

**Etude de l'influence d'une microsporidiose sur les électrophorégrammes (protéinogramme et zymogramme) des protéines de l'hémolymph de *Carcinus mediterraneus* (Crustacé, Brachyure)<sup>1</sup>**

**Influence of microsporidian infestation on electrophoregrams (proteinogram and zymogram) of hemolymph proteins in *Carcinus mediterraneus* (Crustacea, Brachyura)**

C. P. Vivarès, J. Trellu et H. J. Ceccaldi

Laboratoire d'Ichthyologie et de Parasitologie générale, U. S. T. L., F-34060 Montpellier Cédex (France); Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Biochimie et Ecologie des Invertébrés marins, Station marine d'Endoume, F-13007 Marseille (France), 1 mars 1977

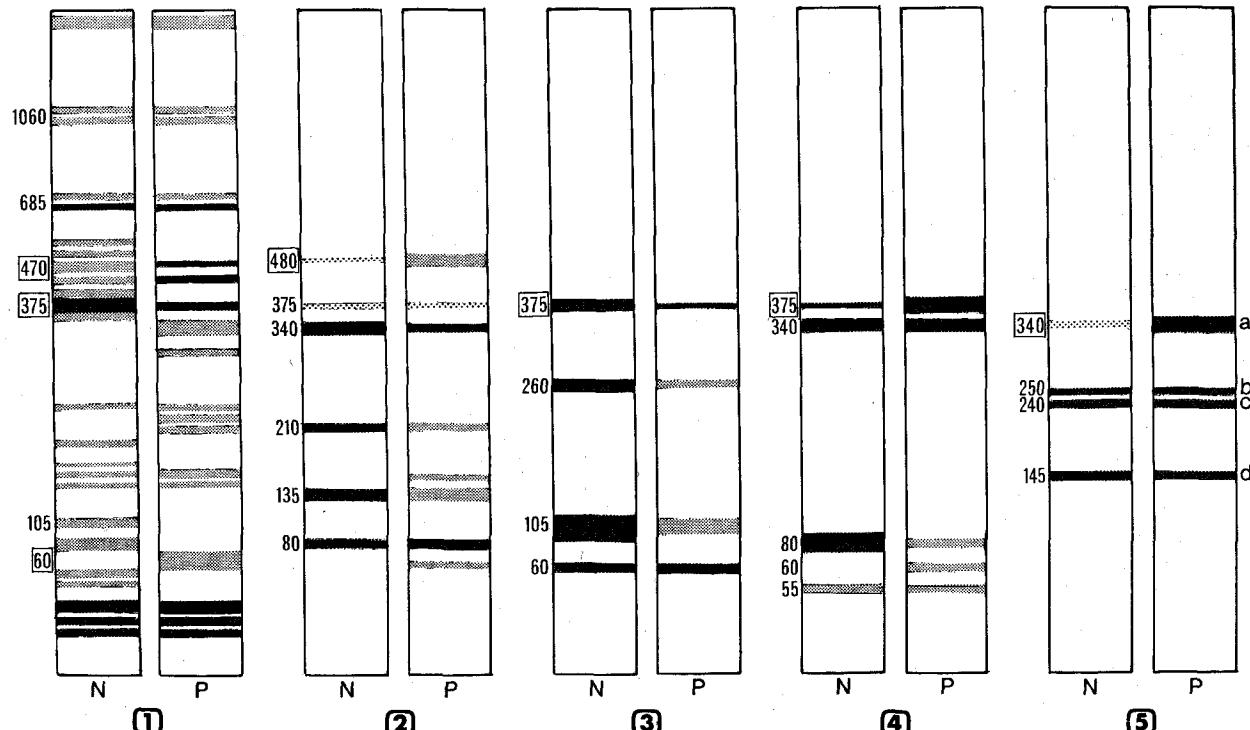
**Summary.** The use of the method of concentration gradient of polyacrylamide gel electrophoresis has permitted to reveal a difference in zymograms when studying the hemolymph of healthy crabs and that of crabs parasitized by the muscular microsporidia *Thelohania maenadis*. The zymograms of the parasitized crabs present an increase in chymotrypsin activity and variations in the zones of esterase activity.

Dans un travail préliminaire<sup>2</sup>, nous avons comparé, par la méthode de «disc-electrophoresis», les électrophorégrammes des hémolymphe de *Carcinus* sains et de *Carcinus* dont les muscles sont parasités par des Microsporidies (Protozoaires). Par la méthode d'électrophorèse en gel de polyacrylamide à gradient continu de concentration, nous voulons affiner nos résultats et caractériser quelques activités enzymatiques des fractions protéiques mises en évidence.

**Matériel et méthodes.** Les *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884, ont été pêchés, en mai 1976, dans l'étang de Vic (près de Montpellier, France); certains (1%) étaient parasités par des sporoblastes et des spores de *Thelohania maenadis* Pérez, 1904, ayant détruit 70 à 80% de leur musculature. Nos observations ont porté exclusivement sur des animaux de sexe mâle, au stade C 4 selon Drach<sup>3</sup>,

maintenus à jeun pendant 36 h à 18 °C. L'hémolymph, prélevée dans l'après-midi entre 15 et 17 h, est diluée de moitié avec du tampon d'électrophorèse (tris: 10,75 g/l, acide borique 5,04 g/l, Na<sub>2</sub> EDTA: 0,93 g/l, pH 8,35). L'électrophorèse de 5 µl d'échantillon est menée sur gel en gradient continu de polyacrylamide (Pharmacia PAA 4/30) durant 15 h à 125 V stabilisés. La coloration des protéines totales s'effectue à l'amido-schwartz et la révélation des activités enzymatiques à l'aide de substrats

- 1 Contribution n° 1 du Centre de Parasitologie et de Pathologie comparées de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, F-34060 Montpellier Cédex.
- 2 C. P. Vivarès, M. Ryckaert et H. J. Ceccaldi, C. r. Acad. Sci., Paris D 279, 371 (1974).
- 3 P. Drach, Ann. Inst. Océanogr. 19, 103 (1939).



Protéinogramme et zymogrammes de l'hémolymph de *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884, normaux (N) et parasités (P) par la microsporidie *Thelohania maenadis* Pérez, 1904. 1 Protéinogramme. 2 Zymogramme des estérases à 2C. 3 Zymogramme des estérases à 12C. 4 Zymogramme des estérases à 14C. 5 Zymogramme de la chymotrypsine (5a), de la phosphatase alcaline (5b), de l'α-glucosidase (5c) et de la phosphatase acide (5d). Latéralement, les poids moléculaires ( $PM \times 10^{-3}$ ) approximatifs des principales fractions sont indiqués; ceux qui sont encadrés correspondent à des fractions à pourcentage d'intégration significativement différent ( $p < 0,01$ ) entre les animaux normaux et parasités.

histochimiques spécifiques. L'évaluation approchée des poids moléculaires (PM) a été obtenue d'après une courbe établie à partir d'un témoin de sérum humain. La comparaison des activités d'animaux normaux et parasités est faite à l'aide d'un test de F portant sur les intégrations au photomètre intégrateur enregistreur Vernon (type PHI 3 UV) de 6 électrophorèses pour chaque activité et pour chaque lot de crabes.

**Résultats.** Ils sont regroupés dans un protéinogramme et dans un zymogramme schématiques sur lesquels les poids moléculaires ( $PM \times 10^{-3}$ ) sont indiqués (figure). Le test de F effectué sur la somme des intégrations de chaque fraction protéique ne montre pas de différences significatives entre les animaux normaux et parasités; par contre, elles sont constatées entre ces deux lots pour certaines fractions protéiques. Chez les crustacés sains, 24 bandes ont été révélées, et 19 chez les microsporidiens. La diminution significative ( $p < 0,01$ ) de l'intégration des bandes de PM 470 000 et 375 000 chez les parasités semble compensée par une augmentation de même valeur au niveau PM 60 000; de plus, 3 bandes disparaissent entre les PM 400 000 et 500 000 ainsi que 3 autres entre les PM 105 000 et 55 000; enfin, les crabes parasités se caractérisent par l'apparition d'une importante bande de PM 340 000 et la disparition d'une autre au niveau du PM 105 000. Chez les crabes normaux, 6 fractions ont une activité estérasique non spécifique de dégradation des acides organiques à 2C, les parasités en ont 8 (les 2 fractions supplémentaires se situant aux PM 155 000 et 65 000); chez ces derniers, au PM 480 000, l'intensité est nettement supérieure ( $p < 0,05$ ). Sur les 4 fractions d'activité estérasique de dégradation des acides organiques à 12C, une seule (PM 375 000) diminue chez les parasités ( $p < 0,01$ ). Alors que l'hémolymphe des crabes sains possède 4 fractions protéiques à activité estérasique de dégradation des acides organiques à 14C, celle des parasités en a 5 (la fraction supplémentaire est révélée au PM 60 000); cette apparition et l'augmentation de la bande de PM 375 000 ( $p < 0,05$ ), chez les microsporidiens, semblent compensées par une diminution équivalente au PM 80 000 ( $p < 0,01$ ) par rapport à l'intégration normale. Les activités phosphatase alcaline (PM 250 000), phosphatase acide (PM 145 000),  $\alpha$ -glucosidase (PM 240 000) ne montrent pas de différences significatives entre les 2 lots. Quant à l'activité protéasique, elle semble être ef-

fectuée par une seule enzyme de PM approximatif de 340 000; elle est environ 6 fois plus forte dans l'hémolymphe du crabe parasité que dans celle de l'animal sain ( $p < 0,05$ ).

**Discussion.** La technique utilisée nous permet d'une part d'obtenir un électrophorégramme plus détaillé que précédemment<sup>2</sup> (24 fractions au lieu de 18), notamment au niveau des fractions que nous avions considérées comme ayant une mobilité moyenne ou rapide, et d'autre part, d'évaluer leur poids moléculaire. En ce qui concerne l'apparition des fractions dans le protéinogramme des animaux parasités, nous pensons que celle de PM 340 000 correspond à une très forte augmentation de l'activité chymotrypsine, et celle de PM 60 000 à l'intensification de l'activité estérasique globale. Les travaux antérieurs effectués en disc-electrophorèse montrent que les Arthropodes microsporidiens ont tous une hémolymphe dont l'électrophorégramme est caractéristique de l'état pathologique considéré; cet électrophorégramme est différent d'un hôte à l'autre bien que les fractions protéiques concernées soient essentiellement celles dont la mobilité est lente ou moyenne<sup>2,4,5</sup>. Remarquons que non seulement les hôtes étudiés appartiennent à des classes ou des ordres différents (Insectes Lépidoptère<sup>4</sup> ou Phasmidoptère<sup>5</sup>, Crustacés Brachyura ou Natantia<sup>2</sup>) dont la physiologie est différente mais que les parasites font partie de genres distincts (Nosema<sup>4</sup>, Pleistophora<sup>5</sup>, Thelohania<sup>2</sup>). Par contre, *Sacculina carcinis* (Crustacé Rhizocéphale) a une action dissemblable de celle de *T. maenadis* sur l'hémolymphe de *C. mediterraneus* car elle provoque l'apparition sur son électrophorégramme d'une fraction de haut poids moléculaire<sup>6,7</sup>. Puisque chez les crabes parasités par *T. maenadis*, la seule fraction à activité chymotrypsine de l'hémolymphe augmente très fortement, cette augmentation ne serait-elle pas due à l'induction par la microsporidie d'une synthèse accrue de protéase par son hôte dont elle contrôlerait l'autolyse?

- 4 J. Weiser et O. Lysenko, Acta ent. bohemoslav. 69, 97 (1972).
- 5 F. Demarti-Lachaise et M. Raabe, C. r. Acad. Sci., Paris D 278, 2465 (1974).
- 6 C. Herberts, C. r. Acad. Sci., Paris D 279, 1625 (1974).
- 7 N. Andrieux, J. Berreur-Bonnenfant et C. Herberts, C. r. Acad. Sci., Paris 282, 2091 (1976).

## Measurement of orientation responses of caterpillars indoors and outdoors on a grid

K. N. Saxena<sup>1</sup>, P. Khattar and S. Goyal

Zoology Department, Delhi University, Delhi 110007 (India), 30 November 1976

**Summary.** A method has been developed to measure orientation responses of caterpillars to various sources of stimuli at predetermined distances on a grid of intersecting ribs indoors and outdoors.

In the course of our study of orientation of the larvae of *Papilio demoleus* and other lepidopterous insects, it was required to investigate the relationship between their responses, particularly taxis, and distances of various sources of stimuli in different combinations. For this study, it was essential that a) each free moving larva would show its response at a predetermined point at the desired distance from a source of stimulus, and b) its response would be sharply defined by allowing it to turn at right angles towards or away from the stimulus source. These requirements could not be met by the techniques

adopted for other lepidopterous larvae<sup>2-4</sup>. Satisfactory results were obtained by testing the larvae on a grid, as described below.

**Material and methods.** The grid (figure). It consists of a series of parallel, transverse ribs of plastic or iron wire intersecting at right angles another series of parallel, longitudinal ribs at desired distances. The surface of the ribs is coarse and their thickness such that the insects can grip the ribs and move on them with ease. The intersections of the ribs are at distances almost equal to the length of the test larvae so that a) a larva can move from