

# Etude des protéines de l'hémolymph de *Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus* par ultra-microélectrophorèse en gel de gélose

PAR

P. L. G. BENOIT et M. van SANDE.  
(Reçu pour publication le 18 mars 1959).

---

L'ultra-microélectrophorèse, selon Wieme et Rabaye, s'est révélée être une méthode précieuse pour étudier et séparer les protides dans divers liquides biologiques, dont on ne possède que des quantités minimales.

Dans la présente note, nous rapportons nos premiers résultats de l'étude électrophorétique des protéines de l'hémolymph de *Triatoma infestans* Klug et de *Rhodnius prolixus* Stål, deux parmi les principaux vecteurs de *Trypanosoma Cruzi*, agent de la maladie de Chagas. Les résultats démontrent l'intérêt et les grandes possibilités de cette méthode d'investigation pour l'étude des insectes d'importance médicale, dont plusieurs espèces font actuellement l'objet de recherches analogues.

## Technique.

### A. — Le matériel :

L'hémolymph est prélevée en coupant une patte de l'insecte au niveau du coxa, ou en ponctionnant un sac lymphatique sous le microscope binoculaire. Le liquide est aspiré aussitôt dans une pipette Pasteur effilée et appliqué sur agar pour électrophorèse.

### B. — L'électrophorèse :

Nous avons employé la technique de Wieme et Rabaye. L'électrophorèse se fait sur un porte-objet recouvert d'une couche d'agar de 2 à 3 mm (agar Difco 1 % dans une solution tampon à base de véronal, pH = 8,3  $\mu$  = 0,05). L'électrophorèse s'effectue à une différence de potentiel de 150 V, 40 mA par lame, pendant 20 minutes. Après migration et fixation, les différentes fractions sont

colorées à l'amidoschwarz. Leurs valeurs quantitatives sont évaluées par planimétrie, après densimétrie directe (\*).

### Résultats.

#### I. — *Rhodnius prolixus* Stål (fig. n° 1).

L'hémolymphe de *R. prolixus* se présente comme un liquide limpide et incolore. Pour une microélectrophorèse sur agar, il suffit d'appliquer  $\pm 3 \lambda$  sur l'agar. Nous avons répété l'analyse pour 20 insectes.

Au point de vue de l'aspect morphologique, le spectre protéinique est d'une constance remarquable. On distingue facilement une douzaine de fractions, qu'on peut diviser en 3 groupes bien distincts :

— un groupe de fractions anodiques que l'on peut subdiviser en deux fractions : la première, possédant une mobilité nettement plus grande que les albumines sériques, la seconde, à l'aspect strié, qui la suit de tout près. Cette striation peut provenir de protéines dénaturées ou bien de macro-molécules. Cet effet masque peut-être l'apparition d'une troisième fraction quantitativement faible.

Le rapport quantitatif de ces 2 fractions anodiques n'est pas constant. En règle générale, la première fraction est de loin la plus importante. La raison de cette variation quantitative ne nous est pas connue. Nous admettons qu'en général le rapport Fraction I/Fraction II se situe vers 2,0.

— le deuxième groupe de fractions constaté sur le phérogramme est constitué par des protéines non solubles, ne montrant aucune mobilité dans les conditions employées. Ces protéines, très colorables à l'amidoschwarz et quantitativement très importantes, restent au point d'application.

Lors du calcul des valeurs quantitatives relatives des autres fractions, nous n'avons pas tenu compte de cette fraction à vitesse nulle.

Il est cependant intéressant de noter que cette fraction se présente toujours comme une bande très homogène, bien marquée au milieu du phérogramme. Nous ne retrouvons pas cette fraction dans l'hémolymphe de *T. infestans*. Par contre, des fractions de même aspect morphologique, mais possédant une vitesse de migration très

---

(\*) Nous remercions bien vivement M. R. Ressler, ir, chef du Laboratoire de Biochimie de l'Institut de Médecine Tropicale, qui a conçu et construit un appareil et l'a mis à notre disposition.

faible, se sont révélées dans nos recherches similaires faites sur l'hémolymphe de la Blatte, *Péripáneta australasiae* et de certaines araignées.

— le troisième groupe de fractions séparées par électrophorèse dans l'hémolymphe du *R. prolixus* est celui des fractoins basiques, donc migrant vers la cathode. Dans ce groupe, la séparation des diverses fractions se montre extrêmement nette, et souligne l'importance d'employer l'agar comme milieu de support à l'électrophorèse. On constate facilement 8 à 9 fractions cathodiques, dont 4 quanti-

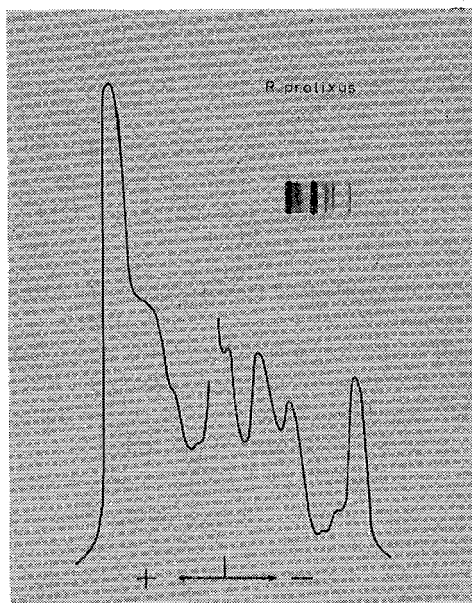


Fig. 1. — Electrophérogramme et courbe des extinctions de *R. prolixus*.

tativement importantes : une fraction, se présentant sous forme d'une strie très mince, migre tout près des protéines insolubles, ensuite 2 fractions, sous forme d'une « raie double » et enfin la fraction la plus cathodique, suivie assez régulièrement par une autre fraction, quantitativement très faible.

Les quatre autres fractions sont colorées faiblement par l'amidoschwarz. On se demande s'il ne s'agit pas de sous-fractions des quatre fractions précitées.

En résumé, le spectre des protéines hémolympatiques du *R. prolixus* présente 7 fractions principales, avec plus ou moins 5 frac-

tions d'intensité moindre. Nous avons calculé l'intensité relative de ces fractions, et les résultats en pour cent sont donnés dans le tableau suivant :

I : 30,5	VII : 2,9
II : 19,2	VIII : 10,0
III : 8,4	IX : 1,5
IV : 6,5	X : 1,1
V : 5,6	XI : 5,9
VI : 8,4	

## II. — *Triatoma infestans* KLUG (fig. n° 2).

L'hémolymphe de cet insecte se présente comme un liquide incolore et limpide. Nous appliquons  $\pm 3 \lambda$  sur l'agar, ce qui donne, après électrophorèse, un spectre d'une dizaine de fractions nettement séparées, qui se retrouve chez 30 insectes étudiés. De même que pour *R. prolixus*, on peut subdiviser les fractions protéiniques obtenues en 3 groupes :

— les fractions anodiques : comme chez *R. prolixus* on constate 2 fractions importantes. Il convient cependant de remarquer que dans l'hémolymphe de *T. infestans* ces 2 fractions se présentent toujours sous forme jumelée avec un rapport chiffré complètement différent de celui des 2 fractions anodiques du *R. prolixus*. Ce rapport se chiffre pour *T. infestans* à  $\pm 0,85$ .

— les protéines insolubles chez cette espèce sont nettement moins importantes que chez l'insecte *R. prolixus*. Elles se présentent sur le phérogramme sous la forme d'un ourlet étroit mais très net au point d'application de l'hémolymphe. Entre les deux fractions anodiques et la bande de protéines insolubles, on retrouve comme chez le *R. prolixus* une striation, qui peut trouver son origine soit dans la présence de protéines insolubles, soit de macro-molécules.

— les fractions cathodiques : on distingue facilement 8 fractions dont deux sont très colorées par l'amido-schwarz : la première migre à une vitesse presque égale à celle des  $\beta$ -globulines humaines et la seconde migre à la même vitesse que la fraction la plus cathodique du *R. prolixus*. Il est intéressant de remarquer que chez la présente espèce cette seconde fraction est presque toujours dédoublée, la première fraction de cette subdivision étant la moins importante.

Quantitativement, les pourcentages des différentes fractions se chiffrent comme suit :

I : 14,0	VI : 7,0
II : 21,1	VII : 3,5
III : 13,2	VIII : 12,6
IV : 7,0	IX : 2,6
V : 5,8	X : 13,2

Nous avons effectué l'électrophorèse des protéines solubles d'œufs de *T. infestans* en les broyant dans du tampon. Après centrifugation, on obtient un liquide surnageant clair, qui donne après électrophorèse sur agar, un spectre complètement différent de celui de l'hémolymphe du *T. infestans* adulte. On n'y retrouve pas les 2 fractions anodiques, qui comme nous venons de le citer, atteignent  $\pm 50\%$  chez l'insecte adulte.

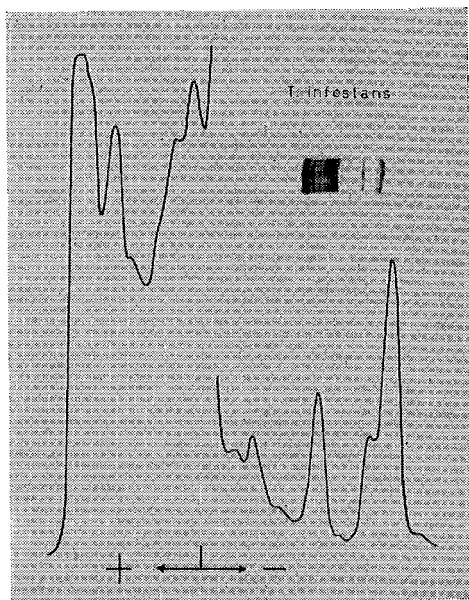


Fig. 2. — Electrophérogramme et courbe des extinctions de *T. infestans*.

En résumé, l'hémolymphe de *T. infestans* étudiée par électrophorèse en agar, présente un spectre protéinique nettement différent de celui de *R. prolixus*; les caractéristiques sont :

- l'aspect différent des 2 fractions anodiques;
- la présence chez le *R. prolixus* d'une importante fraction de protéines insolubles au point de départ;

- c) l'absence chez *T. infestans* d'une strie double, signalée chez *R. prolixus* dans les fractions cathodiques;
- d) l'apparition d'une fraction cathodique supplémentaire dans l'hémolymphe de *T. infestans*, inexistante chez *R. prolixus*;
- e) les sous-divisions des «  $\gamma$ -globulines » du *T. infestans*.

Quantitativement, les différences se présentent nettement en considérant :

- a) les valeurs des 2 fractions anodiques. Le rapport quantitatif pour le *R. prolixus* se chiffre vers 2,0, pour le *T. infestans* ce rapport est de  $\pm 0,85$ ;
- b) les valeurs relatives des fractions cathodiques. Pour le *T. infestans* la somme de ces fractions s'élève à  $\pm 45,0 \%$ , pour le *R. prolixus* à  $\pm 31,0 \%$ ;
- c) les fractions qui migrent à la hauteur des  $\gamma$ -globulines humaines; la valeur relative pour le *T. infestans* est de  $\pm 13,0 \%$ , pour le *R. prolixus*  $\pm 5,0 \%$ .

#### Discussion.

Ces premiers résultats ne font en réalité qu'entrevoir l'intérêt et les possibilités de l'électrophorèse de l'hémolymphe pour l'étude des insectes, vecteurs de germes pathogènes.

Denuce et Rabaye (1956), Denuce (1958) en employant la même méthode que nous, ont obtenu des résultats intéressants pour l'hémolymphe de *Bombyx mori*, *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, etc. Rabaye et Verriest (1958), dans une étude poussée sur des insectes paléarctiques, pouvait déjà remarquer que le spectre protéinique de l'hémolymphe de ces insectes montrait une grande spécificité. Les multiples répétitions effectuées sur les deux Réduviides hématophages faisant l'objet de cette note et auxquelles nous avons ajoutées depuis, des études analogues, non encore publiées, sur diverses espèces d'Ixodides appartenant aux genres *Hyalomma*, *Argas* et *Ornithodoros*, nous permettent de confirmer cette thèse. Comme les insectes ayant fait l'objet de nos études sont nourris sur cobaye, il nous semblait intéressant de comparer leurs protéines hémolympatiques avec celles du cobaye. A cette fin, nous avons simultanément effectué une électrophorèse des 3 sérums sur le même porte-objet, ce qui permet ainsi de comparer facilement les vitesses de migration des fractions obtenues (fig. n° 3). On remarque des différences prononcées entre le spectre protéinique du sérum du cobaye et ceux des 2 insectes étudiés. Aucun des 2 insectes ne possède une fraction migrant à la même vitesse que les albu-

mines du cobaye. En effet, les 2 fractions anodiques des insectes migrent nettement plus loin. En ce qui concerne la comparaison avec les globulines du cobaye, on ne retrouve aucun parallélisme. Le fait que les  $\gamma$ -globulines du cobaye migrent à la même hauteur que les fractions les plus cathodiques des insectes, ne semble pas donner une indication sur la nature de ces fractions. De plus leurs valeurs relatives sont totalement différentes.

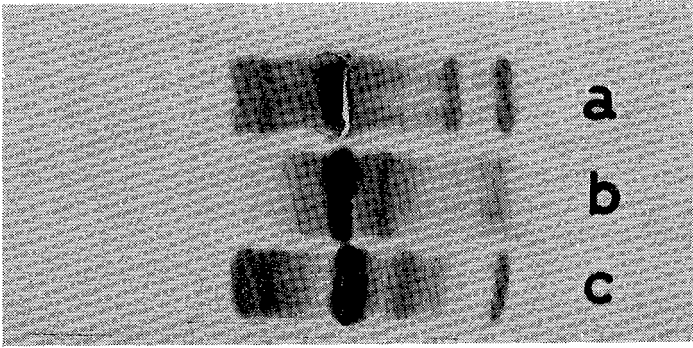


Fig. 3. — Electrophorèse simultanée de :  
a) *T. infestans* — b) sérum de cobaye — c) *R. prolixus*.

Cette expérience ne constitue en fait que l'illustration d'un phénomène biologique classique : la transformation des protéines du sang de son hôte par l'insecte hématophage en protéines qui lui sont propres.

En ce qui concerne les valeurs quantitatives, nous les donnons avec cette restriction que nous ne savons actuellement encore rien de l'affinité entre le colorant employé et chaque fraction du phérogramme.

Des études ultérieures sur insectes infectés compléteront cette investigation.

Résumé. — Dans l'interprétation de ces premiers résultats il convient de mettre en exergue le fait que l'hémolymphe d'une espèce de *Triatoma* et une du genre *Rhodnius* présentent à l'électrophorèse sur agar une morphologie nettement différente. D'autre part, le phérogramme de ces deux espèces de Réduviides, phylogénétiquement proches, présente des analogies que nous n'avons plus retrouvés chez les différents genres et espèces d'Ixodides étudiés depuis lors et qui feront l'objet de publications ultérieures.

Samenvatting. — Van deze eerste uitslagen komt uit dat een haemolymfe van de soort *Triatoma* en een van de soort *Rhodnius* aan de elektroforese op agar een duidelijk verschillend ferogram vertoonde. De ferogram anderzijds van deze twee soorten *Reduviiden*, die phylogenetisch nabij zijn, tonen gelijkvormigheden aan, die we niet meer terugvinden bij de verschillende soorten *Ixodiden* die we sinds dien bestuderen en die later zullen gepubliceerd worden.

Summary. — In interpreting these first results it is sufficient merely to state the fact that the haemolymph from a species of *Triatoma*, and that from one of the genus *Rhodnius* show a definitely different morphology on electrophoresis on agar. On the other hand the pherogram of these 2 phylogenetically close species of *Reduviids* presents analogies which we have not found in the different genera and species of the *Ixodidae* studied up till now; these will be the subject of later papers.

Zusammenfassung. — Bei der Deutung dieser ersten Ergebnisse wird vom Verfasser betont, dass die Haemolymph einer Species von *Triatoma* und diejenige einer Gattung von *Rhodnius* bei Elektrophorese auf Agar deutlich verschiedene Pherogramme zeigt. Andererseits zeigt das Pherogramm dieser phylogenetisch einander nahestehenden *Reduviiden* Analogien, die bei den verschiedenen bisher untersuchten *Ixodiden*-Gattungen und -Arten nicht wieder beobachtet wurden; sie sind Gegenstand einer späteren Mitteilung.

Resumen. — En la interpretación de estos primeros resultados conviene poner en evidencia el hecho de que la hemolinfa de una especie de *Triatoma* y otra del género *Rhodnius* presentan, en la electroforesis sobre agar, una morfología netamente diferente. De otra parte, el ferograma de ambas especies de *Reduviidos*, filogenéticamente próximos, presenta analogías que nosotros no hemos hallado en los diferentes géneros y especies de *Ixodidos* estudiados desde entonces y que serán objeto de publicaciones ulteriores.

Chaire d'Entomologie et Laboratoire de Biochimie  
de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers,  
Directeur : Prof. D<sup>r</sup> P. G. Janssens.

#### BIBLIOGRAPHIE.

- Denuce, J. M. — Zonenelektrophoretische Untersuchungen der Hämolymphe-Proteine von Insekten in verschiedenen Stadien der Larvenentwicklung. Ztschr. f. Naturforschung, 1958, 13b, 4, 215 : 218.



- Denuce, J. M. et Rabaye, M. — De scheiding van haemolympe proteïnen door ultra-microelektrophorese op agar. « Protides of the Biological Fluids » Elsevier, 1958, 154: 158.
- Misselyn, Gen., Karcher, D., de Keyser, F. et van Sande, M. — Studies on hemolympe proteins of insects of medical importance. VII<sup>e</sup> Colloquium St-Jans Hospitaal, Bruges 1959.
- Rabaye, M. et Verriest, G. — Ann. de la Soc. Roy. Zoolog. de Belgique, 1957-1958, 88, 373-383.
- Wieme, R. J. et Rabaye, M. — A new technique of quantitative ultra-micro-electrophoresis. Naturwiss. 1957, 5, 112-113.
-