

Tome 64

fascicule 2

Février 1995

Abonnement 150 F — Le numéro 25 F

ISSN 0366-1326

**BULLETIN MENSUEL**  
DE LA  
**SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON**

**Siège social : 33 rue Bossuet, F 69006 LYON**

Rédaction : P. BERTHET

61 11

1995/2

4A38

4112

# Emploi des gels de polyacrylamide à gradient en systématique et en écophysiologie. Principes et mode opératoire

*Jean-Loup d'Hondt*

Laboratoire de Biologie des Invertébrés Marins et Malacologie, U.R.A. 699 du C.N.R.S.,  
Muséum National d'Histoire Naturelle, 57 rue Cuvier, F - 75231 Paris Cedex 05.

Résumé. — Considérations théoriques sur l'usage des gels de polyacrylamide à gradient pour la résolution de problèmes taxinomiques et écophysiologiques. Description de la pratique opératoire.

## Utilization of polyacrylamide gradient gels in taxonomy and ecophysiology

Summary. — Theoretical considerations on the utilization of polyacrylamide gradient gels to resolve taxonomical and ecophysiological problems. Description of the practice.

### INTRODUCTION

Nous menons depuis 1980 un programme de recherche en systématique, phylogénie et écophysiologie portant sur les Bryozoaires marins et utilisant les méthodes électrophorétiques, employant comme substrat de migration les gels de polyacrylamide à gradient ; les principaux apports en ont été récapitulés par D'HONDT *et al.* (1991). La découverte progressive et empirique des avantages, des inconvénients et des limites de la méthodologie employée nous a conduit à améliorer la technique opératoire, maintenant utilisée depuis plusieurs années en routine au laboratoire. Par la suite, cette technique a été testée puis appliquée avec succès sur différents autres matériels biologiques (marins, dulcicoles et terrestres appartenant à plusieurs embranchements). Les chercheurs qui ont découvert l'intérêt de la méthode, ses finalités et sa fiabilité nous ont invité à la codifier et à la publier ; cette note répond à leur demande.

L'étude électrophorétique conduite sur gels de polyacrylamide à gradient implique plusieurs phases successives ; certaines de ces dernières sont communes aux différentes approches électrophorétiques :

1. la préparation du matériel biologique (D'HONDT *et al.*, 1989).

2. le choix des systèmes enzymatiques testés en fonction du problème biologique à résoudre. Certains de ces systèmes, peu ou non inductibles, sont en effet plus significatifs de l'expression du patrimoine génétique des spécimens étudiés, d'autres traduisant les modulations de l'expression des gènes sous par exemple l'influence des conditions de l'environnement.

3. le choix de la méthode de révélation d'un système enzymatique donné, ce qui amène à tester sur un matériel biologique déterminé plusieurs formules de réactifs, afin de choisir celle qui est la plus sensible et efficace pour ce système chez les organismes considérés et éventuellement d'en modifier la composition ou la durée d'action.

4. le choix des conditions de la migration ; pour une faible intensité de courant, la séparation des protéines est moins efficace, même si on allonge la durée de la migration. La date de péremption indiquée par le fabricant est fréquemment trop limitative, un gel continuant à être utilisable avec la même fiabilité bien au delà, tant que le produit de conservation dans lequel il baigne n'est pas évaporé.

5. la lecture des résultats est plus ou moins aisée selon le pouvoir séparateur du gel ; d'autre part, et pour un même intervalle théorique de porosité à l'intérieur du gel, l'écartement et la répartition des bandes obtenues varient selon la marque de commercialisation. Aussi les résultats acquis pour un extrait protéique donné varient-ils selon le fabricant du gel ; la nécessité d'obtention de résultats susceptibles d'être comparés implique que l'expérimentateur reste fidèle pendant toute la durée d'une manipulation, et même si elle s'étend sur plusieurs années, à une type donné de gel et à une marque commerciale donnée.

6. l'interprétation des résultats. La méthode utilisée a été exposée en détail par D'HONDT et GOYFFON (1989) au travail desquels nous renvoyons.

Les caractéristiques générales des migrations sur gels de polyacrylamide à gradient de porosité, avec ou sans intervention d'un détergent facilitant la dissociation (SDS), ont été décrites par FINE (1985) et dans l'ouvrage de CHARLIONET et RIVAT (1990). Les suspensions de protéines à étudier sont placées au dessus de la partie du gel (vertical) où l'acrylamide est le moins concentré et ménage des pores plus larges ; sous l'influence du champ électrique auquel elles sont soumises, elles pénètrent dans le gel et le traversent de plus en plus profondément jusqu'à ce que le diamètre des pores empêche la poursuite de leur déplacement.

La préparation des gels de polyacrylamide à gradient de porosité, disponibles sous forme de cassettes prêtes à l'emploi dans le commerce, est standardisée ; les résultats sont généralement très reproductibles. En cas de préparation par l'utilisateur, il est difficile de réaliser successivement plusieurs gels rigoureusement identiques les uns aux autres, ce qui est à l'origine de problèmes d'interprétation et d'alignement des bandes ; aussi est-il préférable d'acquérir ses gels dans le commerce. Le pouvoir séparateur le plus élevé est obtenu par les gels de la gamme de porosité 4/30 ; le pouvoir discriminant est moindre pour les gels d'intervalle de porosité plus réduit. Le calcul des poids moléculaires des protéines séparées sur les gels de polyacrylamide à gradient est plus facile lorsque le fabricant a joint une abaque permettant d'établir une corrélation entre la masse de la

molécule et sa distance de migration ; l'absence de cette abaque chez certains fabricants nécessite alors de faire migrer à côté de l'échantillon étudié une suspension de protéines de référence de poids moléculaires prédéterminés.

#### PRINCIPES DE LA MÉTHODE

L'électrophorèse consiste en une migration de protéines, corps amphotères, dans un champ électrique. La rapidité de migration des protéines contenues dans un extrait traité dépend de l'intensité du champ électrique, les protéines les moins chargées se déplaçant plus lentement en direction de l'électrode correspondante.

Dans un gel de porosité homogène (d'amidon ou d'acrylamide), la progression des protéines est indéfinie (jusqu'à la sortie du gel de migration), ce qui nécessite une surveillance fréquente de la manipulation et son arrêt avant le passage, et la perte, des premières protéines migrées dans le tampon baignant le gel ; la surveillance est facilitée par le suivi d'une molécule colorée migrant avec le front de migration. Sur ce type de gels, les bandes protéiques sont séparées en fonction de leur charge électrique ; aussi n'obtient-on souvent qu'un nombre réduit de bandes, puisque chacune d'entre elles peut correspondre à la juxtaposition en une même tache de protéines de composition et de masse moléculaire différentes, mais de même charge électrique ; mais le nombre réduit de ces bandes favorise la possibilité de donner une interprétation génétique des phénogrammes obtenus (équilibres mendéliens, loi de Hardy-Weinberg). Si l'expérience est menée sur un nombre élevé d'échantillons étudiés séparément, les résultats statistiques obtenus peuvent permettre de conclure en une absence d'hybridation entre deux phénotypes sympatriques, ou d'en déduire l'appartenance de ces deux phénotypes à deux espèces distinctes et interstériles (PASTEUR *et al.*, 1987).

Dans un gel de polyacrylamide à gradient de porosité, le champ électrique intervient essentiellement comme agent de migration des protéines, mais est sans effet sur le phénogramme final obtenu au terme de la migration. Le déplacement des protéines, sauf de celles de poids moléculaires très bas, n'est pas indéfini, mais limité par leur encombrement moléculaire (dimensions des protéines et complexité de leur morphologie spatiale). La porosité du gel étant décroissante, les premières molécules dont la migration est interrompue sont les plus volumineuses de celles que contenait l'extrait initial étudié, généralement aussi celles à plus haute masse molaire ; les protéines à petites molécules et à masse molaire plus réduite migreront sur une plus grande distance, jusqu'à ce que le diamètre des pores du gel bloque à leur tour leur déplacement ; seules les très petites molécules passeront alors dans le gel. Le nombre des bandes obtenues pourra être plus élevé (et parfois beaucoup plus) que dans le cas des gels à porosité homogène, et il est donc alors difficile de rattacher une bande donnée à un allèle donné, et par suite d'entreprendre sur de tels phénogrammes des études de génétique classique. L'intérêt des gels à gradient est de permettre la comparaison de populations considérées globalement, à l'aide de protéinogrammes et de zymogrammes totaux résultant du broyage collectif de nombreux individus d'une même population ou du mélange d'extraits ponctionnés chez différents individus de même patrimoine génétique.

Si la migration est effectuée sur les gels à gradient de porosité standardisée, à pores de diamètre calibré, une même bande sera toujours stoppée au même endroit du gel, et sera donc caractérisée par une distance constante de migration qu'il sera facile de mesurer en valeur absolue à l'aide d'un densitomètre, bien qu'un simple double-décimètre puisse suffire (la manipulation est moins « lourde » que celle qui implique le calcul des Rf, à partir d'une bande de référence affectée du coefficient 100, dans le cas des phénogrammes obtenus lors des migrations sur les gels de porosité homogène). Il sera alors possible de calculer le poids moléculaire de chaque protéine à son niveau de stabilisation par comparaison avec des protéines-témoins mises à migrer avec elle, ou d'une abaque fournie par le fabricant ; les résultats seront parfaitement reproductibles. Dans un tel cas, le nombre des bandes protéiques séparées peut être très élevé, pouvant dépasser la vingtaine, ce qui exclut alors l'interprétation génétique quantitative intra-population. En revanche, si l'extrait initial est issu du broyage en commun de plusieurs dizaines d'individus d'une même population (et a plus forte raison si celle-ci a été reconnue comme génétiquement homogène par des études préalables individu par individu sur des gels de porosité constante), il sera suffisamment représentatif de l'ensemble de la diversité génétique de cette population ; il pourra alors être comparé à un autre extrait obtenu dans les mêmes conditions à partir d'une autre population. On pourra ainsi suivre, en fonction de l'éloignement géographique des populations ou de la variation des paramètres écologiques dans l'espace et dans le temps, l'évolution de telle bande ou de telle association de bandes ; des différences selon le cycle biologique des individus peuvent aussi être ainsi révélées. Même si les populations étudiées sont hétérogènes, et consistent en la coexistence de plusieurs espèces cryptiques, l'absence totale de bandes en commun pour un ou plusieurs systèmes enzymatiques témoigne de l'absence d'interfécondité entre elles (il conviendra alors d'étudier leur statut systématique l'une par rapport à l'autre).

Dans le cas des gels à gradient de porosité, le phénogramme obtenu pour chaque système enzymatique correspond à la « photographie » d'une population donnée à un instant donné, et pourra donc être un peu différent à une autre période, dans d'autres conditions écologiques, ou à une phase différente du cycle physiologique ou du développement. Chaque phénogramme exprime en théorie l'influence des facteurs génétiques, mais celle-ci peut être modulée par l'impact de paramètres internes ou externes. Des expériences de transplantations croisées (d'HONDT et GOYFFON, 1994) ont montré que les profils obtenus pour certains systèmes enzymatiques demeuraient inaltérés, ne traduisant que l'expression phénotypique des gènes, et étaient donc à utiliser en priorité dans le cas d'une étude plus spécialement génétique ; d'autres systèmes sont inductibles, les uns très modérément (et peuvent donc être d'un emploi à des fins essentiellement génétiques, comme les précédents), les autres considérablement (et étant donc à choisir dans le cadre d'une étude portant sur l'influence des facteurs de l'environnement, révélant des effets de stress ou une réaction à une modification des conditions écologiques). Sur la trentaine de systèmes enzymatiques utilisés en routine au laboratoire sur les gels à gradient, 11 ont pour le moment été testés ; 2 ont été identifiés comme exprimant le patrimoine génétique, 6 comme peu inductibles, 3 comme très inductibles.

### 1 — Conservation du matériel biologique

Les échantillons sont conservés sans problème pendant au moins un an et demi au congélateur à  $-25^{\circ}\text{C}$  -  $-30^{\circ}\text{C}$ . A une température un peu inférieure à  $0^{\circ}\text{C}$ , l'altération du matériel débute à partir de 3-3,5 semaines. Un matériel (bien) lyophilisé se conservera durant plusieurs mois avant perte progressive de l'activité enzymatique avec le temps.

### 2 — Choix des gels

L'expérience nous a amené à préférer les gels de polyacrylamide à gradient PAA 4/30. Quatre gels sont traités parallèlement. Il est à déconseiller d'entreprendre plus de 4 migrations simultanément, vu la longueur de l'interprétation finale.

### 3 — Matériel

Il est laissé au choix de l'expérimentateur, qui peut préférer un appareil à réglage des paramètres opératoires manuel ou automatisé.

### 4 — Organisation du travail

Début de la migration la deuxième matinée ; arrêt de la migration en début du troisième après-midi. Préparation des réactifs le premier jour et le deuxième après-midi. Préparation de la verrerie pour coloration la troisième matinée. Coloration (avec fin de préparation des colorants à conservation nulle) et interprétation le troisième après-midi.

### 5 — Choix du tampon de migration (tampon unique circulant dans les deux cuves, inférieure et supérieure) :

Tampon de Davis (1964) : tampon tris-glycine, de composition suivante. Solution stock (pH 8,3) : 6 g de Tris, 28,8 g de glycine, qsp. H 20 jusqu'à un litre. Conserver à  $4^{\circ}$  (conservation : plusieurs mois) ; diluer à 10 % lors de l'emploi. Le tampon fonctionnel peut être réutilisé plusieurs fois.

### 6 — Dépôt du matériel biologique

Si le matériel est peu abondant, l'introduire à la pipette dans les puits de la galerie de migration (de préférence, pour éviter les mélanges accidentels, ne traiter qu'une seule population par galerie). S'il est abondant, il suffit de le déposer à la partie supérieure du gel, entre les plaques de verre de la cassette, sans emploi de galerie, sur toute la longueur (ce qui correspond à un gain de temps considérable si l'extrait est visqueux).

### 7 — Durée de la migration

Une durée de 16 h 30 est insuffisante, les protéines n'étant pas encore complètement stabilisées dans le gel, aussi convient-il de les laisser migrer un minimum de 18 h, et par prudence environ 24 h (surtout si l'extrait analysé est pauvre en protéines et de ce fait moins conducteur). La migration s'effectue à la température ambiante du laboratoire, en proscrivant toutefois tout endroit trop chaud ou ensoleillé, même si une différence de quelques

degrés en plus ou en moins est sans incidence. Si quatre gels sont traités en parallèle, une durée de 18 h correspond à des paramètres opératoires optimaux de départ égaux ou supérieurs à 40 milhampères et 120 volts. La migration est à surveiller régulièrement, surtout durant la première heure où l'intensité du courant est susceptible de variations, pouvant aller jusqu'à faire disjoncter l'appareil d'alimentation. Toute coupure d'électricité nécessite l'accroissement en conséquence de la durée opératoire.

## 8 — Coloration

Pour révéler les protéinogrammes totaux, le temps d'immersion du gel dans le bleu de Coomassie ou l'amido black est d'une heure et demie. La décoloration est plus rapide dans les appareils automatiques (de 1 à 2 h) que dans les bacs d'acide acétique laissés sur la paillasse à la température du laboratoire (3 jours), les deux méthodes étant aussi efficaces quant au résultat final.

Pour la révélation enzymatique, aucune formule « standard » n'est plus spécialement à recommander a priori. Selon le matériel biologique utilisé, le colorant le plus efficace pour révéler un système enzymatique donné aura une composition différente. Aussi convient-il de rechercher la formule optimale au coup par coup, en tentant sa chance pour commencer à partir des compositions indiquées dans un travail de référence, comme par exemple celui de SHAW et PRASAD (1970).

Certains constituants des colorants sont parfois susceptibles de se dégrader très rapidement, ce qui nécessite de les conserver au froid en flacons fermés et en évitant toute intrusion d'humidité (le succès ou l'échec de nombreuses manipulations peuvent être tributaires de l'état de fraîcheur du PMS, qui peut s'altérer subitement sur un laps de temps de quelques jours, même au réfrigérateur).

Chaque révélation colorée d'un système enzymatique donné s'effectue à une température optimale, qui selon la coloration choisie est soit de 4 °C, soit de 37-38 °C, certaines révélations nécessitant des changements successifs de température.

Suivant les systèmes enzymatiques, la durée de conservation du colorant fonctionnel (qui, une fois préparé, est conservé à 4 °C) varie de quelques minutes à plusieurs semaines ; elle est pour la plupart d'entre eux de l'ordre de 2-4 jours. Aussi, à l'exception des tampons qui peuvent être préparés sans inconvénient plusieurs semaines à l'avance, est-il recommandé de ne pas préparer ses colorants plus d'une demi-semaine à l'avance, l'expérience montrant ceux qui ont une durée d'efficacité plus brève. Le colorant pour les protéinogrammes peut quant à lui être conservé au réfrigérateur durant plus d'un an sans altération. Il est très pratique de découper, avant coloration, le gel à gradient en une quinzaine de lanières parallèles à la lame à rasoir (l'opération est plus délicate au scalpel, mais moins dommageable pour l'épiderme de l'expérimentateur), lanières dont chacune (par souci d'économie du colorant) sera colorée dans un tube à essais. Aussi peut-on révéler une quinzaine de systèmes enzymatiques par gel à partir du même extrait initial. La coloration dure en moyenne trois heures, mais peut être précédée d'un mordantage ; elle peut être beaucoup plus rapide pour les estérases non spécifiques, seule coloration prenant même à la température ambiante, au

point d'être parfois déjà d'une intensité telle au bout de 90 minutes que la lecture du gel en est devenue impossible.

## 9 — Interprétation

Il convient de différencier l'interprétation qualitative de l'interprétation quantitative, qui ne livrent respectivement pas les mêmes résultats, et qui se complètent mutuellement. L'interprétation qualitative considère l'évolution et le remplacement les unes par les autres d'associations de bandes et leurs localisations (plus précises dans les cas rares mais favorables où l'on connaît la protéine ou la sous-unité étudiées), ainsi que la variabilité au sein de ces groupes, révélant par exemple un cline ou une corrélation avec une pression sélective de l'environnement. L'interprétation quantitative, fondée sur la comparaison de coefficients de similarité (le plus utilisé étant celui de Sørensen), permet de comparer des spécimens deux à deux. Les limites d'utilisation du coefficient de Sørensen ont été discutées par HOUZELOT (1993), qui a montré que ce coefficient ne tient pas compte de l'aspect général des zymogrammes et peut masquer certains clines ; d'autre part, il ne tient compte que de l'alternative présence/absence d'une bande, et son mode de calcul amplifie parfois artificiellement les différences entre phénogrammes.

## RÉSULTATS ET PERSPECTIVES

### 1 — Généralités

Différentes voies de recherche ont actuellement été abordées fructueusement par l'emploi des gels de polyacrylamide à gradient de porosité :

— discrimination d'espèces cryptiques ou d'isolats génétiques intraspécifiques, confirmation de monospécificités.

— détermination d'une variabilité intraspécifique, génétique, géographique, clinale entre deux barrières géographiques naturelles, ou sous l'influence des paramètres de l'environnement.

— reconnaissance d'affinités interspécifiques.

— corrélation entre comportement électrophorétique des adultes et biologie ou capacités de dispersion larvaires ; mise en évidence de différences biologiques entre espèces paraissant occuper la même niche écologique.

— Identification de directions évolutives et apport d'informations phylogénétiques.

— Comparaison des diversités génétiques d'espèces cohabitantes.

— Mise en évidence de l'évolution indépendante des systèmes enzymatiques, même le long d'un cline, chez des populations intraspécifiques d'espèces à distribution géographique discontinue.

— Identification de marqueurs de populations, dont la connaissance permet par déduction des études écologiques et plus précisément sur les relations entre l'organisme et son milieu.

— Mise en évidence d'effets de stress stéréotypés, sous l'influence de différents facteurs perturbateurs ou nocifs, et d'adaptations à l'environnement.

— Confirmation de l'existence des catégories taxinomiques de la systématique évolutive.

- Détection d'hybrides.
- Détection d'introductions ou de l'arrivée d'espèces immigrantes.
- Reconnaissance d'un état physiologique, d'un stade de développement ou du sexe.
- Etude de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité de sous-unités monomériques.
- Détermination de la fiabilité et de l'intérêt respectifs des systèmes enzymatiques en écophysiologie et en génétique.

## 2 — Résultats obtenus dans le cas des Bryozoaires

C'est lors d'études portant sur les Bryozoaires que ces méthodes ont été le plus largement testées ; elles y ont permis de résoudre plusieurs des catégories de problèmes abordées au paragraphe précédent ; les autres problèmes soulevés ci-dessus ont été étudiés sur d'autres types de matériels biologiques, notamment des Arthropodes. Les quelques résultats résumés ci-après présentent les données essentielles présentées dans une vingtaine de publications parues ou acceptées pour publication auxquelles nous invitons le lecteur à se reporter.

— Confirmation de la discrimination de deux « espèces jumelles » sur les côtes françaises, *Alcyonidium polyoum* et « *A. mytili* ».

— Mise en évidence en Europe d'un complexe de 4 espèces cryptiques, géographiquement isolées les unes des autres, sous le nom général d' « *A. mytili* » ; certaines associations de bandes sont des constantes spécifiques diagnostiques, marquant une population donnée, d'autres sont des caractéristiques des populations intraspécifiques d'une aire géographique donnée.

— Chez *A. polyoum*, espèce à répartition presque continue sur les côtes européennes, mais dont l'aire de distribution est interrompue par des barrières géographiques naturelles (Gironde + plages sableuses du Golfe de Gascogne + embouchure de la Bidassoa ; embouchure de la Loire ; delta du Rhin ; Manche ; Kattegat), on observe une variation clinale entre deux barrières géographiques données, et des discontinuités dès le franchissement de l'une d'entre elles.

— Les discontinuités observées chez *A. polyoum* sont d'autant plus marquées que la barrière géographique est importante ou ancienne ; ainsi les populations de Galice sont-elles très différentes de celles de Bretagne, et celles de Norvège de celles du Danemark.

— Une population d'*A. polyoum* en cours de spéciation très avancée s'est différenciée dans une petite baie du Pays de Galles, intercalée dans l'aire de distribution de la forme normale de l'espèce. Cette localité a pu avoir été écologiquement isolée durant une certaine période géologique par un estuaire, dont le tracé se serait ensuite légèrement modifié, occasionnant un isolement génétique de la population considérée. Cette population a été élevée au rang de *vicespecies* et *A. polyoum* à celui de *superspecies*. Plusieurs autres populations entrent indiscutablement dans différentes autres catégories taxinomiques de la systématique évolutive (d'Espagne et de Norvège notamment).

— L'étude électrophorétique révèle qu'*A. polyoum*, espèce habituellement intercotidale, et « *A. mytili* », espèce normalement infralittorale, peuvent exceptionnellement cohabiter sur un même substrat en zone infralittorale

(Portsmouth) ; la forme française d' « *A. mytili* » a exceptionnellement été récoltée en région intercotidale (Bassin d'Arcachon, Luc-sur-Mer).

— *A. hirsutum*, qui cohabite avec *A. polyoum* sur les mêmes substrats, mais dont les exigences écologiques sont un peu différentes (préférence pour des faciès plus battus), représente un complexe d'une dizaine d'espèces cryptiques sur les côtes européennes, séparées par des barrières géographiques naturelles.

— *Electra pilosa* et *Flustrellidra hispida* sont fréquemment associées à *A. polyoum* et à *A. hirsutum* sur les mêmes substrats, tout en préférant des milieux très battus ; leur biologie larvaire est par ailleurs différente de celle des deux *Alcyonidium* (métamorphose presque immédiate et effectuée *in situ* chez ces derniers, tardive après plusieurs jours — *Flustrellidra* (lécitotrophe) — ou plusieurs semaines — *Electra* (planctotrophe) — de vie libre chez les deux autres). *E. pilosa* et *F. hispida* présentent une capacité de brassage génétique de proche en proche le long des côtes européennes, avec modification lente et progressive des phénogrammes en fonction de la distance, et absence d'allèles communs aux deux extrémités de l'aire de distribution (Bretagne ; nord de la Norvège).

— *A. gelatinosum*, espèce benthique infralittorale, présente comme *A. mytili* une distribution discontinue sur les fonds côtiers européens. Les recherches électrophorétiques entreprises ont montré qu'il présentait plusieurs isolats génétiques qui sont au moins des cas de spéciation en cours, et ont confirmé la validité d'*A. topsenti* en tant qu'espèce valable.

— Pour plusieurs des espèces étudiées, les protéinogrammes et les zymogrammes des populations situées à la limite de leurs conditions de survie dans les régions septentrionales de l'Europe sont dépourvus des fractions protéiques de poids élevé.

— Une nouvelle population récemment implantée dans le port de Dinard présente des zymogrammes très différents de ceux des autres populations locales étudiées, d'implantation plus ancienne ; ceci témoigne d'une origine exogène indéterminée, dont il n'est pas à exclure qu'elle puisse être ultérieurement à l'origine d'une pollution génétique (inédit).

— Des expériences de transplantations croisées de plus de 6 mois entre le nord et le sud de la Bretagne portant sur deux espèces, *A. polyoum* et *A. hirsutum*, ont permis de comparer les zymogrammes des spécimens déplacés avec ceux d'échantillons demeurés *in situ* dans les deux stations d'origine, tous ayant été collectés à la même période. Certains des profils électrophorétiques ont été identiques dans tous les cas, ce qui signifie que les systèmes enzymatiques correspondants traduisent fidèlement l'expression du patrimoine génétique ; d'autres ont présenté différentes variations, soit peu marquées (portant sur environ 5 % des bandes), soit très accentuées (de l'ordre de 50 % ou davantage) ; ces derniers phénogrammes, correspondant à des systèmes enzymatiques très inductibles, expriment davantage l'influence des facteurs de l'environnement et mettent donc mieux en évidence l'influence des paramètres écophysiologiques.

— Chez *A. polyoum*, des populations différentes soumises naturellement à des conditions écologiques contraignantes (dessalure, agitation du milieu) présentent pour certains systèmes enzymatiques-cibles la même modification du phénogramme. Celle-ci est interprétée comme une réponse commune non spécifique à des effets de stress différents.

— Chaque colonie d'*Alcyonidium* renferme simultanément, en des proportions variables selon les localités et les saisons, des individus fonctionnels, en reproduction, incubants, en dégénérescence et en régénération. Si les phénogrammes ne sont pas modifiés qualitativement d'une saison à une autre, l'intensité de certaines des bandes est variable en cours d'année. Aussi est-elle certainement fonction de l'état physiologique moyen de la colonie.

— Si l'on considère sur un segment de littoral plusieurs populations successives d'*A. polyoum* distantes de quelques dizaines de kilomètres, on se rend compte que chez l'une les différences affectent plutôt tel système enzymatique donné, chez l'autre tel autre système. Ces observations sont interprétées comme témoignant de l'évolution indépendante de chaque système enzymatique d'une population déterminée par rapport aux autres systèmes de cette même population.

### 3 — Remarques

Les techniques d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide à gradient offrent également d'autres applications et perspectives de recherche incomplètement explorées (par exemple les révélations immunochimiques ou l'emploi de conjugués fluorescents). Ainsi l'électrophorèse bidimensionnelle fait-elle appel depuis plusieurs années, en seconde dimension, aux gels de polyacrylamide à gradient. L'introduction récente des colorations à l'argent, plus sensibles que celles au bleu de Coomassie, et en particulier précisément en électrophorèse bidimensionnelle, a ouvert un nouveau champ de recherche, surtout développé pour le moment en pathologies humaine et animale, en permettant la détection d'anomalies génétiques ou symptomatiques d'une maladie.

Parmi les inconvénients de cette méthode, il faut surtout mentionner la longue durée de la manipulation, la contrainte de la préparation fréquente des réactifs, la nécessité de travailler de manière routinière dans les mêmes conditions matérielles, le tâtonnement préalable à la découverte de la formule de coloration optimale pour un matériel biologique donné, l'impossibilité dans de nombreux cas de donner une interprétation des résultats en termes de génétique classique, l'insatisfaction liée à l'emploi du coefficient de similarité classiquement utilisé. Les avantages majeurs en sont la fiabilité de la méthode, la reproductibilité des résultats, l'utilisation de gels standardisés prêts à l'emploi, la facilité de lecture des gels et de mesure des valeurs numériques obtenues, la possibilité de travailler globalement sur l'ensemble du patrimoine génétique d'une population, la richesse des informations qui en font une approche très puissante des phénomènes de variation clinique et écologique, la faculté de révéler de nombreux systèmes enzymatiques à partir d'un même extrait protéique, la diversité des systèmes enzymatiques mis en évidence.

Remerciements. — Il nous est agréable de témoigner notre sincère gratitude au Dr. M. GOYFFON (L.E.R.A.I., Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, et Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, Grenoble) qui nous a fait l'amitié de se livrer à une lecture constructive de ce texte avant son envoi pour publication.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHARLIONET R. et RIVAT C., 1990. — *Electrophorèse. Principes et concepts méthodologiques*. INSERM, Paris, 255 p.
- FINE J.M., 1985. — Méthodes électrophorétiques et immunochimiques utilisées dans l'abord de la structure d'une protéine et pour des études comparatives en taxonomie. In : *Electrophorèse et Taxonomie*. Goyffon et d'Hondt eds., Société Zoologique de France, *Mém.* 42, p. 15-39.
- HONDT J.-L. d' et GOYFFON M., 1989. — New data on the intraspecific variability of *Alcyonidium polyoum* (Hassall, 1841), Bryozoa : Ctenostomida, studied with gradient polyacrylamide gels. In : *Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms*. Ryland et Tyler eds., Olsen & Olsen, Fredensborg ; p. 273-282.
- HONDT J.-L. d' et GOYFFON M., 1994. — Experimental transplantations of Bryozoa : utilization of electrophoretic techniques to show environmental factors. In : *Biology and Paleontology of Bryozoans*, Ryland et Hayward eds., Olsen & Olsen, Fredensborg (sous presse).
- HONDT J.-L. d', GOYFFON M. et QUEINNEC E., 1991. — Contributions des techniques électrophorétiques à la connaissance de la systématique des Bryozoaires. In : *Bryozoaires actuels et fossiles : Bryozoa living and fossil*. Bigey et d'Hondt eds., Société d'Histoire Naturelle de l'Ouest de la France, *Mém. H.S.* 1, p. 169-177.
- HONDT J.-L. d' et al., 1989. — Electrophorèse et Systématique. *Bull. Soc. zool. Fr.*, 114 (2) : 61-83.
- HOUELOT L., 1993. — Nouvelles observations sur la variabilité intraspécifique d'*Alcyonidium polyoum* (Hassall, 1841), Bryozoaires, Ctenostomes. *Bull. Soc. zool. Fr.*, 118 (4) : 409-423.
- PASTEUR N. et al., 1987. — Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Lavoisier, Paris, 217 pp.
- SHAW C.R. et PRASAD R., 1970. — Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. genetics*, 4 : 297-320.

tsillob  
gnatib  
is enis  
-emolq  
pifolat  
tegnob  
strenay  
zocem  
olunob  
difficior  
zocret  
et. soul  
diffidat  
tabulat  
ambler  
affiance  
hip am  
dlectib  
é zemp  
pouplb