

PRESENTATION DE MÉTHODES BIOCHIMIQUES UTILISABLES DANS
L'ÉTUDE DES INSECTES SOCIAUX: QUELQUES MÉTHODES DE
SEPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES ET LEURS
APPLICATIONS.

BERNARD E. LORBER

Laboratoire de Biochimie, I.B.M.C. - C.N.R.S.

15, rue René Descartes

F - 67084 STRASBOURG Cédex, France

Mots-clés: méthodes, biochimie, électrophorèse, protéines.

RESUME

Les méthodes d'électrophorèse des protéines sont devenues des outils indispensables dans l'étude biochimique de ces molécules. Deux méthodes de base, la focalisation iso-électrique de SVENSSON (1961) et l'électrophorèse de zone de DAVIS (1964), ont servi de point de départ au développement de nombreuses microméthodes et techniques de séparation analytique. Parmi celles-ci, l'électrophorèse et l'iso-

électrofocalisation en gels de polyacrylamide n'ont cessé de recevoir des améliorations pour les rendre de plus en plus performantes. Au cours des dernières années des progrès considérables ont été faits pour accroître la résolution des gels et la sensibilité des techniques de détection des protéines. Ces perfectionnements ouvrent la voie à l'application de ces nouvelles méthodes d'électrophorèse des protéines à l'étude biochimique des Insectes sociaux (y compris ceux des petites espèces).

SUMMARY

The methods of protein electrophoresis have become indispensable tools in the biochemical study of these molecules. Two methods, the isoelectric focusing (SVENSSON, 1961) and the disc electrophoresis (DAVIS, 1964), have been at the start of the development of several analytical separation micromethods and techniques. Among these, the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and the polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAGIF) have been improved to be more and more resolute and sensitive. These improvements make these new protein electrophoresis methods available for the study of social Insects (even those of the smaller species).

Un des premiers problèmes pratiques qui se pose dans l'étude biochimique des êtres vivants de petite taille est celui de la quantité de matière disponible pour l'expérimentation. Dans certains cas, comme lorsqu'il s'agit de bactéries ou de cellules par exemple, cette difficulté est contournée en travaillant sur une population composée d'un nombre très élevé d'individus et en admettant que tous sont identiques. Quand les organismes à étudier sont des Insectes sociaux, cette approximation n'est plus valable et l'individu n'est souvent pas de taille suffisante pour pouvoir être considéré seul. Dans le cas de sociétés présentant un polymorphisme de taille important, il faut souvent regrouper plusieurs individus des castes les plus petites pour compenser la différence de poids avec un individu unique d'une caste de grande taille, au cours d'expériences comparatives.

Le besoin toujours plus important de pouvoir expérimenter sur des quantités de plus en plus petites de matériel biologique et de pouvoir détecter des molécules présentes à des concentrations très faibles, a favorisé le développement de nouvelles microméthodes en biochimie analytique. Il en a été ainsi dans le domaine des méthodes d'électrophorèse des protéines dont le but commun est de séparer ces macromolécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et structurales. Nous nous proposons ici de présenter brièvement un éventail des possibilités qu'elles offrent à l'heure actuelle.

LES METHODES ELECTROPHORETIQUES UTILISEES POUR LA SEPARATION DES PROTEINES

A partir des deux méthodes de base, la "disc electrophoresis" de DAVIS (1964) et la méthode de focalisation isoélectrique de SVENSSON (1961), plusieurs techniques de séparation monodimensionnelle ont vu le jour et sont devenues d'utilisation courante. Certaines ont été peu à peu perfectionnées en microméthodes analytiques. Ceci a été possible grâce à l'emploi de systèmes de séparation bidimensionnelle et à l'application et la mise au point de techniques de détection des protéines plus sensibles.

Les méthodes de séparation monodimensionnelle

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

Dans son principe elle consiste à faire migrer les macromolécules

protéiques dans un système réticulé (gel obtenu par polymérisation d'acrylamide et de bisacrylamide) soumis à un champ électrique. La séparation des protéines se fait principalement en fonction de leur charge et leur taille. Après migration les protéines sont précipitées dans les mailles du gel par un acide fort et révélées par fixation d'un colorant. Il existe plusieurs variantes (MAURER, 1971):

- les gels neutres (ou normaux) : le gel contient une solution tampon dont le pH est choisi en fonction de la charge que l'on veut conférer aux molécules à séparer. Le gel se divise en un gel de séparation (de concentration élevée) portant un gel de concentration (de concentration plus faible). C'est la méthode de DAVIS (1964).

- les autres types de gels: ils diffèrent des précédents par la présence d'un ou plusieurs additifs et la nature du tampon. Les additifs sont le plus souvent des agents dissociants tels l'urée 8M, un détergent non ionique (Triton X 100) ou un détergent ionique (dodécyl sulfate de sodium = SDS) (LAEMMLI, 1971; WEBER et OSBORN, 1969; HAMES et RICKWOOD, 1981).

Dans tous les cas le gel peut être formé d'une concentration en polyacrylamide unique ou bien variable (gradient). De plus le gel peut être composé de polyacrylamide seul ou d'agarose seul ou d'un mélange des deux (GORDON, 1973).

Plusieurs améliorations ont été apportées à cette méthode. D'une part l'électrophorèse en gels cylindriques a été remplacée en grande partie par des gels en plaques minces, de dimensions plus ou moins grandes (environ 10 x 10 cm à 20 x 30 cm), ce qui permet de comparer directement plusieurs échantillons. D'autre part, la sensibilité de détection a pu être augmentée en diminuant l'épaisseur des gels en plaques (de 3 ou 2 à 1 mm environ).

Parmi les applications directes de cette méthode on peut citer la comparaison qualitative et quantitative d'échantillons, la détermination des masses moléculaires des protéines et de leurs sous-unités par rapport à des étalons de masses connues (WEBER et OSBORN, 1969; SHAPIRO et coll., 1967).

L'isoelectrofocalisation en gel (IEF)

Elle consiste à faire migrer les protéines dans un gradient de pH obtenu, à température constante, par la migration de petites molécules (ampholytes) en milieu liquide ou en gel dont la concentration et la réticulation ne sont pas restrictives. La migration des macromolécules se fait en

fonction de leur point isoélectrique. L'isoélectrofocalisation se faisait initialement en veine liquide (en colonne) et a été transposée plus récemment en gels (en plaques ou cylindriques). Dans ces derniers la fixation et la coloration des protéines ont lieu comme pour les gels d'électrophorèse.

Plusieurs variantes ont été mises au point (RIGHETTI et DRYSDALE, 1979) :

- les gels de polyacrylamide (PAGIF)
 - . en conditions non dissociantes
 - . en conditions dissociantes, avec divers additifs, par exemple
 - urée 9,5M
 - détergent non ionique (Triton X 100, Nonidet P 40)
 - urée 9,5M + détergent non ionique (O'FARRELL, 1975)
- les gels d'agarose
 - . en conditions non dissociantes.

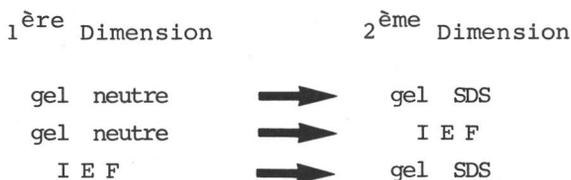
Les améliorations de la méthode ont consisté, d'une part à utiliser des gels en plaques polymérisés sur un support (plaque de verre, feuille de matière plastique) ce qui permet de réduire l'épaisseur des gels et les temps de coloration, et d'autre part à travailler avec de l'agarose ayant une électroendosmose faible.

Plusieurs applications directes sont possibles. L'emploi de gels en plaques facilite la comparaison qualitative et quantitative directe de séries d'échantillons. La détermination du point isoélectrique (pI) des protéines en conditions dissociantes ou non par la mesure directe du pH à l'endroit de migration ou par rapport à des protéines de pI connu est facile et l'homogénéité d'une protéine purifiée peut être estimée.

Les méthodes de séparation bidimensionnelle

Elles combinent l'utilisation de deux méthodes monodimensionnelles dans le but d'augmenter la résolution de la séparation. Si une migration dans une dimension (PAGE ou IEF) peut séparer 50 protéines différentes cela signifie qu'une séparation dans deux dimensions pourrait théoriquement résoudre 50 x 50 soit 2500. Les techniques les plus performantes permettent actuellement de distinguer jusqu'à environ 1500 taches sur les gels (O'FARRELL, 1975; O'FARRELL et coll., 1977; GARRELS, 1979).

Quelques exemples généraux de séparation bidimensionnelle sont :



La première dimension peut être un gel cylindrique ou en plaque alors que la deuxième dimension est obligatoirement en plaque. De même les gels de polyacrylamide, neutres ou contenant des agents dissociants, peuvent être à concentration unique ou variable (gradient). Il faut noter que le gel SDS ne se trouve qu'en deuxième dimension et qu'un gel ne peut porter qu'un seul échantillon.

Les applications directes sont la comparaison qualitative et quantitative des protéines révélées sur différents gels (BOSSINGER et coll., 1979; GARRELS, 1979) et la détermination du pI et du poids moléculaire des sous-unités protéiques dans le système IEF ➔ gel SDS (O'FARRELL, 1975; O'FARRELL et coll., 1977; RIGHETTI et DRYSDALE, 1979).

LES METHODES DE REVELATION DES PROTEINES

L'efficacité des méthodes de séparation électrophorétique ne peut être appréciée qu'en disposant de moyens permettant de détecter les molécules que l'on veut séparer. La mise en évidence des protéines peut se faire avec divers degrés de spécificité suivant la nature des groupements chimiques ou les propriétés (structurales, enzymatiques) des protéines que l'on utilise pour leur détection. Il existe ainsi plusieurs groupes de techniques :

- la coloration (MAURER, 1971; HAMES et RICKWOOD, 1981), par exemple :
 - . des protéines elles-mêmes (noir amide, bleu de Coomassie)
 - . des glucides liés aux protéines (réaction de Schiff)
 - . des lipides liés aux protéines (noir Soudan, Lipid Crimson),
- l'autoradiographie des protéines ayant incorporé un marqueur radioactif:
 - . par exemple un isotope (introduit dans la nourriture de l'Insecte) utilisé lors de la biosynthèse *in vivo* des protéines,
 - . ou un réactif contenant un radioélément (p. ex. l'iode ¹²⁵I) fixé sur les protéines après extraction de celles-ci (HAMES et RICKWOOD, 1981),
- les tests d'activité par exemple :

- . enzymatique : ils nécessitent l'intégrité des protéines enzymatiques et conduisent aux zymogrammes,
- . autres tests permettant de mettre en évidence les protéines étudiées par leurs propriétés particulières.

Les méthodes de révélation des protéines trouvent leurs applications directes dans la détermination de la distribution qualitative et quantitative (densitométrie, mesure de radioactivité, résultat d'un test) des protéines d'un échantillon et la comparaison de plusieurs échantillons entre eux (GARRELS, 1979). Le zymogramme, par exemple, sert lors de l'analyse génétique des espèces.

LES PERFECTIONNEMENT RECENTS DES METHODES DE SEPARATION ET DE REVELATION DES PROTEINES

Afin de pouvoir travailler avec des quantités de plus en plus petites de matériel biologique et d'obtenir de plus en plus d'information sur leur contenu, à la fois les méthodes de séparation et les méthodes de révélation des protéines ont été considérablement améliorées au cours des dernières années.

Un accroissement de la résolution des gels a pu être obtenu :

- en augmentant la pureté chimique des composants des gels (recristallisation de l'acrylamide, préparation extemporanée des solutions et filtration avant emploi),
- en adaptant les dimensions des gels (gels géants 30 x 40 cm, VORIS et YOUNG, 1980; minigels 8 x 10 cm, OGITA et MARKERT, 1979).

La sensibilité des méthodes de révélation a pu être accrue :

- en réduisant les dimensions et l'épaisseur des gels (PAGE et IEF en gels fins de 1 mm à 0,3 mm, RIGHEITTI et DRYSDALE, 1979; HAMES et RICKWOOD, 1981; IEF en microgels de 3 x 3 cm ultrafins de 200 μm à 50 μm d'épaisseur, KINZHOFFER et RADOLA, 1981),
- en travaillant avec des réactifs pouvant être détectés en quantités plus faibles (p.ex. fluorescamine) pour caractériser les protéines,
- en développant de nouvelles méthodes telle la coloration à l'argent (jusqu'à cent fois plus sensible que la coloration classique au bleu de Coomassie). Il en existe déjà, à ce jour, une dizaine de variantes (OCHS et coll., 1981) dont certaines donnent une coloration différentielle des protéines, ce qui fournit une troisième dimension et facilite la compa-

raison des images de séparation (SAMMONS et coll., 1981, MERRIL et coll., 1982).

- en appliquant d'autres méthodes telles les méthodes immunologiques. Un exemple est la technique de transfert sur membrane de nitrocellulose, suivie de révélation immunologique des protéines (TOWBIN et coll., 1979; BOWEN et coll., 1980; JOHNSON et coll., 1982). Elle repose sur le principe du test ELISA (enzyme linked immunosorbant assay) (ENGVALL, 1980) qui consiste à reconnaître les protéines par leur anticorps, puis à fixer un deuxième anticorps, conjugué à un enzyme, sur le premier. La révélation a lieu en faisant la réaction enzymatique qui conduit à la formation d'un produit coloré.

CONCLUSION

Jusqu'à présent l'analyse des protéines par électrophorèse n'a été réalisée que sur quelques Insectes sociaux de taille relativement grande tels les Termites et les grandes et moyennes espèces de Fourmis (HUNG et coll., 1979; WARD, 1980) voire sur des parties du corps (tête, thorax) de Fourmis, d'Abeilles ou de Guêpes (TOMASZEWSKI et coll., 1973; PAMILO et coll., 1978) ou encore sur l'hémolymphe (PASSERA, 1974), mais aucune méthode électrophorétique n'était assez élaborée pour se contenter du peu de matériel que livrent les individus des plus petites espèces (p. ex. les Fourmis des genres *Leptothorax* ou *Plagiolepis*) si l'expérimentation doit se faire sur un seul individu. Actuellement de nouvelles microméthodes de séparation et de révélation des protéines concilient à la fois haute résolution, grande sensibilité, simplicité d'utilisation, rapidité d'exécution, reproductibilité et économie de réactifs.

Plusieurs de ces méthodes analytiques ont été rendues préparatives (GORDON, 1973; RIGHETTI et DRYSDALE, 1979; HAMES et RICKWOOD, 1981). Il ne faut pas oublier qu'il existe encore d'autres méthodes d'électrophorèse qui n'ont pas été décrites ici (comme p. ex. l'immunoélectrophorèse) et que cette courte note n'est pas exhaustive.

De plus des méthodes d'analyse d'autres types de molécules (glucides, lipides, acides nucléiques) ont elles aussi connu un essor au cours des dernières années (p.ex. la chromatographie sur plaque, l'électrophorèse des acides nucléiques, etc.) et s'ajoutent à la liste des outils disponibles pour l'étude biochimique des Insectes sociaux.

Références bibliographiques

- BOSSINGER, J., MILLER, M.J., VO, K.P., GEIDUSCHEK, E.P., XUONG, N.H., 1979.
- *J. Biol. Chem.*, 254 : 7986 - 7998.
- BOWEN, B., STEINBERG, J., LAEMMLI, U.K., WEINTRAUB, H., 1980.- *Nucleic Acids Research*, 8 : 1 - 20.
- DAVIS, B.J., 1964.- *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 : 404 - 427.
- ENGVALL, E., 1980.- *Methods in Enzymology, Academic Press publ.*, 70 : 419 - 439.
- GARRELS, J.I., 1979.- *J. Biol. Chem.*, 254 : 7961 - 7977.
- GORDON, A.H., 1973.- *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels, Elsevier North Holland, Amsterdam*, 258 p.
- HAMES, B.D., RICKWOOD, D., 1981.- *Gel electrophoresis of proteins, Information Retrieval Ltd Press, London*, 290 p.
- HUNG, A.C.F., DOWLER, M.G., VINSON, S.B., 1979.- *Can. J. Genet. Cytol.*, 21 : 537 - 542.
- JOHNSON, M.H., WALKER, R.W.H., KEIR, G., THOMPSON, E.J., 1982.- *Biochem. Soc. Trans.*, 10 : 32 - 33.
- KINZHOFFER, A., RADOLA, B.J., 1981.- *Electrophoresis*, 2 : 174 - 183.
- LAEMMLI, U.K., 1971.- *Nature*, 217 : 680 - 685.
- MAURER, H.R., 1971.- *Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis, W. de Gruyter, Berlin*, 222 p.
- MERRIL, C.R., GOLDMAN, D., VAN KEUREN, M.L., 1982.- *Electrophoresis*, 3 : 17 - 23.
- OCHS, D.C., Mc CONKEY, E.H., SAMMONS, D.W., 1981.- *Electrophoresis*, 2 : 304 - 307.
- O'FARRELL, P.H., 1975.- *J. Biol. Chem.*, 250 : 4007 - 4021.
- O'FARRELL, P.Z., GOODMAN, H.M., O'FARRELL, P.H., 1977.- *Cell*, 12 : 1133 - 1142.
- OGITA, Z., MARKERT, C.L., 1979.- *Analytical Biochemistry*, 99 : 233 - 241.
- PAMILO, P., ROSENGREN, R., VEPSALAINEN, K., VARVIO - AHO, S.L., PISARSKI, B., 1978.- *Hereditas*, 89 : 233 - 248.
- PASSERA, L., 1974.- *Insectes Sociaux*, 21 : 71 - 86.
- RIGHETTI, P.G., DRYSDALE, J.W., 1979.- *Isoelectric focusing, Elsevier North Holland, Amsterdam*, 585 p.

- SAMMONS, D.W., ADAMS, L.D. NISHIZAWA, E.E., 1981.- *Electrophoresis*, 2 : 135
- 141.
- SHAPIRO, A., VINUELA, E., MAIZEL, J., 1969.- *Analytical Biochemistry*, 29 :
505 - 514.
- SVENSSON, H., 1961.- *Acta Chem. Scand.*, 15 : 325 - 335.
- TOMASZEWSKI, E.K., SCHAFFER, H.E., JOHNSON, F.M., 1973.- *Genetics*, 75 : 405
- 421.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J., 1979.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
76 : 4350 - 4354.
- VORIS, B.P., YOUNG, D.A., 1980.- *Analytical Biochemistry*, 104 : 478 - 484.
- WARD, P.S., 1980.- *Evolution*, 34 : 1060 - 1076.
- WEBER, K., OSBORN, M., 1969.- *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406 -4412.