

Variabilité électrophorétique totale à 11 loci structuraux chez les rongeurs muridés (Muridae, Rodentia)

DJOKO ISKANDAR ET FRANÇOIS BONHOMME

Laboratoire de Génétique, Institut des Sciences de l'Évolution (LA 327), USTL, Place Bataillon, 34060 Montpellier France

Reçu le 20 février 1984

Manuscrit révisé reçu le 29 juin 1984

ISKANDAR, D., et FRANÇOIS BONHOMME. 1984. Variabilité électrophorétique totale à 11 loci structuraux chez les rongeurs muridés (Muridae, Rodentia). *Can. J. Genet. Cytol.* **26**: 622-627.

Quarante-six espèces de rongeurs de la famille des muridés ont été soumises à des électrophorèses séquentielles, utilisant 12 systèmes tampons qui différaient par leur pH et leur composition ionique, pour l'étude de 11 loci protéiques. L'ensemble des conditions électrophorétiques a révélé un total de 135 variants, dont 68 sont détectés par une seule de ces conditions. L'augmentation du simple au double du nombre de variants révélés est limitée aux comparaisons intergénériques essentiellement, puisque l'emploi de plusieurs tampons n'a fait ressortir que peu de variants additionnels intragénériques. Ces résultats montrent que l'emploi, quoique fréquent, de données électrophorétiques standard pour estimer le degré de différenciation génétique entre taxons à un niveau d'ordre supérieur à celui du genre, peut conduire à des résultats erronés.

Mots clés: polymorphisme biochimique, électrophorèse séquentielle, rongeurs muridés.

ISKANDAR, D., and FRANÇOIS BONHOMME. 1984. Variabilité électrophorétique totale à 11 loci structuraux chez les rongeurs muridés (Muridae, Rodentia). *Can. J. Genet. Cytol.* **26**: 622-627.

Forty-six rodent species of the Muridae family were submitted to sequential electrophoresis for the study of 11 protein loci, using 12 buffer systems which differed in pH and ionic composition. The complete set of electrophoretic conditions yielded 135 variants of which 68 were detected through a single condition. The twofold increase of revealed variants was essentially limited to intergeneric comparisons because few additional variants within genera were revealed, despite the use of several buffers. These results show that estimation of the degree of genetic differentiation among taxa at a higher level than that of the genus by standard electrophoretic data may, although of current use, lead to erroneous results.

Key words: biochemical polymorphism, sequential electrophoresis, murid rodents.

[Translated by the journal]

Introduction

L'analyse électrophorétique des polymorphismes enzymatiques fournit, depuis quelques années, une part importante des données utilisées dans l'étude des mécanismes de l'évolution. Toutefois, bien que largement utilisée, nous connaissons mal les limites de résolution de cette technique. En particulier, la plupart des travaux qui portent sur l'estimation de l'hétérozygotie ou de la différenciation génétique ne tiennent pas compte de la variabilité dite "cachée," c'est-à-dire de la variabilité qui n'est pas révélée par les techniques d'électrophorèse classiques (ou "électrophorèse standard"). Or nous savons que ce polymorphisme cryptique peut être très important, tout au moins pour une certaine catégorie de gènes. Ainsi par exemple, Kitto et Wilson (1966) ont observé par électrophorèse standard que sur 25 ordres d'oiseaux analysés pour la malate déshydrogénase (soluble)-1 (*Mor-2*)¹, 22 possédaient le même électromorphe. Aquadro et Avise (1982b) ont réanalysé ce

locus chez 56 espèces d'oiseaux appartenant à 22 familles et 10 ordres, en utilisant 12 tampons différents en gel d'amidon ("électrophorèse séquentielle"). Ils ont montré que cet électromorphe était en fait hétérogène et pouvait être décomposé en 18 variants différents. En appliquant les mêmes techniques à neuf systèmes enzymatiques, ils ont obtenu 36% de variants supplémentaires, l'essentiel de ces variants étant d'ailleurs détecté dans les comparaisons interspécifiques. Bonhomme et Selander (1978) ont estimé par dénaturation thermique que les techniques d'électrophorèse standard détectaient environ 50% du polymorphisme cryptique à l'intérieur d'une espèce relativement peu polymorphe comme *Mus musculus*. Singh *et al.* (1976), en faisant varier la concentration et le pH de gels d'acrylamide, ont obtenu 37 classes alléliques différentes à partir de six électromorphes standard de xanthine déshydrogénase (XDH) pour 146 lignées de drosophiles. Ramshaw *et al.* (1979) ont montré que des techniques d'électrophorèse séquentielle pouvaient différencier pratiquement tous les variants existant dans un ensemble d'hémoglobines humaines comportant des substitutions connues d'acides aminés, que celles-ci changent ou non la charge du résidu qu'elles modifient. Plus récemment, Kreitman (1983) a montré en séquençant 11 clones

¹Les protéines analysées pour le présent travail sont désignées par le nom des loci qui les codent, conformément à la nomenclature en vigueur chez *Mus musculus*. Le code enzymatique pour chacune d'entre elles est donnée dans le tableau 3.

génomiques d'alcool déshydrogénase (ADH) de drosophile qu'il existait une forte variabilité de la séquence nucléotidique qui ne se traduisait pas par des substitutions d'acides aminés.

Il semble donc que l'ampleur du polymorphisme caché, ainsi que sa détectabilité par électrophorèse, soit variable selon les gènes considérés et aussi suivant les niveaux de différenciation auxquels l'on s'adresse: polymorphisme intraspécifique ou divergence interspécifique, intergénérique. La présente étude donne un aperçu de ces deux derniers points pour 11 loci fréquemment rencontrés dans les analyses électrophorétiques standard. La famille des muridés auxquels elle s'adresse est un ensemble évolutif assez homogène, probablement monophylétique, et donc bon candidat pour ce genre de travail.

Matériels et méthodes

Le principe de la méthode d'électrophorèse séquentielle consiste à soumettre les extraits tissulaires à des conditions électrophorétiques variées de façon à révéler des différences de mobilité qui n'apparaîtraient pas sur une seule d'entre elles. De telles méthodes ont été assez largement employées sur gel d'acrylamide en faisant varier le pH et la maille du gel (concentration en acrylamide). Pour notre part, nous avons appliqué une méthode analogue à celle employée par Aquadro et Avise (1982a), qui consiste à utiliser, en gel d'amidon, plusieurs tampons de pH et de compositions chimiques variés. La maille du gel ne varie pas, la concentration en amidon étant constante.

Toutes les analyses ont été effectuées sur des broyats de reins ou de foies provenant de 46 espèces de muridés répartis en 20 genres. Les représentants des genres *Mus*, *Rattus*, *Sylviaemus* et *Apodemus* sont (à l'exception de *Mus musculus bactrianus* et *M. m. molossinus*, dons de K. Moriwaki (Mishima) des espèces européennes et asiatiques provenant de la collection de notre laboratoire. Tous les autres genres sont d'origine africaine et ont été fournis et identifiés par F. Petter (Paris) ou J. M. Duplantier (Montpellier).

Les électrophorèses ont été effectuées en gel d'amidon à 12% hydrolysé par nos soins selon une technique adaptée de Moretti *et al.* (1957). Les révélations enzymatiques et les systèmes tampons sont analogues à ceux de Selander *et al.* (1971), Ayala *et al.* (1972), et Harris et Hopkinson (1976) avec quelques modifications. Le tableau 1 donne la liste des 12 tampons utilisés, leur numéro, leur pH et leur abréviation.

Resultats

Comparaison entre loci

A titre d'exemple, nous donnons dans le tableau 2 les résultats bruts obtenus pour les loci phosphoglucose mutase-2 (*Pgm-2*), isocitrate déshydrogénase (soluble)-1 (*Idh-1*) et glutamate oxaloacétate transaminase (mitochondriale)-2 (*Aat-2*) qui sont, respectivement, peu, moyennement et très polymorphes. Le détail des techniques électrophorétiques et des résultats obtenus pour les autres loci, trop volumineux pour être présentés

TABLEAU 1. Composition chimique et pH des systèmes tampons utilisés

Tampon N°	Composition chimique	pH
1	TCE	6,0
2	PC	6,3
3	TC	6,4
4	TME	6,4
5	TC	6,7
6	TME	6,9
7	TME	7,4
8	TC	8,0
9 ^{a,b}	TCL	8,3
10 ^c	TBE	8,6
11 ^{b,c}	TCB	8,7
12 ^c	TG	9,0

NOTE: T, Tris; C, citrate; B, borate; G, glycine, L, hydroxyde de lithium; M, maléate; P, phosphate; E, EDTA.

^aPas de révélation correcte pour les deux loci mitochondriaux *Aat-2* et *Mor-1*.

^bPas de révélation correcte pour *Pgm-2*.

^cPas de révélation correcte pour *Idh-1*.

ici, est disponible auprès des auteurs (Iskandar 1984). Le tableau 3 donne une idée du nombre de variants détectés pour chaque tampon et chaque protéine, et montre comment se décompose la variabilité suivant que l'on utilise un seul tampon d'électrophorèse, deux tampons ou tous les tampons disponibles. La première observation est que l'hétérogénéité qui prévaut au niveau de chaque locus avec un seul tampon, est conservée et même amplifiée quand on emploie plusieurs tampons. Ainsi, les loci très variables le sont encore plus (taux d'accroissement moyen de 104% pour les loci présentant en moyenne plus de 10 électromorphes avec un seul tampon) et les loci peu variables restent peu variables (taux d'accroissement moyen de 43% pour les loci présentant en moyenne entre un et sept électromorphes avec un seul tampon). Ainsi, l'extrême conservation de la malate déshydrogénase (mitochondriale)-2 (*Mor-1*) est encore attestée dans cette classe de vertébrés.

Pouvoir de résolution et limites de la méthode d'électrophorèse séquentielle

En additionnant les résultats obtenus sur les 11 loci, le nombre total de variants détectés par un seul tampon (égal au nombre d'électromorphes mis en évidence moins le nombre de loci) est de 68 (valeur moyenne) alors qu'il est de 107 lorsqu'on utilise une paire quelconque de tampons et 135 avec tous. L'électrophorèse standard sur un seul système tampon révèle donc en moyenne $68/135 = 50\%$ de la variabilité détectable par électrophorèse séquentielle. Ce chiffre est porté à $107/135 = 80\%$ lorsqu'on emploie un deuxième tampon et la pratique montre que l'emploi d'un troisième

TABLEAU 3. Sensibilité de la méthode d'électrophorèse séquentielle appliquée à 11 loci protéiques

Locus	Protéine	Code enzymatique	No ⁿ moyen d'électromorphes détectés avec:			% de variation additionnelle détectée avec 12 tampons (z/x - 100%)
			1 tampon (x)	2 tampons (y)	9-12 tampons (z)	
<i>Aat-1</i>	Glutamate oxaloacétate transaminase (soluble)-1	2.6.1.1	10,25	19,25	25	143,9
<i>Aat-2</i>	Glutamate oxaloacétate transaminase (mitochondriale)-2	2.6.1.1	3,33	3,66	4	20,12
<i>Gdc-1</i>	NAD- α -glycérol phosphate déshydrogénase	1.1.1.8	10,58	19,95	27	155,2
<i>Gpi-1</i>	Glucose phosphate isomérase-1	5.3.1.9	6,5	9,49	11	46
<i>Idh-1</i>	Isocitrate déshydrogénase (soluble)-1	1.1.1.42	10,77	14,36	16	48,56
<i>Ldh-1</i>	Sous-unité A de la lactate déshydrogénase	1.1.1.27	10,83	15,62	20	84,67
<i>Ldh-2</i>	Sous-unité B de la lactate déshydrogénase	1.1.1.27	4,66	5,68	6	50,21
<i>Mor-1</i>	Malate déshydrogénase (mitochondriale)-2	1.1.1.37	1	1	1	0
<i>Mor-2</i>	Malate déshydrogénase (soluble)-1	1.1.1.37	3,77	5,85	9	138,73
<i>Pgm-2</i>	Phosphoglucomutase-2	2.7.5.1	4,91	4,98	5	1,83
<i>Sod-1</i>	Superoxide dismutase-1	1.15.1.1	11,85	18,21	22	85,65
Total			78,45	118,1	146	86 (% moyen)

NOTE: Les onze loci analysés ici sont désignés conformément à la nomenclature qui prévaut chez *Mus musculus*.

tampon permet de révéler pratiquement tout ce qui est révélabile par électrophorèse, tout au moins avec les tampons dont nous disposons.

L'augmentation du nombre de variants détectés grâce à l'utilisation d'un deuxième tampon ne semble pas due à la différence de pH entre ces tampons. Quoique nous ayons enregistré une corrélation très légèrement positive pour les loci *Ldh-1* (lactate déshydrogénase sous-unité A) et *Aat-1* (glutamate oxaloacétate transaminase (soluble)-1), un calcul de corrélation de rang de Spearman montre qu'il n'y a pas d'effet significatif sur l'ensemble des loci. Puisqu'il ne dépend pas de la différence de pH, le pouvoir de détection d'une paire de tampons dépend donc probablement plus de la nature chimique des anions (citrate, maléate, phosphate, etc.) contenus dans le gel et les électrodes. On peut cependant dire (cf. tableau 3) que les tampons à pH basiques révèlent en général moins bien les différents systèmes enzymatiques, et que pour certains d'entre eux (par exemple *Idh-1*), ils sont nettement moins performants.

Répartition taxinomique de la variabilité additionnelle

Dans notre échantillonnage, 10 genres étaient représentés par plus d'une espèce. L'électrophorèse séquentielle ne nous a permis de détecter de la variabilité additionnelle que pour deux d'entre eux (*Mus* et *Rattus*, représentés respectivement par 10 et 7 espèces). L'augmentation moyenne du nombre de variants détectés par nos techniques à l'intérieur d'un genre a été estimée en pondérant le taux d'augmentation pour chaque genre par le nombre d'espèces dans le genre moins une. Nous trouvons la valeur de 9,2% (tableau 4), ce qui est très faible comparé au 86% obtenu sur l'ensemble des loci

et des espèces (tableau 3). A l'intérieur d'un genre, les électromorphes sont extrêmement semblables et peu de nouveaux variants sont révélés par l'emploi de plusieurs tampons. Ceci doit être vrai *a fortiori* à l'intérieur de l'espèce, quoique nous ayons peu d'individus dans chaque cas. Ces résultats sont à mettre en rapport avec ceux de Fuerst et Ferrell (1983), qui montrent que pour 23 hémoglobines de séquences connues appartenant à plusieurs classes de vertébrés, plus la divergence de séquence est importante, moins la différence de migration électrophorétique est prédictible sur la seule base du nombre de résidus chargés qui diffèrent, donc plus les électromorphes seront hétérogènes au sens de la présente analyse.

Discussion et conclusion

Nos résultats sur les muridés confirment dans leurs grandes lignes ceux obtenus par Aquadro et Avise (1982b) sur une famille de grives américaines, à savoir que comme eux, nous ne trouvons quasiment pas d'augmentation de la variabilité au niveau intragénérique, mais qu'il faut des comparaisons intergénériques pour mettre en évidence par nos techniques des variants nouveaux qu'une électrophorèse standard n'aurait pas révélés. Une des motivations de l'analyse d'Aquadro et Avise, et aussi une de leur conclusion, était de confirmer l'idée selon laquelle les divergences biochimiques seraient moindres chez les oiseaux que chez les autres vertébrés. Pour le cas qui nous intéresse ici, c'est-à-dire une famille de l'ordre des rongeurs, nous trouvons cependant des niveaux de diversité tout à fait comparables aux leurs, si ce n'est même inférieurs pour ce qui est de la très conservative *Mor-2*.

TABLEAU 4. Variabilité à 11 loci dans les 10 genres plurispécifiques étudiés

Genre	N° d'espèces	N° d'électromorphes détectés en moyenne avec un seul tampon (a)	N° d'électromorphes détectés avec tous les tampons (b)	% d'augmentation (a/b - 100%)
<i>Acomys</i>	2	14	14	0
<i>Arvicanthis</i>	2	12	12	0
<i>Grammomys</i>	2	13	13	0
<i>Hylomyscus</i>	2	14	14	0
<i>Malacomys</i>	3	12	12	0
<i>Mus</i>	10	18	22	22,6
<i>Nannomys</i>	2	14	14	0
<i>Praomys</i>	3	15	15	0
<i>Rattus</i>	7	15	16	6,6
<i>Sylvaemus</i>	3	17	17	0

% moyen pondéré par le nombre d'espèces dans chaque genre moins une: 9,2%

Un autre point que soulève notre étude est la nature des différences que l'on met en évidence par les techniques d'électrophorèse quand on s'adresse à différents niveaux de variabilité: polymorphisme intraspécifique, divergence entre espèces voisines (intragénérique par exemple), divergence entre espèces plus éloignées (intergénérique). Chez les vertébrés, d'après nos résultats et ceux d'Aquadro et Avise (1982a, 1982b), les techniques d'électrophorèse séquentielle s'avèrent impuissantes à révéler de la variabilité additionnelle pour le premier de ces niveaux. Le même phénomène a été observé pour l' α -glycérophosphate déshydrogénase (α -GPDH) de drosophile par Coyne *et al.* (1979). Ces résultats vont un peu à l'encontre de ceux de Ramshaw *et al.* (1979) qui étaient capables de détecter par électrophorèse à peu près tous les variants de séquence connue de l'hémoglobine humaine. Cependant leur échantillonnage de variants est différent du nôtre et peut-être biaisé en ce sens que, comme le montrent Fuerst et Ferrell (1983), ces variants ont été détectés dans des familles à cause de leurs répercussions physiologiques ou pathologiques, répercussions peut-être liées à des substitutions d'acides aminés entraînant un effet majeur sur la biochimie de la molécule. Comme le montrent également ces auteurs, de telles substitutions ne sont pas celles qui sont retenues le plus fréquemment au cours de la phylogénèse. Toutefois, nous savons par ailleurs grâce à d'autres techniques indépendantes de l'électrophorèse que le polymorphisme cryptique existe dans l'espèce (voir par exemple Bonhomme et Selander (1978) et Singh *et al.* (1976)). Même si son estimation est pour le moment imprécise, son existence ne fait pas de doute, mais il faut d'autres techniques que l'électrophorèse, fût-elle séquentielle, pour le mettre en évidence. Le séquençage direct de l'ADN sera la technique par excellence, comme l'attestent des travaux récents sur l'ADH de drosophile (Kreitman 1983).

D'après les résultats qui précèdent, nous pouvons avancer comme hypothèse que les électrophorèses standard (de routine) détectent quasiment tous les variants de charge qui existent à l'intérieur d'une espèce ou d'un genre, et qu'un électromorphe donné y est "simple" au sens de la charge, c'est-à-dire constitué d'une seule combinaison de résidus aminoacides chargés. En revanche, les électromorphes apparaissant comme identiques par les techniques standard entre groupes phylogénétiquement plus éloignés sont souvent "composites," c'est-à-dire qu'ils doivent correspondre à plusieurs combinaisons de résidus chargés donnant à la protéine la même charge globale au pH standard, mais provoquant une "courbe de titration" différente à d'autres pH, comme c'est le cas avec la technique d'électrophorèse séquentielle. On s'attend à ce que le phénomène s'amplifie à mesure que le temps de divergence augmente et que les phénomènes de mutations réverses ou parallèles s'accumulent dans les différentes lignées.

Ces résultats ont deux conséquences pratiques pour l'utilisation des données électrophorétiques standard en biologie évolutive: (i) la divergence entre groupes éloignés mesurée par des identités protéiques correspondant à des électrophorèses standard est très vraisemblablement sous-estimée par rapport à celle mesurée entre espèces proches, ceci d'un facteur de deux environ. Les analyses de type phénétiques peuvent en être biaisées, et en tout cas, ceci voue à l'imprécision toute tentative d'étalonnage d'une éventuelle horloge moléculaire sur des données d'électrophorèse. (ii) Entre deux groupes éloignés, l'identité électrophorétique d'une protéine n'est pas forcément synonyme d'identité phylogénétique alors que ceci est plus vraisemblable pour des espèces proches. Dans les analyses de type cladistique, ceci peut biaiser la détermination des synapomorphies (caractères dérivés en commun). Il est donc dangereux de comparer sur un même plan les données intragéné-

riques et intergénériques quand on ne dispose que d'électrophorèses de routine.

Remerciements

Nous sommes très reconnaissants à J. Britton-Davidian, N. Pasteur et L. Thaler pour le soutien scientifique constant qu'ils nous ont prodigué, M. Raymond pour son aide précieuse en matière de traitement informatique et M. C. Risi pour la dactylographie. Ce travail a été réalisé sur des crédits mis à notre disposition par le Centre National de la Recherche Scientifique et par l'Université de Sciences et Techniques du Languedoc.

- AQUADRO, C. F., et J. C. AVISE. 1982a. An assessment of hidden heterogeneity within electromorphs at three enzyme loci in deer mice. *Genetics*, **102**: 269-282.
- . 1982b. Evolutionary genetics of birds. VI. A re-examination of protein divergence using varied electrophoretic conditions. *Evolution* (Lawrence, Kans.), **36**(5): 1003-1019.
- AYALA, F. J., J. R. POWELL, M. L. TRACEY, C. A. MOURAO et S. PEREZ-SALAS. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genetic variation in natural population of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, **70**: 113-139.
- BONHOMME, F., et R. K. SELANDER. 1978. Estimating total genic diversity in the house mouse. *Biochem. Genet.* **16**(3/4): 287-297.
- COYNE, J. A., W. F. EANES, J. A. M. RAMSHAW et R. K. KOEHN. 1979. Electrophoretic heterogeneity of α -glycerophosphate dehydrogenase among many species of *Drosophila*. *Syst. Zool.* **28**: 164-175.
- FUERST, P. A., et R. E. FERRELL. 1983. The analyses of hidden electrophoretic variation. Interspecific electrophoretic differentiation and amino acid divergence. *J. Mol. Evol.* **19**: 449-454.
- HARRIS, H., et J. A. HOPKINSON. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- ISKANDAR, D. 1984. Évolution génétique de la superfamille des Muroïdés révélée par électrophorèse classique et électrophorèse séquentielle. Thèse de 3ème cycle, Montpellier II.
- KITTO, G. B., et A. C. WILSON. 1966. Evolution of malate dehydrogenase in birds. *Science* (Washington, D.C.), **153**: 1408-1410.
- KREITMAN, M. 1983. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature* (London), **304**: 412-417.
- MORETTI, J., G. BROUSSIER et M. F. BAYLE. 1957. Réalisation technique et premières applications à l'électrophorèse sur gel d'amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **39**: 593-605.
- RAMSHAW, J. A. M., J. A. COYNE et R. C. LEWONTIN. 1979. The sensitivity of gel electrophoresis as a detector of genic variation. *Genetics*, **93**: 1019-1037.
- SELANDER, R. K., M. H. SMITH, S. Y. YANG, W. E. JOHNSON et J. B. GENTRY. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Stud. Genet., Univ. Texas Publ. No. 7103*, pp. 49-92.
- SINGH, R. C., R. C. LEWONTIN et A. A. FELTON. 1976. Genic heterogeneity within electrophoretic alleles of Xanthine dehydrogenase in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **84**: 609-629.