

J.-C. BARON

# **ETUDE PRELIMINAIRE DES ESTERASES DU SERUM DE SARDINELLA AURITA**

Document Scientifique provisoire  
N° 001 – Mars 1972

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE O.R.S.T.O.M. DE DAKAR



ETUDE PRELIMINAIRE DES ESTERASES DU SERUM  
DE SARDINELLA AURITA (C.V.)

par  
J-C BARON

RESUME

Les estérases du sérum de Sardinella aurita ont été étudiées par électrophorèse en gel d'amidon. Les plus importantes ont été classées en trois groupes d'après leurs mobilités électrophorétiques, leurs activités selon les substrats utilisés, leurs sensibilités à un inhibiteur organophosphoré, le dichlorvos et leur résistance à la chaleur. Pour des concentrations en dichlorvos de  $10^{-5}M$  et  $10^{-4}M$  seul le groupe Es III n'est pas inhibé. Pour une incubation de 30 mn à 56°C le groupe Es I est dénaturé. Le p. chloromercuribenzoate de sodium et l'ésérine n'ont aucune action sur ces trois groupes. Es I serait une acetyl-aliesterase thermolabile, Es II une propionyl-aliesterase et Es III une propionyl-ali-arylesterase. Les trois groupes présentent un polymorphisme mais seul Es II a été utilisé ici pour l'analyse génétique des populations. Ce groupe serait contrôlé par cinq allèles codominants à un même locus qui détermineraient 15 phénotypes dont 14 ont été trouvés. Un allèle très rare Es II<sup>F</sup> a été groupé avec l'allèle rare Es II<sup>E</sup>. Des différences de fréquence des gènes Es II<sup>B</sup> et Es II<sup>C</sup> ont été mises en évidence entre les S. aurita de juin et celles d'octobre mais elles ne sont pas significatives.

ABSTRACT

The esterase enzymes of the sera of Sardinella aurita were analysed by starch gel electrophoresis and classified into three principal sets by their electrophoretic mobility, their activity with different substrates, their susceptibility to an organophosphate inhibitor, the dichlorvos, and their thermostability. EsI is an acetylestearase, EsII a propionyl-esterase and EsIII a propionyl-ali-arylesterase not inhibited by dichlorvos  $10^{-4}M$ . None esterase is inhibited by p. chloromercuri benzoate or eserine. Polymorphism is noted in all three sets of esterases but only EsII is used for population genetic analysis. Es II is controlled by five codominant autosomal alleles giving 15 phenotypes of which 14 phenotypes have been detected. A very rare allele EsII<sup>F</sup> has been counted with the rare allele EsII<sup>E</sup>. No significant differences have been established between the gene frequencies of S. aurita fished during June and those fished during october.

S O M M A I R E

-----

1. INTRODUCTION

2. GENERALITES

2.1. Nature des estérases

2.1.1. Classification d'AUGUSTINSSON

2.1.2. Nature des estérases chez quelques poissons

2.2. Les estérases comme moyen d'étude des populations de poissons

3. MATERIEL ET TECHNIQUES

4. RESULTATS

4.1. Rôle de divers facteurs dans la révélation des estérases de Sardinella aurita.

4.1.1. Rôle du pH

4.1.2. Rôle du tampon

4.1.3. Rôle du substrat

4.1.4. Rôle du réactif coloré

4.1.5. Rôle de la température

4.1.6. Conclusion.

4.2. Action des inhibiteurs et de la température

4.2.1. Action du parachloromercuribenzoate de sodium

4.2.2. Action du dichlorvos

4.2.3. Action de l'ésérine

4.2.4. Action du carbaryl

4.2.5. Action de l'acétazolamide

4.2.6. Action de la température

4.3. Nature des estérases de Sardinella aurita

4.4. Etude génétique du groupe d'estérases Es II

4.5. Le groupe d'estérases Es II comme moyen d'étude des populations de S. aurita.

## INTRODUCTION

---

Deux espèces de sardinelles jouent un rôle économique important sur la côte Ouest d'Afrique : Sardinella aurita (C.V.) et Sardinella eba (C.V.). L'aire de répartition de S. aurita s'étend du parallèle 37° Nord au parallèle 34° Sud (POSTEL, 1959) et se compose de plusieurs stocks dont deux seraient présents dans les eaux sénégalaises.

BOELY (1971) distingue en effet deux populations.

1 - Une population Sénégalo-mauritanienne qui semble liée aux eaux canariennes froides et salées et qui migrerait entre le Rio de QRO et les BISSAJOS. Cette population arriverait aux alentours de la presqu'île du Cap-Vert vers Janvier et disparaîtrait lors de la transgression des eaux tropicales (température de surface > 24°C).

2 - Une population Guinéo-sénégalaise qui serait liée aux eaux chaudes et salées venant de Guinée et qui migrerait vers le Nord jusqu'à la presqu'île du Cap-Vert en septembre-octobre pour repartir vers le sud en novembre.

C'est dans le but d'aider à la différenciation de ces deux stocks probables qu'un polymorphisme biochimique déterminé génétiquement a été recherché dans le sérum de S. aurita. Après avoir étudié les transferrines (BARON, 1971), j'ai entrepris l'étude des estérases qui présentent un polymorphisme intéressant.

Il faut attirer l'attention sur quelques uns des problèmes qui se posent dans les études de polymorphisme biochimique appliquée à la différenciation de populations de poissons.

Tout d'abord un facteur essentiel à mon sens est la "puissance de traitement" des échantillons que possède le laboratoire chargé d'un tel programme. En effet, au cours d'une étude devant établir des caractères distinctifs entre diverses populations de poissons migrateurs comme les Sardinelles il est préférable que les échantillons prélevés soient groupés dans le temps et l'espace plutôt que d'essayer d'intégrer des résultats portant sur des échantillons pris au cours de plusieurs mois (voire plusieurs années) et en des lieux où les "types d'eau" (caractérisés par la température et la salinité) varient. D'autre part pour obtenir des résultats qui soient exploitables il faut analyser un nombre minimum d'individus et ce nombre augmente avec l'importance du polymorphisme constaté. Un chercheur isolé et sans aide technique obtiendra des résultats dont la marge de sécurité sera nécessairement faible. Pour fixer les idées citons l'étude des populations de Katsuwonus pelamis dirigée par FUJINO qui récolta avec la collaboration de plusieurs organismes 15.000 échantillons de sang, et

analysa 11.296 échantillons pour la <sup>4</sup> seule étude des estérases des individus du Pacifique.

Un second point est très important puisqu'il met en question la validité de toute étude de laboratoire avant même qu'elle ne soit commencée : il s'agit du prélèvement des échantillons. En effet il est primordial d'être sûr que les lots d'échantillons prélevés ne sont pas des mélanges des deux stocks présumés car la loi de Hardy-Weinberg qui est ensuite utilisée pour l'étude génétique ne permet pas toujours de distinguer si un lot donné est un mélange ou non de deux populations génétiquement distinctes. C'est le cas par exemple des deux populations de Katsuwonus pelamis du Pacifique séparées par FUJINO grâce à la fréquence des 3 gènes du système d'estérases EsJ : pour un mélange des deux populations les résultats obtenus avec la même hypothèse génétique ne sont pas infirmés par la loi de Hardy-Weinberg, les fréquences des gènes sont intermédiaires à celles des deux populations et le "Chi 2" n'est pas significatif. C'est donc d'après des hypothèses sérieuses établies au cours d'études classiques sur des populations supposées différentes qu'une étude de génétique des populations appliquée à la différentiation des stocks peut être entreprise.

Ma troisième remarque est liée à la puissance de traitement déjà évoquée et à trait à la diversité des systèmes possibles pouvant conclure à la présence de deux stocks. Pour les sardinelles nous avons déjà exploré les groupes érythrocytaires, les transferrines et l'étude des estérases est en cours mais il nous est impossible de savoir à l'avance quel serait le système clé qui permettrait de distinguer à coup sûr 2 stocks présumés de sardinelles. Pour les Katsuwonus pelamis de l'océan atlantique pas moins de 5 systèmes génétiques ont été étudiés, aucun n'ayant décelé une hétérogénéité dans la population atlantique.

Enfin signalons un caractère très important dans l'analyse électrophorétique des échantillons et qui est la reproductibilité. Il est indispensable que la technique d'analyse et l'appareillage soient décrits en détail et que des échantillons de référence concernant les divers phénotypes d'un même système soient conservés aussi longtemps que dure l'étude. Le nombre d'échantillons traités à la fois, c'est-à-dire soumis à des conditions d'analyse identiques, étant faible par rapport au nombre d'analyses à effectuer seule la reproductibilité dans les résultats permet de comparer des échantillons entre eux d'une analyse sur l'autre. Pour améliorer ces conditions j'ai mis au point un appareil permettant de traiter jusqu'à 40 échantillons à la fois dans de bonnes conditions de reproductibilité (BARON, sous presse).

Tableau 1 : Caractéristiques des 3 types d'estérases du plasma des vertébrés (d'après AUGUSTINSSON)

|  | CHOLINESTERASES<br>(Ch. E)    | ALIESTERASES<br>(Ali. E) | ARYLESTERASES<br>(Ar. E) |
|--|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <u>Esters hydrolysés</u>                                       |                               | Bu. > Ac.                | Ac. > Bu.                |
| esters aromatiques   | -                             | +                        | +++                      |
| esters aliphatiques  | +                             | +++                      | -                        |
| esters de la choline   | ++                            | -                        | -                        |
| <u>Inhibiteurs</u>   |                               |                          |                          |
| Composés organophosphorés                                      | +++                           | +++                      | -                        |
| Eserine  | +++                           | -                        | -                        |
| p. hydroxymercuribenzoate                                      | -                             | -                        | ++                       |
| E. D. T. A.  | -                             | -                        | +++                      |
| Mobilités électrophorétiques<br>(véronal pH = 8,4 $\mu$ = 0,1) | $\alpha$ - $\beta$ globulines | $\gamma$ globulines      | Albumine                 |

## GENERALITES

-----

Pour pouvoir effectuer une analyse génétique des populations de *S. aurita* par l'étude du polymorphisme des estérases sériques je me suis tout d'abord intéressé à la nature des estérases en supposant que des estérases de natures différentes étaient génétiquement déterminées par des gènes différents. C'est grâce à la combinaison de la méthode d'électrophorèse en gel d'amidon et des techniques histochimiques employées par HUNTER et MARKERT (1957) pour identifier différentes enzymes d'extraits de tissus, que l'étude du polymorphisme enzymatique s'est généralisée. Ces auteurs proposèrent d'appeler "zymogram" (en français zymogramme) les électrophorégrammes dans lesquels les enzymes sont localisées par des méthodes histochimiques. Deux ans plus tard les mêmes auteurs définissaient les estérases de 32 organes chez la souris (MARKER et HUNTER, 1959).

C'est donc en faisant appel aux propriétés physico-chimiques et biochimiques des molécules d'enzymes que j'ai commencé cette étude qui pour être plus précise devrait utiliser aussi les méthodes immunologiques. En effet un grand nombre d'enzymes conservent leurs activités spécifiques en présence de leurs anticorps et peuvent donc être révélés après immunoélectrophorèse, permettant de différencier "les enzymes isodynamiques, qui sont souvent des protéines différentes, des familles d'isoenzymes, qui sont des formes moléculaires multiples d'une même protéine" (KAMINSKI, 1969). Je me suis ensuite intéressé à l'utilisation des estérases comme moyen d'étude des populations de poissons.

### 2.1. NATURE DES ESTERASES

2.1.1. Classification d'AUGUSTINSSON : Les études comparatives effectuées par AUGUSTINSSON (1961) sur le plasma de divers vertébrés ont révélé l'existence de 3 types d'estérases :

- les arylestérases (Ar. E.)
- les aliestérases (Ali. E.)
- les cholinestérases (Ch. E.)

Ces estérases, séparées par électrophorèse et chromatographie sont étudiées selon leur sensibilité à divers substrats et leur sensibilité à certains inhibiteurs enzymatiques.

Les arylesterases hydrolysent divers esters aromatiques tels que les

Tableau 2 : Spécificités relatives des estérases du plasma de quelques vertébrés basées sur le radical acyl du substrat hydrolysé par chaque groupe. Ac. = acetyl., Bu. = butyryl, Pr. = propionyl (d'après AUGUSTINSSON).

|               | ARYLESTERASES |     | ALIESTERASES |         | CHOLINESTERASES |         |         |
|---------------|---------------|-----|--------------|---------|-----------------|---------|---------|
| Spécificités  | Ac. & Bu.     | Pr. | Ac. & Bu.    | Pr.     | Ac.             | Bu.     | Pr.     |
| MAMMIFERES    |               |     |              |         |                 |         |         |
| Homme         | X             |     |              |         |                 | X       |         |
| Cheval        | X             |     |              | X-----X |                 | X       |         |
| Porc          | X             |     |              |         |                 | X-----X |         |
| Mouton        | X             |     |              |         |                 | X       |         |
| Rat           | X             |     |              | X       |                 |         | X       |
| Cochon d'inde | X-----X       |     |              | X-----X |                 | X       |         |
| OISEAUX       |               |     |              |         |                 |         |         |
| Coq           |               |     |              |         |                 |         | X       |
| Canard        |               |     |              |         | X               |         | X       |
| REPTILES      |               |     |              |         |                 |         |         |
| Tortue        |               |     |              |         | X               |         | X       |
| BATRACIENS    |               |     |              |         |                 |         |         |
| Grenouille    |               |     |              |         | X               |         | X-----X |
| POISSONS      |               |     |              |         |                 |         |         |
| Morue         |               |     | X            |         |                 | X       |         |
| Anguille      |               |     |              | X-----X |                 |         |         |
| Brochet       |               |     |              |         | X               | X       |         |
| Requin        |               |     |              |         | X               | X       |         |
| CYCLOSTOMES   |               |     |              | X       |                 |         |         |

acétates d'α ou β naphtol mais non les esters aliphatiques ou les esters de la choline. Elles résistent à l'ésérine et à certains composés organophosphorés mais sont inhibées par le parachloromercuribenzoate ce qui laisse supposer que les groupes SH sont indispensables à l'activité des arylestérases.

Le calcium joue un rôle important dans l'activité et la stabilité des arylestérases. La plupart perdent leur activité après dialyse contre de l'eau distillée. Les ions sodium à haute concentration (eau physiologique) font diminuer l'activité de l'enzyme et les ions magnésium à une concentration supérieure à 1mM inhibent son activité en augmentant celles des cholinestérases et des aliestérases.

Les arylestérases ont été trouvées chez tous les mammifères étudiés par AUGUSTINSSON mais sont absentes chez les poissons et les autres vertébrés.

Les aliestérases hydrolysent les esters aliphatiques mais non les esters de la choline et ne sont généralement pas inhibées par l'ésérine  $10^{-5}M$  (exception faite pour les aliestérases de la grenouille et du brochet). Elles sont très sensibles aux composés organophosphorés. Les aliestérases sont les principales estérases des vertébrés inférieurs où elles sont représentées par des acetyl-, propionyl-, et butyrylestérases. Elles sont absentes chez l'homme et le singe et présentes à haute concentration dans le plasma des poissons où l'on trouve les types acetyl (morue), propionyl (brochet) et butyryl-propionyl (anguille). Elles représentent le seul type d'estérase détecté chez les cyclostomes.

Le plasma de l'anguille (Anguilla anguilla) présente une activité exceptionnelle (100 fois plus forte que chez l'homme) dans l'hydrolyse des esters aromatiques et des triglycérides, surtout pour les esters de l'acide butyrique. L'aliestérase principale (butyryl ou propionylestérase) est très sensible à certains composés organophosphorés alors que la deuxième aliestérase de mobilité électrophorétique plus faible et hydrolysant plus rapidement les acétates que les butyrate, est moins sensible aux composés organophosphorés et pourrait représenter un type intermédiaire entre une arylestérase et une alies-  
térase.

Les cholinestérases hydrolysent plus vite les esters de la choline que les autres esters et sont inhibées par l'ésérine et certains composés organophosphorés. Les cholinestérases des mammifères ont des spécificités variables : butyryl-, acetyl-, et propionylcholinestérases chez l'homme, le mouton et le rat respectivement, par exemple. La tortue possède une estérase très sensible à l'ésérine mais qui hydrolyse les esters de la choline à un taux plus bas que les autres esters, elle représenterait

Tableau 3 : Nature des estérases du sérum de quelques vertébrés  
 (d'après HOLMES et al., 1968). (f) faible concentration  
 (F) forte concentration.

|   | ARYLESTERASES<br>Ac. > Bu. | CARBOXYLÉSTERASES<br>Bu. > Ac. | CHOLINESTERASES |
|---|----------------------------|--------------------------------|-----------------|
| MAMMIFERES  |                            |                                |                 |
| Cheval  | X                          | X                              | X               |
| Porc  | X                          |                                | X               |
| Mouton  | X                          |                                | X               |
| Rat   | X                          | X                              | X               |
| Cochon d'inde                                     | X                          | X                              | X               |
| Opossum   |                            |                                |                 |
| ( <i>Hemibelideus lemuroïdes</i> )                | X                          | X                              | X               |
| OISEAUX   |                            |                                |                 |
| Canard<br>( <i>Cairina moschata</i> )             | X (f)                      | X                              | X               |
| REPTILES  |                            |                                |                 |
| Lezard<br>( <i>Chlamydosaurus kingii</i> )        | X (f)<br>Ac. < Bu.         | X (F)<br>Ac. << Bu.            |                 |
| BATRACIENS  |                            |                                |                 |
| Grenouille<br>( <i>Hyla aurea</i> )               |                            | X                              | X<br>Ac. < Bu.  |
| POISSONS  |                            |                                |                 |
| Poisson chat<br>( <i>Cnidoglanis megastomus</i> ) | X (f)                      | X (F)                          |                 |
| Sardinella aurita<br>(J.C. BARON)                 | Es III                     | Es I et Es II<br>(Ac. > bu)    | -               |
| Clupea harengus<br>(RIDGWAY et al.)               |                            | X<br>groupe 2 (F)              |                 |

dans la phylogénie un intermédiaire entre les aliestérases que l'on trouve en forte concentration dans le plasma des vertébrés inférieurs et les cholinestérases des vertébrés supérieurs. Les poissons étudiés possèdent une acetylcholinestérase en faible concentration.

A la suite d'expériences sur le lait et le colostrum AUGUSTINSSON pense qu'une enzyme peut avoir 2 mobilités électrophorétiques différentes selon la protéine à laquelle elle se combine et deux activités localisées dans deux fractions différentes ne sont pas nécessairement dues à 2 formes moléculaires distinctes de l'enzyme.

#### 2.1.2. Nature des estérases chez quelques poissons.

HOLMES et al (1968) dans leur étude comparative des estérases de quelques vertébrés retrouvent les données d'AUGUSTINSSON en ce qui concerne les mammifères mais ne sont pas d'accord avec lui quant à l'appartenance des arylestérases aux seuls mammifères. Ils signalent la présence chez le poisson-chat (et le lézard) où, si les carboxylestérases - dont une thermolabile - sont abondantes, la présence de cholinestérase n'a pas été détectée.

RIDGWAY et al (1970) étudient, principalement à partir d'extraits de tissus, les estérases de Clupea harengus. Ils séparent par électrophorèse en gel d'amidon 4 groupes d'estérases toutes inhibées par un composé organophosphoré, le dichlorvos  $10^{-4}M$ , aucune n'étant inhibée par l'ésérine  $10^{-4}M$  ni par l'E.D.T.A.  $10^{-4}M$  montrant ainsi que les estérases du hareng sont toutes des aliestérases. Chez Fundulus heteroclitus, HOLMES et WHITT (1970) mettent en évidence dans des extraits de tissus au moins 15 isoenzymes répartis en 6 à 8 groupes. Un seul de ces groupes est présent à tous les stades du développement alors que les autres apparaissent progressivement. Deux groupes sont résistants au diisopropylfluorophosphate (DFP)  $10^{-4}M$  : l'un hydrolysant mieux l' $\alpha$ Naphtylacétate que l' $\alpha$ Naphtylbutyrate est considéré comme étant une arylestérase, l'autre (Er-1) est aussi actif avec les 2 substrats. Quatre groupes sont inhibés par le DFP ( $10^{-4}M$ ) et non par l'ésérine  $10^{-4}M$  donc classés comme carboxylestérases (aliestérases). Ils sont composés de 2 groupes hydrolysant davantage l' $\alpha$ N-butyrat et de deux groupes hydrolysant de la même façon l' $\alpha$ N-butyrat et l' $\alpha$ N-acétate. Chez Protopterus annectens (poisson Dipneuste) DUPE et BOCKELEE-MORVAN mentionnent la présence d'une acetylcholinestérase peu importante dans le plasma et n'hydrolysant que le perchlorate d'acetylcholine (mais pas l'acetyl- $\beta$ -méthylcholine ni la butyrylcholine).

Rappelons enfin, à propos des composés organophosphorés, que KNOWLES (1968) a trouvé dans des extraits de foie de Lepomis macrochirus et d'Ictalurus punctatus des enzymes capables de dégrader

**Tableau 4 : Nature des estérases des tissus chez quelques poissons et crustacés.**

| ESTERASES   |                                      | ARYLESTERASES |    |    | ALIESTERASES<br>(CARBOXYLES-TERASES) |    |    | CHOLINESTERASES |    |    | AUTEURS                 |
|---|--------------------------------------|---------------|----|----|--------------------------------------|----|----|-----------------|----|----|-------------------------|
| POISSONS  |                                      | Ac            | Bu | Pr | Ac                                   | Bu | Pr | Ac              | Bu | Pr |                         |
| <i>Clupea harengus</i><br>(coeur et foie)                 | 1                                    |               |    |    | X                                    |    |    |                 |    |    | RIDGWAY et al<br>(1970) |
|   | 2                                    |               |    |    | X                                    | X  |    |                 |    |    |                         |
|   | 3                                    |               |    |    | X                                    |    |    |                 |    |    |                         |
|   | 4                                    |               |    |    | X                                    |    |    |                 |    |    |                         |
| <i>Fundulus heteroclitus</i><br>(foie, intestin, muscles) | Es 1-2                               |               |    |    | X---X                                |    |    |                 |    |    | HOLMES et al<br>(1970)  |
|   | Es 3-4                               |               |    |    | X                                    |    |    |                 |    |    |                         |
|   | Er 1                                 | X---X         |    |    |                                      |    |    |                 |    |    |                         |
|   | Er 2                                 | X             |    |    |                                      |    |    |                 |    |    |                         |
| <i>Cnidoglanis megastomus</i><br>(foie, intestin)         | 1                                    | X             |    |    |                                      |    |    |                 |    |    | HOLMES et al<br>(1970)  |
|   | 2                                    | X             |    |    |                                      |    |    |                 |    |    |                         |
|   | 3                                    |               |    |    | X                                    |    |    |                 |    |    |                         |
|   | 4                                    |               |    |    | X                                    |    |    |                 |    |    |                         |
|   | 5                                    | X             |    |    |                                      |    |    |                 |    |    |                         |
| CRUSTACES   |                                      |               |    |    | X---X---X                            |    |    |                 |    |    | BARLOW et al<br>(1970)  |
|   | <i>Homarus americanus</i><br>(coeur) | I             |    |    | X                                    |    |    |                 |    |    |                         |
|   |                                      | II            |    |    | X---X                                |    |    |                 |    |    |                         |
|   |                                      | III           |    |    | X---X---X                            |    |    |                 |    |    |                         |
|   |                                      | IV            |    |    | X---X---X                            |    |    |                 |    |    |                         |
|   | V                                    |               |    |    |                                      |    |    | X---X---X       |    |    |                         |
| <i>Panulirus argus</i><br>(syst. nerveux)                 | 1                                    |               |    |    |                                      |    |    | X               |    |    | MAYNARD<br>(1954)       |
|   | 2                                    |               |    |    |                                      |    |    | X               |    |    |                         |
|   | 3                                    |               |    |    |                                      |    |    | X               |    |    |                         |

le dichlorvos et le D.F.P.

Il est intéressant de mentionner ici que des travaux identiques sont effectués sur les crustacés ce qui nous fait toucher du doigt une certaine conception de continuité qui existe au niveau biochimique dans le règne animal alors même que le zoologiste tranche nettement entre invertébrés et vertébrés (tout en recherchant au niveau des procordés le passage des uns aux autres).

Chez Homarus americanus, BARLOW et RIDGWAY (1971) détectent 5 groupes d'estérases dans divers tissus. Les extraits de cœur contiennent 4 groupes de carboxylestérases non inhibées par l'ésérine  $10^{-5}M$  ni par le p-chloromercuribenzoate  $10^{-3}M$  et une cholinestérase. Les carboxylestérases du groupe I se distinguent de celles du groupe II en hydrolysant l'αNbutyrate et en étant inhibées par la Sevine  $10^{-3}M$ . Le groupe IV présente 5 bandes progressivement plus foncées vers l'anode faisant penser à une polymérisation de subunités.

MAYNARD (1964) met en évidence dans le tissu nerveux de Panulirus argus des cholinestérases différenciables par leur possibilité d'hydrolyser ou non les substrats acétyl ou butyryl et par leurs sensibilités différentes aux concentrations de DFP variant de  $10^{-5}M$  à  $10^{-6}M$ .

## 2.2. LES ESTERASES COMME MOYEN D'ETUDE DES POPULATIONS DE POISSONS.

Pour l'étude des populations de poissons on recherche des estérases présentant un polymorphisme déterminé génétiquement et donnant lieu à la formation d'isoenzymes. Les isoenzymes sont les formes multiples d'une enzyme donnée que l'on trouve dans un même organisme et ayant des activités catalytiques similaires (SHAW, 1960). Le terme est employé soit dans un sens large pour nommer toutes les bandes révélées sur un même zymogramme soit dans un sens restreint aux seules enzymes de structure similaire.

L'interprétation de l'intensité et du nombre des bandes est délicate, des variations pouvant être dues à des facteurs très différents et nullement génétiques. Ainsi l'intensité de certains types d'estérases du plasma de cheval varie après plusieurs décongélation successives (GAHNE, 1965) et au cours de l'électrophorèse sur acétate de cellulose la sérum albumine bovine se traduit par une seule bande en tampon phosphate, et par deux bandes en tampon phosphate-borate (CANN et GOAD). Ce dernier résultat prouvant qu'une seule macromolécule peut donner deux zones par interaction avec les ions borate sans traduire pour autant une hétérogénéité.

L'interprétation est rendue encore plus difficile lorsque les enzymes étudiées donnent lieu à la formation de subunités ou de polymères. CLEGG et Mc CABE (cités par FUJINO, 1970) décrivent un système d'aliestérases dans le foie de Katsuwonus pelamis composé de 4 subunités 1, 2, 3, 4 sous la dépendance de 4 allèles codominants et formant des dimères. Seuls les dimères 1-1, 1-2, 1-3, et 1-4 ont été trouvés sur les 121 individus étudiés.

Enfin, pour tester valablement des hypothèses concernant la génétique des populations il faut que le système utilisé comporte plus de phénotypes que d'allèles (COTTERMAN, 1954).

#### CLUPEIDAE

Clupea harengus : RIDGWAY et al (1970) décrivent parmi les aliestérases extraites du cœur et du foie un groupe (le groupe 1, le plus rapide) composé de 5 bandes sous la dépendance de 5 allèles codominants. Les différentes bandes sont alors présentes seules ou par paire, les 2 bandes les plus rares (la plus rapide et la plus lente) n'apparaissent qu'à l'état d'hétérozygote. Deux populations distinctes sont caractérisées par des fréquences différentes pour 2 des 5 allèles considérés. Le groupe 2, très actif dans le plasma comporte jusqu'à 7 bandes distinctes.

ODENSE et al (1969) trouvent 9 bandes dans des extraits de cœur et de muscle blanc. E<sub>1</sub> à E<sub>5</sub> seraient sous contrôle génétique. Le type le plus fréquemment rencontré possède 3 bandes (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> et E<sub>3</sub>) et les homozygotes sont rares. SIMONARSON et al (1969) décrivent 10 bandes dans des extraits de muscles et trouvent 56 phénotypes différents d'estérases sur 249 individus.

NAEVDAL (1969) étudie les estérases du sérum de 2191 individus par électrophorèse en gel mixte amidon-agar.

Il décrit deux groupes d'estérases qui seraient sous contrôle génétique l'un rapide donnant des bandes faibles (f<sub>1</sub> f<sub>2</sub> f<sub>3</sub>, m<sub>1</sub> m<sub>2</sub>, s) et l'autre moins rapide donnant des bandes fortes (F<sub>1</sub> F<sub>2</sub> M<sub>1</sub> S<sub>1</sub> S<sub>2</sub>)

Sprattus sprattus : HOWLETT et al (1969) à partir d'extraits de muscles de 53 individus étudiés par électrophorèse en gel d'amidon décrivent 5 bandes d'estérases (révélées par l' $\alpha$ -N-acétate et le fast-blue RR) dans une région de faible migration. Ces 5 bandes A, B, C, D, E seraient sous la dépendance de 5 gènes donnant 15 génotypes théoriques. Dans le premier lot de 33 individus où l'allèle Esm<sup>E</sup> est rare les génotypes EE, AE, CE et DE sont absents ; dans le deuxième lot de 20 individus l'allèle Esm<sup>A</sup> est absent et seulement 7 génotypes ont été trouvés. Les auteurs suggèrent que les 2 lots soient considérés comme issus de 2 stocks de sprats différents en se basant sur les différences observées dans les fréquences des gènes rapportées ci-dessous

| Esm <sup>A</sup> | Esm <sup>B</sup> | Esm <sup>C</sup> | Esm <sup>D</sup> | Esm <sup>E</sup> |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Lot 1 : 0,167    | 0,273            | 0,227            | 0,318            | 0,015            |
| Lot 2 : 0,000    | 0,175            | 0,175            | 0,375            | 0,275            |

Je pense personnellement qu'il est imprudent de tirer des conclusions avec un lot de 20 individus lorsque 15 phénotypes différents sont théoriquement possibles (l'absence de l'allèle Esm<sup>A</sup> n'est effectivement pas démontrée).

#### SALMONIDAE

Salmo salar : WILKINS (1969) décrit 7 phénotypes d'estérases non spécifiques à partir d'extraits de foie de 272 individus.

#### CATOSTOMIDAE

Catostomus clarkii : KOEHN (1969) montre que les fréquences des allèles responsables du polymorphisme des estérases du sérum varent avec la température. L'activité à 37° de l'estérase de l'homozygote déterminé par Es1<sup>a</sup> est 10 fois supérieure à celle de l'estérase de l'homozygote déterminé par Es1<sup>b</sup>. A zéro degré l'activité de l'estérase de l'homozygote déterminé par Es1<sup>b</sup> est 10 fois supérieure à celle de l'estérase déterminée par Es1<sup>a</sup>.

#### SCOMBRIDAE

Scomber scombrus : Une étude concertée entre trois laboratoires européens (Lowestoft, Ijmuiden et Bergen) a été effectuée par JAMIESON, de LIGNY et NAEVDAL sur les estérases du sérum de plus de 3 500 individus. JAMIESON trouve 7 allèles codominants à un seul locus déterminant 28 phénotypes théoriques dont 21 trouvés expérimentalement. Trois lots sont en équilibre génétique et représentent un seul stock. On constate dans les autres lots des exès d'homozygotes conduisant à penser qu'il s'agit de mélanges. De LIGNY groupe 2 à 2 les bandes difficiles à différencier sur les zymogrammes (e, f et r, s). Elle constate une grande divergence entre les phénotypes observés et ceux calculés chez les mâles de plus de 30 cm de la région sud de la mer du nord mais non chez les mâles de 26 à 30 cm. NAEVDAL constate aussi un excès d'homozygotes indiquant un mélange de stocks alors qu'il ne semble pas y avoir de stocks régionaux. Il attire l'attention sur une sélection possible contre les hétérozygotes (hétérozis négatif) et sur une erreur possible de lecture des bandes lorsque l'une d'entre elles, trop faible, passe inaperçue et fait conclure à un homozygote.

## THUNNIDAE :

La synthèse effectuée par FUJINO (1970) sur les études de biochimie génétique des thons rapporte en particulier les travaux de FUJINO et KANG et ceux de SPRAGUE sur les estérases de 5 espèces.

Thunnus alalunga possède un système d'estérases  $E_{AL}$  indépendant du sexe et déterminé par 3 allèles codominants donnant 3 phénotypes dont l'un se trouve uniquement dans l'Océan Atlantique, les deux autres étant présents à la fois dans l'Atlantique et le Pacifique. SERENE (1969) ayant étudié 165 individus du nord-est Atlantique compare ses résultats à ceux obtenus par FUJINO sur des individus de l'Atlantique sud et conclue à l'identité des deux populations.

Thunnus obesus possède un système d'estérases  $E_{BE}$  déterminé par 2 allèles codominants donnant 2 phénotypes. SPRAGUE ayant trouvé 3 bandes et 4 phénotypes propose l'action d'un troisième allèle et d'un gène récessif.

Thunnus albacarès : système  $E_{YF}$  déterminé par 2 allèles codominants.

Thunnus macoyii possède un système d'estérases décrit par SPRAGUE comme étant déterminé par 4 allèles codominants donnant 4 bandes et 5 phénotypes.

Katsuwonus pelamis : Cette espèce possède un système d'estérases  $E_{SJ}$  déterminé par 3 allèles codominants (3 bandes et 6 phénotypes) qui a permis de séparer les populations de l'ouest-Pacifique de celles du centre et de l'est-Pacifique. Trois bandes rares supplémentaires portent à 10 le nombre de phénotypes réellement observés.

Dans l'océan Atlantique, aucun des 5 systèmes génétiques employés sur les 215 individus de la mer des Caraïbes et les 105 individus du golfe de Guinée n'a pu démontrer une hétérogénéité de la population de K. pelamis ni permettre de la distinguer des populations est et centre-Pacifique. La distinction est par contre très nette avec la population ouest-Pacifique.

## PLEURONECTIDAE

Pleuronectes flesus : De LIGNY (1968) trouve que les types d'estérases sont déterminés génétiquement par des allèles codominants gouvernant 3 bandes chacun.

Comme cela a déjà été mentionné plus haut les estérases peuvent très bien servir comme moyen d'étude des populations de crustacés comme l'ont montré BARLOW et RIDGWAY (1971) chez Homarus americanus à partir d'extraits de cœur. Ces auteurs décrivent 5 groupes d'isoenzymes dont le plus rapide donne 5 phénotypes se conformant à la distribution de

HARDY-WEINBERG. Ce groupe est sous la dépendance de 3 allèles codominants à 1 seul locus autosomal : 2 allèles fréquents Es1<sup>A</sup> et Es1<sup>B</sup> déterminant 3 phénotypes fréquents Es1 A/A, A/B et B/B et un allèle rare Es1<sup>C</sup> déterminant 2 phénotypes supplémentaires Es1 A/C et B/C l'homozygote Es1 C/C n'ayant pas été détecté. Chaque allèle contrôle deux bandes d'isoenzymes qui se recouvrent chez l'hétérozygote ce qui a été démontré en mélangeant en quantités égales des extraits d'individus de phénotypes Es1 A/A et Es1 B/B le phénotype obtenu étant Es1 A/B.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'existence de 2 bandes contrôlées par un seul allèle. Elles peuvent résulter d'une interaction entre le tampon et la macromolécule considérée (CANN et GOAD, 1965, 1968), représenter deux isomères de conformation d'une seule espèce moléculaire ou résulter d'une dimérisation de l'isoenzyme qui se traduirait par une seconde bande. Enfin chaque isomère pourrait être une protéine complexe possédant au moins 2 subunités, chaque bande ayant en commun 1 subunité et différant des autres par au moins 1 subunité.

Tableau 5 : Caractéristiques du matériel étudié.

| Numéro du lot  | Lot 28  | Lot 29   | Lot 31  |
|--|---|--|---|
| Nombre d'individus   | 66  | 47   | 68  |
| Date et lieu de capture                                    | 22 Juin 1971<br>POOPENGUNE  | 12 Octobre 1971<br>PALMAREN  | 19 Octobre 1971<br>GOUAL, GAO   |
| Moyen de capture   | Sardinier "Sarène"  | Sardinier tcheni   | Sardinier "Fils de la Vierge"   |
| Observations   | Ces poissons sont issus d'un groupe de S. aurita dont 200 individus ont été marqués et relâchés | 34 individus le 1° coup (6 tonnes)<br>13 individus le 2° coup (7 tonnes) | 24 individus le 1° coup (1 tonne de mélange S. a et S. eba)<br>27 individus le 3° coup (9 tonnes).<br>15 individus le 4° coup (23 tonnes) |
| Caractéristiques des poissons d'où les lots ont été tirés. | $17,5 < Lfcm < 22,5$<br>mode = 19,5 cm  | $19 < Lfcm < 24$<br>mode = 21 cm   | $19,5 < Lfcm < 24$<br>mode = 22 cm  |
| Nombre de sérums traités                                   | 66  | 44   | 68  |
| Nombre d'analyses effectuées                               | 104   | 92   | 94  |

### 3 - MATERIEL ET TECHNIQUES

Les sardinelles étudiées ont été péchées au Sénégal en juin 1971 (Lot 28) et en Octobre 1971 (Lot 29 et lot 31). Le tableau 5 donne les caractéristiques du matériel étudié.

L'échantillonnage est effectué de la façon suivante. Dans une aire donnée on pêche au hasard plusieurs tonnes de sardinelles considérées comme représentatives de la population. Les quelques 50 Kg de poissons prélevés au cours de la mise en cale sont pris au hasard mais ensuite intervient un choix à 3 niveaux : 1° On choisit les poissons vivants. On peut considérer que l'état "mort" ou "vivant" du poisson est dû à des causes externes dont la principale est le temps passé hors de l'eau et ne traduit aucune corrélation interne. 2° On choisit des poissons d'une longueur (Lf) supérieure à 18 cm ce qui introduit délibérément une sélection entre individus adultes et non adultes pour satisfaire à une hypothèse de travail selon laquelle les caractères biochimiques étudiés par la suite ont atteint une certaine stabilité. 3° Les individus n'ayant pas donné suffisamment de sang (quelques gouttes) seront éliminés. La quantité de sang obtenue d'un individu dépend de son état de vivacité (BARON, 1970) et l'on est amené à conclure comme précédemment qu'elle est dûe à des causes externes dont on constate les effets au hasard.

La même opération est répétée plusieurs fois dans la journée et c'est l'ensemble des prélèvements effectués à quelques heures d'intervalle en un lieu donné qui constitue un lot (exemple le lot 31). Dans le meilleur des cas tous les individus sont issus d'un même banc (Lot 28).

Le sang est prélevé sans anticoagulant sur le poisson vivant après section en avant du bulbe cardiaque et gardé de 1 à 3 jours au frigidaire à environ + 6°. Le sérum exsudé est prélevé en deux fois, avant et après centrifugation à 3 000 tours/mn et conservé sans antisептиque à - 30° jusqu'au moment d'être utilisé. Les mêmes sérums traités avant et après 5 mois de congélation ne présentent pas d'altération des estérases étudiées.

L'analyse électrophorétique est effectuée en gel d'amidon hydrolisé Connaught concentré à 12%. Le système de tampon discontinu dérivé de celui de Ashton mais de force ionique plus faible est le suivant :

|                          |                      |           |
|--------------------------|----------------------|-----------|
| <u>solution 1 :</u>      | Hydroxyde de lithium | 5,244 g   |
| (pH = 8,5 $\mu$ = 0,325) | acide borique        | ~30,920 g |
|                          | eau distillée qspf   | 5 litres  |

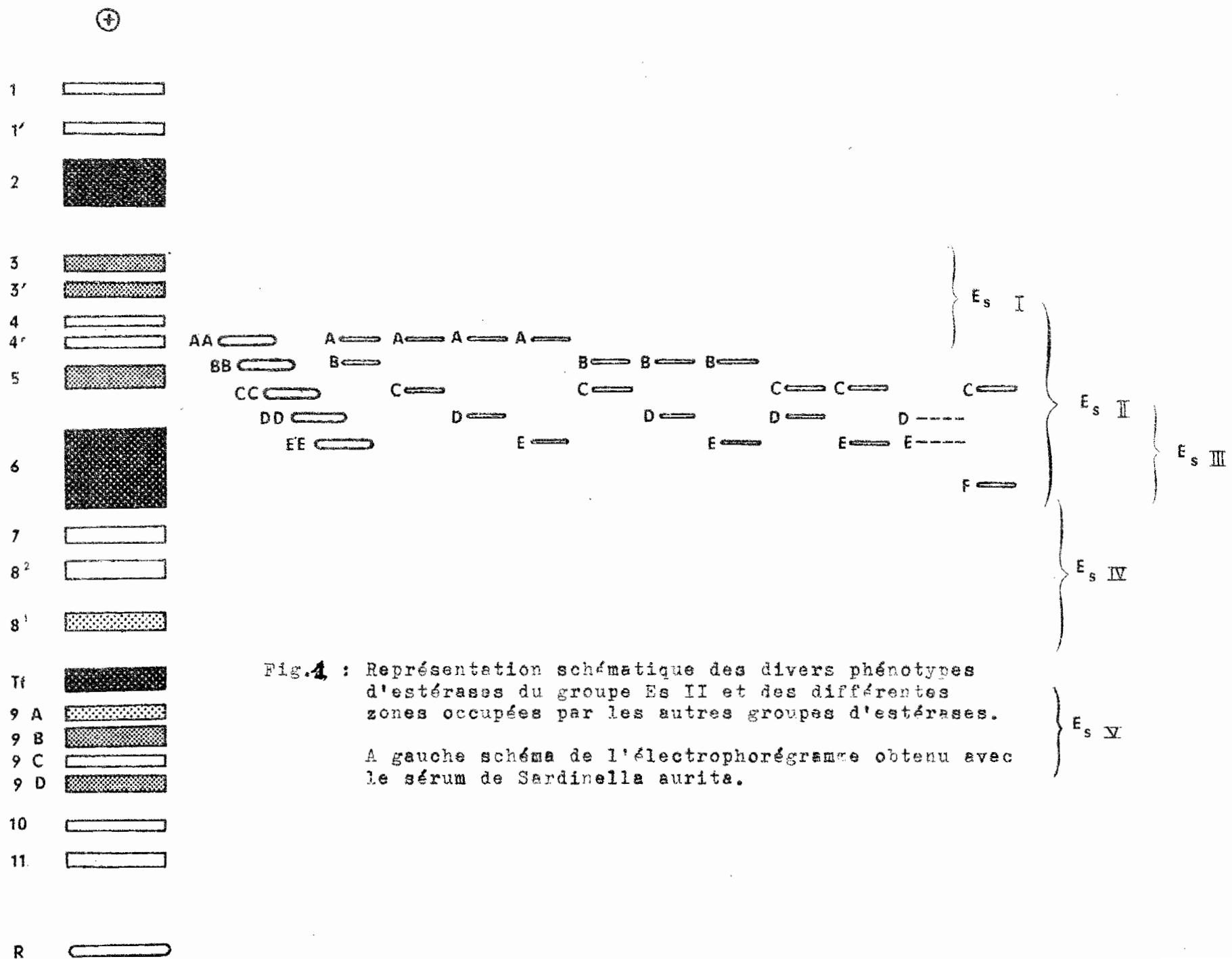
|                            |                                 |          |
|----------------------------|---------------------------------|----------|
| <u>solution 2 :</u>        | Acidé citrique                  | 3,2 g    |
| (pH = 8,3 - $\mu$ = 0,058) | Trishydroxymethyl- aminométhane | 12,1 g   |
|                            | eau distillée q.s.p.f           | 2 litres |

La solution 1 est utilisée dans les bacs à électrodes et renouvelée pendant toute l'électrophorèse par un goutte à goutte. Le tampon utilisé pour faire le gel est composé de 9 volumes de solution 2 pour 1 volume de solution 1. La migration est effectuée pendant 6h 30 à 4,5 volts par cm.

L'appareil utilisé, déjà décrit (BARON, sous presse), permet de faire migrer 30 sérum à la fois à partir de papiers Whatman de 10'x10 mm espacés de 5 mm. Mais il est possible d'inclure 40 échantillons sur des papiers de 9 x 9 mm espacés de 2 mm. Après l'électrophorèse les gels sont coupés transversalement et soumis aux révélations des estérases avec différents substrats et à l'action de divers agents inhibiteurs.

Après lavage et séchage les zymogrammes sont photographiés et les gels conservés dans un mélange de méthanol (2 litres), d'acide acétique (380 ml) et d'eau (2 litres).

Certains sérum sont analysés plusieurs fois, soit que leurs phénotypes aient besoin d'être confirmés soit que leurs phénotypes étant très nets ils servent d'échantillons repères dans les électrophorèses ultérieures.



#### 4 - RESULTATS

Des études antérieures sur le sérum des sardinelles nous avaient permis de localiser les estérases sur un électrophorégramme et de constater la possibilité d'un polymorphisme (BARON, à paraître). On peut en première approximation classer ces estérases d'après leurs mobilités électrophorétiques décroissantes en 3 groupes importants EsI, EsII et Es III (Fig. 1). De faibles traces d'estérases sont parfois présentes entre EsIII et la transferrine (Es IV) et entre la transferrine et le point de départ (Es V) mais peut être le substrat utilisé n'est-il pas le meilleur ( $\alpha$ -Naphtylacétate). Chez le protopètre seule l'utilisation de perchlorate d'acétylcholine a permis la mise en évidence d'une faible acétylcholinesterase dans le sérum (DUPE et al, 1968) et chez la langouste une bande fortement révélée avec l'acétylthiocholine comme substrat ne l'est plus du tout avec de l' $\alpha$ N-acétate, butyrate ou propionate (MAYNARD, 1964).

##### 4.1. ROLE DE DIVERS FACTEURS DANS LA REVELATION DES ESTERASES DE SARDINELLA AURITA

Au cours des résultats qui vont suivre j'emploierai les abréviations suivantes :

$\alpha$ Nac. :  $\alpha$ naphthyl-acétate

$\beta$ Nac. :  $\beta$  " "

$\alpha$ Nbu. :  $\alpha$ naphthyl-butyrate

$\alpha$ Npr. :  $\alpha$ naphthyl-propionate

$\beta$ N pr.:  $\beta$  " "

BB : fast blue BB salt

RR : fast blue RR salt

pCMB : parachloromercuribenzoate de sodium

et pour les couleurs : B = brun, Bb = brun-bleu, M = marron, P = pourpre, V = violet, Vb = vert bronze. L'intensité croissante des bandes observées est chiffrée de 1 à 4.

**4.1.1. Rôle du pH.** J'ai essayé à l'aide d'un tampon phosphate 0,4M une gamme de pH s'étendant de 6,55 à 7,75. Les révélations sont bonnes pour toute la gamme, cependant la couleur des bandes révélées avec de l' $\alpha$ Nac. comme substrat et du BB comme réactif coloré est uniforme à pH = 6,55 (marron-jaune) et à pH = 7,75 (brun). Pour un pH compris entre 7 et 7,5 certaines bandes sont brunes et les autres marron, ce qui présente un caractère distinctif supplémentaire intéressant. La valeur 7,5 pour le pH des solutions révélatrices d'estérases de S. aurita a donc été retenue, cette valeur étant proche du pH du sérum de ce poisson évalué à 7,7 (Blood Micro system-Radiometer). Pour Homarus americanus BARLOW et RIDGWAY (1971) obtiennent une activité estérasique maximum à pH = 6,55 pour une gamme de pH comprise entre 5 et 7,5.

Tableau 6 : Rôle de divers facteurs dans la révélation des estérases de *Sardinella aurita*.

| Tampon           | pH          | Substrat                     | réactif coloré | E S T E R A S E S                                   |
|------------------|-------------|------------------------------|----------------|---|
|                  |             |                              |                | Es I Es II Es III                                   |
| Phosphate 0,4 M  | 6,55 à 7,75 | $\alpha$ Nac.                | BB             | Toutes les estérases sont révélées (marron à brun). |
| "                | 7           | $\alpha$ Nac.                | RR             | M-4 M-4 B-2   |
| "                | 7,25        | $\beta$ Nac.                 | BB             | P-1 P-4 -   |
| "                | 7           | $\beta$ Nac.                 | RR             | P-1 P-4 -   |
| "                | 7,5         | $\alpha$ Nac. + $\beta$ Nac. | BB             | B-1 V-4 B-4   |
| "                | 7,5         | $\alpha$ Nac. + $\beta$ Nac. | BB + RR        | B-1 V-4 B-4   |
| Phosphate 0,04 M | 7,5         | $\alpha$ Nac.                | BB             | M-4 B-4 M-4   |
| "                | "           | $\beta$ Nac.                 | BB             | P-1 P-4 P-2   |
| "                | "           | $\alpha$ Nac. + $\beta$ Nac. | BB             | B-1 M-4 B-4   |
| Tris-Hcl 0,4 M   | 7,5         | $\alpha$ Nac + $\beta$ Nac.  | BB             | B-1 V-4 B-4   |
| Tris-Hcl 0,1 M   | 7           | $\alpha$ Nac                 | BB             | M-1 B-3 M-3   |
| "                | "           | $\beta$ Nac                  | BB             | P-1 P-4 V-2   |
| "                | "           | $\alpha$ Nac + $\beta$ Nac   | BB             | B-1 V-4 B-4   |
| "                | 6,75        | $\alpha$ Nac + $\beta$ Nac   | BB             | B-1 V-4 B-3   |
| Tris-Hcl 0,1 M   | 7,5         | $\alpha$ Nac                 | RR             | M-1 M-2 B-4   |
| "                | "           | $\alpha$ Nac.                | BB             | B-3 B-4 M-3   |
| "                | "           | $\beta$ Nac.                 | BB             | P-2 P-4 V-2   |
| "                | "           | $\alpha$ Nac + $\beta$ Nac.  | BB             | B-4 V-4 B-4   |
| "                | "           | $\alpha$ N- $\beta$ u.       | BB             | Vb-2 Vb-4 Vb-3                                      |
| "                | "           | $\alpha$ N-pr.               | BB             | Vb-2 Vb-4 Vb-2                                      |
| "                | "           | $\beta$ N-pr.                | BB             | P-2 P-4 -   |
| "                | "           | butyrylcholine iodide        | BB             | M-1 M-1 M-1   |
| "                | "           | Acetylcholine perchlorate    | BP             | tr. tr. tr.   |

4.1.2. Rôle du tampon : Deux tampons de nature et de molarités différentes ont été expérimentés : un tampon phosphate (0,4M et 0,04M) et un tampon Tris-Hcl (0,4M et 0,04M). Les résultats sont bons dans les 4 cas. Cependant lors de l'utilisation de  $\beta$ naphthyl-acétate avec le tampon phosphate 0,4M on observe une flocculation gênante. Comme les solutions inhibitrices sont utilisées avec du tampon Tris 0,1M et que les révélations sont aussi bonnes avec un tampon Tris 0,4M qu'avec un tampon Tris 0,04M j'ai choisi d'utiliser le tampon Tris-Hcl 0,1M de pH = 7,5.

4.1.3. Rôle du substrat : Pour les analyses de routine il fallait un substrat bon marché et révélant bien toutes les estérases. L' $\alpha$ Nac. colore toutes les estérases dans des tons bruns et marron l' $\alpha$ Nbu. et l' $\alpha$ Npr. les colorent uniformément en vert-bronze et sont très chers. Le  $\beta$ Nac et le  $\beta$ Npr. colorent les estérases en pourpre sauf Es III qui est faiblement révélée par le premier et pas du tout par le second. Le mélange des substrats  $\alpha$ Nac. et  $\beta$ Nac. permettant de colorer EsI et EsIII en brun alors que EsII devient violet et la différence de coloration étant plus nette qu'entre le marron et le brun obtenus avec l' $\alpha$ Nac. seul j'ai choisi d'utiliser le mélange  $\alpha$ Nac. +  $\beta$ Nac. à 1% dans l'acétone.

4.1.4. Rôle du réactif coloré : Le fast blue BB salt se dissout mieux que le fast blue RR salt et colore bien toutes les bandes. Le RR colore bien toutes les bandes, EsI et EsII en marron et EsIII en brun ce qui permet de distinguer les bandes rapides de EsIII au niveau de Es II. Le mélange BB + RR n'apportant pas de caractère distinctif supplémentaire il vaut mieux utiliser BB et RR séparément.

4.1.5. Rôle de la température : La température du laboratoire (20° à 24°) s'est révélée être la meilleure pour obtenir une révélation ni trop rapide ni trop lente. La coloration étant obtenue en 15 minutes (bandes faibles visibles, bandes fortes et rapprochées encore distinctes).

4.1.6. Conclusion : Les estérases de Sardinella aurita doivent être révélées en routine de la façon suivante :

|                             |                 |        |
|-----------------------------|-----------------|--------|
| <u>solution de substrat</u> | : $\alpha$ Nac. | 0,05 g |
|                             | : $\beta$ Nac.  | 0,05 g |
|                             | Acétone         | 10 ml  |

Tampon Tris-Hcl 0,1M pH = 7,5

Tris 1M 100 ml

Hcl 1M 75 ml

eau distillée qspf 1 litre

solution révélatrice (15 minutes à 22°)

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| - Tampon Tris-Hcl 0,1M pH = 7,5 | 200 ml |
| - solution de substrat          | 8 ml   |
| - BB (ou exceptionnellement RR) | 200 mg |

Remarques : -On peut utiliser pour l'étude de EsII une solution de contrôle contenant du  $\beta$ N propionate à 1% dans l'acétate au lieu du mélange  $\alpha$ Nac. +  $\beta$ Nac.

-Des doses différentes de substrats et de réactif coloré (et en particulier une diminution des concentrations) donnent de mauvais résultats.

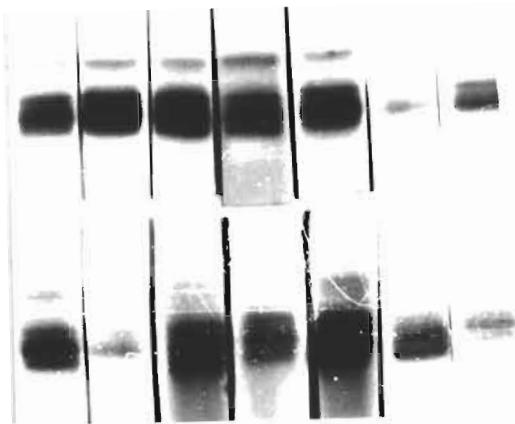


Fig. 1 - Rôle de divers facteurs dans la révélation des estérasés de *Sardinella aurita* avec un tampon phosphate 0,4M. De gauche à droite, en haut : pH = 6,55  $\alpha$ Nac BB 2- pH = 7  $\alpha$ Nac. BB 3- pH = 7,25  $\alpha$ Nac. BB 4- pH = 7,75  $\alpha$ Nac. BB 5- pH = 7  $\alpha$ Nac. RR 6- pH = 7,25  $\beta$ Nac. BB 7- pH=7  $\beta$ Nac RR. En bas: action du p-chloromercuribenzoate  $2 \cdot 10^{-2}$ M (p-CMB) et de l'acétazolamide  $10^{-4}$ M (Az) 1- p.CMB, pH = 7  $\alpha$ Nac. RR 2- Az pH = 7,75  $\alpha$ Nac. RR 3- Az pH = 7,75  $\beta$ Nac. BB 4- p. CMB pH = 7,75  $\alpha$ Nac. RR 5- p.CMB pH = 7,75  $\beta$ Nac. BB 6- p. CMB pH = 7,75  $\alpha$ Nac. BB 7- Az pH = 7  $\alpha$ Nac. BB.

Tableau 7 : Action de quelques inhibiteurs enzymatiques sur les 3 groupes d'estérases Es I, Es II et Es III du sérum de Sardinella aurita. (-=inhibition totale ; tr = traces d'activité enzymatique ; + pas d'inhibition).

| INHIBITEURS             |              | Es I | Es II | Es III | CONCLUSIONS   |
|-------------------------|--------------|------|-------|--------|---|
| Dichlorvos              | $10^{-6}M$   | tr   | tr    | +      |   |
|                         | $10^{-5}M$   | -    | -     | +      |   |
|                         | $10^{-4}M$   | -    | -     | tr     | Es III serait un type intermédiaire entre les Ali. E. et les Ar. E.             |
|                         | $10^{-3}M$   | -    | -     | -      |   |
|                         | $10^{-2}M$   | -    | -     | -      |   |
| p. CMB                  | $10^{-4}M$   | +    | +     | +      | Es I, Es II Es III ne sont pas des Arylestérases (en accord avec AUGUSTINSSON). |
|                         | $5.10^{-3}M$ | +    | +     | +      |   |
|                         | $2.10^{-2}M$ | +    | +     | +      |   |
|                         | $5.10^{-2}M$ | +    | +     | +      |   |
| Esérine<br>(sulfate)    | $10^{-4}M$   | +    | +     | +      |   |
|                         | $10^{-3}M$   | +    | +     | +      |   |
|                         | $10^{-2}M$   | +    | +     | +      |   |
| Esérine<br>(salicylate) | $10^{-4}M$   | +    | +     | +      | Es I, Es II Es III ne sont pas des cholinestérases.                             |
| Esérine                 | $10^{-4}M$   | +    | +     | +      |   |
| Acetazolamide           | $10^{-4}M$   | +    | +     | +      |   |
|                         | $10^{-3}M$   | +    | +     | +      |   |

Tableau 8 : Action de la température sur les 3 groupes d'estérases Es I, Es II et Es III du sérum de Sardinella aurita.

| Température | Temps | Es I | Es II | Es III |
|-------------|-------|------|-------|--------|
| 35°         | 30mn  | +    | +     | +      |
| 45°         | 15 mn | +    | +     | +      |
| 45°         | 30 mn | +    | +     | +      |
| 56°         | 15 mn | +    | +     | +      |
| 56°         | 30 mn | -    | +     | +      |
| 56°         | 45 mn | -    | +     | tr     |
| 62°         | 15 mn | -    | tr    | -      |
| 62°         | 30 mn | -    | tr    | -      |

#### 4.2. ACTION DES INHIBITEURS ET DE LA TEMPERATURE (tableaux 7 et 8).

Les inhibiteurs enzymatiques employés sont : le parachloromercuribenzoate de sodium, le dichlorvos, l'ésérine et l'acétazolamide à diverses concentrations dans du tampon Tris-HCl 0,1M de pH = 7,5. Une tranche de gel est mise à incuber 30 mn dans la solution inhibitrice à la température du laboratoire puis est révélée de façon classique.

##### 4.2.1. Action du parachloromercuribenzoate de sodium (p. CMB.)

Le p. CMB est un inhibiteur des arylestérases. Il inhibe les acétylestérases des globules rouges humains à une concentration de  $2 \cdot 10^{-2} M$  et active les butyrylestérases à une concentration pouvant descendre jusqu'à  $8 \cdot 10^{-5} M$ . Il inhibe toutes les estérases du homard à une concentration de  $10^{-2} M$  (BARLOW et RIDGWAY, 1971).

Pour les estérases de sardinelle quatre concentrations de  $10^{-4} M$  à  $5 \cdot 10^{-2} M$  ont été essayées et diverses solutions révélatrices ont été employées en faisant varier tampon, pH, substrats et réactifs colorés.

Aucune inhibition d'estérases n'a été constatée aux concentrations employées.

##### 4.2.2. Action du dichlorvos (2,2 dichlorovinyldiméthyl phosphate = vapona)

Le dichlorvos est un composé organophosphoré qui inhibe les aliestérases et les cholinestérases. Toutes les estérases du hareng sont inhibées pour une concentration de  $10^{-4} M$  et celles du homard pour une concentration de  $10^{-5} M$ .

Les estérases de sardinelles ont été soumises à des concentrations de dichlorvos de  $10^{-2} M$  à  $10^{-6} M$ . Pour des concentrations supérieures à  $10^{-4} M$  toutes les estérases sont inhibées. Pour une concentration de  $10^{-4} M$  le groupe d'estérases Es II est apparent et il devient très net pour une concentration de  $10^{-5} M$  alors que les estérases des groupes Es I et Es II sont inhibées. L'usage du dichlorvos  $10^{-5} M$  permet de distinguer les bandes rapides de Es III normalement "cachées" par celles de Es II.

##### 4.2.3. Action de l'ésérine (= physostigmine)

L'ésérine est un inhibiteur des cholinestérases. Elle inhibe l'estérase du groupe V des extraits de coeur du homard à une concentration de  $10^{-6} M$  (sulfate d'ésérine). J'ai utilisé l'ésérine sous forme de sulfate, de salicylate et nature à des concentrations

de  $10^{-4}M$  à  $10^{-2}M$ . Aucun des groupes d'estérases de S. aurita n'est inhibé.

4.2.4. Action du carbaryl (= sévine). Employé à une concentration de  $10^{-3}M$  il inhibe partiellement Es I et n'a aucune action sur Es II et Es III.

4.2.5. Action de l'acétazolamide : Cet inhibiteur est spécifique de l'anhydrase carbonique et n'inhibe aucune estérase du sérum de sardinelle.

4.2.6. Action de la température : Toujours dans le but de singulariser entre elles les nombreuses estérases présentes dans le sérum de S. aurita j'ai recherché si certaines n'étaient pas plus thermolabiles que d'autres comme c'est le cas pour les carboxylestérases du poisson chat (HOLMES et al, 1968). Juste avant d'effectuer l'électrophorèse, les sérums sont répartis en 2 tubes, l'un est mis à incuber au bain marie et l'autre reste à la température du laboratoire. Ils migrent côté à côté au cours de l'électrophorèse et les zymogrammes sont révélés classiquement. On constate une dénaturation totale de Es I pour une incubation de 30 minutes à 56° alors que Es II n'est pas dénaturée et que Es III est encore nette.

PLANCHE I

A - Zymogrammes des estérases de 24 sérumS de S. aurita du lot 28.

En haut : la première tranche du gel a été révélée en tampon Tris-HCl pH = 7,5 avec  $\alpha$ Nac. +  $\beta$ Nac. à 1% dans l'acétone comme substrat et fast blue BB comme coupleur coloré. Les 3 groupes Es I, Es II et Es III sont révélés et les phénotypes indiqués sont ceux de Es II.

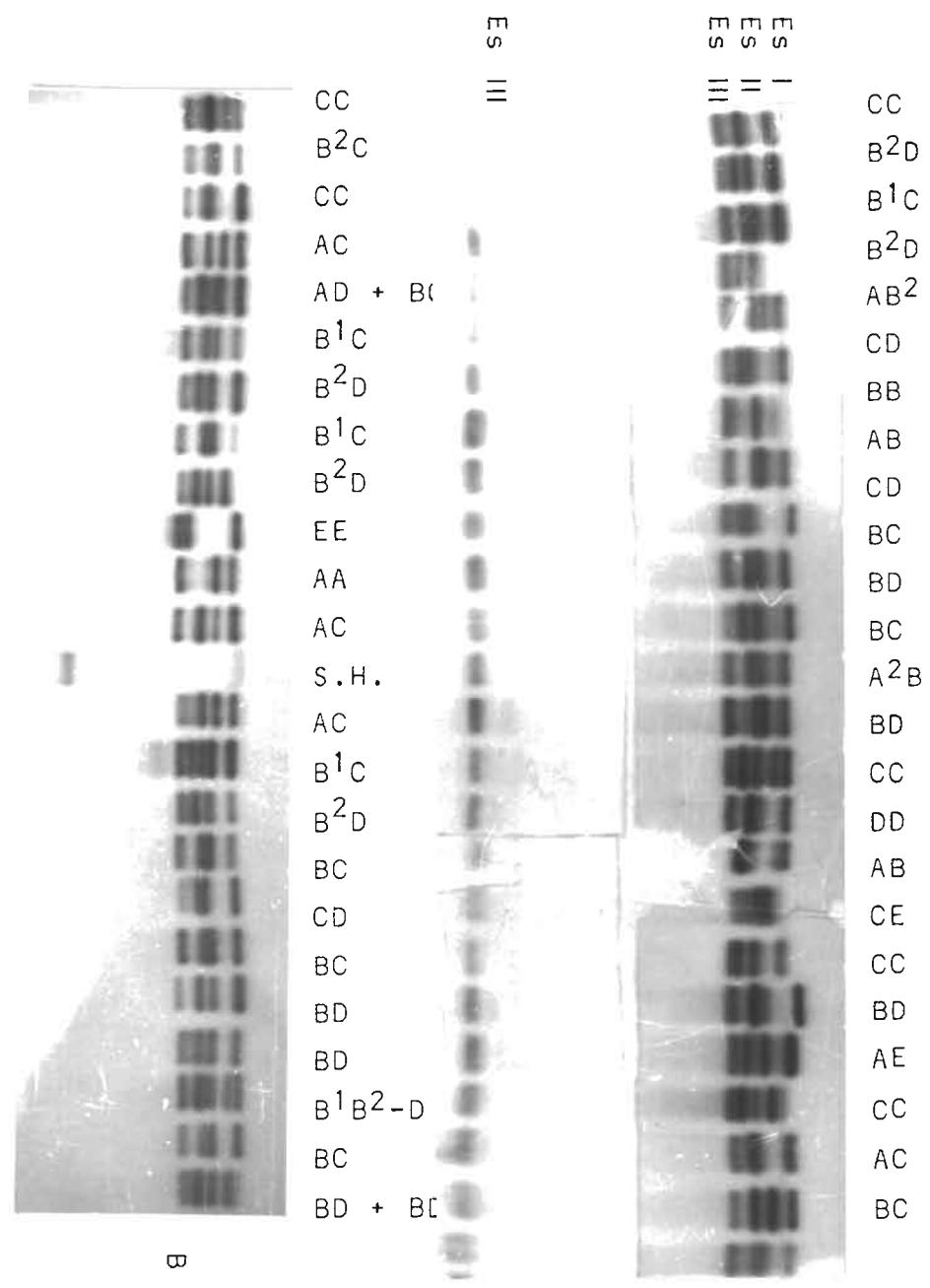
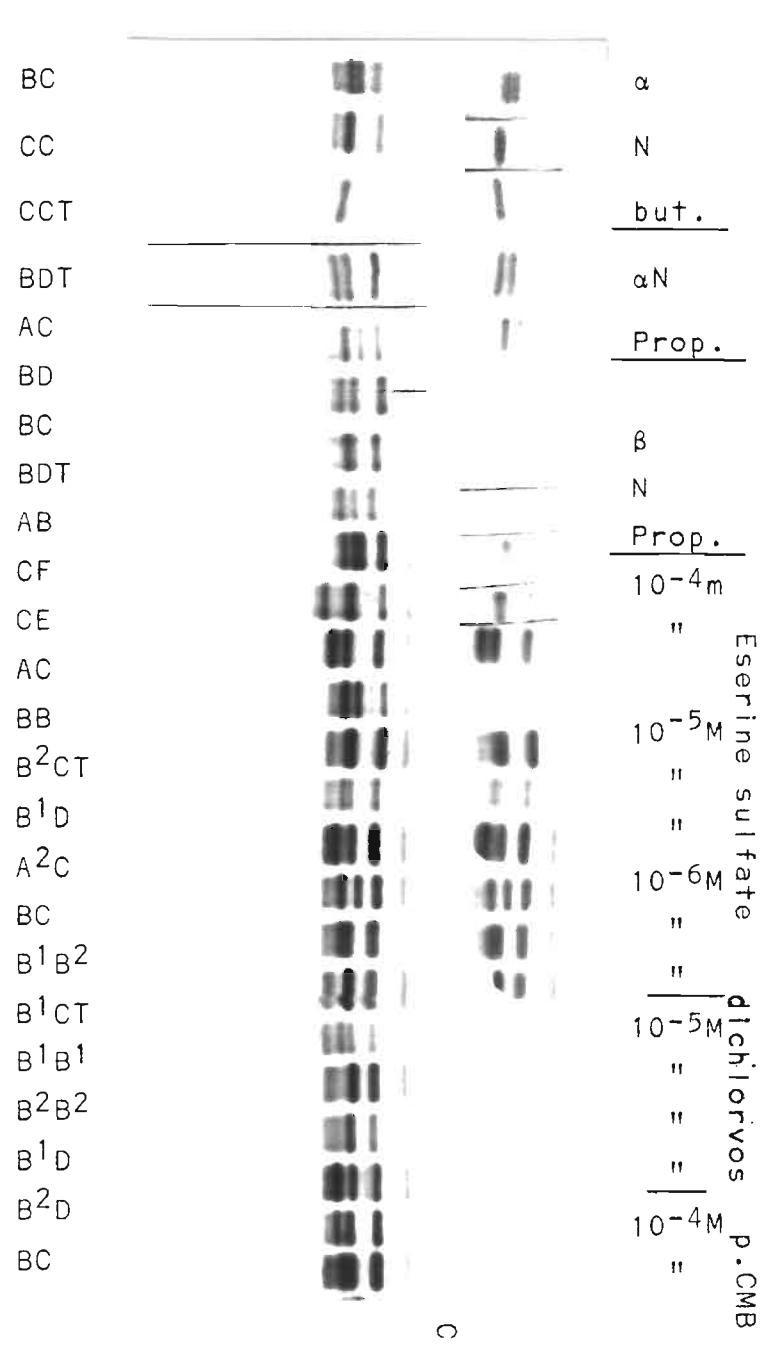
En bas : la deuxième tranche de gel a été mise à incuber dans une solution de dichlorvos  $10^{-5}M$  avant d'être révélée comme précédemment. Seul le groupe d'estérases Es III est visible.

B - Zymogrammes des estérases de 23 sérumS de S. aurita du lot 29 (SH = sérum humain JCB). On remarque le phénotype très rare EE (la seconde bande appartient à Es III), un phénotype à trois bandes B<sup>1</sup>B<sup>2</sup>-D et deux mélanges de sérumS : AD + BC donnant le phénotype ABCD et BD + BD donnant le phénotype BD.

C - Electrophorégrammes et zymogrammes superposés (révélation des estérases suivie d'une révélation générale des protéines au Noir Amido 10B) de 19 sérumS de S. aurita du lot 31 et de 5 témoins (T) du lot 29.

En haut : la deuxième tranche du gel a été coupée en 8 parties pour tester 3 substrats et 3 inhibiteurs enzymatiques. 1. L' $\alpha$ N-butyrate révèle bien Es II et moins bien Es I et Es III. 2. L' $\alpha$ N-propionate révèle très bien Es II et assez bien Es I et Es III. 3. Le  $\beta$ N-propionate révèle bien Es II moins bien Es I et pas du tout Es III. 4-5-6. Le sulfate d'ésérine n'inhibe pas du tout les 3 groupes d'estérases. 7. Le dichlorvos  $10^{-5}M$  inhibe Es I et Es II. 8. Le p.chloro-mercuribenzoate n'inhibe aucune estérase.

PLANCHE I



#### 4.3. NATURE DES ESTERASES DE SARDINELLA AURITA

4.3.1. Groupe d'estérases Es I : Ce groupe d'estérases a la plus grande mobilité électrophorétique relative et se révèle selon une ou 2 bandes (parfois zéro) d'intensité variable. Ces bandes occupent plusieurs positions, les plus lentes se trouvant au niveau des bandes rapides de Es II.

Les estérases de ce groupe sont inhibées par le dichlorvos  $10^{-5}M$  mais non par l'ésérine ou le p. CMB et sont dénaturées après une incubation de 30 mn à 56°. Ce sont des ALIESTERASES thermolabiles à rapprocher de la carboxylestérase thermolabile de faible poids moléculaire décrite chez le poisson-chat Cnidoglanis megastomus par HOLMES L'ordre de préférence des substrats pour les révélations de ces estérases étant l'  $\alpha$ N-acétate, l'  $\alpha$ N-propionate puis l'  $\alpha$ N-butyrate on peut les appeler ACETYL-ALIESTERASES thermolabiles.

Ce groupe Es I pourrait être comparé au groupe rapide d'estérases du sérum du hareng décrit par NAEVDAL (bandes f1, f2, f3, m1, m2, s). Bien que présentant un net polymorphisme il n'a pas encore été utilisé pour l'étude génétique des populations car la position des différentes bandes est délicate à déterminer avec précision.

#### 4.3.2. Groupe d'estérases Es II

Ce groupe d'estérases se distingue très bien des groupes voisins par la couleur violette due à la révélation utilisée (Tris 0,1M, pH = 7,5,  $\alpha$ Nac. +  $\beta$ Nac., BB), les autres estérases se révélant en brun. Il apparaît sous la forme d'une ou 2 bandes (exceptionnellement 3) d'intensité et de mobilité variables. Les bandes occupent 5 positions principales A,B,C,D,E (très rarement F) correspondant à des vitesses de migration relative décroissantes. Les bandes les moins rapides se trouvent au niveau du groupe Es III mais s'en distinguent en hydrolysant le  $\beta$ N-propionate (comme les isoenzymes lentes du groupe I chez Homarus americanus se distinguent du groupe II en hydrolysant l'  $\alpha$ N-butyrate).

Les estérases de ce groupe sont inhibées par le dichlorvos  $10^{-5}M$  mais non par l'ésérine ou le p.CMB et ne sont pas dénaturées par une incubation de 30 mn à 56°. Ce sont des ALIESTERASES thermostables à rapprocher des carboxylestérases thermostables que l'on trouve en forte concentration dans le sérum de quelques mammifères et du canard Cairina moschata (HOLMES et al, 1968). L'ordre de préférence des substrats pour les révélations de ces estérases étant l' $\alpha$ N-propionate,  $\alpha$ N-butyrate,  $\alpha$ Nacétate puis le  $\beta$ N-propionate on peut les appeler

PROPIONYL-ALIESTERASES thermostables. Ce groupe Es II pourrait être comparé au groupe lent d'estérases du sérum du hareng décrit par NAEVDAL (bandes F1, F2, M, S1, S2). Le polymorphisme très net de ce groupe ainsi que la possibilité de l'isoler de ses voisins en éliminant Es I par la chaleur et Es III par l'utilisation de  $\beta$ N-propionate comme substrat l'a fait choisir en priorité pour une étude de génétique des populations. On verra plus loin que ce groupe est probablement déterminé génétiquement par 5 ou 6 gènes allélomorphes à un même locus.

L'ensemble des deux groupes Es I et Es II est comparable aux aliesterases du groupe 2 décrit par RIDGWAY et al dans le plasma du hareng et qui comporte jusqu'à 7 bandes.

#### 4.3.3. Groupe d'estérases Es III

Ce groupe d'estérases a une mobilité électrophorétique plus faible que les deux autres. Il se révèle selon plusieurs bandes : une principale toujours très visible et lente et plusieurs autres bandes de moins en moins visibles vers l'anode et faisant fortement penser à la présence de sous unités migrant au niveau de Es II. Ce groupe d'estérases n'est pas inhibé par le dichlorvos  $10^{-5}M$  ni par l'ésérine mais ne l'est pas non plus par le p.CMB. Je le considère donc comme étant un type intermédiaire entre les aliesterases et les arylestérases ou ALI-ARYLESTERASE. Il se distingue d'ailleurs des deux aliesterases précédentes par d'autres caractères : il est sensible à la forme  $\alpha$  ou  $\beta$  du substrat se révélant moins bien avec  $\beta$ Nac. qu'avec  $\alpha$ Nac. et pas du tout avec  $\beta$ Npr., alors qu'avec  $\alpha$ Npr. il se révèle très bien. Il est beaucoup moins thermolabile que Es I et ne se colore pas en violet comme Es II. L'ordre de préférence des substrats pour la révélation de ce groupe est :  $\alpha$ N-propionate,  $\alpha$ N-acétate et  $\alpha$ N-butyrate, on peut donc appeler ces estérases PROPIONYL-ALI-ARYLESTERASES. Ce groupe d'estérases est à rapprocher de l'aliesterase lente du plasma de l'anguille, de Erl décrit chez Fundulus heteroclitus (où l'auteur n'a pas utilisé le p.CMB) et de l'arylestérase Ar II du plasma des mammifères qui hydrolyse les composés organophosphorés.

#### 4.3.4. Groupes d'estérases Es IV et Es V

De faibles bandes d'estérases apparaissent parfois sur les zymogrammes et une révélation durant toute une nuit ne les révèle pas davantage. Celles comprises entre le groupe Es III et la Transferrine constituent le groupe IV et celles comprises entre la Transferrine et le réservoir constituent le groupe V.

L'emploi de butyrylcholine iodide et d'acetylcholine perchlorate comme substrats n'a pas permis de mieux révéler ces 2 groupes

qui ne sont donc pas constitués de pseudocholinestérases.  
Les groupes Es I, Es II, et Es III hydrolysent faiblement le butyryl-choline iodide et très peu l'acétylcholine perchlorate.

PLANCHE II

A - Zymogramme des estérases de 16 sérums du Lot 31 et de 8 sérums témoins (T.) On remarque l'homozygote rare EE et la bande rare F de l'hétérozygote CF ainsi qu'un phénotype à 3 bandes B<sup>1</sup>B<sup>2</sup>-D. L'incubation d'un sérum (AB) à 56°C pendant 30 mn entraîne la disparition de Es I.

B - En haut :

Zymogramme des estérases de 16 sérums du Lot 31 et de 8 sérums témoins révélés avec  $\alpha$ Nac +  $\beta$ Nac. On remarque les 2 positions possibles A<sup>1</sup> et A<sup>2</sup> de la bande A et l'action de la température sur Es I. Une incubation de 15 mn à 56° n'est pas suffisante pour détruire Es I.

En bas :

Zymogramme des estérases des 19 premiers sérums précédents révélés avec du  $\beta$ N-propionate comme substrat. Seul Es II est alors bien révélé.

C - Zymogramme des estérases de 20 sérums du Lot 31 et de 4 témoins. Es II résiste à une incubation de 45 mn à 56° et de 15 mn à 62° alors que Es III est dénaturé. On observe fréquemment une troisième bande au niveau de C ou D.

## PLANCHE I

|           |                  |                                  |                               |                               |
|-----------|------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| supl. D   | BE               | A <sup>2</sup>                   | A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> | BCT                           |
|           | BC               | A <sup>1</sup>                   | A <sup>1</sup> D              | BDT                           |
| supl. C   | DD               | A <sup>2</sup>                   | A <sup>2</sup> B              | CF                            |
|           | BD               | A <sup>1</sup>                   | A <sup>1</sup> D              | EET                           |
| supl. D   | AB               | A <sup>2</sup>                   | A <sup>2</sup> C              | BDT                           |
|           | BB               | B=B <sup>1</sup> +B <sup>2</sup> | B <sup>1</sup> BT             | BB                            |
| supl. D   | AB               | F rare                           | CF                            | AB                            |
| supl. D   | BB               |                                  | DD                            | BD                            |
|           | BC               |                                  | B <sup>2</sup> C              | ACT                           |
|           | BC               |                                  | DD                            | AB                            |
|           | BD               |                                  | BDT                           | idem                          |
| 30 mn 62° | AC               |                                  | B <sup>1</sup> C              | A <sup>1</sup> D              |
| 15 mn 62° | DD               |                                  | A <sup>1</sup> C              | BDT                           |
| Témoin    | idem             |                                  | B <sup>1</sup> D              | A <sup>2</sup> C              |
|           | DD               | 15 mn 56°                        | BB                            | A <sup>1</sup> CT             |
|           | BC               | Témoin                           | idem                          | BB                            |
|           | ACT              |                                  | A <sup>1</sup> CT             | CC                            |
| Témoin    | CD               | Témoin                           | BD                            | A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> |
| 30 mn 56° | idem             | 30 mn 45°                        | idem                          | A <sup>1</sup> C              |
| 45 mn 56° | idem             | Témoin                           | A <sup>1</sup> D              | BB                            |
|           | BC               | 15 mn 45°                        | idem                          | CD                            |
|           | BC               |                                  | CDT                           | CD                            |
|           | B <sup>1</sup> C | Témoin                           | A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> | BD                            |
|           | B <sup>2</sup> D | 30 mn 35°                        | idem                          | CDT                           |

C

B

A

#### 4.4. - ETUDE GENETIQUE DU GROUPE D'ESTÉRASES Es II

Posons comme principe que les deux stocks présumés de sardinelles que nous essayons de définir représentent chacun une population où n'importe lequel des individus peut s'accoupler à n'importe quel autre sans choix et sans limitation de déplacement et qu'il n'y a ni mutation, ni sélection au sein de cette population. Dans ce cas les proportions à l'origine de différents gènes déterminant les estérases se maintiennent de génération en génération selon la loi de HARDY-WEINBERG.

Supposons de plus que le système d'estérases Es II mis en évidence par électrophorèse dépende de 5 gènes allélomorphes codominants A, B, C, D, E à un seul locus. De façon générale, le nombre de combinaisons obtenues avec  $n$  allèles pris deux par deux est égal à  $n + (n-1) + (n-2) + \dots + 1 = n \frac{(n+1)}{2}$  et dans ce cas particulier il existe  $5 \frac{(5+1)}{2} = 15$  génotypes possibles. Les fréquences des gènes étant  $p, q, r^2, s, t$ , les fréquences théoriques de ces 15 génotypes sont les suivantes :

|    |       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| AA | $p^2$ | AB 2 | $pq$ | BC 2 | $qr$ | CD 2 | $rs$ | DE 2 | $st$ |
| BB | $q^2$ | AC 2 | $pr$ | BD 2 | $qs$ | CE 2 | $rt$ |      |      |
| CC | $r^2$ | AD 2 | $ps$ | BE 2 | $qt$ |      |      |      |      |
| DD | $s^2$ | AE 2 | $pt$ |      |      |      |      |      |      |
| EE | $t^2$ |      |      |      |      |      |      |      |      |

Analysons le système d'estérases Es II du lot 28 d'après les gènes (tableau 9) et les génotypes (ou phénotypes) observés (tableau 10). Les fréquences des gènes observés permettent de calculer les effectifs théoriques définis précédemment d'après la loi de distribution de HARDY-WEINBERG. La distribution de fréquence observée pour les phénotypes du système d'estérases Es II du lot 28 diffère de celle calculée à partir de notre hypothèse génétique. Pour savoir si cette hypothèse de travail est valable, il faut rechercher si l'écart constaté entre les deux distributions peut-être imputé à l'échantillonnage ou non. Pour caractériser la divergence entre les effectifs observés (obs.) et calculés (cal.) de chaque phénotype on

calcule l'écart

Tableau 9 : Fréquences des gènes observés dans les lots 28, 29 et 31. L'allèle rare Es II<sup>F</sup> du lot 31 étant groupé avec l'allèle rare Es II<sup>E</sup>.

| Nature des gènes   | Lot 28    |           | Lot 29    |           | Lot 31    |           |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                    | effectifs | fréquence | effectifs | fréquence | effectifs | fréquence |
| Es II <sup>A</sup> | 17        | 0,129     | 9         | 0,112     | 20        | 0,147     |
| Es II <sup>B</sup> | 34        | 0,257     | 25        | 0,312     | 49        | 0,360     |
| Es II <sup>C</sup> | 45        | 0,340     | 27        | 0,337     | 34        | 0,250     |
| Es II <sup>D</sup> | 33        | 0,250     | 17        | 0,212     | 30        | 0,220     |
| Es II <sup>E</sup> | 3         | 0,022     | 2         | 0,025     | 3         | 0,022     |
| TOTAUX             | 132       | 0,998     | 80        | 0,998     | 136       | 0,999     |

Tableau 10 : Distribution des divers phénotypes dans les lots 28, 29 et 31 et calcul du  $\chi^2$ . L'homozygote EE du lot 29 (\*) n'est pas compté dans le calcul du  $\chi^2$ . L'allèle rare Es II<sup>F</sup> étant groupé avec Es II<sup>E</sup>, le phénotype CF du lot 31 est compté avec CE.

| Es II       | Effectifs du lot 28 |          |                           | Effectifs du lot 29 |          |                           | Effectifs du lot 31 |          |                           |
|-------------|---------------------|----------|---------------------------|---------------------|----------|---------------------------|---------------------|----------|---------------------------|
| Phéno-types | obs.                | calculés | $\frac{(obs-cal)^2}{cal}$ | obs.                | calculés | $\frac{(obs-cal)^2}{cal}$ | obs                 | calculés | $\frac{(obs-cal)^2}{cal}$ |
| AA          | 1                   | 1,09     | 0,01                      | 1                   | 0,50     | 0,50                      | 3                   | 1,47     | 1,59                      |
| BB          | 4                   | 4,35     | 0,03                      | 2                   | 3,90     | 0,93                      | 11                  | 8,81     | 0,54                      |
| CC          | 10                  | 7,63     | 0,73                      | 6                   | 4,90     | 0,25                      | 2                   | 4,25     | 1,19                      |
| DD          | 4                   | 4,12     | 0,02                      | 1                   | 1,60     | 0,22                      | 4                   | 3,29     | 0,15                      |
| EE          | 0                   | 0,03     | 0,03                      | 1*                  | 0,03     | 38,02*                    | 0                   | 0,03     | 0,03                      |
| AB          | 8                   | 4,34     | 3,09                      | 2                   | 2,81     | 0,23                      | 4                   | 7,20     | 1,42                      |
| AC          | 4                   | 5,74     | 0,53                      | 4                   | 3,15     | 0,23                      | 7                   | 5,00     | 0,80                      |
| AD          | 2                   | 4,24     | 1,18                      | 1                   | 1,80     | 0,36                      | 3                   | 4,40     | 0,44                      |
| AE          | 1                   | 0,38     | 1,01                      | 0                   | 0,22     | 0,22                      | 0                   | 0,44     | 0,44                      |
| BC          | 7                   | 11,53    | 1,78                      | 9                   | 8,75     | 0,01                      | 12                  | 12,24    | 0,47                      |
| BD          | 11                  | 8,48     | 0,75                      | 10                  | 5,00     | 5,00                      | 10                  | 10,77    | 0,55                      |
| BE          | 0                   | 0,77     | 0,77                      | 0                   | 0,62     | 0,62                      | 1                   | 1,08     | 0,01                      |
| CD          | 12                  | 11,22    | 0,05                      | 3                   | 5,60     | 1,21                      | 9                   | 7,48     | 0,31                      |
| CE          | 2                   | 1,01     | 0,97                      | 0                   | 0,70     | 0,70                      | 2                   | 0,75     | 2,08                      |
| DE          | 0                   | 0,74     | 0,74                      | 0                   | 0,40     | 0,40                      | 0                   | 0,66     | 0,66                      |
| TOTAUX      | 66                  | 65,67    | $\chi^2 = 11,66$          | 40                  | 39,98    | $\chi^2 = 10,87$          | 68                  | 67,88    | $\chi^2 = 10,67$          |

quadratique (indépendant du signe) que l'on rapporte à l'effectif théorique ce qui donne l'écart quadratique relatif (obs.-cal.)<sup>2</sup>. La divergence entre les deux distributions de phénotypes <sup>cal</sup> est alors caractérisée par la somme de tous les écarts quadratiques relatifs que l'on appelle  $\chi^2$ . Selon le nombre  $v$  de degrés de liberté correspondant au nombre de différences indépendantes qui entrent dans le calcul du  $\chi^2$ , PEARSON a établi des tables de la distribution du  $\chi^2$  correspondant aux coefficients de sécurité de 95 et 99 % et toute hypothèse testée par le  $\chi^2$  et ayant un  $\chi^2$  supérieur à la valeur limite donnée par les tables doit être considérée comme fausse. Dans le cas présent le  $\chi^2$  trouvé permet de considérer notre hypothèse de travail comme plausible à savoir que le groupe d'isoenzymes Es II du lot 28 mis en évidence par électrophorèse est contrôlé génétiquement par 5 allèles codominants à un seul locus dans le lot étudié, prélevé dans une population répondant au principe énoncé plus haut.

Les différentes bandes mises en évidence par électrophorèse et correspondant au système d'estérase Es II se révèlent avec des intensités variables qui traduisent très probablement un caractère quantitatif. Les bandes des homozygotes sont généralement plus larges et leur coloration est plus intense que celles des hétérozygotes. Ce caractère quantitatif pourrait traduire des activités différentes selon les isoenzymes envisagées et mériterait d'être étudié par la suite.

La même analyse a été effectuée pour le lot 29 et là encore l'hypothèse génétique avancée n'a pas été infirmée. Pourtant il faut signaler que sur les 40 individus étudiés l'un a le phénotype homozygote EE qui doit être considéré comme très rare puisque la fréquence du gène Es II<sup>E</sup> pour ce lot est de 0,025. L'analyse électrophorétique a été répétée plusieurs fois et chaque fois une seule bande E d'intensité moyenne a été détectée. Peut-être s'agit-il d'un hétérozygote EX (X = A ou B ou C ou Q) dont la deuxième bande serait trop faible pour être visible. Pour tenir aux conditions d'expérience, il faut accepter cet homozygote EE mais le rejeter d'une distribution de fréquence des phénotypes portant sur 40 individus seulement en considération de sa très faible probabilité d'apparition sous la dépendance d'un gène dont la fréquence est de 0,025. Ceci nous est d'ailleurs confirmé par le fait que sur 104 individus (lot 28 + lot 31) ayant une fréquence du gène Es II<sup>E</sup> identique le phénotype EE n'a pas été trouvé.

Pour le lot 31 une sixième bande appelée F a été observée chez un hétérozygote (CF). Cette bande a une mobilité relative très lente et migre moins loin que la bande la plus lente du groupe III. Elle

se révèle en violet, est inhibée par le dichlorvos et révélée par le  $\beta$ N-propionate ce qui ne laisse aucun doute sur son appartenance au groupe Es II. Il y aurait donc, jusqu'à présent, 6 gènes allélosomorphes possibles au locus déterminant le groupe Es II. Les fréquences des allèles Es II<sup>F</sup> et Es II<sup>E</sup> étant très faibles, ces deux gènes ont été réunis dans les calculs.

En conclusion les tests de conformité ( $\chi^2$ ) pour les distributions observées dans les lots 28, 29 et 31, n'infirment pas l'hypothèse de travail selon laquelle le groupe d'isoenzymes Es II de Sardinella aurita est contrôlé génétiquement par 5 (+1) allèles codominants à un seul locus.

Remarque : Pour les lots 29 et 31 des éléments nouveaux par rapport au lot 28 ont été observés.

1° La bande A occupe deux niveaux différents très rapprochés A<sup>1</sup> ou A<sup>2</sup> selon qu'elle est plus ou moins rapide.

2° La bande B occupe 3 niveaux différents B<sup>1</sup>, B, B<sup>2</sup>, la bande B de l'homozygote s'étendant presque toujours des niveaux B<sup>1</sup> à B<sup>2</sup> alors que chez les hétérozygotes on observe B<sup>1</sup>, B ou B<sup>2</sup> avec parfois B<sup>1</sup>B<sup>2</sup>. Il semble donc que Es II<sup>B</sup> puisse donner lieu à la formation de bandes hybrides à l'état hétérozygote.

3° Souvent une troisième bande presque toujours faible est visible au niveau de C ou D. Il s'agit soit de bandes du groupe Es III dont l'indétermination subsiste du fait que le dichlorvos n'est pas employé systématiquement (en effet une telle bande supplémentaire est parfois présente pour un phénotype homozygote) soit d'une bande hybride dans le cas des hétérozygotes .



Fig. 3 - Différents niveaux de la bande A chez 3 homozygotes (A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>A<sup>2</sup>, A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>) et 2 hétérozygotes (A<sup>2</sup>B et A<sup>1</sup>D) du lot 31. Présence de la bande F chez l'hétérozygote CF. Cette bande ne fait pas partie de Es III comme on peut le voir après incubation dans le dichlorvos 10<sup>-5</sup>M des 5 derniers sérum.

Tableau 11 : Test d'hétérogénéité entre les lots 29 et 31 pêchés en Octobre 1971. Le  $\chi^2$  obtenu ( $\chi^2_{29} + \chi^2_{31}$ ) est égal à 14,90.

| Phéno-<br>types | LOTS 29 et 31 |             | LOT 29    |      |                             | LOT 31    |      |                             |
|-----------------|---------------|-------------|-----------|------|-----------------------------|-----------|------|-----------------------------|
|                 | effectifs     | Pourcentage | Effectifs |      |                             | Effectifs |      |                             |
|                 |               |             | cal.      | Obs. | $\frac{(obs.-cal)^2}{cal.}$ | cal.      | Obs. | $\frac{(obs.-cal)^2}{cal.}$ |
| AA              | 4             | 3,70        | 1,48      | 1    | 0,15                        | 2,51      | 3    | 0,09                        |
| BB              | 13            | 12,03       | 4,81      | 2    | 1,64                        | 8,18      | 11   | 0,97                        |
| CC              | 8             | 7,40        | 2,96      | 6    | 3,12                        | 5,03      | 2    | 1,82                        |
| DD              | 5             | 4,62        | 1,84      | 1    | 0,38                        | 3,14      | 4    | 0,23                        |
| EE              | 1             | 0,92        | 0,36      | 1    | 1,14                        | 0,62      | 0    | 0,62                        |
| AB              | 6             | 5,55        | 2,22      | 2    | 0,02                        | 3,77      | 4    | 0,01                        |
| AC              | 11            | 10,18       | 4,07      | 4    | 0,12                        | 6,92      | 7    | 0,09                        |
| AD              | 4             | 3,70        | 1,48      | 1    | 0,15                        | 2,51      | 3    | 0,09                        |
| AE              | 0             | 0,00        | 0,00      | 0    | 0,00                        | 0,00      | 0    | 0,00                        |
| BC              | 21            | 19,44       | 7,77      | 9    | 0,19                        | 13,21     | 12   | 0,11                        |
| BD              | 20            | 18,51       | 7,40      | 10   | 0,91                        | 12,58     | 10   | 0,53                        |
| BE              | 1             | 0,92        | 0,36      | 0    | 0,36                        | 0,62      | 1    | 0,23                        |
| CD              | 12            | 11,11       | 4,44      | 3    | 0,47                        | 7,55      | 9    | 0,27                        |
| CE              | 2             | 1,85        | 0,74      | 0    | 0,74                        | 1,25      | 2    | 0,45                        |
| DE              | 0             | 0,00        | 0,00      | 0    | 0,00                        | 0,00      | 0    | 0,00                        |
| TOTAUX          | 108           | 99,93       | 39,93     | 40   | $\chi^2_{29} = 9,39$        | 67,89     | 68   | $\chi^2_{31} = 5,51$        |

4.5- LE GROUPE D'ESTERASES Es II COMME MOYEN D'ETUDE DES POPULATIONS DE SARDINELLA AURITA.

Le but étant de comparer les *S. aurita* péchées en Juin (Lot 28) à celles péchées en Octobre (Lots 29 et 31) il faut s'assurer par un test d'hétérogénéité que les deux lots 29 et 31 péchés à 7 jours d'intervalle dans la même région ne sont pas issus de populations différentes. Ensuite il est alors possible de grouper les phénotypes observés des lots 29 et 31 pour calculer les fréquences des différents gènes. Le tableau 11 rend compte du calcul du  $\chi^2$  servant à tester si les lots 29 et 31 (qui sont deux échantillons indépendants supposés appartenir à une même population) sont différents. Pour un  $\chi^2$  de 14,90 (et  $v = 13$ ) le test n'est pas significatif .

et ne permet pas de dire que les lots 29 et 31 sont issus de populations différentes. Les résultats du tableau 9 peuvent donc être présentés de la façon suivante (tableau 12).

Tableau 12 - Fréquence des gènes observés dans les lots 28 et 29+31  
L'allèle rare Es II<sup>F</sup> étant groupé avec l'allèle rare Es II<sup>E</sup>

| Nature des gènes   | S. aurita de Juin<br>(Lot 28) |           | S. aurita d'Octobre (Lots 29 + 31) |           |
|--------------------|-------------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|
|                    | effectifs                     | fréquence | effectifs                          | fréquence |
| Es II <sup>A</sup> | 17                            | 0,129     | 29                                 | 0,134     |
| Es II <sup>B</sup> | 34                            | 0,257     | 74                                 | 0,342     |
| Es II <sup>C</sup> | 45                            | 0,340     | 61                                 | 0,282     |
| Es II <sup>D</sup> | 33                            | 0,250     | 47                                 | 0,217     |
| Es II <sup>E</sup> | 3                             | 0,022     | 5                                  | 0,023     |
| Totaux             | 132                           | 0,998     | 216                                | 0,998     |

Pour pouvoir comparer entre elles les diverses fréquences des gènes observés pour les sardinelles de Juin et celles d'Octobre il faut calculer leurs intervalles de confiance. Ces intervalles ont été calculés pour un coefficient de sécurité de 95 % avec la formule  $f \pm 2 \sqrt{f(1-f)}$  où  $f$  est la fréquence considérée, et  $n$  le nombre total de gènes. L'allèle rare Es II<sup>E+F</sup> n'est pas utilisé, sa fréquence étant trop faible pour donner un intervalle de confiance suffisamment petit. Le tableau 13 donne les résultats obtenus.

Tableau 13 : Estimation et intervalles de confiance des fréquences des gènes Es II<sup>A,B,C,D</sup> pour un coefficient de sécurité de 95%.

| Nature des gènes   | S. aurita de Juin<br>Lot 28 | S. aurita d'Octobre<br>Lots 29 + 31 |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| Es II <sup>A</sup> | 0,024 < 0,129 < 0,18        | 0,08 < 0,134 < 0,18                 |
| Es II <sup>B</sup> | 0,18 < 0,257 < 0,33         | 0,28 < 0,342 < 0,41                 |
| Es II <sup>C</sup> | 0,26 < 0,340 < 0,42         | 0,20 < 0,282 < 0,34                 |
| Es II <sup>D</sup> | 0,18 < 0,250 < 0,32         | 0,16 < 0,217 < 0,27                 |

On constate que les fréquences trouvées pour les gènes Es II<sup>B</sup> et Es II<sup>C</sup> sont différentes pour les sardinelles de Juin et celles d'Octobre, mais que leurs intervalles de confiance se recouvrent en partie. Seul un échantillonnage plus important (au moins pour les sardinelles de Juin) permettrait d'approcher les valeurs réelles des fréquences des gènes puis de réduire l'intervalle de confiance. Par exemple pour Es II<sup>B</sup> la fréquence trouvée pour le lot 29 de 40 individus est de 0,312 mais devient 0,342 pour 108 individus (lot 29 + lot 31), l'intervalle de confiance se réduisant de 0,21 - 0,43 à 0,28 - 0,41.

En conclusion il n'est pas possible de dire avec le nombre d'échantillons étudiés jusqu'à présent si les *Sardinella aurita* péchées en Juin n'appartiennent pas à la même population que les *Sardinella aurita* péchées en Octobre.

B I B L I O G R A P H I E

-----

- BARON (J.C.), 1970.- Remarques concernant le programme de Sérologie appliquée à l'étude des Sardinelles de la Côte Ouest d'Afrique. Doc. du C.R.O. d'Abidjan (ref. 570/ J.C.B./ M.A.D.) 14 p. multigr.
- BARON (J.C.), 1971.- Les transferrines de deux espèces de sardinelles : Sardinella aurita (C.V.) et Sardinella eba (C.V.). Cah. ORSTOM, Ser. Océanogr. vol IX, n° 1 pp. 85 à 96.
- BARON (J.C.) (à paraître).- Note sur les protéines sériques de Sardinella aurita (C.V.)
- BARON (J.C.), sous presse.- Note sur un nouvel appareil d'électrophorèse horizontale pour gel d'amidon.
- BARLOW (J.), RIDGWAY (G.J.), 1971.- Polymorphisms of esterase isozymes in the American lobster (Homarus americanus). J. Fish. Res. Bd. Canada 28 pp. 15 - 21.
- BOELY (T.), 1971.- La pêche industrielle de Sardinella aurita dans les eaux sénégalaises de 1966 à 1970. C.R.O. Dakar D.S.P. n° 31 miméo. 33 p.
- CANN (J.R.), GOAD (W.B.), 1965.- Two or more electrophoretic zones from a single macromolecule. Ann. N.Y. Ac. Sc. pp. 638 - 649.
- COTTERMAN (C.W.), 1954.- Estimation of gene frequencies in nonexperimental populations In. Statistics and mathematics in biology Ed. O. Kempthorne. The Iowa State College Press, Ames, Iowa pp. 149 - 465.
- DUPÉ (M.), BOCKELÉE-MORVAN (M.L.), 1968.- Mise en évidence d'une cholinestérase spécifique au niveau du système nerveux central et du système circulatoire chez un Dipneuste (Protopterus annectens) Soc. Biol. Ouest Africain p. 823 - 829.
- FUJINO (K.), 1970.- Immunological and biochemical genetics of tunas. Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 99, 1, pp. 152 - 178.
- GAHNE (B.), 1966.- Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, préalbumins and plasma esterases of horses. Genetics 53 pp. 681 - 694.
- GIBBLET (E.R.), 1969.- Pseudocholinesterase in Genetic markers in human blood. Blackwell scientific publications. OXFORD - 629 p.
- HOLMES (R.S.), MASTERS (C.J.), WEBB (E.C.), 1968.- A comparative study of vertebrate esterase multiplicity. Comp. Biochem. Physiol. 26 pp. 837 - 852.
- HOLMES (R.S.), WHITT (G.S.), 1970.- Developmental genetics of the esterase isozymes of Fundulus heteroclitus. Biochemical genetics. 4 pp. 474 - 480.
- HOWLETT (G.), JAMIESON (A.), 1969.- A system of muscle esterase variants in the sprat (Sprattus sprattus) ICES, special meeting on the "Biochemical and Serological identification of fish stocks" 8 p. multigr.

- HUNTER (R.L.), MARKERT (C.L.) 1957.- Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125, pp. 1294 - 1295.
- JAMIESON (A.), LIGNY (W. de), NAEVDAL (G.) 1969.- Serum esterases in mackerel, Scomber scombrus L. I.C.E.S. special meeting on "The biochemical and Serological identification of fish stocks" 13 p. multigr.
- KAMINSKI (M.) 1969.- Etude des enzymes et protéines sériques de la caille. *Bull. Biol.* 3 - 4 p. 420 - 434.
- KNOWLES (C.O.) 1968.- Degradation of organophosphates by fish liver phosphatases. *J. Fish. Res. Bd. Canada*. 25, 8, pp. 1571 - 1579.
- KOEHN (R.K.), RASMUSSEN (D.I.), 1967.- Polymorphic and monomorphic serum esterase heterogeneity in catostomid fish populations. *Biochem. Genet.* 1 p. 131.
- KOEHN (R.K.) 1969.- Esterase heterogeneity : dynamics of a polymorphism. *SCIENCE*, 163, pp. 943 - 944.
- LATNER (A.L.), SKILLEN (A.W.) 1968.- Isoenzymes of the hydrolases. 4 Esterases.  
in - Isoenzymes in biology and medicine. Academic Press - London  
289 p.
- LIGNY (W. de) 1968.- Polymorphism of plasma esterase in flounder and plaice. *Genet. Res. Camb.* 11 pp. 179 - 182.
- MAYNARD (E.A.) 1964.- Estérases in Crustacean nervous system. I Electrophoretic studies in lobsters. *J. Expl. Zool.* 157 pp. 251 - 266.
- NAEVDAL (G.) 1969.- Distributions of multiple forms of lactate dehydrogenase, aspartate amino-transferase and serum esterase in herring samples from norwegian water. ICES, special meeting on the "Biochemical and Serological identification of fish stocks" n° 16, 9 p. multigr.
- ODENSE (P.H.), ALLEN (T.M.) 1969.- A biochemical comparison of some atlantic herring population. ICES, Special meeting on the "Biochemical and Serological identification of fish stocks" 11 p. multigr.
- PANTELOURIS (E.M.), PAYNE (R.H.) 1968.- Genetic variation in the eel I. The detection of haemoglobin and esterase polymorphisms. *Genet. Res. Camb.* 11, pp. 319 - 325.
- POSTEL (E.) 1959.- Rapport sur la sardinelle (Sardinella aurita Valenciennes- (Atlantique Africain) in Proceedings of the World scientific meeting on the biology of sardines and related species. Rome. 14 - 21 Sept. 1959.
- RIDGWAY (G.J.), SHERBURNE (S.W.), LEWIS (R.D.) 1970.- Polymorphism in the esterase of atlantic herring. *Trans. of the American Fisheries Soc.* vol 99, 1, pp. 147 - 151.
- SERENE (Ph.) 1969.- Esterase of the north-east atlantic albacore stock I.C.E.S. Special meeting on the "Biochemical and Serological identification of fish stocks" n° 33 8 p. multigr.

SHAW (C.R.), 1960.- Isozymes : classification, frequency and significance. Int. Rev. Cytol. 25 pp. 297 - 332.

SHAW (C.R.), PRASAD (R.), 1970.- Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Biochemical Genetics 4 pp. 297 - 320.

SIMONARSON (B.), WATTS (D.C.), 1969.- Muscle esterase and protein variants in stocks of herring from Blackwater, Dunmore and Ballantrae. ICES, Special meeting on the "Biochemical and Serological identification of fish stocks" 6 p. multigr.

TASHIAN (R.E.), 1969.- The esterases and carbonic anhydrases of human erythrocytes in Biochemical methods in red cell genetics. Ed. by Jorge J. Yunis. Academic Press. New-York. 530 p.

WEBB (E.C.), 1964.- The nomenclature of multiple enzyme forms. Experientia, 20. p. 592.

WILKINS (N.P.), 1969.- Biochemical and serological studies on atlantic salmon (Salmo salar L.) ICES, Special meeting on the "Biological and Serological identification of fish stocks".