

**Variations des protéines de l'hémolymphe
chez *Processa edulis edulis* (Crustacé Décapode),**

par Mireille RYCKAERT et Hubert J. CECCALDI.

Cette étude doit être replacée dans une série de travaux ayant pour but de mieux connaître les caractères des protéines du milieu intérieur des Crustacés. En effet, malgré plusieurs publications importantes concernant ce sujet (1 à 5), de nombreuses inconnues subsistent encore quant à la connaissance des protéines de l'hémolymphe, quant à leurs différences suivant le sexe des individus étudiés à l'intérieur de l'espèce considérée, quant à leurs variations, chez les femelles, en fonction des différentes phases de l'ovogenèse. Il est rendu compte ci-après des résultats obtenus après électrophorèse, en vue d'analyser les composants protéiques de l'hémolymphe du Crustacé *Processa edulis edulis*.

Méthode d'étude. — Les individus mâles et femelles sont reconnaissables par leurs appendices thoraciques 3 et 5 et leur première paire de pléopodes. En ce qui concerne le développement de l'ovaire, chaque groupe de Crustacés se caractérise par des modalités de reproduction qui lui sont propres. Certains ne pondent qu'un petit nombre de fois, voire une seule fois par an ; d'autres, au contraire, effectuent plusieurs pontes consécutives durant toute la saison de reproduction.

- (1) A. Damboviceanu, *Arch. Roum. Pathol. Exp. et Microbiol.*, 1929, t. 2, p. 5.
- (2) R. Frenzt, Contribution à l'étude biochimique du milieu intérieur de *Carcinus maenas* Linné. Thèse Doct. ès Sc. Nancy, 1960.
- (3) M. Florkin, *Physiology of Crustacea*, Vol. 1, p. 141, Acad. Press, 1960.
- (4) H. J. Ceccaldi, Recherches sur la biologie des associations entre protéines et caroténoïdes chez les crustacés décapodes ; aspects métaboliques et moléculaires. Thèse Fac. Sci. Aix-Marseille, 1968.
- (5) C. Jeuniaux, *Chemical zoology*, Vol. 6, p. 63. Acad. Press, 1971.

Cette dernière modalité se retrouve chez la Crevette d'herbier *P. e. edulis*. Chez cette espèce, la femelle présente une synchronisation entre la durée de maturation de l'ovaire et le développement embryonnaire des œufs qu'elle porte. Dès que les œufs sont pondus, l'ovaire commence un nouveau cycle de maturation qui se termine au moment où les œufs, fixés sur les pléopodes, éclosent.

Une population de *P. e. edulis* peut donc présenter, durant la saison de reproduction, des femelles à tous les stades de maturation ovarienne et de développement des œufs. Un parallélisme assez strict existe entre l'état de développement de l'ovaire et l'état de développement des embryons contenus dans les œufs. Il est donc possible d'évaluer assez précisément l'état de développement d'un ovaire, sans mesurer son R.G.S. (Rapport gonado-somatique) simplement en observant l'état de développement des embryons qui se différencient dans les œufs portés par la femelle. Huit stades de développement de l'ovaire ont donc été déterminés, de façon arbitraire, suivant les différentes étapes de croissance des embryons. Ces huit étapes ont été décrites dans le tableau I.

Aussi, il sera possible d'utiliser un repère facile pour étudier les variations de la composition des protéines de l'hémolymphe à tous les stades de développement de l'ovaire. Ce dernier devient de plus en plus vert au fur et à mesure que l'on se rapproche de la ponte, en raison de la charge croissante des ovocytes en une caroténoprotéine verte dont les caractères sont vraisemblablement proches de ceux de l'ovo-verdine (6).

Animaux étudiés. — Les individus de *P. e. edulis* ont été pêchés dans la zone des herbiers près des Iles d'Hyères, le 16 mai 1972 au matin.

Ils ont ensuite été placés dans des bacs alimentés par un courant d'eau de mer continu, à une température de 14 à 17°C (du 16 mai au 6 juin) et nourris avec des moules.

Techniques. — Le prélèvement de l'hémolymphe a été effectué à l'aide d'une micropipette de 10 microlitres après incision des segments abdominaux 2,3,4, parallèlement à la chaîne nerveuse.

La méthode de disc-électrophorèse employée est celle décrite par Ornstein (7) avec une solution tampon à pH 7,9 mais avec un pH plus basique pour les gels de « tassement » 7,2 et de séparation 9,2 au lieu de 6,8 et 8,8 respectivement ; cette modification permet d'obtenir une meilleure séparation des bandes les plus rapides. Le gel de séparation est à 7 p. 100 d'acrylamide.

Résultats. — FRACTIONS OBTENUES. — Dix-huit fractions ont pu être séparées par disc-électrophorèse. Elles sont numérotées de 1 à 18, à partir du front de migration (voir fig. 1). Les fractions, dont les variations ne paraissent pas dépendre, ou dépendre peu, du sexe, sont les bandes de 1 à 11 inclus. Les cinq premières présentent peu de fluctuations d'un individu à l'autre, contrairement aux quatre suivantes. La dixième est toujours la plus importante dans tous les échantillons étudiés. La onzième varie peu.

(6) H. J. Ceccaldi, D. F. Cheesmann et P. F. Zagalsky, *C. R. Soc. Biol.*, 1966, t. 160, p. 587.

(7) L. Ornstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, t. 121, p. 321.

Stades	Ovaire		Œufs	
	Teinte	Taille	Teinte	Aspect
1	Blanc	Lobes petits, très fins, réduits à la ligne médiane.	Vert soutenu	Ovoïdes. Uniquement remplis de vitellus.
2	Blanchâtre	Légèrement plus gros.	Vert soutenu	Apparition d'un disque germinatif au pôle animal.
3	Blanc jaunâtre	Commence à s'étendre vers la base du rostre en recouvrant légèrement l'hépatopancréas et l'estomac.	Vert pâle	Développement de l'embryon aux dépens d'un quart du vitellus initial.
4	Vert jaunâtre	La moitié du volume du thorax est occupée par l'ovaire.	Verdâtre	Vitellus occupant la moitié de l'œuf: Apparition de 3 points pigmentaires rouges, sur l'embryon, au pôle végétatif.
5	Vert pâle	Les crosses postérieures atteignent presque la limite thorax-abdomen.	Vert brun	Apparition, latéralement, de pigments oculaires concentrés sous forme de virgule. Différenciation visible du telson.
6	Vert pâle	Occupe la majeure partie du thorax, en recouvrant l'hépatopancréas presque entièrement.	Brun vert	Vitellus occupant le quart de l'œuf. L'œil grossit. Appendices thoraciques (mx, mxp) visibles. Augmentation du nombre des taches pigmentaires.
7	Vert plus sombre	Les crosses antérieures atteignent la base du rostre et les crosses postérieures occupent le premier segment abdominal.	Brun	Vitellus réduit à deux poches entre les 2 yeux et dorsalement. Légère apparition de pédonculisation. Taches pigmentaires : 5 ou 6.
8	Vert plus sombre	Semble plus développé latéralement. Proche de la ponte.	Brun rosé	Vitellus à peu près inexistant. Pigmentation plus nette. Ecllosion proche.

Tableau I. — Stades comparés de l'évolution de l'ovaire et des œufs des femelles de *Processa edulis edulis*.

Au point de vue quantitatif, une moyenne calculée à partir d'électrophorogrammes d'un individu mâle typique, et de deux femelles dont les ovaires étaient de petite taille, a été établie. Les valeurs, pour

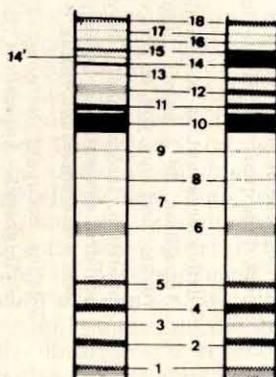


Fig. 1. — Disc-électrophorogrammes des protéines de l'hémolymphe de *Processa edulis edulis* : à gauche : mâle ; à droite : femelle.

chaque fraction, exprimées en pour cent des protéines totales, sont réunies dans le tableau II. Chaque chiffre est indiqué à une unité près, c'est-à-dire 1 pour cent du total.

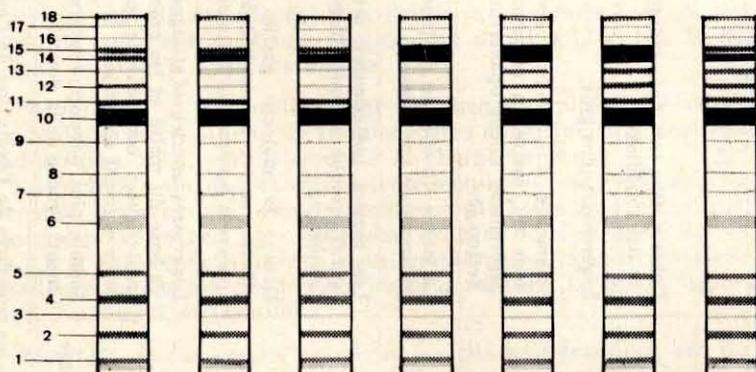


Fig. 2. — Disc électrophorogrammes des protéines de l'hémolymphe des femelles de *Processa edulis edulis* au cours des différentes phases de l'ovogénèse.

DIFFÉRENCES ENTRE LES HÉMOLYMPHES DES MÂLES ET DES FEMELLES. — Les différences d'intensité les plus notables entre les individus mâles et les individus femelles portent sur les bandes 12, 13 et surtout 14 et 15 (voir fig. 2). Les fractions 12 et 13 ne sont jamais très apparentes chez le mâle, contrairement à ce que l'on observe chez la femelle. Chez les individus de ce sexe, à certaines périodes de la vitellogénèse, ces ban-

des égalent en intensité la fraction 11. Les bandes 14 et 15 sont toujours très fines chez le mâle, avec une plus grande intensité de la quatorzième, qui se dédouble parfois, montrant alors une autre bande indiquée sur la figure 1, par le repère 14', dont la valeur moyenne est de l'ordre de 1 pour cent des protéines totales.

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pourcentage	6,5	6,1	3,4	8,6	8,1	5,8	3,9	3,8	3,8
Fractions	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pourcentage	29,3	4,2	1,9	1,6	4,3	4,5	0,8	0,8	1,3

Tableau II. — Pourcentage de chacune des fractions protéiques de l'hémolymphe de *Processa edulis edulis* séparées par disc-électrophorèse.

Les trois dernières bandes, 16, 17 et 18 sont plus ou moins nettes selon les individus et ne semblent pas varier beaucoup en fonction du sexe (voir fig. 1).

La population d'animaux étudiés était surtout composée de femelles portant des pontes. Un nombre restreint de mâles et de femelles dépourvues de pontes et sans ovaire visible a été étudié. Les électrophorégrammes obtenus chez ces deux types d'individus pourtant de sexe différent, étaient très comparables et différaient fort peu les uns des autres. Mais le faible nombre d'analyses effectuées ne nous permet pas d'en tirer de conclusions définitives.

EVOLUTION SUR L'HÉMOLYPHE AU COURS DE L'OVOGENÈSE. — Cette évolution est nettement visible sur la figure 2. Notons qu'il n'a été trouvé que trop peu d'individus femelles ayant expulsé leurs œufs depuis très peu de temps ; aussi, l'électrophorégramme relatif au stade 1 du développement de l'ovaire n'est pas représenté. Les électrophorégrammes des hémolymphe des femelles en cours de vitellogenèse se caractérisent par une nette variation de l'intensité des bandes 12, 13, 14 et 15. La fraction 12 diminue d'intensité jusqu'au stade 3, pour atteindre ensuite un maximum aux stades 7 et 8. La fraction 13 semble diminuer juste après la ponte et ne devient nette qu'aux derniers stades de l'ovogenèse.

Les variations les plus importantes portent sur les fractions 14 et 15 ; faiblement représentées aux premiers stades, elles vont en augmentant jusqu'à atteindre une densité maximale aux stades 7 et 8, puis diminuer avant la ponte au stade 8.

Donc, d'une façon générale, les fractions lentes augmentent d'importance. L'accroissement du total des pourcentages de ces fractions lentes est net. Les valeurs obtenues à partir de l'hémolymphe de femelles du stade 7 dont les ovaires sont en pleine phase de maturation, permettent d'établir le tableau III. On voit, par comparaison avec le tableau II, que les fractions rapides montrent une diminution générale. Ce phénomène pourrait être dû au fait que le mode de calcul privilégie les fractions lentes dans la méthode de l'établissement des pourcentages puisqu'elles sont devenues plus importantes.

On peut noter, dans ces conditions, que les bandes protéiques qui augmentent le plus fortement sont la 14, qui triple de valeur, la 15 et la 12, qui, comme les 16, 17 et 18, doublent d'intensité. La fraction 10,

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pourcentage	2,1	3,6	1,0	6,0	5,5	3,0	1,4	1,5	1,4
Fractions	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pourcentage	33,0	4,4	4,4	4,0	13,0	10,0	1,5	1,6	2,2

Tableau III. — Pourcentage de chacune des fractions protéiques de l'hémolymphe, séparées par disc-électrophorèse, chez une femelle de *Processa edulis* en cours de vitellogenèse.

identifiable à l'hémocyanine et qui est la plus importante, a un pourcentage qui demeure à peu près constant, sa valeur augmentant d'un peu plus de 10 p. 100 au cours de la vitellogenèse.

Interprétations et Discussion. — L'interprétation des résultats est rendue peu aisée en raison du nombre pas très important d'animaux récoltés. D'autre part, la faible quantité d'hémolymphe contenue dans chaque individu rend sa ponction difficile ; ceci n'a pas permis de procéder à des colorations spécifiques sur différents gels pour un même stade qui auraient permis de mettre en évidence les cuproprotéines, lipoprotéines et glycoprotéines. Par analogie avec d'autres travaux (4, 5, 8), il est permis de supposer que la fraction 10 présente dans les électrophorégrammes des mâles et des femelles correspond à une cuproprotéine, vraisemblablement l'hémocyanine, les fractions 1 à 5 pouvant être, soit des sous-unités de cette cuproprotéine (4), soit une hémocyanine rapide (9), soit d'autres cuproprotéines non hémocyaniques (8).

Au sujet des fractions lipoprotéiques du sexe femelle, les résultats obtenus au cours de ces recherches confirment les publications précédemment parues. En effet, d'autres travaux ont abouti à des résultats comparables chez des Décapodes Brachyours (4) comme *Paratelphusa hydrodromous* (10), *Carcinus maenas* (11), *Callinectes sapidus* (12), *Macropipus puber* (13), chez des Décapodes Macroures (4) comme *Scyllarus arctus* (14), chez des Amphipodes comme *Orchestia gammarella* et *Talitrus saltator* (13), chez des Isopodes comme *Porcellio dilatatus* (15).

- (8) W. Ghidalia, *Cahiers de Biologie marine*, 1969, t. 10, p. 109.
 (9) E. C. Horn et M. S. Kerr, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1969, t. 29, p. 493.
 (10) R. G. Adiyodi, *Indian J. Exper. Biol.*, 1968, t. 6, p. 144.
 (11) H. J. Ceccaldi et J.-L. M. Martin, *C. R. Soc. Biol.*, 1969, t. 163, p. 2638.
 (12) M. S. Kerr, *Develop. Biol.*, 1969, t. 20, p. 1.
 (13) Y. Croisille, J.-J. Meusy et H. Charniaux-Cotton, *C. R. Acad. Sci.*, D, 1970, t. 271, p. 527.
 (14) H. J. Ceccaldi, *C. R. Soc. Biol.*, 1971, t. 165, p. 364.
 (15) J.-L. Picaud et G. Besse, *C. R. Acad. Sci.*, 1973, D, t. 276, p. 2207.

L'apparition d'une première lipoprotéine, suivie d'une seconde, chez des individus du sexe femelle en cours de vitellogenèse semble maintenant un fait bien établi : la présence des fractions 14 et 15 au cours de l'évolution de l'ovaire est une indication supplémentaire.

Des données nouvelles doivent être acquises pour connaître les rapports qui lient les différentes phases de l'ovogenèse et les variations quantitatives de ces protéines liées au sexe femelle. Il n'est d'ailleurs pas exclu que les fractions très lentes ne soient pas, elles aussi, impliquées dans le développement des ovocytes.

La question de la régulation de leur synthèse, c'est-à-dire de leur apparition, puis de leur disparition dans l'hémolymphe lorsque l'ovaire a atteint sa complète maturité, reste entier. Un problème similaire, non résolu, se pose pour la fraction 14' qui apparaît chez certains mâles. Une autre inconnue demeure : la synthèse des fractions lentes au cours de la vitellogenèse s'accompagne-t-elle d'une diminution de la synthèse des fractions rapides ? Ces variations quantitatives des différentes bandes protéiques amènent à envisager le problème des variations cycliques des protéines de l'hémolymphe au cours des cycles biologiques de la mue et de l'ovogenèse, ainsi que des relations corrélatives avec les changements macromoléculaires qui se produisent au cours du cycle d'intermue chez les espèces étudiées (16).

Des recherches ultérieures seront nécessaires pour apporter des éléments de réponse à ces importantes questions (*).

*(Ecole Pratique des Hautes Etudes,
Laboratoire de Biochimie et Ecologie des Invertébrés marins,
Station marine d'Endoume, 13007 Marseille).*

(16) D. Skinner, *Am. Zool.*, 1966, t. 6, p. 242.

(*) Ce travail a été réalisé dans le cadre du contrat CNEXO N° 73/654.