

Ent. 1101

**MICROÉLECTROPHORÈSE DE L'HÉMOLYMPHE DU POU  
(*PEDICULUS HUMANUS*)**

Par CH. SÉRIÉ, M. OVAZZA et R. GUTFREUND (\*)

L'étude de l'hémolymphe de poux (*Pediculus humanus*) par la méthode de microélectrophorèse sur papier nous a permis de mettre en évidence plusieurs fractions protéiniques et d'étudier leurs variations en fonction du sexe et de l'infection à *Rickettsia prowazeki*.

La bibliographie mise à notre disposition ne nous a fourni aucune donnée sur l'hémolymphe de cette espèce.

I. — TECHNIQUE UTILISÉE

A. — Appareillage.

Les tracés électrophorétiques ont été obtenus sur papier Arche 301 au moyen de l'appareil de microélectrophorèse de Machebœuf-Rebeyrotte; l'appareil étant branché sur la prise haute tension (380 V). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la solution tampon à pH 8,6 (véronal-véronal sodé). La durée de chaque électrophorèse a été de 4 heures.

La fixation et la révélation ont été pratiquées suivant les méthodes standard. Pour nous permettre de mieux évaluer l'importance des différentes fractions protéiniques, nous avons établi des graphiques en suivant la méthode décrite dans un travail antérieur (\*\*). Une modification a été apportée à cette méthode en introduisant la notion d'« intensité ». Nous appelons ainsi le quotient du nombre de degrés photométriques obtenus après dilution de chacune des taches de la bande électrophorétique par leur longueur en millimètres (\*\*\*) .

B. — Prélèvement de l'hémolymphe.

a) *Matériel utilisé :*

- une loupe binoculaire de dissection à platine,
- une pince fine, courbe, souple,
- des verres à montre,

(\*) Séance du 14 novembre 1956.

(\*\*) « Electrophorèse et Diagnostic de la Rage » (*Ann. de l'Inst. Past.*, 88, avril 1955).

(\*\*\*) Les intensités ont été portées en ordonnées, pour la commodité de la réalisation des graphiques, il a été pris 10 divisions de papier millimétré pour 1° d'intensité. Les longueurs en millimètres de chaque fraction protéinique ont été portées en abscisse. Il a été pris 2 divisions de papier millimétré pour 1 mm.; les longueurs ainsi déterminées sont le double de celles effectivement mesurées.

G. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 13141-281

25 MAR 1959

- une aiguille montée à pointe aiguisée,
- des tubes à hémolyse,
- une micropipette Seive n° 3140,
- une micropipette préparée extemporanément par effilage d'une pipette Pasteur. Cette micropipette doit être étalonnée de la façon suivante : 7 mm<sup>3</sup> 5 de solution tampon mesurée avec la pipette Seive, sont déposés dans un verre de montre. Après avoir vérifié que le diamètre de la micropipette est inférieur à celui d'une goutte d'hémolymphe de poux, on plonge cette micropipette dans la solution tampon et on marque un repère à l'encre de chine à l'endroit où s'arrête l'ascension de la solution par capillarité. Cette opération est répétée autant de fois qu'il est nécessaire pour épuiser les 7 mm<sup>3</sup> 5. Si au cours de la dernière aspiration, l'hémolyse n'atteint pas le repère un second trait est inscrit au niveau atteint.

b) *Méthode de prélèvement* :

Les poux sont lavés par agitation durant deux minutes dans un petit Erlenmeyer contenant 20 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Le contenu de l'Erlenmeyer (poux et eau physiologique) est versé sur un filtre en papier. Les poux sont prélevés et mis dans une boîte de Petri dont le fond est garni par une rondelle de papier Joseph. La boîte de Petri est laissée 10 minutes à 37°.

Chaque pou est prélevé à la pince, maintenu sur le verre de montre et ponctionné avec l'aiguille montée au niveau du bord externe d'un des trois derniers anneaux de l'abdomen. L'aiguille retirée, la goutte qui sourd est déposée sur le verre de montre et aspirée par capillarité avec la micropipette.

On ponctionne autant de poux qu'il est nécessaire pour que l'hémolymphe atteigne le repère de la micropipette. Ce liquide est alors rejeté dans un tube à hémolyse où l'on a auparavant déposé 20 mm<sup>3</sup> de solution tampon. Cette opération est répétée jusqu'à ce que l'on obtienne 7 mm<sup>3</sup> 5 d'hémolymphe. Le mélange contenu dans le tube représente donc 27 mm<sup>3</sup> 5. Il est déposé sur la bande de papier Arches 20 mm<sup>3</sup> de la solution qui représentent 5 mm<sup>3</sup> 5 d'hémolymphe, quantité optima pour avoir des tracés électrophorétiques lisibles.

Il faut noter que toutes les fois, par suite d'erreurs de manipulation, la goutte d'hémolymphe est troublée par les fèces ou le sang de l'intestin, elle est rejetée.

## II. — HÉMOLYMPHE DE POUX ADULTES D'ÉLEVAGE

La microélectrophorèse, pratiquée selon la méthode qui a été décrite dans le chapitre précédent, a donné, avec 20 lots de poux adultes prélevés dans un élevage sain 2 heures environ après le repas, les résultats suivants :

1) La constitution protéinique de l'hémolymphe de poux semble constante dans les conditions expérimentales décrites.

2) Il existe une différence très importante entre le mâle et la femelle (fig. 1 et 2).

Chez la femelle, on note 3 fractions distinctes que nous avons appelées  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

Chez le mâle, on note une seule fraction que nous avons appelée  $\gamma$ ; cette fraction ayant sensiblement le même déplacement que la

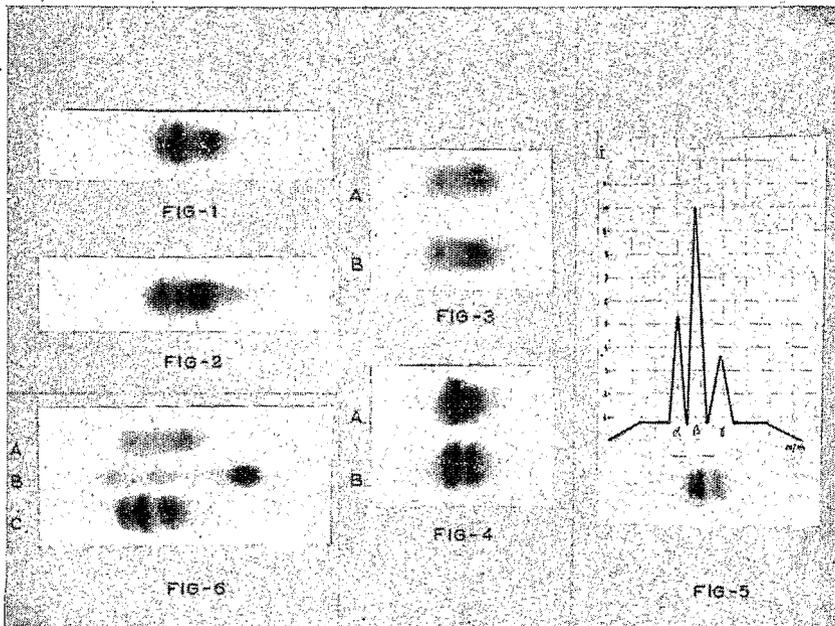


Fig. 1. — Tracé électrophorétique de poux normaux d'élevage, femelles.

Fig. 2. — Tracé électrophorétique de poux normaux d'élevage, mâles.

Fig. 3. — A. Tracé électrophorétique de poux normaux d'élevage, mâles; B. Tracé électrophorétique de poux normaux d'élevage, mâles, après un jeûne de 24 heures.

Fig. 4. — A. Tracé électrophorétique de poux normaux d'élevage, femelles; B. Tracé électrophorétique de poux normaux d'élevage, femelles après un jeûne de 24 heures.

Fig. 5. — Tracé électrophorétique de poux femelles prélevés sur un sujet sain.

Fig. 6. — A. Tracé électrophorétique de poux normaux d'élevage, mâles; B. Tracé électrophorétique de sérum humain; C. Tracé électrophorétique de poux normaux d'élevage, femelles.

fraction  $\gamma$  de la femelle. Sur certains tracés électrophorétiques d'hémolymphe de poux mâles, on note une tache sur le lieu exact où l'on a déposé le liquide. Cette tache qui est inconstante et qui, lorsqu'elle existe n'a subi aucun déplacement, ne doit pas être prise en considération (elle est pratiquement indistinguable sur les tracés reproduits à la figure 3).

Nous avons voulu préciser si ces caractères pouvaient varier en fonction de différents facteurs du jeûne d'abord, des conditions de vie ensuite.

Un jeûne de 24 heures à la température du laboratoire (19° le jour et 11° la nuit en moyenne) ne semble pas modifier les tracés électrophorétiques (fig. 3 pour mâles, fig. 4 pour femelles). Tout au plus peut-on noter une légère accentuation de l'ensemble des taches, augmentation qui dénote, peut-être, une concentration des protéines dans l'hémolymphe.

Il n'y a pas de différence significative entre la quantité d'hémolymphe contenue dans des poux venant d'être nourris et dans ceux maintenus 24 heures à jeun (ou 15 heures à l'étuve à 32°). Cette donnée est fournie par le nombre de poux nécessaires pour obtenir 7 mm<sup>3</sup> 5 d'hémolymphe.

Mâles 2 heures après le repas : 102 en moyenne.

Mâles à jeun depuis 24 heures : 102 en moyenne.

Femelles 2 heures après le repas : 44 en moyenne.

Femelles après 24 heures de jeûne : 48 en moyenne.

On voit que les femelles contiennent en général deux fois plus d'hémolymphe que les mâles. Il faut noter que les très vieilles femelles contiennent trois fois plus de liquide que les femelles adultes encore jeunes (de moins de 30 jours).

Pour vérifier si les conditions de vie jouaient un rôle, il a été prélevé un lot de poux sur un sujet sain, ces poux eux-mêmes ont été contrôlés microscopiquement pour s'assurer qu'ils étaient indemnes de toute affection.

L'examen électrophorétique de leur hémolymphe a donné un tracé identique à ceux des poux d'élevage (fig. 5).

Nous avons tenu à établir une comparaison entre le tracé électrophorétique du sérum humain et celui de l'hémolymphe de poux (fig. 6). Nous avons également voulu savoir si dans l'hémolymphe de poux persistaient des éléments protéiniques du sérum humain (\*)

Un test pour la recherche des précipitines humaines a été pratiqué il nous a montré que l'hémolymphe contenait effectivement des précipitines humaines. L'hémolymphe de poux possède donc, du moins en partie, des constituants du sérum humain. Dans ce travail, nous n'avons pas recherché si l'ensemble des fractions isolées dans l'hémolymphe contenait des protéines du sérum humain ou si au contraire, telle ou telle fraction en était le support exclusif.

(\*) Nous remercions M. SANDOR, de l'Institut Pasteur de Paris, des conseils qu'il a bien voulu nous donner concernant ces différents points.

Nous remercions également M. OUDIN, de l'Institut Pasteur de Paris, de nous avoir permis de pratiquer dans son laboratoire les tests de précipitines.

### III. — HÉMOLYPHE DE POUX INFECTÉS AVEC « RICKETTSIA PROWAZECKI »

Des poux d'élevage ont été infectés avec trois souches de *Rickettsia prowazecki* (souches ASG, LI, CA de l'Institut Pasteur d'Ethiopie) et des examens électrophorétiques d'hémolymphes ont été pratiqués aux 4<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> jours de l'infection.

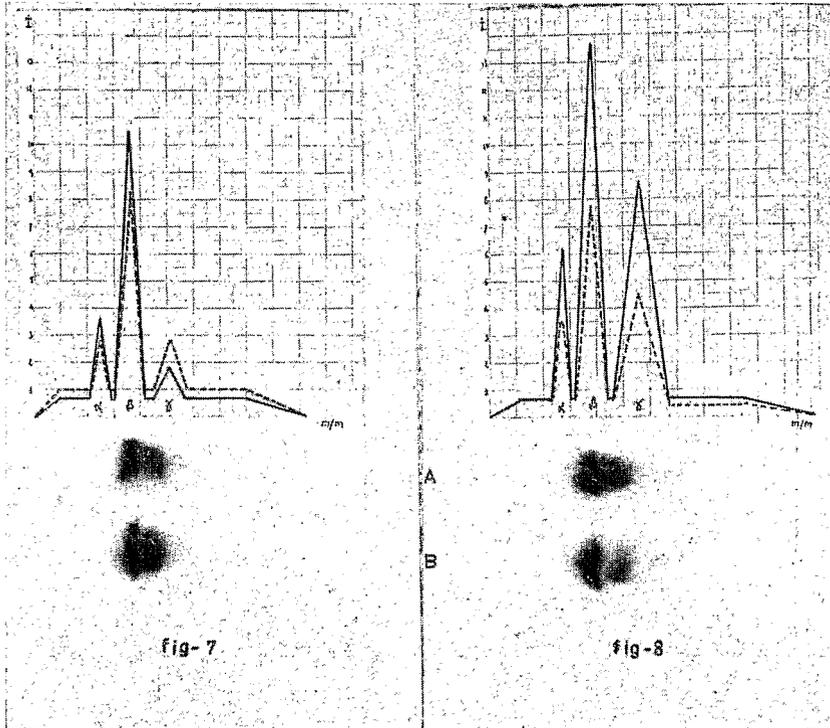


Fig. 7. — A. Poux normaux d'élevage, femelles ; B. Poux d'élevage infectés avec *Rickettsia prowazecki* (infection lente et légère). Sur le graphique les traits pleins représentent les poux normaux. Les traits pointillés, les poux infectés.

Fig. 8. — A. Poux normaux d'élevage, femelles ; B. Poux normaux d'élevage infectés avec *rickettsia prowazecki* (infection rapide et massive). Sur le graphique, les traits représentent les poux normaux ; les traits pointillés, les poux infectés.

#### I) Technique d'infection des poux.

L'inoculation des poux a été faite suivant la méthode de Weigl (intra-anales) avec une suspension de jaune d'œuf riche en rickettsies diluée à 10 0/0 en eau physiologique et centrifugée durant une minute à 3.500 tours-minute.

Dans deux cas seulement, le matériel infectant a été pris dans un lot de poux à forte teneur en rickettsies. Après désinfection, les poux

ont été broyés, dilués en eau physiologique et centrifugés. Le liquide surnageant a été inoculé selon la méthode de Weigl.

L'expérimentation a porté uniquement sur des poux femelles. Ils ont, en effet une quantité d'hémolymphe supérieure à celle des mâles.

L'infection a été de deux types :

— une infestation avec multiplication lente des rickettsies réalisée en nourrissant immédiatement les insectes après l'inoculation. Ainsi une grande partie des rickettsies est rejetée avec les fèces ;

— une infestation avec multiplication rapide et importante des rickettsies réalisée en gardant à jeun les insectes pendant 12 heures à la température du laboratoire ce qui permet une imprégnation massive de la muqueuse intestinale.

De plus, il est à préciser que tous les poux dont l'hémolymphe a été prélevée pour examen électrophorétique ont eu leur intestin contrôlé microscopiquement (coloration de Macchiavèllo) et leur richesse en rickettsies, notée.

## 2) Résultats.

Les examens électrophorétiques de l'hémolymphe des poux infectés ont été différents suivant l'évolution de l'affection rickettsienne.

Une infection lente dont le contrôle a montré 40 à 60 0/0 d'insectes fortement positifs s'est traduite par une légère diminution des fractions protéiniques  $\alpha$  et  $\beta$  et une augmentation marquée de la fraction  $\gamma$ .

Une infection rapide dont le contrôle a montré 95 à 99 0/0 d'insectes fortement positifs s'est traduite par une diminution globale des trois fractions protéiniques.

## CONCLUSION

a) Les tracés obtenus avec l'appareil de Machebœuf-Rebeyrotte permettent de mettre en évidence dans l'hémolymphe de poux trois fractions protéiniques chez la femelle et une seule fraction chez le mâle.

b) La constitution protéinique d'hémolymphe semble constante dans les conditions expérimentales décrites.

c) Il existe une nette différence entre l'hémolymphe des poux mâles et femelles.

d) L'infestation rickettsienne à *Rickettsia prowazeki* de poux femelles entraîne dans le cas d'une infection lente, une diminution des fractions protéiniques  $\alpha$  et  $\beta$  et une augmentation de la fraction  $\gamma$  ; dans le cas d'une infection rapide, une diminution globale de toutes les fractions protéiniques.

*Institut Pasteur d'Ethiopie.*