

# STRUCTURE GÉNÉTIQUE DE LA SOLE (*SOLEA VULGARIS* QUENSEL, 1806 ; TÉLÉOSTÉENS, SOLÉIDÉS)

Premier catalogue de polymorphismes biochimiques accessibles par l'électrophorèse en gel d'amidon.

Nicole PASTEUR \*, Michel AUTEM \*, Paul PICHOT \*\*, Moufida GOUCHA \*\*\*

- \* Institut des Sciences de l'Evolution - Laboratoire de Génétique.  
Université des Sciences et des Techniques du Languedoc (U.S.T.L.),  
F 34060 Montpellier Cédex, France.
- \*\* IFREMER - Centre de Sète - Laboratoire de Biochimie,  
1, rue Jean-Vilar,  
F34200 Sète, France.
- \*\*\* Institut de Biologie - Faculté des Sciences,  
Tunis, Tunisie.

## *Abstract*

GENETIC STRUCTURE OF THE SOLE (*SOLEA VULGARIS* QUENSEL, 1806 ; TELEOSTEAN, SOLEIDAE).

A survey of *Solea vulgaris* biochemical polymorphisms is presented with details of the techniques employed. The electrophoretic patterns of GPI, SOD, PGM, LDH, GPD, MDH, AAT, ES, GLO, XDH, MOD, IDH and major proteinic components of the skeletal muscle are described as corresponding to the products of 27 genes, 13 of which were found to be highly polymorphic. The bases and limits of the « locus per locus » interpretation of biochemical polymorphisms for which the mode of inheritance is not available yet are discussed.

## *Résumé*

Nous présentons un premier catalogue de polymorphismes biochimiques accessibles chez *Solea vulgaris* par l'électrophorèse en gel d'amidon, ainsi que le détail des techniques que nous utilisons. La description des empreintes électrophorétiques des GPI, SOD, PGM, LDH, GPD, MDH, AAT, ES, GLO, XDH, MOD, IDH, ainsi que des composants protéiniques majeurs du muscle squelettique permet de caractériser l'état allélique de 27 gènes, dont 13 ont manifesté un polymorphisme notable. Nous rappelons les bases et discutons des limites de l'interprétation « locus par locus » de polymorphismes biochimiques dont les modalités de la transmission héréditaire n'ont pas été contrôlées par la génétique formelle classique, situation imposée par la maîtrise encore aléatoire de l'élevage complet de la sole.

## **Introduction.**

La biologie halieutique et la biologie aquicole sont tout particulièrement intéressées par la génétique biochimique, dont l'appareil expérimental et théorique permet l'étude simultanée — en termes de nature, de quantité et de structure — des polymorphismes de nombreux gènes. L'électrophorèse enzymatique (sur différents supports) en est l'outil essentiel. Elle permet d'accéder directement à l'organisation génétique des espèces et d'en décrire les fluctuations géographiques, écologiques, temporelles...

Nous présentons ici un premier catalogue de polymorphismes biochimiques accessibles chez *Solea vulgaris* par l'électrophorèse en gel d'amidon, avec le détail des techniques que nous utilisons. Il s'agit de mettre en place l'embryon d'une terminologie homogène qui va rapidement s'avérer indispensable, étant

donné le développement en cours, à la suite de ce que nous avons entrepris (GOUCHA, 1982 ; GOUCHA *et al.*, 1982 ; PASTEUR, 1983 ; QUIGNARD *et al.*, 1984) sur les Soléidés de Méditerranée à des fins taxinomiques, de ce genre de recherches dans différents laboratoires.

Alors que l'étude du polymorphisme biochimique des Soléidés ne fait que débiter, il nous paraît en effet essentiel d'éviter d'emblée le cloisonnement des différents programmes dont l'effet le plus néfaste, du fait du désordre terminologique qui en résulte inéluctablement, est de rendre extrêmement difficiles, et même généralement impossibles, les comparaisons qui s'imposent. Ceci est malheureusement la situation qui caractérise beaucoup d'organismes parmi ceux étudiés à ce jour, alors même que les techniques de la génétique biochimique, bien standardisées à travers le monde, fournissent par ailleurs des résultats très reproductibles et particulièrement propices aux comparaisons à distance.

Grâce à de telles recherches de génétique des populations, nous espérons pouvoir amener des éléments de réponse *qualitativement* nouveaux à des questions d'importance majeure quand on cherche à optimiser l'exploitation d'une espèce pêchée, domestiquée ou en cours de domestication, telle que la sole précisément : existe-t-il des unités populationnelles plus ou moins isolées et, si oui, quelle relation y a-t-il entre la partition de l'espèce en dèmes du généticien et celle en stocks du dynamique ? Ces unités constituent-elles des « gisements génétiques » distincts pour une aquiculture débutante ? La différenciation intra- ou interdèmes peut-elle être reliée à des paramètres de l'environnement, en particulier à ceux intéressant les éleveurs ? Quelle relation peut-il exister entre le polymorphisme moléculaire d'une souche et ses performances écophysologiques et zootechniques ?

Nous donnons ici la description des zymogrammes des glucose-phosphate-isomérases (GPI), des superoxyde-dimutases (SOD), de la phospho-glucomutase (PGM), des lactate-déshydrogénases (LDH), des glycérol-3-phosphate-déshydrogénases (GPD), des malate-déshydrogénases (MDH), des aspartate-aminotransférases (AAT), des estérases (ES), de la glyoxalase (GLO), de la xanthine-déshydrogénase (XDH), des enzymes maliques (MOD) et des isocitrate-déshydrogénases (IDH). Nous avons étudié également quelques protéines non enzymatiques majeures (PMM).

## Matériels et méthodes.

### *Echantillonnage des animaux.*

Les polymorphismes décrits dans cet article ont été détectés chez des *Solea vulgaris* provenant de trois zones géographiques du domaine de l'espèce et composant sept échantillons (fig. 1).

- 1 — Quatre échantillons représentant les populations des côtes armoricaines et normandes. Les soles ont été capturées à l'est du Cotentin (échantillon A, 30 individus) le 2 novembre 1981, en baie du Mont Saint-Michel (échantillon B, 30 individus) le 10 novembre 1981 et en baie de Vilaine (échantillon C, 31 individus) le 25 novembre 1981, au cours de la campagne « Nurse II » (N.O. « Roselys », n° d'archivage B.N.D.O. 81007211) organisée par l'I.S.T.P.M., avec pour objectif d'obtenir des indices d'abondance des prérecrues (classes 1979, 1980 et 1981) dans ces trois zones considérées comme d'importantes nurseries. Un quatrième échantillon (D) provient de Loctudy (11 individus, le 8 avril 1982) et son étude génétique est en cours de publication (QUIGNARD *et al.*, 1984).

- 2 — Deux échantillons représentent les côtes françaises de Méditerranée, tout au moins celles du Languedoc. Un premier échantillon a été constitué en rassemblant des lots d'origines écologiques très variées (étangs littoraux, estuaires, large) ayant permis une

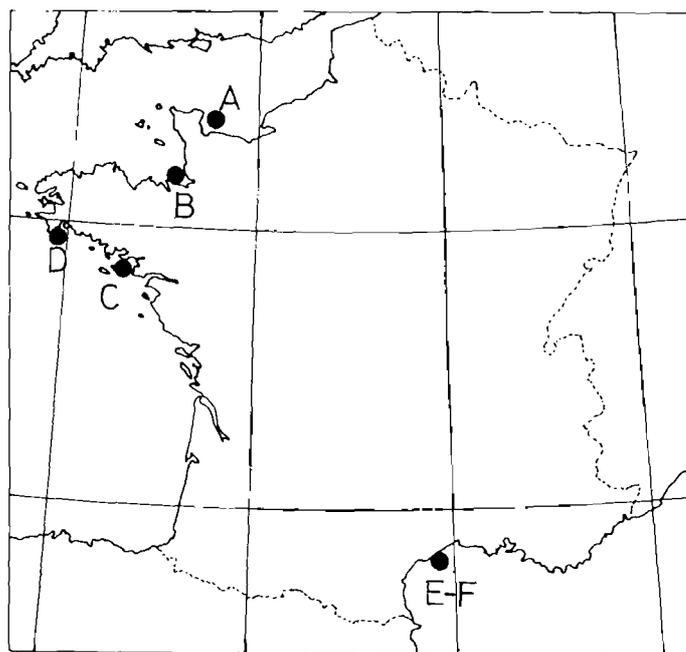


FIG. 1. — Points d'échantillonnage de *Solea vulgaris* (Tunisie non figurée)  
Sampling stations of *Solea vulgaris* in France.

étude taxinomique antérieure (QUIGNARD *et al.*, 1984) (échantillon E, 96 individus, du 28 janvier 1981 au 10 mars 1982). Un second échantillon a été prélevé spécialement pour cette étude au cours d'opérations de pêche commerciale (échantillon F, 80 individus, le 27 avril 1983). Il provient d'un coup de chalut de  $\bar{m}$  par 70 m de fond entre les deux embouchures du Rhône, dans une population supposée constituée de géniteurs.

• 3 — Un échantillon (G) a été capturé au large de Tunis (17 individus) en 1980. Sa composition génétique a fait l'objet d'une description antérieure (GOUCHA, 1982). Les échantillons A, B et C sont relativement homogènes et composés d'individus dont la longueur (Lt) varie entre 160 et 220 mm et le poids brut de 40 à 100 g. Leur sexe-ratio n'est pas différent de un. L'échantillon F est aussi assez homogène, encore que constitué de deux classes d'âge (3+ et 4+) dont les tailles (Lt) s'échelonnent de 260 à 350 mm (poids bruts de 150 à 400 g). Son sexe-ratio est très sensiblement déséquilibré en faveur des femelles ( $\frac{\sigma}{\varphi} = 0,74$ ). Les autres échantillons sont par comparaison très hétérogènes, avec des individus dont la taille peut varier entre 40 et 400 mm et un sexe-ratio mal défini.

#### *Conditionnement des animaux et préparation des extraits tissulaires.*

Les soles sont transportées vivantes ou dans la glace jusqu'au laboratoire. Les individus entiers peuvent être conservés plusieurs mois à  $-30^{\circ}\text{C}$  (congélateur de ménage), sans altération notable des activités enzymatiques quand on les congèle dès leur mort. Cependant, dès qu'un individu a séjourné un certain temps après sa mort à température ambiante ou qu'il a été décongelé, il est impérieux de préparer immédiatement des extraits tissulaires qu'on conservera ensuite à très basse température ( $-60^{\circ}\text{C}$ ). Pour cela différents organes — ou fragments d'organes — sont excisés (œil entier, cœur, estomac-gésier, rein, muscle squelettique sur la face œillée, foie), puis subissent un traitement analogue : broyage dans approximativement leur volume d'une solution à pH 6,8 (Tris : 1,2 g/l ; E.D.T.A. : 0,37 g/l ; NADP : 0,04 g/l) au moyen d'un homogénéiseur « Ultraturax ».

Quelques millilitres de toluène ajoutés lors de ce broyage et éliminés au cours de l'étape suivante (centrifugation) permettent de débarrasser les enzymes étudiées des fractions lipidiques qui y sont généralement agrégées. Ce traitement est obligatoire quand ces résidus sont à la fois très nombreux et surtout présents en nombre variable, ce qui entraîne la formation de traînées illisibles sur les gels. Au contraire des résidus acétyls ou phosphates qui conditionnent l'activité même des enzymes, celles-ci peuvent généralement être séparées de leurs résidus lipidiques sans dénaturation sensible. Le meilleur indicateur de l'état de dénaturation d'une enzyme restant pour nous son activité, et l'altération de celle-ci se traduisant *in fine* par une non-lecture, la séparation des fractions lipidiques, si elle venait à altérer une enzyme, n'est pas de nature à provoquer un véritable artefact, en l'occurrence une erreur de lecture.

L'homogénat est ensuite centrifugé dans un appareil réfrigéré (20 000 g à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 40 mn pour le muscle et 25 mn pour les autres organes) jusqu'à l'obtention d'un surnageant aqueux limpide. Celui-ci est ensuite prélevé au moyen d'une pipette Pasteur sous la pellicule superficielle de toluène et de lipides, puis stocké dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et à une température inférieure à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Dans le cas du foie, particulièrement chargé en réserves lipidiques, la phase aqueuse est soumise à un deuxième passage toluène-centrifugation avant son stockage définitif.

#### *Electrophorèses.*

Ces extraits seront ensuite soumis à des électrophorèses en gels horizontaux (MORETTI *et al.*, 1957) contenant 12 % d'amidon U.S.T.L. (amidon préparé à base de fécule brute de pomme de terre selon une technique mise au point par le laboratoire de Génétique et le laboratoire de Technologie alimentaire, Montpellier).

Ce choix de l'amidon est lié à sa grande facilité de mise en œuvre, à son universalité d'emploi pour toutes les activités enzymatiques, beaucoup ne pouvant être étudiées en acrylamide par exemple, et surtout à la possibilité de tirer jusqu'à quatre tranches par gel qu'on peut colorer chacune pour une activité enzymatique différente. La résolution obtenue en amidon, contrairement à une idée répandue, est excellente quand les tampons sont bien adaptés, souvent équivalente voire meilleure à celle obtenue en acrylamide selon l'enzyme étudiée : il ne faut en effet pas confondre netteté des bandes et pouvoir de résolution, c'est-à-dire capacité à séparer des variants électrophorétiques. Nous pratiquons les deux types d'électrophorèse et dans le cas de la sole, les essais en acrylamide horizontale réalisés par exemple sur les lactate-déshydrogénases et les aspartate-amino-transférases sont moins satisfaisants qu'en gel d'amidon.

Les systèmes tampons utilisés et cités au paragraphe suivant ont été décrits par SELANDER *et al.* (1969-1971). Nous en rappelons la composition (tabl. 1). Les colorations spécifiques des différentes activités enzymatiques ont été adaptées de SELANDER *et al.* (1971) et de HARRIS et HOPKINSON (1976) par les chercheurs du laboratoire de Génétique de l'U.S.T.L. Nous donnerons les protocoles utilisés en regard de chaque activité étudiée. Elles nécessitent l'utilisation de diverses solutions dont la composition est donnée (tabl. 2). Enfin, comme en histologie, la qualité des résultats obtenus dépend fortement des produits utilisés et nous donnons (tabl. 3) les références commerciales des principaux. De façon générale, les solutions de coloration doivent être préparées au moment de l'utilisation, certaines pouvant tout au plus être conservées partiellement quelques heures au réfrigérateur.

*Conventions terminologiques et principes de nomenclature  
des enzymes et des gènes responsables de leur synthèse.*

Les caractérisations électrophorétiques montrent très généralement :

- une complexité plus ou moins grande des différentes activités enzymatiques qui, chez chaque individu, se décomposent le plus souvent en système de bandes multiples, inégalement exprimées selon l'organe considéré, et représentant autant de classes de mobilité où viennent se ranger des molécules présentant des différences structurales ; celles-ci sont des *isozymes* — au sens de MARKERT et MOLLER (1959) — c'est-à-dire des espèces moléculairement différentes mais présentant une activité enzymatique analogue ;
- des différences entre individus d'une même population des schémas électrophorétiques produits par un certain nombre d'enzymes, permettant de définir un véritable polymorphisme ; la génétique formelle classique d'un certain nombre d'organismes a permis de montrer le déterminisme génétique élémentaire de ces polymorphismes enzymatiques.

Selon PRAKASH *et al.* (1969), nous appellerons *allozymes* deux formes moléculaires dont les différences répercutent celles de deux allèles d'un même gène. Deux allozymes distinctes peuvent être simultanément présentes chez un même individu s'il est hétérozygote, étant donné la très générale codominance des allèles des gènes de structure des enzymes : on voit donc que la présence simultanée d'isozymes peut résulter à la fois de l'expression de gènes différents et d'allèles différents de ces gènes. A cette situation déjà complexe vient fréquemment s'ajouter la présence de molécules hybrides entre allozymes — d'où des hétérozygotes « à bandes multiples » —, voire entre molécules codées par des gènes différents.

Interpréter l'empreinte électrophorétique d'une activité enzymatique donnée consiste alors à regrouper les bandes pouvant correspondre :

- à des allozymes *sensu stricto* ou leurs hybrides moléculaires ; nous appelons « électromorphe » un ensemble d'allozymes ayant la même mobilité électrophorétique, et « système d'allozymes » un ensemble d'isozymes uniquement constitué d'allozymes et de leurs hybrides moléculaires ;
- à des « systèmes d'hybrides », ensembles d'hybrides moléculaires d'un type donné entre deux « systèmes d'allozymes ».

Dans un premier temps, nous comparons différents organes afin de dénombrer les différents systèmes d'isozymes. Ils sont dénommés par une lettre, dans l'ordre alphabétique, du système le plus cathodique au système le plus anodique. Dans une deuxième étape, des comparaisons d'individus de la même espèce ou bien d'espèces différentes voisines nous permettent de distinguer les systèmes d'allozymes, qui seuls nous intéressent, des systèmes d'hybrides. Dans chaque système d'allozymes, les électromorphes sont dénommés par un indice : l'indice de référence « 100 » est attribué arbitrairement à celui qui est le plus fréquent dans la population méditerranéenne, les autres étant désignés ensuite par un indice supérieur ou inférieur tel qu'il respecte leur classement relatif de la cathode (indice le plus faible) à l'anode (indice le plus élevé). L'appartenance d'une allozyme à tel ou tel électromorphe est établie par comparaison directe, réalisée sur un même gel, avec les allozymes, de mobilités connues, d'autres individus. Des comparaisons de ce type ont été réalisées en particulier avec d'autres espèces de Soléidés (détails non publiés ici) dans la recherche d'une nomenclature homogène au sein de l'ensemble de cette famille, dont *Solea vulgaris* fournit donc l'échelle de référence.

Enfin on nomme par un numéro chacun des gènes responsables de la synthèse des différents éléments des systèmes d'allozymes, dans l'ordre croissant du système d'allozymes le plus cathodique au système d'allozymes le plus anodique. En l'absence d'information complémentaire, on admet que le polymorphisme d'une isozyme non hybride traduit la variabilité du gène de structure de son monomère polypeptidique de base. Par convention le nom des gènes, leur numéro d'ordre et éventuellement la classe allélique codant un électromorphe donné apparaissent en caractères *italiques*, par opposition à leurs produits polypeptidiques qui apparaissent en caractères droits. Les enzymes, systèmes d'isozymes et électromorphes sont, quant à eux, symbolisés par un sigle en majuscules.

**Catalogue des protéines étudiées.**

GLUCOSE PHOSPHATE ISOMÉRISE (GPI ; E.C.5.3.1.9.).

Tampon d'électrophorèse : système discontinu Tris-citrate pH 8,7/borate pH 8,2.

Coloration :

1 — Préparer une solution d'agar-agar à 2 %.

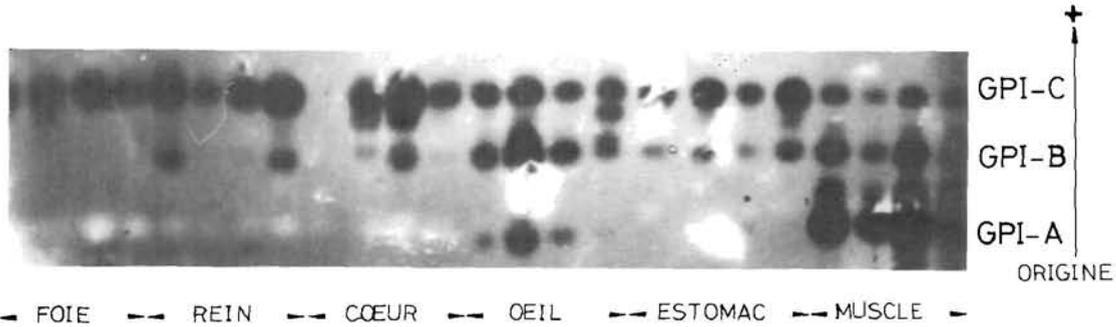


FIG 2. — Distribution des isozymes de la GPI dans différents organes de *Solea vulgaris* : outre la répartition différentielle des isozymes GPI-A, GPI-B et GPI-C, on note (1) un individu présentant, dans l'œil uniquement, deux isozymes supplémentaires. Elles trahissent en fait la présence d'un parasite dont l'activité GPI s'exprime simultanément à celle de l'hôte dans l'organe parasité.

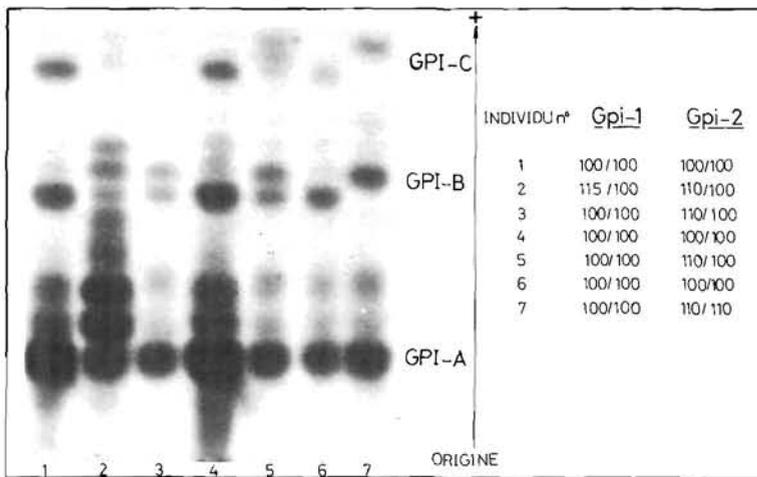


FIG 3. — Polymorphismes électrophorétiques des isozymes GPI-A et GPI-C chez *Solea vulgaris* observés dans le muscle squelettique : remarquer l'indépendance des comportements des deux isozymes et, au contraire, les répercussions par GPI-B des variations de GPI-A et de GPI-C.

Electrophoretic polymorphisms of GPI-A and GPI-C isozymes in skeletal muscle of *Solea vulgaris*. Note that the mobilities of the two isozymes seem independent from one another, but that GPI-B varies concomitantly with either GPI-A and GPI-C.

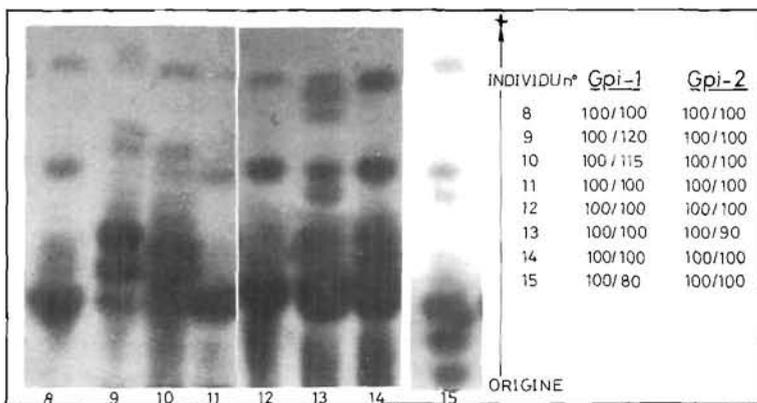


FIG 4. — Polymorphismes plus rares des isozymes GPI-A et GPI-C.

Exceptional polymorphisms of GPI-A and GPI-C isozymes.

2 — Préparer et placer au réfrigérateur le mélange :

tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,0	10 ml
MgCl <sub>2</sub> 0,5M	1 ml
Fructose - 6 - Phosphate	10 mg
NAD 1 %	1 ml
NADP 1 %	0,5 ml

3 — Au moment de la coloration, ajouter :

Glucose - 6 - Phosphate déshydrogénase	6 µl
PMS 1 %	0,5 ml
NBT 1 %	1 ml
MTT 1 %	0,5 ml
Agar-agar 2 % 45-50° C	20 ml

Remuer rapidement avec une spatule et verser sans délai sur la tranche d'amidon à colorer. Ne rien déplacer avant la solidification de l'agar.

*Motifs électrophorétiques* : on sépare très nettement trois systèmes d'isozymes, tous à mobilités anodiques (fig. 2). Les isozymes les plus anodiques (GPI-C) s'expriment fortement dans les six organes examinés. Les plus cathodiques (GPI-A) sont surtout exprimées dans le muscle et plus faiblement dans l'œil. Elles semblent absentes ou réduites à l'état de simples traces dans les autres organes.

Les isozymes de mobilité intermédiaire (GPI-B) peuvent facilement s'interpréter comme des hybrides moléculaires entre GPI-A et GPI-C car elles répercutent toutes les variations de ces deux systèmes. GPI-A et GPI-C présentent en effet des polymorphismes, largement découplés entre eux mais au contraire parfaitement reproduits par GPI-B.

Nous interprétons donc ces deux polymorphismes comme la traduction de ceux de deux gènes, *Gpi-1*, intervenant dans la synthèse du système d'allozymes GPI-A, et *Gpi-2* intervenant dans la synthèse de GPI-C. *Gpi-1* présente au moins quatre classes d'allèles codant les électromorphes correspondantes : *Gpi-1*<sup>100</sup>, *Gpi-1*<sup>115</sup>, *Gpi-1*<sup>120</sup> et *Gpi-1*<sup>80</sup>. Les hétérozygotes présentent trois bandes. Un certain nombre d'individus homozygotes présentent un spectre GPI-A perturbé de bandes satellites plus rapides qu'on peut cependant différencier assez facilement du système à trois taches des hétérozygotes vrais (fig. 3 et 4). Quatre classes d'allèles de *Gpi-2* ont été détectées, codant les quatre électromorphes correspondantes de GPI-C : *Gpi-2*<sup>100</sup>, *Gpi-2*<sup>110</sup>, *Gpi-2*<sup>115</sup> et *Gpi-2*<sup>90</sup>. Les hétérozygotes entre deux de ces classes alléliques ont également trois isozymes GPI-C.

SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD ; E.C.1.15.1.1.).

Tampon d'électrophorèse : système continu  
Tris-citrate pH 8,0.

Coloration :

1 — Préparer le mélange

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	40 ml
MgCl <sub>2</sub> 0,5 M	0,2 ml

2 — Au moment de la coloration, ajouter :

PMS 1 %	0,5 ml
MTT 1 %	1 ml
NAD 1 %	1 ml

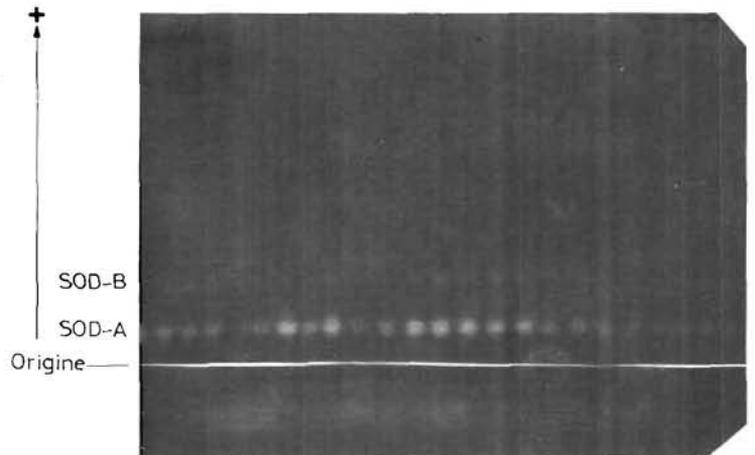


FIG 5. — Aspect général d'un gel coloré pour les SOD (foie).  
Electrophoretic pattern of SOD isozymes in liver homogenates.

Coloration à laisser agir sous une source puissante de lumière type « lumière du jour ». Les taches apparaissent en clair sur fond bleu en une heure à température ambiante (fig. 5).

*Motifs électrophorétiques* : deux systèmes d'isozymes à migrations anodiques ont été caractérisés. SOD-A, plus cathodique, est très actif dans le foie et le rein, plus faiblement dans le muscle. SOD-B anodique n'a été rencontré que dans le foie et le rein. L'étude systématique réalisée sur le foie n'a révélé qu'un variant rare SOD-A<sup>80/100</sup> en Tunisie. C'est surtout la comparaison de diverses espèces de Soléidés ayant des allèles différents et présentant des polymorphismes « découplés » (GOUCHA, 1982) qui nous permet d'affirmer que deux locus au moins, *Sod-1* et *Sod-2*, sont atteints par cette étude.

PHOSPHOGLUCOMUTASE (PGM : E.C.2.7.5.1).

Tampon d'électrophorèse : système discontinu Tris-citrate pH 8,7/Borate pH 8,2.

Coloration :

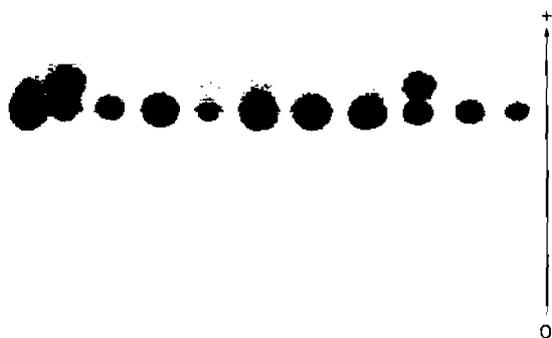
- 1 — Préparer une solution d'agar-agar à 2 %.
- 2 — Préparer le mélange :

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	5 ml
MgCl <sub>2</sub> 0,5M	1 ml
Glucose - 1 - Phosphate	300 mg
NAD 1 %	1 ml
NADP 1 %	0,5 ml

- 3 — Au moment de la coloration, ajouter :

Glucose - 6 - Phosphate déshydrogénase	6 μl
PMS 1 %	0,5 ml
NBT 1 %	1 ml
MTT 1 %	0,5 ml
Agar-agar 2 % 45-50° C	20 ml

Remuer rapidement avec une spatule et verser sans délai sur la tranche d'amidon. Ne rien déplacer avant prise complète de l'agar.



*Motifs électrophorétiques* : un seul système enzymatique, de mobilité anodique a été caractérisé. Il est très actif dans le muscle squelettique, plus discret dans le foie, le rein et le cœur. Il est absent ou réduit à l'état de traces dans l'œil et l'estomac. PGM présente un polymorphisme (fig. 6) qui peut être interprété comme l'expression de celui d'un gène *Pgm* dont les produits participeraient à trois électromorphes, *Pgm*<sup>100</sup>, *Pgm*<sup>90</sup> et *Pgm*<sup>115</sup>.

Les hétérozygotes présentent deux taches très distinctes.

FIG. 6. — Polymorphisme des PGM : hétérozygotes à deux bandes 110/115 (muscle squelettique).

*PGM polymorphism showing two-banded heterozygotes (Pgm 110/115).*

LACTATE DÉSHYDROGÉNASE (LDH ; E.C.1.1.1.27).

Tampon d'électrophorèse : système discontinu Tris-citrate pH 8,7/borate pH 8,2.

Coloration.

- 1 — Préparer le mélange :

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	35 ml
Lactate de lithium 0,5M	6 ml
NAD 1 %	1 ml
NBT 1 %	0,3 ml

- 2 — Au moment de la coloration, ajouter :

PMS 1 %	0,5 ml
---------	--------

Verser sur la tranche.

Taches violacées apparaissant entre 15 mn (LDH B, C et D) et 6 h (LDH A).

*Motifs électrophorétiques* : les empreintes électrophorétiques des LDH s'avèrent difficiles à interpréter malgré leur bonne qualité. Le nombre d'isozymes est élevé et leurs polymorphismes en partie incompatibles avec les modèles « simples » qui relient directement la variabilité des enzymes à celle de leur gène de structure.

Pour estimer le nombre de locus indépendants responsables du polymorphisme des LDH chez *Solea vulgaris*, nous avons dû aussi considérer, en complément de tous les variants rencontrés dans cette espèce, l'expression différentielle des isozymes selon l'organe, ainsi que l'ensemble des informations issues de l'étude comparée des Soléidés de Méditerranée (GOUCHA *et al.*, 1982 ; QUIGNARD *et al.*, 1984).

Les quatre systèmes isozymiques principaux qu'on peut mettre en évidence chez chaque individu migrent tous vers l'anode, de LDH-A la plus cathodique à LDH-D la plus anodique (fig. 7 et 8). LDH-A n'a été détectée que dans le muscle squelettique (fig. 7). Son activité est discrète et n'est révélée que par des incubations de plusieurs heures. Elle est beaucoup plus intense chez d'autres espèces de Soléidés. Elle présente un polymorphisme rare dans les populations bretonnes, certains individus montrant deux bandes (LDH-A<sup>100</sup> et LDH-A<sup>110</sup>) d'égale activité. LDH-B est très fortement active dans le muscle, plus faiblement dans l'œil et à l'état de traces dans le cœur (fig. 7). Elle présente un polymorphisme complexe (fig. 8) : d'abord on rencontre fréquemment des phénotypes présentant une ou deux bandes appartenant aux électromorphes LDH-B<sup>100</sup>, LDH-B<sup>70</sup>, LDH-B<sup>90</sup> et LDH-B<sup>110</sup>. On peut alors penser qu'il s'agit d'un polymorphisme déterminé par différents états alléliques d'un gène unique et donnant des hétérozygotes à deux bandes, mais cette interprétation est perturbée par l'existence d'un variant rare trouvé en Méditerranée : celui-ci fournit une empreinte électrophorétique à bandes multiples (3 au moins) et ressemble davantage aux phénotypes « habituels » des hétérozygotes pour un gène structural d'une LDH (fig. 8). Enzymes tétramères, les LDH présentent le plus souvent des phénotypes hétérozygotes à cinq bandes qui correspondent aux cinq combinaisons quatre à quatre possibles des produits des deux allèles exprimés simultanément, avec parfois une simplification à trois bandes résultant de la non-manifestation des hétérotétramères asymétriques.

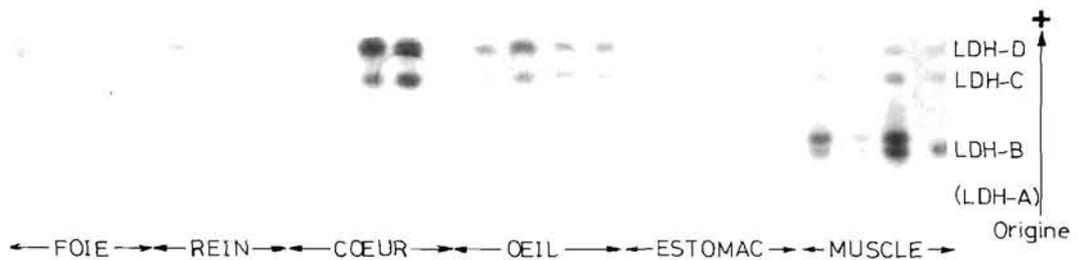


FIG. 7. — Distribution des isozymes de la LDH dans différents organes chez *Solea vulgaris*.  
LDH isozymes activities in different organs of *Soiea vulgaris*.

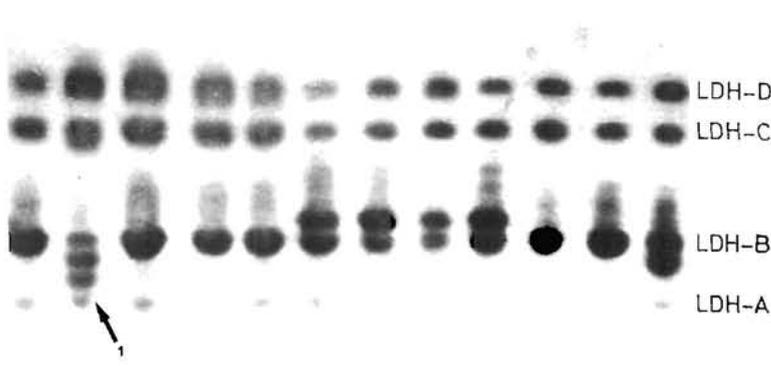


FIG. 8. — Détail d'un gel d'extraits musculaires coloré 12 h pour la LDH. Remarquer la coexistence d'un polymorphisme « double » touchant LDH-B. Certains hétérozygotes ont deux bandes sans répercussion sur LDH-C, d'autres ayant trois bandes au moins et une LDH-C dédoublée (1).

Exceptionnal multibanded heterozygote of LDH-B isozyme showing an echo onto LDH-C pattern (1), among homozygotes and « usual » twobanded heterozygotes showing no echo onto LDH-C.

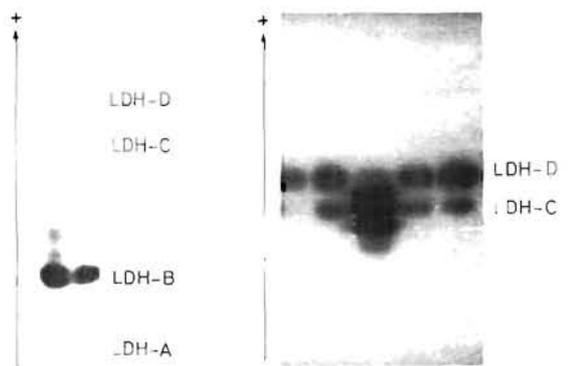


FIG. 9. — Deux polymorphismes de LDH-D. A gauche : LDH-D<sup>90/100</sup> observé dans le muscle squelettique et sa répercussion par LDH-C. A droite : LDH-D<sup>80/100</sup> observé dans le cœur, montrant bien les cinq bandes bien dégagées par l'importante différence de mobilité des deux allèles 100 et 80.

Two polymorphisms in LDH-D : on the left a LDH-D<sup>90/100</sup> heterozygote observed in skeletal muscle showing an echo onto LDH-C. On the right, a LDH-D<sup>80/100</sup> heterozygote observed in heart exhibiting a very distinct system of five bands.

Cette complexité apparente du polymorphisme de LDH-B est par ailleurs renforcée par l'observation des comportements de LDH-C et LDH-D. Ces deux systèmes, les plus anodiques, s'expriment simultanément dans le cœur et dans l'œil où ils sont très actifs (fig. 7), moins vigoureusement dans le muscle squelettique. Quelques traces en ont également été détectées dans l'estomac. LDH-D seul peut être détecté dans le foie et le rein de quelques individus où il est alors très actif. LDH-D présente un polymorphisme très faible (fig. 9) : un individu donne un système flou, très vraisemblablement à cinq taches, vers les mobilités lentes. Un autre présente un phénotype analogue, mais vers les mobilités rapides tandis qu'un troisième montre cinq bandes très nettes vers la cathode. Nous pensons qu'il s'agit d'individus hétérozygotes présentant simultanément les électromorphes LDH-D<sup>100</sup> et (respectivement) LDH-D<sup>90</sup>, ou LDH-D<sup>105</sup> ou LDH-D<sup>80</sup>. LDH-C est un système également polymorphe, mais ses variations sont totalement liées à celles de LDH-D, tant intraspécifiques chez *Solea vulgaris* qu'interspécifiques dans le genre *Solea* dont les espèces présentent de nombreuses différences de mobilité (GOUCHA *et al.*, 1982, QUIGNARD *et al.*, 1984). Nous avons par ailleurs trouvé l'écho, sur LDH-C et sous forme d'une bande supplémentaire, du variant LDH-B à bandes multiples alors qu'aucune répercussion des variants LDH-B<sup>90</sup> ou LDH-B<sup>110</sup> n'a jamais été enregistrée sur LDH-C.

Nous pensons actuellement que trois gènes structuraux permettent la synthèse des quatre isozymes décrites : *Ldh-1*, *Ldh-2* et *Ldh-3*. LDH-A serait composé de tétramères (Ldh-1)<sup>4</sup>, LDH-B de tétramères (Ldh-2)<sup>4</sup> et LDH-D de tétramères (Ldh-3)<sup>4</sup>. LDH-C serait un système d'hybrides, hétéro-tétramères asymétriques (Ldh-2)<sup>1</sup>/(Ldh-3)<sup>3</sup>.

Il reste à expliquer le « double » polymorphisme de LDH-B. Il semble impossible de voir dans les phénotypes 90, 100 et 110 différents états d'une dénaturation ou d'une modification physiologique de la molécule étant donné l'apparente cohérence des observations réalisées dans différents organes (muscle, œil), et la constance de la présence des phénotypes à deux bandes dans différentes populations et classes d'âge. Le polymorphisme de LDH-B résulte peut-être de la variabilité de deux gènes distincts, le gène structural *Ldh-2* et un autre dont la fonction pourrait être de conditionner une « retouche finale » du tétramère pour qu'il soit actif ou de coder un peptide complémentaire intervenant dans la structure moléculaire définitive de l'enzyme. Le polymorphisme de LDH-B pourrait alors résulter aussi bien de mutations touchant le monomère codé par le gène de structure — d'où des hétérozygotes à bandes multiples répercutés de surcroît par LDH-C — que de celui d'un peptide (?) complémentaire intervenant dans la structure quaternaire de LDH-B, ou encore de celui d'une tierce enzyme qui viendrait opérer des modifications post-traductionnelles de la LDH-B, d'où l'existence d'hétérozygotes à deux bandes sans écho sur LDH-C.

HARRY (1983) décrit en détails chez un cèdre l'intrication en un seul polymorphisme enzymatique (MDH) des effets de la variabilité de deux gènes distincts non liés. Le gène structural code plusieurs électromorphes codominants qui peuvent, de surcroît, répercuter différents états d'un gène « modificateur » dont l'allèle mutant est récessif.

Nous considérons ici provisoirement trois gènes seulement, *Ldh-1*, *Ldh-2* et *Ldh-3*, en gardant à l'esprit que ce ne sont pas forcément les gènes structuraux des homotétramères correspondant aux isozymes LDH-A, LDH-B et LDH-D. *Ldh-1* code les éléments de deux électromorphes : LDH-A<sup>100</sup> et LDH-A<sup>110</sup> ; *Ldh-2* code les électromorphes LDH-B<sup>90</sup>, LDH-B<sup>100</sup> et LDH-B<sup>110</sup> qui donnent des hétérozygotes à deux bandes, l'hétérozygote ultra-rare à bandes multiples étant provisoirement considéré comme non variant ; enfin *Ldh-3* code les électromorphes LDH-D<sup>90</sup>, LDH-D<sup>100</sup>, LDH-D<sup>105</sup> et LDH-D<sup>80</sup>. Cette interprétation est provisoire, dans l'attente d'observer d'autres polymorphismes rares et surtout de pouvoir réaliser des croisements contrôlés comme peuvent nous le laisser espérer les progrès de l'élevage complet de la sole.

#### GLYCÉROL-3-PHOSPHATE DÉSHYDROGÉNASE (GPD ; E.C.1.1.1.8.).

Tampon d'électrophorèse : système continu Tris-citrate pH 8,0.

#### Coloration

- |  |  |        |
|--|--|--------|
| 1 — Préparer une solution d'agar-agar à 2 %. | 3 — Au moment de la coloration ajouter : |        |
| 2 — Préparer le mélange suivant :            | PMS 1 %                                  | 0,5 ml |
| tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0                  | MTT 1 %                                  | 0,3 ml |
| MgCl <sub>2</sub> 0,5M                       | Agar-agar 2 %                            | 15 ml  |
| D,L - αβ - glycérophosphate                  |  |        |
| NAD 1 %                                      |  |        |
| NBT 1 %                                      |  |        |

Remuer rapidement avec une spatule et verser sans délai sur la tranche d'amidon à colorer. Ne rien déplacer avant prise complète de l'agar.

Coloration violacée apparaissant en une heure à l'étuve (35° C).

**Motifs électrophorétiques :** on détecte trois systèmes principaux isozymes chez la sole : GPD-A est fortement active dans le muscle squelettique. GPD-B et GPD-C caractérisent le foie. GPD-A et GPD-C sont très indépendamment polymorphes. On trouve des variants à trois bandes qu'on peut facilement interpréter comme des hétérozygotes (fig. 10). La variabilité de GPD-B répercute systématiquement celles de GPD-A et GPD-C (fig. 11). Les hétérozygotes en particulier présentent un dédoublement de l'isozyme GPD-B. Nous pensons donc que deux gènes au moins conditionnent chez la sole la production de GPD : *Gpd-1* présente deux classes d'allèles variants *Gpd-1<sup>115</sup>* et *Gpd<sup>85</sup>* conditionnant la présence de l'électromorphe GPD-A<sup>115</sup> et GPD-A<sup>85</sup>. *Gpd-2* présente au moins quatre classes alléliques, *Gpd-2<sup>100</sup>*, *Gpd-2<sup>80</sup>*, *Gpd-2<sup>110</sup>* et *Gpd-2<sup>115</sup>* qui conditionnent la présence des électromorphes respectives GPD-C<sup>100</sup>, GPD-C<sup>80</sup>, GPD-C<sup>110</sup> et GPD-C<sup>115</sup>.

INDIVIDU n°	Gpd-2
1	100 / 100
2	100 / 100
3	100 / 110
4	100 / 100
5	110 / 110
6	100 / 110
7	100 / 100

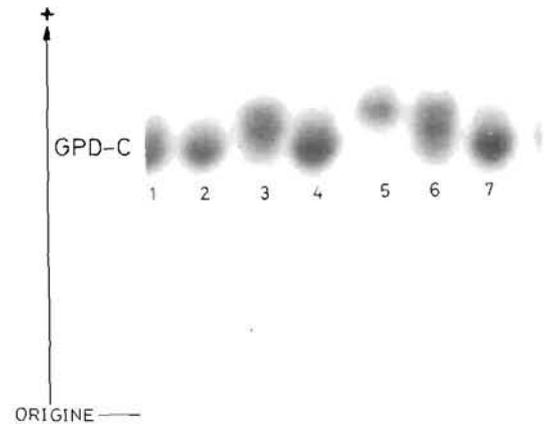


FIG. 10. — Polymorphisme de GPD-C observé dans le foie (GPD-B non visible).

**MALATE DÉSHYDROGÉNASE (MDH ; E.C.1.1.1.37).**

Tampon d'électrophorèse : système continu Tris-citrate pH8.

**Coloration**

1 — Préparer le mélange :

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	35 ml
D,L-malate de sodium 2M pH 7,0	5 ml
MgCl <sub>2</sub> 0,5M	0,3 ml
NAD 1 %	2 ml
NBT 1 %	1 ml

2 — Au moment de la coloration, ajouter :

PMS 1 %	0,5 ml
MTT 1 %	1 ml

Verser sur la tranche d'amidon et placer à l'étuve (35° C).

Taches violacées apparaissant en 1 heure.

**Motifs électrophorétiques :** on détecte deux classes d'isozymes chez la sole (fig. 12). MDH-A est active dans le cœur et le muscle. On a trouvé un variant rare à trois bandes interprété comme hétérozygote en un locus *Mdh-1* pour deux allèles appartenant aux classes *Mdh-1<sup>100</sup>* et *Mdh-1<sup>80</sup>* et conditionnant la présence des électromorphes MDH-A<sup>100</sup> et MDH-A<sup>80</sup>. MDH-B, isozyme la plus anodique, est active dans tous les organes que nous avons testés. Elle présente trois électromorphes, 80, 100 et R, cette dernière classe, très rare, n'ayant pu encore être comparée avec les mobilités 120 de *S. aegyptiaca* et de *S. azevia*. Nous avons admis l'existence d'un deuxième gène, *Mdh-2*, qui serait donc polymorphe pour les classes d'allèles correspondantes *Mdh-2<sup>80</sup>*, *Mdh-2<sup>100</sup>* et *Mdh-2<sup>R</sup>*.

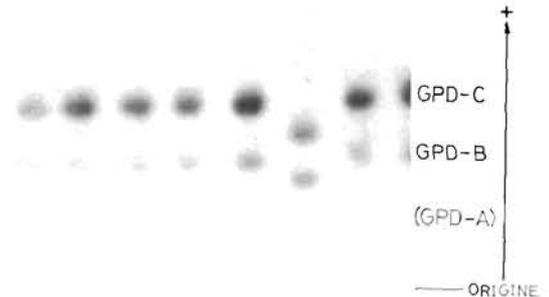


FIG. 11. — Homozygote mutant *Gpd-2<sup>80-80</sup>* : remarquer la répercussion sur GPD-B.

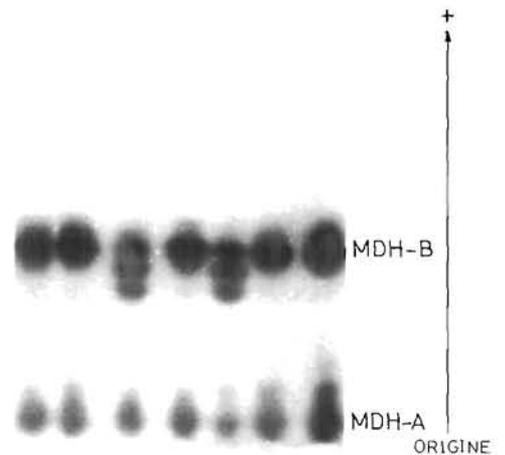


FIG. 12. — Polymorphisme de MDH-B observé dans le muscle squelettique (ici des hétérozygotes à trois bandes *Mdh-2<sup>80/100</sup>*).

On remarque une tendance au dédoublement de la bande correspondant à MDH-A, vraisemblablement liée à un phénomène de dénaturation à rapprocher d'une certaine labilité thermique de cette enzyme. Enfin on note dans le foie et le cœur la formation assez discrète d'hétérodimères Mdh-1/Mdh-2.

GLYOXALASE (GLO : E.C 4.4.1.5.).

Tampon d'électrophorèse : système continu Tris-citrate pH 6,7.

*Coloration*

1 — Préparer une solution d'agar-agar à 2 %.

2 — Au moment de la coloration, préparer le mélange :

tampon Phosphate de Na 0,2M pH 6,5	15 ml
Méthylglyoxal	0,45 ml
Glutathion réduit	15 mg

Imprégner un papier Whatman n° 3 de la dimension du gel de cette solution, puis après l'avoir égoutté, l'appliquer sur la tranche de gel en chassant soigneusement les bulles d'air.

Incuber 30 mn à 35° C (étuve).

3 — L'incubation terminée, préparer le mélange :

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	5 ml
MTT 1 %	1,8 ml
DCIP passé sur filtre	20 gouttes
Agar-agar 2 % 45-50° C	15 ml

Mélanger rapidement avec une spatule et verser sans délai sur la tranche d'amidon. Ne rien remuer jusqu'à la prise complète de l'agar.

Coloration négative apparaissant sur le fond bleu en une heure à 37° C (étuve).

*Motifs électrophorétiques* : un seul locus a pu être mis en évidence (foie et muscle). Nous n'avons observé aucun polymorphisme dans nos échantillons de Méditerranée mais nous n'avons pas encore analysé systématiquement cette enzyme en Atlantique.

ASPARTATE AMINO TRANSFÉRISE (AAT : E.C.2.6.1.1.).

Tampon d'électrophorèse : systèmes continus Tris-citrate pH 8,0 et Tris-citrate pH 6,4.

*Coloration*

1 — Préparer le mélange :

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	40 ml
Pyridoxal-5-phosphate	5 mg
Acide L-aspartique	40 mg
Acide $\alpha$ -kétoglutarique	80 mg

2 — Incuber la tranche 30 mn dans ce mélange à 35° C.

3 — Evacuer la solution et la remplacer par le mélange colorant :

Fast Blue BB	80 mg
H <sub>2</sub> O déionisée	40 ml

Incuber à température ambiante jusqu'à intensité suffisante des bandes (coloration verdâtre) et en évitant de trop laisser imprégner le fond.

*Motifs électrophorétiques* : l'utilisation combinée d'électrophorèses sous deux pH différents permet de mettre en évidence quatre systèmes isozymiques chez *Solea vulgaris*, appelés AAT-A, AAT-B, AAT-C et AAT-D, du plus cathodique au plus anodique. AAT-B, C et D doivent être séparés sous pH 8,0 alors qu'il est nécessaire d'adopter un pH de 6,4 pour « décoller » AAT-A de l'origine du gel.

AAT-A et C sont exprimés dans le foie et aussi un peu dans le rein. AAT-B et D sont actifs dans tous les organes sauf l'œil (fig. 13). AAT-A, AAT-B et AAT-D sont polymorphes de façon apparemment découplée et paraissent refléter la variabilité de trois gènes distincts *Aat-1*, *Aat-2* et *Aat-4*.

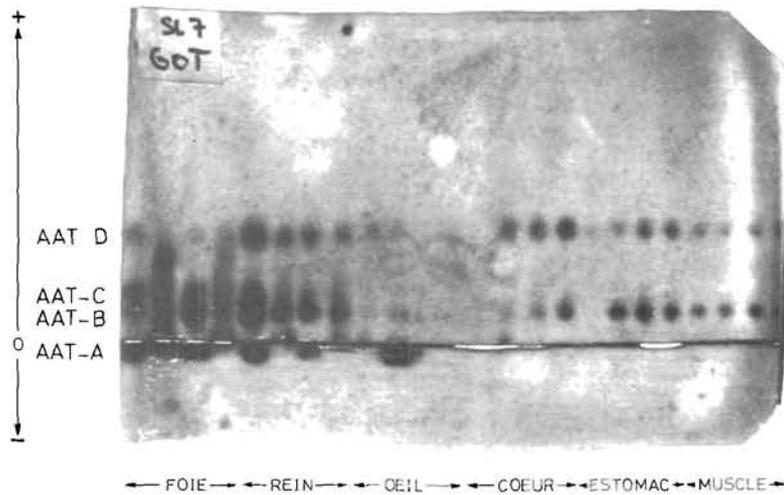


FIG. 13. — Distribution des isozymes de l'AAT dans différents organes de *Solea vulgaris*.

AAT-C semble un dimère hybride entre les produits de *Aat-1* et *Aat-4* dont les homodimères correspondant sont AAT-A et AAT-D. Cette idée résulte de la répercussion par AAT-C des polymorphismes de AAT-A, composés d'au moins trois électromorphes, AAT-A<sup>100</sup>, AAT-A<sup>110</sup> et AAT-A<sup>120</sup>, en Languedoc et que nous pensons conditionnés par la présence des allèles des trois classes *Aat-1*<sup>100</sup>, *Aat-1*<sup>110</sup> et *Aat-1*<sup>120</sup>. La lecture de AAT-C reste cependant difficile et il semble que le couplage de ses variations avec celles de AAT-A et AAT-D ne soit pas général chez les Soléidés (ALAYSE, comm. pers.). C'est la raison pour laquelle nous conservons la nomenclature de QUIGNARD *et al.* (1984) qui considèrent quatre locus.

*Aat-2* possède trois classes alléliques, *Aat-2*<sup>100</sup>, *Aat-2*<sup>120</sup> et *Aat-2*<sup>80</sup> codant les électromorphes AAT-B<sup>100</sup>, AAT-B<sup>120</sup> et AAT-B<sup>80</sup>. Les hétérozygotes ont trois bandes. *Aat-4* enfin a manifesté un polymorphisme qui semble très rare pour deux classes alléliques, *Aat-4*<sup>80</sup> et *Aat-4*<sup>120</sup> codant les électromorphes AAT-D correspondantes.

#### XANTHINE DÉSHYDROGÉNASE (XDH ; E.C.1.2.1.37.).

Tampon d'électrophorèse : système discontinu « Poulik » Tris-citrate pH 8,7/borate pH 8,2.

#### Coloration

1 — Mélanger :

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	40 ml
Hypoxanthine	100 mg

Chauffer à l'ébullition pour dissoudre l'hypoxanthine, puis laisser refroidir à la température ambiante.

2 — Au moment de la coloration, ajouter :

NAD 1 %	1 ml
NBT 1 %	1 ml
PMS 1 %	0,5 ml

Verser directement sur la tranche d'amidon.

Taches fines, violacées, apparaissant en 2 h à 35° C.

*Motifs électrophorétiques* : une seule isozyme a été mise en évidence dans le foie puis étudiée dans l'échantillon (F) de Méditerranée. Elle s'avère électriquement monomorphe et nous admettons pour l'instant l'existence d'un seul locus, *Xdh*.

#### ISOCITRATE DÉSHYDROGÉNASE NADP-DÉPENDANTE (IDH ; E.C.1.1.1.42.).

Tampon d'électrophorèse : système continu Tris-citrate pH 6,7.

Ajouter 1 ml NADP 1 % au gel en fin de cuisson (dégazage) et 1 ml au tampon cathodique.

#### Coloration

1 — Préparer une solution d'agar-agar à 2 %.

2 — Préparer le mélange :

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	5 ml
MnCl <sub>2</sub> 0,25M	0,3 ml
Acide isocitrique 0,1M	4 ml
NADP 1 %	1 ml

3. — Avant coloration, ajouter :

NBT 1 %	0,5 ml
PMS 1 %	0,5 ml
Agar-agar 2 % 45-50° C	15 ml

Remuer rapidement avec une spatule et verser sans délai sur la tranche d'amidon. Attendre la prise de l'agar et placer à 35° C (étuve).

Taches violacées apparaissant en quelques minutes, ou pas du tout si dénaturation (très fréquente !).

**Motifs électrophorétiques :** les IDH sont parmi les enzymes les plus difficiles à étudier systématiquement sur de gros échantillons du fait de leur fragilité thermique : il est conseillé, chez la sole, de les caractériser dès la première décongélation des extraits sous peine de les perdre définitivement.

Nous avons reconnu deux systèmes de taches. Le moins anodique, IDH-A s'exprime dans le cœur et le muscle squelettique. Il nous est apparu pour l'instant monomorphe dans l'échantillon F de Méditerranée où nous l'avons bien caractérisé. Nous lui attachons un locus appelé *Id-1*. IDH-B, isozyme plus rapide vers l'anode, est active dans le foie uniquement. Elle est polymorphe et nous paraît refléter la variabilité d'un seul locus, *Id-2* codant deux électromorphes, IDH-B<sup>100</sup> (déterminé par l'allèle *Id-2*<sup>100</sup>) et IDH-B<sup>80</sup> (déterminé par *Id-2*<sup>80</sup>). Les hétérozygotes, supposés *Id-2*<sup>100/80</sup> présentent, dans nos conditions d'électrophorèse, un système diffus couvrant les mobilités de IDH-B<sup>80</sup> à IDH-B<sup>100</sup>.

ACTIVITÉS ESTÉRASIQUES (ES : E.C.3.1.1.1.).

Tampon d'électrophorèse : système discontinu Tris-HCl pH 8,5/Borate pH 8,2.

Coloration

1 — Au moment de la coloration, préparer le mélange :

Phosphate de Na 0,04M pH 7,0	50 ml
α-naphthylpropionate à 1 % dans l'acétone	1 ml
β-naphthylpropionate à 1 % dans l'acétone	1 ml
Fast Blue RR	20 mg

2 — Colorer en cuvette émaillée à température ambiante. Apparition de taches noires en quelques minutes.

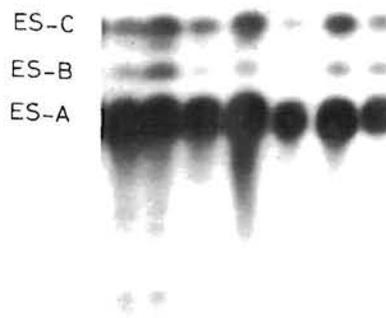


FIG. 14 A. — Terminologie des isozymes à activité estérasique chez *Solea vulgaris* observées ici dans le rein.

**Motifs électrophorétiques :** deux systèmes principaux d'isozymes ont pu être effectivement étudiés dans le foie (fig. 14). ES-A, le plus cathodique, est fortement actif dans le foie, le rein et l'estomac, plus faiblement dans le cœur et l'œil. Il semble absent du muscle (fig. 14). Nous le considérons comme un système d'allozymes à deux électromorphes, ES-A<sup>100</sup> et ES-A<sup>98</sup>, codées par les classes alléliques *Es-1*<sup>100</sup> et *Es-1*<sup>98</sup>. ES-C, système le plus anodique est un autre système d'allozymes, expression d'un locus *Es-3* polymorphe et présentant trois classes alléliques *Es-3*<sup>100</sup>, *Es-3*<sup>110</sup> et *Es-3*<sup>90</sup>.

On peut parfois observer dans le rein l'apparition d'un système complémentaire ES-B, de mobilité intermédiaire entre celles de ES-A et ES-C et assez difficile à discerner de façon répétitive (fig. 14). Il présente une variabilité interspécifique et a pu être interprété comme l'expression d'un locus distinct *Es-2* (GOUCHA 1982, GOUCHA *et al.*, 1982, QUIGNARD *et al.*, 1984).

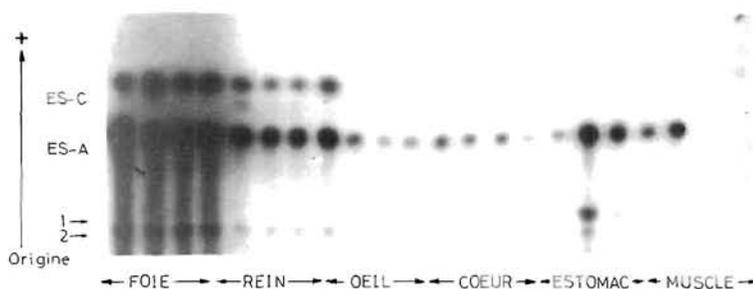


FIG. 14 B. — Distribution des isoenzymes à activité estérasique dans différents organes chez *S. vulgaris*.

Il existe enfin d'autres activités estérasiques dans le foie, le rein et l'estomac, mais nous n'avons pas encore abordé leur étude ni même leur nomenclature.

MALATE DÉSHYDROGÉNASE DÉCARBOXYLATIVE (ou Enzyme Malique) (MOD ; E.C.1.1.1.40).

Tampon d'électrophorèse : système continu Tris-citrate pH 8,0.

Ajouter 1 ml NADP 1 % au gel en fin de cuisson (dégazage) et 1 ml au tampon cathodique.

Coloration

1 — Préparer une solution d'agar-agar 2 %.

2 — Préparer le mélange :

tampon Tris-HCl 0,2M pH 8,0	5 ml
MgCl <sub>2</sub> 0,5M	1,5 ml
D,L-malate de sodium 2M pH 8,0	1 ml
NADP 1 %	0,1 ml

3 — Au moment de la coloration, ajouter :

PMS 1 %	0,1 ml
NBT 1 %	0,2 ml
MTT 1 %	0,2 ml
Agar-agar 2 % 45-50° C	15 ml

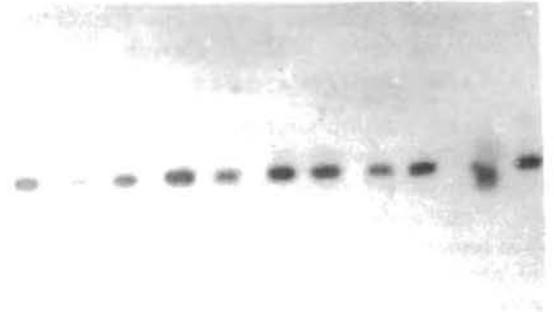


FIG. 15. — Deux individus variants pour MOD-BM (hétérozygotes Mod-2<sup>100/90</sup>).

Remuer rapidement avec une spatule et verser sans délai sur la tranche d'amidon. Attendre la gélification complète de l'agar et placer à l'étuve (35° C).

Coloration violacée apparaissant en une heure environ.

Trois systèmes de taches apparaissent, tous à migration anodale.

- MOD-A, le plus cathodique, s'exprime dans le muscle squelettique uniquement. Son activité, très inégale selon l'espèce de Soléidés considérée, est plutôt faible chez *S. vulgaris* et difficile à étudier malgré la grande netteté des bandes sur les gels. MOD-A n'a pour l'instant manifesté aucun polymorphisme là où nous avons pu la caractériser (Méditerranée).

- Le deuxième système d'isozymes vers l'anode, MOD-B, s'exprime dans le muscle squelettique, l'estomac, le cœur, le rein et le foie. Nous avons constaté qu'il présente un polymorphisme non seulement indépendant des autres systèmes de MOD, mais par ailleurs complètement différent entre le foie et les autres organes ; il y a donc deux systèmes d'allozymes de même mobilité en gel d'amidon, MOD-BM (« muscle ») et MOD-BF (« foie »), correspondant à l'expression de deux gènes *Mod-2* et *Mod-3*. *Mod-2*, très faiblement polymorphe, code pour les électromorphes MOD-BM<sup>100</sup> et MOD-BM<sup>90</sup> (fig. 15) et MOD-BM<sup>105</sup>. *Mod-3*, fortement polymorphe, code l'électromorphe MOD-BF<sup>100</sup> mais aussi plusieurs électromorphes plus cathodiques, très difficiles à discerner dans l'état actuel de nos techniques : nous les rangeons dans la classe MOD-BF<sup>L</sup>.

- MOD-C enfin, système le plus anodique, s'exprime dans le foie. Il est très polymorphe et également difficile à étudier du fait de la proximité des électromorphes. Nous admettons donc simplement l'existence d'un locus supplémentaire, *Mod-4*, impliqué dans la synthèse des MOD.

COMPOSANTS PROTÉINIQUES MAJEURS DU MUSCLE (PMM).

Tampon d'électrophorèse : système discontinu « Poulik » Tris-citrate pH 8,7/borate pH 8,2.

Coloration

1 — baigner la tranche d'amidon dans du bleu de Coomassie (3 g dans un litre de fixateur) pendant quelques heures,

2 — régresser dans du fixateur clair changé plusieurs fois jusqu'à décoloration satisfaisante du fond.

*Motifs électrophorétiques* : une coloration générale des protéines majeures donne de bons résultats sur les électrophorèses d'extraits musculaires.

Le système de bandes obtenues (fig. 16) totalement monomorphe à ce jour permet d'atteindre au moins quatre locus comme le montrent les comparaisons d'espèces proches de Soléidés ayant fixé des allèles différents (respectivement *Pmm-1*, *Pmm-2*, *Pmm-3* et *Pmm-4*).

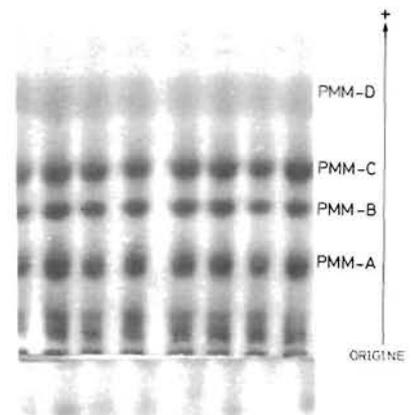


FIG. 16. — Composants protéiques majeurs du muscle de *Solea vulgaris*.

## Conclusion.

Pour la plupart des systèmes d'isozymes que nous avons étudiés, des comparaisons de tissus et d'individus différents, parfois d'espèces proches quand aucune variation intraspécifique n'a pu être observée, ont permis d'élaborer des interprétations génétiques directes des empreintes électrophorétiques et de leurs polymorphismes.

Ce type d'analyse repose sur l'édifice théorique de la génétique biochimique des populations qui intègre nos connaissances relatives aux mécanismes de la synthèse des enzymes, leur structure moléculaire (nombre de sous-unités), le mode de transmission héréditaire de leurs polymorphismes dans différents groupes zoologiques qu'on sait élever au laboratoire...

Toutefois l'observation d'un polymorphisme atypique de LDH-B nous fait clairement entrevoir des limites possibles à nos interprétations : formellement parlant ce n'est pas nécessairement le gène de structure de l'enzyme qui est polymorphe, et on n'est pas non plus à l'abri de l'intrication des effets des polymorphismes simultanés de deux gènes distincts. On connaît par ailleurs bien d'autres phénomènes pouvant induire des modifications post-transcriptionnelles liées par exemple à différents états physiologiques, ou plus simplement à des artéfacts de dénaturation moléculaire. En toute rigueur le contrôle expérimental du mode de transmission héréditaire des variations biochimiques reste le seul argument irréfutable de leur interprétation génétique.

Néanmoins, l'arbre ne doit pas cacher la forêt. C'est très largement par analogies que les données rapportées dans la littérature ont été acquises et cette approche reste la plus efficace, surtout quand l'espèce cible ne se prête pas à des contrôles mendéliens en bonne et due forme — ce qui est pour l'instant le cas de la sole précisément.

Ainsi, les « bizarreries » du polymorphisme de LDH-B de *S. vulgaris* sont les premières du genre enregistrées dans notre laboratoire où des dizaines d'espèces de tous les embranchements zoologiques ont été étudiées, dont trois au moins, les souris *Mus musculus* et *M. spretus* et le moustique *Culex pipiens*, y font l'objet, depuis plusieurs années, d'études très précises du déterminisme génétique de leurs polymorphismes biochimiques. On peut dire qu'à ce jour la transmission héréditaire d'aucun d'entre eux n'a jamais vraiment différé d'un mode mendélien élémentaire.

En conclusion, nous pensons que le risque d'erreur est aujourd'hui infime quand on donne une interprétation génétique directe des polymorphismes enzymatiques. Nous admettons donc avoir caractérisé, par l'analyse des empreintes électrophorétiques de 12 activités enzymatiques et des constituants protéiniques majeurs du muscle squelettique, l'état allélique de 27 gènes dont 13 ont manifesté un polymorphisme notable. Ces résultats sont résumés au tableau 4.

Il est possible d'aborder maintenant toutes sortes d'études comparées de populations d'origines variées et de décrire la structure génétique de l'espèce et ses fluctuations écologiques, géographiques, temporelles...

## BIBLIOGRAPHIE

- GOUCHA (M.), 1982. — Etude morphologique, biologique, cytogénétique et biochimique de trois espèces de soles du genre *Solea* Quensel, 1806 des côtes tunisiennes. — Doct. 3<sup>e</sup> cycle *Biol. Mar.*, Université de Tunis, 1 vol., 192 p.
- GOUCHA (M.), QUIGNARD (J.-P.) et PASTEUR (N.), 1982. — Différenciation et systématique biochimique des soles du genre *Solea* du golfe de Tunis. — *C.I.E.S.M.*, XXVIII<sup>e</sup> Congrès-Assemblée plénière, Cannes 2-11 XII 1982, 2 p. ronéo.
- HARRIS (H.) et HOPKINSON (D.A.), 1976. — Handbook of enzyme electrophoresis in Human genetics. — *North-Holland Publishing Company*, Amsterdam and *American Elsevier Publishing Company, Inc.*, New-York, 1 vol., pag. multiple.
- HARRY (D.E.), 1983. — Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of Malate Dehydrogenase Isozymes in Incense cedar (*Calocedrus decurrens*) and its implications for populations studies. — *Biochem. Gen.*, **21** (5-6) : 417.
- MARKERT (C.L.) et MOLLER (F.), 1959. — Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic and species specific patterns. — *Proc. natn ; Acad. Sci. U.S.A.*, **45** : 753-763.
- MORETTI (J.), BROUSSIER (G.) et JAYLE (M.-F.), 1957. — Réalisation technique et premières applications de l'électrophorèse sur gel d'amidon. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39** : 593-605.
- PASTEUR (N.), 1983. — Structure génétique des populations naturelles d'animaux laguno-marins sur des bases de génétique biochimique et d'écologie. — Rap. fin de contrat ATP Bases biologiques de l'Aquiculture, Lab. Gen., *Univ. Sci. Techn.*, Montpellier, 1 vol., 34 p.
- PRAKASH (J.), LEWONTIN (R.C.) et HUBBY (J.L.), 1969. — A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genetic variation in central marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. — *Genetics*, **61** : 841-858.

- QUIGNARD (J.-P.), PASTEUR (N.) et SHEMATA (S.), 1984. — Biosystématique des soles du golfe du Lion (Poissons, Téléostéens, Soléïdés, genre *Solea*) : génétique, morphologie et méristique. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **46** (4) : 273-284.
- SELANDER (R.K.), YANG (S.Y.) et HUNT (W.A.), 1969. — Polymorphism in esterases and hemoglobin in wild populations of the house mouse. — *Stud. Genet., Univ. Texas Publ.*, **6918** : 271-338.
- SELANDER (R.K.), SMITH (M.H.), YANG (S.Y.), JOHNSON (W.E.) et GENTRY (J.B.), 1971. — Biochemical Polymorphism in the genus *Peromyscus*. 1. Variation of the Old-Field Mouse (*Peromyscus polionotus*). — *Stud. Genet., Univ. Texas Publ.*, **7103** : 49-90.

ANNEXE

TAMPONS	COMPOSANTS	ÉLECTRODES	GEL
SYSTEMES CONTINUS			
Tris-citrate pH 8,0 (T.C. 8,0)	Tris Acide citrique pH	0,62 M ) 0,14 M ) 8,0	dilution 1/29 8,0
Tris-citrate pH 6,7(ou 6,4) (T.C. 6,7 ou 6,4)	Tris Acide citrique pH	0,22 M 0,08 M 6,3 (6,0)	0,008 M 0,003 M 6,7 (6,4)
SYSTEMES DISCONTINUS			
"Poulik" Tris-citrate/Borate (T.C. 8,7/B. 8,2)	Acide borique NaOH Tris Acide citrique pH	0,3 M 0,06 M / / 8,2	/ / 0,07 M 0,005 M 8,7
Tris-HCl/Borate (T-HCl 8,2/B. 8,2)	Acide borique NaOH Tris HCl (pur) pH	0,3 M 0,06 M / / 8,2	/ / 0,01 M Ajuster le pH à 8,2

TABL. 1. — Composition des différents tampons d'électrophorèse cités dans le texte.

NAD grade III	B-710113
NADP disodique	B-128058
Glucose-1-phosphate disodique	B-105287
DL-Isotule de lithium	S-L1500
DL- $\alpha/\beta$ -Glycérophosphate disodique	S-6501
Acide DL-malique	S-M0875
Méthylglyoxal	S-M0252
Glutathion réduit	B-127736
Pyridoxal 5-phosphate	B-108979
Acide L-(+)-aspartique	B-102920
Acide $\alpha$ -Kétoglutarique	S-K1876 ou B-127850
Fast Blue BB	F-44670
Hypoxanthine	S-H9377
DL-Isocitrate disodique	S-I1252
$\alpha$ -naphthyl propionate	S-N0376
$\beta$ -naphthyl propionate	S-N0501
Fast Blue RR	S-F0500
Bleu de Coomassie R250	M-12553
D.C.I.P. (2,6 dichlorophénol-Indophénol)	S-D1878
MTT	S-M2128
PMS	S-P9625
NBT grade III	S-N6876
Glucose-6 phosphodéshydrogénase, NAD dépendante	B-737186 (extraite de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; 3250 $\mu$ /ml à 30°C)

TABL. 3. — Références commerciales des principaux composés de chimie fine cités dans le texte et les colorations : B-Boehringer ; S-Sigma ; F-Fluka ; M-Merck.

TAMPONS DE COLORATION

Tris-HCl 0,02 M pH 8,0	Tris	24,2 g
	E.G.T.A.	0,4 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 1000 ml
	HCl (pur) : ajuster le pH à 8,0	
Phosphate 0,04 M pH 7,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,80 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,84 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 1000 ml
	Ajuster le pH à 7,0	

FIXATEUR DES COLORATIONS

Acide acétique	10%
Alcool méthylique	40%
H <sub>2</sub> O distillée	50%

SOLUTIONS VARIEES

MgCl <sub>2</sub> (0,5 M)	MgCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	10,0 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 100 ml
MnCl <sub>2</sub> (0,25 M)	MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	4,9 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 100 ml
Lactate de lithium (0,5 M)	DL-lactate de lithium	9,6 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 200 ml
Acide isocitrique (0,1 M)	DL-isocitrate trisodique	2,84 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 100 ml
Malate de sodium (2 M ; pH 7,0)		
<u>Solution A :</u>	Acide malique	536,4 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 1000 ml
<u>Solution B :</u>	NaOH (pastilles)	320,0 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 500 ml

1. Refroidir la solution A dans un récipient en Pyrex tenu dans la glace pilée
2. Ajouter la solution B GOUTTE A GOUTTE
3. Compléter avec : H<sub>2</sub>O 500 ml
4. Ajuster le pH à 7,0

PMS 1 %	phénazine méthosulfate	1,0 g
	H <sub>2</sub> O	qsp..... 100 ml
MTT 1 %	MTT ( [3-(4,5-Diméthylthiazolyl-2- 2,5 diphényl tétrazolium Bromide ) ] )	1 g
	H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml
NBT 1 %	Nitrobleu Tétrazolium	1,0 g
	H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml
NAD 1 %	-diphosphopyridine nucléotide (NAD)	1,0 g
	H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml
NADP 1 %	Nucléotide triphosphopyridine (NADP)	1,0 g
	H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml
α -naphthylpropionate 1 %	α -naphthylpropionate	1,0 g
	acétone analytique	100 g
β -naphthylpropionate 1 %	β -naphthylpropionate	1,0 g
	acétone analytique	100 g
D.C.I.P. 1 %	2,6-dichlorophénol-indophénol	1 g
	H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml
Bleu de coomassie	Bleu de Coomassie	3 g
	Fixateur de coloration	1000 ml
AGAR-AGAR 2 %	Agar-agar	2 g
	Tampon de coloration	100 ml

Chauffer à l'ébullition jusqu'à dissolution de l'agar, puis refroidir et maintenir à 50-60°C sous agitation modérée sans turbulence (agitateur magnétique). Toute l'écume doit se dissiper.

TABL. 2. — Solutions techniques utilisées dans les colorations citées dans le texte.

Nomenclature MPAC-IUB (1978)	Systèmes d'allozymes	Locus associés	Tampons d'électrophorèse	Organe	Variants recensés	Phénotypes hétérozygotes
1.1.8.	GPD-A GPD-C	<u>Gpd-1</u> <u>Gpd-2</u>	T.C. 8,0 idem	muscle foie	115, 85 80, 110, 115	trois bandes trois bandes
1.1.27.	LDH-A LDH-B LDH-D	<u>Ldh-1</u> <u>Ldh-2</u> <u>Ldh-3</u>	T.C.8,7/B.8,2 idem idem	muscle muscle muscle	110 90, 110 (80*) (80) 90, 105	deux bandes deux bandes (cinq bandes*) (cinq bandes) flous
1.1.37	MDH-A MDH-B	<u>Mdh-1</u> <u>Mdh-2</u>	T.C.8,0 idem	muscle muscle	80 80, R	trois bandes trois bandes
1.1.40	MOD-BM MOD-BF	<u>Mod-2</u> <u>Mod-3</u>	T.C.8,0 T.C. 8,0	muscle foie	90, 105 L	flous deux bandes
1.1.42	IDH-A IDH-B	<u>Id-1</u> <u>Id-2</u>	T.C.6,7 + NADP T.C.6,7 + NADP	muscle foie	monomorphe 90	flous
15.1.1.	SOD-A SOD-B	<u>Sod-1</u> <u>Sod-2</u>	T.C.8,0 T.C.8,0	foie foie	80 monomorphe	trois bandes
2.1.37	XDH	<u>Xdh</u>	T.C.8,7/B.8,2	foie	monomorphe	
6.1.1.	AAT-A AAT-B AAT-D	<u>Aat-1</u> <u>Aat-2</u> <u>Aat-3</u>	T.C.6,4 T.C.8,0 T.C.8,0	foie muscle muscle	110, 120 120, 80 120, 80	trois bandes ou flous trois bandes
7.5.1.	PGM	<u>Pgm</u>	T.C.8,7/B.8,2	muscle	90, 115	deux bandes
1.1.1.	ES-A ES-C	<u>Es-1</u> <u>Es-3</u>	T.HCL 8,5/B.8,2 T.HCL 8,5/B.8,2	foie, rein foie, rein	98 90, 110	deux bandes deux bandes
4.1.5.	GLO	<u>Glo</u>	T.C.6,7	foie	monomorphe	
3.1.9.	GPI-A GPI-C	<u>Gpi-1</u> <u>Gpi-2</u>	T.C.8,7/B.8,2 idem	muscle muscle	80, 115, 120 90, 110, 115	trois bandes trois bandes
	PMM-A, B, C et D	<u>Pmm-1, 2, 3 et 4</u>	T.C.8,7/B.8,2	muscle	monomorphes	

TABL. 4. — Polymorphismes biochimiques décrits dans le texte.