

ÉTUDE DES RÉACTIONS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* A L'INFESTATION PAR *SCHISTOSOMA MANSONI*

I — Composition protéique de l'hémolymph des Mollusques sains. Comparaison entre les populations sauvages et les souches de laboratoire

C. HERBERTS, M. QUIGNON, Y. J. GOLVAN* et J. de FRESCHEVILLE**

RÉSUMÉ. La composition protéique de l'hémolymph du Mollusque *Biomphalaria glabrata* (souche brésilienne et formes de Guadeloupe) est analysée chez des individus sains. L'hémolymph présente une vingtaine de fractions se répartissant en trois groupes de migration. Les variations du schéma type sont définies. La variabilité individuelle est importante et doit être prise en compte pour les études comparatives.

**Study of *Biomphalaria glabrata* reaction to infection with *S. mansoni*.
I. Hemolymph proteic composition of noninfected molluscs. Comparison between
natural and laboratory strains.**

SUMMARY. The proteic composition of the hemolymph from healthy *Biomphalaria glabrata* (brazilian strain and wild specimens of Guadeloupe) is analysed. The blood shows about twenty proteic fractions with different electrophoretic mobilities. The variations occurring in the general pattern conduces to characterize two main blood's types. Individual variability is important and has to be considered in comparative studies on infested molluscs.

Introduction

L'association entre le mollusque *Biomphalaria glabrata* et son parasite, le Trématode *Schistosoma mansoni*, a été étudiée par de nombreux auteurs en raison du caractère hautement pathologique de cette parasitose chez l'homme.

Le trématode pénètre dans le Mollusque sous forme de larve miracidium et y effectue une partie de son développement en donnant des sporocystes. Ces derniers évoluent en cercaires qui sont libérées dans le milieu extérieur. Au cours de ces modifications, le parasite envahit divers organes notamment la glande digestive. Cependant les mécanismes d'action de *S. mansoni* sont encore mal connus (revue

* Service de Parasitologie, C.H.U. Saint-Antoine, 27, rue de Chaligny, F 75571 Paris Cedex 12.

** Laboratoire de Zoologie, Université P. et M. Curie, 4, place Juiieu ssF 75230 Paris cedex 05.

Accepté le 15 mars 1985.

dans 1) ; on ignore en particulier s'il existe chez le Mollusque une réaction de défense à la présence du parasite. Notre objectif étant l'étude des modifications cellulaires ou humorales induites chez *B. glabrata* par la pénétration puis le développement du schistosome, il était nécessaire, dans une première étape de connaître les caractéristiques du milieu intérieur de Mollusques sains.

Les recherches effectuées en pathologie humaine sur le Trématode ont conduit à développer en laboratoire des populations de Mollusques maintenues depuis fort longtemps dans des conditions déterminées. Il nous a paru nécessaire de les analyser conjointement à des ensembles de la même espèce prélevés dans le milieu naturel.

De plus, les études épidémiologiques réalisées en Guadeloupe ont indiqué (2) que toutes les populations d'une même espèce de Mollusques ne présentaient pas la même sensibilité au Trématode. D'autres travaux relatifs à *B. glabrata* ont donc été envisagés d'un point de vue systématique [3].

Pour le problème concerné, nous avons choisi d'étudier le milieu intérieur du Mollusque. En effet, c'est dans l'hémolymphe que se manifestent les modifications du métabolisme et que peuvent être observées les substances élaborées par le parasite ou synthétisées par l'hôte après infestation. L'analyse d'individus sains est donc un terme de référence indispensable à l'étude des effets du parasitisme.

Matériel et méthodes

I — OBTENTION DES ANIMAUX, PRÉLÈVEMENTS D'HÉMOLYMPHE

Les animaux utilisés appartiennent pour les uns à une souche brésilienne de *B. glabrata* maintenue de plus de vingt années au laboratoire ; pour ce qui concerne les mollusques sauvages, il s'agit de *B. glabrata* provenant de différentes stations de Guadeloupe ; (Basse-Terre : Marigot, Grand Étang, Grands Fonds, Jabrun)*. Après leur récolte les mollusques sont maintenus pendant un mois en élevage avant d'être analysés. Les animaux sont élevés dans de l'eau vieillie, à la température de 25-26° C, soumis à un nyctémère de 12 h-12 h, et nourris de laitue fraîche. L'étude porte sur des mollusques adultes dont la taille se situe entre 8 et 15 mm.

Après séchage de la coquille, un fragment de celle-ci est prélevé et l'hémolymphe ponctionnée à l'aide d'une microseringue. Nous avons effectué des prélèvements intracardiaques et des prises de sang dans la région hépatopancréatique. Les échantillons sont recueillis sur glace fondante puis centrifugés à 5 000 t/mn. pendant deux minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite prélevé et congelé à -20° C jusqu'au moment de son utilisation dans un délai maximum de six mois. Nous avons effectué des regroupements d'hémolymphe, le nombre d'individus utilisés variant de 3 à 23 avec en moyenne des groupes de dix mollusques. Dans ce dernier cas, des parties aliquotes ont été préparées pour le dosage des protéines. Nous avons également analysé des échantillons d'hémolymphe pris individu

* Nous adressons nos remerciements au Dr J. P. Pointier qui nous a rapporté les mollusques de Guadeloupe.

par individu, afin de préciser le degré de variabilité des phénomènes observés. Nous avons enfin étudié de la même manière le tissu hépatopancréatique.

2 — DOSAGE DES PROTÉINES

La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Lowry et coll. [4]. Elle varie entre 10,4 mg/ml et 14,2 mg/ml pour différents groupes d'hémolymphe.

3 — ÉLECTROPHORÈSES

La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse en gel d'acrylamide à 6 % avec un tampon Tris-glycine, pH 8,5. La migration s'effectue à température ambiante, l'intensité étant de 2 milliampères par tube. Les protéines sont révélées à l'amidoschwartz, la décoloration et la fixation sont effectuées dans une solution d'acide acétique à 7 %.

Résultats

ANALYSE DES FRACTIONS PROTÉIQUES

Les bandes observées sont repérées en mesurant leur distance de migration dans le gel. On définit le Rf de chaque fraction comme le rapport de la distance de migration de la protéine à la distance de déplacement du bleu de bromophénol, co-migrant avec l'échantillon.

Dans nos conditions expérimentales, l'hémolymphe de Mollusque présente une vingtaine de fractions, certaines fortement marquées d'autres plus discrètes. Pour les commodités de l'analyse nous les avons regroupées en trois ensembles de mobilité diverse : fractions lentes (Rf de 0,00 à 0,17), protéines à migration intermédiaire (Rf de 0,18 à 0,65) et groupe de grande mobilité (Rf de 0,66 à 1,00).

1 — *Mollusques sauvages.*

Nous décrivons tout d'abord l'image électrophorétique relative à la population de Marigot, les électrophorogrammes des mollusques d'autres stations étant ensuite comparés à cette dernière.

Du côté cathodique, on observe une fraction très fortement colorée pénétrant peu dans le gel (Rf : 0,00 à 0,008) et correspondant à l'hémoglobine ; elle précède deux bandes, l'une de Rf : 0,05 dont l'intensité varie avec les individus, l'autre de Rf : 0,06 souvent faible et peu visible. Dans la zone de Rf : 0,15 à 0,17, une protéine nette et forte est régulièrement observée. Elle correspond à la limite des fractions de faible mobilité.

Les protéines de moyenne vitesse de migration comprennent un groupe de trois bandes, de Rf respectifs : 0,18, 0,22, et 0,25. Cet ensemble est souvent très atténué dans les pools observés. L'analyse faite individu par individu montre que ce ne sont pas toujours les mêmes fractions qui s'affaiblissent.

Dans la zone de Rf : 0,29 à 0,31, on note une fraction de force variable mais toujours présente. La bande de Rf : 0,38 est constante et nette ; par contre la protéine suivante (Rf : 0,46) est moins régulière. Entre ces deux zones, on peut noter de fines lignes pâles (Rf : 0,41, 0,42, 0,44).

La région de Rf : 0,60 à 0,62 est marquée par la présence quasi permanente d'une fraction forte et nette. Les deux ou trois lignes correspondant aux protéines de Rf supérieur à 0,66 (protéines de grande mobilité) apparaissent plus faiblement marquées, parfois sous forme de zones colorées diffuses.

Si on compare les électrophorogrammes de mollusques sauvages d'une station à l'autre, on note quelques différences au niveau des fractions de faible mobilité et des protéines à migration intermédiaire. C'est ainsi que pour la station Grands Fonds, les mollusques présentent dans la première de ces zones deux à trois bandes supplémentaires, de Rf : 0,03 à 0,06. Celles-ci peuvent être masquées par la bande importante d'hémoglobine. Toutefois l'emploi d'un gel d'acrylamide de concentration différente permet de les caractériser. Pour les individus de cette dernière localité, on observe également l'absence d'une fraction normalement observée au niveau Rf : 0,56, et la présence au niveau Rf : 0,68 à 0,75 de colorations diffuses au lieu de bandes nettement délimitées.

Les individus de la station Jabrun diffèrent des précédents par l'absence de la fraction généralement observée au niveau Rf : 0,46.

L'ensemble de ces observations permet de définir ainsi un schéma type de l'hémogramme. Mais les observations faites individu par individu pour chaque station conduisent à définir dans la composition sanguine du mollusque deux aspects, l'un de type « fort » avec de nombreuses fractions nettement marquées, l'autre de type « faible ». Compte tenu de ces observations, et pour les stations étudiées, le protéinogramme de diverses populations de *Biomphalaria glabrata* est sensiblement le même. L'on ne peut ainsi envisager, par l'examen de l'hémogramme considéré dans son ensemble de rapporter tel ou tel individu à une population donnée.

2 — Souches de laboratoire.

Les *Biomphalaria glabrata* souche Brésil présentent le même type d'hémogramme que celui des formes sauvages envisagées. L'hémoglobine pénétrant très peu dans le gel est suivie d'une fraction située au niveau Rf : 0,05 et d'une bande à 0,17 toujours visible. Cette dernière peut toutefois être atténuée parfois dédoublée. Les fractions intermédiaires comprennent un groupe de trois bandes plus faiblement marquées, de Rf respectifs : 0,20, 0,23 et 0,27, une fraction plus intensément colorée (Rf : 0,30-0,33) et une fraction protéique irrégulièrement observée (Rf : 0,37). La fraction suivante (Rf : 0,40) est souvent forte, et parfois diffuse. Dans la plupart des échantillons une protéine nette et accentuée est révélée avec un Rf de 0,50. Au-delà on observe deux à trois fractions faiblement marquées puis une bande importante de Rf : 0,65. Les protéines rapides sont généralement au nombre de quatre et de faible intensité; elles se situent entre les zones Rf : 0,70 et 0,90.

Discussion - Conclusion

L'étude réalisée tant sur des mollusques sauvages que sur des souches de laboratoire permet de mettre en évidence un modèle général de l'hémogramme et de préciser les variations susceptibles d'apparaître autour de ce schéma de base (fig. 1 et 2).

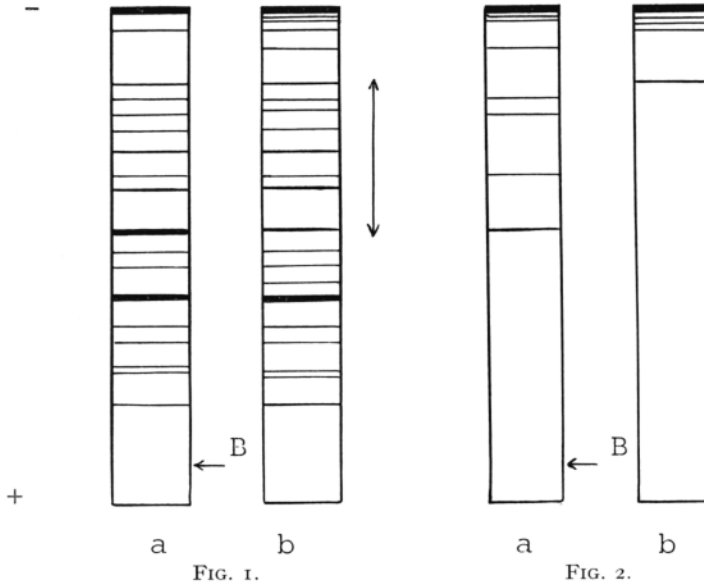


FIG. 1. — a) Schéma d'électrophorèse d'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata* ; acrylamide à 6 %, 15 µl de dépôt. Sens de migration — vers +. Les flèches indiquent une zone bleuée. b) Variations des fractions lentes.

FIG. 2 a et b. — Schéma du protéinogramme de mollusque avec réduction progressive des fractions rapides ; mêmes conditions que figure 1.

L'hémoglobine est toujours quantitativement importante. Les variations de sa concentration dans le sang des différents groupes de mollusques peuvent être liées à la taille des individus [3]. Dans nos conditions expérimentales, l'hémoglobine migre peu et masque parfois des fractions immédiatement sous-jacentes dont le nombre et l'intensité respectives diffèrent.

Au-delà des fractions lentes, les variations observées portent davantage sur l'importance relative des protéines observées que sur leur présence ou leur absence. Les différences individuelles conduisent à définir des schémas d'hémogrammes « forts » et « faibles » qui se retrouvent dans les souches d'élevage comme dans les populations sauvages. Cette diversité ne peut être mise en relation avec des différences de l'environnement — caractéristiques édaphiques ou climatiques — pour les ensembles considérés. Cette variation ne paraît pas non plus être liée à une dilution

de l'hémolymph correspondant à un artefact lors de la ponction. En effet, les rapports d'intensité de différentes fractions homologues n'étant pas constants, ceci indique que chacune d'elles varie indépendamment.

Enfin, nous avons vérifié, par l'électrophorèse simultanée d'extraits de glande digestive, que les hémolymphes de type « fort » ne correspondent ni dans le cas des

TABLEAU I. — Hémogrammes de *B. glabrata* de diverses provenances.

Rf	Rf	Rf	Rf
0,000 } Hb. 0,008 } Hb.	0,000 } Hb. 0,008 } Hb. 0,03	0,000 } Hb. 0,008 } Hb. 0,03	0,000 } Hb. 0,008 } Hb. 0,03 0,04 0,05
0,05	0,05	0,05	0,05
0,06	0,06	0,06	0,06
0,15	0,15	0,14	0,17
0,18	0,18 0,21	0,19	0,20
0,22			0,23
0,25	0,25	0,26	0,27
0,29	0,31	0,29	
0,30			0,30 0,33 0,37
	0,37		
0,38		0,39	
0,41	0,40		0,40
0,42			
0,44			
0,46	0,46	—	0,50
0,52	0,52	0,54	0,58
0,56	—	0,59	
0,60			
0,62	0,62	0,62 0,64	0,62 0,65
0,66	0,68	0,66	
0,70		0,73	0,72
0,76	0,75		0,76
	0,78	0,80	0,79
0,84	0,85	0,86	0,85
Marigot	Gd. Fonds	Jabrun	
	GUADELOUPE Mollusques sauvages		BRÉSIL Souche d'élevage

Hb : hémoglobine

— : fractions lentes ; - - - - fractions de moyenne mobilité ;

..... : fractions rapides.

mollusques de Guadeloupe, ni pour les souches de laboratoire, à une contamination par du tissu hématopancréatique au moment du prélèvement. Les images électrophorétiques du foie et du sang sont différentes, et si certaines fractions sont observées migrant au même niveau dans les deux tissus, leur concentration plus importante dans l'hémolymphe permet d'exclure l'hypothèse d'une contamination de celle-ci par la glande.

En conclusion, l'hémogramme de mollusque sain présente quelle que soit son origine, une vingtaine de fractions avec une variabilité assez importante de leur intensité (*tableau I*). Cette variabilité ne peut pour l'instant être reliée à des modifications connues du métabolisme. Les travaux sont poursuivis pour préciser les causes de la diversité observée, qui doit être prise en considération dans l'étude comparative des mollusques sensibles au Trématode et des individus résistants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRESS F. M., CHENG T. C. : Alteration in total serum proteins and protein fractions in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni*. *J. Inv. Pathol.*, 1973, 22, 382-390.
 - [2] THERON, communication personnelle.
 - [3] MICHELSON E. H., DU BOIS L. : Intraspecific variations in the haemolymph of *Biomphalaria glabrata* a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Malacologia*, 1975, 15, 105-111.
 - [4] LOWRY O. H., ROSEBOUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. : *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
-