

ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DE CERTAINS CONSTITUANTS TÉGUMENTAIRES ET DE LEUR RELATION AVEC LES PROTÉINES SÉRIQUES CHEZ *MACROPIPUS PUBER* (DÉCAPODE BRACHYOURE).

par

W. Ghidalia¹, C. Montmory², M. Vicomte³, P. Lambin⁴ et J.M. Fine⁴

1) Immunochimie et Sérologie des Arthropodes, Océanographie biologique, Université de Paris VI
4, place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05.

2) Laboratoire de Physiologie des Insectes, Paris VI.

3) Institut de Recherches scientifiques sur le Cancer, Villejuif.

4) Laboratoire d'Immunochimie, Centre National de Transfusion Sanguine, 4, rue A.-Cabanel,
75739 Paris Cedex 15.

Résumé

Les constituants protéiques d'extraits de téguments calcifiés et d'épiderme de *Macropipus puber* mâle ont été étudiés par des méthodes électrophorétiques et immunochimiques puis comparés aux protéines du sérum total en utilisant les mêmes techniques. Les composants des extraits de téguments calcifiés n'ont aucun déterminant antigénique en commun avec les protéines sériques. Dans l'épiderme, par contre, on constate la présence, à des périodes déterminées du cycle d'intermue, d'un composant antigéniquement identique à une protéine sérique déterminée. Ce composant semble impliqué dans les processus de mue. Cette protéine a, soit un rôle informateur, soit un rôle de transport d'hormone, soit un rôle métabolique.

Les principales lignes de précipitation dénombrées par immuno-électrophorèse dans le sérum de *Macropipus puber* mâle ont été récemment décrites (Ghidalia, Vicomte, King Bien Tan, 1973). Certaines d'entre elles ont déjà été identifiées. Ainsi, l'arc le plus anodique, quantitativement le plus important et vraisemblablement de structure complexe, correspond à l'hémocyanine (Fine et al., 1975). La nature de deux autres lignes a également été précisée grâce aux fonctions particulières des protéines qui les constituent. L'une de ces dernières est une protéine transporteuse de métaux (Ghidalia, Fine, Marneux, 1972), l'autre une hétéroagglutinine (Ghidalia, Lambin, Fine, 1975). La nature des autres arcs demeure, soit encore inconnue, soit seulement soupçonnée.

L'examen comparatif d'immunoélectrophorégrammes de sérums prélevés sur des crabes parvenus à différents stades du cycle d'intermue montre que les arcs sont plus nombreux durant la période de

prémue ; c'est-à-dire en un moment où s'amorcent et se développent les synthèses des constituants organiques de la nouvelle carapace. Il est donc possible que certains des arcs supplémentaires manifestent la présence dans l'hémolymph, en cette période déterminée, de constituants protéiques impliqués dans les processus de mue considérés au sens large du terme. Le présent travail expose les recherches entreprises pour tenter de confirmer cette hypothèse.

I. - MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) Matériel.

Les crabes, tous de sexe mâle, ont été recueillis près de Roscoff. L'hémolymph a été prélevée avec une seringue dans les sinus situés à la base des péréopodes. Elle est laissée durant 24 h à la température du laboratoire. Le caillot est alors dilacéré avec une baguette de verre et le tout soumis à une centrifugation de 10 minutes à 6.000 t/mn. Le surnageant, souvent coloré en bleu, est considéré comme du sérum.

B) Méthodes.

1. Techniques d'extraction

a) à partir des téguments calcifiés :

les téguments calcifiés subissent deux extractions successives effectuées selon les procédés de Trim (1941) légèrement modifiés. Compte tenu de leur minéralisation importante, les carapaces sont préalablement soumises à un traitement destiné à faciliter ces opérations. Des expériences préliminaires, au cours desquelles les carapaces étaient soit broyées dans des mortiers à billes d'agate, soit soumises à l'action de différentes solutions décalcifiantes, ont montré que les meilleurs résultats étaient obtenus lorsque la déminéralisation était réalisée avec un mélange, à parties égales, de solutions d'acide formique à 5 p. 100 et de citrate de sodium à 20 p. 100 (Greep, Fischer, Morse, 1948).

Première extraction.

Les carapaces, préalablement lavées et débarrassées de tous les tissus mous sous-jacents, sont, après décalcification, plongées durant 36 h dans un tampon de pH 8,9, fait de cinq parties d'une solution de borax à 19 g/l, cinq parties d'eau distillée, quatre parties d'alcool à 95° et d'une partie d'éther. L'extraction est effectuée dans une étuve réglée à une température de 50°. Après filtration, le liquide recueilli constitue le premier extrait.

Seconde extraction.

Les fragments de carapace récupérés sur le filtre au cours de la précédente opération sont traités durant cinq heures, toujours à 50°, par une solution de soude à 5 p. 100. Une filtration permet d'obtenir le second extrait.

b) à partir de l'épiderme :

des fragments d'épiderme, tapissant intérieurement les boucliers dorsaux, sont prélevés avec une pince fine et soigneusement rincés à l'eau courante, afin de les débarrasser des débris d'hépatopancréas qui peuvent y adhérer. On les immerge alors dans de l'eau distillée et le tout est conservé au réfrigérateur à $+ 4^{\circ}$ durant deux ou trois jours. L'extrait épidermique, souvent teinté en brun, est obtenu par filtration.

2. Techniques électrophorétiques

Supports :

Séphadex G 200 - agarose - amidon (S.A.A.) (Ghidalia, Vendrely, Coirault, 1970) ; gels de polyacrylamide à gradient de concentration (Gradipore, Townson & Mercer, Lane - Cove, Australie).

Tampons :

Véronal pH 8,2 (Grabar, 1964) ; système de tampons discontinus Tris-glycine pH 8,7 (Uriel, 1966) ; Tris-borate pH 8,3 (Tris : 10,75 g, acide borique : 5,04 g, eau distillée en quantité suffisante pour ajuster à un litre).

Conditions expérimentales :

S.A.A./véronal : 4 V/cm, 24 h, $+ 4^{\circ}$; S.A.A./Tris-glycine : 6 V/cm, 7 h, $+ 4^{\circ}$; Gradipore/Tris-borate : 4 V/cm, 17 h, température du laboratoire.

3. Techniques immunochimiques

Les immun-sérums ont été obtenus selon un protocole antérieurement décrit (Fine et coll., 1975).

Les immunoélectrophorèses ont été réalisées sur des gels à 1,5 p. 100 d'agarose (Industrie Biologique Française) avec un tampon à haut pouvoir de résolution (Gelman n° 51104). La différence de potentiel appliquée est de 5 V/cm pendant une heure et demie à la température du laboratoire.

Immunodiffusion : technique d'Ouchterlony (1948).

II. - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Analyse des extraits de carapaces calcifiées

I. Extrait alcooloboré.

En gels de Séphadex G 200-agarose-amidon et avec des tampons véronal ou Tris-glycine, cet extrait montre une composition hétérogène qui se manifeste par la présence de sept fractions électrophorétiques distinctes (Planche I, C).

Les quatre antérieures, très nettes, sont sensiblement situées à hauteur des fractions cupriques postérieures d'un sérum total de référence. Néanmoins, aucune d'elles ne réagit avec la dithiooxamide qui est un réactif du cuivre.

Les trois postérieures sont quantitativement beaucoup moins importantes.

Lorsque cet extrait est analysé par un immun-sérum anti-sérum total de *M. puber*, en immunoélectrophorèse et en immunodiffusion, aucun arc de précipitation n'est observé.

2. Extrait sodé.

Les résultats ont toujours été négatifs. Aucune fraction électrophorétique, aucune ligne de précipitation, n'ont pu être mises en évidence avec cet extrait (Planches I, D et II, 1 D).

3. Extrait épidermique.

Les résultats obtenus sont variables. Un examen comparatif montre qu'ils dépendent, en fait, du stade d'intermue atteint par les crabes dont les carapaces ont été utilisées.

De fin C⁴ - début D° à la fin A, c'est-à-dire durant les stades qui précèdent ou suivent immédiatement l'exuviation, les électrophorogrammes d'extrait épidermique présentent — quel que soit le support employé pour l'électrophorèse — un seul composant électrophorétiquement homogène (Planches I, B et II, 2, emc) apparemment dépourvu de cuivre car la dithiooxamide ne réagit pas avec la fraction qu'il constitue.

A partir du stade B, ce composant semble absent de l'épiderme car il n'apparaît plus dans les électrophorogrammes réalisés avec des extraits de ce tissu. Aucune observation concernant sa présence à des stades ultérieurs n'a pu être effectuée en raison du manque de spécimens adéquats ; toutefois, son absence durant la plus grande partie du stade C⁴ est certaine.

Confronté par immunoélectrophorèse à un immun-sérum anti-sérum total de *M. puber*, le composant épidermique donne naissance à un arc de précipitation unique (Planche II, 3, ee). *Il existe donc une parenté antigénique nette entre le composant de l'extrait épidermique et une protéine sérique déterminée.*

Le recours au procédé d'immunodiffusion (technique d'Ouchterlony) a permis de préciser le degré de communauté antigénique, donc de similitude structurale, existant entre la protéine sérique et celle de l'épiderme. Un immun-sérum anti-sérum total de *M. puber* donne les résultats suivants :

dans le sérum total (Planche II, 1 A), deux lignes de précipitation épaisses plus ou moins contiguës apparaissent près du puits des anticorps et une troisième ligne, plus fine près du puits des antigènes. Compte tenu de leur emplacement et de leur importance, les deux lignes principales correspondent probablement, en partie ou en tota-

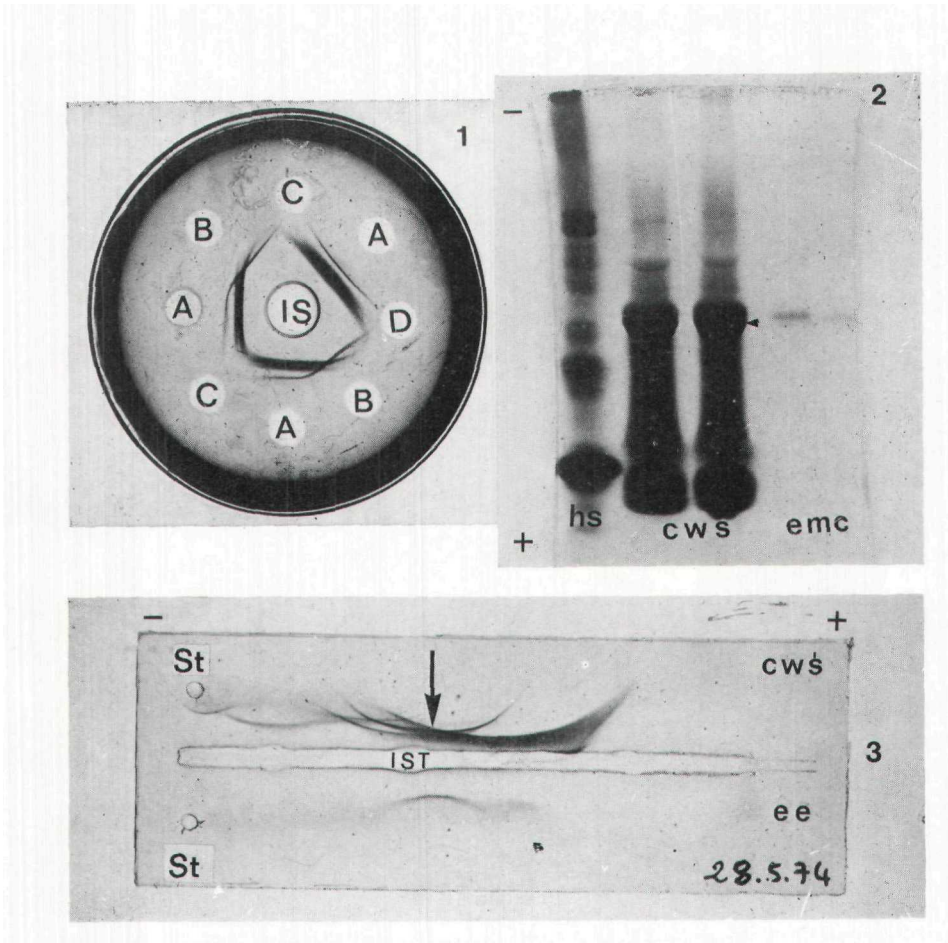


PLANCHE I

Electrophorégrammes d'un sérum témoin de *M. puber* mâle (A), d'un extrait d'épiderme (B), d'un extrait hydroboraté de téguments calcifiés (C), d'un extrait sodé des mêmes téguments (D). Support : gel de Séphadex G 200-agarose-amidon, tampon : véronal.

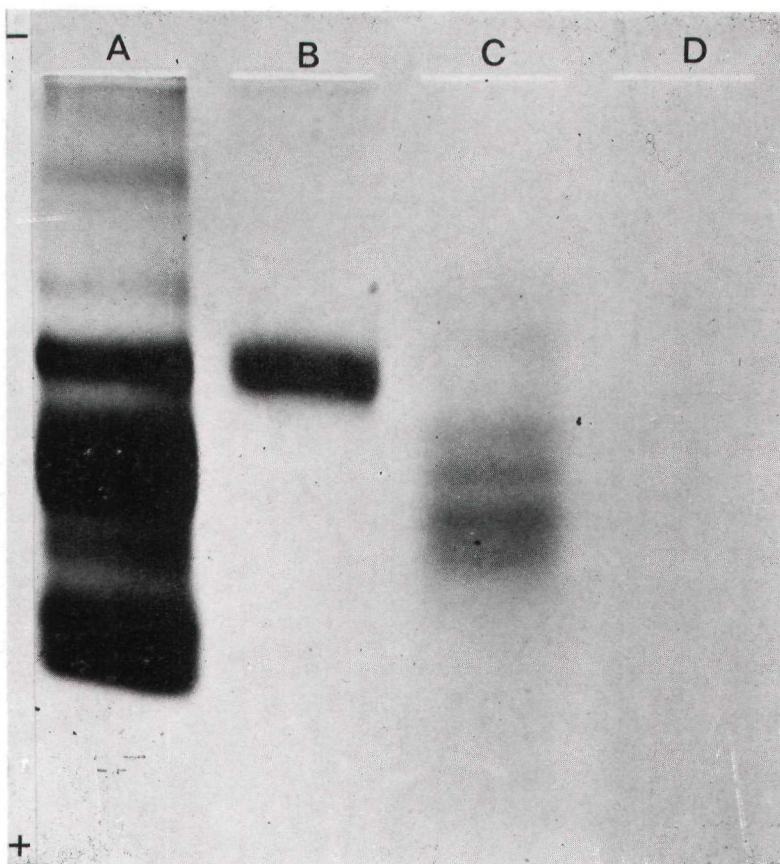


PLANCHE II

1 : Comparaison immunochimique par la technique d'Ouchterlony d'un sérum témoin de *M. puber* mâle (A), d'un extrait d'épiderme (B), d'un extrait hydroboraté de téguments calcifiés (C), d'un extrait sodé des mêmes téguments (D).

2 : Electrophorégrammes d'un sérum humain (hs), de deux sérums de *M. puber* mâle (cws) et d'un extrait épidermique (emc).

Support : gel de polyacrylamide à gradient de concentration. Tampon : Tris-borate pH 8,3. La flèche indique l'emplacement de la fraction cuprique qui précède la fraction sérique correspondant au composant épidermique.

3 : Immunoélectrophorégrammes d'un sérum de *M. puber* mâle (cws) et d'un extrait épidermique (ee).

Support : gel d'agarose, tampon à haut pouvoir de résolution (Gelman). St : puits des antigènes. IST : puits des anticorps.

lité, aux cuproprotéines sériques, lesquelles ont toujours la mobilité la plus anodique sur les électrophorégrammes ;

dans l'extrait épidermique (Planche II, 1 B) une ligne de précipitation fine mais fort distincte, dont l'aspect est en tout point semblable à celui de la troisième ligne de précipitation d'un sérum total, apparaît. Avec le temps, ces deux lignes, l'épidermique et la sérique, convergent l'une vers l'autre et finissent par fusionner en donnant une ligne continue dépourvue de tout éperon, témoignant ainsi de l'entière similitude antigénique existant entre elles.

En conséquence, la protéine de l'extrait épidermique apparaît comme un composant normal du sérum de *M. puber*. Afin de le localiser sur les électrophorégrammes et les immunoélectrophorégrammes de sérum total, des migrations et des diffusions conjointes d'extraits épidermiques et de sérums ont été réalisées.

Sur les électrophorégrammes, l'emplacement et l'individualisation même de la fraction électrophorétique du sérum qui correspond au composant épidermique dépendent du support et du tampon utilisés pour effectuer l'électrophorèse.

Sur des supports inertes (papier, agarose, acétate de cellulose), la protéine considérée forme une bande distincte, située juste en arrière de la ou des fractions cupriques. Elle n'est présente que durant la période de prémue et le début de celle de postmue.

Sur des supports présentant un effet filtrant (gels d'amidon hydrolysé, Séphadex G 200 agarose amidon, acrylamide), son individualisation requiert l'emploi de tampons à haut pouvoir de résolution, tel le tampon Tris-glycine. La fraction qui apparaît possède alors les mêmes caractéristiques que sur les supports non filtrants ; même localisation en arrière des fractions cupriques et même période de présence (fin C⁴ - début D° à début de stade A).

Avec d'autres tampons — le véronal, par exemple — la protéine ne s'individualise pas et la fraction électrophorétique correspondante se confond avec la fraction cuproprotéique qui la précède dans les conditions expérimentales définies plus haut. Toutes deux constituent une fraction unique qui, de ce fait, donne une réaction positive avec les réactifs du cuivre et demeure présente sur les électrophorégrammes tout au long du cycle d'intermue.

Enfin, sur les gels de polyacrylamide à gradient continu de concentration (Gradipore), avec lesquels on utilise généralement des tampons à haut pouvoir de résolution, le composant épidermique forme une fraction très nette dont la présence dépend du stade d'intermue de l'animal étudié mais qui est, cette fois, localisée entre les second et troisième groupes de fractions cuproprotéiques (Planche II, 2emc).

En analyse immunoélectrophorétique et avec un immun-sérum antisérum total de *M. puber*, le composant épidermique donne naissance à un seul arc de précipitation (Planche II, 3) qui occupe le même emplacement que l'arc de précipitation II-I d'un sérum total témoin (Ghidalia, Vicomte, King Bien Tan, 1973).

III. - DISCUSSION

L'étude des relations existant entre les protéines sériques et les composants de différents extraits tégumentaires, effectuée par des techniques électrophorétiques et immunochimiques, a mis en évidence les faits suivants :

les composants hydrosolubles présents dans la carapace calcifiée, dont certains manifestent une mobilité électrophorétique voisine ou semblable à celle de certaines protéiques sériques, n'ont aucun déterminant antigénique en commun avec ces protéines et apparaissent, en conséquence, comme totalement différents de ces dernières ;

la même constatation s'appliquerait aux éventuels constituants de l'extrait sodé de carapaces calcifiées ; cela, dans la mesure où des composants de nature protéique seraient présents dans cet extrait et qu'ils n'aient subi aucune dénaturation au cours de leur extraction. L'absence de fractions protéiques décelables sur les électrophorégrammes d'extraits sodés laisse à penser que tel n'est pas le cas ;

dans l'épiderme on trouve, à des périodes déterminées du cycle d'intermue (période exuviale et début de période post-exuviale), un composant protéique hydrosoluble, dépourvu de cuivre, dont la mobilité électrophorétique et l'antigénicité sont identiques à celles d'une protéine sérique déterminée. Cette similitude entre ces deux protéines est non seulement d'ordre physique ou chimique mais également physiologique puisque toutes deux apparaissent (période pré-exuviale) et disparaissent (début de la période post-exuviale) presque simultanément, l'une dans le sérum et l'autre dans l'épiderme. En conséquence, le composant hydrosoluble présent dans l'extrait épidermique semble de nature identique à la protéine sérique qui se manifeste par l'arc de précipitation II-I sur les immunoélectrophorégrammes de sérum total.

Compte tenu du moment de son apparition dans l'hémolymph (essentiellement période préexuviale du cycle d'intermue), cette protéine paraît manifestement impliquée dans les phénomènes de mue. Or, durant cette période, ceux-ci sont de deux ordres :

une dégradation partielle de l'ancien exosquelette, suivie d'une résorption de certains produits de cette lyse ;

une synthèse des parties organiques des couches préexuviales, épi- et exocuticules, de la nouvelle carapace. Deux protéines sont essentiellement impliquées dans ce processus. L'une d'elles, hydrosoluble, l'arthropodine, est particulièrement abondante dans les téguments non encore calcifiés et les membranes arthrodiales. La seconde, ou sclérotine, est insoluble dans l'eau et ne se rencontre que dans les téguments calcifiés.

Ainsi, trois hypothèses peuvent être avancées au sujet de la nature du composant de l'extrait épidermique :

- 1° produit d'hydrolyse de l'ancien exosquelette ;
- 2° produit de sécrétion des cellules épidermiques ;

3° protéine impliquée dans la synthèse de la nouvelle carapace soit comme matériau protéique, soit comme protéine informatrice, au sens le plus large du terme.

Dans l'état actuel des recherches, il est possible d'écarter les deux premières hypothèses et cela pour deux raisons. Premièrement, les activités tant de résorption que de sécrétion des cellules épidermiques débutent en fin de D° et plus exactement en début de D¹. Or, la protéine considérée apparaît nettement plus tôt, début de D° et parfois même fin de C⁴. En second lieu, les électrophorèses simultanées d'extrait épidermique et de sérum, obtenus à partir du même crabe, ont montré que cette protéine se rencontre d'abord dans l'hémolymphe, puis dans l'épiderme. En conséquence, les deux premières hypothèses qui impliquent une première étape, résorption ou sécrétion s'effectuant dans la couche épidermique, ne cadrent pas avec les faits mis en évidence.

En se référant à la solubilité dans l'eau du composant épidermique, il aurait été tentant de le considérer comme de l'arthropodine, protéine hydrosoluble qui est présente dans les téguments mous ou calcifiés. Mais, en fait, la protéine en question a été extraite non pas de l'exosquelette mais de l'épiderme. De plus, aucune relation antigénique, même partielle, n'a pu, jusqu'ici, être mise en évidence entre cette protéine et les composants protéiques de la carapace obtenus selon la technique mise au point par Trim pour extraire l'arthropodine des téguments d'Insectes et de Crustacés.

En fait, cette dernière observation n'est valable que dans le cas où aucune dénaturation ne s'est produite au cours de l'extraction, ce qui est loin d'être prouvé.

Si la méthode d'extraction utilisée ne lèse point la structure des protéines récupérées, ce dont sont convaincus Trim (1941) et Lafon (1948), cette absence de communautés antigéniques manifesterait alors l'existence d'une différence structurale indiscutable, primitive ou secondaire, entre la protéine du composant épidermique et l'arthropodine.

Dans le premier cas, ces deux protéines seraient chimiquement distinctes dès l'origine et, dans cette optique, la première de celles-ci interviendrait dans les phénomènes de mue, soit comme une protéine transporteuse d'une hormone de mue, soit comme agent déclenchant (protéine informatrice). Dans le second cas, les différences structurales existant entre l'arthropodine et le composant épidermique seraient la conséquence de modifications chimiques subies par ce dernier au cours de la synthèse et de la calcification de la nouvelle carapace. Dans cette perspective, le composant épidermique pourrait constituer un précurseur de l'arthropodine.

Summary

Electrophoretic and immunologie study of some tegument components and of their relation with serie proteins in *Macropipus puber* (Crustacea Decapoda).

1. Extracts from hard shells and epidermis taken on *Macropipus puber* male crabs have been analyzed by electrophoretic and immunologie means.

2. The hard shells extracts components, even when their electrophoretic mobility is close to that of some serie proteins, have no antigenic determinants in common with those.

3. Epidermis contains, at a definite period of the intermoult cycle, a protein component of which the electrophoretic mobility and the antigenicity are identical with those of a série protein.
4. The nature of this protein, which corresponds to the II-I precipitin arc of a whole serum immunoelectrophoretic pattern, is discussed.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- GHIDALIA, w., FINE, J.M. and MARNEUX, M., 1972. — On the presence of an iron binding protein in the serum of a Crustacea Decapoda, *Macropipus puber* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 41 B, pp. 349-354.
- GHIDALIA, w., LAMBIN, P. and FINE, J.M., 1975. — Electrophoretic and immunologie studies of a hemagglutinin in the hemolymph of the Decapod *Macropipus puber*. *J. Invert. Pathol.*, 25, pp. 151-158.
- GHIDALIA, w., VENDRBLY, R. et COIRAULT, Y., 1970. — Un nouveau support mixte pour électrophorèse de zone : le gel de Séphadex-agarose-amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52, 1, pp. 110-112.
- GHIDALIA, w., VICOMTE, M. and KING BIEN TAN, 1973. — Immunoelectrophoretic analysis of *Macropipus puber* male serum. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44 B, pp. 715-724.
- GRABAR, P., 1964. — The immunoelectrophoretic method of analysis. In *Immunoelectrophoretic analysis* (Elsevier Publ. C°, Amsterdam, London, New York).
- GREEP, R.O., FISGHER, C.J. and MORSE, A., 1948. — Alkaline phosphatase in odontogenesis and osteogenesis and its histochemical demonstration after demineralization. *J. Am. Dental. Assoc.*, 36, pp. 427-442.
- LAFON, M., 1948. — Nouvelles recherches biochimiques et physiologiques sur le squelette tégumentaire des Crustacés. *Bull. Inst. Océan. Monaco*, n° 939.
- OUCHTERLONY, o., 1948. — Antigen antibody reactions in gel. *Ark. /Terni. Miner. Geol.*, B 26, n° 16.
- TRIM, A.R., 1941. — Studies in the chemistry of the Insect cuticle. I. Some general observations on certain Arthropod cuticles with special reference to the characterization of the proteins. *Biochem. J.*, 35, pp. 1088-1098.
- URIEL, J., 1966. — Méthode d'électrophorèse dans les gels d'acrylamide-agarose. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 8-9, pp. 969-982.