

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES ESTÉRASES POUR CINQ ESPÈCES DU GENRE *SPHAEROMA* : *S. HOOKERI*, *S. RUGICAUDA*, *S. MONODI*, *S. SERRATUM* ET *S. TEISSIERI*.

par

Marc Laulier

Laboratoire de Biologie animale, Faculté des Sciences
Université du Maine, 72017 Le Mans-Cedex, France.

Résumé

L'électrophorèse en gel d'acrylamide de broyat de Sphéromes entiers et la mise en évidence de l'activité estérasique sur un substrat d' α naphthyl acétate permettent de caractériser chacune des trois espèces : *S. serratum*, *S. monodi* et *S. teissieri* alors que les espèces *S. hookeri* et *S. rugicauda* présentent, entre elles, un équipement estérasique identique.

L'emploi de substrats différents et l'action de divers inhibiteurs confirment les analogies au sein du couple *S. hookeri* et *S. rugicauda* et les divergences observées entre les autres espèces. On constate cependant qu'une isoenzyme de *S. monodi* tout en possédant une mobilité relative différente présente les mêmes réactions vis-à-vis des inhibiteurs et des différents substrats qu'une isoenzyme commune aux *S. hookeri* et *S. rugicauda*.

Les observations et les arguments tirés d'expériences antérieures confirment l'isolement de *S. serratum* et *S. teissieri* et la grande parenté du couple *S. hookeri* et *S. rugicauda* avec lequel *S. monodi* présente certaines affinités.

Depuis une vingtaine d'années, l'étude des équipements protéiques ou enzymatiques à des fins comparatives a suscité un engouement particulier des carcinologistes comme le prouve la richesse de la bibliographie citée par Gibert dans ce domaine (1972). Rappelons seulement, pour mémoire, les travaux entrepris chez les Copépodes par Manwell, qui lui ont permis de caractériser deux espèces : *Calanus finmarchicus* et *Calanus helgolandicus* (1967), ceux de Battaglia, Bisol et Varotto chez *Tisbe holothuriae* cela à des fins éco-physiologiques (1978) et les recherches entreprises chez les Isopodes par Manwell (1963), Wieser (1965), Besse (1968). Lagarrigue et Trilles (1969) et Kérambrun (1970) qui s'est plus spécialement attaché au genre *Sphaeroma* en caractérisant trois espèces : *S. hookeri*, *S. ghighi* et *S. serratum* par les enzymogrammes estérasiques et phosphatasiques.

Afin de compléter les données de Kérambrun sur les estérases et nos premiers résultats sur les lactates (Laulier et Lejuez, 1977), nous avons repris l'étude des activités estérasiques pour cinq espèces de

Sphéromes : *S. hookeri*, *S. rugicauda*, *S. monodi*, *S. serratum* et *S. teissieri*.

Une migration effectuée dans des conditions expérimentales définies conduisant à des enzymogrammes spécifiques des espèces considérées, nous avons modifié la concentration en acrylamide de nos gels afin de préciser les analogies entre les enzymogrammes. Les travaux de Hedrick et Smith (m N. Ressler et M.R. Maurer) nous ont, en effet, révélé que cette technique permet de savoir si deux ou plusieurs molécules diffèrent par leur masse, leur charge ou les deux composantes à la fois. Enfin, indépendamment des propriétés physiques, nous avons utilisé les propriétés biochimiques afin de confirmer ou d'infirmer les analogies.

A. - MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. Matériel

Les analyses électrophorétiques des cinq espèces étudiées ont été réalisées à partir d'individus, soit prélevés directement dans les populations naturelles, soit obtenus de croisements réalisés au laboratoire et maintenus en élevage dans des conditions standards : eau de mer de salinité normale avec des Entéromorphes et des feuilles d'orme séchées comme nourriture. Les *S. hookeri* ont été prélevés dans le canal de Caen à la mer, au niveau du pont de Bénouville « Pegasus Bridge » ; les *S. rugicauda* proviennent de la région de Courseulles et Graye-sur-Mer ; la plus grande partie des *S. monodi* provient de Pirou cependant que certains spécimens ont été récoltés dans les stations de Roscoff et de Luc-sur-mer ; les *S. serratum* ont été recueillis à Luc-sur-Mer et à Roscoff ; les *S. teissieri*, enfin, proviennent uniquement de la population établie dans le sable fin au pied de la pointe rocheuse en face du port de Mogueriec.

II. Techniques

a) Extraction.

Les Sphéromes entiers sont broyés, séparément, dans une solution tampon Tris-glycine à pH 8,3 additionnée d'un volume égal de saccharose à 40 p. 100, le volume total variant de 100 µl à 150 µl selon la taille des individus. Après centrifugation du broyat à 4° C pendant 10 minutes à 18 000 g, le surnageant est prélevé et déposé sur un gel de polyacrylamide à 7,5 ou à 10 p. 100 et à pH 8,9 coulé en tube. Nous avons toujours utilisé un gel intermédiaire. Lors de l'utilisation de substrats différents ou d'inhibiteurs, la moitié seulement du surnageant était déposé sur le gel, l'autre moitié servant à la réalisation d'un tube témoin.

Tous les *S. serratum* ont été préalablement débarrassés des *Jaera hopeana* qu'ils pouvaient porter.

b) Electrophorèse.

La migration réalisée dans une enceinte réfrigérée à 4°C sous une intensité de 3 m A par tube dure 1 h 15. La solution tampon est la même que celle utilisée pour l'extraction.

Dans quelques cas, des gels à 7,5 p. 100 ayant subi une première migration ont été soumis à une deuxième migration. Le gel non coloré est alors découpé en deux moitiés dans le sens de la longueur et une moitié est étroitement appliquée sur un gel à gradient de concentration PAA 4/30 de « Pharmacia » pour subir une deuxième migration. Cette electrophorèse s'opère pendant 13 ou 15 h sous une tension de 125 V avec un maximum de 50 m A par plaque, le tampon utilisé étant une solution de Tris-Acide borique - Na EDTA à pH 8,35.

c) Révélation.

La technique de révélation est celle de Sims déjà reprise par Kérambrun : une préincubation dans l'acide borique 0,5 M précède la révélation dans un mélange d' α naphtyl acétate ou de β naphtyl acétate en solution acétonique et de fast blue BB dans une solution de tampon phosphate 0,1 M et à pH 6,5.

Dans certains cas, les deux substrats et naphtyl ont été mélangés en proportion égale pour rechercher d'éventuelles différences d'affinité.

d) Caractérisation des différentes estérases.

L'étude des inhibitions par le DFP, l'Esérine et l'EDTA a été menée en réalisant une préincubation des gels pendant 30 mn dans la solution d'acide borique 0,5 M contenant l'inhibiteur et une révélation en ajoutant le même inhibiteur, à concentration égale, dans la solution de révélation.

L'action de la température sur les activités enzymatiques a été mise en évidence en réalisant la migration et la révélation à partir d'un surnageant soumis à une température de 60° C pendant des temps variables.

B. - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**I. Analyse des électrophorégrammes unidimensionnels.**

L'ensemble des enzymogrammes correspond à des migrations anodiques ; l'inversion de la polarité n'a, en effet, jamais permis la matérialisation de zones présentant une activité estérasique.

a) Gels à 7,5 p. 100.

Pour les cinq espèces considérées, nous pouvons distinguer quatre zones dans la répartition de l'activité estérasique :

• le gel d'espacement **qui** présente chez toutes les espèces, **deux** bandes assez intenses caractérisant des protéines qui ne subissent pratiquement pas de migration soit en raison d'un poids moléculaire élevé, soit à cause d'une charge très faible ;

• la zone proximale qui offre toujours une activité faible et diffuse que nous n'avons pas matérialisée sur la figure 1 ;

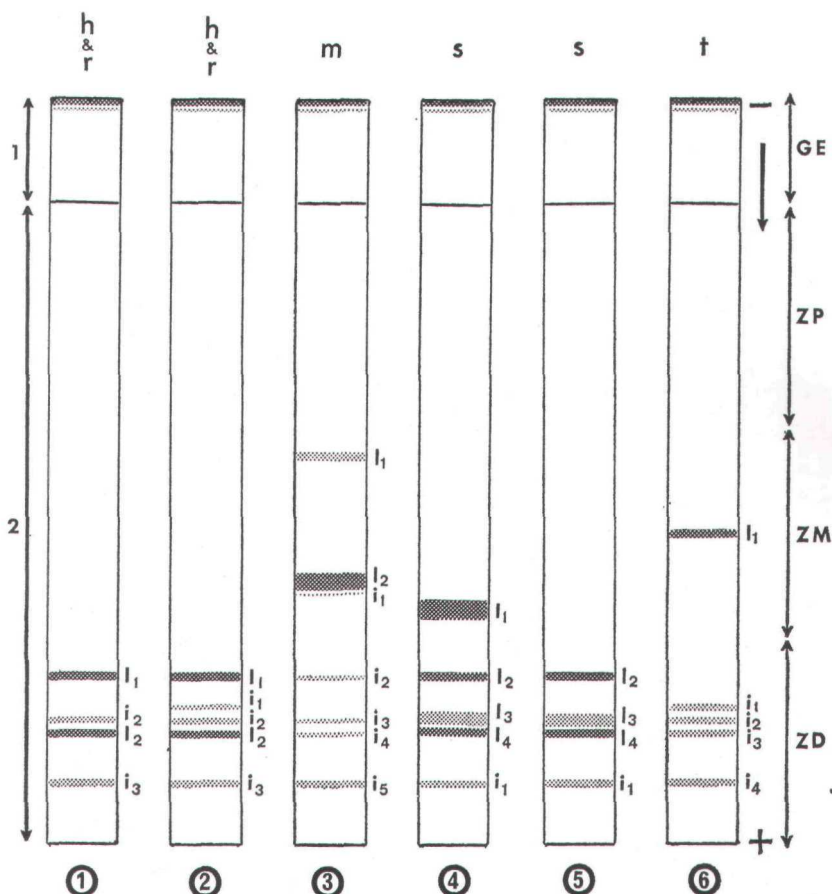


FIG. 1

Activité estérasique après électrophorèse sur gel d'acrylamide cylindrique à 7,5 p. 100 de concentration chez cinq espèces de *Sphaeroma* : h, *S. hookeri* ; r, *S. nigicauda* ; m, *S. monodi* ; s, *S. serratum* ; t, *S. teissieri*.

I : bandes présentant une coloration intense ; i : bandes faiblement colorées. La flèche précise le sens de migration. GE = gel d'espacement ; ZP = zone proximale ; ZM = zone médiane ; ZD = zone distale.

• la zone distale, la plus riche en activité estérasique, qui suggère, comme l'indique la figure 1, l'existence de bon nombre d'analogies qui en fait, ne sont qu'apparentes puisque non confirmées par l'étude de gels à 10 p. 100 d'Acrylamide ;

• la zone médiane qui permet généralement de caractériser les espèces *S. monodi*, *S. serratum* et *S. teissieri* (présence de bandes intenses à des niveaux différents), à l'exclusion des *S. hookeri* et *S. rugicauda* chez lesquelles aucune activité estérasique ne se manifeste à ce niveau. Dans certains cas, la bande I, peut ne pas se manifester chez *S. serratum* et la

discrimination de *S. serratum* avec les espèces *hookeri* et *rugicauda* s'opère au niveau des bandes intenses de la zone distale (3 bandes I_2 , I_3 , I_4 chez *S. serratum* ; 2 bandes I_1 , I_2 chez *S. hookeri* et *S. rugicauda*).

b) Gels à 10 p. 100.

Le gel d'espacement étant identique à celui utilisé pour les gels à 7,5 p. 100, nous retrouvons, pour les cinq espèces considérées, deux bandes caractérisées par une activité estérasique positive dont la vitesse de migration est très faible.

L'étalement relativement important de l'enzymogramme, dû à un meilleur pouvoir séparateur du gel de séparation, rend plus délicate la délimitation des zones précédemment décrites ; pour cette raison, elles ont été matérialisées sur la figure 2 : zone proximale (ZP), zone médiane (ZM) et zone distale (ZD).

— La zone proximale est caractérisée par une coloration de fond importante qui rend difficile l'étude des homologues ou des analogues des bandes faiblement positives et à vitesse de migration lente rencontrées chez les cinq espèces.

— La zone médiane présente des situations variables selon les espèces :

- *S. hookeri* et *S. rugicauda* n'offrent, en général, que deux bandes faibles i_1 et i_2 apparaissant sur les gels bien colorés (Fig. 2, gels 1 et 2) ; 2 *S. hookeri* sur les 86 individus examinés présentaient une bande intense I_1 au niveau de la bande i_2 (Fig. 2, gel 3) ;
- *S. monodi* se caractérise essentiellement au niveau de cette zone par deux bandes intenses I_1 et I_3 généralement accompagnées d'une bande faible i_1 (Fig. 2, gel 3).
Chez certains individus, la bande I_1 est remplacée par une bande I_2 dont la vitesse de migration est légèrement supérieure à celle de I_1 (Fig. 2, gel 8) ; d'autres spécimens présentent, à la fois, les bandes I_1 et I_2 (Fig. 2, gel 7).

Sans analyser, en détail, la diversité de ce polymorphisme présenté par les populations naturelles, assez cloisonnées, de *S. monodi*, nous donnons quelques informations sur la fréquence et la distribution de ces phénotypes dans trois stations où ont été prélevés des échantillons.

Population de Roscoff : 54 individus présentant la bande I_1 ,
5 individus présentant la bande I_2 .
Population de Pirou : 71 individus présentant la bande I_1 ,
1 individu présentant les deux bandes I_1 et I_2 .
Population de Luc-sur-Mer : 36 individus présentant la bande I_1 ,
1 individu présentant les deux bandes I_1 et I_2 .

La fréquence peu élevée de ces phénotypes ne nous a pas permis d'entreprendre l'étude génétique de ce système estérasique.

• *S. serratum* présente deux phénotypes enzymatiques également répartis : 19 individus sur les 36 analysés ne montraient aucune bande dans cette zone médiane (Fig. 2, gel 10) alors que les 17 autres Sphéromes se caractérisaient par une large bande I_1 résultant du chevauchement de trois petites bandes i_1 , i_2 , i_3 (Fig. 2, gel 9).

• *S. teissieri* se caractérise par une bande forte I_1 , située au niveau de la bande I_3 de *S. monodi* (Fig. 2, gel 11). Cette bande est cependant toujours plus faiblement positive que les bandes intenses observées chez les autres espèces. Il est pourtant difficile, dans l'immédiat, de savoir si la faiblesse relative de la réaction est normale et constante ou si elle est liée à une résistance moindre des *S. teissieri* aux conditions d'élevage avant le traitement.

Comme nous l'avons déjà signalé, une migration sur gel à 10 p. 100 assure une meilleure séparation des bandes et les analogies mises en

évidence lors des migrations sur gels à 7,5 p. 100 disparaissent dans cette zone médiane. Pour la même raison, bien que sur gel à 10 p. 100 la bande I₁ de *S. teissieri* se situe au même niveau que la bande I₃ de *S. monodi*, le comportement très différent de ces deux bandes dans le cas de gels à 7,5 p. 100 permet d'affirmer l'absence d'analogie entre ces deux bandes.

— Comme pour les gels à 7,5 p. 100, la zone distale demeure la plus complexe. Un examen rapide de la figure 2 indique que, seules, les espèces *S. hookeri*, *S. rugicauda* et *S. serratum* présentent deux ou trois bandes fortement positives, les espèces *S. monodi* et *S. teissieri* étant dépourvues de bandes intenses.

- Les *S. hookeri* et *S. rugicauda* se caractérisent par deux bandes intenses I₂ et I₃, situées respectivement au même niveau chez les deux espèces. Chez un spécimen *hookeri* (Fig. 2, gel 4) parmi 88 individus analysés, la bande I₃ semblait dédoublée en deux bandes I₃ et I₄. Indépendamment de ces réactions fortement positives, chaque espèce présente une ou deux bandes faibles situées entre les bandes intenses I₂ et I₃ :
 - deux bandes i₃ et i₄ (Fig. 2, gel 1) : 10 *S. hookeri* et 8 *S. rugicauda* ;
 - une bande i₃ (Fig. 2, gel 2) : 20 *S. hookeri* et 20 *S. rugicauda* ;
 - une bande i₄ (Fig. 2, gel 3) : 2 *S. hookeri* et 0 *S. rugicauda*.

Bien que la variation phénotypique de ces bandes soit **assez** importante, nous nous sommes limités à l'étude des enzymogrammes présentant une coloration satisfaisante de ces bandes. En effet, si la netteté de coloration est possible à l'analyse d'animaux venant d'être prélevés dans la nature, elle devient plus aléatoire pour des animaux maintenus longtemps en élevage et très incertaine à l'examen de jeunes issus de croisements expérimentaux. C'est pour cette raison qu'une étude génétique rigoureuse n'a pu être entreprise.

Enfin, une bande faible i₅, localisée au même niveau chez *S. hookeri* et *S. rugicauda*, se manifeste plus près du front de migration souligné par le bleu de Bromophénol.

- Chez *S. serratum* (Fig. 2, gels 9 et 10), cette zone distale se concrétise par l'existence de deux bandes intenses I₂ et I₃, sans analogie avec les mêmes bandes signalées chez *S. hookeri* et *S. rugicauda*, et par une bande également bien colorée I₄ située au niveau de la bande i₅ de *S. hookeri* et *S. rugicauda*. Dans certains cas, cette bande I₄ se subdivise en deux bandes i₄ et i₅.

- Chez *S. monodi*, la situation la plus complexe présente cinq bandes faibles (Fig. 2, gel 5) : une bande i₂ localisée au niveau de la bande I₂ de *S. serratum*, une bande i₃ située à la limite supérieure des bandes I₂ de *S. hookeri* et *S. rugicauda*, des bandes i₄ et i₅ situées respectivement au niveau des bandes i₄ et I₃ de *S. hookeri* et *S. rugicauda* et, enfin, une bande i₄ localisée au niveau de i₅ de *S. hookeri* et *S. rugicauda* et de I₄ de *S. serratum*. Dans certains cas, la bande i₂ n'existe pas.

- Chez *S. teissieri* (Fig. 2, gel 11), les cinq bandes faibles observées possèdent des propriétés électrophorétiques nettement différentes de celles observées chez les autres espèces et aucune analogie ne peut être établie entre les bandes i₂ — i₆ de *S. teissieri* et les bandes de la zone distale des autres espèces étudiées.

FIG. 2

Activité estérasique après électrophorèse sur gel d'acrylamide cylindrique à 10 p. 100 de concentration chez cinq espèces de *Sphaeroma* : h, *S. hookeri* ; r, *S. rugicauda* ; m, *S. monodi* ; s, *S. serratum* ; t, *S. teissieri*.

I : bandes présentant une coloration intense ; i = bandes faiblement colorées. La flèche précise le sens de migration. UE — gel d'espacement ; ZP = zone proximale ; ZM = zone médiane ; ZD = zone distale.

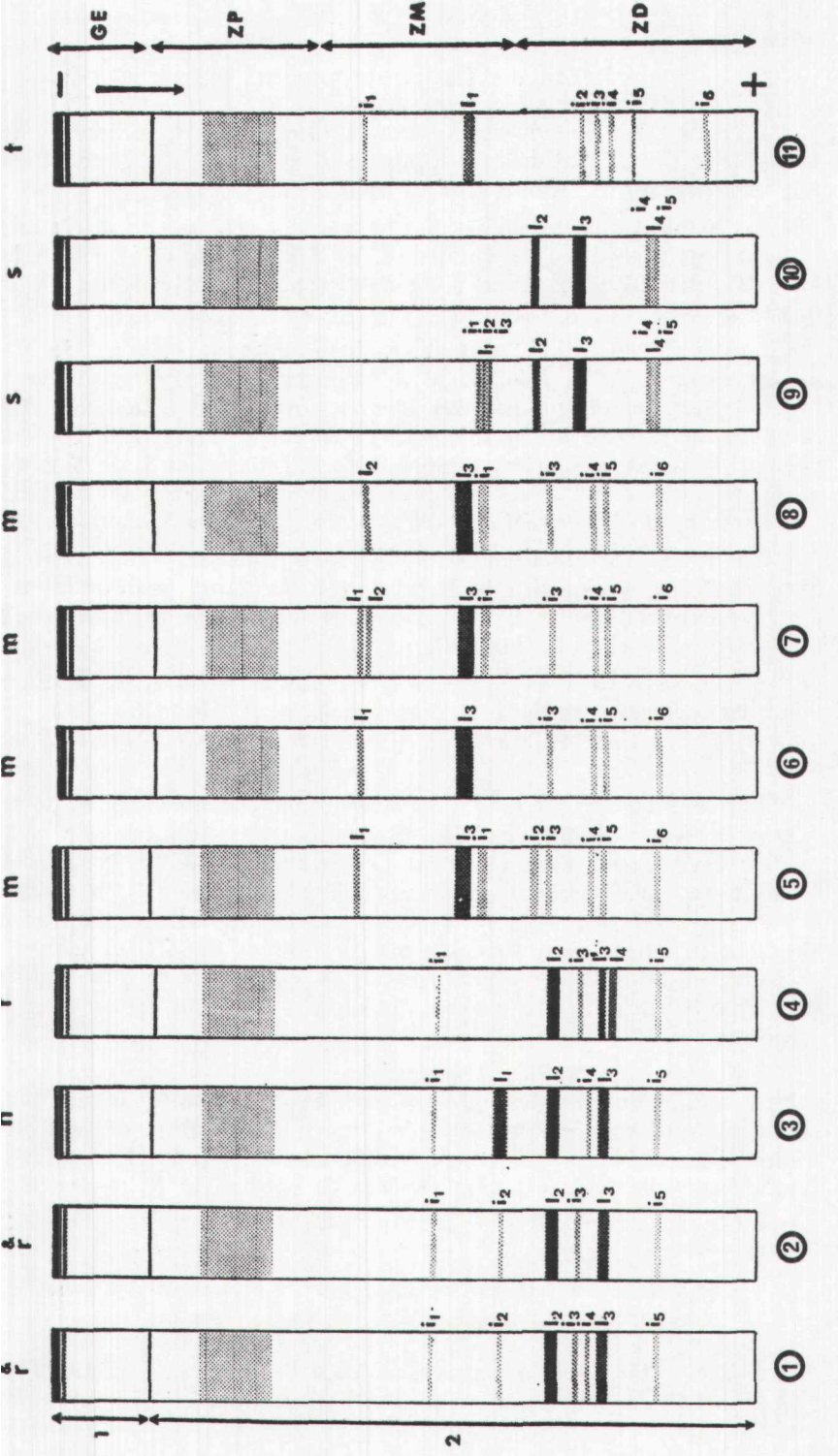


FIG. 2

II. Interprétation des électrophorégrammes bidimensionnels.

L'étude des enzymogrammes bidimensionnels, obtenus après 15 heures de migration sur plaques à gradient de concentration, apporte des informations complémentaires.

La bande I_2 observée chez *S. hookeri* et *S. rugicauda* après migration sur gels en tube se subdivise en 2 taches I_2 et $i?$ (Planche I, 1 et 2), ce qui permet de suggérer la nature hétérogène de cette bande I_2 .

La bande de faible intensité i_3 de *S. monodi*, située à la limite de la bande i_2 de *S. hookeri* et *S. rugicauda* se concrétise par une tache i_3 sur gel en plaque. La localisation de cette tache de faible intensité au niveau de la tache $i?$ de *S. hookeri* et de *S. rugicauda* permet de conclure que les bandes i_3 de *S. monodi* et I_2 de *S. hookeri* et *S. rugicauda* ne sont pas homologues, l'analogie se situant au niveau de $i?$ de *S. hookeri* et *S. rugicauda* et de i_3 de *S. monodi*. '•

La bande fortement positive I_3 de *S. hookeri* et *S. rugicauda* conduit à une tache simple I_3 occupant la même position chez les deux espèces (Planche I, 1 et 2) alors qu'aucune réaction positive n'est décelable chez *S. monodi*.

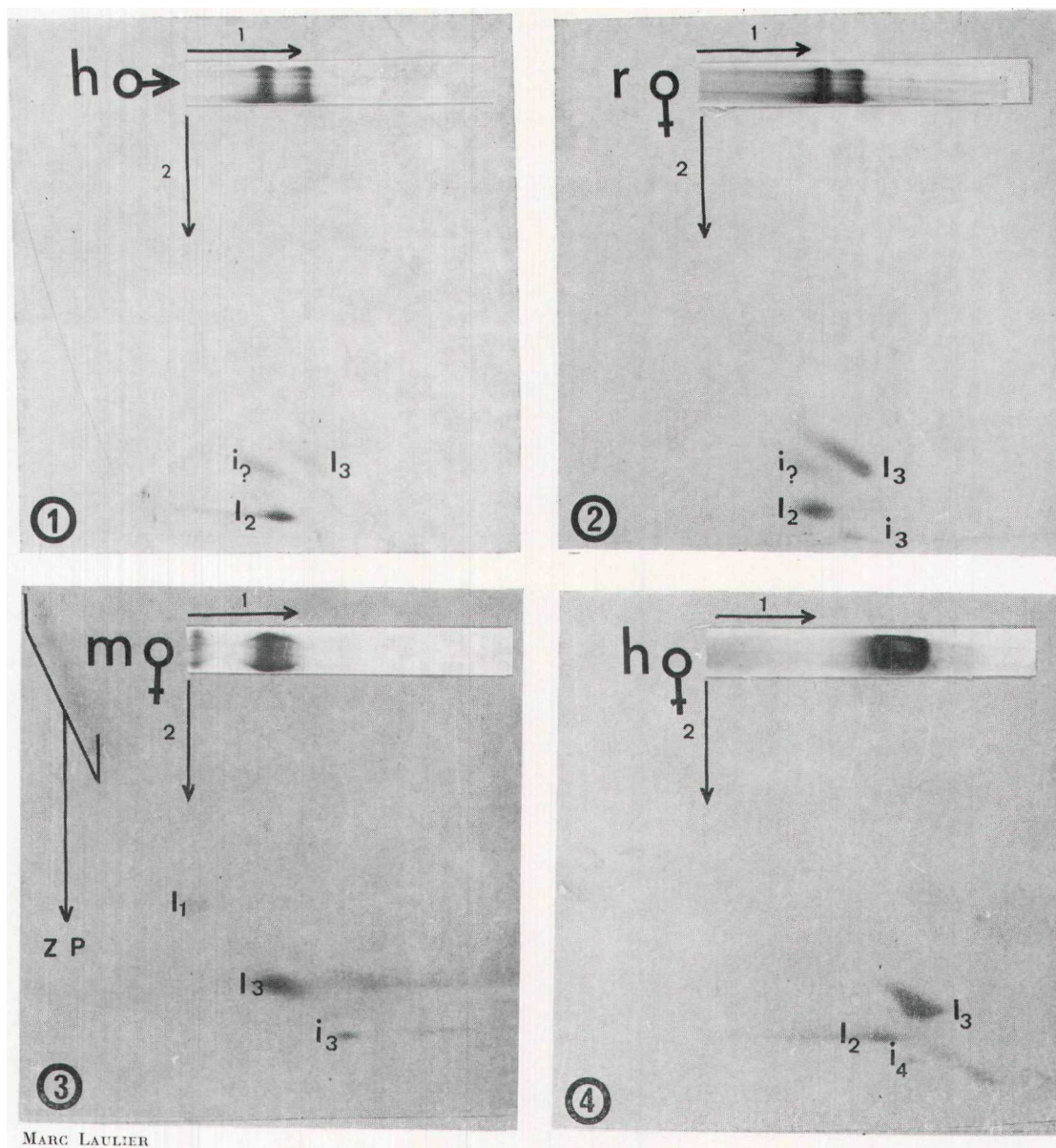
Après 15 heures de migration, les bandes I_1 et I_3 de *S. monodi* conduisent respectivement aux taches I_1 et I_3 (Planche I, 3) alors qu'aucune réaction n'apparaît à ce niveau chez *S. hookeri* et *S. rugicauda*.

Les bandes faibles i_3 et i_4 observées chez *S. hookeri* et *S. rugicauda* se concrétisent par des taches correspondantes sur gel en plaque. La tache i_3 absente sur le premier gel (Planche I, 1) se situe à la limite inférieure du deuxième gel (Planche I, 2). En réduisant le temps de migration de 15 à 13 h, une tache i_4 correspondant à la bande i_4 se matérialise ainsi qu'une succession de petites taches qui se trouvent éliminées du gel lorsque la migration se prolonge. Ces faits montrent que leur poids moléculaire est peu élevé et que le gel, dans ces conditions, n'a pas fini d'assumer son rôle de tamis.

La zone proximale qui se présente comme une région à forte coloration de fond sur les gels cylindriques se traduit par une longue tache oblique sur les gels en plaque, ce qui semble démontrer sa nature hétérogène. Cette plage matérialisée Planche I, 3 (ZP) est également observable chez les espèces *S. hookeri* et *S. rugicauda*.

III. Modalités d'action sur les 2 substrats α et β naphthyl acétates et influence des inhibiteurs et de la température.

A l'exception de la bande d'intensité faible i_5 , constante chez *S. hookeri* et *S. rugicauda*, nous n'avons considéré, pour cette étude, que les bandes présentant une activité intense afin d'éviter les erreurs d'interprétation, toujours possibles, au niveau des bandes faiblement colorées. L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 1.



MARC LAULIER

PLANCHE I

Electrophorèse bidimensionnelle : activité estérasiqne chez *S. hookeri* h, *S. ruicauda* r et *S. monodi* m.

La flèche horizontale 1 indique le sens de la première migration sur gel cylindrique ; la flèche verticale 2 indique le sens de la seconde migration réalisée sur plaque. Les taches sont numérotées en fonction de leur homologie avec les bandes observées sur gels cylindriques.

TABLEAU 1

Intensité de la coloration des bandes en fonction de la nature du substrat ;
influence des inhibiteurs.

Espèce	bande	Substrat			Inhibition		
		α Naphtyl	β Naphtyl	$\alpha + \beta$ Naphtyl	DFP (10^{-3} M)	θ 60° C5'	θ 60° C1'
<i>hookeri</i>	I ₁ *	++	?	?	?	?	?
	I ₂	+++	+++	$\alpha + \beta +$	++	++	+++
	I ₃	++	+	$\alpha +$	\pm	+	++
	i ₅	+	—	?	?	?	
	I ₂	+++	+++	$\alpha + \beta +$	++	++	+++
<i>rugicauda</i>	I ₃	++	+	$\alpha +$	\pm	+	++
	i ₅	+	—	?	?	?	
<i>monodi</i>	I ₁	++	\pm	$\alpha +$	++	\pm	++
	I ₃	+++	+++	$\alpha + \beta +$	++	++	+++
	I ₁	++	+	$\beta +$?*		
<i>serratum</i>	I ₂	++	++	$\beta +$	++		
	I ₃	+++	\pm	$\alpha + \beta +$	+		
	I ₄ i ₅	+	\pm	$\alpha +$?**		
<i>teissieri</i>	I ₁	++		$\alpha + \beta +$	++		

La nomenclature des bandes est identique à celle qui est précisée sur la figure 2.

Intensité de coloration : forte +++, modérée ++, faible +, très faible \pm , absence de coloration —.

Pour le mélange $\alpha + \beta$ naphtyl, $\alpha +$ indique une coloration brune, $\beta +$ une coloration rouge et $\alpha + \beta +$ une coloration brun rouge.

Importance de l'inhibition : forte +++, modérée ++, faible +, difficilement observable \pm .

* Bande inconstante non observée chez les témoins obtenus à partir de la moitié du broyat.

** Cette bande apparaît plus étroite ce qui confirmerait sa nature complexe.

? Réaction de cette bande vis-à-vis du substrat ou de l'inhibition non connue.

a) Réaction sur l' α et le β naphtyl acétates.

L'ensemble des bandes décrites chez chacune des cinq espèces étudiées réagit positivement sur un substrat d' α naphtyl acétate et aucune bande nouvelle n'apparaît lorsque le β naphtyl acétate est utilisé comme substrat.

L'utilisation du β naphtyl acétate conduit à une coloration rouge moins importante des bandes L de *S. hookeri* et *S. rugicauda* et I, de *S. serratum*, faible des bandes I, de *S. monodi* et I₃, I₄ de *S. serratum* et pratiquement nulle pour la bande i₅ de *S. hookeri* et *S. rugicauda*.

L'utilisation du mélange α et β naphtyl acétates conduit soit à des bandes brunes caractéristiques d'une réaction positive avec l' α naphtyl, soit à ces bandes rouges caractéristiques du β naphtyl, soit à des bandes rouge brun que nous pouvons considérer comme une réaction $\alpha + \beta$ naphtyl positive. Aucune bande nouvelle n'apparaît et seules les bandes les plus intenses (I₂ de *S. hookeri* et *S. rugicauda*, I₃ de *S. monodi* et *S. serratum*, I₁ de *S. teissieri*) sont $\alpha + \beta$ naphtyl positives. Aucune bande β naphtyl positive n'a été observée chez *S. hookeri*, *S. rugicauda*, *S. monodi* et *S. teissieri*. Chez *S. serratum*, les bandes I, et I₂ réagissent positivement au β naphtyl.

b) Influence des inhibiteurs.

A des concentrations comprises entre 10^{-2} et 10^{-5} M, l'EDTA ne provoque pas d'inhibition sensible au niveau des bandes présentant une activité intense.

De même, l'Esérine, à une concentration de 10^{-4} M, ne conduit pas à une inhibition des bandes nettes, mais la zone proximale des gels caractérisée par une activité diffuse et peu importante ne se colore pratiquement pas.

A une concentration de 10^{-2} M, le DFP inhibe l'ensemble des bandes estérases. A partir d'une concentration $0,5 \times 10^{-2}$ M, la spécificité s'affirme et le tableau 1 qui traduit le résultat de cet inhibiteur pour une concentration de 10^{-3} M montre que les bandes I_2 de *S. hookeri* et *S. rugicauda* et I_3 de *S. monodi* sont les plus inhibées et qu'elles correspondent à un ensemble de bandes aux caractéristiques biochimiques identiques.

c) Influence de la température.

L'étude de l'influence de la température n'a été entreprise que pour les trois espèces où des analogies importantes ont été constatées : *S. hookeri* et *S. rugicauda* en raison de la localisation des bandes et des réactions aux différents substrats et inhibiteurs et *S. monodi* en raison du comportement identique de sa bande I_3 et des bandes I_2 de *S. hookeri* et *S. rugicauda*, pourtant situées à un niveau très différent.

Le chauffage à 60°C pendant 1 minute ne semble pas concerner l'activité de la bande I_1 de *S. monodi* mais affecte considérablement l'activité des autres bandes importantes. Pour les spécimens de *S. hookeri* et *S. rugicauda* étudiés, les témoins, réalisés avec la moitié du surnageant, présentaient une activité plus intense en I_2 qu'en I_3 et, corrélativement, par chauffage, la bande I_2 semblait proportionnellement plus inhibée que la bande I_3 .

Le chauffage à 60°C pendant 5 minutes provoque une inhibition plus importante de l'ensemble des bandes. L'inhibition est totale lorsque le surnageant est chauffé à 60°C pendant 10 minutes.

L'ensemble de ces données montre que toutes les bandes intenses constamment observées chez *S. hookeri* et *S. rugicauda* et localisées au même niveau présentent des réactions identiques et que la bande L de *S. monodi* se comporte vis-à-vis des inhibiteurs et des différents substrats comme la bande I_2 de *S. hookeri* et *S. rugicauda*, pourtant située à un niveau différent.

C. - DISCUSSION ET CONCLUSION

La comparaison des enzymogrammes réalisés sur des gels d'acrylamide à 7,5 p. 100 permet de différencier les espèces *S. monodi*, *S. serratum* et *S. teissieri*, à l'exclusion des deux espèces *S. hookeri* et *S. rugicauda* mais suggère l'existence d'analogies importantes dans la zone distale des gels. Cependant, la modification de la concentration en acrylamide montre que cette homogénéité n'est qu'apparente et les analogies observées sur gels à 7,5 p. 100 disparaissent à l'exception de celles entre *S. hookeri* et *S. rugicauda*.

Comme Kérambrun, nous avons observé deux bandes d'intense activité estérasique chez *S. hookeri* et, au moins, trois bandes chez *S. serratum* ; par contre, nous n'avons pu déceler, comme lui, d'homologies entre les bandes intenses de *S. serratum* et du couple d'espèces *S. hookeri* et *S. rugicauda*. Par ailleurs, cet auteur fait mention d'un dimorphisme sexuel au niveau de bandes moins intenses apparemment situées dans une région correspondant à la zone proximale de nos gels. Nous avons préféré ne pas prendre ces bandes en considération compte tenu de leur finesse, de leur inconstance et de l'importante coloration de fond du système que nous avons utilisé.

Le faible nombre de substrats et d'inhibiteurs utilisés dans nos essais de différenciation des espèces *S. hookeri* et *S. rugicauda* ne nous autorise pas, à l'instar de nombreux auteurs et d'Oxford, en particulier, à établir une classification biochimique de ces estérases. A défaut de classification, la constatation que l'ensemble des bandes, de *S. hookeri* et *S. rugicauda*, situées au même niveau après migration, présente les mêmes réactions, confirme l'analogie de ces enzymes. Le comportement analogue vis-à-vis des différents substrats et inhibiteurs de la bande I₂ de *S. hookeri* et *S. rugicauda* et de la bande I₃ de *S. monodi*, pourtant située à un niveau très différent, implique que cette analogie de comportement est aussi importante physiologiquement et métaboliquement que les propriétés électrophorétiques. L'étude d'hybrides interspécifiques devrait nous permettre d'analyser le comportement de ces bandes.

L'espoir d'obtenir des informations sur la confirmation et la taille des molécules ayant une activité estérasique grâce à l'emploi de gels à gradient de concentration s'est révélé illusoire. Ces enzymes se trouvent, en effet, à la limite d'exclusion des gels à 30 p. 100, ce qui correspond approximativement à la valeur des poids moléculaires de 50.000 à 180.000 trouvée chez *Penaeus plebjus* par Haites, Don et Master.

Contrairement aux résultats acquis par Manwell chez *Calanus* et par Jelnes chez *Cardium*, l'étude des estérases ne nous a permis de différencier que les espèces *S. serratum*, *S. monodi* et *S. teissieri* à l'exclusion des espèces *S. hookeri* et *S. rugicauda* qui, dans les conditions expérimentales définies, présentent des enzymogrammes identiques. La convergence de ces données et des résultats de l'analyse de la lactate NAD oxydoréductase confirme la proche parenté de ces deux espèces qui diffèrent profondément, comme l'a montré récemment Frier, par leur comportement physiologique.

La localisation précise des bandes possédant une activité estérasique étant maintenant bien établie chez les espèces de *Sphaeroma* étudiées, on peut espérer que les recherches biochimiques, actuellement en cours, sur les hybrides interspécifiques entre les espèces *S. monodi*, *S. rugicauda* et *S. hookeri* permettront de préciser les positions phylogéniques de ces espèces.

Summary

Comparative study of the electrophoretic analysis of esterases for five species of genus *Sphaeroma* : *S. hookeri*, *S. rugicauda*, *S. monodi*, *S. serratum* and *S. teissieri*.

Acrylamide gel electrophoresis of entire crushed *Sphaeroma* and the obviousness of esterases activity on an α — naphthyl acetate substrate enable distinguish each of the three species : *S. serratum*, *S. monodi* and *S. teissieri*, while the species *S. hookeri* and *S. rugicauda* show among them an identical esterase equipment.

The use of different substrates and the action of varied inhibitors corroborate the analogies within the couple *S. hookeri* and *S. rugicauda* and the differences observed among the other species. However, it can be observed that in isoenzyme of *S. monodi*, while having a different relative mobility, shows the same reactions in front of inhibitors and different substrates as an isoenzyme common to *S. hookeri* and *S. rugicauda*.

Observations and arguments from antecedent experiments corroborate the isolation of *S. serratum* and *S. teissieri* and the great relationship of the couple *S. hookeri* and *S. rugicauda* with which *S. monodi* has some similarities.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ARVY, L., 1969. — Les enzymes chez les Crustacés. *Ann. Biol.*, 8 (9-10), pp. 505-580.
- BATTAGLIA, B., BISOL, P.M., VAROTTO, v., 1978. — Variabilité génétique dans des populations marines et lagunaires de *Tisbe holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida). *Arch. Zool. exp. gin.*, 119, pp. 251-264.
- BESSE, G., MOCQUARD, J.P., 1968. — Etude par électrophorèse des quantités relatives des protéines de l'hémolymph d'individus normaux et de femelles castrées chez deux Crustacés Oniscoides, *Porcellio dilatatus* (Brandt) et *Ligia oceanica* (L.). *C.R. Acad. Sc., Paris*, 267, pp. 2017-2019.
- FRIER, J.O., 1976. — Oxygen consumption and osmoregulation in the isopods *Sphaeroma hookeri* (Leach) and *S. rugicauda* (Leach). *Ophelia*, 15 (2), pp. 193-203.
- GIBERT, J., 1972. — Synthèse bibliographique des recherches électrophorétiques sur les protéines des Crustacés. *Ann. Biol.*, 11 (7-8), pp. 305-327.
- HAITES, N., DON, M., MASTER, J.C., 1972. — Heterogeneity and molecular weight. Interrelationships of the esterase isoenzymes of several invertebrate species. *Comp. Biochim. Physiol.*, 42 (B), pp. 303-332.
- JELNES, J.E., PETERSEN, GH., RUSSELL, p.J.C., 1971. — Isoenzyme taxonomy applied on four species of *Cardium* from danish and british water with a short description of the distribution of the species (Bivalvia). *Ophelia*, 9, pp. 15-
- KÉRAMBRUN, P., 1970. — Mise en évidence des estérases après électrophorèse sur gel de polyacrylamide chez *Idotea baltica*, *Ligia italica*, *Sphaeroma serratum*, *Sphaeroma hookeri* et *Sphaeroma ghigghi* (Crustacés, Isopodes). *C.R. Acad. Sc. Paris*, 271, pp. 438-441.
- KÉRAMBRUN, p., 1974. — Etude de la variabilité biochimique et génétique de *Sphaeroma ghigghi*, *S. hookeri* et *S. serratum* (Isopodes Flabellifères). Thèse de doctorat ès-Sc. Nat.
- KÉRAMBRUN, p., 1975. — Variabilité biochimique et génétique de *Sphaeroma ghigghi*, *S. hookeri* et *S. serratum*. Comparaison interspécifique. *Biochim. System. and ecol.*, 3, pp. 95-100.
- KÉRAMBRUN, p., 1975. — Variabilité biochimique et génétique de *Sphaeroma ghigghi*, *S. hookeri* et *S. serratum*. Variations intraspécifiques. *Biochim. System and ecol.*, 3, pp. 101-109.
- KÉRAMBRUN, p., 1976. — Différences de composition et de propriétés biochimiques liées au sexe chez *Sphaeroma hookeri* (Isopode Flabellifère). *Tethys* 8 (2), 1976 (1978), pp. 169-172.
- LAULIER, M., LEJUEZ, H., 1976. — Etude comparative de l'analyse électrophorétique de la Lactate NAD oxydoréductase pour cinq espèces de Sphéromes : *Sphaeroma serratum*, *S. monodi*, *S. teissieri*, *S. rugicauda* et *S. hookeri*. *C.B. Acad. Sc. Paris*, 283, pp. 1779-1781.

- LEJUEZ, R., 1966. — Comparaison morphologique, biologique et génétique de quelques espèces du genre *Sphaeroma* Latreille (Isopodes Flabellifères). *Arch. Zool. exp. gén.*, 107, pp. 469-668.
- MAURER, H.R., 1971. — Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. W. de Gruyter. New York.
- MANWELL, c, BAKER, C.M.A., ASHTON, P.A., CORNER, E.D.S., 1967. — Biochemical differences between *Calanus finmarchicus* and *C. helgolandicus*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 47, pp. 145-169.
- NARANG, s., KITZMILLER, J.-B., 1971. — Esterase polymorphism in a natural population of *Anopheles punctipennis*. II. Analysis of the EST. C system. *Can. J. Genet. cyt.*, 13, pp. 771-776.
- OXFORD, G.S., 1973. — The biochemical properties of esterases in *Cepea* (Mollusca : Helicidae) — *Comp. Biochem. Physiol.*, 45 (B), pp. 529-538.
- OXFORD, G.S., 1973. — The genetics of *Cepea* esterases. 1. *Cepea nemoralis*. *Heredity*, 30 (2), pp. 127-139.
- RESSLER, N., 1973. — A systematic procedure for determination of the heterogeneity and nature of multiple electrophoretic bands. *Anal. Biochem.* 51, pp. 589-610.
- SIMS, M., 1965. — Methods for detection of enzymatic activity after electrophoresis in polyacrylamide gel in *Drosophila* species. *Nature*, 207, pp. 757-758.