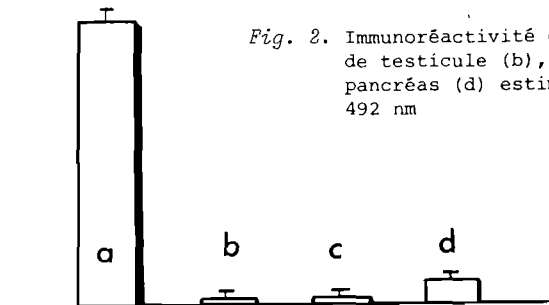
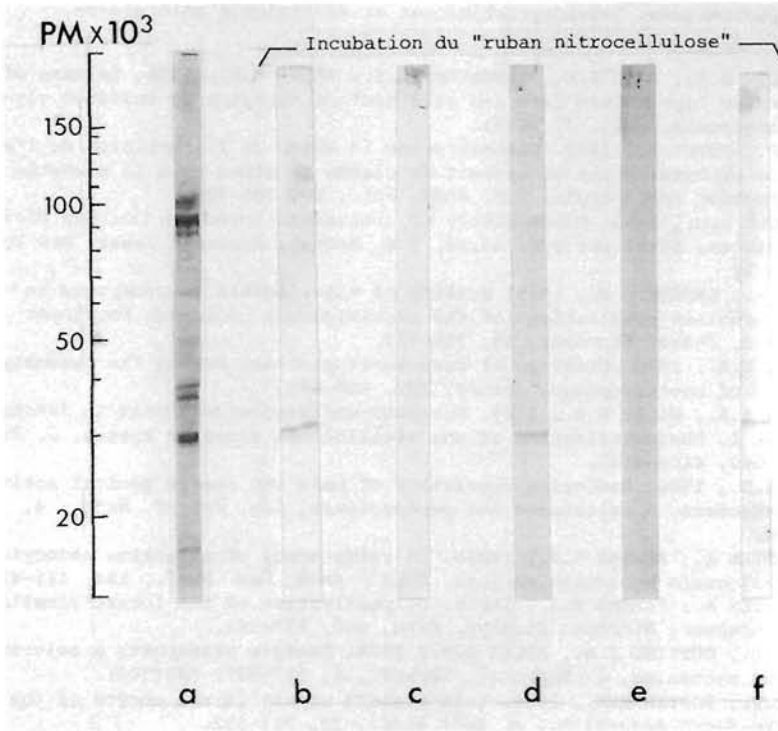


Fig. 2. Immunoréactivité des membranes d'ovaire (a), de testicule (b), de muscle (c) et d'hépatopancréas (d) estimée par un lecteur ELISA à 492 nm

PLANCHE I

Fig. a-f. Des membranes ovocytaires solubilisées soumises à une électrophorèse SDS-PAGE et à une électroblotting



Légendes

- a. Séparation des protéines membranaires ovocytaires par électrophorèse.
- b-d. Incubation du "ruban nitrocellulose" en présence:
 - (b) de la vitellogénine marquée à la peroxydase (VTG-HRP);
 - (c) de VTG-HRP et d'un excès de vitellogénine native;
 - (d) de VTG-HRP et d'un excès de l'hémocyanine.
- e. Préincubation du "ruban nitrocellulose" dans la pronase suivie d'une incubation en présence de VTG-HRP.
- f. Incubation avec le sérum de lapin anti-protéine 30 kDa suivie d'une incubation avec du sérum de chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase.

En conclusion, il a été possible de caractériser et d'isoler à partir de membranes ovocytaires, une protéine de 30 kDa capable de fixer spécifiquement la vitellogénine. La production d'un anticorps contre cette protéine nous permet maintenant d'envisager, par une méthode immunoenzymatique, le dosage de cette protéine au cours des cycles de vitellogenèse primaire et secondaire. La biosynthèse de cette protéine ainsi que sa mise en place dans la membrane plasmique ovocytaire seront étudiées à l'aide de techniques biochimiques, immunocytochimiques et de biologie moléculaire.

-
- GOLDSTEIN J.L., BASU S.K., BRUNSCHED G.Y., BROWN M.S., 1976. Release of low-density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans, *Cell*, 7, 85-95.
- JUGAN P., SOYEZ D., 1985. Démonstration *in vitro* de l'inhibition de l'endocytose ovocytaire par un extrait de glande de sinus chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii*, *C.R. Acad. Sci.*, 20, 705-709.
- KLEINHOLZ L.H., 1985. Biochemistry of crustacean hormones, in: *The Biology of Crustacea*, édité par D.E. Bliss, L.H. Mantel, Academic Press, New York, 9, 463-522.
- KÖNING R., LANZREIN B., 1985. Binding of vitellogenin to receptors in oocyte membrane preparations of the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*, *Insect Biochem.*, 15, 735-737.
- LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature*, 227, 680-685.
- OPRESKO L.K., WILEY H.S., 1987. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes. I. Characterization of the vitellogenin receptor system, *J. Biol. Chem.*, 262, 4109-4115.
- PAYEN G.G., 1986. Endocrine regulation of male and female genital activity in crustaceans. A retrospect and perspectives, *Adv. Invert. Repr.*, 4, 125-134.
- RÖHRKASTEN A., FERENZ H.J., 1985a. In vitro study of selective endocytosis of vitellogenin by locust oocytes, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 194, 411-416.
- RÖHRKASTEN A., FERENZ H.J., 1985b. Solubilization of the locust vitellogenin receptor, *Biochim. Biophys. Acta*, 860, 577-582.
- ROTH T.F., CUTTING J.A., ATLAS S.B., 1976. Protein transport: a selective membrane mechanism, *J. Supramol. Struct.*, 4, 527(487)-548(508).
- ROTH T.F., PORTER K.R., 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L., *J. Cell Biol.*, 20, 313-332.
- WOOD J.W., ROTH T.F., 1984. A specific subunit of vitellogenin that mediates receptor binding, *Biochem. J.*, 23, 5774-5780.
- YUSKO S., ROTH T.F., 1976. Binding to specific receptors on oocyte plasma membranes by serum phospholipovitellin, *J. Supramol. Struct.*, 4, 89-97.