

RELATIONS HÔTE-PARASITE ENTRE LES CRUSTACÉS *CARCINUS* ET *SACCULINA CARCINI* :

Effet d'extraits de parasite et de l'hémolymph de crabe infesté sur le protéinogramme de crabes sains

N. ANDRIEUX*, CH. HERBERTS** ET J. DE FRESCHVILLE***

RÉSUMÉ. L'injection d'extraits de sacculine à des crabes sains provoque, dans des délais variables, des modifications qualitatives et quantitatives du protéinogramme de ces animaux, associées à un ralentissement du cycle d'intermue. Ces changements sont analogues à ceux observés chez les individus porteurs de sacculine externe. L'injection d'hémolymph de crabe infesté produit des effets semblables.

La sacculine serait donc capable d'exercer une action à distance sur des organes non envahis par ce parasite.

The relationship between host and parasite in the Crustacean *Carcinus* parasitized by *Sacculina carcini* : effect of crude extracts of *Sacculina* and haemolymph of parasitized Crab upon the proteinogramm of experimented healthy Crabs.

SUMMARY. The injection of crude extracts of *Sacculina* to healthy crabs induces, after a variable lapse of time, qualitative and quantitative changes in their proteinogramm and a delay in their moulting cycle. These changes are the same as those observed in infested specimens. The injection of haemolymph from parasitized crabs gives similar effects.

So, the *Sacculina* could be able to produce effect from afar upon organs not invaded by the roots of the parasite.

* Équipe de recherche n° 229 - Bâtiment E - Centre National de la Recherche Scientifique, F 91190 Gif-sur-Yvette.

** Faculté de Médecine Saint-Antoine - Service de Parasitologie (Pr Golvan), 27, rue de Chaligny, F 75571 Paris cedex 12.

*** Laboratoire de Biologie et Physiologie des organismes marins, Université Pierre et Marie Curie, 4, Place Jussieu, F 75230 Paris cedex 05.

Accepté le 16 février 1981.

Introduction

On sait que souvent les parasites peuvent modifier la physiologie de leur hôte, selon des modalités variables et un déterminisme encore mal connu. Nous avons choisi d'étudier ce problème dans le couple hôte-parasite formé par deux Crustacés : le crabe *Carcinus* et le Rhizocéphale *Sacculina carcini*.

La sacculine est constituée d'un système interne de racines et d'un sac viscéral externe. Ce dernier, enveloppé d'un tégument, contient essentiellement un appareil reproducteur ♂ et ♀ et un ganglion nerveux. On sait depuis longtemps (Delage, 1884) que la présence de ce parasite se traduit par une modification des caractères sexuels secondaires et par l'arrêt des mues de l'hôte. Nous avons également montré (Herberts *et al.*, 1978, Andrieux *et al.*, 1980) que le protéinogramme des crabes infestés est modifié sous l'influence de la sacculine externe : réduction quantitative de certaines protéines et apparition d'autres fractions.

Il nous a semblé intéressant de reproduire expérimentalement l'action du parasite sur son hôte en injectant à des crabes sains un homogénat de sacculine. Un travail analogue avait permis à d'autres auteurs (Rubiliani *et al.*, 1980) d'avancer l'hypothèse d'une action à distance des racines du parasite sur la gonade et le système nerveux du crabe.

Afin de rechercher si l'action de la sacculine s'exerce grâce à des substances diffusibles, nous avons d'autre part injecté à un autre lot d'animaux de l'hémolymphe de crabe parasité.

Matériel et méthodes

Les crabes utilisés étaient des *Carcinus mediterraneus* provenant des étangs de Gruissan (Aude) et des *Carcinus maenas* de Roscoff (Finistère). Leur largeur céphalo-thoracique était comprise entre 20 et 30 mm. Des animaux des deux sexes ont été utilisés. Nous avons prélevé au hasard dans la population récoltée un certain nombre d'individus dont les stades ont été déterminés au début de l'expérience (méthode de Drach et Tchernigovtzeff, 1967 ; Andrieux, 1979). Afin de ne pas léser les animaux devant subir une injection, nous avons considéré que ces individus étaient représentatifs de l'ensemble de la population, et que leur répartition de stades était donc la même que celle des crabes soumis à expérience. Les stades de ces derniers ainsi que ceux du lot témoin, ont été également déterminés à la fin de l'expérience.

Les sacs viscéraux de sacculine ont été prélevés sur des *C. maenas* et répartis en 2 lots selon qu'ils ont été ou non débarrassés de leur tégument dont la toxicité a été signalée (Levy, 1923). Ils ont été homogénéisés dans de l'eau de mer filtrée, à raison de 0,25 g de sac viscéral pour 1 ml. d'eau de mer, centrifugés 15 mn à 5000 tours

par minute, distribués en aliquots et conservés à -35 °C jusqu'à utilisation dans un délai maximal de sept semaines.

L'hémolymphe injectée a été obtenue par mélange d'échantillons prélevés sur plusieurs *C. maenas* parasités. Elle a été centrifugée et conservée dans les mêmes conditions que les sacs viscéraux.

Après avoir subi un premier prélèvement de 20 µl d'hémolymphe, destiné à indiquer l'état de son protéinogramme au début de l'expérience, chaque crabe a reçu à la base d'un péréopode 2 injections de 25 µl chacune, soit d'hémolymphe, soit d'homogénat de sac viscéral, à 4 ou 5 jours d'intervalle. Les prélèvements suivants, de 20 µl également, ont été effectués 11, 18, 25, 32 et 42 jours après la première injection. De plus, les animaux injectés avec du broyat de sacculine ont subi un prélèvement supplémentaire de 20 µl 4 jours après la première injection.

Les échantillons prélevés ont été étudiés immédiatement, d'une part en électrophorèse sur gel à gradient de concentration d'acrylamide (4 à 28 %), d'autre part en immunoélectrophorèse bidimensionnelle (méthode de Clarke et Freeman, 1967) avec révélation par un sérum antihémolymphe de *C. maenas* parasité. Des protéinogrammes de crabes sains ayant reçu des injections d'hémolymphe de crabe sain ont été analysés parallèlement pour s'assurer qu'une telle opération n'avait pas d'effet.

Résultats

Vingt-quatre crabes ont été soumis à injection : onze ont reçu de l'hémolymphe de crabe parasité, treize de l'homogénat de sacculine.

Les résultats obtenus ne dépendent ni du sexe des animaux utilisés, ni, dans l'ensemble, de la nature du produit injecté (hémolymphe, sac viscéral complet, sac viscéral sans tégument).

1 — Évolution du cycle d'intermue

On constate qu'en fin d'expérience, les animaux injectés présentent un certain retard par rapport aux témoins de la même récolte. C'est ainsi que tous les individus ayant reçu de l'hémolymphe de crabe parasité étaient alors en C₄ ou en début de prémue, tandis que seule la moitié des témoins était à ce stade, l'autre moitié étant déjà en fin de prémue (D₁, D₂). Ce retard est toutefois moins net chez les crabes ayant reçu de l'homogénat de sacculine.

2 — Analyse du protéinogramme en gel d'acrylamide

Les deux espèces utilisées ont reçu chacune des injections soit d'hémolymphe de crabe parasité, soit de sac viscéral ou d'ovaires de sacculine. Mais chez *C. mediterraneus* injecté d'homogénat de parasite, on observe après la deuxième injection une

mortalité importante qui pourrait être due à la toxicité de l'extrait utilisé. Nous n'avons pas tenu compte, pour les analyses relatives aux injections de sacculine, des *C. mediterraneus* morts prématurément.

Les protéinogrammes obtenus montrent en général trois bandes très fortes correspondant à de l'hémocyanine, que nous avons dénommées en fonction de leur distance de migration : hémocyanine rapide (H_1), au-delà de laquelle on n'observe pas de protéines, hémocyanine moyenne (H_2) et hémocyanine lente (H_3).

Les protéines situées entre H_1 et H_2 ne semblent pas modifiées sous l'effet de l'injection. Les variations éventuellement observées à ce niveau paraissent aléatoires.

En ce qui concerne les bandes comprises entre H_2 et H_3 , le résultat diffère selon l'espèce considérée. Chez *C. mediterraneus*, on observe dans cinq cas sur six une ou deux bandes supplémentaires apparaissant dans la semaine suivant les injections ; ultérieurement, il y a au contraire une tendance à la disparition de bandes dans cette région. Chez *C. maenas* on note par contre une diminution du nombre de protéines dans la semaine suivant les injections ; l'évolution subséquente est variable.

Dans le haut du gel, au-dessus de H_3 , on peut observer essentiellement une bande fine bien reconnaissable. Cette protéine, le plus souvent absente avant injection, apparaît par la suite avec un délai variable selon les individus et persiste généralement jusqu'à la fin de l'expérience chez les individus injectés d'hémolymphe de crabe parasité. Chez les crabes injectés d'homogénat de sacculine, cette bande n'apparaît pas après injection dans le cas où elle était initialement absente, et elle fluctue de façon irrégulière dans les cas contraires.

La protéine caractéristique des crabes sacculinés (Andrieux *et al.*, 1976) n'est jamais apparue après les injections.

3 — Analyse immunochimique bidimensionnelle

Nous avons déjà défini dans deux publications précédentes (Herberts *et al.*, 1978 ; Andrieux *et al.*, 1980) plusieurs groupes de protéines distinguées d'après leur vitesse de migration. En arrière du groupe I, le plus rapide, qui correspond à l'hémocyanine, on peut ainsi identifier les groupes II, III, III' et IV, de mobilités décroissantes.

Le groupe II, moins visible chez *C. mediterraneus* que chez *C. maenas*, montre une augmentation du nombre de fractions aux 11^e et 18^e jours, suivie d'une diminution de ce nombre ainsi que de la netteté des pics.

Le groupe III ne présente pas de modification sensible.

Le groupe III', constitué d'un seul pic, est très généralement absent avant les injections. Il apparaît régulièrement par la suite, de façon plus précoce chez les crabes ayant reçu du broyat de sacculine, et persiste ultérieurement.

Le groupe IV peut être formé de deux pics que nous avons distingués d'après leur aspect, l'un fin et pâle, l'autre plus épais. Chez *C. mediterraneus* injecté d'hémolymphe de crabe parasité, le pic épais est toujours présent, et seul, avant les injections ;

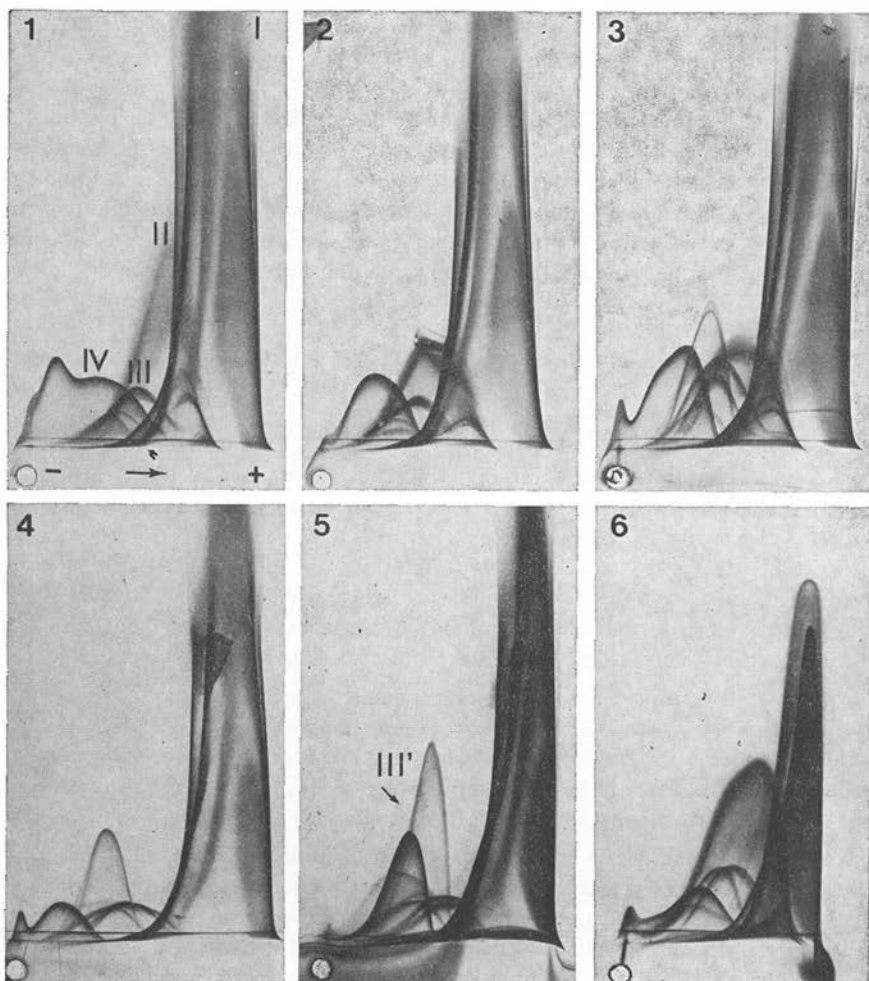


PLANCHE 1. — Immunoélectrophorèses bidimensionnelles d'hémolymphes de *Carcinus maenas*, révélées par un sérum anti-hémolymphes de crabe parasité.

FIG. 1 à 5. — Effets des injections sur le protéinogramme du crabe sain. Comme signalé dans le texte, les différents produits injectés produisent des effets équivalents.

FIG. 1 à 3. — Réduction du groupe II — Fig. 4 et 5 : Apparition du groupe III'.

FIG. 1. — Hémolymphes de crabe sain avant apport d'un broyat d'ovaire de sacculine.

FIG. 2. — Même crabe quatre jours après injection.

FIG. 3. — Même individu, dix-huit jours après injection (stade DI'). Dès ce jour on note une diminution du groupe II. Cette réduction est d'autant plus nette que chez les individus normaux, d'une part ce groupe augmente considérablement au cours de la pémue et que, d'autre part, les autres groupes de protéines III et IV se sont développées conformément à leur évolution normale en pémue.

FIG. 4. — Hémolymphes de crabe sain avant injection de broyat d'ovaire de sacculine. Le pic III' n'est pas présent.

FIG. 5. — Même crabe quatre jours après injection.

Le pic III' est bien développé.

FIG. 6. — Hémolymphes de crabe parasité utilisée pour les injections.

Signes utilisés pour les figures : I : Hémocyanine. II : Protéines du groupe II. III : Protéines du groupe III. III' : Pic III'. IV : Protéines du groupe IV. Sens de migration : - → +.

le pic fin n'apparaît que le 18^e ou le 24^e jour et ces deux pics persistent ensuite jusqu'au terme de l'expérience. Chez *C. maenas*, le pic fin peut être visible dès le début, le pic épais étant par contre moins constant. Comme chez *C. mediterraneus*, les deux pics sont présents de manière constante à partir du 18^e jour dans la série ayant reçu de l'hémolymphe ; chez *C. maenas* injecté d'homogénat de sacculine, leur présence simultanée est beaucoup plus précoce (dès le troisième jour après la première injection).

Discussion

Les résultats obtenus au cours de ces expériences permettent de montrer que, dans des délais variables, les protéinogrammes des animaux injectés présentent des caractéristiques analogues à celles que l'on peut observer chez les crabes sacculinés. Ces modifications sont :

- une tendance à la réduction de la hauteur, associée à une diminution de la netteté des pics du groupe II en fin d'expérience, ainsi qu'une variation de leur nombre, qui augmente d'abord puis diminue. Cette évolution est conforme à nos résultats antérieurs concernant les *C. maenas* parasités (Andrieux *et al.*, 1980).

Nous avons signalé que chez *C. mediterraneus* les protéines du groupe II, dès le début de l'expérience, apparaissent moins nettement que chez *C. maenas* ; on peut se demander si ce résultat n'est pas dû au fait que l'antisérum utilisé, obtenu à partir d'hémolymphe de *C. maenas*, révélerait moins bien ces protéines chez *C. mediterraneus*.

- une apparition constante du pic III'.

Nous avons montré dans une note précédente (Andrieux *et al.*, 1980) que ce pic, généralement non visible chez les crabes sains, est retrouvé régulièrement dans l'hémolymphe des crabes à sacculine externe. Ceci correspond exactement aux résultats présentés ici, où ce pic, absent avant injection, apparaît toujours ensuite. Rappelons que cette apparition est plus précoce après apport de broyat de sacculine.

On aurait pu penser que cette protéine avait été introduite avec l'hémolymphe ou le broyat injectés. Mais, dans le cas d'un apport d'hémolymphe de crabe parasité, même contenant cette protéine, la présence de celle-ci n'est plus décelable après sa dilution de 50 à 100 fois dans le milieu intérieur de l'hôte. Nous nous sommes par ailleurs assurés de son absence dans les homogénats de sacculine.

Par contre, la bande caractéristique du crabe parasité, observable en gel d'acrylamide à gradient de concentration (Andrieux *et al.*, 1976), n'a jamais été retrouvée. Toutefois, ce résultat s'explique facilement, car des infestations expérimentales (Herberts *et al.*, 1980) ont montré que le délai d'apparition de cette protéine est d'environ trois mois, donc nettement supérieur à la durée de la présente étude ; de plus, les crabes utilisés ont reçu simplement deux injections au début de l'expérience tandis que la sacculine interne exerce sur son hôte une action continue.

Lorsque la sacculine est externe, le cycle d'intermue de l'hôte est arrêté au stade C₄. Nous avons signalé (Andrieux *et al.*, 1980) que les protéines du groupe II, vrai-

semblablement liées aux processus préparatoires à l'exuviation (Herberts *et al.*, 1978), sont simultanément réduites. Ici encore, nous constatons qu'une tendance au ralentissement du cycle exuvial est associée à la réduction de ce groupe de protéines.

De même que les injections provoquent l'apparition constante du pic III', elles induisent également l'apparition d'un pic dans la région IV. Celle-ci, ne comportant le plus souvent qu'une protéine avant l'injection, en présente régulièrement deux ensuite. Cette apparition est particulièrement rapide (3 jours) dans le cas des crabes ayant reçu de l'extrait de sacculine. Nous n'avons pas encore observé ce pic supplémentaire et il est vraisemblable que cette absence était due à l'usage d'un lot d'antisérums différent de celui que nous avons utilisé dans le présent travail.

Bien que les deux espèces, *C. mediterraneus* et *C. maenas*, soient très voisines et puissent en général être utilisées indifféremment, nous avons noté ici certaines différences entre elles. C'est ainsi que dans les gels à gradient de concentration d'acrylamide, il apparaît chez *C. mediterraneus*, juste après les injections, une ou deux protéines supplémentaires dans la région comprise entre H_2 et H_3 . *C. maenas* présente au contraire au même moment une diminution du nombre de bandes. De même, le groupe IV de l'étude immunochimique montre au début de l'expérience une différence nette entre les deux espèces.

Nous avons constaté également une moindre résistance de *C. mediterraneus* à l'injection d'homogénats de sacculine, tandis que l'injection d'hémolymph de crabe parasité n'entraîne pas chez eux une plus grande mortalité. Nous avons déjà remarqué que cette espèce est plus fragile que *C. maenas*.

Conclusion

Ces expériences nous ont permis de retrouver chez les crabes étudiés des modifications déjà observées chez les crabes parasités : certaines peuvent être mises en relation avec l'influence de la sacculine sur le cycle de mue ; d'autres n'ont pas de signification actuellement connue dans la physiologie de l'animal sacculiné. Ces modifications se produisent selon des modalités analogues, tant chez les individus injectés avec de l'hémolymph de crabe parasité que chez ceux ayant reçu des broyats de sacculine. Cette similitude nous conduit à penser que la sacculine induirait la présence, dans l'hémolymph de l'hôte, de substances diffusibles capables d'exercer une action à distance sur des organes non envahis par des racines de ce parasite.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDRIEUX N. : L'apolyse au cours du cycle d'intermue chez deux Crustacés Décapodes Brachyours, *Carcinus maenas* Linné et *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky. *C.R. Acad. Sci.*, 1979, 288, D, 1595-1597.
- ANDRIEUX N., BERREUR-BONNENFANT J., HERBERTS C. : Composition protéique de l'hémolymph des Crabes *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky sains ou parasités par *Sacculina carcini* Thompson. *C.R. Acad. Sci.*, 1976, 282, D, 2091-2094.

- ANDRIEUX N., HERBERTS C., De FRESCHVILLE J. : Métabolisme protéique et parasitisme chez le Crabe *Carcinus maenas*. Effet de *Sacculina carcini* (Crustacé, Rhizocéphale) sur les protéines sériques et épidermiques de l'hôte. *J. Can. Zool.*, 1980, 58, 580-585.
- CLARKE H. G. M., FREEMAN T. : A quantitative immunoelectrophoresis method (Laurell electrophoresis). *Protids Biol. Fluids, Proc. Colloq.*, 1967, 14, 503-509.
- DELAGE Y. : Évolution de la sacculine (*Sacculina carcini* Thompson), Crustacé endoparasite de l'ordre nouveau des Kentrogonides. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 1884, 2^e série, II, 417-736.
- DRACH P., TCHERNIGOVITZ C. : Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux Crustacés. *Vie et Milieu*, 1967, 18, 3A, 595-610.
- HERBERTS C., ANDRIEUX N., de FRESCHVILLE J. : Variations des protéines de l'hémolymph et de l'hypoderme au cours du cycle de mue chez *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky : analyses électrophorétique et immunochimique. *J. Can. Zool.*, 1978, 56, 1735-1743.
- HERBERTS C., ANDRIEUX N., De FRESCHVILLE J. : Influence du parasite *Sacculina carcini* Thompson au début de son développement sur les fractions hémolympatiques et épidermiques du crabe *Carcinus maenas* Linné. *J. Can. Zool.*, 1980, 58, 572-579.
- LÉVY R. : Sur la toxicité des racines de la sacculine (*Sacculina carcini* Thomps.) vis-à-vis du crabe (*Carcinus maenas*). *Bull. Soc. Zool. France*, 1923, 48, 291-294.
- RUBILIANI Cl., PAYEN G., RUBILIANI-DUROZOI M. : Action d'implants et homogénats de racines du Rhizocéphale *Sacculina carcini* Thompson chez le crabe mâle *Carcinus maenas* (L.) C.R. *Acad. Sci.*, 1980, 290, D, 355-358.