

CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET POLYMORPHISME DES ESTÉRASES DANS LE COMPLEXE D'ESPÈCES AFFINES *JAERA ALBIFRONS LEACH (CRUSTACÉ, ISOPODE).*

par

Marie-Louise Cariou

Laboratoire de Biologie et Génétique Evolutive», C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette, France.

Résumé

L'analyse électrophorétique en gel d'acrylamide permet de reconnaître sept zones d'activité estérasique dans trois espèces du Crustacé marin *Jaera albifrons* (Isopode). A l'exception de la zone II, la capacité à hydrolyser les esters décroît régulièrement quand la longueur de la chaîne carbonée du groupement acyl du substrat augmente. Le plus grand nombre de bandes sur le gel est obtenu avec l'alpha naphtyl acétate comme substrat. L'analyse génétique démontre que cinq loci autosomaux indépendants contrôlent les variations électrophorétiques dans ces espèces. Ce déterminisme mendélien simple est compatible avec les résultats obtenus par l'action d'inhibiteurs qui permet de reconnaître les quatre catégories principales d'estérases (cholinestérase, acétyl, acyl et carboxylestérases). L'homogénéité relative des estérases des trois espèces de *Jaera albifrons* s'oppose à la grande variabilité qui les caractérise dans d'autres groupes. Pour les *Jaera*, si chaque locus est susceptible de montrer des variations alléliques, c'est le même allèle qui prédomine dans toutes les espèces.

Les estérases non spécifiques constituent un vaste groupe d'enzymes susceptibles de réagir avec des esters de synthèse (Gomori, 1952). Ces enzymes se caractérisent par une large répartition tissulaire et un important polymorphisme aussi bien chez les végétaux que dans le règne animal où elles ont été étudiées dans des groupes zoologiques variés. Il est évident que l'extrême diversité des estérases les rend particulièrement favorables à l'analyse de la structure génétique des populations naturelles, bien que la complexité des phénotypes observés sur les électrophorégrammes rend parfois leur interprétation difficile. Ce, d'autant plus que certaines enzymes, telles que les lipases et les anhydrases carboniques, sont susceptibles de montrer une activité estérolytique. L'analyse génétique des variants électrophorétiques des estérases est donc particulièrement souhaitable. Le complexe *Jaera albifrons* regroupe cinq espèces étroitement apparentées, dont seuls les mâles sont reconnaissables grâce aux variants sexuels portés par les péréiopodes antérieurs ou postérieurs (Bocquet, 1953). Ce complexe est actuellement soumis à une étude intensive du polymorphisme enzymatique. Cette note présente les résultats de l'étude de l'activité des électromorphes des estérases en présence de substrats et d'inhibiteurs variés dans trois des cinq espèces : *Jaera albifrons albifrons*.

frons, *J. (a.) ischiosetosa* et *J. (a.) posthirsuta*. Le déterminisme des variations aux différents loci est élucidé par une analyse génétique expérimentale, fait relativement rare chez des Invertébrés marins.

Matériel et méthodes

Les électrophorèses sont conduites en gel de polyacrylamide de concentration 10 p. 100 dans une solution tampon borate de sodium 0,2M à pH 8,6, selon la technique décrite antérieurement (Cariou, 1976). A 5°, pour une intensité de 4 mA par tube, la migration dure 3 heures. Avant la révélation de l'activité enzymatique, les gels sont placés pendant 40 mn dans une solution d'acide borique 0,25M, à 5° afin d'abaisser leur pH. L'incubation se fait au réfrigérateur (température 7-10°) pendant 8 à 12 heures, ce qui permet une révélation satisfaisante des bandes de faible activité et évite la surcoloration de l'ensemble du gel. La solution d'incubation (modifiée de Pasteur et Kastritsis, 1971) comprend : 10 ml d'une solution d' α naphtyl acétate à 1 p. 100 dans un mélange eau : acétone volume à volume ; 70 mg de Fast Garnett GBC dans 100 ml de tampon acétate de sodium 0,05M, pH 5.

L'activité spécifique du substrat est déterminée en comparant l'intensité de chaque bande en présence des divers substrats. Pour l'étude des effets des inhibiteurs, les gels sont immergés pendant 35 mn dans la solution tampon acétate de sodium contenant l'inhibiteur (ou maintenus à l'étuve, à la température choisie pendant une durée variable), puis soumis à l'incubation dans la solution normale de révélation. Le gel témoin et le gel soumis à l'action de l'inhibiteur sont obtenus à partir du même individu.

RÉSULTATS

Dans les trois espèces étudiées, *J. (a.) ischiosetosa* et *J. (a.) albifrons* (populations de Kiel, Allemagne) ; *J. (a.) posthirsuta* (population de Newport, U.S.A.), une quinzaine de bandes colorées d'intensité variable peut être dénombrée après électrophorèse. Elles se répartissent en sept zones d'activité numérotées de I à VII, la zone I étant la plus anodique.

Action de différents substrats

La révélation la plus complète est obtenue avec l' α naphtyl acétate (Fig. 1). L' α naphtyl butyrate révèle les mêmes zones d'activité, mais les zones I et VII sont nettement moins colorées alors que les bandes de la zone II sont plus intenses. En présence d' α naphtyl caprylate, la réaction est pratiquement nulle : les zones II et III apparaissent sous forme de traces.

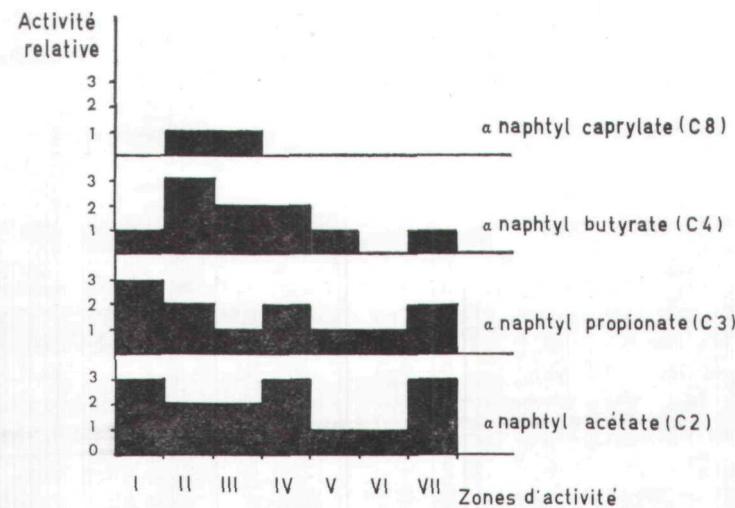


FIG. 1

Activité spécifique des estérases chez *Jaera albifrons*, en fonction du substrat. L'activité est appréciée par l'intensité relative des bandes. 0 = activité nulle; 3 = activité maximale.

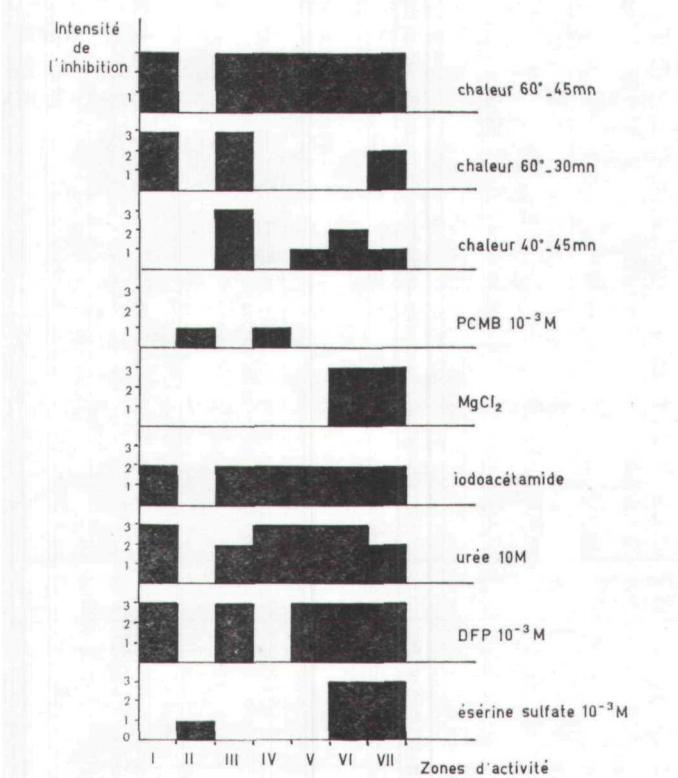


FIG. 2

Sensibilité spécifique aux inhibiteurs des zones d'activité estérasique chez *Jaera albifrons*. L'inhibition est mesurée par l'intensité relative des bandes: 0 = inhibition nulle, la coloration des bandes par rapport au témoin n'est pas modifiée. 3 = inhibition totale, aucune activité enzymatique n'est décelable sur les gels.

Action des inhibiteurs (Fig. 2)

L'ésérine, inhibiteur des cholinestérases a été fréquemment utilisée pour les identifier (Wilson, 1960; Augustinsson, 1961, Masters et Holmes, 1974). A la concentration de $10^{-3}M$, l'ésérine inhibe totalement la zone VII et partiellement la zone VI, toutes deux situées dans la partie supérieure du gel.

Le DFP (Di-isopropylfluorophosphate) inhibe les estérases comportant un résidu hydroxyl-sérine au site actif (Cohen, 1955). Chez les *Jaera*, les zones I, III, V, VI et VII, sont totalement inhibées. Seules les zones II et IV sont préservées et représentent les arylestérases, les acétylestérases n'ayant pas été reconnues avec certitude chez les Invertébrés.

L'urée fortement concentrée ($10^{-3}M$) inhibe totalement les zones I, IV, V et VI. L'inhibition est faible pour les zones III et VII. Or, selon Masters et Holmes (1974), les arylestérases seraient préservées. Il est tentant de considérer que la zone IV, totalement inhibée, est composée d'acétylestérases bien que leur présence n'ait pas été démontrée jusqu'ici chez les Invertébrés.

A $10^{-3}M$, la iodoacétamide n'exerce aucune inhibition sélective ; cependant l'ensemble des zones d'activité est moins coloré.

Certains ions métalliques exercent également une action inhibitrice; le parachloromercuribenzoate (PCMB), à $10^{-3}M$, inhibe faiblement les zones II et IV.

Inhibition par la chaleur

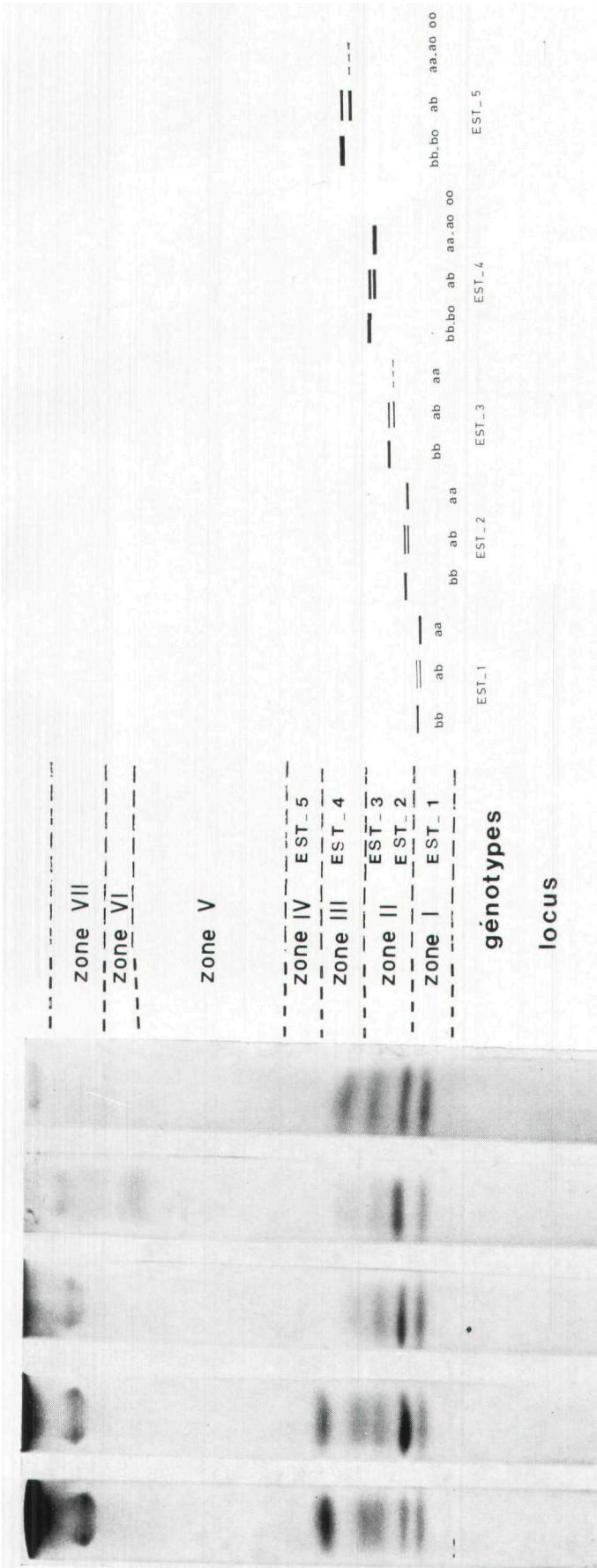
Les gels exposés à une température de 60° pendant 45 minutes, montrent une inhibition totale des zones III, IV, VI et VII. La zone I est partiellement inhibée. A une température moins élevée (40°), seule la zone III est totalement inhibée.

Les informations ainsi obtenues sont résumées dans le tableau I.

TABLEAU I

Caractérisation des estérases des espèces de *Jaera albifrons* par l'action des inhibiteurs.

Zone d'activité et locus	Classification des estérases	Critère de détermination
VII VI	Cholinestérases Cholinestérases + estérases non caractérisées non précisée	sensibilité à l'ésérine et à la chaleur sensibilité à l'ésérine et à la chaleur
V IV (EST-5)	Accétylestérases ?	préservée par DFP sensibilité au PCMB, urée et chaleur
II (EST-2 et 3)	Arylestérases	préservée par DFP et urée sensibilité au PCMB
III (EST-4) et I (EST-1)	Carboxylestérases	sensibilité au DFP et à la chaleur



Dr. WENGER

Variantes électriques des estéras dans trois espèces du complexe *Jaera albitifrons*. Le diagramme illustre les phénotypes observés ou hypothétiques (en pointillé) ainsi que les génotypes correspondants. Les loci EST-1, EST-2 et EST-3 sont dialliques; EST-4 et EST-5 sont trialléliques et comportent un allele nul (symbole O). La mauvaise révélation des bandes dans la partie supérieure des gels n'a pas permis l'interprétation génétique des variations observées (zones V, VI et VII).

Variations génétiques des estérases

Les sept zones d'activité reconnues révèlent des variations individuelles sur les électrophorégrammes, au moins dans l'une des trois espèces étudiées. Les zones de faible mobilité électrophorétique (V, VI et VII) montrent des variations selon toute vraisemblance, génétiques, mais les difficultés de lecture des gels rendent aléatoire l'interprétation des résultats des croisements. Par contre, pour les zones de I à IV, les ségrégations mendéliennes observées dans les divers croisements réalisés démontrent le déterminisme génétique simple des variants électrophorétiques. Sur les gels, les homozygotes présentent une seule bande, rapide ou lente ; les hétérozygotes montrent les deux bandes parentales. On peut en déduire une structure monomérique des estérases de *Jaera*. L'ensemble des phénotypes observés et leur interprétation génétique sont illustrés par la Planche I : le locus EST-1 (zone I) est diallélique dans l'espèce *posthirsuta*. Seul l'allèle lent a été détecté dans les populations de *J. (a.) albifrons* et *J. (a.) ischiosetosa*. Deux systèmes génétiques interviennent dans la zone II : au locus EST-2, deux allèles ont été détectés dans les espèces *albifrons* et *ischiosetosa* ; un allèle nul intervient dans l'espèce *posthirsuta* (aucune activité n'est décelable sur les gels chez l'homogypse). Le locus EST-3 est diallélique ; l'allèle lent est seul présent chez les individus *ischiosetosa* et *posthirsuta* examinés. Trois allèles, dont un allèle nul, règlent les variations aux loci EST-4 (zone III) et EST-5 (zone IV), mais interviennent différemment dans chaque espèce.

DISCUSSION

Chez les *Jaera albifrons*, on constate que toutes les estérases sont capables d'hydrolyser les esters à chaîne acyl courte, mais l'efficacité de ces enzymes varie selon le substrat utilisé. L'activité de la majorité des estérases de *Jaera* décroît régulièrement quand la longueur de la chaîne acyl du substrat augmente : les zones I, IV et VII montrent une activité maximale avec l'a naphtyl acéate qui ne comporte que deux atomes de carbone dans la chaîne acyl. De telles différences d'activité ont été fréquemment observées par les auteurs (Masters et Holmes, 1974 ; Dickinson et Johnson, 1978) et sont attribuées à des différences dans le taux de réaction plutôt qu'à une spécificité réelle. Choudhury (1972) propose une autre interprétation, comparable à celle de la structure de la LDH, basée sur un concept de sous-unités. Ainsi, chaque estérase de *Jaera* serait constituée d'un mélange de sous-unités capables d'hydrolyser les substrats comportant des chaînes acyl à deux, trois et quatre atomes de carbone, avec une prédominance du premier type, ce qui expliquerait l'activité plus forte avec le substrat à deux carbones.

Les estérases des zones III et V, relativement peu actives, semblent indifférentes à la longueur de la chaîne acyl du substrat. On peut

imaginer que ces estérases ne sont pas spécifiques ou que ce sont des molécules complexes composées en quantité égale de sous-unités capables d'hydrolyser les substrats à 2, 3, 4 et 8 atomes de carbone.

Le comportement de la zone II semble s'opposer à la généralisation de l'interprétation de Choudhury. Pour ces estérases, l'activité est maximale avec l'a naphtyl butyrate (Fig. 1) et décroît aussi bien avec les esters à chaîne plus courte que plus longue. Matteo (1975) fait la même observation chez *Littorina littorea*, Templeton (1969), chez une estérase d'érythrocyte de souris et Choudhury (1972), pour une estérase stomachale de rat. Selon ce dernier auteur, ces estérases pourraient être composées en majeure partie de sous-unités identiques qui, placées en présence de leur substrat complémentaire (estérase 4C en présence du substrat 4C) montreraient leur activité maximale.

Ce concept de sous-unités de la structure des estérases semble pouvoir rendre compte des variations d'activité des différentes zones estérasiques détectées par électrophorèse dans trois espèces de *Jaera albifrons*. Cependant, cette interprétation est plus difficilement compatible avec les résultats de l'analyse génétique qui impliquent un déterminisme mendélien simple : cinq loci indépendants règlent les variations des zones I à IV et, pour chacun d'eux, deux ou trois allèles expliquent la totalité des variations observées. Par ailleurs, les résultats de l'étude de l'action des inhibiteurs sont concordants avec la reconnaissance de zones à commande génétique indépendante.

Le petit nombre d'allèles détecté pour chaque locus est l'une des originalités des estérases de ces crustacés (nombre moyen d'allèles : 2,4). La même constatation a été faite pour l'Isopode marin *Sphaeroma* (Laulier, com. pers.) et *Homarus americanus* (Barlow et Ridgway, 1971).

De plus, bien que chaque locus soit susceptible de montrer des variations alléliques, au moins dans une espèce, c'est le plus souvent le même allèle qui prédomine dans les trois espèces étudiées. Les estérases ne permettent en aucun cas une diagnose spécifique dans ce complexe. L'homogénéité relative des estérases des espèces affines de *Jaera albifrons* contraste fortement avec l'extraordinaire polymorphisme de ces enzymes dans la plupart des groupes zoologiques. Cinq à huit allèles ne sont pas rares à un même locus, notamment chez les insectes où leur nombre atteint 18 pour un locus de *Hemimargus isola* (Burns et Johnson, 1971), 20 au locus EST-A de *Dacus olaea* (Tsakas et Krimbas, 1970), 24 pour une estérase de *Gryllus integer* (Wagner et Selander, 1974). Si certaines estérases interviennent dans la résistance de divers insectes aux pesticides (Tsakas et Krimbas, 1970 ; Pasteur et Sinègre, 1975), on possède peu de renseignements sur leurs fonctions biologiques réelles. On leur attribue un rôle important dans l'assimilation des aliments. L'homogénéité des estérases de *Jaera* pourrait suggérer, soit l'existence d'un régime alimentaire peu varié d'une espèce à l'autre, soit une réponse à des conditions d'environnement comparables, les trois espèces se partageant la zone intertidale.

Je remercie vivement le Professeur J. David qui a accepté de relire ce manuscrit.

Summary

Acrylamide electrophoresis is used to determine the esterase isozymes present in three species of the intertidal crustacea *Jaera albifrons* (Isopoda). Seven regions can be recognized on gels and a maximum of bands is found with α naphtyl acetate as substrate. The capacity of ester hydrolysis is seen to decline gradually with successively longer chain carbon substrates except for region II (maximum activity with α naphtyl caprylate). These results seem to be consistent with Choudhury's suggestion that non specific esterases all belong to one enzyme system whose structure is built on a subunit structure and exhibit overlapping specificities though sharing of common summits.

But, a genetic analysis shows that five independant autosomal loci control the variations at polymorphic regions (regions I, II, III and IV) in the three species. This mendelian determinism is consistent with the results of inhibitor tests which permit the characterization of the four major groups of esterases (cholinesterases, acetyl, aryl and carboxylesterases) and seem to show that this compartmentation is not completely arbitrary.

An important feature is the relative homogeneity of esterase isozymes in the three species of *Jaera albifrons* group: each locus is able to show allelic variation but the same allele is predominant for all the species.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AUGUSTINSSON, D.B., 1961. — Multiple forms of esterase in vertebrate blood plasma. *Ann. Acad. Sci.*, 94, pp. 844-860.
- BARLOW, J. and RIDGWAY, G.J., 1971. — Polymorphisms of esterase isozymes in the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Bd., Canada*, 28, pp. 15-21.
- BOCQUET, C., 1953. — Recherches sur le polymorphisme naturel des *Jaera marina* (Fabr.) (Isopodes, Asellotes). *Arch. Zool. exp. gén.*, 90, pp. 187-450.
- BURNS, J.M. and JOHNSON, P.M., 1971. — Esterase polymorphism in the butterfly *Hemiargus isola*: stability in a variable environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68, p. 34.
- CARIOU, M.L., 1976. — Variations de la malate déshydrogénase dans quatre espèces de *Jaera albifrons*: étude génétique et variation géographique. *Biochem. Syst. Ecol.*, 4, pp. 123-129.
- CHOUDHURY, S.R., 1972. — The nature of nonspecific esterases. A subunit concept. *J. Histochem. Cytochem.*, 20, pp. 507-517.
- COHEN, J.A., OOSTERBAAN, R.A., WARBINGA, M.B.P.J. and JANSZ, H.S., 1955. — Chemical structure of the reactive group of esterases. *Disc. Faraday Soc.*, 20.
- DICKINSON, J.P. and A.D. JOHNSON, 1978. — Electrophoretic separation of esterases of *Alaria marcianae* (La Hue, 1917) (Trematoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 60B, pp. 277-279.
- GOMORI, G., 1952. — Microscopic histochemistry. The University of Chicago Press.
- MASTERS, C.J. and HOLMES, U.S., 1974. — Isoenzymes, multiple enzymes forms and phylogeny in "Advance in Comparative Physiology and Biochemistry", Academic Press.
- MATTEO, M.R., 1975. — Biochemical characterization of esterase isozymes of the marine snail, *Littorina littorea* in "Isozymes. IV. Genetics and Evolution" Ed. L. Markert, Academic Press.
- PASTEUR, N. and KASTRITSIS, C., 1971. — Developmental studies in *Drosophila*. I. Acid phosphatase, esterases and other proteins in organs and whole-fly homogenates during development of *D. pseudoobscura*. *Dev. Biol.*, 26, pp. 525-536.
- PASTEUR, N. et SINEGRE, G., 1975. — Esterase polymorphism and sensitivity to duration organophosphorus insecticide in *Culex pipiens pipiens* populations. *Biochem. Genet.*, 13, pp. 789-803.

- TEMPLETON, M., 1969. — Mouse erythrocyte esterases and an interaction with heparin as shown by starch gel electrophoresis. *J. Histochem. Cytochem.* 17, p. 95.
- TSAKAS, S. and KRIMBAS, C.B., 1970. — The genetics of *Dacus oleae*. IV. Relation between adult esterase genotypes and survival to organophosphante insecticides. *Evolution*, 24, pp. 807-815.
- WAGNER, R.P. and R.K., SELANDER, 1974. — Isozymes in Insects and their significance. *Ann. Rev. Entomol.*, 19, pp. 117-138.
- WILSON, I., 1971. — Acetylcholinesterase in "The Enzymes", Boyer, P.D. Lardy, H. and Myrback, K., 4, pp. 501-520.