

1

M E M O I R E

présenté à

L ' U N I V E R S I T E P A R I S V I

P I E R R E E T M A R I E C U R I E

par

G I L L E S F E D I E R E

pour obtenir le

DIPLÔME D'ETUDES APPROFONDIES D'ENTOMOLOGIE

ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOLOGIQUE
DES PROTEINES DE L'HEMOLYPHE DE L'ORTHOPTERE
SCHISTOCERCA GREGARIA FORSKAL.
INFLUENCE DU PARASITISME DÛ AU PROTOZOAIRE
MALAMEBA LOCUSTAE KING ET TAYLOR.

Soutenu le 21 SEPTEMBRE 1982

Travail réalisé à

L'Université Pierre et Marie Curie

E.R.A. 620 : Cytophysologie des Arthropodes

105, boulevard Raspail, 75006 PARIS

Fonds Documentaire IRD



010025955

Fonds Documentaire IRD
Cote: Bx25955 Ex: 1

M E M O I R E

présenté à

L ' U N I V E R S I T E P A R I S V I,
P I E R R E E T M A R I E C U R I E

par

G I L L E S F E D I E R E

pour obtenir le

D I P L Ô M E D ' E T U D E S A P P R O F O N D I E S D ' E N T O M O L O G I E

E T U D E E L E C T R O P H O R E T I Q U E E T I M M U N O L O G I Q U E
D E S P R O T E I N E S D E L ' H E M O L Y M P H E D E L ' O R T H O P T E R E
S C H I S T O C E R C A G R E G A R I A F O R S K A L .
I N F L U E N C E D U P A R A S I T I S M E D U A U P R O T O Z O A I R E
M A L A M E B A L O C U S T A E K I N G E T T A Y L O R .

soutenu le 21 SEPTEMBRE 1982

Travail réalisé à

L'Université Pierre et Marie Curie

E.R.A. 620 : Cytophysologie des Arthropodes

105, boulevard Raspail, 75006 PARIS

AVANT - PROPOS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur P. CASSIER, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui, depuis, n' a jamais cessé de s'intéresser à mon travail et de me prodiguer ses enseignements.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Madame M. PAPILLON, qui a eu l'extrême complaisance de m'initier aux techniques immunologiques et de me prodiguer sans compter aide et conseils.

Je remercie très vivement Mesdames C. JOULIE et N. COUDOUEL pour leur aide technique, Mademoiselle J. BIGLER et Madame A. JANICOT pour la présentation de ce mémoire.

Je remercie également toute l'équipe de l'E.R.A. 620 :
Cytophysiologie des Arthropodes, et en particulier Madame M. NEGRE-PIOT.

SOMMAIRE

Introduction	p. 1
I. Matériel et méthodes	p. 2
A. Le matériel biologique : le Criquet pèlerin	
<u>Schistocerca gregaria</u> Forskäl	p. 2
1. mode d'élevage	
2. Choix des animaux d'expérience	
3. Prélèvement de l'hémolymphe	
B. Dosage des protéines (méthode de Lowry)	p. 3
1. Préparation des solutions mères	
2. Réactif	
3. Dosage s.s.	
C. Techniques électrophorétiques	p. 4
1. Structure et propriétés du gel de polyacrylamide	p. 4
2. Composition des tampons et des gels	p. 4
a) Electrophorèse en conditions dénaturantes PAGE - SDS -	
b) Electrophorèse en gel neutre	
3. Préparation des extraits biologiques	p. 7
a) Electrophorèse en conditions dénaturantes	
b) Electrophorèse en gel neutre	
4. Electrophorèse	p. 8
a) Electrophorèse en conditions dénaturantes	
b) Electrophorèse en gel neutre.	
5. Fixation, coloration, décoloration et conservation des gels	p. 8
6. Détermination du poids moléculaire des protéines et des sous-unités polypeptidiques	p. 9
a) Détermination du poids moléculaire des protéines: méthode de Hedrick et Smith (1968)	
b) Détermination du poids moléculaire des sous-unités polypeptidiques : méthode de Weber et Osborn (1969)	
c) Autre méthode de détermination du poids moléculaire des protéines : Electrophorèse en gel neutre de polyacrylamide en gradient 4 - 30 %.	

D. Techniques immunologiques	p. 11
1. Préparation des immunosérums	p. 11
a) Anticorps anti-oeufs de <u>Schistocerca gregaria</u>	
b) Immunosérum épuisé : anticorps anti-oeufs - complexe vitellin.	
2. Immunodiffusion, électroimmunodiffusion et immuno-électrophorèse	p. 12
a) Principe	
b) Préparation du gel et du tampon pour immuno-électrophorèse.	
c) Réalisation	
d) Séchage et coloration.	
II. Résultats.....	p. 15
A. Dosage des protéines	p. 15
B. Techniques électrophorétiques	p. 16
1. Electrophorèse en gel neutre homogène	
2. Electrophorèse en gel neutre en gradient 4-30 %	
3. Electrophorèse en conditions dénaturantes.	
C. Techniques immunologiques	p. 18
1. Immunodiffusion	
2. Electro immunodiffusion	
3. Immuno électrophorèse "line"	
4. Immuno électrophorèse "Rocket"	
Conclusion	p. 20
Bibliographie.	

Introduction

Chez le Criquet pèlerin Schistocerca gregaria Forskäl, la présence d'un protozoaire parasite Malameba locustae King et Taylor, est à l'origine de graves perturbations physiologiques.

La structure du parasite a été décrite en microscopie photonique (King et Taylor, 1936; Taylor et King, 1937; Prinsloo, 1961, 1962; Henry, 1968) et en microscopie électronique (Hanrahan, 1975; Harry et Finlayson, 1976; Papillon et Cassier, 1978).

L'histopathologie de l'infection a fait l'objet de nombreux travaux (Taylor et King, 1937; Prinsloo, 1961, 1962; Henry, 1968; Martoja, 1969; Evans et Elias, 1970; Hanrahan, 1975; Harry et Finlayson, 1976; Papillon et Cassier, 1978). Les tubes de Malpighi sont les plus sévèrement touchés ; à leur niveau, les trophozoïtes se multiplient activement, puis s'enkystent. Lors d'une infestation sévère les kystes libérés par rupture des tubes de Malpighi se répandent dans les tissus voisins : le corps gras est ainsi fréquemment envahi et régresse (planches I et II).

Cet envahissement massif affecte la physiologie des Criquets : réduction de la fécondité (Prinsloo, 1961, 1962; Hanrahan, 1975); diminution de la longévité (Hanrahan, 1975), ralentissement de la croissance larvaire (Henry, 1968) et du développement sexuel (Tobe et Pratt, 1975).

L'atrésie du tissu adipeux affecte le métabolisme protéique : le taux des protéines circulantes est réduit de 17 à 56 % chez les insectes parasités des deux sexes; cette réduction affecterait spécifiquement certaines fractions (Papillon et Cassier, 1978).

Compte tenu du rôle fondamental des protéines sériques, notamment celles impliquées dans la vitellogénèse, il a semblé intéressant de poursuivre leur étude immunologique et électrophorétique chez Schistocerca gregaria afin d'en préciser les caractères physico-chimiques et d'étudier les variations quantitatives et qualitatives associées à la présence de l'amibe pathogène, Malameba locustae.

Nous comparons les protéines hémolympatiques d'adultes mâles et femelles, sains ou infestés à divers stades de leur maturation sexuelle. Les animaux sains sont préservés du parasitisme par l'utilisation d'un sulfamide, le Thiopyrimeth, bien que son utilisation chronique soit à l'origine d'anomalies morphologiques et structurales, notamment au niveau du mésentéron (Hanrahan, 1981).

Fig. 1. Portion d'un tube de Malpighi de Locusta migratoria migratorioides (R. et F.) parasité par Malameba locustae. Noter en position extracellulaire, la coexistence de trophozoïtes (T) et de kystes (K) en cours d'évolution, à paroi plus ou moins épaisse.

Le parasite est caractérisé par la présence de mitochondries à crêtes tubulaires (M), d'enclaves lipidiques (L.) d'accumulation de glycogène (G.) de courtes citernes ergastoplasmiques (→)

N. : noyau - C x 16.000.

X

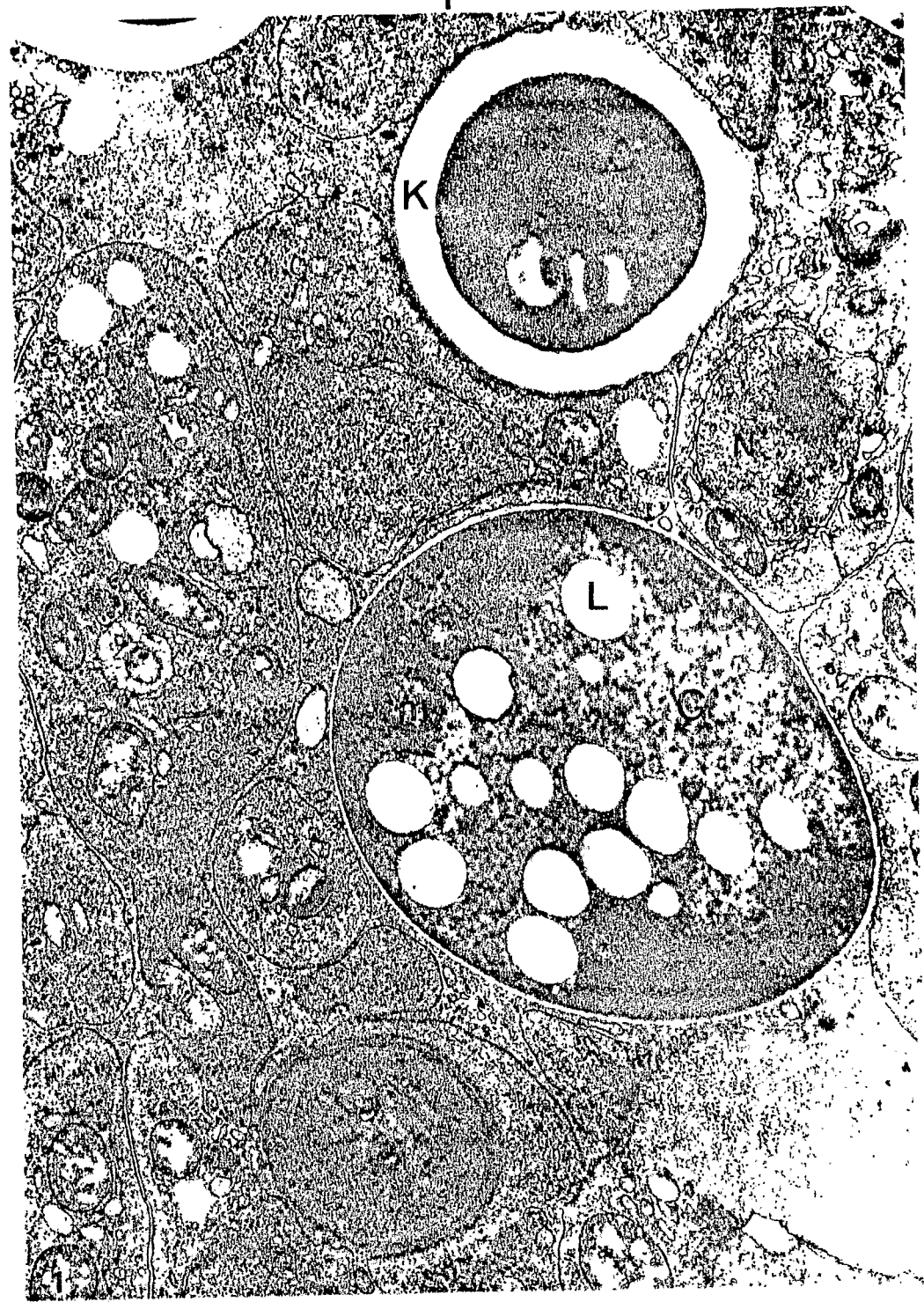


Planche II (d'après M. PAPILLON et P. CASSIER, 1978).

Fig.2. Phase d'édification précoce de la paroi kystique (→). Etude parasitaire de Malameba locustae. N. : noyau ; L. : enclave lipidique.

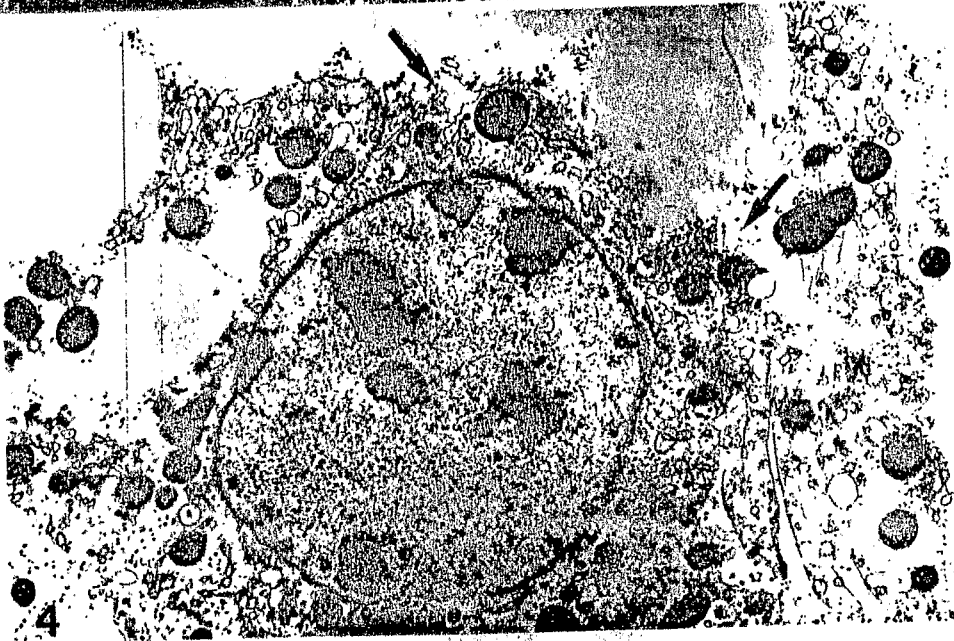
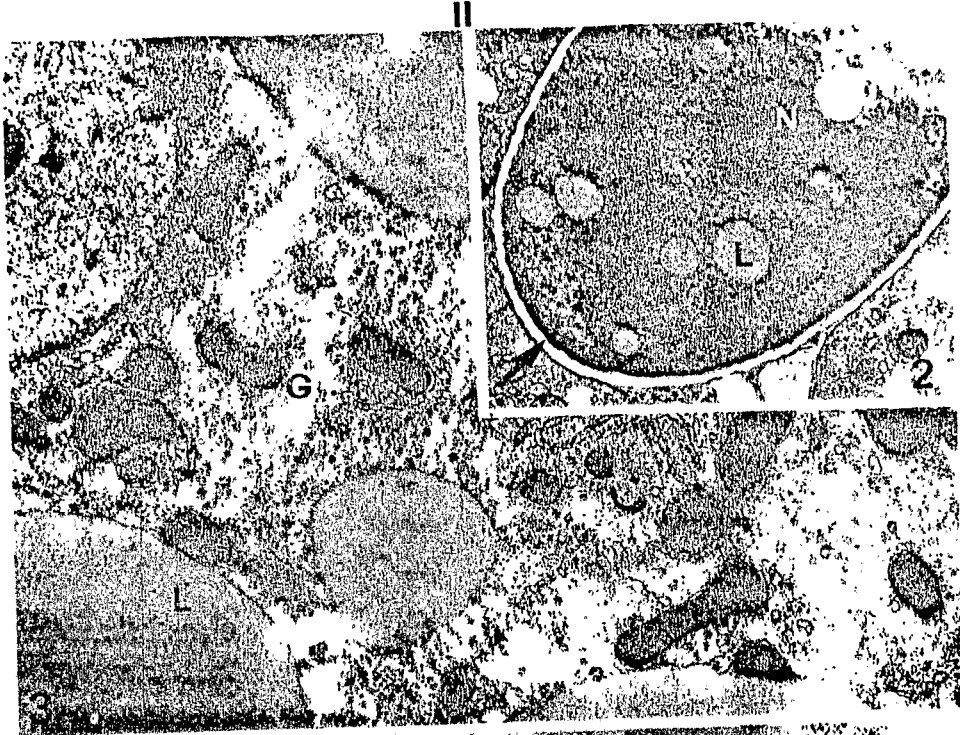
G x 16.000

Fig.3. Cellule adipeuse saine, riche en glycogène (G), en lipide (L) et en réticulum endoplasmique

G x 8.200

Fig.4. Cellule adipeuse parasitée, en voie d'autolyse. L'action du parasite, Malameba locustae se traduit par la rupture des membranes plasmiques (→), la vésiculation du réticulum endoplasmique, l'épuisement des réserves glucidiques, la pycnose nucléaire -

G x 4.200.



I. Matériel et méthodes.

A. Le matériel biologique : le Criquet pèlerin, Schistocerca gregaria Forskäl.

1 - Mode d'élevage.

La méthode d'élevage et les cages utilisées dans l'équipe de Cytophysiologie des Arthropodes ont été antérieurement décrites (Papillon, 1967). Les élevages groupés (phase grégaire) (2000 larves, 1500 adultes) sont effectués dans des cages de bois mesurant 38x38x52 cm. Chaque cage est vitrée sur une face et possède divers disques et portes de ventilation ajustables. Une ampoule électrique de 60 Watts assure une photopériode de 10 heures (9 à 19 heures) et une température de 36 à 38°C pendant la journée; la nuit, la température tombe à 18-20°C. L'humidité relative y est de 30-50 % le jour, et de 50-70 % la nuit.

La nourriture consiste en Poa pratensis distribué deux fois par jour et en son de froment renouvelé chaque matin.

2 - Choix des animaux d'expérience.

- Deux lots comprenant chacun 150 larves du 5^{ème} stade venant de muer (4^{ème} mue) sont constitués.

- Les criquets du premier lot reçoivent chaque semaine une nourriture additionnée de Thiopyriméth pour éliminer Malameba locustae; ils constituent la souche d'adultes sains de référence.

Le Thiopyriméth est une combinaison de trois sulfamides : sulphaméthazine, sulphathiazole sodium et sulphapyridine sodium dans les proportions 1,5 - 3 - 4 ml d'une solution de Thiopyriméth à 12 % dans de l'eau distillée sont mélangés à 100 gr de son (Henry, 1968 modifié par Donaldson, 1971).

- Les criquets du deuxième lot ne sont pas traités aux sulfamides et ils sont en permanence exposés à l'infection par le protozoaire dont les kystes rejetés avec les fèces persistent dans les cages.

3 - Prélèvement de l'hémolymphe.

Les prélèvements se font à l'aide d'une micropipette, par ponction à travers la membrane cervicale.

L'hémolymphe recueillie à 5°C est centrifugée pendant 20 minutes à 9000 g. Le surnageant est immédiatement utilisé pour les techniques d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide neutre (protéines natives). Pour les autres techniques, il peut être stocké à - 20°C jusqu'au moment de l'emploi.

B. Dosage des protéines.

Les protéines de l'hémolymphe des ♂ et des ♀ sains et infectés, ont été dosées par la méthode de Lowry (Lowry et al, 1951). La gamme étalon est réalisée avec l'albumine sérique bovine (BSA) en solution dans du NaCl à 0,4 M (1mg/ml).

1) Préparation des solutions mères.

- Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans NaOH N/10 : 150 ml
- Solution B : tartrate de Na et K à 0,5% dans H_2O : 10 ml
- Solution C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 0,5% dans H_2O : 10 ml
- Réactif de Folin (Folin et Ciocalten, Touzart et Matignon) dilué 3 fois dans NaCl à 0,4 M.

Ces solutions sont conservées à 4°C.

2) Réactif: solution cuproalcaline (solution D)

- solution A : 100 ml
- solution B : 1 ml
- solution C : 1 ml

3) Dosage ss: 0,5 ml de la solution protéique à doser sont mélangés à 5 ml de la solution D.

- Agiter et laisser reposer 10 à 15 minutes. Puis ajouter 0,5 ml de réactif de Folin dilué; agiter et laisser reposer entre 30 et 60 minutes.

La lecture de la densité optique au spectrophotomètre s'effectue à 660 nm.

Parallèlement à cette méthode, nous avons effectué des dosages par la technique du Biorad (Biorad Protein Assay) - méthode colorimétrique au bleu de Coomassie(G-250) la lecture se faisant à 595 nm.

C. Techniques électrophorétiques.

L'analyse électrophorétique des protéines de l'hémolymphe a été réalisée sur gel de polyacrylamide en plaques.

1 - Structure et propriétés du gel de polyacrylamide.

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation en milieu liquide d'un monomère principal, l'acrylamide et d'un comonomère servant d'agent de réticulation, le N, N' méthylène-bis- acrylamide. La polymérisation est catalysée en présence de persulfate d'ammonium et de N,N,N',N' tétraméthyl-éthylène-diamine (Temed, initiateur de la réaction).

La polymérisation engendre dans le gel une structure tridimensionnelle délimitant des pores dont le calibre est inversement proportionnel à la teneur en polyacrylamide. L'ensemble des pores constitue un filtre moléculaire susceptible de sélectionner les protéines en fonction de leur poids moléculaire donc de leur taille ; ce raisonnement concerne les protéines globulaires. Cet effet de filtration conjugué à l'action d'un champ électrique sur la charge des protéines est le principe même de l'électrophorèse qui assure un tamisage moléculaire et permet, comparativement à la migration des protéines de référence, la détermination du poids moléculaire des protéines étudiées. (Hedrick et Smith, 1968).

Parallèlement à cette technique d'électrophorèse en gel neutre, nous avons également utilisé la technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes pour déterminer le nombre de sous-unités polypeptidiques. L'agent utilisé est le dodécyl sulfate de sodium (S.D.S.), détergent anionique qui dénature les protéines et en sépare les chaînes polypeptidiques. Le S.D.S. se fixe dans la proportion de 1,4 g par gramme de protéines ; il leur confère une forte charge négative ; l'effet de charge est alors supprimé et les chaînes polypeptidiques migrent et se ségrègent uniquement selon leur poids moléculaire. L'existence d'une relation linéaire entre le logarithme décimal du poids moléculaire de ces sous-unités polypeptidiques et leur mobilité électrophorétique permet de déterminer le poids moléculaire de chacune d'elle. (Weber et Osborn, 1969).

2 - Composition des tampons et des gels

- a) Electrophorèse en conditions dénaturantes : P.A.G.E. - S.D.S.
(Laemmli, 1970) -modifié-

- Composition des tampons

* Tampon de concentration "Stacking buffer"

- Tris 1,251 M : 15,14 g
- S.D.S. 1 % 1 g
- H₂O distillée Q.S. 100 ml
- H Cl → ph : 6,8

* Tampon de séparation "Running buffer"

- Tris 1,876 M : 45,42 g
- S.D.S. 0,5 % 1 g
- H₂O distillée Q.S. 200 ml
- H Cl → ph : 8,8

* Tampon de migration "Electrophoresis buffer"

- Tris 0,025 M : 3,03 g
- Glycérine 0,192 M 14,4 g
- S.D.S. 0,1 % 1 g
- H₂O distillée Q.S. 1 litre
- H Cl → ph : 8,3

- Composition et fabrication des gels.

Quelle que soit la concentration de polyacrylamide, le gel de séparation contient 0,1% de S.D.S. et 0,375 M de Tris.

Les gels sont coulés entre 2 plaques de verre à l'aide de "Kits" pharmacia. Les moules G.S.C. 2 et G.S.C. 8 permettent respectivement l'obtention de gels de dimensions : 17,8 x 13,8 x 0,27 cms et 8,2 x 8,2 x 0,49 cms ; les premiers présentant 14 puits de dépôts, les autres n'en présentant que 6.

La solution mère d'acrylamide est filtrée sur multipore 0,45 μ et conservée à 4°C. La solution de persulfate d'ammonium doit être renouvelée pour chaque emploi en raison de son instabilité.

Les solutions sont préparées dans des fioles à vide et dégazées avant l'addition des agents catalyseurs (persulfate d'ammonium et Temed).

Les gels de séparation dont la concentration en polyacrylamide est supérieure ou égale à 9 % sont surmontés d'un gel de tassement "stacking gel" à 5 %.

Nature et Concentration du gel	Gel de tassement	Gel de séparation				
	5 %	5 %	7 %	9 %	11 %	13 %
Solution mère { Acrylamide 30 % et { bis-Acrylamide 0,8%	7,5 ml	16,2 ml	23,5 ml	30,0 ml	36,6 ml	43,3 ml
Filtration						
Tampon : { T. concentration ou { T. séparation	T.C 4,5 ml	T.S 20 ml	T.S 20 ml	T.S 20 ml	T.S 20 ml	T.S 20 ml
H ₂ O distillée	32,4 ml	62,7 ml	55,5 ml	49,0 ml	42,0 ml	36,0 ml
Dégazage						
Persulfate d'ammonium 10 %	0,45 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Temed	45 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
quantités pour : 1 gel : 17,8 x 13,8 x 0,27 cm ou 4 gels : 8,2 x 8,2 x 0,49 cm						

b) - Electrophorèse en gel neutre

L'électrophorèse a été réalisée soit sur gel discontinu à différents concentrations de polyacrylamide, soit sur gel en gradient 4 % - 30 % pharmacia.

- Gel discontinu

Les concentrations de polyacrylamide utilisées sont : 5 %, 6 %, 7 %, 8 %. La composition des tampons et des gels est la même que précédemment, abstraction faite du S.D.S.

- Gel en gradient

Ces gels sont commercialisés par "Pharmacia". La composition du tampon de migration est la suivante

- Tris 0,09 M 10,9 g
- Borate 0,08 M 4,95 g
- Na.EDTA 0,0025 M 0,93 g
- H₂O distillée Q.S. 1 litre
- H Cl —————→ ph : 8,3

3 - Préparation des extraits biologiques.

a) Electrophorèse en conditions dénaturantés.

Les extraits lyophilisés sont dissous dans une solution de solubilisation : le tampon d'extraction, puis incubés pendant 5 minutes à 100°C en présence d'un volume équivalent de tampon de dépôt ("sample buffer")

* Tampon d'extraction :

- Tris	0,012 M	0,15 g
- Na Cl	0,172 M	1 g
- S.D.S.	0,5 %	0,5 g
- H ₂ O	distillée	Q.S. 100 ml
- H Cl	—————>	ph : 7,6

* Tampon de dépôt "sample buffer"

- Tris	0,125 M	1,51 g
- S.D.S.	4 %	4 g
- β mercaptoéthanol	5 %	5 ml
- Glycérol	20 %	20 ml
- Bleu de bromophénol	0,005%	0,005 g
- H ₂ O	distillée	Q.S. 100 ml
- H Cl	—————>	ph : 6,8

Le β mercaptoéthanol à chaud provoque la rupture des ponts disulfures. Le glycérol augmente la densité du tampon et facilite le dépôt des échantillons dans les puits du gel.

Le bleu de bromophénol indique le front de migration durant l'électrophorèse.

b) Electrophorèse en gel neutre

- Gel discontinu

Les tampons d'extraction et de dépôt ne contiennent ni S.D.S. ni β-mercaptoéthanol. Pour éviter toute dénaturation, le mélange des extraits en solution et du tampon de dépôt se fait à froid (4°C).

- Gel en gradient

Nous utilisons comme tampon d'extraction le tampon de migration Tris-Borate-EDTA conservé à 4°C. Le mélange avec le tampon de dépôt se fait à raison de 4/5 d'extraits en solution pour 1/5 de tampon de dépôt.

* Tampon de dépôt

- Tris 0,09 M 10,9 g
- Borate 0,08 M 4,95 g
- Na.EDTA 0,0025 M 0,93 g
- Saccharose 40 % 40 g
- Bleu de bromophénol 0,005% 0,005 g
- H₂O distillée Q.S. 100 ml
- H Cl → ph : 8,4

4 - Electrophorèse

Les dépôts dans les puits du gel se fait à l'aide d'une seringue Hamilton ou d'une micropipette. La quantité d'extrait à déposer est déterminée à partir des résultats du dosage des protéines. Les dépôts contiennent de 50 à 100 µg de protéines.

a) Electrophorèse en conditions dénaturantes

Cette électrophorèse se déroule à température ambiante.

- pré-électrophorèse : 65 V pendant 1/2 h
- électrophorèse : 65 V pendant 15 mn (prémigration)
puis 130 V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol arrive à 1,5 cm de l'extrémité du gel (environ 1h30).

b) Electrophorèse en gel neutre.

Le tampon de migration remplissant la cuve d'électrophorèse est maintenu à 4°C.

- Le gel discontinu

- pré-électrophorèse : 65 V pendant 1/2 h
- électrophorèse : 200 V pendant 15 mn
puis 130 V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol arrive à 1,5 cm de l'extrémité du gel (environ 1h30).

- Gel gradient

- pré-électrophorèse : 75 V pendant 1 h
- électrophorèse : 75 V pendant 1 h
puis 150 V pendant 15 h

5 - Fixation, coloration, décoloration et conservation des gels

Les fractions protéiques retenues par le gel sont fixées par une solution d'acide trichoroacétique (T.C.A.) à 25 % pendant 1/2 h, puis colorées 12 h, par une solution, filtrée avant usage, de bleu de Coomassie.

* Colorant d'électrophorèse

- Bleu de Coomassie : 0,1 %
- Méthanol : 25 %
- Acide acétique : 10 %
- H₂₀ distillée Q.S. 1 litre

La différenciation des gels est obtenue par immersion dans plusieurs bains de solution décolorante.

* Décolorant électrophorèse

- Méthanol : 25 %
- Acide acétique : 10 %
- H₂₀ distillée Q.S. 1 litre

Le gel est alors photographié puis un enregistrement densitométrique est effectué au moyen d'un photomètre intégrateur Vernon.

Après avoir subi 4 bains successifs de 6 h chacun dans des solutions aqueuses contenant 55 % de méthanol, les gels sont séchés entre 2 feuilles de papier cellophane à l'aide d'un appareillage Pharmacia (G.S.D. 4), en vue d'une longue conservation.

6 - Détermination du poids moléculaire des protéines et des sous-unités polypeptidiques.

a - Détermination du poids moléculaire des protéines : méthode de Hedrick et Smith (1968).

Les protéines sont soumises à l'électrophorèse dans des gels neutres de polyacrylamide de diverses concentrations (6 à 9 %). La mobilité relative des bandes protéiques (Rf) a été calculée en établissant le rapport :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par la fraction}}{\text{distance parcourue par le front}}$$

La méthode de Hedrick et Smith utilise la relation linéaire existant entre la mobilité relative des protéines ($100 \log_{10} (\text{Ref} \times 100)$) et la concentration en polyacrylamide des gels.

Chaque protéine est caractérisée par la pente de la droite ainsi obtenue. L'étude se fait en trois temps.

- Une droite d'étalonnage (pente/PM) est réalisée à partir de 4 protéines de référence de poids moléculaires connus compris entre 67000 et 440000 (Electrophoresis Calibration Kit for molecular weight determination of high molecular weight proteins - Pharmacia -).
- Puis, pour chaque protéine à étudier la pente de la droite est obtenue en

portant en ordonnée $100 \text{ Log } (R_f \times 100)$ et en abscisse la concentration du gel.

- Le report sur la droite d'étalonnage de la pente de la droite caractérisant chacune des protéines étudiées permet de connaître leur poids moléculaire. (Planche III).

b - Détermination du poids moléculaire des sous-unités polypeptidiques : méthode de Weber et Osborn (1969).

Les protéines sont soumises à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS à la concentration de 9 %.

5 protéines de références (monomères) (Electrophoresis Calibration Kit for molecular weight determination of Low molecular weight proteins - Pharmacia -) de poids moléculaires connus compris entre 20100 et 94000 permettent d'établir une droite d'étalonnage reliant le R.f au logarithme du poids moléculaire des chaînes polypeptidiques (planche IV).

c - Autre méthode de détermination du poids moléculaire des protéines : Electrophorèse en gel neutre de polyacrylamide en gradient 4 - 30 %.

Nous utilisons le principe de la méthode de Weber et Osborn (1969). 5 protéines de référence (non dénaturées) de poids moléculaire compris entre 67000 et 669000 permettent d'établir une droite d'étalonnage reliant le R.f au logarithme du poids moléculaire des protéines (planche V).

Planche III : Droite d'étalonnage donnant la relation Poids moléculaire/pente pour 4 protéines de référence (cf. Hedrick et Smith, 1968).

Les protéines ont été soumises à des électrophorèses en gel de polyacrylamide de diverses concentrations (6 à 9 %) en conditions non dénaturantes.

Protéines de référence

n°	Protéine	P.M.	- Pente
A	Bovine Serum albumine	67 000	13,18
B	Lactate dehydrogenase	140 000	19,16
C	catalase	232 000	27,6
D	Ferritin	440 000	43,1

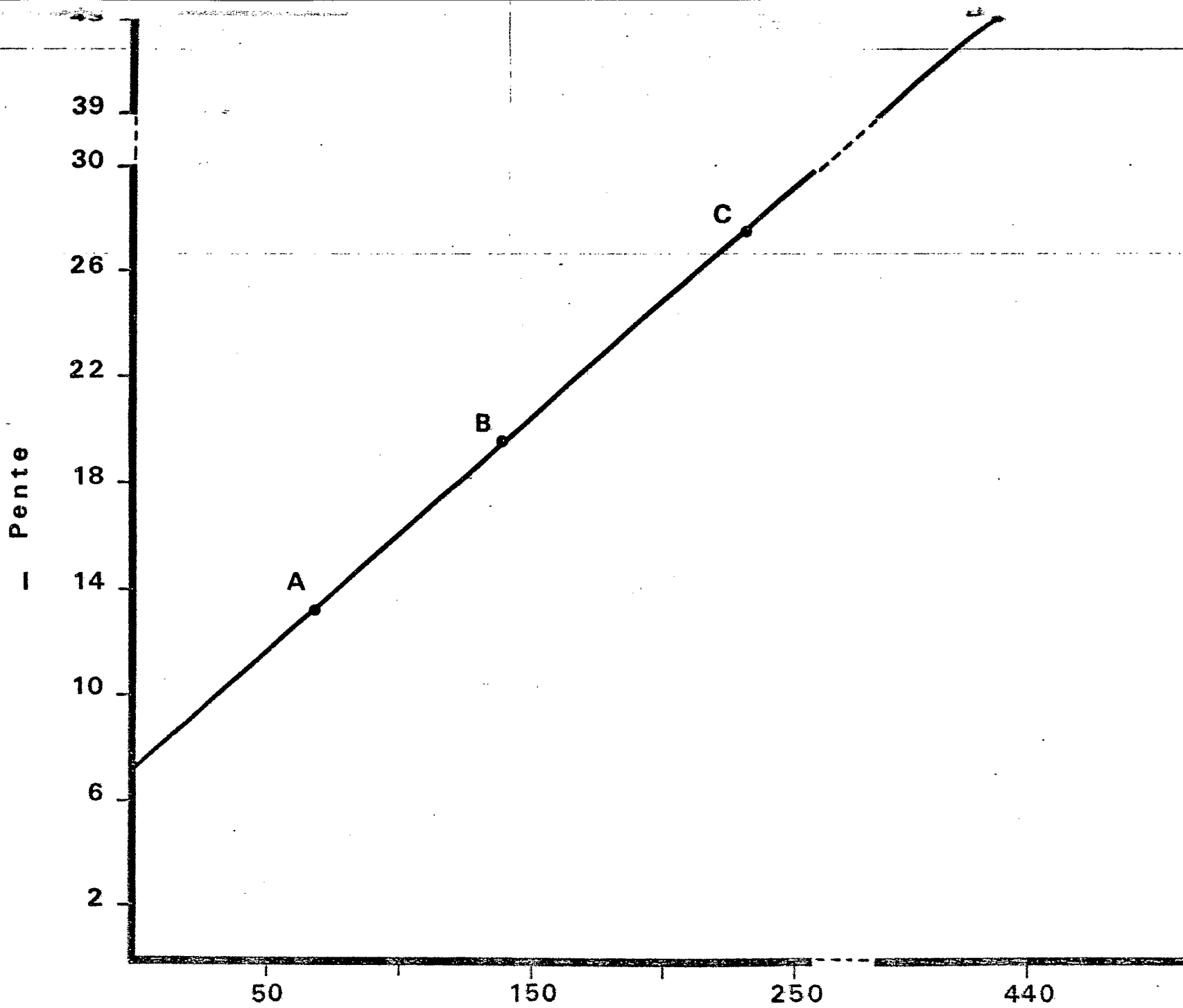


Planche IV : Droite d'étalonnage reliant la mobilité relative (R.f) au logarithme decimal du poids moléculaire pour 5 protéines de référence (cf Weber et Osborn, 1969)

Les protéines ont été soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (concentration : 9%) en conditions dénaturantes (SDS - B mercaptoethanol). Chaque point est la moyenne de 5 mesures.

Protéines de référence (monomères)

n°	Protéine	P.M.	R.f
I	Phosphorylase.b.	94 000	0,176
II	Bovine serum albumine	67 000	0,290
III	Ovalbumin	43 000	0,463
IV	Carbonic anhydrase	30 000	0,661
V	Trypsin inhibitor	20 100	0,902

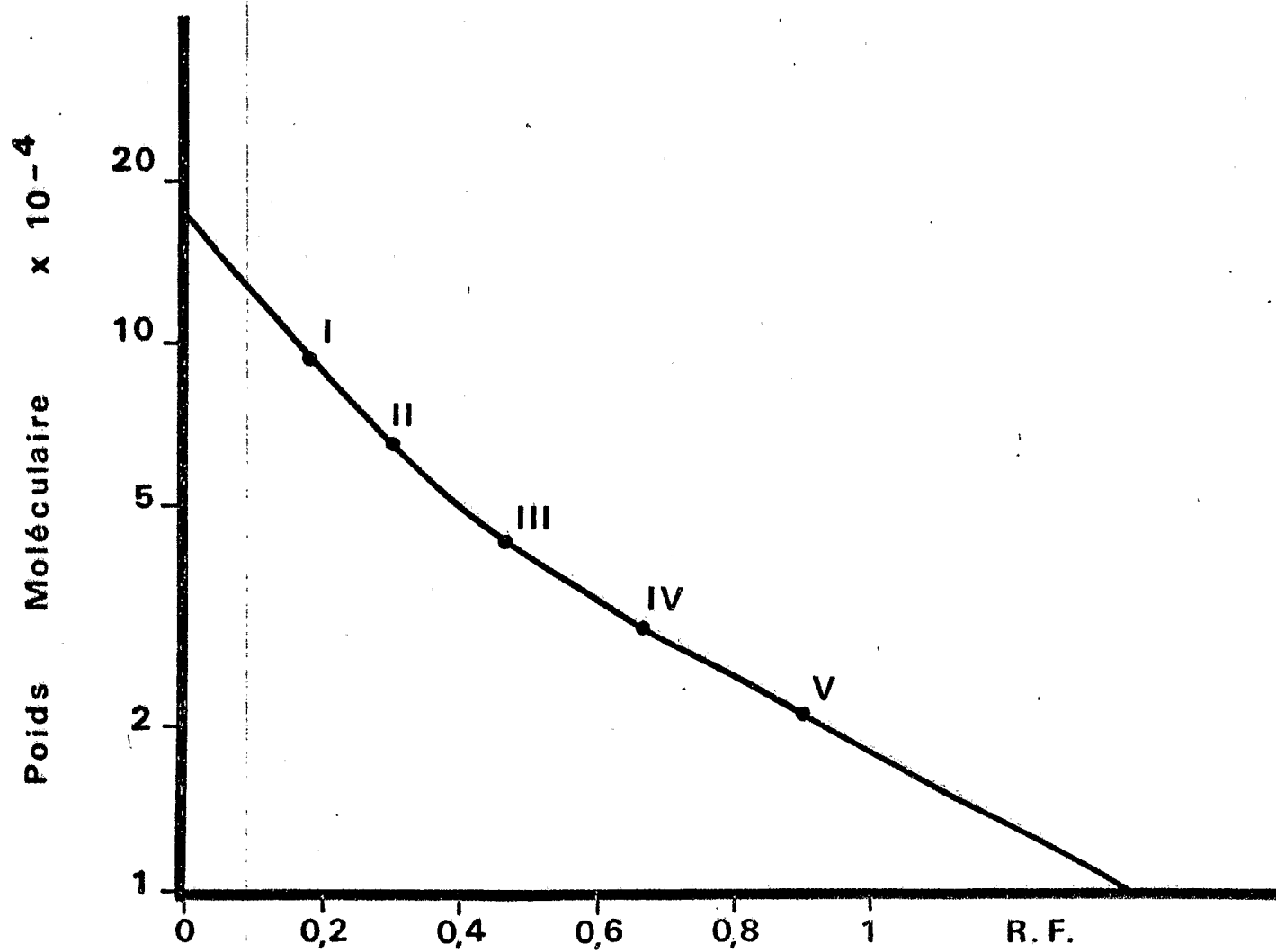


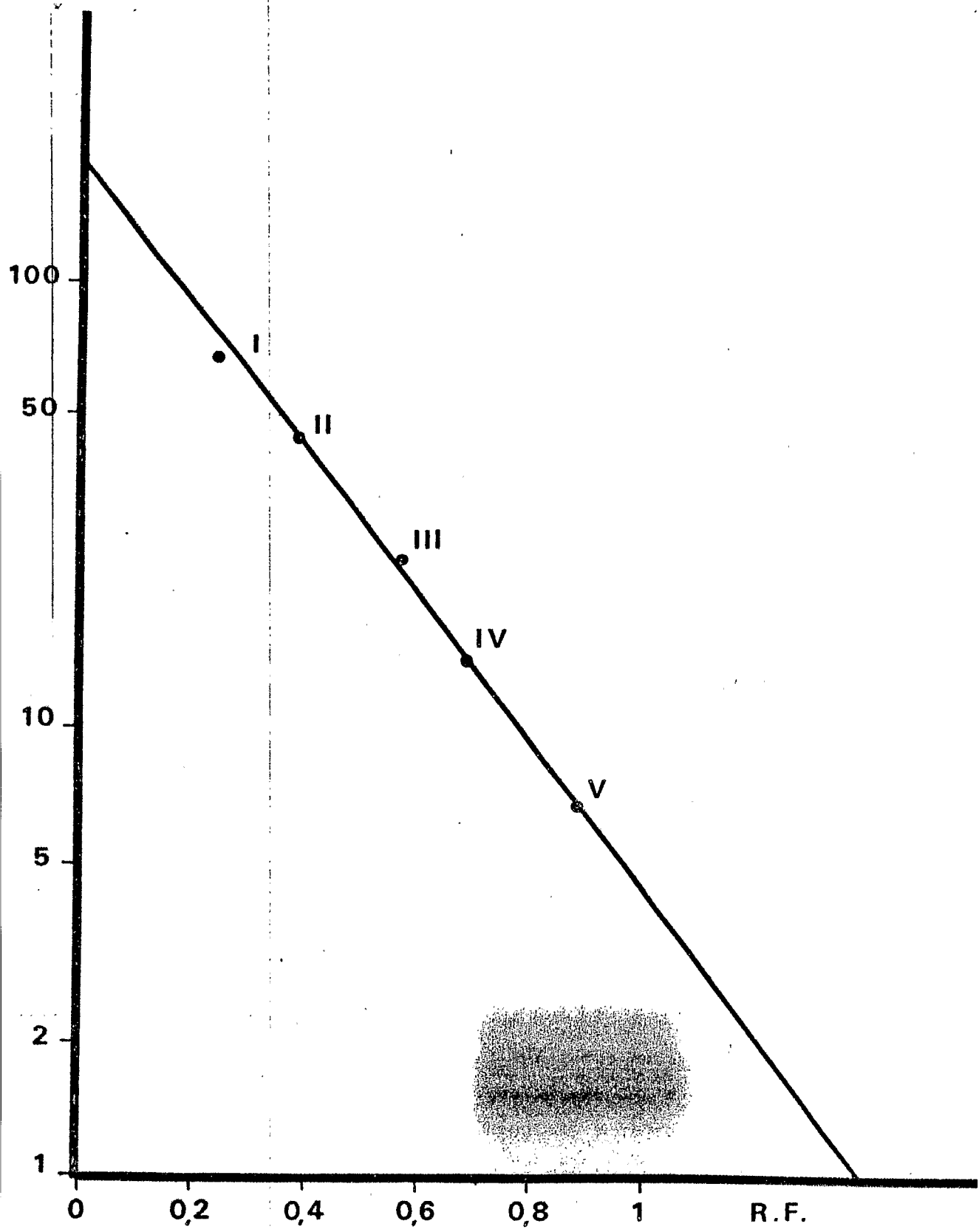
Planche V : Droite d'étalonnage reliant la mobilité relative (R.f)
 au logarithme décimal du poids moléculaire pour
 5 protéines de référence.

Les protéines ont été soumises à une électrophorèse en gel de
 polyacrylamide en gradient 4 - 30 % en conditions non dénaturantes.

Protéines de référence

n°	Protéines	P.M.	R.f
I	Thyroglobulin	669 000	0,236
II	Ferritin	440 000	0,382
III	Catalase	232 000	0,566
IV	Lactate dehydrogenase	140 000	0,678
V	Bovine serum albumin	67 000	0,882

Poids Moléculaire x 10⁻⁴



D. Techniques immunologiques.

1 - Préparation des immun sérums.

a) Anticorps anti-oeufs de Schistocerca gregaria

. Préparation de l'extrait immunogène.

Cinquante oeufs fraîchement pondus de Schistocerca gregaria F., phase grégaire, sont lavés rapidement dans une solution 0,4 M de Na Cl puis broyés au potter dans 2,5 ml de cette même solution. Le broyat est centrifugé 20 mn, à 40°C, à 10.000 G de manière à éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est réparti en 3 lots équivalents (0,5 M Cl environ).

. Immunisation du lapin.

La méthode d'immunisation utilisée dérive de celle préconisée par Vaitukaitis et al. (1971). Un lapin adulte de 3 kg environ a reçu lors de l'immunisation initiale, puis en rappels 25 et 35 jours plus tard 3 ml d'un mélange émulsionné comprenant 1,5 ml d'adjuvant complet de Freund, 1 ml de sérum physiologique et 0,5 ml de l'extrait ovulaire. La réponse immunitaire est renforcée par injection sous-cutanée abdominale de 0,5 ml de Vaccin anticoquelucheux (Vascicoq adsorbé Mérieux). L'injection sous-cutanée du mélange immunogène est faite de 30 à 40 points distribués symétriquement le long de la colonne vertébrale. Chaque injection est précédée par le prélèvement au niveau d'une veine auriculaire marginale de 3 ml de sang. Le sérum recueilli après rétraction du caillot (1h à 37°C ; 12h à 10°) permet de vérifier par immunodiffusion (méthode d'Outcherlony) la présence d'anticorps dirigés contre les diverses protéines ovulaires (vitelline, protéines sanguines).

L'immunsérum recueilli 10 jours après le second rappel par ponction cardiaque est réparti en lots de 1,5 ml et conservé au congélateur, sans adjonction de glycérol ou d'azide de sodium jusqu'au moment de l'utilisation.

b) Immunsérum épuisé : anticorps anti-complexe vitellin.

Un immunsérum spécifique réagissant avec les "fractions protéiques femelles" (vitelline ou vitellogénine) a été obtenu par épuisement en mélangeant à volume égal l'anticorps anti-oeuf et de l'hémolymphe de Criquet mâle. Ce mélange est incubé à 37°C pendant 12 h puis centrifugé 15 mn à 10.000 g. Le surnageant est réparti en fraction de 250 µl puis congelé. La validité de l'épuisement a été appréciée par immunodiffusion, et immunoélectrophorèse. Cet anticorps monospécifique est utilisé pour mettre en évidence la vitellogénine dans l'hémolymphe des femelles aux divers stades.

2 - Immuno diffusion, électro immunodiffusion et immunoélectrophorèse

a) Principe

. Immunodiffusion (Ouchterlony, 1948)

Cette méthode de double diffusion est qualitative, et se prête particulièrement bien à l'étude de systèmes antigéniques complexes (parentées immunologiques existant entre antigènes de diverses origines).

Antigènes et anticorps diffusent à travers un gel d'agarose peu concentré (1 %) ; lorsque le rapport des concentrations atteint sa valeur optimale des arcs de précipitation correspondant à chaque groupe antigénique apparaissent. L'existence des continuités, d'entrecroisements partiels ou complets permet de conclure à l'identité immunologique totale, partielle ou nulle des déterminants présents dans les extraits biologiques.

. Electro immuno diffusion (Grabar et Williams, 1953).

Dans cette méthode qualitative les protéines de la solution antigénique, soumises dans un 1^o temps à une électrophorèse se répartent selon leur charge donc leur mobilité électrophorétique. L'immunodiffusion consécutive fait apparaître des lignes de précipitation spécifiques pour chacun des systèmes antigéniques.

. Immunoélectrophorèse (Laurell, 1966).

La migration électrophorétique des constituants de la solution protéique se fait dans un gel contenant l'antisérum.

Pour l'étude qualitative des protéines hémolympathiques nous utilisons la méthode des dépôts linéaire d'antigène "line immunoélectrophoresis" (Krøll, 1973). L'anticorps peut être plurispécifique et des lignes de précipitation permettent la différenciation des groupes antigéniques. L'étude quantitative est réalisée selon la méthode des rockets "Rockets immunoélectrophoresis" (Laurell, 1966 modifié par Weeke 1973). L'anticorps est alors monospécifique et chaque dépôt d'antigène donne un pic de précipitation. Il existe une corrélation entre la hauteur de ce pic et la concentration de la protéine étudiée contenue dans l'extrait biologique.

b) Préparations du gel et du tampon pour immunoélectrophorèse.

Le gel utilisé dans les différents techniques contient 1 % d'agarose (indubiose A.37. pharmindustrie) dans une solution de tampon pour immunoélectrophorèse, dilué de moitié dans de l'eau distillée.

* Tampon

- Barbitol (Diéthylmalenylurée)	0,013 M	2,47 g
- Na-barbitol	0,05 M	9,75 g
- Tris	0,05 M	5,78 g
- H ₂ O distillée		Q.S. 1 litre

ph : 8,8

Pour l'immunodiffusion nous ajoutons à cette préparation un bactéricide et bactériostatique, l'azide de sodium (1 : 10.000). La solution est mise à chauffer au bain marie (environ 80°C) jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Lors de l'adjonction d'un immunosérum dans le gel, la solution d'agarose doit être refroidie à 45°C-50°C pour éviter la dénaturation des anticorps. Les plaques de verre sur lesquelles sont coulés les gels sont posés sur une table à niveau ; la surface de travail horizontal garantit l'uniformité de l'épaisseur du gel.

c) Réalisation. Immunodiffusion :

Un gel de 1,5 mm d'épaisseur est coulé sur une lame histologique (80,5 x 29,9 mm) soit 3,6 cm³ de gélose par lame. 7 puits disposés aux sommets et au centre d'un hexagone sont pratiqués à l'aide d'un emporte-pièce de 4 mm de diamètre muni d'un dispositif d'aspiration sous vide. 20 µl d'antigène ou d'anticorps sont disposés dans chaque puits. Les lames stockées dans une chambre humide sont mises à incuber à 37° C pendant 24 h.

. Electro immuno diffusion :

Un gel de 1,5 mm d'épaisseur est coulé sur une plaque de verre de 83 sur 93 mm, soit 11,6 cm³ de gélose par plaque.

A l'aide d'un moule L.K.B. nous découpons dans le gel 4 rigoles longitudinales (2,7 x 50 mm) de part et d'autre de 3 puits de 4 mm de diamètre.

20 µl d'antigène sont disposés dans chacun des puits. La plaque est placée dans une cuve à électrophorèse Gelman. Le contact entre le gel et les bacs remplis de tampon pour immunoélectrophorèse est assuré par des ponts de papier Wathman.

L'électrophorèse se déroule sous 150 V à 40°C pendant 2 h ; les fractions protéiques se déplacent vers l'anode. 200 µl d'anticorps sont alors déposés dans chaque rigole, la plaque est stockée en chambre humide et mise à incuber à 37°C pendant 24 h.

• Immunoélectrophorèse

‡ "Line immunoelectrophoresis"

Nous coulons un gel support de 2 mm d'épaisseur sur une plaque de verre de 90 sur 110 mm. Des fenêtres sont découpées à l'aide d'un scapel ; elles sont remplacées par des gels de 1,5 mm contenant soit l'antigène dilué à 25 % dans la gélose, soit l'anticorps à raison de 5 μ l/c. Dans nos conditions expérimentale la migration s'effectuant de la cathode vers l'an-ode, le dépôt d'antigène s'effectue à 5 mm du bord cathodique du dépôt d'anticorps. La disposition et la taille des fenêtres varient selon le nombre des extraits à tester. La plaque est placée dans une cuve Gelman. L'électrophorèse se déroule à 4°C pendant 15 h sous 100 V.

‡ "Rocket immunoelectrophoresis"

Nous utilisons une plaque de verre et 110 sur 205 mm. Une grande fenêtre de 60 sur 180 mm est découpée dans le gel support de 2 mm d'épaisseur. Nous y coulons un gel de 1, cm d'épaisseur contenant l'anticorps à raison de 0,75 μ l/cm². 21 puits de 2 mm de diamètre distants l'un de l'autre de 8 mm sont creusés à 5 mm du bord cathodique du gel contenant l'immunsérum. Le gel est placé sur la plaque réfrigérée d'une cuve à électrophorèse L.K.B.2117. Les ponts de papier filtre reliant le gel au tampon des cuves doivent être de même largeur que la plaque. Le dépôt des antigènes se déroule sous une tension de 70 V, pour éviter une diffusion préalable à la migration. 5 μ l, de solution de la protéine standard ou de la solution à doser, sont versés dans chaque puits à l'aide d'une micropipette Ziptrol. L'électrophorèse se déroule à 280 V pendant 4 h 1/2, la plaque étant refroidie par le courant d'eau qui circule dans le support.

d) Séchage et coloration

La plaque de gélose est soumise alternativement à des séries de lavages et de pressages. Elle est d'abord lavée dans 4 bains d'eau physiologique (NaCl 9 %) de 10 minutes chacun afin d'éliminer les protéines non

précipitées, puis dans 2 bains d'eau distillée pour entraîner l'excédent de sel. Entre chaque bain la plaque est pressée pendant 15 minutes sous une bande de papier-filtre humide, et plusieurs épaisseurs de papier absorbant. La plaque est alors séchée à l'étuve (50 à 60°C). La coloration se fait dans une solution, filtrée avant usage, de bleu de Coomassie, pendant 15 minutes. Les plaques sont alors différenciées dans une solution de décoloration.

- Colorant pour immunologie

- Bleu de Coomassie 0,5 %
- Ethanol 95° 45 %
- Acide acétique 10 %
- H₂O distillée Q.S. 1 litre.

- Décolorant pour immunologie

- Ethanol 95° 45 %
- Acide acétique 10 %
- H₂O distillée Q.S. 1 litre

II. Résultats

A. Dosage des protéines.

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Lowry dans l'hémolymphe de femelles adultes saines et infestées parvenues au même stade de leur développement ovarien (caractérisé par la longueur des ovocytes terminaux) et dans l'hémolymphe de mâles.

Pour chacun des lots d'animaux étudiés, trois dosages ont été réalisés et pour chacun d'entre eux, la quantité de protéines exprimée en ug de protéines / μ l d'hémolymphe a été déterminée par comparaison avec la gamme étalon (Albumine sérique bovine :BSA).

Les valeurs reportées dans le tableau ci-dessous sont les moyennes des séries de 3 mesures.

La présence de parasites entraîne une réduction du taux des protéines hémolympatiques, dans les deux sexes. Cette diminution est moins importante chez le mâle (8 %) que chez la femelle où elle atteint son maximum en fin de vitellogenèse (30 %).

	O sain	O inf.	♀ saine ovo.2-4mm	♀ inf. ovo.2-4 mm	♀ saine ovo.5-7 mm	♀ inf. ovo.5-7 mm
ug protéines ul d'hémolymphe	37,5	34,8 (- 8%)	39,1	33,6 (-15%)	35,5	25,1 (-30%)

B. Techniques électrophorétiques.

1°) Electrophorèse en gel neutre homogène.

Les protéines natives de l'hémolymphe des adultes mâles et femelles sains ou parasités de Schistocerca gregaria ont été soumises à l'électrophorèse en présence de gels homogènes comportant 6,7,8 et 9 % de polyacrylamide. Après coloration, les bandes protéiniques ont été dénombrées, caractérisées par leur R.f, leur poids moléculaire, et estimées en valeur relative par lecture à l'aide d'un densitomètre intégrateur VERNON. Chaque série expérimentale a été répétée de 3 à 6 fois. Les résultats indiqués dans les tableaux sont des moyennes.

- La meilleure définition du spectre protéinique (nombre de bandes, dispersion) a été obtenue à l'aide de gels à 6 et 7 % de polyacrylamide qui seront seuls pris en considération et illustrés (planches VI, VII, VIII et XIV fig.1).

- 1 - Un maximum de 13 bandes protéiniques peut être détecté (gel à 6 %). Les protéines de faible mobilité disparaissent progressivement lorsque la concentration de polyacrylamide augmente (tableau 1).
- 2 - Les bandes 1 et 2' caractérisent le criquet mâle alors que les bandes 1', 2 et 6 sont représentatives du sexe femelle. Le dimorphisme sexuel apparaît de nouveau.
- 3 - Les bandes 3 (PM:347 000), 3', 4 (PM: 258 000), 4' (PM:110 000), 5 (PM:40 000) et 9 (PM:14000) sont communes aux deux sexes. La bande 4 est particulièrement intense chez les femelles; les protéines correspondant à la bande 4 sont, chez tous les criquets étudiés les plus abondantes (tableau 2 et 3).
- 4 - La présence du parasite Malameba l. se traduit
 - par la disparition de la bande 7 (PM: 26 000), au moins chez la femelle;
 - par une diminution du taux des protéines correspondant aux bandes 2, 2', 3, 3', 8 (PM: 15 000).
 - par une augmentation du taux de protéines correspondant à la bande 4'; ce phénomène inattendu, compte-tenu de la chute globale de la protéinémie des animaux infestés pourrait résulter d'une accumulation des protéines normales et des protéines issues du parasite ou de son métabolisme.

2°) Electrophorèse en gel neutre en gradient 4-30 %.

L'hémolymphe de criquets adultes mâles et femelles, en fin de vitellogénèse, a été soumise à l'électrophorèse sur gel neutre en gradient 4 - 30 %.

Cette méthode, contrairement à la précédente, permet de révéler des protéines

Tableau 1

% Poly- acrylamide	♀ saine ovocyte : 2-4 mm			♀ infestée ovocyte : 2-4 mm			♀ saine ovocyte : 5- 7mm			♀ infestée ovocyte :5- 7mm			♂ sain			♂ infesté		
	n°	Rf	%	n°	Rf	%	n°	Rf	%	n°	Rf	%	n°	Rf	%	n°	Rf	
6 %							1'	0,067	21,3	1'	0,060	19,1	1	0,056	5,7			
							2	0,097	3,3	2	0,101	3,5	2'	0,135	2,1			
							3	0,150	10,8	3	0,150	5,4	3	0,150	12,2			
							4	0,236	14,2	4	0,233	17,0	3'	0,195	3,3			
							4'	0,263	17,14	4'	0,263	25,39	4	0,233	11,2			
							7	0,507	2,3	5	0,379	3	4'	0,270	23,0			
							8	0,740	1,4	9	0,883	1	5	0,387	8,8			
													8	0,744	6,1			
													9	0,883	10,0			
7 %	2	0,035	6,4	2	0,035	4,4	2	0,030	5,7	2	0,035	5,0	2'	0,020	4,8	2'	0,031	1
	3	0,054	13,2	3	0,062	12,5	3	0,058	9,6	3	0,058	6,6	3	0,050	10,1	3	0,050	13
	3'	0,079	14,0	3'	0,109	4,9	3'	0,090	13,3	3'	0,082	1,2	3'	0,085	17,7	3'	0,109	1
	4	0,132	14,0	4	0,136	11,2	4	0,130	15,0	4	0,127	13,3	4	0,125	10,2	4	0,128	7
	4'	0,171	17,6	4'	0,175	23,7	4'	0,175	15,2	4'	0,175	16,7	4'	0,167	14,8	4'	0,164	24
	5	0,281	3,0	5	0,281	6,7	5	0,283	2,8	5	0,285	5,9	5	0,277	8,4	5	0,273	3
	6	0,359	3,0				6	0,373	3,3									
	7	0,500	7,6				7	0,550	3,4				7	0,492	7,1			
	8	0,605	13,5	8	0,609	1	8	0,609	10,2				8	0,609	18,9	8	0,601	3
									9	0,730	4,2	9	0,726	3,7	9	0,718	3	
8 %	3	0,027	13,1	3	0,034	9,4				3	0,031	4,1	3	0,027	6,1	3	0,020	14
	4	0,086	16,4	4	0,093	15,5	4	0,075	14,8	4	0,089	14,6	4	0,086	13,6	4	0,075	12
	4'	0,151	16,2	4'	0,155	29,5	4'	0,140	17,8	4'	0,148	21,8	4'	0,151	24,3	4'	0,141	38
	5	0,262	3,7	5	0,255	7,1	5	0,246	7,5	5	0,248	7,3	5	0,248	9,5	5	0,237	7
							7	0,404	3,2									
	8	0,475	8,3	8	0,482	7,9	8	0,462	8,5	8	0,475	2,1	8	0,465	7,8	8	0,455	5
	9	0,558	1	9	0,558	2				9	0,555	3,2	9	0,544	4,2	9	0,537	3
							4	0,024	8,4	4	0,023	10,4	4	0,025	7,9			
9 %						4'	0,069	24,6	4'	0,078	27,1	4'	0,081	20,8				
						5	0,170	8,0	5	0,175	8,7	5	0,177	11,2				
						7	0,341	3,7										
						8	0,426	5,8	8	0,429	2,1	8	0,409	9,2				
									9	0,519	4,6	9	0,498	12,9				

Electrophorèse sur gels neutres homogènes de polyacrylamide à 6 %, 7 %, 8 % et 9 %.

Chaque protéine est caractérisée par son Rf et estimée en valeur relative.

Tableau 2

Proteines % Acryl.	1	1'	2	2'	3	3'	4	4'	5	6	7	8	9
6 % Rf	0,056	0,063	0,099	0,135	0,150	0,195	0,220	0,265	0,383			0,742	0,883
100 Log (Rfx100)					117,6		134,0	142,3	158,3			187,0	194,5
7 % Rf			0,035		0,055	0,095	0,130	0,171	0,279	0,373	0,525	0,606	0,724
100 Log (Rfx100)					74,0		111,3	123,2	144,5		172,0	178,2	185,9
8 % Rf					0,027		0,084	0,147	0,249	0,404	0,469	0,550	
100 Log (Rfx100)					43,1		92,4	116,7	139,6	160,6	167,1	174,0	
9 % Rf							0,026	0,076	0,174	0,341	0,421	0,508	
100 Log (Rfx100)							41,0	88,0	124,0	153,2	162,4	170,5	
Pente					37,25		29,79	16,94	10,78	9,39	8,49	8,39	
Poids moléculaire					347 000		258 000	110 000	40 000	26 000	15 000	14 000	

Electrophorèse sur gels neutres homogènes de polyacrylamide à 6%,7%,8% et 9%

Détermination du poids moléculaire des protéines : méthode de Hedrick et Smith (1968).

Tableau 3

N° protéines	♂ sain	♂ inf.	♀ saine 2-4	♀ inf. 2-4	♀ saine 5-7	♀ inf. 5-7
1						
1'						
2			6,4 %	4,4 %	5,7 %	3,5 %
2'	4,8 %	1,6 %				
3	10,2 %	13,8 %	13,1 %	10,9 %	8,6 %	5,3 %
3'	17,5 %	1,0 %	10,0 %	4,9 %	8,2 %	1,2 %
4	10,2 %	9,8 %	14,8 %	13,3 %	15,0 %	13,8 %
4'	20,7 %	31,6 %	17,6 %	26,6 %	17,1 %	20,6 %
5	9,4 %	5,5 %	3,0 %	6,9 %	7,7 %	6,1 %
6			3 %		3,3 %	
7	7,1 %	2,0 %	7,6 %		3,1 %	
8	10,2 %	4,1 %	13,5 %	4,4 %	10,2 %	2,1 %
9	7,7 %	3,1 %	1,0 %	2,0 %		3,2 %

Electrophorèse sur gels neutres homogènes de polyacrylamide à 6%, 7%, 8% et 9%

Estimation en valeur relative du taux moyen de chaque protéine

Planche VI

Electrophorèse sur gel neutre homogène de polyacrylamide
à 7 %

Enregistrements densitométriques

Fig. A : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle
adulte saine (ovocyte 2 - 4 mm)

Fig. B : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle
adulte infestée (ovocyte 2 - 4 mm).

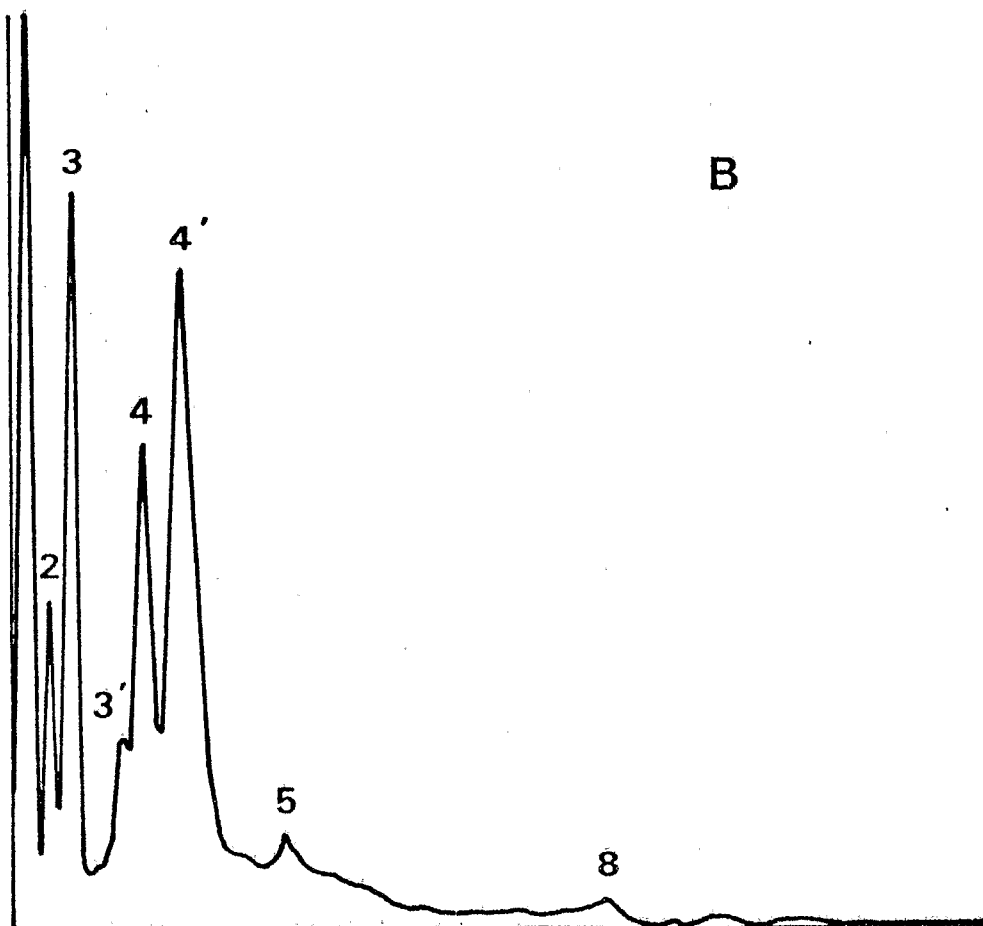
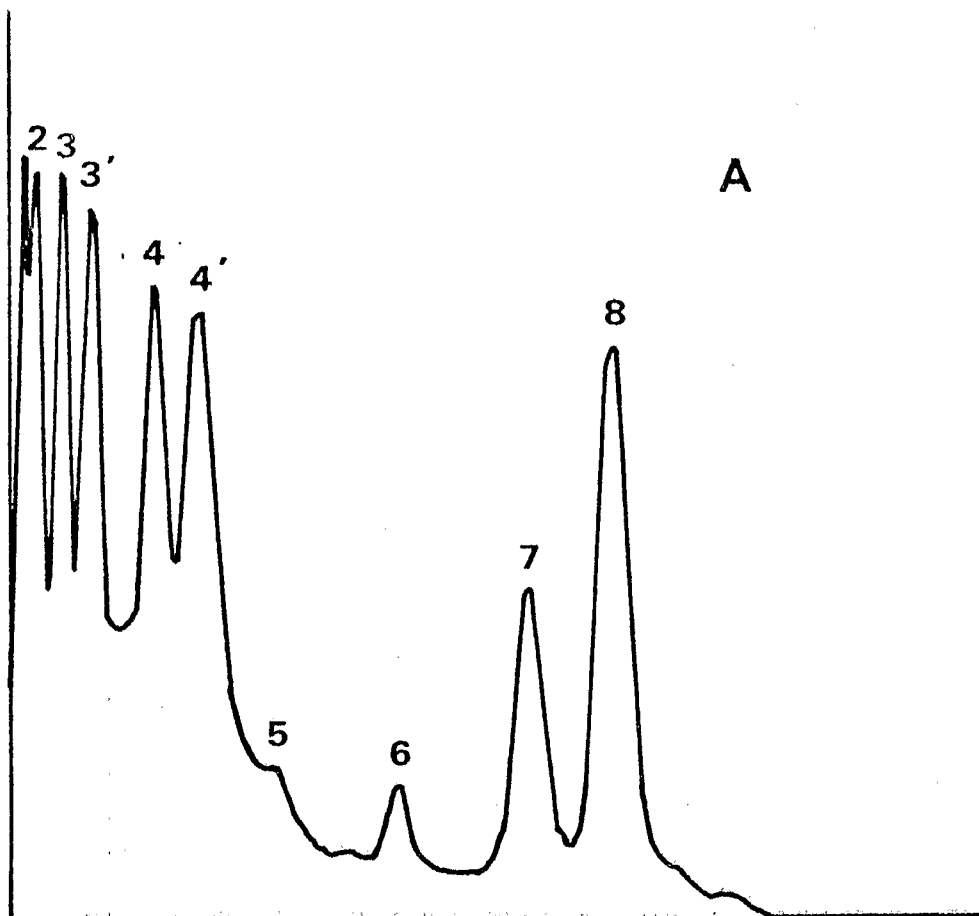


Planche VII

Electrophorèse sur gel neutre homogène de polyacrylamide
à 7 %

Enregistrements densitométriques

Fig. C : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle
adulte saine (ovocyte 5 - 7 mm)

Fig. D : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle
adulte infestée (ovocyte 5 - 7 mm).

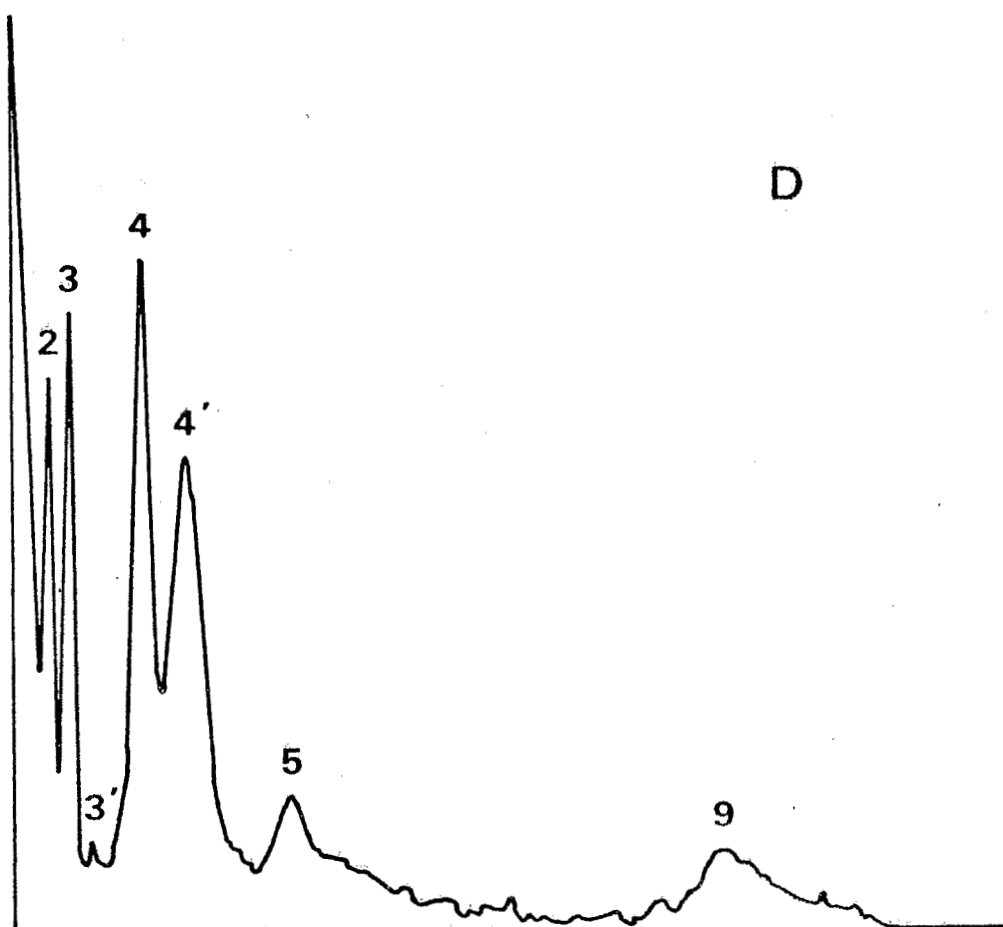
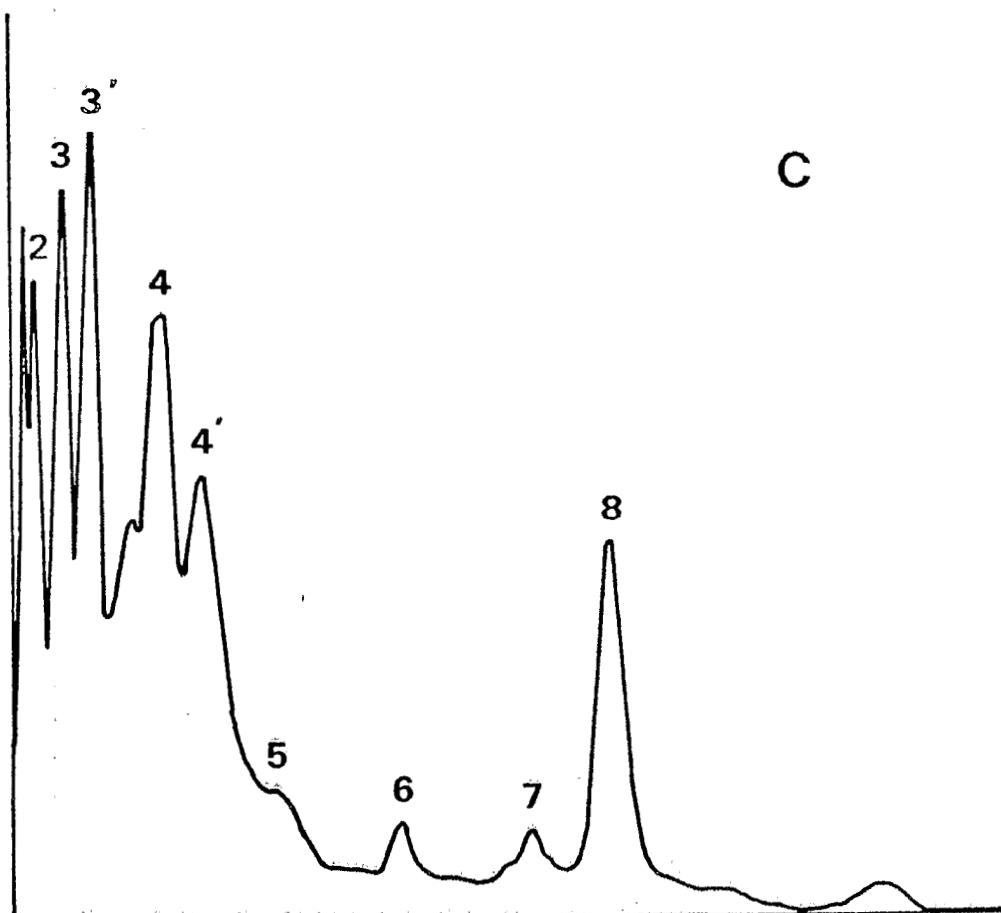


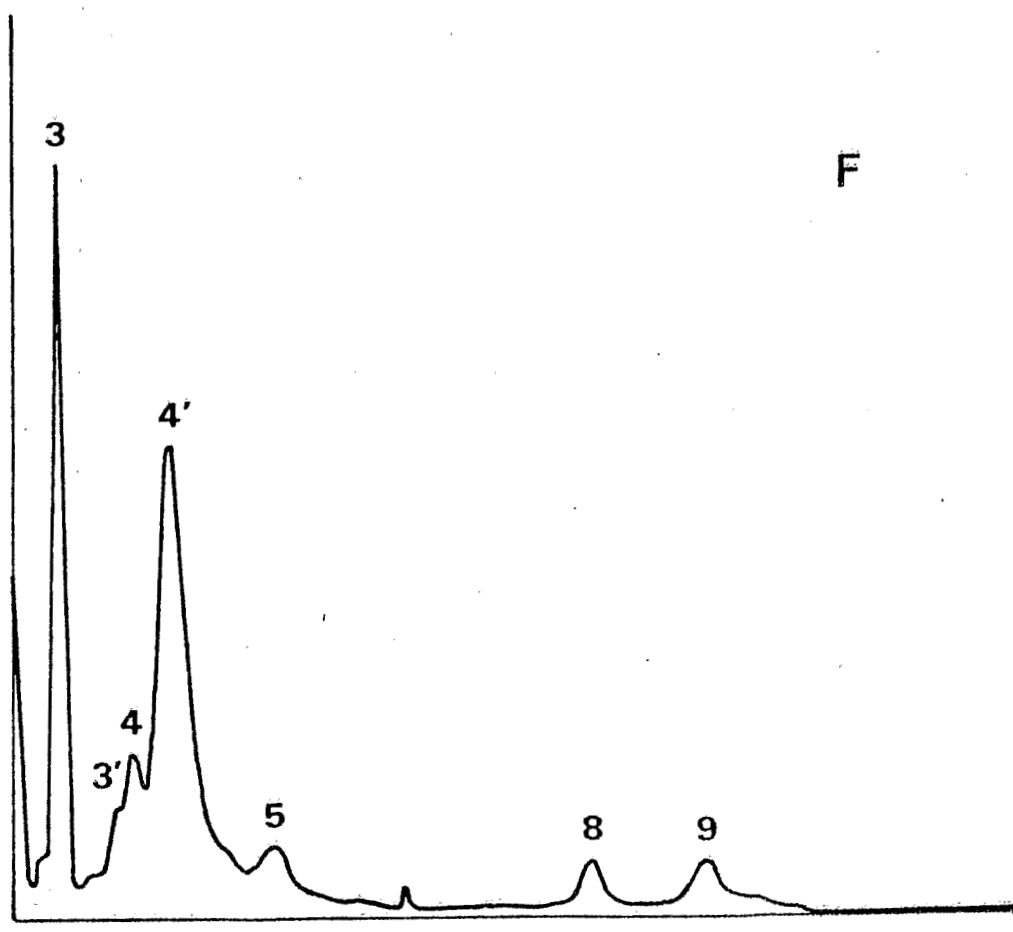
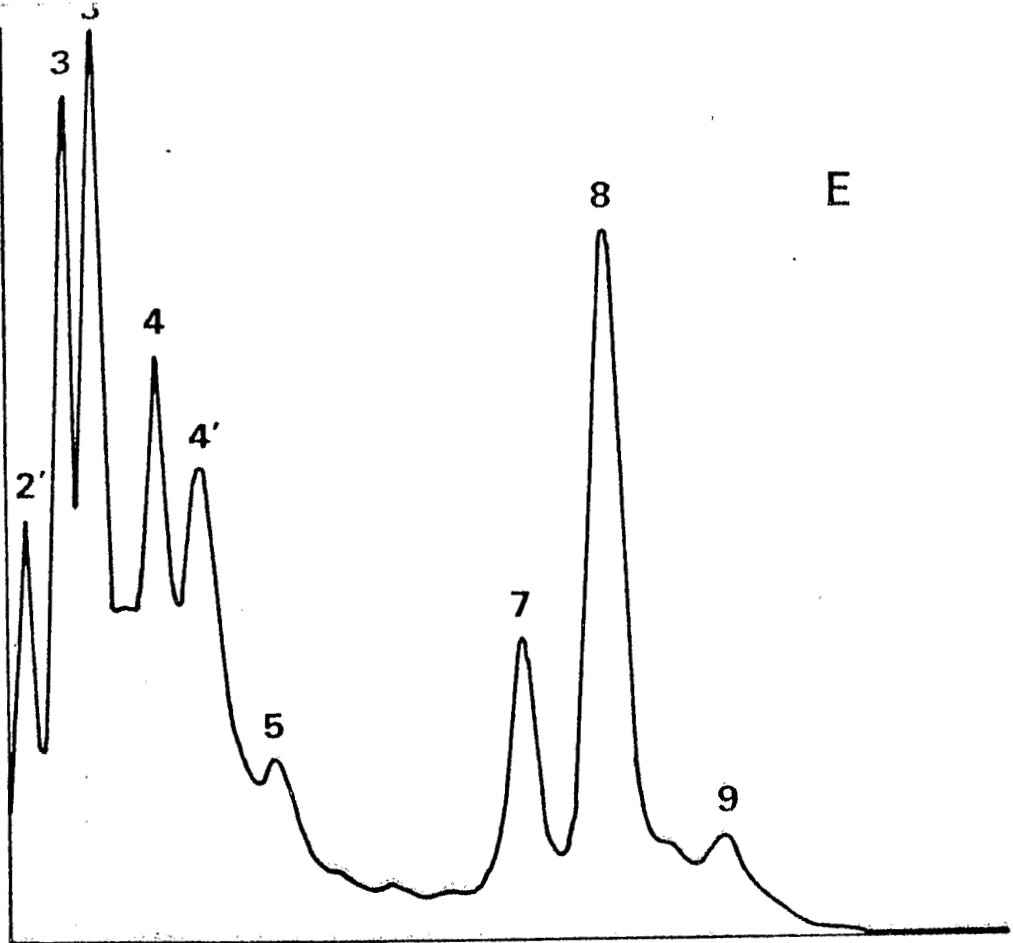
Planche VIII

Electrophorèse sur gel neutre homogène de polyacrylamide
à 7 %

Enregistrements densitométriques

Fig. E : Electrophorégramme d'hémolymphe de mâle
adulte sain

Fig. F : Electrophorégramme d'hémolymphe de mâle
adulte infesté.



de hauts poids moléculaires.

Chaque expérience a été répétée cinq fois; les résultats indiqués sont des moyennes.

- 1 - Un maximum de 16 bandes protéiniques peut être détecté (planche IX, X et XIV fig.2).
- 2 - Les bandes A,B (PM:820 000), G (PM:410 000), H (PM: 360 000), I (PM: 300 000) et N (PM:66 000) caractérisent les criquets femelle. alors que la bande L' (PM:115 000) est représentative du sexe mâle. Ces observations mettent en évidence le dimorphisme lié au sexe (tableau 4).
- 3 - Les bandes C (PM:730 000), D (PM:510 000), E (PM:470 000), F (PM:440 000), J (PM: 260 000), K(PM:160 000), L (PM: 120 000) et M (PM:96 000) sont communes aux deux sexes. Les bandes C et L sont particulièrement intenses chez la femelle.
- 4 - L'influence du parasitisme se traduit :
 - par la disparition des bandes A,B,G,H,I et K chez les femelles, et des bandes C,D,K et L chez les mâles.
 - par une diminution du taux des protéines correspondant aux bandes C,L,M et N chez la femelle et aux bandes F et Y chez le mâle.
 - par une augmentation du taux des protéines correspondant aux bandes D,E,F et J chez la femelle et aux bandes E et L' chez le mâle où nous assistons même à l'apparition d'une bande supplémentaire chez les individus infestés : C' (PM:600 000). Ce phénomène rejoint les observations précédentes et serait dû à une accumulation de protéines issues du parasite.

3°) Electrophorèse en conditions dénaturantes.

Après dénaturation à chaud en présence de B-mercaptoethanol, les protéines de l'hémolymphe des adultes mâles et femelles sains ou parasités de Schistocerca gregaria sont soumises à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à la concentration de 9% en présence de SDS. La séparation des sous-unités polypeptidiques s'observe après coloration. Chaque bande protéinique a été caractérisée par son R.f, son poids moléculaire et estimée en valeur relative par lecture à l'aide d'un densitomètre intégrateur VERNON. Chaque série expérimentale a été répétée de 2 à 6 fois. Les résultats indiqués dans le tableau sont des moyennes.

Tableau 4

Protéine	Rf	♀ saine 5-7	♀ inf. 5-7	♂ sain	♂ inf.	P.M.
A	0,136	4,3 %				
B	0,210	13,2 %				820 000
C	0,246	15,6 %	9 %	3,8 %		730 000
C'	0,299				7 %	600 000
D	0,340	7,2 %	10,2 %	3,7 %		510 000
E	0,363	3,3 %	4,5 %	6,9 %	8,6 %	470 000
F	0,383	2,0 %	3,8 %	8,9 %	6,4 %	440 000
G	0,394	1,7 %				410 000
H	0,431	0,7 %				360 000
I	0,482	1,6 %				300 000
J	0,516	2,7 %	17,1 %	33,4 %	13,0 %	260 000
K	0,646	2,7 %		6,1 %		160 000
L	0,719	17,3 %	15,4 %	7,1 %		120 000
L'	0,738			9,0 %	12,2 %	115 000
M	0,784	4,6 %	3,0 %		11,2 %	96 000
N	0,891	0,6 %	0,4 %			66 000

Electrophorèse sur gel neutre de polyacrylamide en gradient 4- 30 %

Chaque protéine est caractérisée par son Rf, son poids moléculaire, et estimée en valeur relative

Planche IX

Electrophorèse sur gel neutre de polyactylamide
en gradient 4 - 30 %

Enregistrements densitométriques

Fig. 1 : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle
adulte saine (ovocyte 5 - 7 mm)

Fig. 2 : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle
adulte infestée (ovocyte 5 - 7 mm).

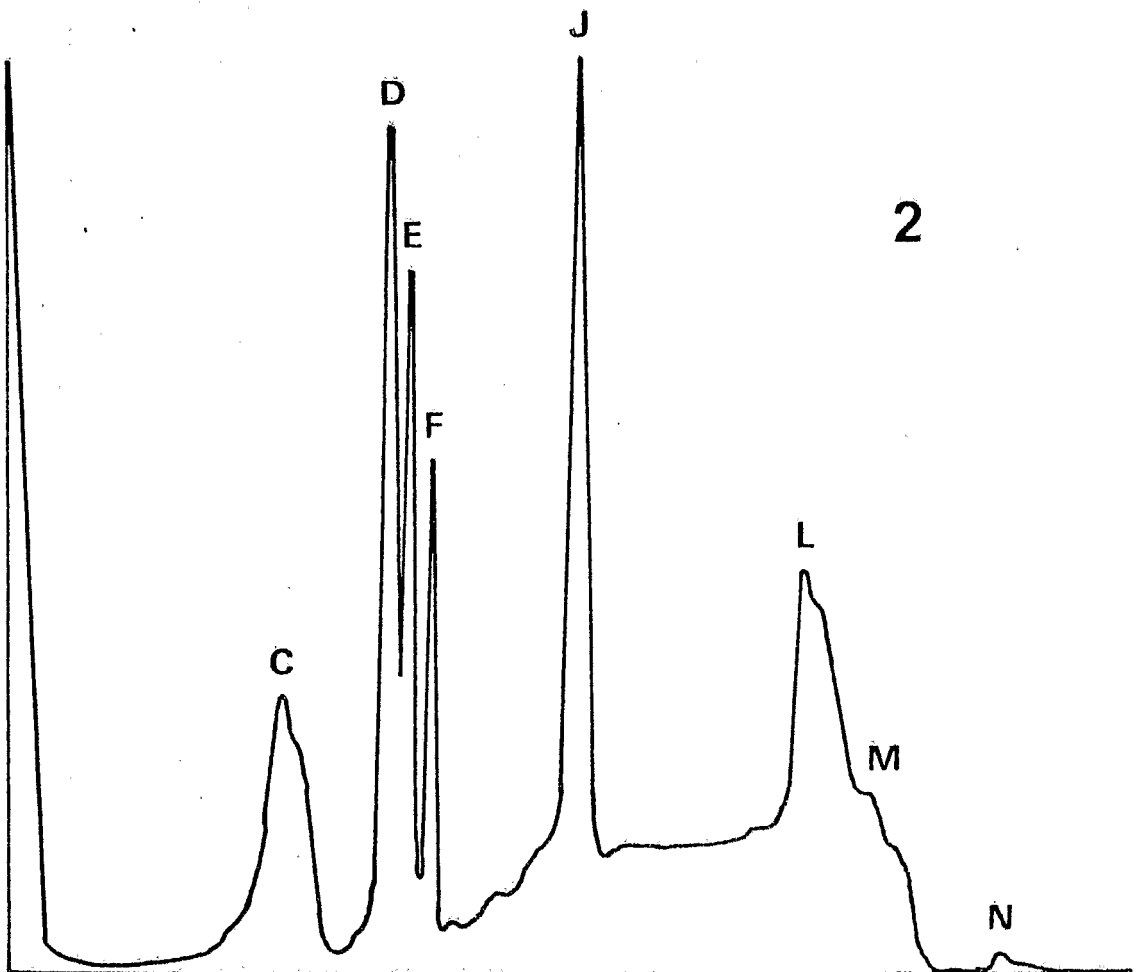
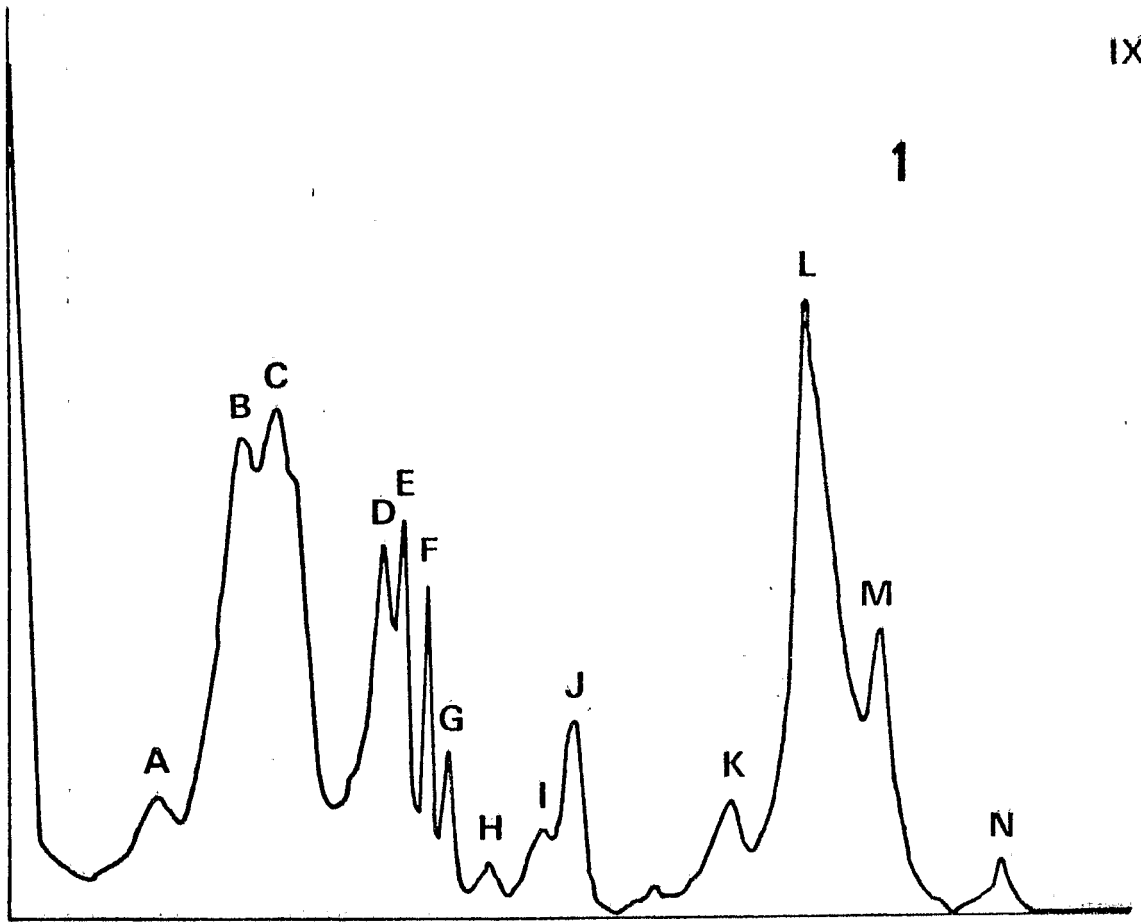


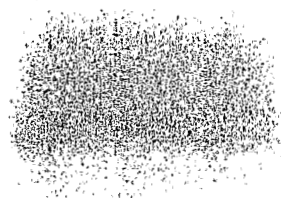
Planche X

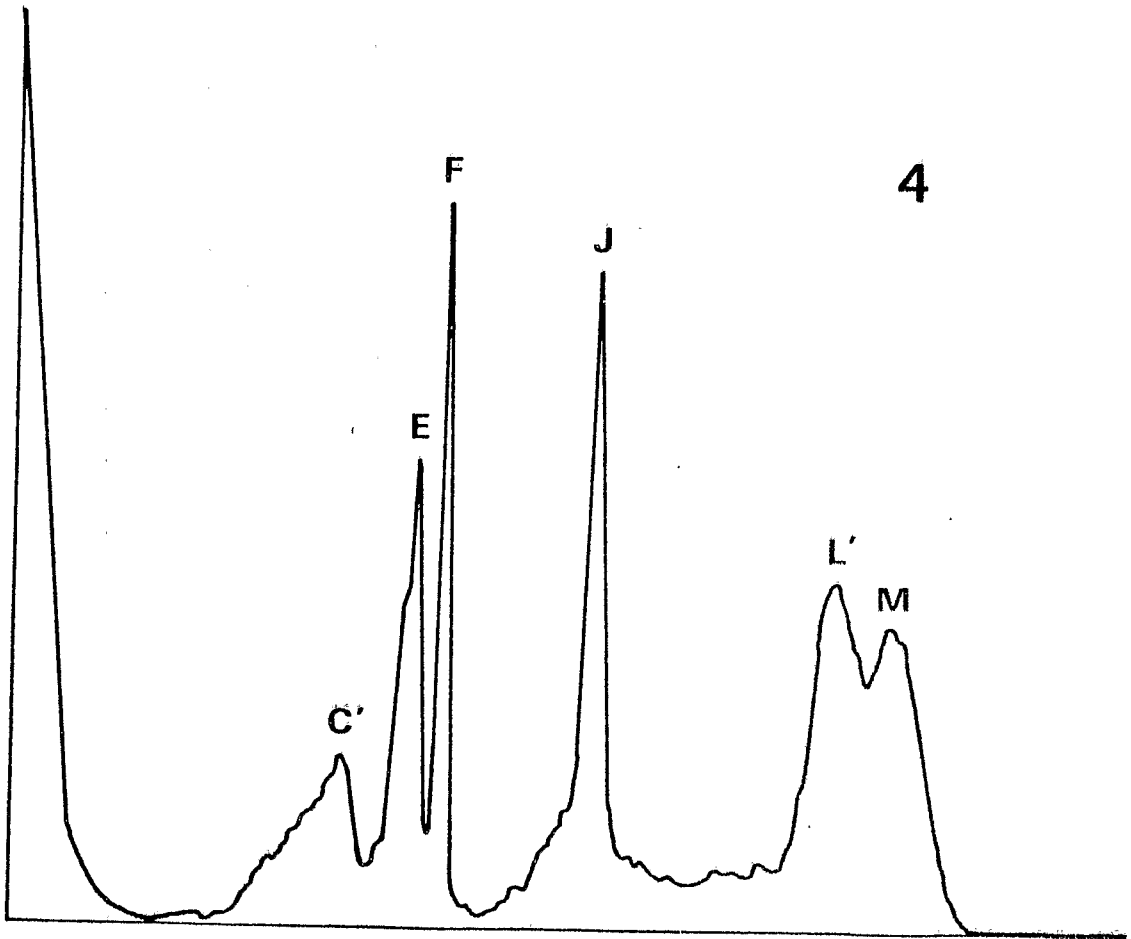
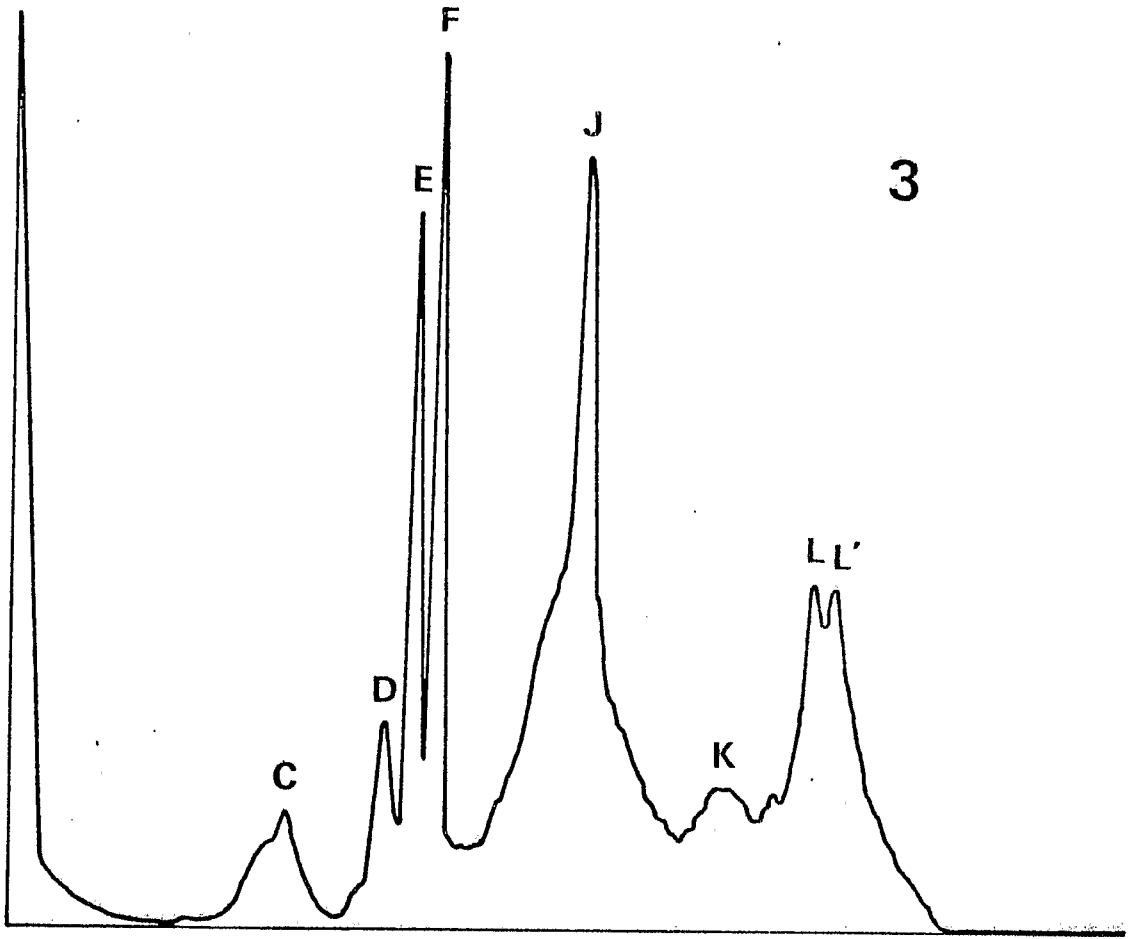
Electrophorèse sur gel neutre de polyacrylamide
en gradient 4 - 30 %

Enregistrements densitométriques

Fig. 3 : Electrophorégramme d'hémolymphe
de mâle adulte sain.

Fig. 4 : Electrophorégramme d'hémolymphe
de mâle adulte infesté.





- 1 - Un maximum de 14 bandes protéiniques peut être détecté (planches XI XII, XIII et XV figs. 1, 2 et 3).
- 2 - Les ^{bandes} c (PM:120 000) et f (PM:88 000) caractérisent les criquets mâle alors que les bandes b (PM:140 000), d (PM:105 000), e (PM:94 000), j (PM:61 000) et m (PM 49 000) sont représentatives du sexe femelle. Le dimorphisme sexuel apparaît de nouveau (tableau 5).
- 3 - Les bandes a (PM: 150 000), G (PM: 82 000), h (PM: 78 000), i (PM: i (PM: 69 000), k (PM:56 000), l (PM: 53 000) et n (PM: 29 000) sont communes aux 2 sexes.
- 4 - La présence du parasite Malameba l. se traduit :
 - par la disparition de la bande l chez le mâle
 - par une diminution du taux des protéines correspondant aux bandes a et i chez les mâles, aux bandes d, i, l, m et n chez les femelles en cours de vitellogenèse, et aux bandes a, g, h, i, j, k, l, et m chez les femelles en fin de vitellogenèse.
 - par une augmentation du taux des protéines correspondant, à la bande c chez le mâle où nous assistons même à l'apparition de la bande g absente dans l'hémolymphe du mâle sain, aux bandes a, g et h chez la femelle en cours de vitellogenèse et aux bandes d, e et n chez la femelle en fin de vitellogenèse. Ce phénomène, résultant d'une accumulation de protéines issues du parasite ou de son métabolisme, apparaît de nouveau.

C. Techniques immunologiques.

1°) Immuno-diffusion.

La méthode de double diffusion mettant en présence les anti-corps soit anti-oeuf soit anti-vitellogénine et des extraits hémolympatiques de mâles et de femelles adultes permet d'obtenir 3 arcs de précipitation. Des déterminants antigéniques sont communs à l'extrait d'oeuf et à l'hémolymphe de femelle mature (planche XVI, fig.1); le déterminant le moins mobile est propre au sexe ♀ et n'apparaît qu'à maturation sexuelle (planche XVI, figs. 2 et 3). Il est reconnu par l'anti-corps monospécifique et peut donc être homologué à la vitellogénine (planche XVI, fig.4).

2°) Electro-immunodiffusion .

L'analyse par electro-immunodiffusion des extraits d'hémolymphe ♂ et ♀ en présence de l'anticorps anti-oeuf permet d'obtenir 6 arcs de précipitation et confirme l'existence du dimorphisme lié au sexe. Un arc particulièrement intense caractérise l'hémolymphe ♀ et les extraits d'oeufs; Etant reconnu par l'anti-corps anti-vitellogénine, il correspond au complexe

Tableau 5

n°	Rf	PM	♀ saine 2-4	♀ inf. 2-4	♀ saine 5-7	♀ inf. 5-7	♂ sain	♂ inf.
a	0,24	150 000	5,5%	8,0 %	3,2 %	1,3 %	3 % ++	+
b	0,48	140 000	12,6%	12,2 %	11,8 %	11,4 %		
c	0,106	120 000					4,7 % ++	+++
d	0,139	105 000	20,8%	17,8 %	13,7 %	19,6 %		
e	0,175	94 000	11,4%	10,8 %	10,8 %	13,6 %		
f	0,193	88 000					20,3 % +++	+++
g	0,217	82 000	13,1%	16,2 %	18,2 %	17,5 %	-	+++
h	0,241	78 000	9,0%	11,2 %	14,5 %	3 %	27 % ++++	++++
i	0,283	69 000	3,0 %	2,0 %	3,6 %	2,7 %	2,8 % ++	+
j	0,326	61 000	5,3 %	5,8 %	5,6 %	5,0 %		
k	0,358	56 000	5,5 %	5,7 %	7,6 %	5,3 %	3,8 % ++	++
l	0,381	53 000	3,0 %	2,2 %	3,7 %	3,0 %	3,8 % ++	-
m	0,409	49 000	1,9 %	0,8 %	2,0 %	1,1 %		
n	0,684	29 000	3,7 %	1,0 %	1,2 %	4,1 %	13,1 % +++	+++

Caractères physico-chimiques et estimation en valeur relative des sous-unités polypeptidiques de l'hémolymphe de criquets adultes mâles et femelles sains ou infestés. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide - SDS à la concentration de 9 %.

Planche XI

Electrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide
à 9 % en présence de S.D.S.

Enregistrements densitométriques

Fig. 1 : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle
adulte saine (ovocyte 2 - 4 mm)

Fig. 2 : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle
adulte infestée (ovocyte : 2 - 4 mm).

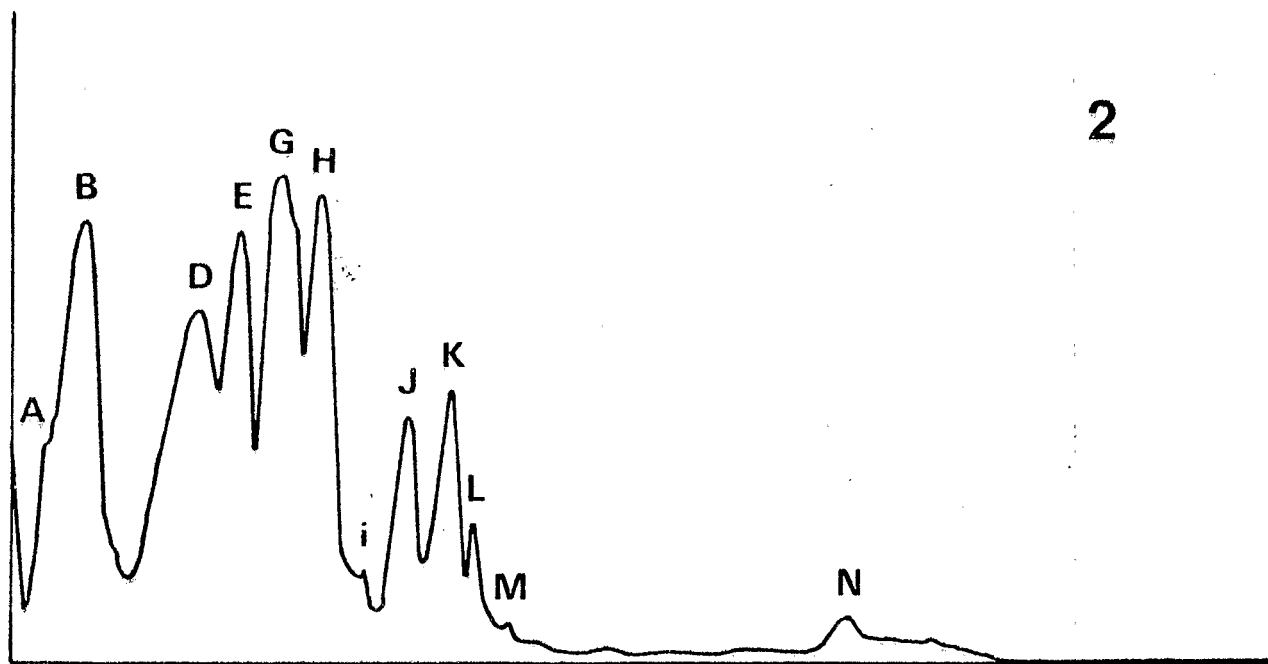
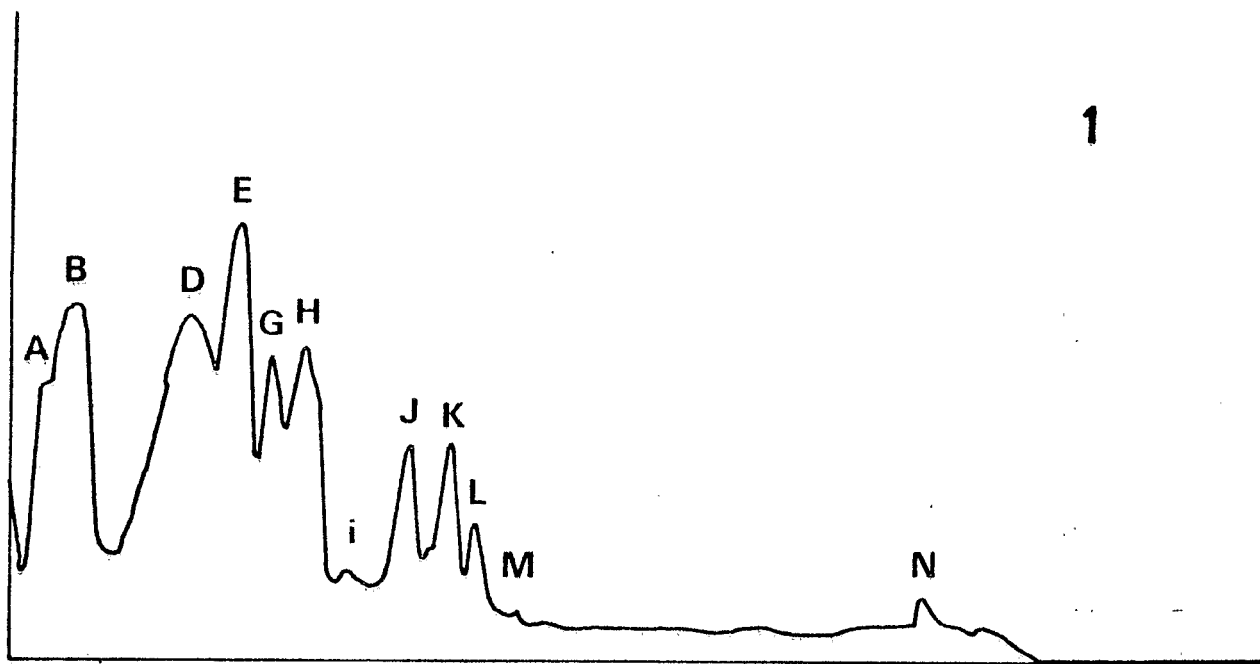


Planche XII

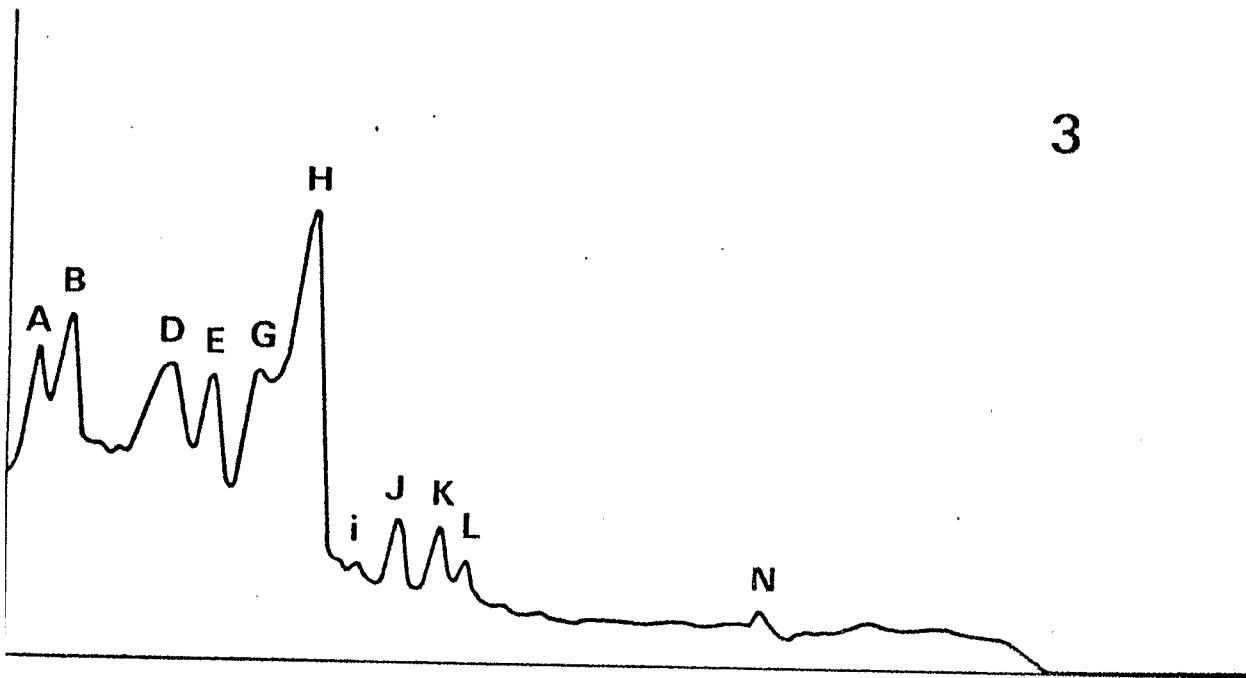
Electrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide
à 9 % en présence de S.D.S.

Enregistrements densitométriques

Fig. 3 : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle adulte
saine (ovocyte 5 - 7 mm)

Fig. 4 : Electrophorégramme d'hémolymphe de femelle adulte
infestée (ovocyte 5 - 7 mm).

3



4

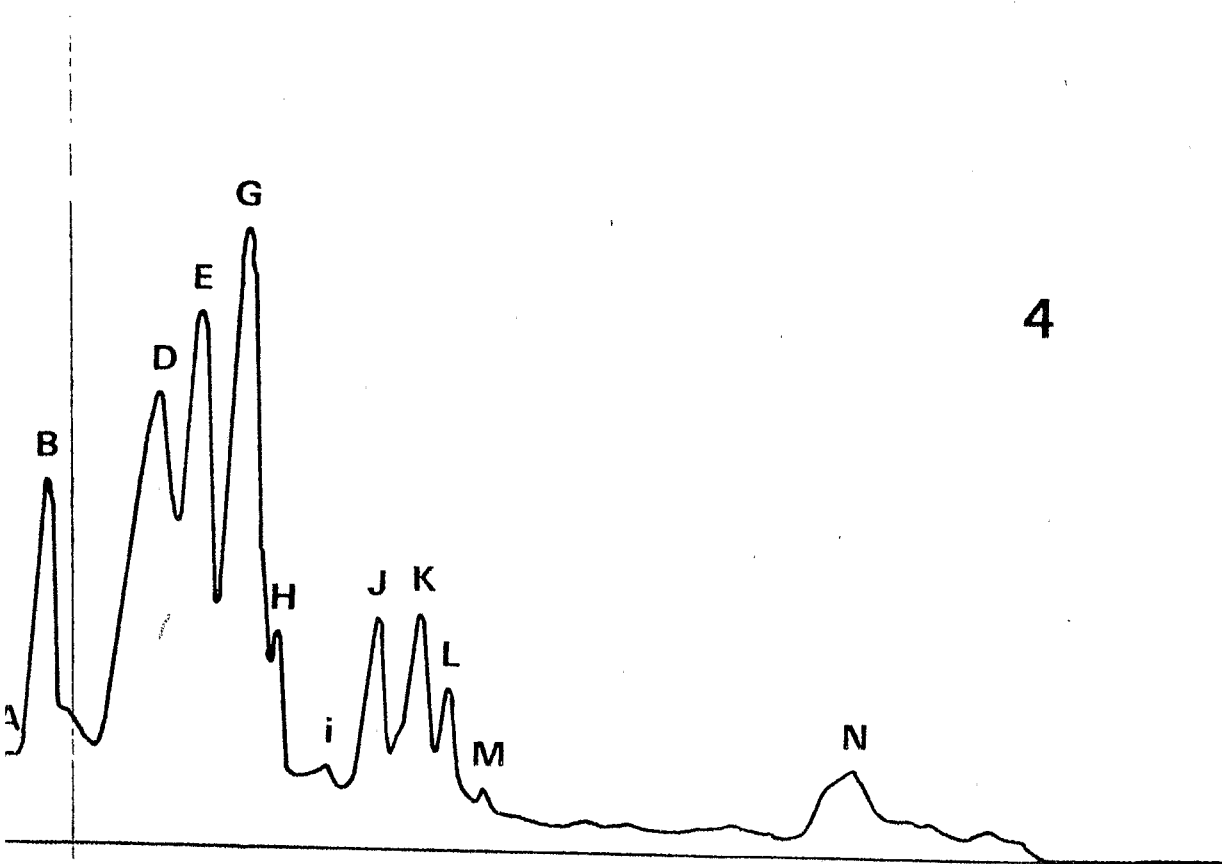


Planche XIII

Electrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide
à 9 % en présence de S.D.S.

Enregistrements densitométriques

Fig. 5 : Electrophorégramme d'hémolymphe de mâle adulte sain.

Fig. 6 : Electrophorégramme d'hémolymphe de mâle adulte infesté.

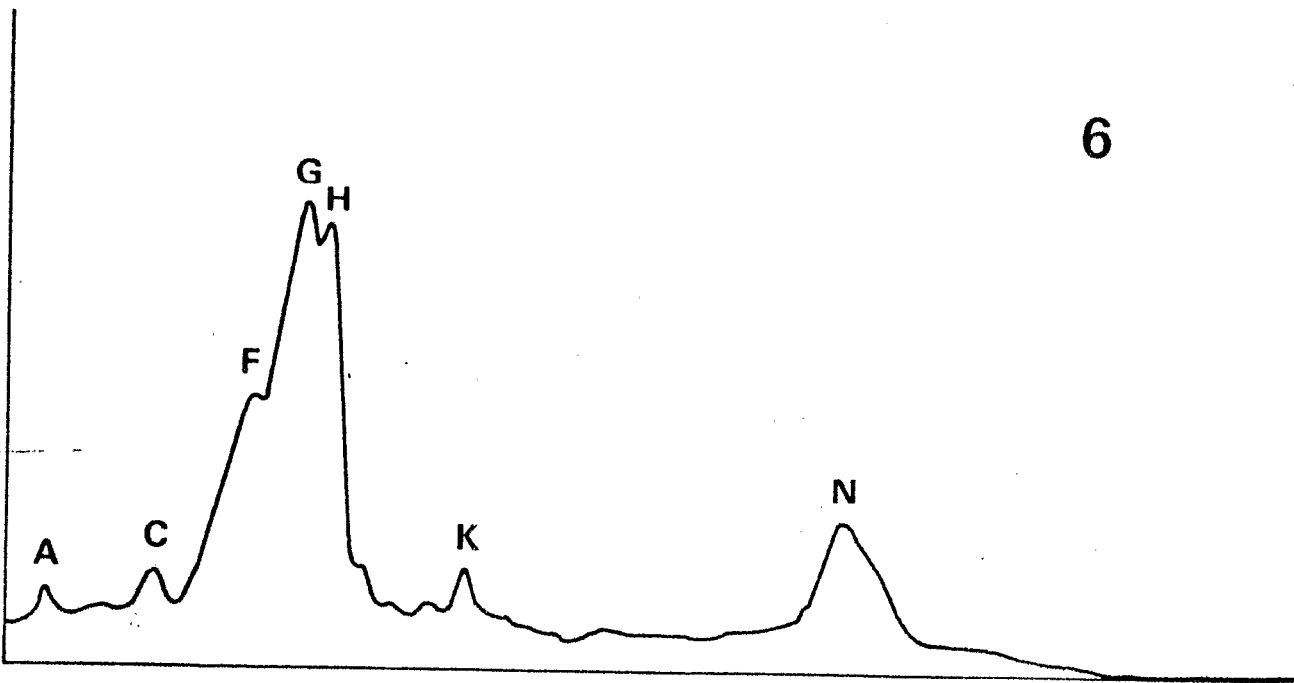
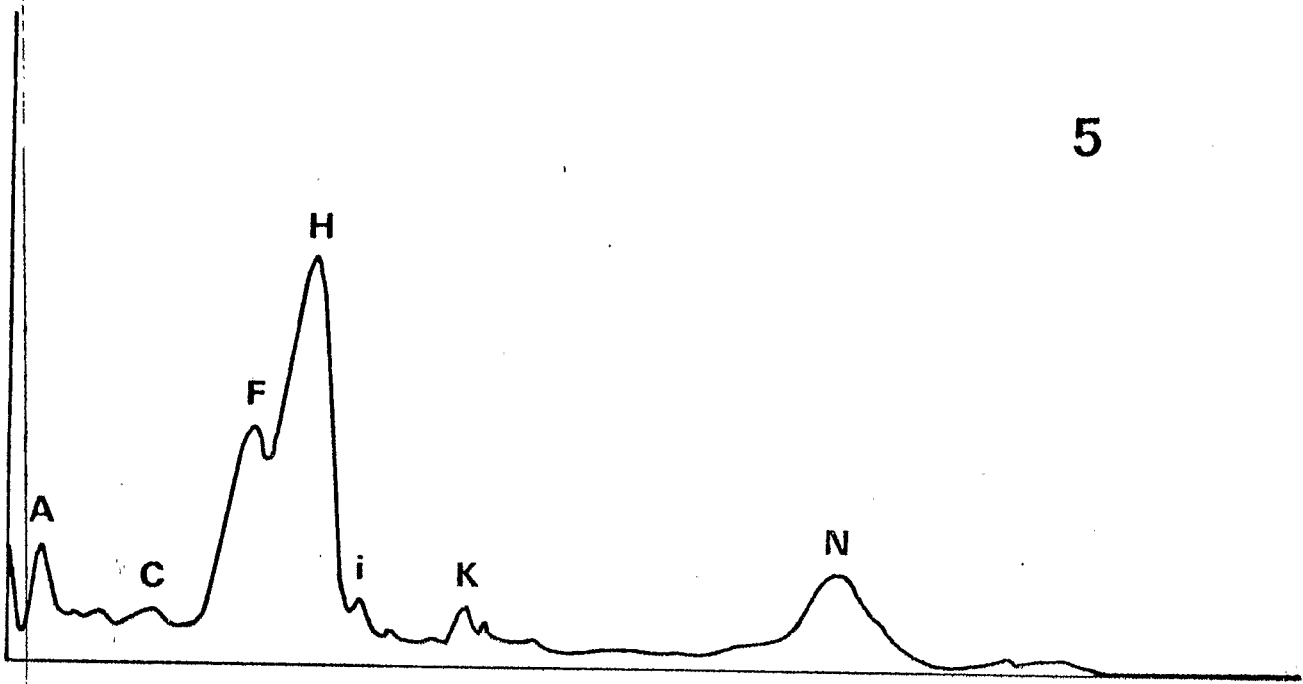


Planche XIV

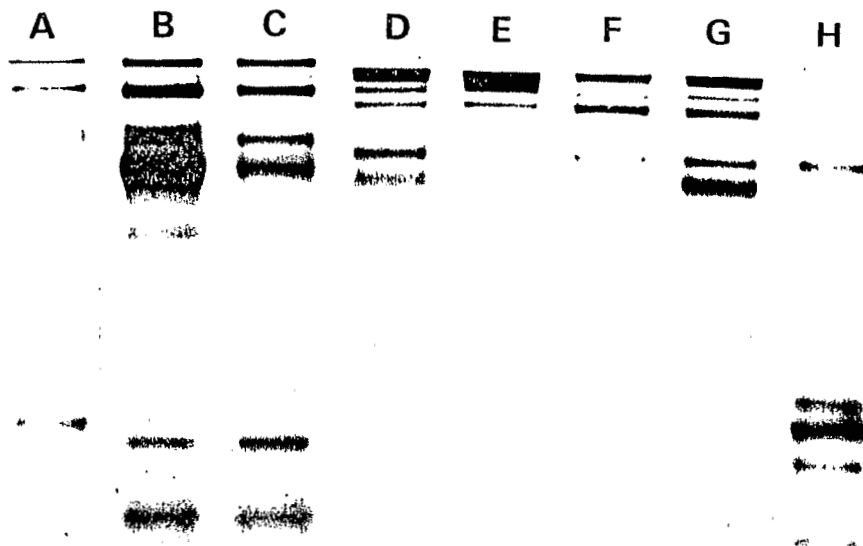
Fig. 1 : Electrophorèse sur gel neutre homogène de polyacrylamide à 7 %

- A : marqueurs : protéines de hauts poids moléculaires (669 000, 440 000, 232 000, 140 000, 67 000)
- B : Hémolymphe ♂ adulte sain
- C : Hémolymphe ♂ adulte infesté
- D : Hémolymphe ♀ adulte saine (ovocyte 2-4 mm)
- E : Hémolymphe ♀ adulte infestée (ovocyte 2-4 mm)
- F : Hémolymphe ♀ adulte infestée (ovocyte 5 - 7 mm)
- G : Hémolymphe ♀ adulte saine (ovocyte 5 - 7 mm)
- H : marqueurs : protéine de bas poids moléculaires (94 000, 67 000, 43 000, 30 000, 20 100).

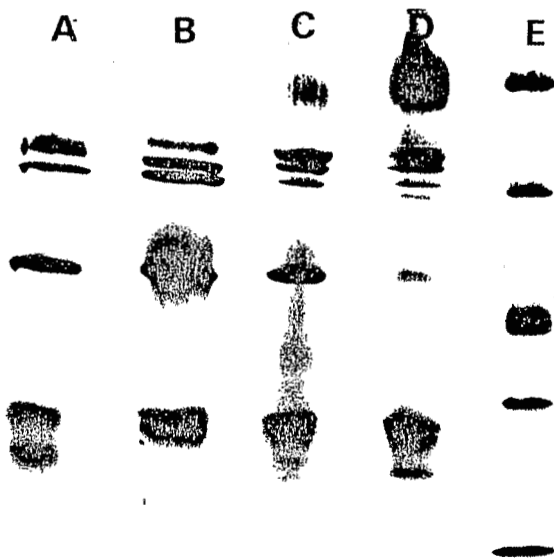
Fig. 2 : Electrophorèse sur gel neutre de polyacrylamide en gradient 4 - 30 %

- A : Hémolymphe ♂ adulte infesté
- B : Hémolymphe ♂ adulte sain
- C : Hémolymphe ♀ adulte infesté (ovocyte 5 - 7 mm)
- D : Hémolymphe ♀ adulte saine (Ovocyte 5 - 7 mm)
- E : marqueurs : protéine de hauts poids moléculaires (cf. fig:1):

XIV



1



2

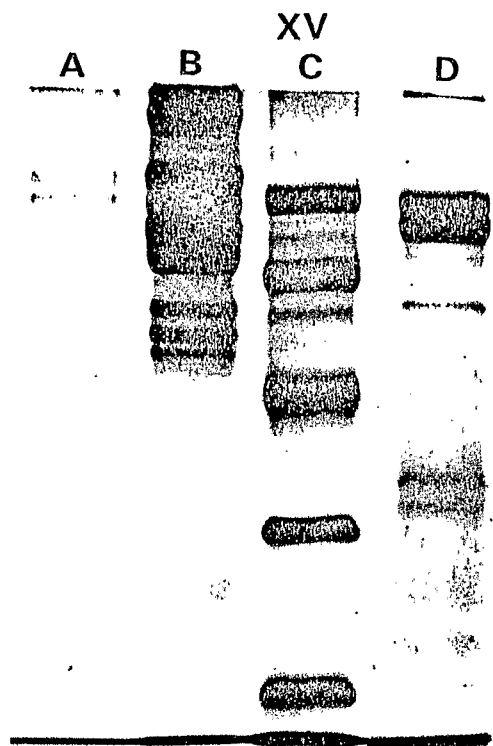
Planche XV

Electrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide
à 9 % en présence de S.D.S.

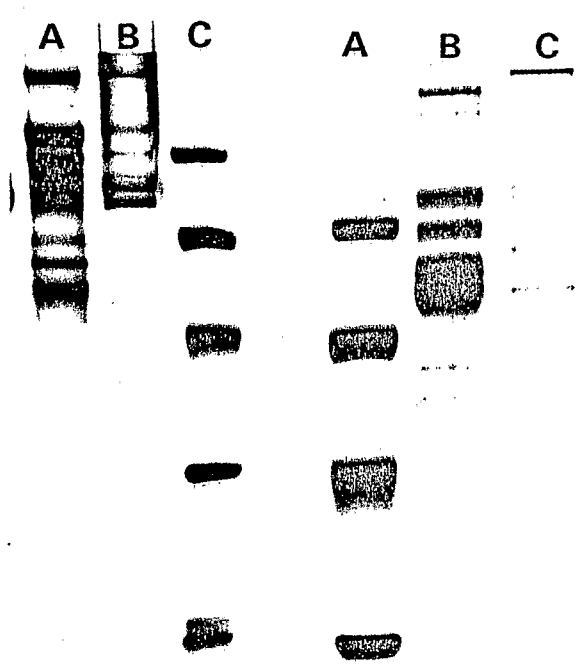
Fig. 1 : A : extrait ovulaire
B : hémolymphe ♀ adulte saine - ovocyte 5-7 mm
C : marqueurs : protéines de bas poids moléculaire (94 000,
67 000, 43 000, 30 000, 20100)
D : hémolymphe ♂, adulte sain.

Fig. 2 : A : hémolymphe ♀ adulte saine - ovocyte 5-7 mm
B : hémolymphe ♀ adulte saine - ovocyte 2-4 mm
C : marqueurs : protéines de bas poids moléculaires (cf. fig.1).

Fig. 3 : A : marqueurs : protéines de bas poids moléculaires (cf. fig.1)
B : hémolymphe ♀ adulte saine (ovocyte 5-7 mm)
C : hémolymphe ♀ adulte infestée (ovocyte 5-7 mm).



1



2

3

vitellin (planche XVI, fig.5).

3°) Immuno-electrophorèse "liné".

Cette méthode utilisant soit l'anticorps anti-oeuf soit l'anti-corps monospécifique anti-vitellogénine et des extraits ovulaires et hémolympatiques issus de criquets sains et parasités, mâles et femelles, révèle :

- la présence de protéines antigéniques communes aux deux sexes.
- la présence d'une protéine femelle reconnue par les deux anti-corps, incorporée dans les ovocytes, donc assimilable à la vitellogénine et à la vitelline,
- Des différences de mobilité de protéines extraites des individus parasités, différences traduisant vraisemblablement des concentrations distinctes (point d'équivalence). (Planche XVII, figs. 1 et 2).

4°) Immuno-electrophorèse "Rocket".

Pour établir la courbe d'étalonnage, nous choisissons comme standard un extrait d'oeuf : 5 oeufs sont broyés dans 200 μ l d'une solution à 0,4 M de NaCl dans le tampon d'immunologie dilué de moitié. Le surnageant recueilli après centrifugation pendant 10 minutes à 10 000 g subit différentes dilutions (1/8, 1/16, 1/32, 1/64). Les estimations quantitatives sont réalisées par rapport à l'"Equivalent oeuf" : longueur du précipité obtenu avec la dilution 1/16.

Par cette méthode de dosage, nous comparons la concentration en vitellogénine dans l'hémolymphe de femelles saines et infestées dont les ovocytes mesurent d'une part entre 2 et 4 mm et d'autre part entre 5 et 7 mm.

Nous constatons une diminution du taux de vitellogénine dans l'hémolymphe des femelles infestées par Malameba l.

La concentration diminue en moyenne de 35 % chez les femelles dont les ovocytes mesurent entre 2 et 4 mm et de 15 % chez les femelles en fin de vitellogénèse (tableau 6) (planche XVII, fig.3).

Planche XVI

Fig. 1 : Immunodiffusion (Méthode d'Outcherlony)

x : anticorps anti oeuf
a - c - e : hémolymphe ♀ adulte mûre
b - d - f : extrait ovulaire
- 2 arcs de précipitation sont communs à l'hémolymphe ♀
et à l'extrait ovulaire.

Fig. 2 : Immunodiffusion (Méthode d'Outcherlony)

x : anticorps anti oeuf
a - d : hémolymphe ♂ adulte mûr
b - e : hémolymphe ♀ adulte non mûre
c - f : hémolymphe ♀ adulte mûre
- 2 arcs de précipitation sont communs aux hémolymphe de ♀
adultes mûres et non mûres et à l'hémolymphe de ♂ adulte mûr.
(→) arc spécifique de l'hémolymphe ♀ adulte mûr

Fig. 3 : Immunodiffusion (Méthode d'Outcherlony)

x : anticorps anti oeuf
a - d : extraits ovulaires
b - e : hémolymphe ♀ adulte non mûre
c - f : hémolymphe ♀ adulte mûre
(→ - arc de précipitation commun aux hémolymphe de ♀
adultes mûres et non mûres et à l'extrait ovulaire.
(➤) arc de précipitation spécifique de l'hémolymphe de ♀
adulte mûre se retrouvant dans l'extrait ovulaire (vitellogénine-
vitelline).

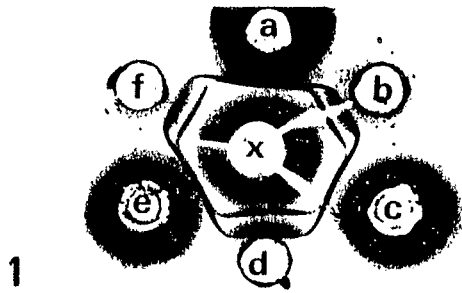
Fig. 4 : Immunodiffusion

x : hémolymphe ♀ adulte mûre
a - c - e : anticorps anti oeuf
b - d - f : anticorps anti-vitellogénine
- 1 cercle central de précipitation caractéristique de la
vitellogénine
- 2 arcs de précipitation correspondant aux protéines hémolymphe
non liées au sexe.

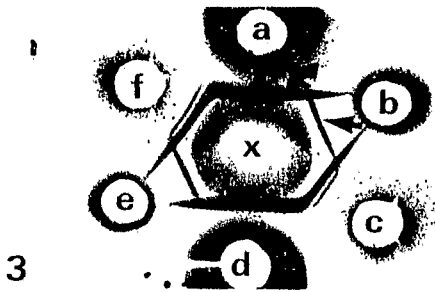
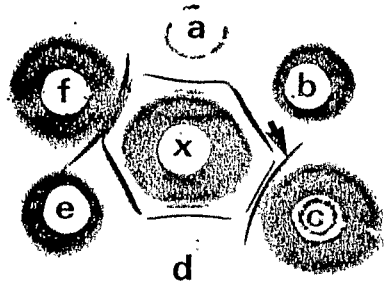
Fig. 5 : Electro immunodiffusion.

A : anticorps anti oeuf
B : anticorps anti-vitellogénine
m : hémolymphe ♂ adulte mûr
f : hémolymphe ♀ adulte mûre
- 5 arcs de précipitation au maximum sont communs à l'hémolymphe
des adultes ♂ et ♀ mûres.
(→) 1 arc intense est caractéristique de l'hémolymphe des
♀ adultes mûres (vitellogénine-).

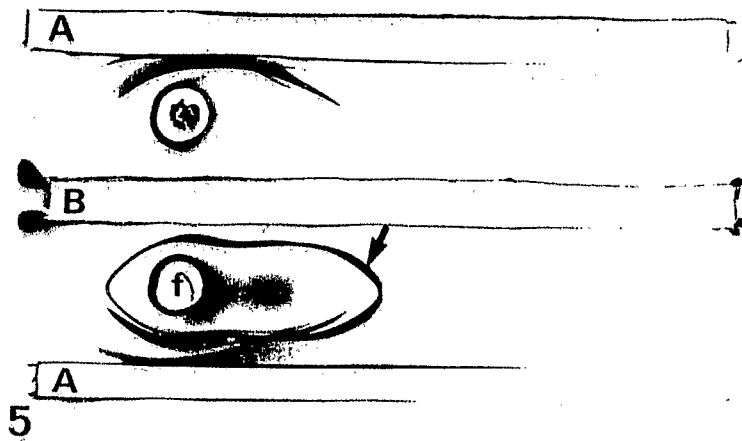
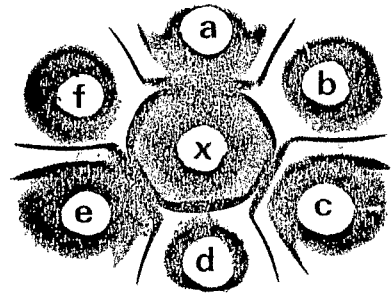
XVI



2



4



c = hémolymphe ♂ adulte mûr. •

- (→) ligne de précipitation commune aux hémolymphe ♂ à l'extrait ovulaire
- (↘) ligne de précipitation spécifique de l'hémolymphe mûre se retrouvant dans l'extrait ovulaire (vitell vitelline),

Fig. 2 : Immuno électrophorèse linéaire

- antigènes : hémolymphe ♀ adulte mûre

- anticorps : a = anti oeuf

b = anti vitellogénine

(↘) ligne de précipitation caractérisant la vitellogé

(→) ligne de précipitation, n'apparaissant qu'en prés l'anticorps polyspécifique, dû à un déterminant a autre que la vitellogénine.

Fig. 3 : Immuno électrophorèse "Rocket"

- anticorps : monospécifique anti vitellogénine

- antigène : a = extrait d'oeuf étalon, dilutions :

b = hémolymphe ♀ adulte saine
ovocyte terminal : 2 à 4 mm
dilutions : 1/8, 1/16, 1/32

c = hémolymphe ♀ adulte infestée
ovocyte terminal : 2 à 4 mm
dilutions : 1/8, 1/16, 1/32.

d = hémolymphe ♀ adulte saine
ovocyte terminal : 5 à 7 mm
dilutions : 1/16, 1/32, 1/64.

e = hémolymphe ♀ adulte infestée
ovocyte terminal : 5 à 7 mm
dilutions : 1/16, 1/32, 1/64.

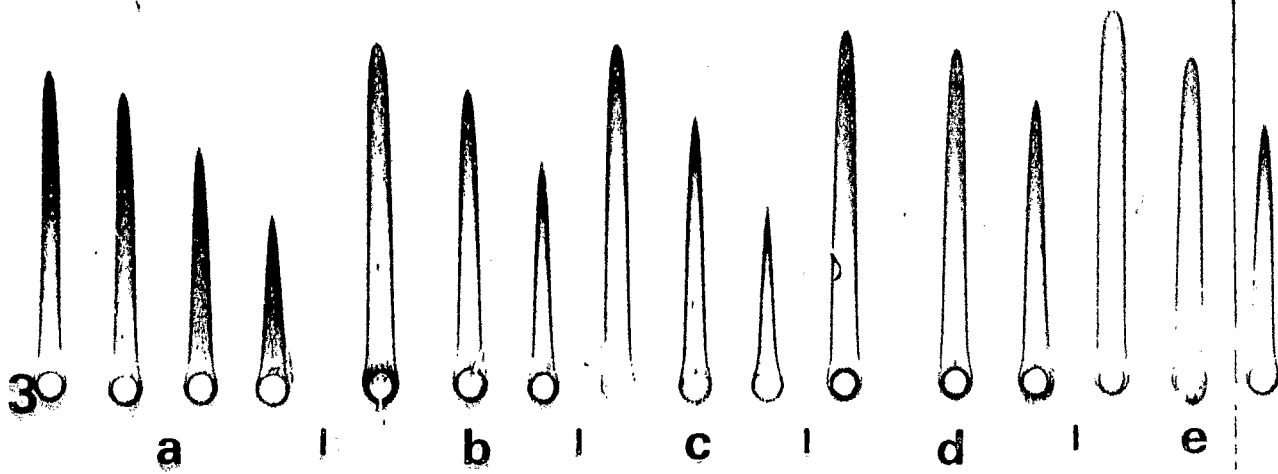
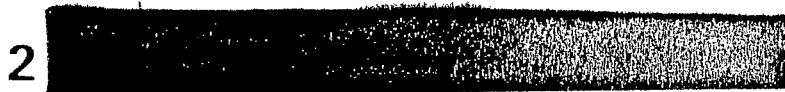
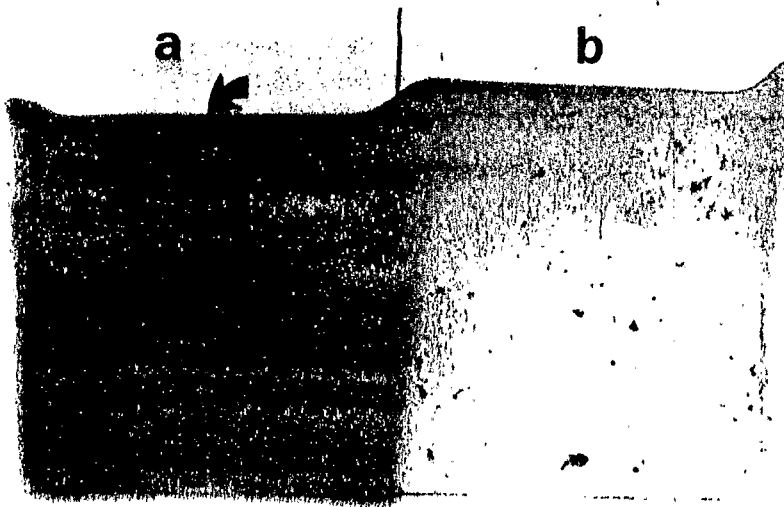
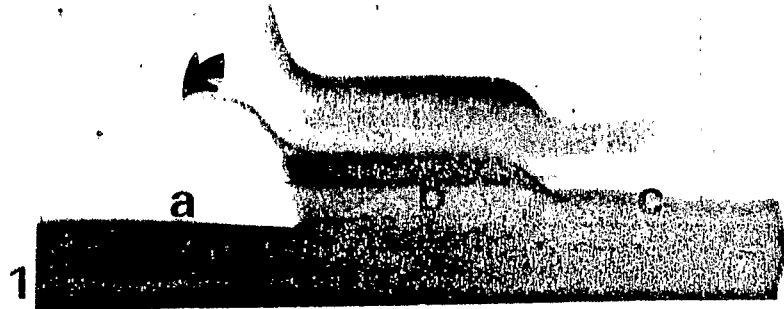


Tableau 6

Echantillons		Oeuf Etalon	Hémolymphe ♀ saine	Hémolymphe ♀ inf.	Hémolymphe ♀ saine	Hémolymphe ♀ inf.
Dilutions		(5 oeufs/200ul tampon)	ov. 2-4 mm	ov. 2-4 mm	ov. 5-7 mm	ov. 5-7 mm
1/16	longueur précipité	32,5 mm	32,5 mm	30,0 mm		
	équivalent oeuf	1	1	0,76		
	longueur précipité	26,5 mm	2,45 mm	19,0 mm	37,0 mm	36,0 mm
1/32	équivalent oeuf	0,50	0,44	0,250	1,55	1,40
	longueur précipité	19,0 mm			31,5 mm	29,0 mm
1/64	équivalent oeuf	0,25			0,88	0,70

Influence de la présence de Malameba locustae sur le taux de vitellogénine dans l'hémolymphe des femelles
 Dosage par immunoélectrophorèse "Rocket".

CONCLUSION

L'étude électrophorétique et immunologique des protéines de l'hémolymphe d'adultes mâles et femelles de Schistocerca gregaria sains ou infestés par Malameba locustae a été entreprise.

Hill (1962) signale l'existence d'un dimorphisme sexuel au niveau des protéines hémolympatiques; Kulkarni (1970) dénombre par électrophorèse sur gel neutre de polyacrylamide 12 protéines dans l'hémolymphe ^{de la femelle} et 10 chez le mâle dont les poids moléculaires s'échelonnent de 20 000 à 480 000, mettant en évidence plusieurs protéines spécifiques du sexe.

Nous avons obtenu la composition, en protéines natives de l'hémolymphe de Schistocerca gregaria en associant les résultats des électrophorèses sur gel neutre de polyacrylamide, homogènes et en gradient 4-30 %.

19 bandes protéiniques ont été séparées chez la femelle et 14 chez le mâle pour des poids moléculaires allant de plus de 820 000 à 14 000.

6 protéines sont spécifiques de l'hémolymphe femelle (une dont le PM est supérieur à 820 000, puis 820 000, 410 000, 96 000, 66 000 et une dont le PM est compris entre 40 000 et 26 000), Une protéine est spécifique du sexe mâle (115 000).

Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle la vitellogénine, protéine spécifique du sexe femelle, synthétisée dans le corps gras, puis transportée par l'hémolymphe vers l'ovocyte pour être adsorbée par pinocytose, peut être formée chez Schistocerca gregaria de deux composantes (une dont le PM est supérieur à 820 000 et l'autre de PM : 820 000). Chaque composante est formée de plusieurs polypeptides. Des clivages protéolytiques affectent la vitellogénine, probablement dès le comportement hémolympatique, ce qui peut expliquer la présence de 4 autres bandes protéiniques spécifiques de l'hémolymphe femelle.

Deux protéines (PM: 260 000 et 120 000) sont abondantes dans l'hémolymphe de la femelle aussi bien que dans l'hémolymphe du mâle. Une fraction non négligeable présente chez les deux sexes (PM: 730 000) peut appartenir au groupe des lipoprotéines (complexes lipo-glyco-carotenoprotéiques de faible mobilité) participant au transport des diglycérides hémolympatiques.

La composition en sous-unités polypeptidiques des protéines de l'hémolymphe dénaturées par l'action combinée du SDS et du β -mercaptoethanol a été révélée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 9 %.

- 12 sous-unités ont été séparées dans l'hémolymphe de femelle adulte et 9 chez le mâle pour des poids moléculaires allant de 150 000 à 29 000.

- 5 bandes protéiniques sont spécifiques du sexe femelle dont 3 sont abondantes (140 000, 105 000 et 94 000)
- 2 bandes protéiniques sont spécifiques du sexe mâle dont 1 est abondante (PM ; 88 000),
- 1 sous-unité polypeptidique est abondante dans les deux types d'hémolymphe (PM: 78 000).

Le dimorphisme sexuel réapparaît donc au niveau des sous-unités des protéines hémolympatiques.

La présence de l'amibe pathogène Malameba locustae influe sur la protéinémie des criquets parasités. Le taux moyen de protéines circulantes est réduit de 8 % chez le mâle, de 15 % chez la femelle en cours de vitellogénèse, et de 30 % chez la femelle en fin de vitellogénèse.

L'influence du parasitisme se traduit d'une part par la disparition de certaines bandes protéiniques chez les mâles et chez les femelles et, d'autre part, par la diminution du taux de certaines protéines. L'augmentation du taux de quelques protéines chez les animaux infestés pourrait résulter d'une accumulation de protéines issues du parasite ou de son métabolisme.

L'étude immunologique des hémolymphe de criquets adultes mâles et femelles par immunodiffusion, électro-immunodiffusion et par des analyses immunoelectrophorétiques, permet d'obtenir 6 arcs de précipitation dont un est spécifique de l'hémolymphe de femelle adulte (la vitellogénine) et confirme l'existence d'un dimorphisme lié au sexe.

Par la technique d'immunoélectrophorèse "Rocket", nous jugeons de l'influence du parasitisme sur le taux de vitellogénine dans l'hémolymphe des femelles. Le taux moyen est réduit de 35 % chez les femelles en cours de vitellogénèse et de 15 % chez les femelles en fin de vitellogénèse. Compte-tenu de la chute de la protéinémie, qui est chez ces animaux respectivement de 15 % et de 30 %, cela nous amène à imaginer un retard de la vitellogénèse chez les femelles infestées, puis un rattrapage, ce qui expliquerait une réduction moindre en fin de vitellogénèse.

BIBLIOGRAPHIE

- AGOSIN, M., 1978. Functional Role of Protein in "Biochemistry of insects".
Rockstein, M. ed., Academic Press, New York, 93-144.
- CHEN, P.S., 1978. Protein synthesis in relation to cellular activation and
deactivation. in "Biochemistry of insects" Rockstein, Med. Academic Press
New York, 145-203.
- CLARKE, M.H.G. et FREEMAN T., 1968. Quantitative immunoelectrophoresis of
human serum proteins. Clin.Sci., 35, 403.
- DONALDSON, J.M.I., 1971. Attempts to hatch cysts of Malameba locustae
(King and Taylor) or control them with drugs. Phytophylactica, 3, 103-106.
- DUFOUR, D., TOSKAR, S.P. et PERRON J.M., 1970. Ontogenesis of a female specific
protein from the locust, Schistocerca gregaria. J. Insect Physiol., 16,
1369-1377.
- EVANS, W.A. et ELIAS, R.G., 1970. The life cycle of Malameba locustae (King
and Taylor) in Locusta migratoria migratorioides (R.etF.). Acta protozool.
7, (17), 229-242.
- GORDON, R., WEBSTER, J.M. et HISLOP, T.G., 1973. Mermithid parasitism, protein
turn over and vitellogenesis in the desert locust Schistocerca gregaria
Forsk. Comp. Biochem. Physiol., 46 B, 575-593.
- GRABAR, P. et WILLIAM, C.A., 1953. Méthode permettant l'étude conjuguée des
propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines
Application du sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta., 10, 193.
- HANRAHAN, S.A., 1975. Ultrastructure of Malameba locustae (K. & T.) a protozoan
parasite of locusts. Acrida, 4, 237-249.
- HANRAHAN, S.A., 1981. The effect on locust tissues of sulphonamides used to
eliminate Malameba locustae (King & Taylor) infection. Acrida, 10, 5-13.
- HARRY, O.G. et FINLAYSON, C.H., 1975. Histopathology of secondary infections
of malpighamoeba locustae (Protozoa, Amoebidae) in the desert locust,
Schistocerca gregaria (Orthoptera, Acrididae). J. Invertebr. pathol., 25,
25-33.
- HARRY, O.G. et FINLAYSON, L.H., 1976. The life-cycle, ultrastructure and mode
of feeding of the locust amoeba malpighamoeba locustae. Parasitology, 72,
127-135.
- HEDRICK, J.L. et SMITH, A.J., 1968. Size and charge isomer separation and
estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
Arch. Biochem. Biophys., 126, 155-164.
- HENRY, J.E., 1968. Malameba locustae and its antibiotic control in grasshopper
cultures. J. Invert. Pathol., 11, 224-233.

- HENRY, J.E. et OMA, E.A., 1975. Sulphonamide antibiotic control of Malameba locustae (King & Taylor) and its effects on grasshoppers. Acrida, 4, 217-226.
- HILL, L., 1962. Neurosecretory control of haemolymph protein concentration during ovarian development in the desert locust. J. Insect Physiol., 8, 609-619.
- JACKSON, L.I., BAKER, G.L. et HENRY, J.E., 1968. Effect of Malameba locustae infection on the egg lipids of the Grasshopper Melanoplus bivittatus. J. Insect Physiol., 14, 1773-1778.
- KING, R.L. et TAYLOR, A.B., 1936. Malpighameba locustae n.sp. (Amebidae). A protozoan parasite in the malpighian tubes of Grasshoppers. Trans. Amer. microsc. soc., 55, 6-10.
- KROLL, J., 1973. Line immunoelectrophoresis. in "Quantitative immuno electrophoresis", Axelsen, N.H., Kroll, J., Weeke, B., eds. Scand. J. immuno., 2, suppl. n°1, 61-67.
- KULKARNI, A.P. et MEHROTRA, K.N., 1970. Amino acid nitrogen and proteins in the haemolymph of adult desert locusts, Schistocerca gregaria. J. Insect Physiol., 16, 2181-2199.
- LAURELL, C.B., 1965. Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal Biochem., 10, 358.
- LAURELL, C.B., 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal. Biochem., 15, 45.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.Y., FARR, A.L. et RANDALL, R.Y., 1951. Protein measurement with folin phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MARTOJA, R., 1969. Données histopathologiques sur une amibiase d'Acridiens. C.R. Acad. Sci. Paris, 268, 2442-2445.
- OUCHTERLONY, O., 1948. Antigen antibody reaction in gels. Ark. Keni. Miner. geol. B., 26, n°16.
- OUCHTERLONY, O., 1967. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis in "Handbook of experimental immunology". Weir, D.M. ed, Blackwell Sci. Publ. Oxford, 655-706.
- PAPILLON, M., 1967. Facteurs écologiques et phases chez le criquet pèlerin Schistocerca gregaria Forsk. Thèse doctorat d'état, Paris.
- PAPILLON, M. et CASSIER, P., 1978. Perturbations morphologiques et physiologiques dues à la présence du protozoaire parasite Malameba locustae (K & T) chez Schistocerca gregaria Forsk. Acrida, 7, 101-114.
- PRINSLOO, H.E., 1961. The influence of an ameboid parasite of the Brown Locust on the incidence of diapause in its eggs. S. Afr. J. agric. Sci. Pretoria, 4, 225-230.

- PRINSLOO, H.E., 1962. An antibiotic factor in ether extracts of locusts infested with the Ameba Malameba locustae (King & Taylor). S. Afr. J. agric. Sci., Pretoria, 5, 145.
- TAYLOR, A.B. et KING, R.L., 1937. Further studies on the parasitic Ameba in grasshoppers. Trans. Amer. microsc. Soc., 56, 172-176.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. et ROSS, G.T., 1971. A method for procuring specific antisera with small doses of immunogen. J. clin. Endocrinol., 33, 988.
- WEBER, K. et OSBORN, M., 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. chem., 244 (16), 4406-4412.
- WEEKE, B., 1973. Rocket immunoelectrophoresis in "quantitative immunoelectrophoresis". Axelsen, N.H., Kroll, J., Weeke, B. eds. Scand. J. immuno., 2, suppl. n°1, 37-46.
- WYATT, G.R., 1978. Insect plasma proteins. Ann. Rev. Biochem., 47, 779-817.