

**ÉVALUATION DE LA GÉNÉTIQUE
DES POPULATIONS D'INVERTÉBRÉS
BENTHIQUES DU BASSIN VERSANT DES
GRANDS LACS ET DU SAINT-LAURENT AU
MOYEN DE L'ÉLECTROPHORÈSE SUR
ACÉTATE DE CELLULOSE**

Céline Larose et Ian Hogg
Contamination du milieu aquatique

Centre Saint-Laurent
Conservation de l'environnement
Environnement Canada - Région du Québec

Juin 1998

AVANT-PROPOS

Ce rapport est publié dans le cadre de l'entente fédérale-provinciale Saint-Laurent Vision 2000.

REMERCIEMENTS

Toute notre reconnaissance à P.D.N. Hebert (Université de Guelph) et à J.-M. Sévigny (Pêches et Océans Canada) pour nous avoir si généreusement fait profiter de leur expérience et nous avoir éclairés sur les subtilités de l'électrophorèse sur acétate de cellulose. Également un grand merci à K. Schnabel et Yves de Lafontaine pour leurs commentaires sur ce rapport.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
--------------------------	----

LISTE DES TABLEAUX	vii
---------------------------	-----

CHAPITRE 1	INTRODUCTION	1
-------------------	---------------------	---

CHAPITRE 2	PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	3
-------------------	---	---

CHAPITRE 3	INSTALLATION DE L'ÉQUIPEMENT ET RÉALISATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE	5
	ÉQUIPEMENT	5
	PRÉPARATION DES SOLUTIONS	5
	PRÉPARATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE	8
	RÉALISATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE	9

CHAPITRE 4	INTERPRÉTATION	14
-------------------	-----------------------	----

RÉFÉRENCES	19
-------------------	----

ANNEXES	1 Colorants utilisés pour trois espèces d'invertébrés benthiques	21
	2 Grille des résultats de l'électrophorèse des alloenzymes	27

LISTE DES FIGURES

1	Représentation graphique d'un gel d'acétate de cellulose, après migration et coloration	16
2	Représentation graphique d'un gel illustrant un dimère à trois allèles	16
3	Représentation graphique d'un gel illustrant une enzyme à différences « fixées » (sans allèles en commun) entre stations	17
4	Représentation graphique d'un gel d'acétate de cellulose illustrant la migration de deux isoenzymes (zones d'activité ou locus présumés)	17

LISTE DES TABLEAUX

1	Liste de l'équipement et du matériel nécessaires pour l'électrophorèse sur acétate de cellulose	6
2	Composition des deux tampons utilisés dans les analyses	7
3	Tampons utilisés et durée de migration pour l'électrophorèse pour différentes enzymes chez des invertébrés benthiques du bassin des Grands Lacs et du Saint-Laurent	12

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

En écotoxicologie et en biologie de la conservation, il est essentiel de pouvoir distinguer avec exactitude les espèces ou les populations génétiquement différentes. Si l'importance de telles différences est reconnue et étudiée intensément dans le cas des vertébrés (par exemple, pour les stocks de poissons), on s'en préoccupe moins dans le cas des invertébrés benthiques d'eau douce. Il faut le déplorer car si de telles différences existent et qu'on n'en tient pas compte, l'interprétation des résultats peut s'en trouver considérablement faussée. Les problèmes rencontrés dans l'identification des espèces d'après leurs caractères morphologiques expliquent en partie cet état de choses. Heureusement, grâce au récent progrès des techniques moléculaires, les laboratoires participant à des études sur la biodiversité ou à des travaux d'écotoxicologie peuvent maintenant identifier des populations ou des espèces génétiquement distinctes. Le présent ouvrage porte sur l'emploi de l'électrophorèse pour identifier des populations d'invertébrés aquatiques. Les techniques décrites ici peuvent servir à l'étude d'autres taxons aquatiques ou terrestres.

L'électrophorèse (notamment pour l'analyse des alloenzymes) est de plus en plus utilisée pour l'étude de la génétique des populations d'invertébrés (voir entre autres, Sweeney *et al.*, 1986; Jackson and Resh, 1992). Bien qu'on puisse aussi utiliser diverses autres techniques plus récentes (comme les empreintes génétiques par l'analyse de l'ADN), l'analyse des alloenzymes demeure appropriée pour étudier la structure génétique des populations et distinguer les espèces entre elles, et ce, pour toute une variété d'organismes, dont les invertébrés. En outre, grâce à de récentes améliorations, dont l'utilisation de l'acétate de cellulose, l'électrophorèse est devenue encore plus intéressante, car elle est relativement bon marché et n'exige pas d'installation encombrante.

L'électrophorèse consiste à faire migrer des protéines chargées en les soumettant à un champ électrique. L'électrophorèse des alloenzymes (enzymes qui dénotent une variation allélique) permet de mettre en évidence des variations génétiques, les gènes qui codent les alloenzymes étant différents lorsque les enzymes sont

elles-mêmes différentes. Cette technique a beaucoup servi dans les analyses diagnostiques en biologie et en médecine, et elle a aussi été très utilisée dans l'étude de la génétique de populations naturelles (Roby *et al.*, 1991). L'analyse des alloenzymes peut apporter des renseignements utiles sur la structure génétique des populations en plus de permettre une identification plus exacte des espèces (Korinek and Hebert, 1996).

Le présent document porte sur l'utilisation de l'électrophorèse sur acétate de cellulose pour étudier la génétique de populations d'invertébrés benthiques d'eau douce. Cette technique a été choisie pour trois raisons : a) le gel est facile à préparer; b) il ne faut qu'un petit volume d'échantillon (environ 5 μ L); et c) il est possible de traiter rapidement un grand nombre d'échantillons. L'ouvrage ne contient pas une description complète et détaillée de la technique (pour plus de détails, consulter Hebert and Beaton, 1993), mais explique les modifications apportées pour l'étude des invertébrés aquatiques du bassin versant Grands Lacs–Saint-Laurent. Pour une étude complète de l'électrophorèse des alloenzymes, consulter Richardson *et al.* (1986).

CHAPITRE 2

PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Comme les enzymes se dégradent généralement rapidement (en moins d'une heure) après la mort de l'organisme, il importe, pour que l'analyse soit valable, de conserver les spécimens au frais afin de préserver les enzymes présentes dans leurs tissus. La partie qui suit porte sur les techniques de prélèvement et de conservation des échantillons d'invertébrés.

On peut utiliser des spécimens cultivés en laboratoire ou en prélever sur des sites d'échantillonnage au moyen d'une épuisette ou d'un autre instrument approprié (comme une benne Eckman). L'échantillon est étalé dans un plateau de plastique ou de métal, et les spécimens sont triés en les manipulant délicatement, avec les doigts ou avec des pinces d'entomologiste (parfois aussi appelées pinces molles). Idéalement, les spécimens devraient être matures et à peu près de même taille (cette uniformité n'est pas absolument nécessaire). On peut transporter les spécimens vivants pour les placer en milieu de conservation cryogénique au laboratoire (cette méthode peut poser des problèmes dans le cas des espèces prédatrices) ou, au besoin, les placer dans de l'azote liquide sur le site de prélèvement. Dans nos études, la plupart des spécimens ont été transportés vivants. Pour transporter les spécimens vivants on peut les déposer directement dans des sacs en plastique de 1 L et ajouter une bonne quantité d'eau (prélevée avec l'échantillon), de préférence sans sédiments, plantes ou détritiques, car ils abaissent la teneur en oxygène de l'eau. Compter environ 50 à 100 spécimens (p. ex. *Gammarus*) par sac. Pour que l'apport en oxygène soit suffisant, laisser une bonne quantité d'air dans le sac (c.-à-d. ne pas en expulser l'air complètement en le refermant). Les sacs d'échantillons doivent être conservés à l'obscurité sur des contenants réfrigérants (Ice pak) ou de la glace et ramenés dès que possible au laboratoire pour les placer dans un milieu de conservation cryogénique.

Pour la conservation cryogénique sur le terrain ou au laboratoire, déposer chaque spécimen dans un tube à microcentrifuger; grouper les tubes par provenance (station d'échantillonnage) et les placer dans des sacs en plastique (s'ils sont

conservés au congélateur) bien identifiés, ou dans les récipients de la bouteille d'azote liquide (s'ils sont conservés dans de l'azote liquide). Identifier les sacs à l'extérieur (à l'encre indélébile) et à l'intérieur par une carte sur laquelle sont indiquées l'heure, la date, la station d'échantillonnage, etc.

ATTENTION!

Les tubes à microcentrifuger à «bouchon-pression» sont déconseillés pour la conservation en azote liquide car le bouchon a tendance à sauter à la décongélation. Portez des lunettes de sécurité!

CHAPITRE 3

INSTALLATION DE L'ÉQUIPEMENT ET RÉALISATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE ---

ÉQUIPEMENT

Pour faire une électrophorèse sur acétate de cellulose, il faut au minimum les pièces d'équipement suivantes :

- cuves d'électrophorèse et applicateur disponible chez Helena Laboratories;
- générateur de courant continu (au moins 200 V);
- réfrigérateur/congélateur pour conserver les produits chimiques;
- dispositif cryogénique pour conserver les échantillons (p. ex. congélateur ultrafroid (- 80 °C) ou azote liquide);
- verrerie et installations de laboratoire courantes.

Il est également utile de disposer d'un four à micro-ondes (pour préparer la gélose), d'une étuve pour sécher les gels et conserver la gélose et d'une plaque lumineuse pour l'interprétation des gels. La liste complète de l'équipement nécessaire, avec les noms des fournisseurs lorsqu'il y a lieu, est fournie au tableau 1.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Les tampons servent aussi bien à réhydrater les gels qu'à réaliser l'électrophorèse (dans un système dit en continu). Trois tampons ont été utilisés :

- Tris-glycine, pH = 8,5 (TG 8,5);
- Tris-glycine, pH = 9,0 (TG 9,0);
- Tris-citrate, pH = 8,2 (TC 8,2); les compositions sont données au tableau 2.

Les tampons peuvent être préparés en grande quantité et conservés au réfrigérateur à 4 °C.

TABLEAU 1
LISTE DE L'ÉQUIPEMENT ET DU MATÉRIEL NÉCESSAIRES POUR
L'ÉLECTROPHORÈSE SUR ACÉTATE DE CELLULOSE*

ARTICLE	FOURNISSEUR	REMARQUE
Cuves d'électrophorèse	Helena	Ou équivalent fabriqué en atelier
Bandes de gel	Helena	On peut en confectionner avec les gels qu'on a déjà
Applicateur Super Z-12	Helena	
Feuilles de gel Titan III (76 × 76 mm)	Helena	
Générateur de courant continu 200 V	Helena, BioRad	D'autres marques conviennent aussi
Tubes à microcentrifuger (1,5 mL)	Toutes les marques	Pour les échantillons
Bacs en plastique pour la photographie	Toutes les marques	Pour les bains
Feuilles de plexiglass (13 × 13 cm)	Atelier	Comme portoirs à gels pour la coloration
Fioles à scintillation en verre (20 mL)	Toutes les marques	Pour les solutions de coloration
Bouteille à compte-gouttes ambrée (60 mL)	Toutes les marques	Pour les solutions-mères
Béchers (1 L)	Toutes les marques	Pour réhydrater les feuilles de gel
Bouteilles en verre (50, 250, 500, 1000 mL)	Corning	Pour les solutions-mères
Micropipettes (10-100, 100-1000 µL)	Toutes les marques	
Bac en plastique (ou l'équivalent)	Toutes les marques	Pour la glace
Réfrigérateur/congélateur	Toutes les marques	Pour conserver les produits chimiques
Congélateur ultrafroid	Sanyo, ou une autre marque	Pour conserver les échantillons
Four à micro-ondes	Toutes les marques	Pour la préparation de la gélose
Étuve	Sanyo, ou une autre marque	Pour sécher les gels et conserver la gélose
Feuilles de papier essuie-mains		Pour éponger les gels avant usage
Boîte lumineuse	Toutes les marques	Pour l'examen des gels
pH-mètre	Toutes les marques	
Balance (100 à 1000 mg)	Mettler	
Pointe à tracer	Toutes les marques	Façonnée en pilon pour broyer les spécimens
Petite spatule en métal	Toutes les marques	Pour distribuer les produits chimiques et broyer les spécimens
Petite brosse à bouteilles	Toutes les marques	Pour nettoyer la base de l'applicateur
Tiges de verre (20 mm × 20 cm)	Toutes les marques	Pour séparer les gels durant le trempage
Microscope à dissection (avec micromètre)	Toutes les marques	Pour identifier et mesure les spécimens
Sacs de plastique « Ziploc »	Épicerie	

* Le tableau présente également le nom des fabricants et des fournisseurs des produits utilisés. À l'exception de certains équipements spéciaux provenant de chez Helena Laboratories, les produits sont vendus en majorité par la plupart des fournisseurs de matériel de laboratoire.

TABLEAU 2
COMPOSITION DES DEUX TAMPONS UTILISÉS
DANS LES ANALYSES*

ABRÉVIATION	TAMPON	INGRÉDIENTS (POUR 1 L DE TAMPON)
TC	Tris-citrate pH 8,2	12,11 g de Tris 3,99 g d'acide citrique
TG 8,5	Tris-glycine pH 8,5	3,03 g de Tris 14,41 g de glycine
TG 9,0	Tris-glycine pH 9,0	3,03 g de Tris 14,41 g de glycine Ajuster le pH à 9,0 en ajoutant environ 5 mL de NaOH 0,1 M

* Ajouter les ingrédients à un litre d'eau.

Pour les solutions de coloration, préparer les solutions-mères des divers ingrédients en petites quantités, selon les besoins. Ici, les solutions utilisées dans la plupart des colorants (p. ex. PMS, MTT et NAD) ont été préparées en portions de 50 à 250 mL et conservées dans des bouteilles ambrées, enveloppées de papier d'aluminium, ces produits étant très sensibles à la lumière. Pour les produits préparés en plus petites quantités et ajoutés au compte-gouttes aux solutions, il faut aussi utiliser des bouteilles ambrées (également enveloppées dans du papier d'aluminium). Les solutions-mères conservées à 4 °C demeurent relativement stables pendant un mois. Au bout d'un mois, il est conseillé de jeter ce qui en reste pour utiliser des solutions fraîchement préparées afin d'obtenir la meilleure résolution possible. Une estimation exacte des besoins permet de réduire considérablement les quantités à jeter.

Les différents colorants sont préparés dans des fioles à scintillation en verre, par lots de 20. Il est possible de gagner beaucoup de temps en préparant les solutions d'avance et en les congelant pour les conserver jusqu'à leur utilisation. La plupart des ingrédients des solutions de coloration peuvent être mélangés à l'avance, mais certains produits chimiques (PMS et enzymes de liaison) doivent être ajoutés au mélange juste avant usage, sinon la solution peut s'altérer. Nous avons utilisé les compositions de colorants de Hebert and Beaton (1993) en les modifiant pour

chacune des espèces d'invertébrés afin d'améliorer la résolution des électrophorèses. Les modifications apportées aux recettes par l'espèce *Gammarus fasciatus* (Amphipode) sont indiquées à l'annexe 1.

PRÉPARATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE

Les deux côtés des cuves d'électrophorèse sont remplies avec le tampon approprié, puis des bandes de gel pliées sur la longueur sont disposées sur les rails de soutien. Lorsque les cuves ne sont pas utilisées (par exemple, la nuit), elles sont remises à 4 °C, ce qui empêche les champignons de se développer dans le tampon et réduit l'évaporation. Même si la Tris-glycine garde généralement toute son efficacité pendant plusieurs électrophorèses, il est préférable de remplacer tous les tampons une fois par semaine pour que la résolution soit toujours bonne et remplacer en même temps les bandes de gel.

Pour réhydrater les feuilles d'acétate de cellulose, il faut utiliser le même tampon que pour l'électrophorèse dans laquelle ils seront utilisés (TG, TC). On peut faire tremper plusieurs gels à la fois dans des béchers de 1 L, en les séparant au moyen de tiges de verre de façon à ce que tous baignent entièrement dans le liquide. Déposer les gels lentement (pour empêcher la formation de bulles) dans le tampon et les y laisser au moins 20 minutes avant de les utiliser (Hebert and Beaton, 1993). À noter que la migration des particules (bandes de taches) est plus uniforme lorsque le gel a été laissé à tremper toute la nuit au réfrigérateur. Conserver toutes les feuilles non réhydratées dans un sac en plastique étanche une fois l'emballage ouvert. Cette précaution empêche les gels de se dessécher (ce qui peut surtout arriver en hiver), minimise la formation de bulles et permet aux couches d'acétate et de Mylar de se détacher moins souvent.

RÉALISATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE

Pour faire le plus grand nombre d'analyses possible par jour, on peut suivre le programme décrit ci-après (ce qui nous permettait de faire trois séries d'électrophorèses par journée de huit heures). Il est important de préparer la plupart des solutions d'avance et de réaliser plusieurs étapes simultanément : par exemple, pendant qu'une série d'électrophorèses est en cours, les gels de la série suivante (réhydratation par trempage dans le tampon) peuvent être préparés.

ÉTAPE 1

INSTALLATION DE L'ÉQUIPEMENT ET ORGANISATION DES ÉCHANTILLONS

- Installer les cuves d'électrophorèse et les brancher au générateur (sans mettre celui-ci en marche); disposer les feuilles de plexiglass (pour la coloration des gels), le papier essuie-mains, les pipettes, etc., et préparer le bac à glace (pour garder les échantillons au froid durant la préparation).
- Retirer les échantillons du dispositif de conservation cryogénique (chaque spécimen doit déjà se trouver dans un tube à microcentrifuger) et les déposer aussitôt sur la glace.
- Retirer chacun des spécimens de son tube pour en confirmer l'identification taxonomique et pour le mesurer (p. ex. longueur et largeur de la tête) au microscope à dissection (cette opération doit se faire aussi rapidement que possible, car les enzymes se dégradent très rapidement à la chaleur). Replacer les spécimens dans leur tube dès que possible et déposer les tubes sur la glace.
- Retirer les mélanges de coloration (préparés) du congélateur et les laisser dégeler sur la pailleasse.

ÉTAPE 2

PRÉPARATION DES EXTRAITS

Ajouter 5 à 30 μL (selon la taille du spécimen) de tampon de broyage dans chaque tube à microcentrifuger (ou dans le puits à échantillon, si le spécimen est très petit) et broyer jusqu'à obtention d'un extrait liquide. Pour broyer les spécimens,

on peut utiliser divers instruments; nous nous sommes servis d'une pointe à tracer les métaux (vendue dans les quincailleries) dont nous avons façonné l'extrémité pour faire un pilon de la même forme que le fond d'un tube à microcentrifuger. On peut aussi employer une petite spatule en métal (comme celles qu'on utilise pour les produits chimiques) ou des mèches spéciales pour perceuse électrique. Avec ces instruments, le broyage donne un échantillon bien homogène, de sorte que l'électrophorèse produit des résultats nets. Après chaque usage, rincer l'instrument et l'essuyer (avec une serviette Kim-wipe ou l'équivalent) pour prévenir la contamination.

REMARQUE

Nous avons utilisé 10 à 15 μL de tampon de broyage (Tris-HCl [0,09 M], pH 8,0) pour les spécimens de *Hyaella azteca*, et 15 à 30 μL pour les spécimens de *Gammarus fasciatus*, d'isopodes, d'éphéméroptères et de zygoptères (de 0,5 à 2 cm de longueur).

ÉTAPE 3

RÉPARTITION DES EXTRAITS SUR LA PLAQUE À ÉCHANTILLONS

Une fois l'extrait homogénéisé, en déposer 10 μL dans un des puits de la plaque à échantillons au moyen d'une micropipette, en veillant à ne pas mélanger entre eux les extraits des différents puits. Comme la migration est moins régulière en bordure du gel, il est parfois difficile d'interpréter les taches correspondant aux puits 1 et 12. Pour pallier cette lacune, on peut placer un extrait de référence (foie de poisson) dans le puits 1 et un extrait « témoin » en reprise, c'est-à-dire un deuxième échantillon d'un extrait ayant déjà été soumis à l'électrophorèse. On place les « nouveaux » extraits dans les puits 2 à 12, les puits 4, 10 et 12 étant réservés à la reprise de « témoins », c'est-à-dire d'extraits déjà soumis à une électrophorèse. Avec cette méthode, une importante proportion des extraits subit au moins deux électrophorèses, ce qui permet de valider adéquatement leur analyse. Une fois les extraits répartis sur la plaque à échantillons, inscrire à l'encre indélébile le numéro de l'électrophorèse et le numéro du puits sur les tubes à microcentrifuger correspondants, puis replacer ceux-ci sur la glace.

REMARQUE

Il est indispensable que les spécimens soient bien broyés et que les extraits soient juste assez dilués. Lorsque l'extrait est insuffisamment dilué, il peut contenir des

morceaux de tissus qui pourraient boucher l'applicateur et produire des traînées (souvent difficiles à interpréter). Par contre, si l'extrait est trop dilué, les taches risquent d'être faibles, voire inexistantes, ce qui rend aussi l'interprétation difficile. La centrifugation des échantillons peut aussi être utile.

ÉTAPE 4

IMPRÉGNATION DES GELS ET REMPLISSAGE DES CUVES

Une fois les extraits répartis dans les puits, procéder à l'imprégnation des gels.

- Traiter une feuille de gel à la fois; retirer une feuille du tampon de réhydratation et l'éponger rapidement, pour enlever **tout** excès de liquide, en la plaçant en sandwich dans une pile de papier essuie-mains (comme celui des distributeurs de toilettes publiques) absorbant (épais); appuyer en exerçant une pression modérée.
- Retirer le gel des serviettes et le déposer, côté Mylar, sur la base d'alignement. Pour empêcher les gels de se déplacer nous avons déposé une goutte de tampon de réhydratation sur la base d'alignement (pour créer un effet de tension superficielle).
- Tremper l'applicateur dans les puits de la base à échantillons (qui contiennent les extraits), puis transférer à la base d'alignement. Il est recommandé de n'imprégner les gels qu'une seule fois pour éviter la formation de traînées, ce qui se produit parfois lorsqu'on fait des applications répétées.
- Après l'application, déposer immédiatement le gel, côté acétate, sur les bandes de gels en plaçant la base où se trouvent les extraits du côté de la cathode (négatif). Disposer des lames à microscope de chaque côté de façon que le contact soit toujours complet.

REMARQUE

Pour que les dents de l'applicateur viennent toutes en contact avec le gel (et au même degré), passer délicatement le doigt sur le dessus de l'applicateur. Avant de déposer les gels dans la cuve d'électrophorèse, humecter le bord des bandes de gel avec du tampon, de façon à ce que les bandes et le gel restent bien en contact. Pour être en mesure de remplir la cuve, il peut être nécessaire de rétrécir un ou deux gels en taillant (aux ciseaux) une lisière de 2 mm sur les côtés.

ÉTAPE 5**CONDUITE DE L'ÉLECTROPHORÈSE**

Une fois la (les) première(s) cuve(s) remplie(s), commencer l'électrophorèse et pendant qu'elle s'effectue, continuer de disposer les autres gels après y avoir appliqué les échantillons. Les électrophorèses sont réalisées à la température ambiante, à un courant de 200 volts. La durée de migration varie selon le tampon utilisé. Quatre cuves ont été employées : les deux premières contenaient des tampons TG, l'un de pH 8,5, l'autre de pH 9,0; les deux autres contenaient toutes deux des tampons TC de pH 8,2. La durée de migration et les enzymes utilisées pour les différentes espèces d'invertébrés analysées sont indiquées au tableau 3.

TABLEAU 3
TAMPONS UTILISÉS ET DURÉE DE MIGRATION POUR
L'ÉLECTROPHORÈSE POUR DIFFÉRENTES ENZYMES
CHEZ DES INVERTÉBRÉS BENTHIQUES DU BASSIN
DES GRANDS LACS ET DU FLEUVE SAINT-LAURENT

ENZYMES	N° EC	TAMPON	PH	DURÉE DE MIGRATION
AO	1.2.3.1	TC	8,2	20 min
ARK	2.7.3.3	TC	8,2	20 min
GPI	5.3.1.9	TG	9,0	17 min
LDH	1.1.1.27	TC	8,2	20 min
MDH	1.1.1.37	TC	8,2	20 min
MPI	5.3.1.8	TG	8,5	17 min
PEP	3.4.11/13	TG	8,5	17 min
PGM	2.7.5.1	TG	9,0	17 min
6PGDH	1.1.1.44	TC	8,2	20 min

Pendant les électrophorèses, on numérote les tubes à microcentrifuger suivant la répartition des extraits, puis on replace les tubes dans le dispositif de conservation cryogénique (comme un congélateur ultrafroid à -80 °C). Les plaques à échantillons sont conservées sur la glace jusqu'à la fin de l'électrophorèse (au cas

où il serait nécessaire de reprendre l'électrophorèse d'une enzyme). Deux minutes avant la fin de la première série d'électrophorèses, les réactifs (PMS et enzymes de liaison) sont ajoutés aux mélanges de coloration, et la gélose est retirée de l'étuve (environ 60 °C) (ou du four à micro-ondes). Une fois la série d'électrophorèses terminée, on retire les gels, un à la fois, et on les dépose, côté Mylar, sur les feuilles de plexiglass. La gélose est ajoutée au mélange de coloration, puis le mélange est immédiatement versé uniformément sur les plaques en une seule fois.

REMARQUE

Les gels doivent être colorés dès qu'ils sont retirés des cuves d'électrophorèse, sinon ils peuvent sécher. La coloration peut prendre de 5 à 20 minutes, selon le mélange utilisé et la netteté nécessaire pour une résolution adéquate. Souvent, nous tentions d'interpréter le gel (ne serait-ce qu'à titre expérimental) durant la coloration, car, avec certaines enzymes, la netteté est souvent maximale lorsque les gels portent encore leur couche de surface. Pour éviter la surcoloration, enlever la couche de surface sans délai (une fois atteint le degré de résolution voulu), puis rincer le gel à l'eau froide et le faire tremper 15 minutes dans un bain d'eau. Après ce trempage, assécher les gels en les épongeant, puis les placer dans l'étuve. Pour préparer les plaques à échantillons et les applicateurs pour une autre série d'électrophorèses, les laver avec un détergeant doux et les essuyer.

CHAPITRE 4

INTERPRÉTATION

L'interprétation peut prendre beaucoup de temps et se révèle souvent difficile, surtout lorsqu'on a peu d'expérience en la matière. Toutefois, avec de la patience, on peut à la longue parvenir à une bonne maîtrise. Hebert and Beaton (1993) signalent qu'il faut pratiquer l'interprétation au moins six mois pour atteindre une telle maîtrise. Il est conseillé de demander, si possible, l'aide d'une personne expérimentée, car l'interprétation en sera considérablement facilitée, et, les erreurs étant limitées au maximum, les conclusions découlant de l'interprétation risquent moins d'être erronées.

On décrit des bandes de taches et les interprétations correspondantes dans Hebert and Beaton (1993); une analyse plus complète est présentée dans Richardson *et al.* (1986). Brièvement, précisons que trois structures quaternaires (bandes de taches) sont communément observées avec la plupart des alloenzymes : ce sont les structures monomère, dimère et tétramère. Dans le cas des sujets homozygotes pour toutes les structures quaternaires, on obtient une tache unique (comme le puits numéro 3, aux figures 1 et 2). Avec les sujets hétérozygotes, on obtient deux taches pour la structure monomère, trois pour la structure dimère et cinq pour la structure tétramère. Dans certains cas (structures tétramères), il peut être difficile de distinguer les taches les unes des autres, surtout s'il y a eu surcoloration, les taches confluant partiellement. En général, les meilleurs résultats (c'est-à-dire les plus faciles à interpréter) sont obtenus avec des monomères et des dimères. Aux figures 1 et 2, on peut voir des taches correspondant, respectivement, à des structures monomères et dimères, et dans les deux cas, il y avait trois allèles.

Avec certaines enzymes, on obtient une coloration monomorphe pour tous les sujets ou pour certaines stations en particulier, c'est-à-dire qu'il n'y a aucune variation allélique entre les sujets ou les stations); cet effet varie toutefois selon l'espèce et doit être évalué en fonction des particularités de chaque cas. Parfois, les formes alléliques d'une enzyme, qu'elle soit monomorphe ou polymorphe (dans ce dernier cas, l'enzyme présente alors une variation allélique), ne se

retrouvent pas chez tous les groupes de sujets provenant d'une même station, ou chez l'ensemble des sujets de certaines stations (voir la figure 3). De telles différences « fixées » peuvent signifier qu'il s'agit de sujets génétiquement différents (ou de populations génétiquement différentes), voire d'espèces différentes, et se révéler particulièrement utiles pour l'identification taxonomique (voir la figure 3). Dans certains cas, les enzymes possèdent plus d'une zone d'activité (on les appelle alors des isoenzymes). Ceci peut prêter à confusion si les taches sont rapprochées ou si elles se chevauchent; il faut alors apporter un grand soin à l'interprétation pour éviter les erreurs (voir la figure 4).

L'allèle (tache) le plus lent est désigné par le nombre « 1 » ou la lettre « A », et les allèles plus « rapides », par les chiffres suivants (ou les lettres suivantes). Souvent, il peut être utile de commencer par l'examen d'un ensemble de sujets provenant de stations différentes pour avoir une idée de la diversité des allèles qu'on peut trouver. Toutefois, comme cette évaluation d'ensemble est impossible dans bien des cas, il est conseillé de donner le chiffre « 5 » à l'allèle le plus lent, de façon à pouvoir désigner, sans trop de réorganisation, les allèles encore plus lents qui pourraient apparaître plus tard. La grille utilisée pour consigner les résultats est présentée à l'annexe 2.

Quelques conseils additionnels pour faciliter l'interprétation :

- il vaut mieux travailler d'abord avec des systèmes simples (p. ex. monomères d'espèces à reproduction sexuée [diploïdes]);
- faire un essai en utilisant le même sujet dans toutes les lignes pour avoir une idée de la variabilité que peut présenter la migration lorsqu'il y a plusieurs sujets, mais qu'il n'y a aucune différence véritable entre eux;
- tenter de créer un échantillon homogénéisé à partir de différents individus ou génotypes pour utilisation à titre de référence sur chaque gel afin d'aider à la différenciation des allèles (ceci peut ne pas fonctionner obligatoirement);
- conserver tous les gels et les extraits homogénéisés (à env. -80 °C) pour les revoir ou les réanalyser au besoin;

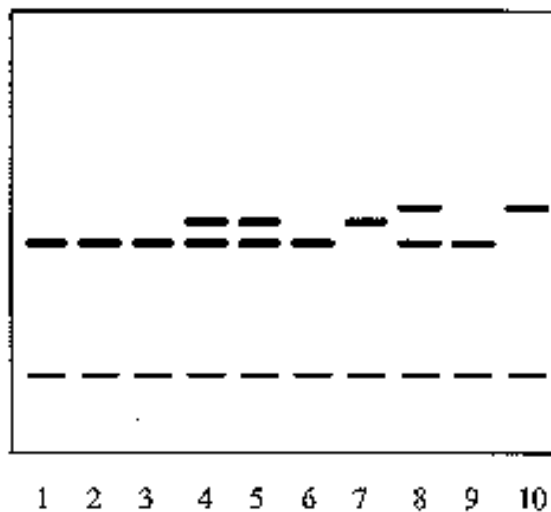
FIGURE 1

**Représentation graphique
d'un gel d'acétate de
cellulose, après migration et
coloration***

BANDE DE TACHES

LIGNE
D'APPLICATION

NUMÉRO DES PUIITS

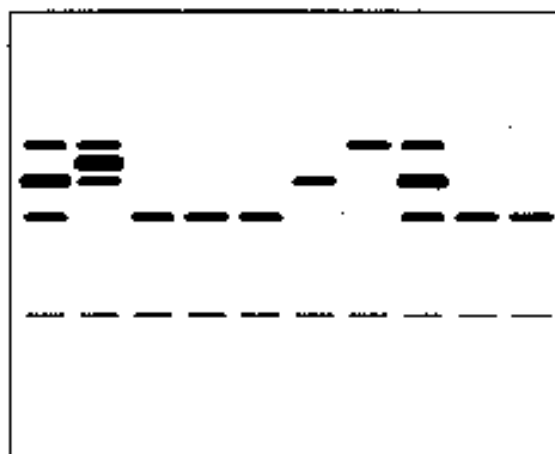


* La bande de taches correspond à un monomère à trois allèles. L'analyse a porté ici sur 10 sujets. Si l'on désigne l'allèle le plus lent par le chiffre « 1 », on obtient pour ce gel la formule suivante : 11, 11, 11, 12, 12, 11, 22, 13, 11, 33.

FIGURE 2

**Représentation graphique
d'un gel illustrant un dimère
à trois allèles***

BANDE DE TACHES

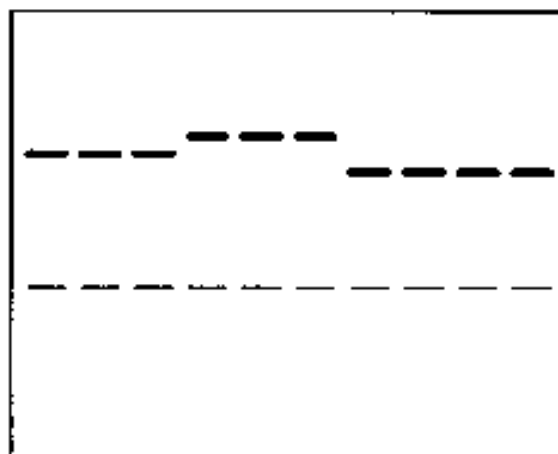
LIGNE
D'APPLICATION

* Les 10 sujets analysés donnent la formule suivante : 13, 23, 11, 11, 11, 22, 33, 13, 11, 11.

FIGURE 3

**Représentation graphique
d'un gel illustrant une
enzyme à différences
« fixées » (sans allèles en
commun) entre stations***

BANDE DE TACHES

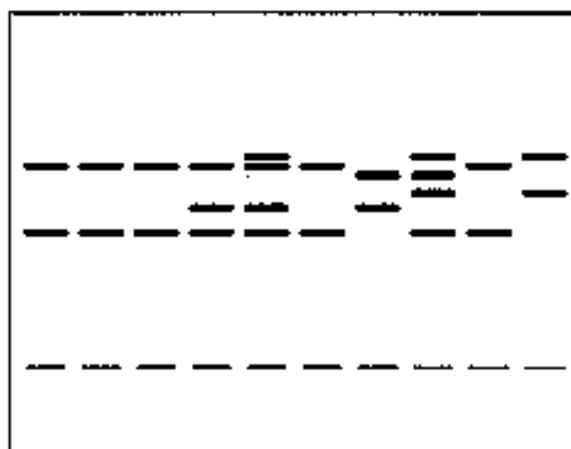
LIGNE
D'APPLICATION

Remarque. – On suppose, pour les besoins de cet exemple, que les sujets des lignes 1 à 3, 4 à 6 et 7 à 10 proviennent de stations différentes.

* De telles différences peuvent signifier que les sujets appartiennent à des populations génétiquement différentes ou, peut-être, à des espèces différentes. Ici, la formule se lirait comme suit : 22, 22, 22, 33, 33, 33, 11, 11, 11, 11.

FIGURE 4

**Représentation graphique
d'un gel d'acétate de
cellulose illustrant la
migration de deux
isoenzymes (zones d'activité
ou locus présumés)***

BANDE DE TACHES
(ISOENZYME) 2BANDE DE TACHES
(ISOENZYME) 1LIGNE
D'APPLICATION

* Il s'agit, dans cet exemple, de deux monomères. La formule se lirait comme suit : 11, 11, 11, 12, 12, 11, 22, 13, 11, 33 (isoenzyme 1); et 22, 22, 22, 23, 22, 11, 13, 22, 33 (isoenzyme 2).

- comme l'expliquent Richardson *et al.* (1986), faire des reprises, c'est-à-dire, reprendre dans chaque électrophorèse des sujets de l'électrophorèse précédente (pour lesquels on a déjà fait l'interprétation), ce qui permet de contre-vérifier l'attribution des désignations et l'uniformité des électrophorèses.

RÉFÉRENCES

Hebert, P.D.N. et M.J. Beaton (1993). *Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis*. Helena Laboratories. (Distribué par Helena Laboratories au Canada, aux États-Unis et en Australie.)

Hogg, I.D., J.M. Eadie et Y. de Lafontaine (1998). « Atmospheric change and the diversity of aquatic invertebrates : are we missing the boat? » *Environmental Monitoring and assessment*, 49 : 291-301.

Jackson, J.K. et V.H. Resh (1992). « Variation in genetic structure among populations of the caddisfly *Helicopsyche borealis* from three streams in northern California, U.S.A ». *Freshwater Biology*, 27 : 29-42.

Korinek, V. et P.D.N. Hebert (1996). « A new species complex of *Daphnia* (Crustacea, Cladocera) from the Pacific Northwest of the United States ». *Canadian Journal of Zoology*, 74 : 1379-1393.

Richardson, B.J., P.R. Baverstock et M. Adams (1986). *Allozyme Electrophoresis: A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*. Academic Press Inc.

Roby, D., J.D. Lambert et J.M. Sevigny (1991). « Morphometric and electrophoretic approaches to discrimination of capelin (*Mallotus villosus*) populations in the Estuary and Gulf of St. Lawrence ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 48 : 2040-2050.

Sweeney, B.W., D.H. Funk et R.L. Vannote (1986). « Population genetic structure of two mayflies (*Ephemerella subvaria*, *Eurylophella verisimilis*) in the Delaware River drainage basin ». *Journal of North American Benthic Society*, 5 : 253-262.

ANNEXE 1

COLORANTS UTILISÉS POUR TROIS ESPÈCES D'INVERTÉBRÉS BENTHIQUES*

Gammarus fasciatus (Amphipode)

AO₁ (Aldéhyde-oxydase) (EC 1.2.3.1)

0,6 mL Tris-HCl, pH = 8,0
1 goutte benzaldéhyde
[4 gouttes MTT]
[4 gouttes PMS] (juste avant usage)
2 mL gélose

AO₂ (Aldéhyde-oxydase) (EC 1.2.3.1)

0,6 mL Tris-HCl, pH = 8,0
1 goutte benzaldéhyde
[7 gouttes MTT]
[7 gouttes PMS] (juste avant usage)
2 mL gélose

ARK (Arginine-kinase) (EC 2.7.3.3)

0,5 mL Tris-HCl, pH = 8,0
1,5 mL NAD
5 gouttes MgCl₂
5 gouttes phospho-L-arginine
5 gouttes solution d'ADP
5 gouttes MTT
5 gouttes PMS (avant usage)
10 mL hexokinase (juste avant usage)
10 mL G6PDH (juste avant usage)
2 mL gélose

Solution d'ADP
0,10 g ADP
3,15 g D-glucose
10,0 mL eau

GPI (Glucose-6-phosphate-isomérase) (EC 5.3.1.9)

1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0
1,5 mL NAD
7 gouttes fructose-6-phosphate
[7 gouttes MTT]
[6 gouttes PMS] (juste avant usage)
10 mL G6PDH (juste avant usage)
2 mL gélose

LDH (Lactate-déshydrogénase) (EC 1.1.1.42)

1,0 mL Tris-HCl, pH = 7,0
1,5 mL NAD
4 gouttes acide DL-lactique
5 gouttes MTT
5 gouttes PMS (juste avant usage)
2 mL gélose

* Dans le cas de l'espèce *Gammarus fasciatus* (Amphipoda), les ingrédients modifiés par rapport aux ingrédients de Hébert et Beaton (1993) sont indiqués entre parenthèses.

MDH (Malate-déshydrogénase) 1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NAD 13 gouttes substrat malique 5 gouttes MTT 5 gouttes PMS (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 1.1.1.37) <u>Substrat malique</u> (ajuster le pH à 8,0) 180 mL 20 mL Tris-HCl, pH = 9,0 3,68 g acide L-malique
MPI (Mannose-6-phosphate-isomérase) 1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NAD [6 gouttes D-mannose-6-phosphate] [6 gouttes MTT] [7 gouttes PMS] (juste avant usage) [10 mL PGI] (juste avant usage) 20 mL G6PDH (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 5.3.1.8)
PEP (Peptidase) 2,0 mL Na_2HPO_4 0,02 M (ajuster le pH à 7,5) 4 gouttes peroxydase 8 gouttes o-dianisidine (sel de diHCL) 2 gouttes MnCl_2 [9 gouttes L-phénylalanine] [6 gouttes acide L-aminé-oxydase] (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 3.4.11 et 3.4.13)
PGM (Phosphoglucomutase) 1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NAD 5 gouttes MgCl_2 [7 gouttes solution de glucose-1-phosphate] [7 gouttes MTT] 5 gouttes PMS (juste avant usage) 20 mL G6PDH (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 5.4.2.2) <u>Solution de glucose-1-Phosphate</u> 250 mg glucose-1-phosphate (no 3) 250 mg glucose-1-phosphate (no 4) 5,0 mL eau
6PGDH (6-Phosphogluconate-déshydrogénase) 0,6 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NADP 6 gouttes acide 6-phosphogluconique 6 gouttes MgCl_2 [6 gouttes MTT] [6 gouttes PMS] (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 1.1.1.44)

***Hyalella azteca* (Amphipode)**

AO₁ (Aldéhyde-oxydase)	(EC 1.2.3.1)
0,6 mL Tris-HCl, pH = 8,0	
1 goutte benzaldéhyde	
4 gouttes MTT	
3 gouttes PMS (juste avant usage)	
2 mL gélose	

ARK (Arginine-kinase)	(EC 2.7.3.3)
0,5 mL Tris-HCl, pH = 8,0	
1,5 mL NAD	
5 gouttes MgCl ₂	
5 gouttes phospho-L-arginine	
5 gouttes solution d'ADP	<u>Solution d'ADP</u>
5 gouttes MTT	0,10 g ADP
5 gouttes PMS (avant usage)	3,15 g D-glucose
10 mL hexokinase (juste avant usage)	10,0 mL eau
10 mL G6PDH (juste avant usage)	
2 mL gélose	

G3PDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase)	(EC 1.2.1.12)
1,5 mL NAD	
2 mL solution de D-fructose-1,6-diphosphate	<u>Solution de fructose-1,6-diphosphate</u>
7 gouttes Na ₂ HAsO ₄	100 mg fructose-1,6-disphosphate
7 gouttes MTT	50 µL aldolase
7 gouttes PMS (juste avant usage)	4,0 mL eau
2 mL gélose	Incuber 1 h à 37 °C
	Congeler en portions de 1 mL

GPI (Glucose-6-phosphate-isomérase)	(EC 5.3.1.9)
1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0	
1,5 mL NAD	
5 gouttes fructose-6-phosphate	
5 gouttes MTT	
5 gouttes PMS (juste avant usage)	
10 mL G6PDH (juste avant usage)	
2 mL gélose	

LDH (Lactate-déshydrogénase)	(EC 1.1.1.42)
1,0 mL Tris-HCl, pH = 7,0	
1,5 mL NAD	
6 gouttes acide DL-lactique	
5 gouttes MTT	
5 gouttes PMS (juste avant usage)	
2 mL gélose	

MDH (Malate-déshydrogénase) 1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NAD 13 gouttes substrat malique 5 gouttes MTT 5 gouttes PMS (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 1.1.1.37) <u>Substrat malique</u> (ajuster le pH à 8,0) 180 mL eau 20 mL Tris-HCl, pH = 9,0 3,68 g d'acide L-malique
MPI (Mannose-6-phosphate-isomérase) 1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NAD 8 gouttes D-mannose-6-phosphate 7 gouttes MTT 8 gouttes PMS (juste avant usage) 10 mL PGI (juste avant usage) 20 mL G6PDH (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 5.3.1.8)
PEP (Peptidase) 2,0 mL Na_2HPO_4 0,02 M (ajuster le pH à 7,5) 4 gouttes peroxydase 8 gouttes o-dianisidine (sel de diHCL) 2 gouttes MnCl_2 9 gouttes L-phénylalanine 6 gouttes acide L-aminé-oxydase (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 3.4.11 et 3.4.13)
PGM (Phosphoglucomutase) 1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NAD 5 gouttes MgCl_2 7 gouttes solution de glucose-1-phosphate 7 gouttes MTT 6 gouttes PMS (juste avant usage) 20 mL G6PDH (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 5.4.2.2) <u>Solution de glucose-1-phosphate</u> 250 mg glucose-1-phosphate (qualité 3) 250 mg glucose-1-phosphate (qualité 4) 5,0 mL eau

***Caetidotae communis* (Isopode) (également pour les zygoptères et les éphéméroptères)**

AO (Aldéhyde-oxydase)	(EC 1.2.3.1)
0,6 mL Tris-HCl, pH = 8,0	
1 goutte benzaldéhyde	
5 gouttes MTT	
4 gouttes PMS (juste avant usage)	
2 mL gélose	

ARK (Arginine-kinase)	(EC 2.7.3.3)
0,5 mL Tris-HCl, pH = 8,0	
1,5 mL NAD	
5 gouttes MgCl ₂	
5 gouttes phospho-L-arginine	
5 gouttes solution d'ADP	<u>Solution d'ADP</u>
5 gouttes MTT	0,10 g ADP
5 gouttes PMS (avant usage)	3,15 g D-glucose
10 mL hexokinase (juste avant usage)	10,0 mL eau
10 mL G6PDH (juste avant usage)	
2 mL gélose	

GPI (Glucose-6-phosphate-isomérase)	(EC 5.3.1.9)
1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0	
1,5 mL NAD	
6 gouttes fructose-6-phosphate	
6 gouttes MTT	
6 gouttes PMS (juste avant usage)	
10 mL G6PDH (juste avant usage)	
2 mL gélose	

LDH (Lactate-déshydrogénase)	(EC 1.1.1.42)
1,0 mL Tris-HCl, pH = 7,0	
1,5 mL NAD	
4 gouttes acide DL-lactique	
5 gouttes MTT	
5 gouttes PMS (juste avant usage)	
2 mL gélose	

MDH (Malate-déshydrogénase)	(EC 1.1.1.37)
1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0	
1,5 mL NAD	
13 gouttes substrat malique	<u>Substrat malique</u> (ajuster le Ph à 8,0)
5 gouttes MTT	180 mL eau
5 gouttes PMS (juste avant usage)	20 mL Tris-HCl, pH = 9,0
2 mL gélose	3,68 g acide L-malique

MPI (Mannose-6-phosphate-isomérase) 1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NAD 8 gouttes D-mannose-6-phosphate 8 gouttes MTT 8 gouttes PMS (juste avant usage) 15 mL PGI (juste avant usage) 20 mL G6PDH (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 5.3.1.8)
PEP (Peptidase) 2,0 mL Na_2HPO_4 0,02 M (ajuster le pH à 7,5) 4 gouttes peroxydase 8 gouttes o-dianisidine (sel de diHCL) 2 gouttes MnCl_2 9 gouttes L-phénylalanine-L-leucine 6 gouttes acide L-aminé-oxydase (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 3.4.11 et 3.4.13)
PGM (Phosphoglucomutase) 1,0 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NAD 5 gouttes MgCl_2 7 gouttes solution de glucose-1-phosphate 7 gouttes MTT 7 gouttes PMS (juste avant usage) 20 mL G6PDH (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 5.4.2.2) <u>Solution de glucose-1-phosphate</u> 250 mg glucose-1-phosphate (qualité 3) 250 mg glucose-1-phosphate (qualité 4) 5,0 mL eau
6PGDH (6-phosphogluconate-déshydrogénase) 0,6 mL Tris-HCl, pH = 8,0 1,5 mL NADP 6 gouttes acide 6-phosphogluconique 6 gouttes MgCl_2 6 gouttes MTT 6 gouttes PMS (juste avant usage) 2 mL gélose	(EC 1.1.1.44)

ANNEXE 2

GRILLE DES RÉSULTATS DE L'ÉLECTROPHORÈSE DES ALLOENZYMES

N° DE L'ÉLECTROPHORÈSE : _____ DATE : _____

ESPÈCE : _____ PROVENANCE : _____

N° DU PUITS	EMPLACEMENT	TAILLE	AO1	AO2	ARK	GPI	LDH	MDH	MPI	PEP1	PEP2	PGM		
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														

Remarques :

N° des puits en reprise : _____