

LE COMPLEXE *BOTHRIOCEPHALUS SCORPII* (MUELLER, 1776)
Différenciation des espèces parasites du Turbot (*Psetta maxima*)
et de la Barbue (*Scophthalmus rhombus*).
Étude des fractions protéiques et des complexes antigéniques.

F. RENAUD*, C. GABRION* et B. ROMESTAND**

RÉSUMÉ. Ce travail est réalisé à partir de deux populations de Cestodes appartenant à l'espèce nominale *Bothriocephalus scorpii* (Mueller, 1776) (Cestoda, Pseudophyllidea), parasites du Turbot et de la Barbue sur le littoral méditerranéen et pour lesquelles, à partir de l'étude des isoenzymes (Renaud *et al.*, 1983) nous avons attribué les dénominations suivantes :

— *Bothriocephalus (supra sp. scorpii) gregarius*, parasite du Turbot.

— *Bothriocephalus (supra sp. scorpii) barbatus*, parasite de la Barbue.

Nous recherchons à identifier ces deux populations à partir de critères biochimiques.

L'étude des fractions protéiques par électrophorèse sur gel d'acrylamide montre l'existence dans les deux populations de 19 fractions protéiques distinctes. Deux d'entre elles (Rf 53 et Rf 87) sont présentes uniquement chez *B. barbatus* et une fraction de Rf 42, absente de ce dernier, se retrouve chez *B. gregarius*. Par contre, la fraction de Rf 27 n'est présente que chez *B. barbatus*. L'application de l'immunoélectrophorèse met en évidence 7 ou 8 fractions antigéniques majeures selon la population étudiée ; cinq d'entre elles sont communes aux deux populations. Les réactions d'épuisement d'immunsérum nous ont permis de caractériser 3 arcs de précipitation propres aux Cestodes de la Barbue, correspondant aux fractions protéiques de Rf (27, 53, 87) et 3 arcs chez le Cestode du Turbot ; ceux-ci correspondent aux fractions protéiques de Rf (42, 21, 66).

The Complex *Bothriocephalus scorpii* (Mueller, 1776)

Differentiation of the parasitic strains from the Turbot (*Betta maxima*) and the Brill (*Scophthalmus rhombus*). Protein profiles and antigenic communities.

SUMMARY. Previous electrophoretic studies (Renaud *et al.*, 1983) carried out on the Cestode *Bothriocephalus scorpii* (Mueller, 1776) showed that the populations parasiting the Turbot and the Brill on the Mediterranean coast, are two distinct species : *Bothriocephalus (supra sp. scorpii) gregarius* and *Bothriocephalus (supra sp. scorpii) barbatus* respectively. This work has been done with the purpose of identifying these two species by using biochemical tests.

The study of whole body proteins by electrophoresis of zones of acrylamide gel shows the existence of nineteen distinct protein fractions in both populations. Among those different protein fractions, two of them (Rf 53 and Rf 87) are present only in the Cestode of the Brill and one (Rf 42) seems to be specific of the Turbot. On the other hand, the fraction of Rf 27 is present only in the Cestodes of the Brill.

* Laboratoire de Parasitologie comparée, U.S.T.L., Place Eugène-Bataillon, F 34060 Montpellier Cedex.

** Centre de Physiologie des Invertébrés, U.S.T.L., Place Eugène-Bataillon, F 34060 Montpellier Cedex.

Accepté le 20 juin 1983.

The immunoelectrophoretic study of antigenic components shows seven or eight major fractions depending on the source of protein, five of them being common to both. The reactions of absorption of antiserum permitted characterization of three arcs of precipitation proper in the Cestodes of the Brill corresponding to protein fractions of Rf (27, 53, 87) and three arcs in the Cestodes of the Turbot, corresponding to protein fractions of Rf (42, 21, 66).

L'espèce nominale *Bothriocephalus scorpii* (Mueller, 1776) (Cestoda-Pseudophyllidea), depuis sa découverte sur *Cottus scorpius* a été signalée par de nombreux auteurs chez plus de 50 espèces d'hôtes capturés sur les Côtes de Scandinavie, les Iles Britanniques, la France, l'Italie, les U.S.A., l'Océan Arctique (Cooper, 1918) et l'Océan Pacifique (Wardle, 1932).

Jones (1975), utilisant des critères morphologiques et anatomiques conventionnels, redécrit *B. scorpii* (Mueller, 1776) chez 5 espèces de Poissons téléostéens : *Cottus bubalis* Euphrasen, *Onos mustelus* (L.), *Scophthalmus maxima* (L.), *Liparis liparis* (L.) et *Crenilabrus melops* (L.) des côtes galloises et arrive à la conclusion que les Cestodes observés chez les différents hôtes appartiennent à la seule espèce *Bothriocephalus scorpii*.

Depuis, les méthodes d'identification des parasites ont considérablement évolué. Une nouvelle systématique a pris corps s'appuyant sur des critères biochimiques indispensables à la caractérisation de tout organisme vivant et son application aux Cestodes Pseudophyllides s'est d'emblée révélée performante avec l'étude de Bylund et Djupsund (1977) sur des espèces du genre *Diphyllobothrium*.

L'étude du polymorphisme enzymatique nous a permis de distinguer au sein du complexe spécifique *B. scorpii* la présence de deux espèces *B. (supra sp. scorpii) gregarius* et *B. (supra sp. Scorpii) barbatus* respectivement parasites du Turbot et de la Barbué (Renaud *et al.*, 1983).

Dans ce travail, nous avons recherché à savoir si les fractions protéiques et les complexes antigéniques sont susceptibles, comme les isoenzymes de montrer des différences spécifiques entre ces deux populations de Cestodes.

Matériel et méthodes

Les Turbots (*Psetta maxima*) et les Barbués (*Scophthalmus rhombus*) récoltés au chalut sur le littoral méditerranéen (Sète, Agde, Le Grau-du-Roi) sont rapidement disséqués après leur capture et leurs intestins sont prélevés. Ces derniers incisés longitudinalement, sont plongés dans des boîtes de Pétri contenant du liquide de Ringer afin d'isoler les Cestodes. Ceux-ci sont maintenus dans une solution physiologique (0,85 % NaCl) dans une enceinte à 12° C pendant 72 heures. Pendant cette période, le milieu est renouvelé à plusieurs reprises. Ces précautions sont prises afin d'éliminer le chyle intestinal susceptible d'avoir été entraîné avec le Cestode et de permettre l'assimilation et la dégradation des fractions protéiques éventuellement

absorbées par ce dernier avant son extraction. Après cette période, les Cestodes sont broyés au Potter dans 0,5 ml d'eau physiologique.

Les broyats ainsi obtenus sont alors centrifugés à 14,4 g pendant 20 minutes. Chaque surnageant est prélevé et stocké au congélateur à -25° C dans de petits tubes stériles (Eppendorf). Les extraits de chaque individu ainsi obtenus servent à la fois aux électrophorèses et aux immunisations.

Un dosage de la protéinémie de chaque extrait est réalisé selon la méthode de Biuret (Lowry et coll., 1951). Les densités optiques sont lues sur un spectrophotomètre UNICAM SP 6000.

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide à 7 % effectuées sur des tubes cylindriques de 8 cm de hauteur sont réalisées selon la méthode de Ornstein et Davis (1962) dans une cuve Acrylophor, en présence d'une solution tampon de Tris-glycine M/16 à pH 9,2. La migration dure 90 minutes à la température ambiante sous une d.d.p. de 50 volts correspondant à une intensité de 8 mA par tube.

Les fractions protéiques sont révélées par la coloration à l'amidoschwarz 10B (Merck). La mise en évidence des glycoprotéines est réalisée par la fushine acide selon la méthode de Groulade et Pichot (1967).

Les lectures photométriques, avec enregistrement graphique et interprétation, sont effectuées à l'aide d'un densitomètre intégrateur de type « VERNON ». Après lecture, la position de chaque bande protéique est caractérisée par son R_f (Chipendale et Beck, 1966).

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la fraction}}{\text{distance parcourue par le front}} \times 100$$

La préparation des immunosérums est réalisée par des lapins immunisés à partir d'extraits de Cestodes prélevés sur *Psetta maxima* ou sur *Scophthalmus rhombus* selon la technique de Romestand (1978). Les immunosérums ainsi préparés sont stockés à -25° C. Trois types de réactions sont envisagées à partir des immunosérums obtenus : réactions homologues, hétérologues et par épuisement d'immunosérums. Les immunoélectrophorèses sont conduites selon la technique de Grabar et Williams (1953). Pour l'électrophorèse, le tampon utilisé est un tampon barbital sodique de pH 8,6.

Résultats

Protéines totales

Dans les extraits protéiques de Cestodes provenant respectivement du Turbot et de la Barbue, nous avons reconnu globalement l'existence de 19 fractions protéiques (*fig. 1*) distinctes, caractérisées par des R_f différents. Les fractions protéiques se répartissent en trois catégories principales suivant leur vitesse de migration. On peut ainsi distinguer :

— une fraction de mobilité électrophorétique « moyenne », présente dans les deux populations de Cestodes, de R_f 33 et que nous utiliserons comme bande de référence ;

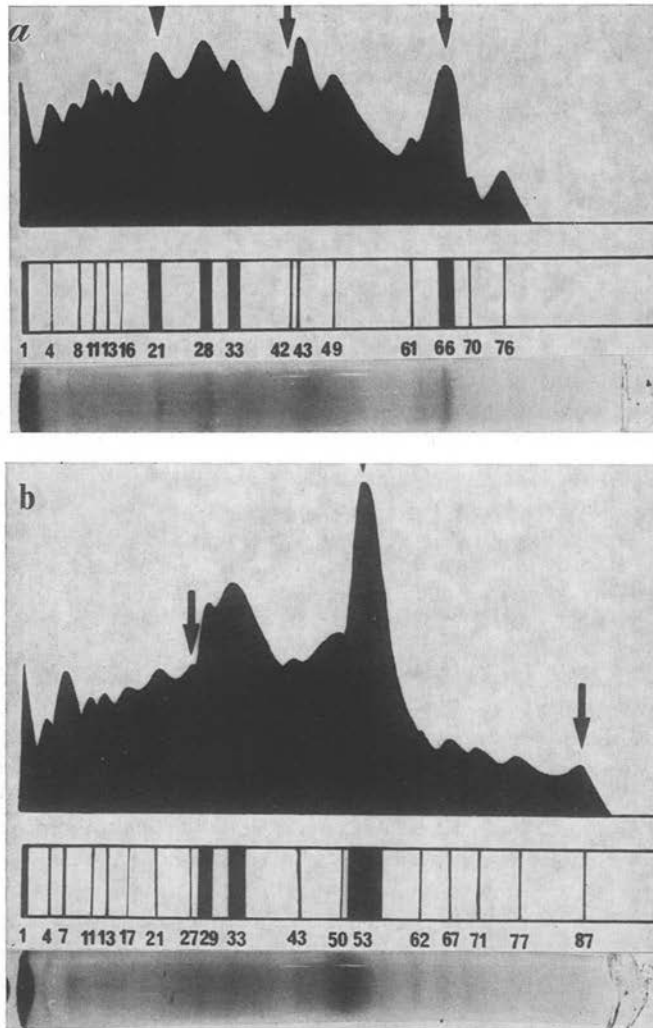


FIG. 1. — Électrophorèses et Tracés densitométriques des Protéines : a) *Bothriocephalus (supra sp. scorpii) gregarius* ; b) *Bothriocephalus (supra sp. scorpii) barbatus*.

- un groupe de fractions rapides (7 ou 8 selon la population considérée) dont les R_f respectifs sont toujours supérieurs à 33 ;
- un groupe de fractions lentes (8 ou 9 selon la population considérée) de R_f toujours inférieur à 33 et dont les bandes apparaissent plus condensées que celles du groupe précédent. Parmi ces différentes fractions, 5 d'entre elles de R_f compris entre 1 et 13 et présentes dans les deux populations sont de nature glycoprotéique.

Les variations observées entre les deux populations portent à la fois sur les fractions rapides et lentes (*fig. 1*).

Dans les fractions rapides, 6 bandes sont communes aux deux populations, bien que la fraction R_f 66-67 soit plus importante quantitativement chez *B. gregarius*.

Les fractions de R_f 53 et 87 n'apparaissent que chez *B. barbatus* alors que celle de R_f 42 ne figure que chez *B. gregarius*.

Enfin, la fraction R_f 27 de faible intensité présente chez *B. barbatus* fait défaut chez *B. gregarius*.

Complexes antigéniques

Les différentes immunoelectrophorèses réalisées sur les deux populations de Cestodes montrent :

— dans le cas de réactions homologues ; extraits de Cestodes de Barbué plus immun-sérum correspondant, apparition de 8 arcs de précipitations (*fig. 2a*) ;

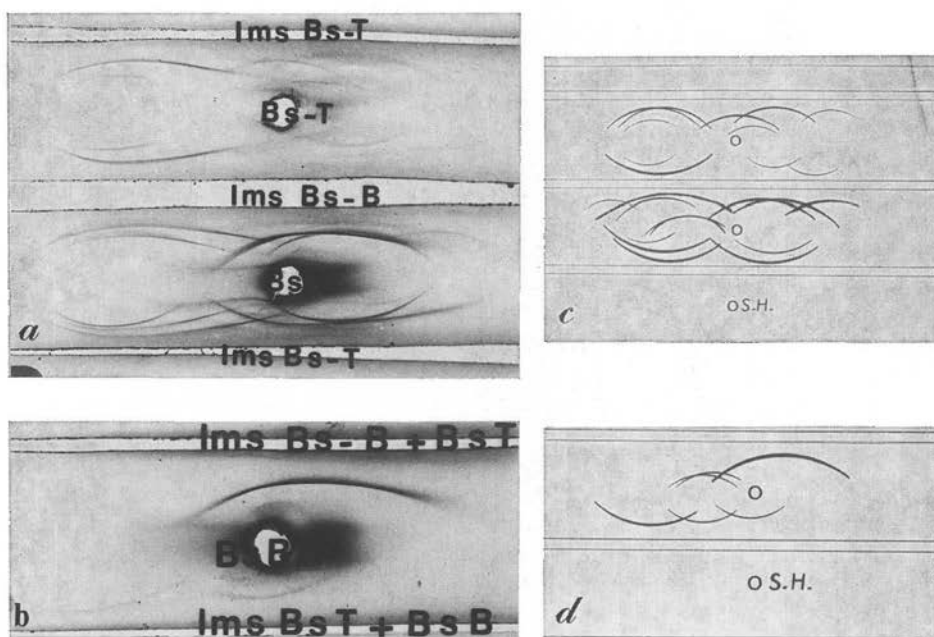


FIG. 2. — Immunoelectrophorèses et représentation graphique : a) Réactions homologues et hétérologues ; b) Réactions d'absorption d'immunsérum ; c) Représentation graphique des principaux arcs de précipitation observés sur la figure 1a ; d) Représentation graphique des principaux arcs de précipitation observés sur la figure 1b.

- Bs-T : Broyat de *Bothriocephalus (sup. scorpii) gregarius*
- Bs-B : Broyat de *Bothriocephalus (sup. scorpii) barbatus*
- S. H. : Sérum humain
- Ims. Bs. T. : Immunsérum *Bothriocephalus (sup. scorpii) gregarius*
- Ims. Bs. B. : Immunsérum *Bothriocephalus (sup. scorpii) barbatus*

— dans le cas de réactions homologues ; extraits de Cestodes de Turbot plus immun-sérum correspondant, apparition de 7 arcs de précipitations (fig. 2a).

L'utilisation des réactions hétérologues montre au sein de ces deux populations 5 fractions antigéniques communes.

Les réactions d'absorption ou d'épuisement d'immunsérums (fig. 2b) nous ont permis de caractériser chez *B. barbatus* trois arcs de précipitation qui sont absents de *B. gregarius*, ces arcs pourraient correspondre aux fractions protéiques de R_f 27, 53 et 87. Chez *B. gregarius* ces réactions révèlent la présence également de trois arcs ; pour l'un deux il pourrait s'agir de la fraction protéique de R_f 42 absente de *B. barbatus* ; par contre les deux autres arcs correspondraient à deux fractions protéiques de R_f 21 et 66 qui bien que communes aux deux populations de parasites ne se rencontrent pas chez *B. gregarius* et *B. barbatus* avec la même intensité.

Discussions et conclusions

L'analyse de la constitution protéique des Cestodes du Turbot ou de la Barbue montre que les deux populations présentent des fractions protéiques et antigéniques communes. Il existe donc bien au sein du complexe d'espèces *Bothriocephalus scorpii* une homogénéité de structure ; « la structure antigénique comparée des Helminthes exprime " pro parte " leur parenté systématique » (Capron *et al.*, 1968).

Mais des différences, quantitatives et qualitatives, de fractions protéiques confirmées par la présence d'arcs de précipitation existent entre les deux populations. Or, nous avons montré (Renaud *et al.*, 1983) que ces deux populations constituent deux entités taxinomiques spécifiques. Ainsi, les communautés et les divergences de structures des Cestodes peuvent être considérées comme un critère taxinomique, au même titre que certains caractères morphologiques ou biologiques ; et sont le reflet des mécanismes d'isolement et de spéciation ayant eu lieu entre ces deux groupes.

Quels mécanismes peut-on envisager pour expliquer l'apparition de ces deux espèces ?

Spéciation sympatrique alloxenique qu'Euzet et Combes (1980) définissent comme la divergence d'un pool de gènes issus d'un même parasite se trouvant chez deux hôtes différents. Mécanisme que Mayr (1978) exprime de la manière suivante : « La spéciation sympatrique peut avoir lieu chez des parasites ou des insectes inféodés à une espèce particulière de plante hôte. Si par accident une nouvelle espèce hôte est envahie, la descendance des immigrants peut former sur cette nouvelle espèce une population stable... Les gènes déterminant ce type de comportement seront préférentiellement conservés par la sélection naturelle d'où l'apparition d'une race nouvelle inféodée au nouvel hôte ; et finalement, la différenciation d'une nouvelle espèce spécifique du nouvel hôte .»

Spéciation allopatrique phylétique (Euzet et Combes, 1980) qui peut se définir comme la divergence génétique de deux populations d'hôtes ayant entraîné parallèlement la divergence génétique des populations de parasites qu'elles abritaient. Ce

qui nous amène à considérer que nombre de « binômes » écologiques parasites-hôtes ne sont pas des rencontres fortuites mais le fruit d'une longue coévolution.

La suite logique à donner à ce travail consiste à rechercher les communautés et les divergences biochimiques présentent au sein du complexe *Bothriocephalus scorpii* (Mueller, 1776) considéré comme très ubiquiste et à partir des données recueillies d'envisager les mécanismes susceptibles d'avoir entraîné les radiations adaptatives au sein de ce groupe de parasites.

BIBLIOGRAPHIE

- BYLUND G., DJUPSUND B. M. : Protein profiles as an aid to taxonomy in the genus *Diphyllobothrium*. *Z. Parasitenkunde*, 1977, 51, 241-247.
- CAPRON A., BIGUET J., ROSE F., VERNES S. A. : Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. Étude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, 109, 798-810.
- CHIPPENDALE G. M., BECK S. D. : Haemolymph protein of *Ostrinia rubilatis* during diapause and prepared differentiation. *J. Insect. Physiol.*, 1966, 12, 1629-1638.
- COOPER A. R. : North American Pseudophyllidean Cestodes from Fishes. *Illinois Biological Monographs*, 1918, 4, 1-243.
- EUZET L., COMBES C. : Les problèmes de l'espèce dans le règne animal. Tome III, Mémoire n° 40 de la Société Zoologique de France, 1980.
- GRABAR P., WILLIAMS C. A. : Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunologiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193-194.
- GROULADE, J. PICHOT P. : Électrophorèse des Protéines sériques en plaque et gel d'acrylamide. *Ann. Biol. Clin.*, 1967, 25, 371-381.
- JONES A. : The morphology of *Bothriocephalus scorpii* (Muller) (Pseudophyllidea, Bothriocephalidae) from littoral fishes in Britain. *J. Helminthol.*, 1975, 49, 251-261.
- LOWRY Oh., ROSEBROUG N. H., FAR A. L., RANDALL R. S. : Proteins measurements with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
- MAYR E. : L'évolution. *Pour la Science*, 1978, 13, 15-24.
- ORNSTEIN G., DAVIS G. J. : Discelectrophoresis, facts I and II, reprinted by distillation product industries Eastman Kodak Co (1962).
- RENAUD F., GABRION C., PASTEUR N. : Le complexe *Bothriocephalus scorpii* (Mueller, 1776) : différenciation par électrophorèse enzymatique des espèces parasites du Turbot (*Psetta maxima*) et de la Barbue (*Scophthalmus rhombus*). *C.R. Acad. Sci.*, 1983, 296, série III, 127-129.
- ROMESTAND B. : Étude écophysiological des parasites à Cymothoidae. *Thèse d'État*, Montpellier, 1978, 1-284.
- WARDLE R. A. : The limitations of morphometric characters in the differentiation of Cestoda. *Trans. R. Soc. Can.*, 1932, 26, 193-204.