ÉTUDE BIOSYSTÉMATIQUE DE DEUX POPULATIONS DE TÉLÉOSTÉENS (*SARDINA PILCHARDUS*) ET DE LEURS COPÉDODES PARASITES (*PERODERMA CYLINDRICUM*) SUR LES CÔTES TUNISIENNES

BECHEIKH S.*, RAIBAUT A.***, EUZET S.** et BEN HASSINE O.K.*

Summary : BIOSYSTEMATIC ANALYSIS OF TWO TELEOSTEAN POPULATIONS (*SARDINA PILCHARDUS*) AND OF THEIR PARASITE COPEPODES (*PERODERMA CYLINDRICUM*) ALONG TUNISIAN COASTS

A genetic analysis realized, on Tunisian coasts, within and between two populations of a Teleostean (*Sardina pilchardus*) on one hand, and two populations of their parasitic Copepods (*Peroderma cylindricum*) on the other hand, reveal that: (I) the 14 loci analysed are monomorphic in the Teleostean populations; (II) 3 loci among 13 investigated are polymorphic in the Copepod populations. Statistical tests from deviations of Hardy-Weinberg equilibrium and genotypic homogeneity show the existence of strong gene flows within and between Copepod populations. Thus, it seems that the Teleostean (*Sardina pilchardus*) and the Copepod (*Peroderma cylindricum*) constitute, at least on Tunisian coasts, two homogeneous taxonomic units.

KEY WORDS : biodiversity, isozymes, Teleostean, Crustacean, parasitism.

INTRODUCTION

Les Clupéidés constituent une proportion importante des Téléostéens capturés sur le littoral tunisien. Dans cette famille, la sardine [*Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792)], est fréquemment parasitée par un copépode *Peroderma cylindricum* (Heller, 1865), appartenant à la famille des Pennellidae, qui se fixe au niveau du rein de l'hôte (Raibaut *et al.*, 1971; Ktari et Abdelmouleh, 1980; Kabata, 1984). L'analyse des caractéristiques du parasitisme des sardines (prévalence et intensité) par *Peroderma cylindricum* montre, en Tunisie, une forte variabilité en fonction des sites de prélèvement (Ben Hassine *et al.*, 1990). En effet, si la prévalence parasitaire est comprise entre 27 et 37 % sur la côte septentrionale, elle chute brutalement dès le passage sur la façade maritime Est; les plus faibles prévalences (3 à 4 %) sont observées dans la région de Sfax. Par ailleurs, sur la base de caractéristiques méristiques et

Résumé :

Une analyse génétique du polymorphisme de gènes de structure (isoenzymes) effectuée sur les côtes tunisiennes, dans et entre deux populations de Téléostéens (*Sardina pilchardus*) d'une part, et deux populations de leurs copépodes parasites (*Peroderma cylindricum*) d'autre part, révèle l'existence: (I) d'un monomorphisme chez les Téléostéens au niveau des 14 loci analysés; (II) de 3 loci polymorphes parmi 13 étudiés chez les Copépodes. Les tests de conformité intra-populations à la loi de Hardy-Weinberg et d'homogénéité génotypique inter-populations montrent la présence de flux géniques dans et entre ces deux populations de Copépodes. Ainsi, sur les côtes tunisiennes, il semble que le Téléostéen *Sardina pilchardus* et le Copépode *Peroderma cylindricum* appartiennent à deux unités taxinomiques homogènes.

MOTS CLES : biodiversité, isoenzymes, Téléostéens, Crustacés, parasitisme.

morphométriques, Kartas (1981) signale la présence, entre la côte septentrionale et la côte Est, de deux stocks différenciés de sardines. Les divergences observées, tant sur les paramètres intrinsèques (morphométrie), qu'extrinsèques (parasitisme) seraient-elles le reflet de l'existence de deux entités génétiques de sardines et/ou de parasites? Pour tenter d'apporter un élément de réponse à cette question, nous avons mené une analyse parallèle de biosystématique entre deux échantillons de sardines d'une part, et de leurs parasites respectifs (Copépodes) d'autre part. En effet, les parasites représentent souvent, de par les liens évolutifs étroits qu'ils ont avec leurs hôtes (spécificité parasitaire), d'excellents marqueurs biologiques apportant des éléments d'information primordiaux sur l'écologie et la biologie des hôtes (Le Brun *et al.*, 1990; Renaud *et al.*, 1990; Tirard *et al.*, 1992).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PROVENANCE DU MATÉRIEL ET CONSERVATION DES TISSUS

L'échantillonnage des hôtes (*Sardina pilchardus*) et des parasites (*Peroderma cylindricum*) a été effectué dans deux stations des côtes tunisiennes : côte septentrionale (Bizerte) et façade

* Laboratoire de Parasitologie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus universitaire du Belvédère, 1060 Tunis, Tunisie.

** Laboratoire de Parasitologie Comparée (URA 698, CNRS), Université de Montpellier II, Pl. E. Bataillon, 34095 Montpellier CEDEX 5, et, Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral (U.M.II), 1 Quai de la Daurade, 34200, Sète, France.

Correspondance : Pr. A. RAIBAUT, Laboratoire de Parasitologie Comparée (URA 698, CNRS), Université de Montpellier II, Pl. E. Bataillon, 34095 Montpellier CEDEX 5, France.

Téléphone: 67-14-37-52; Télécopie: 67-14-46-46.

maritime Est (Sousse) (Fig. 1). Dans chacune des stations, dès le retour des bateaux de pêche, le foie et le muscle de 30 sardines ont été prélevés et conservés individuellement dans des containers contenant de l'azote liquide. Les Copépodes parasites sont prélevés

sur leur hôte et conservés de la même manière. Nous avons pu ainsi récolter 26 *Perodermis* dans la région de Bizerte et 30 dans celle de Sousse. Au laboratoire, l'ensemble de ces tissus est conservé au congélateur à -80°C jusqu'à la réalisation des électrophorèses.

Fig. 1. – Sites de prélèvements des hôtes et de leurs parasites sur les côtes tunisiennes.

ELECTROPHORESES

Nous avons utilisé la méthode d'électrophorèse de protéines homologues (isoenzymes), telle que décrite par Pasteur *et al.* (1984). Elle consiste à interpréter génétiquement le polymorphisme observé après séparation électrophorétique des protéines en fonction de leur charge électrique globale et révélation histochimique des activités enzymatiques spécifiques. Le grand avantage de cette méthodologie est de permettre une interprétation directe des structures génotypiques sous-jacentes aux phénotypes observés. En effet, les allèles des gènes codant pour ces protéines étant co-dominants, les différents phénotypes observés correspondent à différents génotypes.

Les hôtes : chaque organe (foie, muscle) est homogénéisé volume pour volume dans une solution de broyat (10 mM Tris-EDTA, pH 6.8). Quelques gouttes de tétrachlorure de carbone (CCl₄) sont ajoutées au moment de l'extraction des protéines du foie; ce composant permet ainsi d'éliminer les lipides qui gêneraient la migration électrophorétique. Durant 30 minutes, les extraits sont ensuite centrifugés à 15 000 t/mn à une température de 4°C. Les migrations électrophorétiques et les colorations sont réalisées selon les protocoles décrits par Pasteur *et al.* (1984) et Richardson *et al.* (1986). Nous avons pu ainsi analyser et interpréter génétiquement 11 systèmes enzymatiques : phosphoglucomutase (PGM; E.C. 5.4.2.2); phosphogluconatedéshydrogénase (PGD; E.C. 1.1.1.44); lactate déshydrogénase (LDH; E.C. 1.1.1.27); 'malic' enzyme (ME; E.C. 1.1.1.38); phosphatase acide (ACP; E.C. 3.1.3.2); créatine kinase (CK; E.C. 2.7.3.2); adénylate kinase (AK; E.C. 2.7.4.3); malate déshydrogénase (MDH; E.C. 1.1.1.37); glucose phosphate isomérase (GPI; E.C. 5.3.1.9); peptidase 2 (PEP1; E.C. 3.4.11.4; substrat LEU-GLY-GLY); fumarase (FUM; E.C. 4.2.1.2). A partir des ces 11 systèmes, nous avons pu étudier l'expression de 14 gènes de structure codant pour des enzymes. En effet, les systèmes glucose phosphate isomérase (GPI; E.C. 5.3.1.9), lactate déshydrogénase (LDH; E.C. 1.1.1.27) et malate déshydrogénase (MDH; E.C. 1.1.1.37) révèlent chacun l'existence de deux loci distincts, un au niveau du foie et un au niveau du muscle.

Les parasites : chaque parasite est broyé dans 200 µl de la solution de broyat (10 mM Tris-EDTA pH 6.8). Les extraits sont centrifugés durant 5 minutes à 10 000 t/mn et 4°C. Les protocoles d'électrophorèse et de colorations histochimiques sont identiques à ceux des hôtes. Pour s'affranchir d'une éventuelle "pollution" due à du sang hôte ingéré par le parasite, un extrait de tissu hôte est systématiquement placé dans chaque gel d'analyse des parasites. Les loci ainsi mis en évidence sont donc

propres aux parasites. 11 systèmes enzymatiques sont révélés et interprétés génétiquement: phosphoglucomutase (PGM; E.C. 5.4.2.2); phosphogluconatedéshydrogénase (PGD; E.C. 1.1.1.44); phosphatase acide (ACP; E.C. 3.1.3.2); adénylate kinase (AK; E.C. 2.7.4.3); malate déshydrogénase (MDH; E.C. 1.1.1.37); glucose phosphate isomérase (GPI; E.C. 5.3.1.9); peptidase 1 (PEP1; E.C. 3.4.13.18; substrat VAL-LEU); peptidase 2 (PEP2; E.C. 3.4.11.4; substrat LEU-GLY-GLY); peptidase 3 (PEP3; E.C. 3.4.13.9; substrat PHE-PRO); aspartate amino transférase (AAT; E.C. 2.6.1.10); mannose phosphate isomérase (MPI; E.C. 5.3.1.8). Ces 11 systèmes révèlent l'activité de 13 gènes de structure. En effet, les systèmes phosphogluconatedéshydrogénase (PGD; E.C.1.1.1.44) et peptidase 1 (PEP1; E.C. 3.4.13.18; substrat VAL-LEU) présentent chacun deux loci différents.

ANALYSES STATISTIQUES

Les conformités à la loi de Hardy-Weinberg intra-populations et à l'homogénéité génotypique inter-populations sont analysées par la méthode exacte de Fisher (Scherrer, 1984). Ce test qui fournit la probabilité exacte doit être choisi par rapport à tout autre statistique, car il est indépendant de la distribution des données et de l'effectif des classes.

RÉSULTATS

Populations hôtes : l'ensemble des locus analysés dans les deux échantillons hôtes se sont révélés monomorphes pour les mêmes allèles. Aucune différenciation allélique n'a donc pu être mise en évidence entre les sardines de la façade nord et de la façade est des côtes tunisiennes.

Populations parasites: sur les 13 loci analysés, 3 (PGD, MDH et PEP 2) sont polymorphes dans les deux stations. Ils présentent chacun deux allèles dont les fréquences respectives sont présentées dans le tableau I.

Les tests de conformité à la loi de Hardy-Weinberg montrent que, dans les deux échantillons et pour chaque locus, les distributions observées des génotypes ne s'écartent pas significativement des distributions attendues sous l'hypothèse d'équilibre. Les probabilités exactes sont respectivement à Bizerte et Sousse: locus PGD ($P = 0,68$ et $0,46$); locus MDH ($P = 1,00$ et $1,00$) et locus PEP2 ($P = 1,00$ et $0,55$).

Le test de comparaison des distributions alléliques, au niveau des trois loci, entre les deux échantillons révèle l'existence d'une homogénéité génétique entre les populations de Bizerte et de Sousse ($P = 0,20$ pour le locus PGD; $P = 0,77$ pour le locus MDH et $P = 0,81$ pour le locus PEP2).

Locus	BIZERTE (Fig.1)	SOUSSE (Fig.1)
PGD		
fréquence allèle a	0,44	0,57
fréquence allèle b	0,56	0,43
MDH		
fréquence allèle a	0,86	0,90
fréquence allèle b	0,14	0,10
PEP2		
fréquence allèle a	0,21	0,18
fréquence allèle b	0,79	0,82

Tableau I.

DISCUSSION

Il n'existe pas de différenciation génétique, du moins au niveau des loci analysés lors de cette étude, des populations hôtes (sardines) d'une part et parasites (copépodes) d'autre part entre les sites de Bizerte et Sousse. Ainsi, sur la base de nos résultats, nous pouvons conclure que, sur les côtes tunisiennes, la sardine (*Sardina pilchardus*) et son copépode parasite (*Peroderma cylindricum*) semblent respectivement appartenir à une seule et même entité génétique, c'est à dire un seul et même taxon. Les différences de prévalence et d'intensité parasitaires observées entre ces deux sites géographiques par Ben Hassine *et al.* (1990) ne semblent donc pas corrélées à des caractéristiques intrinsèques (génétiques) des populations hôtes ou parasites comme cela a pu être montré chez le copépode *Lernaeocera luscii* parasite de *Trisopterus luscus* entre les côtes atlantiques et méditerranéennes françaises (Tirard *et al.*, 1992). Les divergences morphométriques et méristiques signalées par Kartas (1981), chez les sardines tunisiennes, peuvent être le reflet d'une structuration génétique locale que nous n'aurions pas pu mettre en évidence à l'aide des marqueurs génétiques étudiés au cours de cette étude. Cependant, l'absence de différenciation des structures génotypiques entre les deux populations de parasites suggère quant à elle l'existence de flux géniques symboles de l'homogénéisation qui doit également avoir lieu chez les hôtes porteurs de ces parasites. Ainsi, sachant que ces parasites possèdent un cycle hétéroxène à deux hôtes, nous pensons que les différences des paramètres du parasitisme entre les deux zones doivent trouver leur origine dans l'écologie du premier hôte où a lieu la reproduction du parasite. Il devient donc maintenant nécessaire d'entreprendre des études sur la biologie des populations de cet hôte pour mieux cerner les paramètres épidémiologiques de cette parasitose.

RÉFÉRENCES

- BEN HASSINE O.K., RAIBAUT A., BEN SOUISSI J. et ROUSSET V. : Morphologie de *Peroderma cylindricum* Heller, 1865, copépode parasite de la sardine, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) et quelques aspects de son écologie dans les eaux côtières tunisiennes. *Annales des Sciences Naturelles*, 1990, Paris, 11, 9-16.
- KABATA Z. : Diseases caused by Metazoans: Crustacean. In, Diseases of Marine Animals. (O. Kinne Ed.), 1984, IV, 1, 321-399.
- KARTAS F. : Les clupéidés de Tunisie. Caractéristiques biométriques et biologiques. Etude comparée des populations de l'Atlantique et de la Méditerranée. Thèse d'Etat, Université de Tunis, 1981, 1-608.
- KTARI M.H. et ABDELMOULEH A. : Note sur la présence et les effets du copépode *Peroderma cylindricum* Heller 1868 parasite de la sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) des côtes tunisiennes. *Bulletin de l'Institut Océanographique des Pêches de Tunisie*, 1980, 7, 103-112.
- LE BRUN N., RENAUD F. et LAMBERT A. : Differential settlement by *Diplozoon gracile* (Monogenea) on teleostean (Cyprinid) hosts in relation to biological and environmental conditions. *Acta Oecologia*, 1990, 11, 5, 729-739.
- PASTEUR N., PASTEUR G., BONHOMME F., CATALAN J. et BRITTON DAVIDIAN J. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Techniques et documentation, Lavoisier, Paris, 1-217.
- RAIBAUT A., BEN HASSINE O.K. et ESSAFI K. Copépodes parasites des poissons de Tunisie. *Bulletin de l'Institut Océanographique des Pêches de Tunisie*, 1971, 2, 169-197.
- RENAUD F., BLANQUER A. et GABRION C. Genetic divergence in *Bothriocephalus gregarius* : A hypothesis based on the paleogeographic movements of their teleost (Psetta) hosts. *International Journal for Parasitology*, 1990, 20, 5, 637-643.
- RICHARDSON B.J., BAVERSTOCK P.R. et ADAMS M. : Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies. *Academic Press*, Australia, 1986, Sydney, 1-410.
- SCHERRER B. : Biostatistique. Gaëtan Morin, 1984, Québec, 1-547.
- TIRARD C., BERREBI P., RAIBAUT A. et RENAUD F. : Biodiversity and biogeography in heterospecific teleostean (Gadidae) - copepod (*Lernaeocera*) associations. *Canadian Journal of Zoology*, 1992, 71, 1639-1645.

Accepté le 17 juillet 1994