

## Contribution à l'Étude des Estérases dans Quatre Sous-espèces D'*Idotea balthica*

JEAN-PHILIPPE GILARD et EMMANUELLE LEGRAND-HAMELIN

Laboratoire de Biologie Animale, E.R.A. C.N.R.S. no 230, U.E.R. Sciences, 86022 Poitiers Cédex, France

**Key Word Index**—*Idotea balthica*; Valvifera; Isopoda; Crustacea; enzyme polymorphism; esterases; geographic variation.

**Abstract**—In *Idotea balthica*,  $\alpha$  esterase<sub>2</sub> and  $\beta$  esterase<sub>3</sub> have been tested against nine substrates and nine inhibitors. They are dependent on two polyallelic independent loci. Est<sub>2</sub> offers alternative alleles in Mediterranean and Nordic populations. The variation in frequency of alleles at locus Est<sub>3</sub> allows one to characterize the subspecies *stagnea* compared with *tricuspidata* and *balthica* but cannot be used to separate this subspecies of *basteri*.

### Introduction

L'espèce *Idotea balthica* se rencontre sur toutes les côtes de l'Europe occidentale et de l'Afrique du Nord. L'étude des caractères morphologiques, mixiologiques et biogéographiques de nombreuses populations de cet isopode conduit à distinguer deux couples de sous-espèces: l'un, nordique, comprend *I. b. balthica* du secteur baltique et *I. b. tricuspidata* du domaine atlantique, l'autre, méridional, comprend *I. b. basteri* de la mer méditerranée et *I. b. stagnea* des étangs littoraux méditerranéens. De plus, cette étude autorise un essai de reconstitution de l'histoire évolutive de ces sous-espèces [1].

Sur le plan théorique, il apparaît intéressant d'estimer par l'analyse de leur polymorphisme enzymatique le degré de divergence génétique existant entre ces différentes sous-espèces et de voir si leur histoire évolutive est liée à l'évolution de leurs protéines solubles. Sur le plan pratique, on peut espérer affiner la définition de chacune de ces sous-espèces en mettant en évidence des phénotypes enzymatiques caractéristiques de chacune d'elles. Dans le cadre de ce travail de taxonomie électrophorétique [2, 3], nous avons entrepris l'étude des estérases non spécifiques; ces enzymes, chez beaucoup d'invertébrés, sont très polymorphes et recèlent souvent des gènes diagnostiques.

Nous relaterons ici nos essais de caractérisation biochimique des deux systèmes estérasiques

majeurs d'*I. b.* et aborderons leur analyse de génétique formelle ainsi que l'étude de la variation géographique de leur polymorphisme.

### Résultats

Les zymogrammes estérasiques observés en migration anodique, après dégradation de l' $\alpha$ -et du  $\beta$  naphthyl acétate, présentent sept systèmes. Ils ont été affectés d'un indice qui augmente avec leur distance de migration à partir de l'origine. La plupart d'entre eux, parfois de manifestation inconstante, paraissent monomorphes; il s'agit des  $\beta$  estérases 1, 4 et 7 et des  $\alpha$  estérases, 5 et 6. Au contraire, les systèmes 2 et 3, qui constituent la zone d'activité principale, localisée dans la moitié proximale du gel, sont polymorphes (Fig. 1); ce seront les seuls systèmes étudiés ici.

Le système 3 est une  $\beta$  estérase. Cette Est<sub>3</sub> se présente, chez la majeure partie des individus des quatre sous-espèces d'*I. b.* étudiées ici, sous la forme d'une bande unique, dont la mobilité relative est de 0,34; nous l'avons appelée 100. Chez certains individus, cette bande est remplacée par une autre, plus lente (bande 90 ou 95) ou au contraire plus rapide (bande 106 ou 111). Chez d'autres, ce système comporte trois bandes, dont la médiane est généralement deux fois plus épaisse que les extrêmes; ces extrêmes coïncident alors avec deux quelconques des bandes 90, 95, 100, 106 ou 111. Tous ces phénotypes à bande unique ou à trois bandes se rencontrent aussi bien chez les mâles que chez

(Received 8 December 1984)

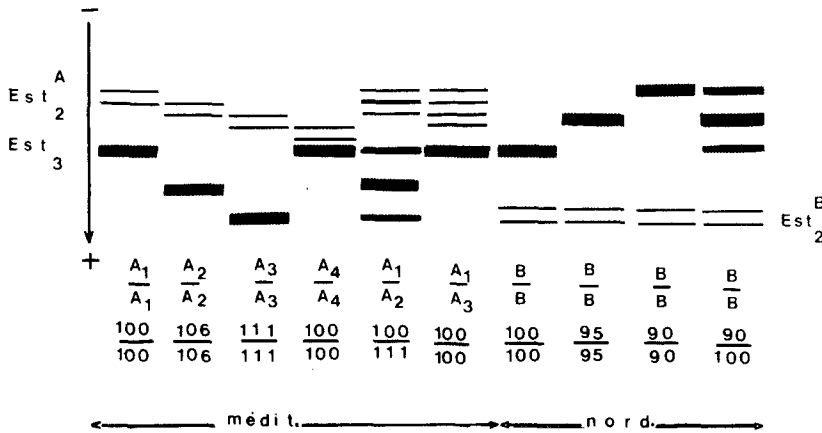


FIG. 1. DIAGRAMMES DE QUELQUES VARIANTS ELECTROPHORETIQUES DE L'EST<sub>2</sub> ET DE L'EST<sub>3</sub> CHEZ DES *IDOTEA BALTHICA* MEDITERRANEENNES ET NORDIQUES. AU DESSOUS DE CHAQUE PHENOTYPE A ETE INDIQUE LE GENOTYPE CORRESPONDANT.

les femelles appartenant aux différents types de couleur de l'idotée.

Le système 2 est un  $\alpha$  estérase, dont la mobilité varie en fonction de l'origine géographique de l'individu étudié; il y a donc lieu de distinguer une Est<sub>2</sub><sup>A</sup> et une Est<sub>2</sub><sup>B</sup>. L'estérase 2<sup>A</sup> caractérise les sous-espèces méditerranéennes d'*I. b.*, elle migre toujours plus lentement que la bande 100 de l'Est<sub>3</sub>. Elle se présente, le plus souvent, sous forme de deux bandes brun-noir d'intensité égale, et écartées d'environ 2,5 mm sous nos conditions expérimentales. Cette double bande peut se trouver en quatre positions, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub>; la bande la plus lente de A<sub>1</sub> est située à environ 10 mm au-dessus de l'Est<sub>3</sub><sup>100</sup>, celle de A<sub>4</sub> à 2mm 5 de cette même Est<sub>3</sub><sup>100</sup>. A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> sont en position intermédiaire. Il existe des individus dont l'Est<sub>2</sub><sup>A</sup> présente deux doubles bandes: l'une par exemple en position A<sub>1</sub>, l'autre en position A<sub>3</sub>; on peut aussi observer la présence simultanée de A<sub>1</sub> et de A<sub>4</sub> ou de A<sub>2</sub> et de A<sub>4</sub>. D'autres phénotypes apparaissent à 3 bandes, où la bande médiane est souvent plus épaisse que les extrêmes. Nous pensons qu'ils sont le résultat de la présence simultanée de deux doubles bandes, cette fois contiguës, par exemple A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>A<sub>3</sub> ou A<sub>3</sub>A<sub>4</sub> avec superposition de la bande rapide de l'une avec la bande lente de l'autre (Fig. 1).

L'estérase 2<sup>B</sup> caractérise les sous-espèces nordiques d'*I. b.*; elle migre toujours plus rapidement que la bande 100 de l'Est<sub>3</sub>. Elle comporte deux

bandes brun-noir d'intensité égale, dont la plus lente se situe à environ 10 mm au-dessus de l'Est<sub>3</sub><sup>100</sup>.

#### Essai de Caractérisation Biochimique

L'Est<sub>2</sub> et l'Est<sub>3</sub> d'*I. b.* ne diminuent que faiblement d'efficacité lorsque s'allonge la chaîne acyl du substrat carboxylique utilisé; il faut que cette chaîne atteigne 14 atomes de carbone pour que leur baisse d'activité soit sensible. La zone principale d'activité estérasique chez *Idotea balthica* est également bien révélée avec l'acétylthiocholine iodide et le butyrylthiocholine iodide.

Une inhibition totale de l'Est<sub>2</sub> et de l'Est<sub>3</sub> est obtenue par l'action du D.F.P., du P.C.M.B. et par une exposition de 90 minutes à une température de 60°C. Une inhibition faible de ces deux enzymes s'obtient avec le P.M.S.F. et l'Iso O.M.P.A. Par ailleurs, l'azinphos éthyl organophosphate, le nitrate d'argent et l'urée suppriment l'Est<sub>2</sub> mais laissent intacte (ou presque pour l'urée) l'Est<sub>3</sub>. De plus, une exposition de 45' à 60°C n'a aucun effet sur l'Est<sub>2</sub><sup>A</sup>, n'a qu'une action faible sur l'Est<sub>3</sub>, mais au contraire inhibe totalement l'Est<sub>2</sub><sup>B</sup>. Enfin, l'ésérine et l'E.D.T.A. n'ont aucune action inhibitrice sur la totalité de la zone estérasique principale de *I. b.*

#### Génétique Formelle

Est<sub>2</sub>. Afin d'étudier l'hérédité de l'Est<sub>2</sub><sup>A</sup> caractéristique des idotées méditerranéennes et de l'Est<sub>2</sub><sup>B</sup> caractéristique des idotées nordiques, nous

TABLEAU 1. LIAISON ENTRE L'EST<sub>2</sub><sup>A</sup> ET L'EST<sub>3</sub><sup>B</sup>: F<sub>1</sub> DE SEPT CROISEMENTS INTERSUBSPECIFIQUES

Numéro du croisement	Parents		Descendants				χ <sup>2</sup>
	Idotées méditerranéennes	Idotées nordiques	A,B	A <sub>2</sub> B	A <sub>3</sub> B	A <sub>4</sub> B	
1	♀ A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	♂ BB	0	0	21	0	
2	♀ A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	♂ BB	0	0	0	18	
3	♀ A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	♂ BB	27	26	0	0	0,02
4	♀ A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	♂ BB	0	17	21	0	0,4
5	♀ A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	♂ BB	19	0	32	0	3,3
6	♂ A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	♀ BB	20	0	22	0	0,09
7	♂ A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	♀ BB	10	0	16	0	1,4

avons effectué quelques croisements intersubspécifiques entre *I. b. basteri* ou *I. b. stagnea* présentant une double, une triple ou une quadruple bande au niveau Est<sub>2</sub><sup>A</sup>, et *I. b. tricuspadata* ou *I. b. balthica* qui ne présentaient donc qu'une double bande au niveau Est<sub>3</sub><sup>B</sup>. Les résultats de ces croisements sont consignés dans le Tableau 1. On obtient, dans tous les cas, des individus hybrides, chez lesquels s'expriment, aussi intensément que dans les souches parentales, à la fois l'Est<sub>2</sub><sup>A</sup> et l'Est<sub>3</sub><sup>B</sup>. Ces hybrides de F<sub>1</sub> ont, à leur tour, été croisés entre eux. Les résultats obtenus ont été regroupés dans le Tableau 2.

Est<sub>3</sub>. Vingt cinq types de croisements ont été effectués à partir d'individus au zymogramme connu. Ils nous ont permis de faire l'analyse électrophorétique de mille six cent soixante six individus. Dans le Tableau 3, nous avons regroupé plusieurs descendancee du même type lorsqu'elles se sont avérées chacune statistiquement conformes aux rapports mendéliens attendus.

*Indépendance des gènes codant pour Est<sub>2</sub> et Est<sub>3</sub>*. Le croisement d'un ♂ Est<sub>2</sub><sup>A<sub>2</sub>/A<sub>3</sub></sup> Est<sub>3</sub><sup>100/106</sup> avec une ♀ Est<sub>2</sub><sup>B/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>90/100</sup> a donné: 4 Est<sub>2</sub><sup>A<sub>2</sub>/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>90/100</sup>, 6 Est<sub>2</sub><sup>A<sub>2</sub>/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>100/100</sup>, 10 Est<sub>2</sub><sup>A<sub>3</sub>/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>90/106</sup>, 8 Est<sub>2</sub><sup>A<sub>3</sub>/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>100/106</sup>, 6 Est<sub>2</sub><sup>A<sub>3</sub>/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>90/100</sup>, 5 Est<sub>2</sub><sup>A<sub>3</sub>/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>100/100</sup>, 5 Est<sub>2</sub><sup>A<sub>2</sub>/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>90/106</sup>, 6 Est<sub>2</sub><sup>A<sub>2</sub>/B</sup> Est<sub>3</sub><sup>100/106</sup>. Les gènes qui codent pour ces deux types d'estérasee sont donc très probablement indépendants.

#### *Variation Géographique du Polymorphisme des Estérasee Principales d'I. b.*

Est<sub>2</sub>. De nombreuses électrophorèses ont été effectuées, en vue d'étudier une éventuelle variation géographique de l'Est<sub>2</sub><sup>A</sup> entre populations d'*I. b. stagnea* et d'*I. b. basteri*, mais la définition souvent plus ou moins bonne des doubles bandes d'une électrophorèse à l'autre nous interdit pour le moment toute conclusion.

Est<sub>3</sub>. L'Est<sub>3</sub> a été étudiée dans 19 populations d'*I. b.*, 10 nordiques (7 de *balthica* 3 de *tricuspadata*) et 9 méditerranéennes (4 de *basteri* et 5 de

TABLEAU 2. LIAISON ENTRE L'EST<sub>2</sub><sup>A</sup> ET L'EST<sub>3</sub><sup>B</sup>: F<sub>2</sub> DE QUELQUES CROISEMENTS EXPOSES DANS LE TABLEAU 1

F <sub>2</sub> des croisements du Tableau 1	Génotypes des descendants									P	χ <sup>2</sup>
	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>3</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>4</sub> A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B	A <sub>2</sub> B	A <sub>3</sub> B	A <sub>4</sub> B	BB		
de 1 A <sub>1</sub> B × A <sub>1</sub> B	0	0	11	0	0	34	0	20	1:2:1	2,63	
de 2 A <sub>2</sub> B × A <sub>2</sub> B	0	0	0	7	0	0	13	6	1:2:1	0,08	
de 4 A <sub>2</sub> B × A <sub>3</sub> B	0	12	0	0	0	8	9	9	1:1:1:1	0,95	
de 5 A <sub>1</sub> B × A <sub>3</sub> B	10	0	0	0	13	0	7	6	1:1:1:1	3,33	
A <sub>1</sub> B × A <sub>2</sub> B										3 dl	

P, Proportions mendéliennes attendues; dl, degrés de liberté.

TABLEAU 3. RESULTATS DES CROISEMENTS MONTRANT L'ALLELISME DES CINQ BANDES DE L'ESTERASE, D'*IDOTEA BALTHICA*

Génotypes des parents			Génotypes des descendants											T	P	X	
♀	♂	N	90/90	90/100	90/106	90/111	95/95	95/100	100/100	100/106	100/111	106/106	106/111				111/111
90/100	90/100	1	9	6					7						22	1:2:1	4,9
90/100	90/100	1	7	37					10						54	1:2:1	7,7*
90/100	100/100	1		13					18						31	1:1	0,8
100/100	90/100	1		16					8						24	1:1	2,6
90/100	100/106	1		10	15				11	14					50	1:1:1:1	1,36
90/111	90/100	1	7	11		7					8				33	1:1:1:1	1,65
90/111	100/111	1		17		12					13			16	58	1:1:1:1	1,17
95/95	95/100	1						25	25						50	1:1	0
95/100	95/95	1						19	9						28	1:1	3,57
95/100	95/100	1						24	50	34					108	1:2:1	2,44
95/100	100/100	1							12	19					31	1:1	1,5
100/100	95/100	1							16	12					28	1:1	0,57
100/100	100/100	4								176					176	1	
100/100	100/106	1								14	14				28	1:1	0
100/106	100/100	4								67	73				140	1:1	0,25
100/100	100/111	1								17		21			38	1:1	0,42
100/111	100/100	1								44		33			77	1:1	1,57
100/100	106/106	1									42				42	1	
100/100	111/111	1										10			10	1	
100/106	100/106	3								38	86		44		168	1:2:1	0,52
100/106	100/106	1								12	36		1		49	1:2:1	15,73*
100/106	106/106	1									23		34		57	1:1	2,12
106/106	100/106	1									23		25		48	1:1	0,08
106/106	106/106	1											38		38	1	
100/111	90/100	1		16		23				18		20			77	1:1:1:1	1,38
100/111	100/106	1								26	20	21		26	93	1:1:1:1	1,32
100/111	100/111	2								21	55			32	108	1:2:1	2,27

N, Nombre de croisements du même type; T, total des descendants d'une seule ou de plusieurs descendance du même type; P, proportions mendéliennes attendues.

\*Test de X<sup>2</sup>: significatif au seuil de 5%.

TABLEAU 4. DISTRIBUTION DES GENOTYPES ET FREQUENCES ALLELIQUES DE L'ESTERASE<sub>3</sub> DANS DIFFERENTES POPULATIONS D'*IDOTEA BALTHICA*

Sous-espèces Origine géographique des populations	Nombre d'individus	Distribution des génotypes (1)											Fréquences alléliques					
		90 90	90 100	95 106	95 95	95 100	95 106	100 100	100 106	100 111	106 106	106 111	111 111	Est <sub>3</sub> <sup>100</sup>	Est <sub>3</sub> <sup>106</sup>	Est <sub>3</sub> <sup>90</sup>	Est <sub>3</sub> <sup>95</sup>	Est <sub>3</sub> <sup>111</sup>
<i>I.b. balthica</i>																		
Elle Kilde Hage I	62	0	3	0	0	0	0	59	0	0	0	0	0	0,976	0	0,02	0	0
Elle Kilde Hage II	38	0	0	0	0	0	0	38	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hundested	48	0	0	0	0	3	0	45	0	0	0	0	0	0,969	0	0	0,030	0
Vellerup	65	0	2	0	0	0	0	60	3	0	0	0	0	0,961	0,02	0,01	0	0
Kerteminde	94	0	7	0	2	1	1	83	0	0	0	0	0	0,925	0	0,04	0,030	0
Feggesund	36	0	0	0	0	2	2	32	0	0	0	0	0	0,917	0	0	0,050	0
Krik Vig	54	1	4	0	0	4	0	45	0	0	0	0	0	0,917	0	0,05	0,040	0
<i>I.b. tricuspida</i>																		
Wimereux	52	0	4	0	0	1	0	42	1	1	3	0	0	0,875	0,07	0,04	0,010	0,010
Réville	83	0	2	0	0	2	0	75	4	0	0	0	0	0,951	0,02	0,01	0,010	0
La Rochelle	173	0	8	0	2	7	0	137	8	8	3	0	0	0,882	0,04	0,032	0,032	0,023
<i>I.b. basteri</i>																		
Marseille	86	0	3	0	0	1	0	61 (59,40)	15 (17,4)	2	3 (1,3)	0	1	0,831	0,12	0,005	0,005	0,020
Lac de Bizerte Baie de Scardovari	90	0	0	0	0	0	0	81	9	0	0	0	0	0,950	0,05	0	0	0
Chioggia	64	0	1	0	0	3	0	54	6	0	0	0	0	0,922	0,05	0,02	0,020	0
55	0	0	0	1	1	0	0	52	1	0	0	0	0	0,964	0,009	0,027	0,027	0
<i>I.b. stagnea</i>																		
Etang de Canet	159	0	1	0	0	0	0	92 (68,20)	22 (68,50)	2	41 (17,2)*	1	0	0,658	0,330	0	0	0,009
Etang de Sigean	57	0	0	0	0	2	0	40 (37,10)	9 (12,4)	1	3 (1)	0	2	0,807	0,132	0,02	0,020	0,040
Etang de Thau	102	0	2	0	0	1	1	55 (44)	16 (38,10)	5	20 (8,2)*	1	1	0,657	0,284	0,01	0,010	0,040
Etang de Mauguio	121	0	0	0	0	1	0	86 (71,40)	12 (41,40)	1	21 (6,0)*	0	0	0,768	0,223	0,004	0,004	0,004
Etang de Vaccarés	133	0	2	0	0	0	0	70 (44)	10 (60,40)	1	46 (20,7)*	3	1	0,575	0,395	0	0	0,020

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux valeurs théoriques calculées par application de la loi de Hardy-Weinberg.

\*Test de  $\chi^2$  significatif au seuil de 5%.

*stagnea*). Le Tableau 4 résume l'ensemble des données collectées.

### Discussion

Les estérases non spécifiques ont été mises en évidence chez de nombreux Crustacés [4] et notamment chez les Isopodes: *Idotea balthica*, *Ligia italica* [5] et *Excirologa* [4]. Une étude détaillée leur est également consacrée chez plusieurs espèces de *Jaera* [6] et de *Sphaeroma* [5, 7]. La zone d'activité estérasique principale chez *Idotea balthica* ne compte pas quatre bandes ainsi que le pensait Kerambrun [5] mais en présente au minimum 3 et au maximum 7.

D'une façon générale, les estérases sont classées en quatre grands groupes: acétylestérases (EC3.1.1.6), carboxylestérases (EC3.1.1.1), arylestérases (EC3.1.1.2) et cholinestérases comprenant les acétylcholinestérases (EC3.1.1.7) et les pseudocholinestérases (EC3.1.1.8) selon leurs propriétés vis-à-vis des substrats et inhibiteurs auxquels elles sont soumises.

Le manque de spécificité vis-à-vis des substrats de l'Est<sub>2</sub> et de l'Est<sub>3</sub> d'*I. b.* est à rapprocher de la situation présentée par les estérases de *Culex tarsalis* [8]. Par ailleurs, en utilisant les données de Augustinsson [9], de Pearse [10] et de Masters et Holmes [11], acquises chez les Vertébrés mais valables d'après ces auteurs également pour les Invertébrés, on arrive à la conclusion que l'Est<sub>2</sub> et l'Est<sub>3</sub> d'*I. b.*, sensibles au D.F.P., sont des carboxylestérases; cependant, elles ne devraient pas être sensibles au P.C.M.B. et l'Est<sub>3</sub> de plus, ne devrait pas être résistante aux organophosphates et au nitrate d'argent. Malgré l'utilisation d'un nombre élevé de substrats et d'inhibiteurs, il ne nous est donc pas possible de rapporter les 2 estérases principales de l'*I. b.* à une catégorie bien définie d'enzyme. Nous rejoignons la conclusion d'Oxford [12] qui, à l'issue de son travail sur les estérases de *Cepaea*, pense qu'une étude approfondie de ces enzymes chez les Invertébrés est nécessaire avant d'en proposer une classification.

### Génétique Formelle

Est<sub>2</sub>. L'ensemble des résultats acquis dans les croisements entre Idotées méditerranéennes et nordiques et, en particulier, les disjonctions obtenues en F<sub>2</sub>, caractéristiques d'un monohybridisme, indique que Est<sub>2</sub><sup>A</sup> et Est<sub>2</sub><sup>B</sup> sont codées

par les allèles codominants d'un même gène autosomique, sans que l'on puisse toutefois exclure—le nombre des descendants de F<sub>2</sub> étant faible—une hypothèse de gènes liés, très voisins, avec chacun un allèle nul homozygote, l'un, dans les Idotées méditerranéennes, l'autre, dans les Idotées nordiques. Nous pensons plutôt que nous sommes en présence d'allèles alternatifs: l'un, rapide, B, est propre au couple nordique de sous-espèces et est responsable, à l'état homozygote, de la double bande rapide qui caractérise ce couple; les autres, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub>, tous lents, appartiennent en propre au couple méridional de sous-espèces et codent chacun, à l'état homozygote, pour une des quatre doubles bandes A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub> trouvées dans ce couple. Les phénotypes à 3 ou 4 bandes, chez ces mêmes Idotées méditerranéennes, représentent dès lors des hétérozygotes entre allèles de mobilité voisines (3 bandes) ou, au contraire, de mobilité plus éloignée (4 bandes).

Le fait qu'à chaque allèle du locus Est<sub>2</sub> correspondent deux bandes toujours associées peut, peut-être, s'expliquer par une dissociation en deux sous-unités de l'enzyme codée sous l'effet de la tension électrophorétique. Des faits identiques ont déjà été signalés pour une estérase de homard [13] et pour une estérase de termite [14].

Est<sub>3</sub>. Sur le Tableau 3 qui relate nos résultats de génétique formelle sur l'Est<sub>3</sub>, on peut constater qu'à deux exceptions près, il n'y a aucune différence significative entre les fréquences observées et les fréquences mendéliennes. Cette analyse nous conduit à considérer que le polymorphisme de l'Est<sub>3</sub> est, chez *I. b.*, sous la dépendance d'un seul locus autosomique polyallélique à au moins cinq allèles co-dominants 90, 95, 100, 106 et 111. Les individus à bande unique sont homozygotes, les phénotypes à 3 bandes correspondent aux hétérozygotes, la molécule d'Est<sub>3</sub> étant un dimère. Le zymogramme des hétérozygotes devrait présenter deux bandes extrêmes deux fois plus fines que la médiane, or nous avons noté chez certains hétérozygotes 90/100, 95/100 ou 90/111 que la bande la plus rapide était aussi intensément colorée que la médiane; au contraire, chez certains hybrides 100/106; c'est la bande la plus lente, cette fois, qui est aussi foncée que la médiane. Ces faits témoignent peut-être d'un

degré d'activité anormalement élevé de l'enzyme formée, dans le premier cas, de deux monomères rapides et, dans le second, de deux monomères lents. On peut également penser à l'intervention de gènes modificateurs ou régulateurs.

#### Variation Géographique du Polymorphisme de l'*Est*<sub>3</sub>

Le Tableau 4 montre tout d'abord que, dans toutes les populations, l'allèle 100 est prédominant: sa fréquence la plus basse se trouve dans la population d'*I. b. stagnea* de l'étang de Vaccarès:  $P_{100}=0,575$ , mais, même chez cette sous-espèce, elle peut atteindre, par exemple dans la population de Sigean, la valeur de 0,81. Dans les populations des trois autres sous-espèces, elle est toujours supérieure à cette dernière valeur: elle oscille entre 0,83 et 0,96 dans les populations d'*I. b. basteri*, entre 0,88 et 0,95 dans les populations d'*I. b. tricuspadata* et entre 0,92 et 1 dans les populations d'*I. b. balthica*.

Par ailleurs, les 4 autres allèles 90, 95, 106 et 111 ont été trouvés dans la plupart des populations des quatre sous-espèces d'*Idotea balthica*. Il faut noter toutefois que l'allèle 111 n'a été répertorié dans aucune des sept populations d'élevage d'*I. b. balthica*; il est possible que cette absence soit due à un défaut d'échantillonnage.

De ces quatre allèles, seul *Est*<sub>3</sub><sup>106</sup> atteint des fréquences non négligeables, mais essentiellement dans les populations d'*I. b. stagnea*; tous les autres allèles peuvent être qualifiés de rares, car leurs fréquences ne dépassent, dans aucune population, le seuil de 5%.

Pour tester l'homogénéité des fréquences alléliques entre les différentes populations appartenant à une même sous-espèce ou à des sous-espèces différentes, nous avons regroupé en une seule classe les allèles 90, 95, 106 et 111, et les avons opposés à l'allèle 100.

Dans ces conditions, toutes les populations d'*I. b. balthica* apparaissent homogènes ( $\chi^2=10,40$  pour 6 d.l.), avec une fréquence moyenne de  $P_{100}=0,95$ . En ce qui concerne *I. b. tricuspadata*, le seuil de signification est atteint ( $\chi^2=5,58$ ) entre la population de Réville, d'une part, et l'ensemble homogène ( $\chi^2=0,02$ ) formé par les populations de La Rochelle et de Wimereux, d'autre part. Parmi les populations

d'*I. b. basteri*, les deux populations de l'Adriatique Nord et celle de Bizerte forment un ensemble homogène ( $\chi^2=2,13$ ), qui diffère significativement de la population de Marseille ( $\chi^2=18,17$ ). Enfin, en ce qui concerne *I. b. stagnea*, les populations de Sigean et de Mauguio forment un ensemble homogène ( $\chi^2=0,46$ ), qui diffère significativement ( $\chi^2=25,02$ ) de l'ensemble homogène ( $\chi^2=5,06$ ) formé par les populations de Canet, Thau et Vaccarès.

Dans ce mode de comparaison, qui oppose l'allèle 100 à tous les autres allèles réunis, aucune sous-espèce ne se distingue des trois autres, du point de vue de ses variations au locus *Est*<sub>3</sub>. En effet, si l'ensemble homogène constitué par les populations de *balthica* diffère très significativement des deux ensembles homogènes de *stagnea*: Sigean-Mauguio d'un part, et Canet-Thau-Vaccarès d'autre part ( $\chi^2$  respectivement de 69,56 et de 263,03), il ne diffère pas significativement de la population de Réville de *tricuspadata* ( $\chi^2=0,013$ ) et de l'ensemble homogène constitué par les populations de Bizerte, Scardovari, et Chioggia de *basteri* ( $\chi^2=0,003$ ).

En revanche, les deux ensembles homogènes de *stagnea* (Sigean-Mauguio, et Canet-Thau-Vaccarès) diffèrent très significativement des *tricuspadata*: Sigean-Mauguio versus Réville,  $\chi^2=22,8$ ; Sigean-Mauguio versus Wimereux-La Rochelle,  $\chi^2=14,8$ ; Canet-Thau-Vaccarès versus Réville,  $\chi^2=64,6$ ; Canet-Thau-Vaccarès versus Wimereux-La Rochelle:  $\chi^2=90,8$ . Ces deux ensembles homogènes de *stagnea* (Sigean-Mauguio et Canet-Thau-Vaccarès) diffèrent très significativement de l'ensemble homogène de *basteri*: Bizerte-Scardovari-Chioggia ( $\chi^2$  respectivement de 44,18 et 139,28).

Le seuil de signification est également atteint entre l'ensemble Canet-Thau-Vaccarès et la population de Marseille de *basteri* ( $\chi^2=25$ ), mais l'ensemble Sigean-Mauguio ne diffère pas significativement de cette population de Marseille ( $\chi^2=1,53$ ). Enfin, si l'on compare les populations de *tricuspadata* et de *basteri*, on voit que le seuil de signification n'est pas atteint entre l'ensemble homogène Wimereux-La Rochelle et la population de Marseille ( $\chi^2=2,57$ ), ni entre la population de Réville et l'ensemble homogène Bizerte-Scardovari-Chioggia ( $\chi^2=0,016$ ).

Ainsi, les variations alléliques au locus *Est*<sub>3</sub> permettent de distinguer *stagnea* du couple

nordique *tricuspidata* et *balthica*, mais sont inefficaces pour caractériser *stagnea* par rapport à *basteri*, et *basteri* par rapport à *tricuspidata* et *balthica*.

Enfin il faut souligner, que dans toutes les populations de *stagnea*, à l'exception de celle de Sigean, il existe un très fort déficit en hétérozygotes 100/106, comme le montrent les calculs de  $\chi^2$  comparant la fréquence observée et la fréquence calculée: population de Canet,  $\chi^2=72,8$  pour 1 d.l.; population de Thau,  $\chi^2=32,5$  pour 1 d.l.; population de Mauguio,  $\chi^2=61,0$  pour 1 d.l.; population de Vaccarès,  $\chi^2=88,3$  pour 1 d.l.

Un tel fait est l'indice, dans les populations concernées, ou bien d'une sélection contre les hétérozygotes ('hétérosis négatif'), ou bien d'un défaut de panmixie. Ce phénomène de déficit des hétérozygotes chez *I. b. stagna* peut peut-être se relier aux conditions de vie des populations dans ces milieux instables que sont les lagunes; on y enregistre en effet des fluctuations brutales, et parfois considérables, des facteurs physico-chimiques, en particulier de la température et de la salinité.

## Conclusion

Trois caractéristiques se dégagent de l'étude des estérases chez *I. b.*: (a) La proportion des locus estérasiques polymorphes chez cette espèce est de 0,28; c'est une valeur identique à celle trouvée par Hedgecock [4] à partir des données collectées chez 80 espèces de Crustacés.

(b) Le nombre d'allèles par locus est relativement élevé: 2,14 contre 1,43 pour les Crustacés en général [4]. En effet, nous avons montré que la zone principale d'activité estérasique d'*I. b.* est sous la dépendance de deux locus autosomiques indépendants et polymorphes, Est<sub>2</sub> et Est<sub>3</sub>, qui comptent chacun au moins cinq allèles. *I. b.* se distingue de ce point de vue des trois autres Isopodes étudiés: *Exciroiana* [4], *Jaera* [6] et *Sphaeroma* [7], où trois allèles au maximum ont été détectés, par locus.

(c) Enfin, chez *I. b.*, l'Est<sub>2</sub> est un excellent marqueur des populations méditerranéennes, d'une part, avec Est<sub>2</sub><sup>A</sup>, et des populations nordiques, d'autre part, avec Est<sub>2</sub><sup>B</sup>; nous avons affaire ici à des allèles alternatifs; des travaux complémentaires devront être poursuivis, avec une technique plus performante, afin de rechercher une éventuelle variation géographi-

que de l'Est<sub>2</sub><sup>A</sup> entre les populations de *stagnea* et de *basteri*. Par ailleurs, les variations alléliques au locus Est<sub>3</sub> ne permettent de distinguer que *stagnea* par rapport au couple nordique *tricuspidata-balthica*.

## Partie Expérimentale

Les estérases ont été recherchées chez les individus des deux sexes, prépubères ou pubères, de phénotype de couleur différents et capturés, à l'exception de ceux des populations baltiques, dans la nature. Les 7 populations d'élevage d'*I. b. balthica* ont été constituées à partir d'un minimum de 25 souches 'isofemelles' chacune.

*Origine des populations étudiées.* *I. b. balthica* est représentée par 7 populations du Danemark: Elle Kilde Hage I (dragage en surface dans les eaux dessalées (11 à 12‰) en provenance de l'Oresund; Elle Kilde Hage II (dragage en profondeur dans les eaux à 20‰ du Kattegat); Hundsted (prélèvement en surface dans le Kattegat); Vellerup (fond de l'Isefjord); Kerteminde (en Fionie, dans le Store Bælt); Feggesund (dans le nord du Limfjord); Krig Vig (dans le sud-ouest du Limfjord). *I. b. tricuspidata*: Wimereux (Pas de Calais); Réville (côte orientale du Cotentin); La Rochelle (Charente Maritime). *I. b. basteri*: Marseille (Anse de la Pointe rouge); Lac de Bizerte (Tunisie); Baie de Sardovari (Adriatique); Chioggia (fond de la lagune de Venise). *I. b. stagna*: étangs méditerranéens français: Etang de Canet (bordure orientale); Etang de Sigean (près de Narbonne); Etang de Thau (Mèze); Etang de Mauguio (Cabanes de Pérols); Etang de Vaccarès (nord du mas de Fieulouse).

Chaque échantillon est obtenu à partir d'un animal, privé de tube digestif et de coecums digestifs et broyé dans un milieu d'extraction composé de tampon bac et d'une solution de saccharose à 40% (1/1). Le broyat est centrifugé à 12000 g et à 5°C. L'électrophorèse est réalisée à 5°C en gel de polyacrylamide sur plaque (gel de séparation à 10%; gel de concentration à 2,5%). Sur ces gels sur plaque, nous avons le plus souvent disposé un extrait à l'électrophorégramme déjà connu et qui sert de marqueur. Le tampon-bac est un Tris-glycine pH=8,6. La technique de révélation est celle de Sims [13]. Les substrats employés couramment sont l' $\alpha$  et le  $\beta$  naphthyl acétate (sigma) et le colorant, le Fast blue BB Salt (Sigma).

Outre  $\alpha$  et le  $\beta$  naphthyl acétate, les autres substrats utilisés sont le  $\beta$  naphthyl propionate, le  $\beta$  naphthyl butyrate, le  $\beta$  naphthyl caprylate, le  $\beta$  naphthyl laurate, le  $\beta$  naphthyl myristate, l'acetylthiocholine iodide et le butyrylthiocholine iodide, (tous de marque Sigma).

Les inhibiteurs employés sont le diisopropylfluorophosphate (D.F.P., Sigma), le P Chloromercuribenzoic acid (P.C.M.B., Sigma), l'azinphos-éthyl organophosphate (A.E.O., Carlo Erba), le nitrate d'argent (Merck), l'Urée (Merck), le phenylmethylsulfonyl fluoride (P.M.S.F., Sigma), l'isopropylpyrophosphoramide (iso O.M.P.A., Sigma), le salicylate d'ésérine (Sigma) et l'éthylenediamine tetra acetic acid (E.D.T.A., Sigma). Dans tous les cas, les inhibiteurs ont été ajoutés dans la solution d'acide borique et dans la solution de révélation. L'emploi d'urée, d'azinphos éthyl ou de nitrate d'argent en inhibant l'Est<sub>3</sub> facilite grandement l'étude de l'Est<sub>3</sub> car il supprime la superposition partielle qui existe entre ces deux types d'enzymes au niveau de certains phénotypes.



**Remerciements**—Nous remercions vivement pour leur envoi d'échantillons ou pour leur aide lors de nos récoltes: E. Rasmussen, T. Frenchel, L. Hagerman, R. Duguay, R. Elkaïm, F. Charfi et C. Fava. Ce travail a été réalisé avec l'aide technique de G. Heily et de C. Debenest.

## Références

1. Tinturier-Hamelin, E. (1963) *Cah. Biol. Mar.* T **IV**, 5, 479.
2. Legrand-Hamelin, E., Souty, C. et Picaud, J. L. (1982) *Biochem. Syst. Ecol.* **10**, 79.
3. Legrand-Hamelin, E., Souty, C. et Gilard, J. Ph. *Bull. Soc. Zool. Fr.* (sous presse).
4. Hedgecock, D. (1982) in *Biology of Crustacea*, Vol. II. Academic Press, New York.
5. Kerambrun, P. (1970) *C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D* **271**, 438.
6. Cariou, M. L. (1981) *Cah. Biol. Mar.* T **XXII**, 185.
7. Laulier, M. (1984) Thèse d'état, Le Mans, 144pp.
8. Houk, E. J., Cruz, W. J. et Hardy, J. L. (1979) *Insect Biochem.* **9**, 429.
9. Augustinsson, K. B. (1961) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **94**, 844.
10. Pearse, A. (1960) *Histochemistry—Theoretical and Applied*. Churchill, London.
11. Masters, C. et Holmes, R. (1974) *Adv. Comp. Physiol. Biochem.* 110.
12. Oxford, G. S. (1973) *Comp. Biochem. Physiol.* **45B**, 529.
13. Sims, M. (1965) *Nature* **207**, 4998, 757.