

UNE MICROMETHODE D'ELECTROPHORESE EN PLAQUE D'AMIDON APPLICABLE A L'ETUDE D'INDIVIDUS ISOLES DE MICROARTHROPODES

par

J. P. DUJARDIN, A. FAIN & B. DE DEKEN

Laboratoire de Zoologie Médicale, Institut de Médecine Tropicale,
Nationaalestraat 154, B-2000 Antwerpen, Belgique

Résumé — Les auteurs décrivent une méthode d'électrophorèse en plaque d'amidon très sensible, permettant d'obtenir le zymogramme d'estérases non spécifiques à partir d'un seul individu de l'acarien *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, responsable de l'asthme bronchique des poussières.

Grâce à cette méthode, ils ont pu rechercher le déterminisme génétique des variations individuelles que présentent les isoenzymes d'estérases de cette espèce.

KEYWORDS : Plate Electrophoresis; Microarthropodes; *Dermatophagoides farinae*; Esterase Isoenzymes; Genetics.

Introduction

L'électrophorèse des isoenzymes est de plus en plus utilisée dans la systématique des arthropodes d'importance médicale (Avisé, 1974). La méthode la plus appropriée à cette recherche est la technique de l'électrophorèse en plaque, qui permet de comparer dans un même gel plusieurs individus entre eux. Cette méthode convient très bien pour des vecteurs de la taille des insectes ou des tiques, mais elle est inapplicable aux microarthropodes à cause de la trop faible quantité d'enzymes que ceux-ci renferment. De si petites quantités peuvent être révélées par la méthode d'électrophorèse sur colonnes, ou disc-électrophorèse (Davis, 1964), malheureusement cette méthode ne permet pas de faire l'étude comparative de plusieurs zymogrammes dans un même gel.

Jusqu'à présent, dans le cas des microarthropodes, on s'est contenté de faire des zymogrammes sur des « pools » d'individus (Silberstein *et al.*, 1979) mais ce procédé ne permet pas de mettre en évidence les variations individuelles dont l'étude est indispensable pour la définition génétique d'une espèce (Hubby *et al.*, 1966). Nous avons alors cherché à augmenter la sensibilité de la méthode en plaque, principalement en diminuant la dispersion de l'enzyme dans le gel. Par ce procédé nous avons réussi à obtenir, pour la première fois, des zymogrammes d'estérases parfaitement lisibles à partir d'individus isolés. Nos essais ont été réalisés sur une culture de l'acarien *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, une petite espèce dont la longueur n'atteint pas un demi-millimètre et qui est responsable de l'asthme bronchique des poussières (Wharton, 1976).

Chez cet acarien nous avons pu montrer que les individus ne possèdent pas tous la même composition isoenzymatique d'estérases. L'étude de la

transmission héréditaire des différents phénotypes observés suggère que ces différences sont le résultat du polymorphisme allélique de deux locus d'estérases non spécifiques.

Matériel et méthode

1. Souche de microarthropode utilisée dans nos expériences

Nous avons utilisé dans nos expériences une souche de l'acarien *Dermatophagoides farinae* qui nous fut aimablement fournie par Mademoiselle Dr. A. Van Bronswijk, de l'Akademisch Ziekenhuis d'Utrecht, Nederland. Cet acarien constitue une source importante d'allergène dans l'athme bronchique des poussières.

Cette souche est entretenue dans notre laboratoire depuis le 5 février 1978.

Des couples (un mâle et une femelle) sont prélevés de la culture et isolés. Afin d'être certain que la femelle prélevée n'a pas déjà été fécondée, elle est retirée au stade de tritonymphe; à ce stade, elle est souvent « occupée » par un mâle, et dans ce cas c'est également ce mâle qui est choisi pour former le couple géniteur. Après une quinzaine de jours, lorsque la ponte est probablement achevée, et avant qu'une copulation ait pu se produire entre les deux générations, le couple géniteur est retiré et sacrifié aux fins de l'électrophorèse. Lorsque des œufs réapparaissent dans cette famille, les adultes sont également retirés et leurs enzymes étudiés; ils constituent ce que nous appelons ici la première génération, et la répartition de leurs phénotypes est comparée aux phénotypes du couple géniteur. Nous n'avons pas réalisé de croisements « en retour », ni étudié la deuxième génération.

2. Méthode d'électrophorèse utilisée

La méthode d'électrophorèse en plaque qui est utilisée habituellement dans l'étude des insectes ne peut pas convenir dans le cas de très petits arthropodes comme les acariens, dont la taille n'atteint pas 0,5 mm en longueur, et qui ne renferment donc que des quantités très faibles d'enzymes.

Grâce à de légères modifications dans la technique nous sommes parvenus à augmenter la sensibilité de cette méthode au point de pouvoir obtenir des zymogrammes à partir d'individus isolés d'acariens.

L'augmentation de la sensibilité a été obtenue en diminuant la diffusion de l'enzyme dans le gel. Pour freiner le plus possible cette dispersion nous utilisons un gel très mince d'environ 2 mm d'épaisseur. Cette épaisseur peut être empiriquement ajustée suivant la taille des spécimens à examiner.

L'amincissement du gel augmente déjà nettement la sensibilité de la réaction, mais on peut encore améliorer les résultats en ajustant la distance de migration de façon à obtenir le maximum de séparation des enzymes compatible avec une bonne intensité de la réaction.

Nous décrivons ici les phases successives de la méthode telle qu'elle a été utilisée par nous pour réaliser des zymogrammes d'acariens isolés.

Le support utilisé pour l'électrophorèse est le gel d'amidon (Smithies, 1955). Il est constitué d'amidon hydrolysé (Connaught Laboratories) mis en solution à 11,6 p. cent dans le tampon gel de Sélander *et al.* (1971) composé de 22,89 mM de tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane (Sigma) et de 5,22 mM d'acide citrique monohydraté (Merck). Le pH de ce liquide tampon (pH 8,5) peut être éventuellement abaissé à 7,6 avec le l'HCL 0,1 N (figs. 2-3). Un moule de verre dont le fond est amovible est préparé pour former un gel de 2 mm d'épaisseur, 6 cm de largeur et 9 cm de longueur. Le refroidissement du gel se fait à 4 °C sous une feuille de plastic pendant 4 heures. Le gel est ensuite retiré de son moule avec la plaque de verre qui lui sert de support, et dont il ne sera séparé qu'après la fin de la migration.

Les individus mâles et femelles les plus chitinisés ont été prélevés dans un tube et placés au congélateur pendant au moins une demi-heure. Ils sont ensuite déposés chacun dans une goutte de 0,2 μ L d'eau désionisée, et écrasés minutieusement sous contrôle d'un binoculaire, à l'aide d'un pilon de verre. La suspension ainsi réalisée est absorbée sur un carré de papier filtre Whatman n° 3 de 1,5 mm de côté. Il est important d'insérer le papier filtre dans le gel immédiatement après cette opération. On évite ainsi l'effet de dilution provoqué par la condensation de l'eau sur ce matériel froid. Chaque carré de papier est introduit dans une fente verticale individuelle de façon à la remplir complètement : au maximum six fentes par gel, donc six individus par gel. Ces fentes s'alignent en largeur sur une droite parallèle à la ligne des ponts, et située à 4 cm de la cathode. Les ponts sont découpés dans une seule épaisseur de papier Whatman n° 3 et recouvrent les bords du gel sur 10 mm.

La cuve utilisée (Shandon modèle U 77) peut recevoir deux gels à la fois. Les électrodes sont plongées chacune dans 250 ml de la solution tampon d'électrode de Sélander composée de 0,687 M de tris-hydroxy - méthyl-amino-méthane, et 0,157 M d'acide citrique monohydraté (pH 8). Avant d'établir le champ électrique, chaque carré de papier filtre est imprégné d'une solution de bleu de bromophénol à 0,05 p. cent, qui servira de témoin de migration. Du fait de la taille du gel et de la minceur des ponts, la migration se fait au frigo et est réalisée à courant constant : au maximum 10 mA par gel. La durée de l'électrophorèse est prévue à ce moment en fonction du voltage affiché pour permettre au témoin de parcourir quelque 3 cm. Cette migration dure une heure environ.

La mise en évidence de l'activité des estérases non spécifiques s'inspire directement de la technique mise au point par de Stordeur (1976). Elle a lieu dans une petite cuve de verre aux dimensions du gel. Ce dernier est séparé de son support et trempé dans 44 ml de la solution tampon d'incubation, composée de 0,1 M Na₂HPO₄ (Merk) et 0,1 M de KH₂PO₄ (Merck), dont le pH est abaissé à 6,0 avec de l'HC1 fumant. Après une dizaine de minutes sont ajoutés 5,5 ml de la solution de substrat, constitué de 0,5 g de alpha-naphtyl-acétate (Serva) et de 0,5 g de bêta-naphtyl-acétate (Serva) dissous dans 75 ml d'acétone pure ajustés à 100 ml avec de l'eau désionisée. Le gel est laissé en présence du substrat pendant une vingtaine de minutes, avant d'ajouter 22 mg de Fast Garnet G. B. C. salt (Serva). Une plus grande quantité de colorant assombrirait la teinte du gel, ce qui diminuerait le contraste des images. Les zones colorées en bleu et en rouge apparaissent après cinq minutes chez les femelles,

dix minutes chez les mâles (dont la taille est nettement plus petite), et ont atteint leur maximum d'intensité après trois quart d'heure. Le gel est alors plongé dans le liquide fixateur (acide acétique glacial, méthanol et eau courante dans les proportions 1 : 5 : 5) où il peut rester plusieurs mois. Si l'on désire, avant la fixation, rendre transparent le support du zymogramme, il suffit de tremper le gel dans de la glycérine chauffée à 80 °C pendant environ une minute (Marsh *et al.*, 1964).

Observations personnelles

1. Résultats de zymogrammes d'individus isolés de *D. farinae* Hughes, 1961

Grâce à la technique que nous venons de décrire nous avons pu obtenir des zymogrammes d'individus isolés de l'acarien *Dermatophagoides farinae*. Les enzymes testées sont les estérases non spécifiques.

La figure 1 montre le zymogramme d'estérases obtenu à partir d'un pool d'acariens d'environ 20 à 30 individus de *D. farinae*. Il comporte deux électromorphes rapides d'intensités équivalentes et de mobilités légèrement différentes au sommet du zymogramme (groupe Est-1) puis deux zones successives d'activité intense (groupe Est-2 et Est-3) et enfin une zone d'activité ayant migré vers la cathode (groupe Est-4).

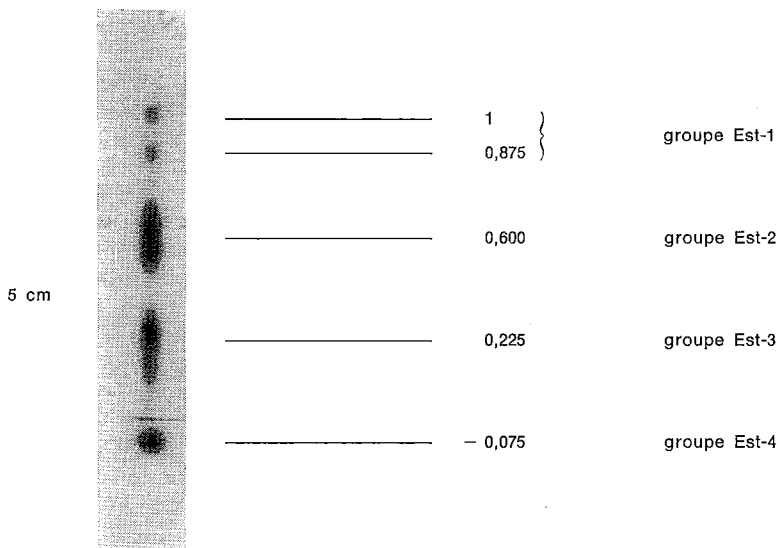


Figure 1.

Zymogramme des estérases non spécifiques de *D. farinae* Hughes, 1961, obtenu à partir d'un pool de 20 à 30 spécimens sur un gel d'amidon en plaque de 30 cm de long et 7 mm d'épaisseur, utilisant un pH 8,5 (Silberstein *et al.*, 1979).

Les figures 2 et 3 montrent les variations individuelles qui ne pouvaient pas apparaître avec la technique utilisant un pool d'individus (fig. 1). Ces variations sont observées au niveau des groupes Est-1 et Est-4.

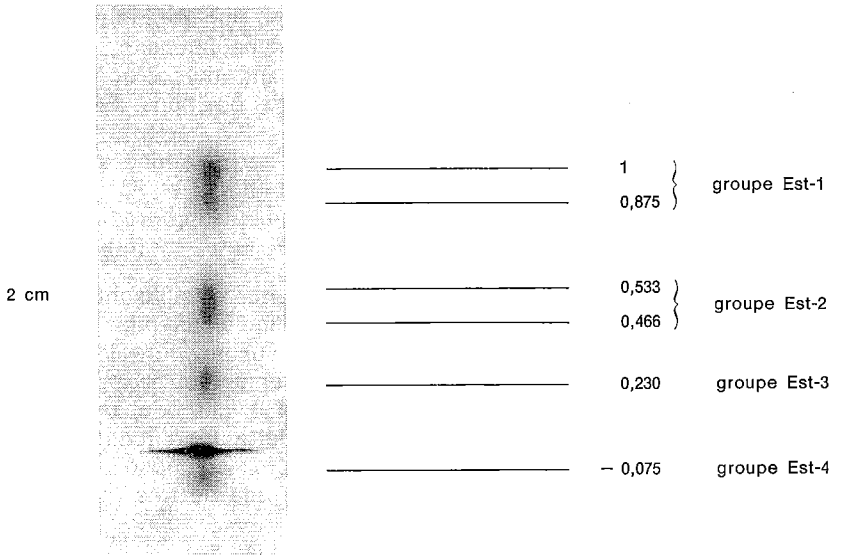


Figure 2.
Zymogramme d'estérases non spécifiques,
obtenu à partir d'un seul spécimen mâle de *D. farinae* Hughes, 1961,
selon la microméthode que nous décrivons en utilisant un pH 8,5.

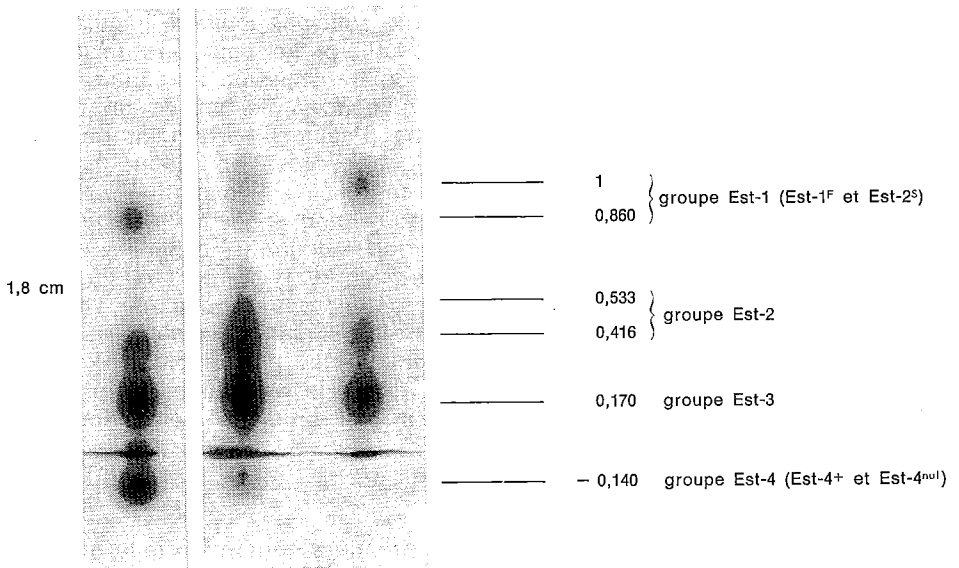


Figure 3.
Trois zymogrammes d'estérases non spécifiques
obtenus chacun à partir d'un seul individu de *D. farinae* Hughes, 1961,
selon notre microméthode, en utilisant un pH 7,6.

Groupe Est-1 : trois phénotypes sont possibles, l'un rapide, Est-1^F (fig. 3 à droite), l'autre lent et de même intensité, Est-1^S (fig. 3 à gauche), et le dernier occupant, mais avec une intensité moindre, chacune de ces deux positions, Est-1^{PS} (fig. 2, et fig. 3 au centre).

Groupe Est-4 : deux phénotypes sont retenus. La présence d'une activité, dont l'intensité varie de faible (fig. 2 et fig. 3 au centre) à forte (fig. 3 à gauche), nommée indifféremment Est-4⁺; ou l'absence de toute activité, Est-4^{nu1}, (fig. 3 à droite).

La figure 2 montre l'image qui peut être obtenue en utilisant le même pH que pour la technique portant sur un pool d'individus (fig. 1). L'individu choisi (fig. 2) présente toutes les taches vues sur la figure 1.

La figure 3 montre le résultat d'un abaissement du pH des tampons. L'ensemble des électromorphes est attiré vers la cathode, ce qui permet de mieux distinguer le phénotype Est-4⁺. Cette modification contribue aussi à une meilleure séparation du groupe Est-2, composé de deux électromorphes d'intensité très inégales, le plus rapide de très faible intensité (moins visible sur notre photo).

Seuls les groupes Est-1 et Est-4 varient selon les individus, et présentent donc de l'intérêt. Comme c'est au pH 7,6 que ces groupes sont le mieux définis, c'est ce pH que nous avons choisi pour étudier leur mode de transmission héréditaire.

2. Mode de transmission héréditaire des phénotypes Est-1 et Est-4

Les variations observées dans la composition isoenzymatique de chaque individu chez les arthropodes en général ne sont pas toujours imputables à la variabilité génétique (Shaw, 1970). Celle-ci ne peut être mise en évidence que lors d'une étude du mode de transmission héréditaire des différents phénotypes individuels, et correspond à l'existence de locus qui ségrégent pour deux allèles au moins (Pasteur, 1974). L'information utile recherchée par une technique d'électrophorèse en plaque menée individu par individu est la fréquence de ces allèles. Elle permet en effet d'exprimer la variabilité génétique d'une population, à savoir la fréquence moyenne des individus hétérozygotes à un locus donné (Dobzhansky *et al.*, 1977) et d'apprécier la distance génétique (Nei, 1971) entre deux souches de population. On peut ainsi notamment définir une espèce par l'étude de ses allozymes (Ayala *et al.*, 1972), apprécier l'interaction d'une espèce avec son milieu (Ayala *et al.*, 1974) et étudier les phénomènes de spéciation (Colluzzi *et al.*, 1971). Nous avons étudié la répartition des phénotypes des estérases Est-1 et Est-4 dans une première génération de 8 familles (voir tableaux 1 et 2).

Est-1 (tableau 1)

La répartition des phénotypes dans la première génération telle qu'elle apparaît dans le tableau 1 suggère une disjonction mendélienne des isoenzymes Est-1^F et Est-1^S.

Il s'agit donc de deux allozymes (Markert *et al.*, 1959) codées par un seul et même locus, Est-1, présentant deux allèles codominants Est-1^F

et Est-1^S. Comme aucune différence ne fut notée entre mâles et femelles ce locus est considéré comme autosomique.

TABLEAU 1

Phénotypes des parents	Génotypes proposés	Nombre de familles	Phénotypes des descendants			Total des descendants
			Est-1 ^F	Est-1 ^{FS}	Est-1 ^S	
Est-1 ^F × Est-1 ^S	Est-1 ^{F/F} × Est-1 ^{S/S}	1	0	17	0	17
Est-1 ^{FS} × Est-1 ^S	Est-1 ^{F/S} × Est-1 ^{S/S}	2	0	11	8	19
Est-1 ^{FS} × Est-1 ^F	Est-1 ^{F/S} × Est-1 ^{F/F}	1	12	15	0	27
Est-1 ^{FS} × Est-1 ^{FS}	Est-1 ^{F/S} × Est-1 ^{F/S}	4	17	32	18	67
		8	29	75	26	130

TABLEAU 2

Phénotypes des parents	Génotypes proposés	Nombre de familles	Phénotypes des descendants		Total des descendants
			Est-4 ⁺	Est-4 ^{nul}	
Est-4 ⁺ × Est-4 ⁺	Est-4 ^{+/nul}	3	38	17	55
Est-4 ⁺ × Est-4 ^{nul}	Est-4 ^{+/+} × Est-4 ^{nul/nul}	3	31	0	31
	Est-4 ^{+/nul} × Est-4 ^{nul/nul}	2	24	20	44
		8	93	37	130

Les hétérozygotes Est-1^{FS} montrant deux isoenzymes, il apparaît que l'estérase Est-1 de *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, est une protéine monocaténaire.

Les effectifs observés parmi les descendants des parents hétérozygotes ne diffèrent pas significativement des effectifs calculés ($X^2 = 0,5$) et la fréquence des deux allèles est proche de 0,5 (Est-1^F = 0,493 et Est-1^S = 0,507).

Est-4 (tableau 2)

Le phénotype Est-4^{nul} est explicable par la présence d'un allèle nul. Cela signifie par exemple que la mutation intervenue au locus responsable de la synthèse de cet isoenzyme Est-4 a modifié la fonction estérasique de la protéine, qui ne réagit plus avec l' α ou le β naphthyl-acétate qui lui est proposé.

L'intensité du phénotype Est-4⁺ suggère l'hétérozygotie Est-4^{nul/+} quand elle est faible (fig. 2 et fig. 3 au centre), et l'homozygotie Est-4^{+/+} quand elle est forte (fig. 3 à gauche). Comme cette variation d'intensité n'a pas été prise en compte dans la répartition des phénotypes de la première génération, les proportions qui apparaissent sont celles que produirait un locus occupé par deux allèles dont l'un serait récessif,

c'est-à-dire 3/4 et 1/4 (la valeur de l'écart réduit $|e|$ pour $\alpha = 0,05$ est inférieure à 1,96).

Le calcul des fréquences alléliques dans ce cas présuppose l'équilibre de Hardy Weinberg. Nous estimons toutefois que le nombre des différents types de croisements possibles n'est pas encore atteint, et que l'étude de ce locus doit être poursuivie en particulier sur le point de sa liaison éventuelle au facteur sexuel.

Comme l'isoenzyme migrant vers la cathode n'occupe qu'une seule position et ne montre qu'une seule zone active dans nos conditions expérimentales, il est probable que l'estérase Est-4 de *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, n'est composée que d'une seule chaîne peptidique.

Conclusions

Les auteurs ont réussi à adapter la méthode de l'électrophorèse en plaque d'amidon à l'étude d'individus isolés de microarthropodes. Leurs essais ont été réalisés sur un acarien très petit (moins de 0,5 mm en longueur), *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, responsable de l'asthme bronchique des poussières.

Les premiers résultats de leur méthode peuvent se résumer comme suit :

- 1) les estérases carboxyliques de *D. farinae* présentent au moins 2 locus polymorphes : Est-1 et Est-4;
- 2) le locus Est-1 est occupé par deux allèles codominants, Est-1^B et Est-1^S, de fréquences proches de 0,5;
- 3) le locus Est-1 n'est probablement pas lié au facteur sexuel;
- 4) la protéine codée par ce locus Est-1 est monocaténaire;
- 5) le locus Est-4 est occupé par deux allèles dont l'un est un allèle nul;
- 6) la protéine codée par ce locus Est-4 est également monocaténaire.

Les auteurs se proposent de poursuivre ces observations, en particulier d'étudier le « linkage » éventuel des locus entre eux et vis-à-vis du facteur sexuel.

Electrophoretic starch gel micromethod for the study of single isolated microarthropods.

Summary — The authors describe a new very sensitive plate electrophoretic method that allows to perform the zymogram of non-specific esterases from a single specimen of *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, a mite involved in the production of house-dust mite asthma.

Using this method, they were able to study the genetic mechanism of the individual variations in the esterase isoenzymes of this species.

Electroforetische zetmeelgel micromethode voor de studie van individuele specimens van microarthropoden.

Samenvatting — De auteurs beschrijven een nieuwe zeer gevoelige plaat-electroforese techniek die toelaat een zymogram van niet-specifieke esterases te bepalen voor individuele specimens van *Dermatofagoides farinae* Hughes, 1961, een mijt die bronchiaal huisstof astma veroorzaakt.

Met deze methode kon het genetisch mechanisme van de individuele variaties in de esterase isoenzymen van dit species worden bestudeerd.

Reçu pour publication le 1^{er} décembre 1981.

REFERENCES

- Avise, J. C. (1974) : Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, **23**, 465-481.
- Ayala, F. J. & Powell, J. R. (1972) : Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**, 1094-1096.
- Ayala, F. J., Tracey, M. L., Barr, L. G., McDonald, J. F. & Perez-Salas, S. (1974) : Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms. *Genetics*, **77**, 343-384.
- Colluzzi, M., Bullini, L., Bianchi, P. & Bullini, A. P. (1971) : Phosphoglucomutase polymorphism in *Aedes phoeniciae* Colluzzi et Sabatini of the *Ae. mariae* complex (Diptera, Culicidae). *Bull. ent. Res.*, **61**, 327-330.
- Davis, B. J. (1964) : Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
- Dobzhansky, Th., Ayala, F. J., Stebbins, G. L., & Valentine, J. W. (1977) : *Evolution*. Edit. W. H. Freeman and Company, San Fransisco, pp. 46-51.
- Hubby, J. L. & Lewontin, R. C. (1966) : A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **54**, 577-594.
- Markert, C. L. & Moller, F. (1959) : Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenic. and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **45**, 753-763.
- Marsh, C. L., Jolliff, C. R. & Payne, L. C. (1946) : A rapid micromethod for starch gel electrophoresis. *Technical Bulletin of the Registry of the Medical Technologists*, **34**, 1-7.
- Nei, M. (1971) : Genetic distance between populations. *Amer. Natur.*, **106**, 181-292.
- Pasteur, G. (1974) : Génétique biochimique et populations, ou : Pourquoi sommes-nous multipolymorphes ? *Mem. Soc. Zool. France.*, **37**, 473-531.
- Pasteur, N. (1977) : Recherches de génétique chez *Culex pipiens pipiens* L. Polymorphisme enzymatique, autogénèse et résistance aux insecticides organophosphorés. Thèse, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, pp. 170.
- Selander, R. K., Smith, M. H., Yang, S. Y., Johnson, W. E. & Gentry, J. B. (1971) : Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics. The University of Texas Publication*, **4**, 49-90.
- Shaw, C. R. (1970) : How many genes evolve ? *Biochem. Genet.*, **4**, 275-283.
- Silberstein, A. J., Fain, A. & Herin, A. (1979) : Esterase isoenzyme patterns of some astigmatic mites. *Intl. J. Acar.*, **5** (1), 1-4.
- Smithies, O. (1955) : Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61**, 629-641.
- Stordeur, E., de. (1976) : Esterases in the mosquito *Culex p. pipiens* L. : formal genetics and polymorphism of adult esterases. *Biochem. Genet.*, **14**, 481-493.
- Wharton, G. W. (1976) : House dust mite. *J. Med. Entomol.*, **12** (6), 577-621.