

RÉPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

MINISTÈRE
DE LA PRODUCTION ANIMALE

**CENTRE DE RECHERCHES
OCÉANOGRAPHIQUES**



J. C. BARON

**ETUDE PRÉLIMINAIRE
DES PROTÉINES DU CRISTALLIN
DE DEUX ESPÈCES DE SARDINELLES**

(Sardinella aurita C. V., Sardinella eba C. V.)

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
MINISTERE DE LA PRODUCTION ANIMALE

OFFICE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE & TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE DE RECHERCHES OCEANOGRAPHIQUES
B.P. V 18 - ABIDJAN

ETUDE PRELIMINAIRE
DES PROTEINES DU CRISTALLIN DE DEUX ESPECES DE SARDINELLES
(*Sardinella aurita* C.V., *Sardinella eba* C.V.)

par

J.C. BARON
Océanographe Biologiste

R E S U M E

Une analyse électrophorétique, immunoélectrophorétique et immunologique d'extraits de cristallins de Sardinelles a été effectuée afin d'étudier la possibilité d'utiliser ce matériel dans la recherche des différentes races de sardinelles.

L'analyse électrophorétique révèle 10 fractions dont certaines pourraient donner lieu à un polymorphisme et l'analyse immunoélectrophorétique révèle au moins sept arcs de précipitation.

A B S T R A C T

Electrophoretic, immuno-electrophoretic and immunologic analysis of Sardinelles eye-lens proteins has been done to know if this materiel would be favourable for racial research.

Ten fractions have been disclosed by electrophoresis and seven precipitation lines with immunoelectrophoretic analysis.

S O M M A I R E

1. - GENERALITES

2. - MATERIEL ETUDIE

2. 1. - Les Sardinelles

2. 2. - Les extraits de cristallin

3. - TECHNIQUE

3. 1. - Analyse électrophorétique

3. 2. - Analyse immunoélectrophorétique

3. 3. - Identification des fractions

3. 4. - Analyse immunologique

3. 5. - Obtention d'immunsérums anti-cristallin

4. - RESULTATS

4. 1. - Analyse électrophorétique

4. 2. - Analyse immunoélectrophorétique

4. 3. - Analyse immunologique

5. - CONCLUSION

I - GENERALITES

1-1 - Choix du Matériel:

Le cristallin occupe une place privilégiée dans l'organisme et ses particularités biologiques en font un matériel de choix pour des études biochimiques débouchant sur des problèmes importants de phylogénie, de polymorphisme ou de génétique.

Les protéines du cristallin sont synthétisées par un seul type de cellule alors que les protéines du sérum sont synthétisées par des cellules de types différents; ces protéines de composition complexe se trouvent en forte concentration dans le cristallin et le pourcentage des protéines solubles est élevé (25%). Les protéines cristalliniennes peuvent être réparties en deux groupes:

1. - Les albuminoïdes, insolubles
2. - Les cristallines, solubles

ces dernières sont classiquement divisées en trois en fonction de leur mobilité électrophorétique: l' α cristalline, la β cristalline et l'albumine.

Deux autres particularités sont propres au cristallin. Tout d'abord il est inclus dans une capsule fibreuse dense, imperméable aux grosses molécules et il est nourri par un mécanisme non vasculaire par les humeurs aqueuse et vitrée. Ensuite sa croissance se fait en compressant vers le centre le matériel ancien pour former le nucléus qui enregistre ainsi l'évolution de sa composition au cours de la vie.

Du point de vue immunologique les protéines du cristallin sont antigéniques, elles constituent une des exceptions (avec les substances du cerveau et le sperme) à la règle de tolérance d'un organisme à ses propres constituants. Cette antigénicité marquée permet de préparer un antisérum contre le cristallin de n'importe quelle espèce de vertébré, cet antisérum donne toujours une réaction de précipitation avec le cristallin de tous les autres vertébrés (1).

1-2 - Etudes électrophorétiques des protéines du cristallin

Elles ont porté sur les cristallins de l'homme et de divers animaux. Nous ne citerons ici que les travaux de WIEBE R.J. & KAMINSKI M. (2) sur le cristallin de boeuf donnant lieu à la séparation de huit fractions en gélose, et ceux de RABAEY qui, dans sa thèse, met en évidence 16 fractions dans le cortex et 15 dans le nucléus du cristallin du poisson *Scyllium canicula* (3).

Des études taxonomiques sur les oiseaux montrent que les fractions ne sont pas aussi nettes avec l'âge et qu'à l'intérieur d'une même espèce les électrophorégrammes sont similaires. Chez les poissons et les batraciens une fraction correspondant probablement à l' α - cristalline est présente en faible concentration, les fractions plus lentes sont les plus importantes.

1-3 - Application à l'étude des populations de poissons.

Pour les thons de l'Océan Pacifique, BARRETT I. et WILLIAMS A.A. (4) n'ont pas trouvé de différences contrôlées génétiquement lors de leur étude des protéines solubles des cristallins par électrophorèse en gel d'amidon. Les électrophorégrammes de *Thunnus albacares*, *T. alalunga* et *T. thynnus* sont similaires; le polymorphisme signalé chez *T. albacares* par SMITH (5) n'a pas été confirmé et le polymorphisme constaté chez *Sarda chiliensis* (Bonito) est en fait lié à la longueur du poisson, les proportions et la composition des protéines du cristallin varient avec l'âge du poisson. GUTIERREZ M. (6) met en évidence deux bandes seulement par électrophorèse sur papier de protéines de cristallins de *Thunnus thynnus* de la côte atlantique sud de l'Espagne.

Pour la morue de l'Atlantique Nord (Canada) ODENSE P.H., LEUNG T.C. & ALLEN T.D. (7) ont observé des différences entre les électrophorégrammes des protéines du cristallin sans pouvoir fonder d'hypothèse génétique.

Etant donné le petit nombre de recherches effectuées sur les cristallins de poisson d'une part et l'intérêt offert par ce matériel très facile à obtenir d'autre part, nous avons jugé intéressant d'explorer cette voie par le moyen de l'électrophorèse tout d'abord mais aussi en appliquant les méthodes de recherche immunologique: l'analyse immunoélectrophorétique et la précipitation d'immunocomplexes antigène-anticorps par diffusion double.

Dans ce but nous avons immunisé des lapins pour obtenir des immunosérums anticristallin de sardinelle.

2 - MATERIEL ETUDIE

2-1 - Les sardinelles:

Les divers renseignements concernant la provenance et l'état du poisson sont résumés dans les trois tableaux ci-après.

Les stades sexuels sont évalués de 2 à 7. Le poids de la gonade est parfois indiqué en grammes, entre parenthèses. La teneur en graisse varie de maigre (0) à gras (G) en passant par peu gras (P.G.). Le contenu stomacal est parfois indiqué de 0 (vide) à 4 (plein).

2-2 - Les extraits de cristallins

Les cristallins prélevés en mer sont conservés en eau physiologique à la glacière avant d'être broyés. Ceux prélevés sur le poisson débarqué sont conservés congelés à sec ou broyés immédiatement à l'aide d'un mortier dans huit fois leur volume d'eau distillée puis centrifugés à vitesse maximum durant 15mn. (environ 3000 t/mn).

Le surnageant seul est utilisé soit pour être injecté à des lapins et il est alors additionné de Merseptyl, soit pour les études électrophorétiques et immunologiques. A titre indicatif notons que les 84 cristallins des 42 S.eba du 21 mai avaient un volume total de 3,5ml (3,7ml pour les 90 cristallins de S.aurita), et les 44 cristallins de S.eba du 12 juin un volume total de 0,8ml (1,3ml pour les 50 cristallins de S.aurita).

Le dosage des protéines des extraits de cristallins par la méthode de KJELDHAL donne des résultats comparables pour S.aurita et S.eba. Nous trouvons 7g d'azote par litre soit 43,75g de protéines par litre d'extrait.

EXTRAITS	ESPECES	DATE ET LIEU DE CAPTURE	PRELEVEMENT
Pool (analyse)	S. aurita	17-4-68	En mer
Pool (analyse)	S. eba	"Trois villages"	(sardinier Bingo)
Pool de 45 individus (immunisation)	S. aurita		
Pool de 42 individus (immunisation)	S. eba	Grand-Bassam 21-4-68	Au Laboratoire (poisson frais)
S.a 1 à S.a 10	S. aurita		
S.e 1 à S.e 4	S. eba		
Pool de 22 individus (immunisation)	S. aurita	Jacquenville 12-6-68	Au Laboratoire (poisson frais)
Pool de 25 individus (immunisation)	S. eba		
R1 et R2 D1, D2, et D3	S. a. ronde S. a. demi ronde	"Maison Blanche" 25-6-68	Au Laboratoire (poisson frais)
g1 à g6	S. aurita	Ghana mi-juin	Au Laboratoire (poisson congelé)
S.a. 11 à S.a. 20	S.aurita	Sassandra 20-7-68	Au Laboratoire (poisson congelé)
S.a. 21 à S.a. 30 S.e. 21 à S.e. 30	S.aurita S.eba	Sassandra 23-7-68	Au Laboratoire (poisson congelé)
Pool (immunisation)	S. eba	Sassandra 24-7-68	Au Laboratoire (poisson frais)
Pool (immunisation)	S. aurita	Sassandra 26-7-68	Au Laboratoire (poisson frais)
g7 à g17	S. aurita	Ghana 4-8-68	Au Laboratoire (poisson congelé)

TABEAU I: TABEAU GENERAL DU MATERIEL ETUDIE

25 JUIL 1968	Ronde R1	17,7	-	F	7	0	-
	Ronde R2	17,8	-	F	7	0	-
	$\frac{1}{2}$ Ronde D1	17,3	-	F	3	0	-
	$\frac{1}{2}$ Ronde D2	14,5	-	F	3	PG	-
	$\frac{1}{2}$ Ronde D3	18,6	-	-	-	-	-
MI-JUIN 1968	g1 à g6	-	-	-	-	-	-
4 AOUT 1968	g 7	17,5	60	4 M	6	0	-
	à g 17	19	88	7 F	6	0	-
TOUS EN PLEINE PONTE							
17 AVRIL 1968	Pool	Lf variant peu autour de 16 cm					
12 JUN 1968	Pool	Lf variant peu autour de 14,5 cm					

TABLEAU II: Caractéristiques des *Sardinella aurita* étudiées.

DATE	NUMERO	Lf cm	P g	SEXE	STADE SEXUEL	GRAISSES	ESTOMAC
21 MAI 1968	S.a 1	18	69	M	2	G	-
	S.a 2	17	65	M	2	G	-
	S.a 3	17,5	67,5	M	2	G	-
	S.a 4	19	67,5	F	3	G	-
	S.a 5	19	92	M	3	G	-
	S.a 6	24	183	F	7	PG	-
	S.a 7	23,5	163	M	7	G	-
	S.a 8	23	163	F	7	G	-
	S.a 9	24	171	M	4	G	-
	S.a 10	24	179	F	7	G	-
20 JUILLET 1968	S.a 11	19,5	85,5	M	5 (2,3)	0	4
	S.a 12	18	74	M	5 (1,2)	0	4
	S.a 13	20,5	128	M	5 (9)	0	4
	S.a 14	20,5	126	F	5 (6,2)	0	4
	S.a 15	22	150	F	5 (7,5)	0	4
	S.a 16	20,5	126,5	F	5 (8,9)	0	4
	S.a 17	20,5	115	M	5 (5)	PG	4
	S.a 18	20	117	M	5 (6,8)	PG	4
	S.a 19	21,5	142	F	5 (7,3)	0	4
	S.a 20	15,5	45,5	M	5 (1,3)	0	4
23 JUILLET 1968	S.a 21	15	35	-	-	-	-
	S.a 30	18	70	-	-	-	-

DATE	NUMERO	Lf cm	P g	SEXE	STADE SEXUEL	GRAISSES	ESTOMAC
21 MAI 1968	S.e 1	23,5	183	M	4	G	
	S.e 2	25,5	233	F	4	G	-
	S.e 3	24,5	204	F	4	G	
	S.e 4	25	214	F	3	G	
	S.e 5	Non utilisées					
24 JUILLET 1968	S.e 11	18	82	M	5 (2,2)	O	1
	S.e 12	18,5	95,5	F	4(?) (1,3)	G	1
	S.e 13	20	122,5	M	5 (6,2)	G	0
	S.e 14	18,5	101	M	5 (2,2)	G	0
	S.e 15	19	94	M	5 (1,9)	G	3
	S.e 16	18	80	M	5 (2,8)	PG	2
	S.e 17	18,5	92,5	F	6 (1,3)	O	1
	S.e 18	18,5	88	F	6 (1,5)	PG	1
	S.e 19	19,5	108	F	6 (9)	PG	0
	S.e 20	18	76,5	M	5 (1,7)	PG	2
23 JUILLET 1968	S.e 21	15	55				
	à S.e 30	à 17,5	à 85	-	-	-	-
17 AVRIL 1968	Pool	Lf variant peu autour de 18 cm					
12 JUN 1968	Pool	Lf variant peu autour de 12 cm					

TABLEAU III: Caractéristiques des *Sardinella eba* étudiées.

3-1 - Analyse électrophorétique:

Les électrophorèses ont été faites en gel d'Agarose I.B.F. (Industrie Biologique Française). Le gel est utilisé à une concentration de 1,5% soit avec un tampon véronal de pH=8,4 (véronal = 3,32g; véronal sodé = 21,02g; lactate de Ca = 3,07g; eau distillée = 3 litres) qui donne avec le tampon des bacs un système discontinu (véronal = 6,9g; véronal sodé = 43,8g; lactate de Ca = 1,92g et eau distillée = 5 litres); soit avec un tampon tris-borique de pH=8,8 contenant 1,5g d'E.D.T.A. par litre.

Les extraits à étudier sont mélangés volume à volume avec de l'agarose non tamponné tiède (une température trop élevée cuit l'extrait qui devient tout blanc). La migration dure 4 heures à environ 5,5 V/cm avec le premier tampon et 3 heures à environ 7 V/cm avec le second en se fait dans un frigidaire à + 4°.

3-2 - Analyse immunoélectrophorétique:

L'électrophorèse s'effectue en gel d'Agarose I.B.F. préparé comme il est dit précédemment, soit sur une lame de verre de format 7,5 x 2,5 cm (pour microscopie) avec 3ml d'Agarose fondu à 1,5% par lame, soit sur une plaque de verre de format 9 x 7 cm. Les réservoirs et la rigole centrale sont découpés à l'emporte pièce (Apelab). Après inclusion des échantillons une différence de potentiel de 6 volts par cm est appliquée pendant 1 heure 15mn.

Après l'électrophorèse, la rigole centrale est remplie par l'immunsérum anti cristallin. La diffusion se poursuit durant 24 heures en chambre humide. Les immuncomplexes ayant précipité, les produits en excès sont éliminés par lavage à l'eau physiologique pendant trois jours.

La coloration est effectuée après lavage à l'eau distillée et séchage aux rayons infra-rouge. Les immuncomplexes sont colorés au rouge ponceau pendant trois à quatre heures. Les plaques sont ensuite photographiées.

3-3 - Identification des fractions:

Des essais d'identification des fractions protéiques des extraits de cristallins de sardinelles (révélées par l'électrophorèse simple) aux arcs de précipitation obtenus au cours de la microanalyse immunoélectrophorétique ont été effectués (8).

Après électrophorèse préparative en gel d'agarose et coloration d'une bande témoin le gel est découpé perpendiculairement à l'axe de migration en un certain nombre de portions. Ces portions sont pilées sommairement après addition d'eau physiologique, mises à congeler et centrifugées après décongélation. Les surnageants sont utilisés pour l'analyse immunoélectrophorétique pratiquée de la façon suivante: simultanément et sur la même plaque on fait migrer 1° l'extrait total servant de référence 2° le surnageant de la portion étudiée 3° le mélange des surnageants des autres portions. De cette manière on peut identifier la fraction étudiée par sa présence en 1° et en 2° et par son absence en 3°.

3-4 - Analyse immunologique:

Elle est effectuée par précipitation d'immunocomplexes lors de la diffusion double en gel d'agar d'une solution d'extrait de cristallin et d'un immunosérum anti cristallin.

L'agar utilisé est le "SPECIAL AGAR NOBLE" de chez Difco dissous au bain marie bouillant dans de l'eau physiologique pour obtenir une concentration de 1,5%. Du Merseptyl de concentration finale $\frac{1}{5000}$ y est ajouté pour en assurer la conservation. Trente millilitres d'agar fondu sont versés dans une boîte de Petri de 9cm de diamètre pour obtenir une épaisseur d'environ 5mm. Après solidification au frigidaire les réservoirs sont découpés à l'emporte pièce (Apelab).

On obtient un réservoir central entouré de quatre ou six réservoirs distants de 1cm. L'étanchéité du fond de chaque réservoir est assuré en y déposant une goutte très chaude d'agar fondu.

Les diverses solutions antigéniques et les immunsérums sont déposés dans les réservoirs. Les boîtes de Petri sont observées durant deux à trois jours.

Les immunocomplexes précipités sous forme de series sont relevés sur un schéma à chaque observation pour en suivre l'évolution.

3-5 - Obtention d'immunsérums anti-cristallin:

Nous utilisons deux lapins de 6 mois nés à l'animalerie, ayant déjà reçu une vaccination préventive de cuni-vaccin (Laboratoires Lissot) et recevant une nourriture stable (granulés du commerce, mil, guatémala et stylosenthès).

3-5-1 - Sérum anti cristallin de S.aurita:

Première phase: injection d'extraits de 90 cristallins de S.aurita pêchées le 21 mai 1968 à Grand-Bassam.

1er	jour	1	ml	IV	(intra veineux)
3ème	jour	1	ml	IV	
6ème	jour	1,5	ml	IV	
8ème	jour	1	ml	IV	
10ème	jour	1,5	ml	IV	
13ème	jour	1,5	ml	IV	
15ème	jour	1,5	ml	IV	

repos jusqu'au 19ème jour: prise de sang
repos jusqu'au 23ème jour.

Deuxième phase: injection d'extraits de 25 cristallins de S.aurita pêchées le 12 juin 1968 à Jacqueville.

23ème	jour	2	ml	IV
27ème	jour	2	ml	IV
30ème	jour	2	ml	IV

repos jusqu'au 34ème jour: prise de sang donnant un premier immunsérum.

Rappel un mois plus tard avec des extraits de cristallins de S.aurita pêchées à Sassandra le 27 juillet 1968.

70ème jour 3 ml IV

repos jusqu'au 78ème jour

prise de sang donnant l'immunsérum final

3-5-2 - Sérum anti-cristallin de S.eba:

Le même protocole est appliqué avec des extraits de 84 cristallins de S.eba pêchées le 21 juin 1968 à Grand-Bassam pour la première phase et 22 cristallins de S.eba pêchées le 12 juin 1968 à Jacquville pour la deuxième phase.

Rappels un mois plus tard avec des extraits de cristallins de S.eba pêchées à Sassandra le 24 juillet 1968.

65ème jour 2 ml I.P. (intra péritonéal)

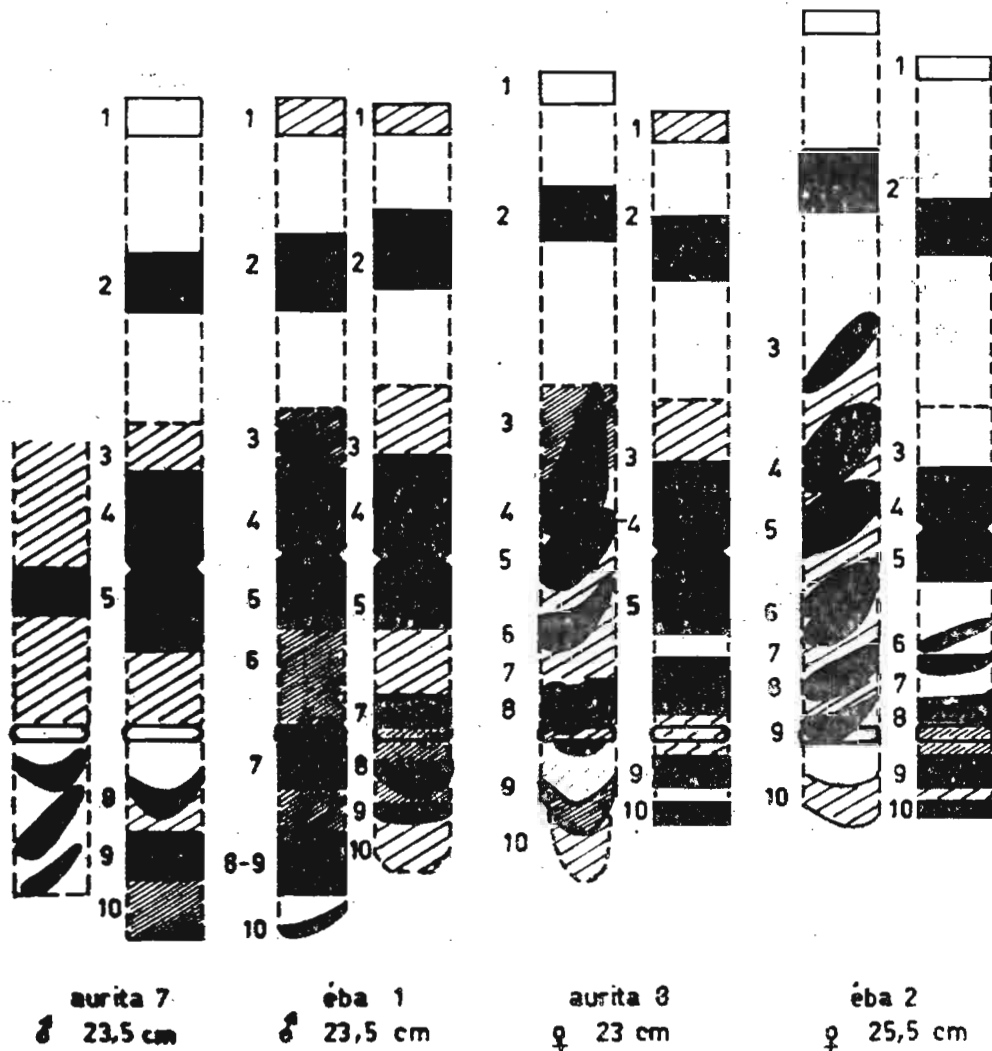
68ème jour 2 ml S.C. (sous cutané)

70ème jour 2 ml I.V.

repos jusqu'au 78ème jour

prise de sang donnant l'immunsérum final.

Le mélange des deux immunsérums obtenus a un titre de $\frac{1}{2000}$ par le Ring test.



ÉLECTROPHORÉGRAMMES D'EXTRAITS DE CRISTALLINS DE SARDINELLES DU 17_4_1968.

Agarose I.B.F. Tampon de Hirschfeld pH = 8,45. 4h à 5,3 V/cm.
Ces 8 échantillons ont migrés sur la même plaque chaque échantillon "déformé" est
placé à gauche du "normal"

4 - R E S U L T A T S

4-1 - Analyse électrophorétique

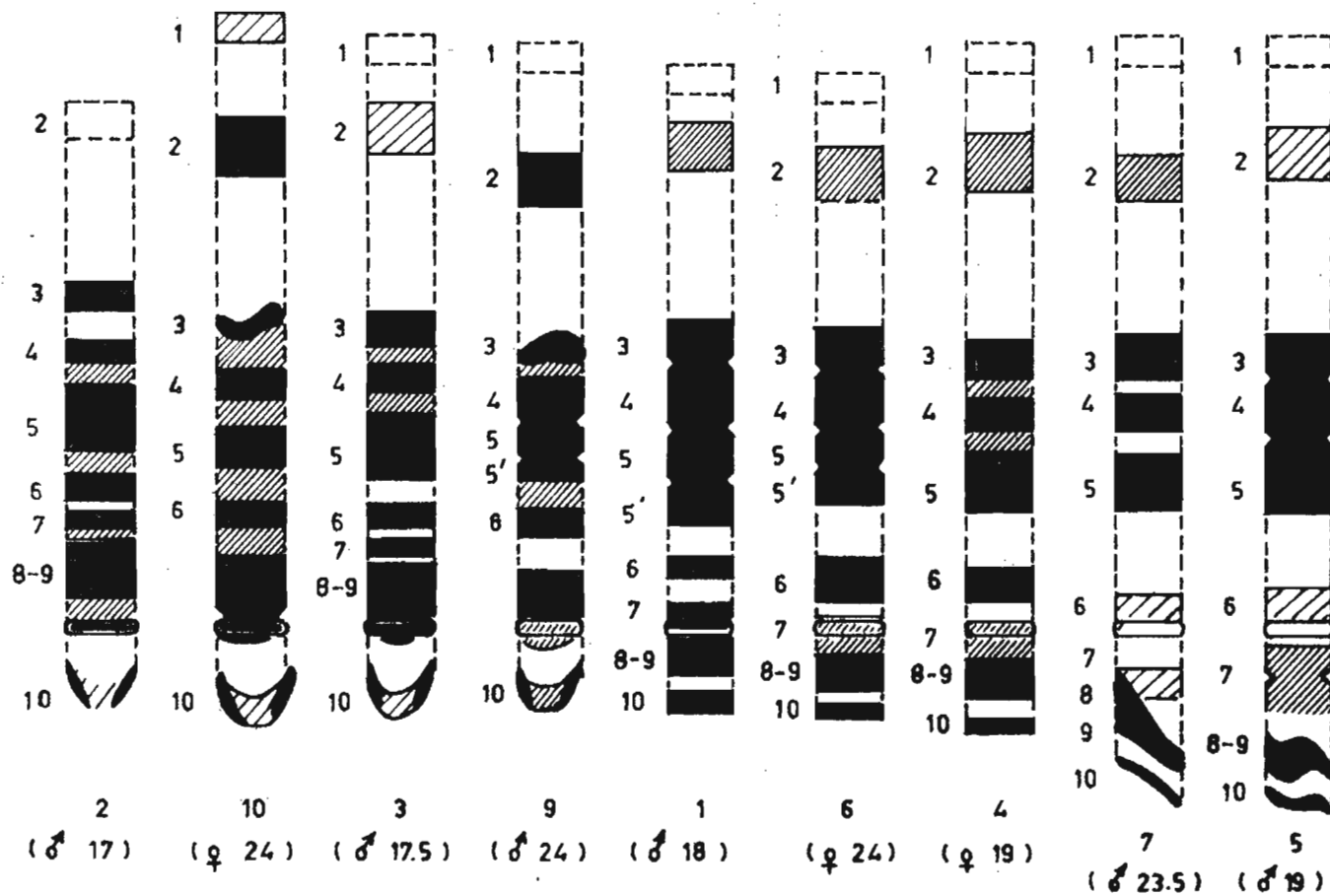
4-1-1 - Avec le tampon de Hirschfeld pH=8,4

Les électrophorégrammes présentent des déformations de migration, surtout pour les fractions migrant vers la cathode (Planches I et II). Un même échantillon sur la même plaque d'électrophorèse donne deux sortes de migrations: l'une "normale" au centre de la plaque et l'autre "déformée" sur les bords de la plaque. En outre le champ électrique n'est pas uniforme et la différence de potentiel subit une chute pouvant atteindre 20 volts d'un bord de la plaque à l'autre.

Un premier essai d'électrophorèse de mélanges de *S.aurita* et de *S.eba* du 17 avril 1968 nous avait permis de séparer deux fractions rapides, une fraction lente complexe très importante et deux fractions migrant vers la cathode, soit 5 fractions. En améliorant les conditions de migration nous avons retrouvé les deux fractions rapides 1 et 2 dont seule la seconde est bien marquée. La fraction lente complexe comprend 3 à 4 fractions principales (3, 4, 5 sont constantes avec parfois une fraction supplémentaire). La fraction 6 a une faible mobilité relative positive et la fraction 7 est mal déterminée. Enfin les fractions migrant vers la cathode sont au nombre de 3, les deux dernières (9 & 10) étant généralement bien marquées. Nous concluons donc à la présence d'au moins 10 fractions solubles décelables dans l'extrait aqueux des cristallins de sardinelles.

L'étude de l'électrophorégramme de la planche I ne permet pas de déceler des différences nettes entre les cristallins de *S.aurita* et de *S.eba* de taille et de sexe comparables, les migrations n'étant pas homogènes.

Il ne semble pas non plus qu'il y ait de variation dans le nombre des fractions entre les *S.aurita* de 18cm et celles de 24cm ainsi qu'entre les mâles et les femelles (planche II).



ÉLECTROPHORÉGRAMME D'EXTRAITS DE CRISTALLINS DE SARDINELLA
aurita du 21_5_1968

Agarose I.B.F. 1.5%. Tampon de Hirschfeld pH = 8,45 . 4h à 5.3 V/cm

Le petit nombre de cristallins étudiés et les défauts de migration ne permettent pas d'éliminer la présence d'un polymorphisme individuel qui pourrait se situer entre les fractions 3 et 7.

Ce premier résultat quant au nombre de fractions et leur importance relative nous a paru insuffisant en ce sens que certaines fractions n'ont pas de position fixe par rapport au réservoir (fractions 6, 7 et 8) et que leur correspondance est difficilement réalisable.

Nous avons donc cherché des conditions de migration meilleures qui nous paraissent être réalisées par l'utilisation d'un tampon de pH=8,8 contenant de l'E.D.T.A.

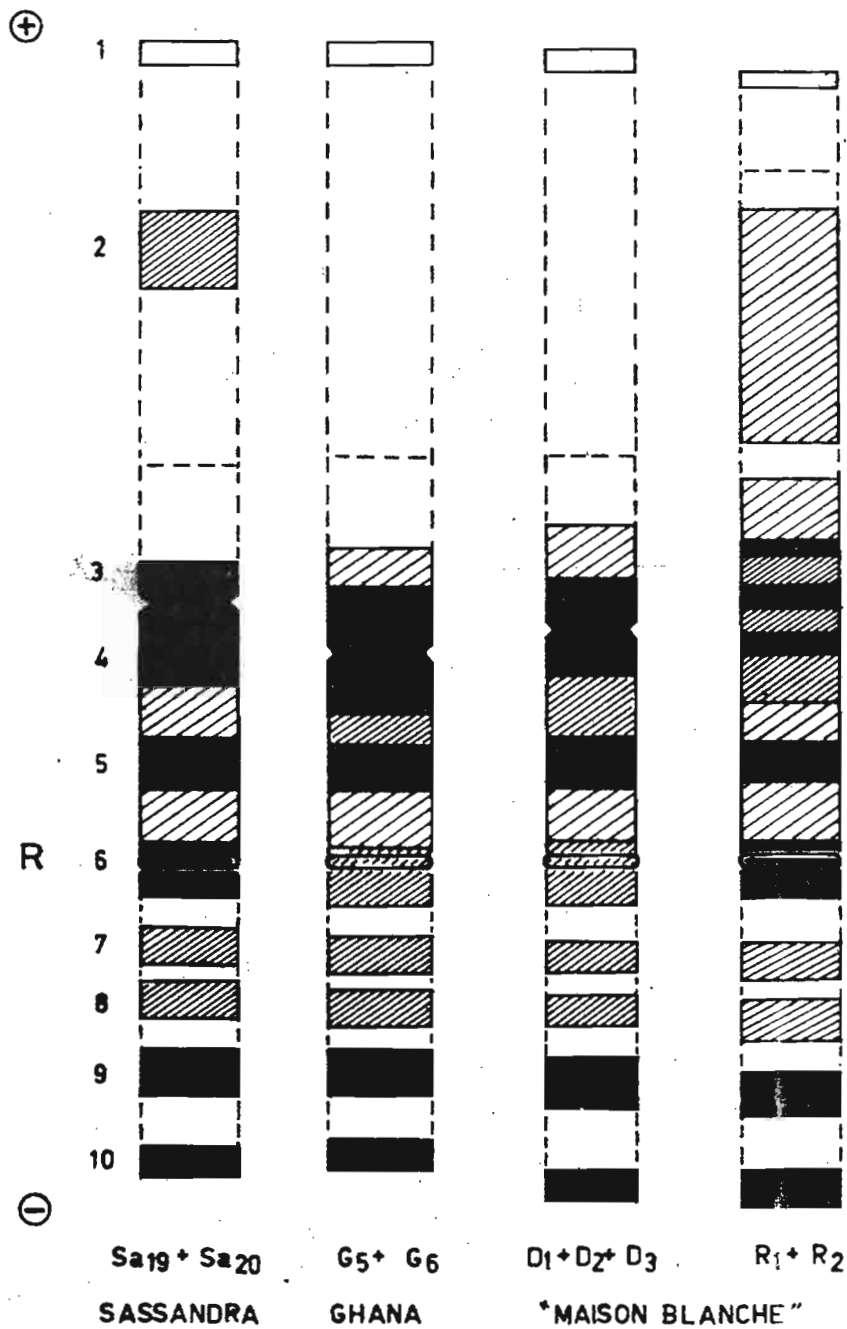
4-1-2 - Avec un tampon tris-borique de pH=8,8

Les électrophorégrammes ne présentent aucune déformation, les fractions sont très bien séparées et occupent des positions constantes aussi bien vers l'anode que vers la cathode. Dix fractions principales sont présentes:

Fraction 1. - C'est la plus rapide. Elle est de faible importance et sa présence est constante.

Fraction 2. - Cette fraction est caractérisée par une migration relative fortement positive. Sa mobilité est sensiblement égale à celle de l'albumine humaine dans des conditions identiques; elle est en outre plus grande chez *S.eba* que chez *S.aurita*. Elle est toujours très importante mais subit une altération avec le temps pouvant aller jusqu'à sa disparition totale sur l'électrophorégramme comme cela a été constaté avec des échantillons de cristallins de *S.aurita* du Ghana conservés un mois et demi au frigidaire et ayant subi une altération caractérisée par un dégagement d' H_2S et un jaunissement de l'échantillon (planche III: $G_5 + G_6$ et $D_1 + D_2 + D_3$ planche IV: G_1 et G_2).

Une fraction 2' a parfois été détectée: elle est située à mi-chemin entre la fraction 3 et la fraction 2 et est de très faible importance (planche V).



ÉLECTROPHORÉGRAMME D'EXTRAITS DE CRISTALLINS
DE SARDINELLA aurita.

Agarose I.B.F. 1,5%. Tampon tris-borique pH = 8,8 3h à 8 V/cm.

Fraction 3. - C'est la plus rapide du groupe des fractions lentes. En fait nous appelons fraction 3 la fraction principale, constante et toujours très importante précédant la fraction 4. Des sous fractions, plus rapides 3a, 3b et 3c détectées sur des cristallins de S.aurita du Ghana (planches IV & V) pourraient traduire : un polymorphisme utile à la détermination des races.

Fraction 4. - Toujours très importante, cette fraction est parfois difficilement distincte de la fraction 3.

Fraction 5. - Toujours très nette, très importante et bien distincte de la fraction 4, cette fraction est la plus lente du groupe. Elle pourrait donner lieu chez S.eba à un polymorphisme par la fraction 5' trouvée chez S.eba 25. (planche IV)

Fraction 6. - De mobilité relative légèrement négative, cette fraction est assez importante et constante.

Fraction 7 & 8. - D'importance moins marquée, ces fractions ont toujours été constatées, avec une exception pour un échantillon altéré de S.eba 27 pour lequel la fraction 8 n'est pas nette alors que la fraction 7 est renforcée (la fraction 2 restant présente). (planche IV)

Fraction 9. - Cette fraction est très bien marquée et constante.

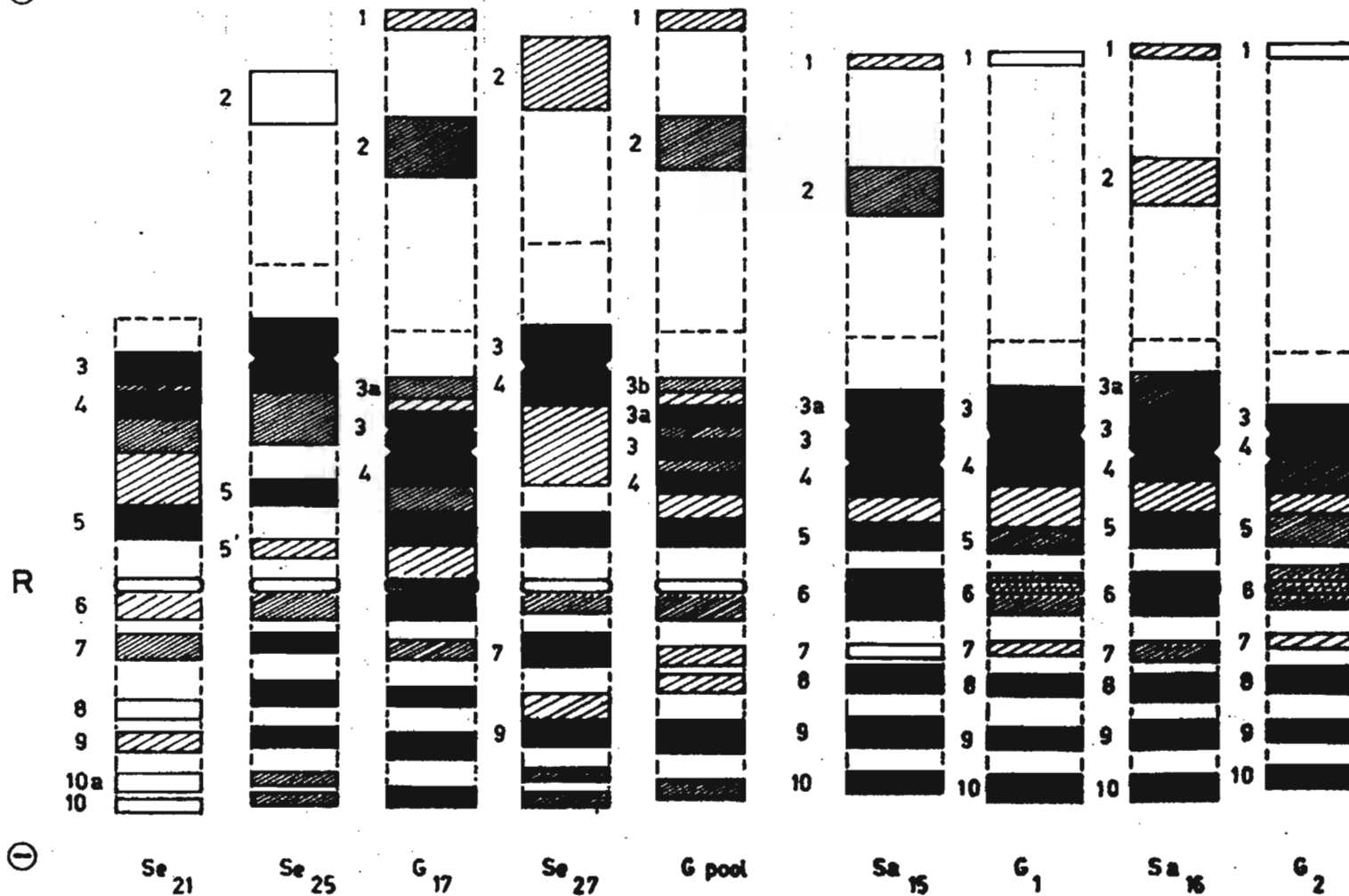
Fraction 10. - C'est la fraction qui a la plus grande mobilité vers la cathode elle est toujours bien marquée.

Elle semble être double chez S.eba 21, 25 et 27 (10 et 10') et simple chez S.aurita (10). (planche IV)

4-1-3 - Conclusion:

Nous avons constaté que les échantillons devaient être traités le plus rapidement possible une fois l'extrait effectué car les protéines s'altèrent pour les échantillons gardés un mois au frigidaire à + 4°. Il vaudrait mieux garder les cristallins à sec au congélateur à - 20° et en faire un extrait juste avant l'emploi.

⊕



ÉLECTROPHORÉGRAMME D'EXTRAITS DE CRISTALLINS DE SARDINELLES

Agarose I.B.F. à 1.5%. Tampon Tris-borique (E.D.T.A) pH=8,8... 3h30 à 6 V/cm.

Cette courte étude préliminaire a permis de mettre en évidence au moins 16 fractions solubles dans l'extrait aqueux de cristallins de sardinelles. En outre un espoir possible de mise en évidence d'un polymorphisme existe par l'intermédiaire de certaines fractions (fractions 3 chez S.aurita et fractions 5 chez S.eba).

Une étude systématique portant sur un grand nombre d'échantillons sera donc entreprise.

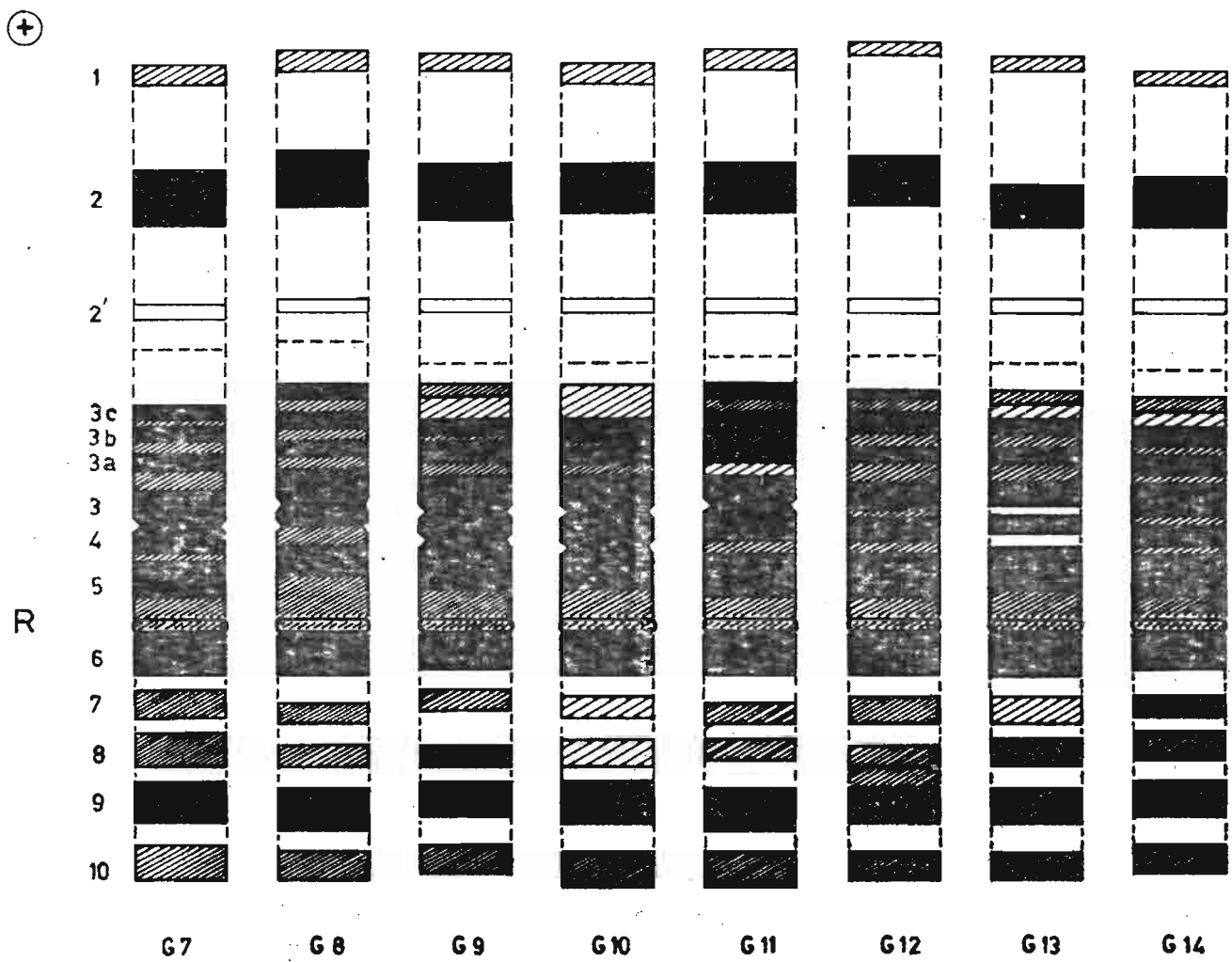
4-2 - Analyse immunoélectrophorétique

L'un des buts de cette analyse est de préciser le nombre de fractions décelables en faisant intervenir la précipitation spécifique d'immunocomplexes antigène - anticorps. L'immunsérum utilisé (voir Techniques), ne contient pas nécessairement tous les anticorps possibles contre les antigènes injectés et les immunocomplexes ne se sont pas nécessairement tous formés dans les conditions d'expérience. C'est donc ici encore un nombre minimum de fractions que nous avons décelées. Ce nombre devrait augmenter en perfectionnant la technique: obtention de plusieurs immunsérums, hyper-immunisation, concentration en anticorps par précipitation au sulfate d'ammonium ou emploi de Rivanol (9). La localisation immunoélectrophorétique des anticorps anti-cristallin de sardinelles contenus dans le sérum de lapin (figure-2) indique qu'ils migrent vers la cathode dans les conditions d'expérience . Ceci doit permettre une concentration ultérieure de l'immunsérum par électrophorèse.

Nous avons aussi recherché l'existence de différences entre les cristallins d'une même espèce pour des moments différents de l'année (avril à juin) pour des lieux différents (du Ghana à Sassandra) et en ce qui concerne S.aurita entre les "rondes" et les "demi-ronde". Nous avons comparé entre elles les S.aurita et les S.eba.

4-2-1 - Avec le tampon de Hirschfeld pH=8,4 (fig.1)

Au niveau des fractions lentes nous avons trouvé 4 arcs de précipitation très nets: les arcs a et b "parallèles" et les arcs c et d "tangents" d étant le plus prononcé. Un cinquième arc important appelé r (pour rapide) correspond à la précipitation d'un antigène de mobilité relative importante.



ÉLECTROPHORÉGRAMME D'EXTRAITS DE CRISTALLINS DE
S. aurita (GHANA)

Agarose I.B.F. à 1.5%. Tampon tris - borique (E.D.T.A.) pH = 8,8. 3h.30 à 6 V/cm.

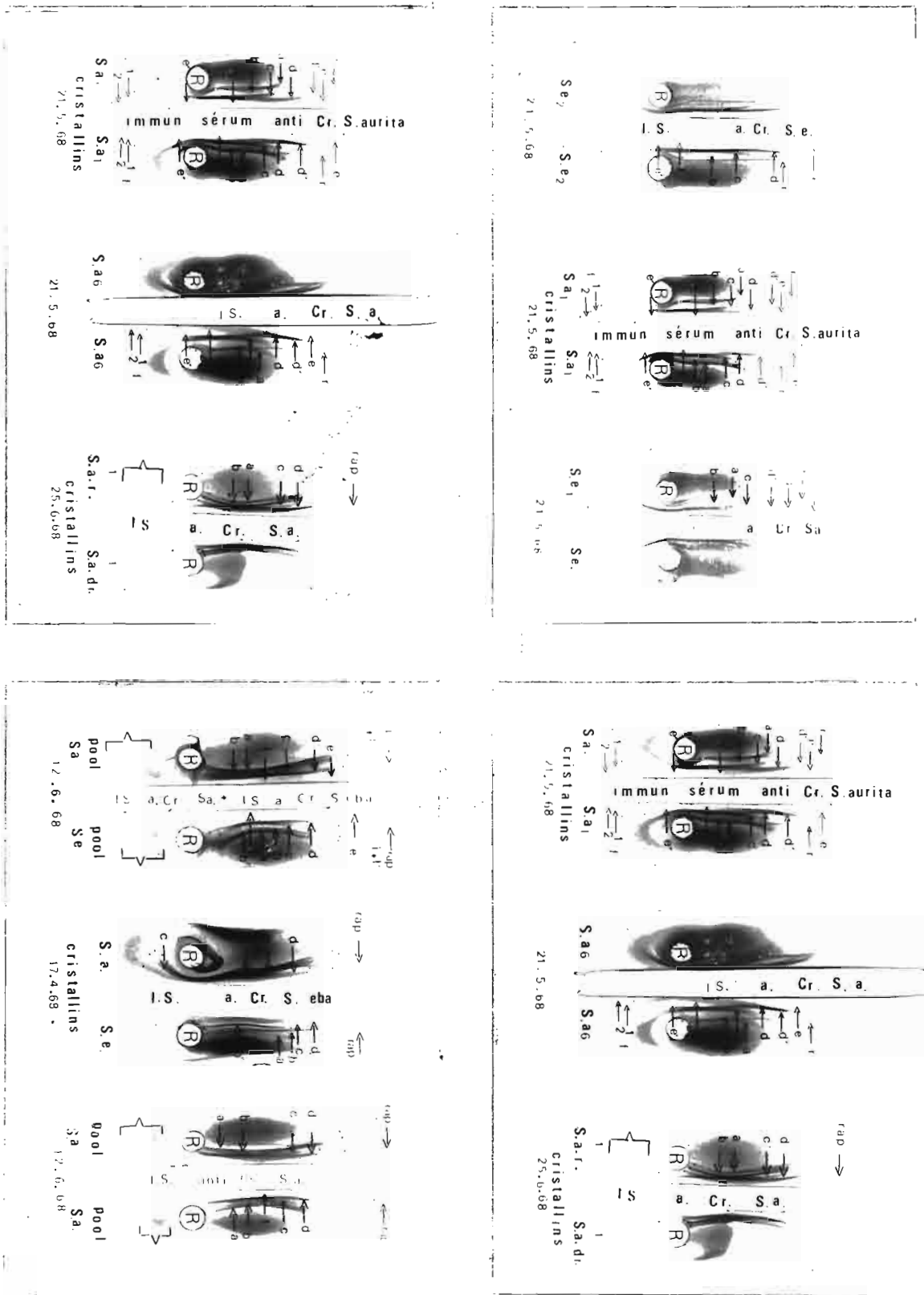


Fig.1 - Analyse immunoélectrophorétique d'extraits de cristallins de sardinelles (tampon de Hirschfeld pH=8,4)

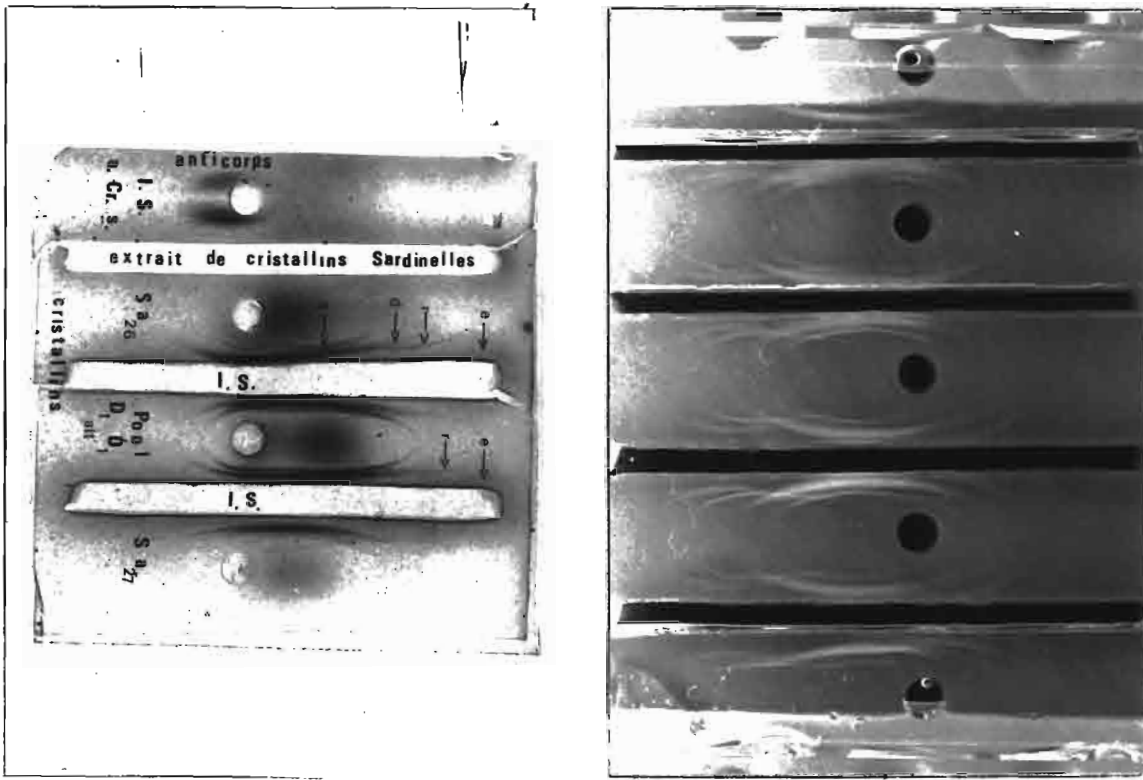


Fig.2: - Analyse immunoélectrophorétique d'extraits de cristallins de Sardinelles - (Tampon tris-borate pH=8,8).

Cet arc que l'on trouve aussi bien chez S.aurita que chez S.eba est double pour S.aurita et S.eba dans le cas d'un mélange des deux immunsérums anti-cristallin et pour un croisement entre les immunsérums cet arc est simple dans les deux cas.

Deux autres arcs e et f moins prononcés sont présents le long de la rigole contenant l'immunsérum et se croisent. Il semble que tout comme pour les fractions de mobilité cathodique les complexes antigènes anticorps se forment trop près de la rigole contenant l'immunsérum pour être mis correctement en évidence (f.1 et f.2). Dans une étude ultérieure nous modifierons les conditions de migration et les proportions antigène-anticorps de façon à détecter ces précipités. Quelques arcs supplémentaires sont parfois présents: b' "parallèle" à b sur le pool de S.eba (absent pour le pool de S.aurita); d' "tangent" à d (pour les analyses individuelles de Sa1, Sa6 et Se1); e', petit arc fin au niveau du réservoir (bien net pour Se2, Sa1, Sa6).

Nous pouvons donc conclure à la présence d'au moins sept fractions de pouvoirs antigéniques distincts dans les extraits de cristallins de sardinelles. Ces fractions donnent lieu à la précipitation de sept complexes antigène-anticorps en présence de l'immunsérum de lapin anti-cristallin de sardinelles.

4-2-2 - Avec le tampon tris-borique pH=8,8 (figure 2)

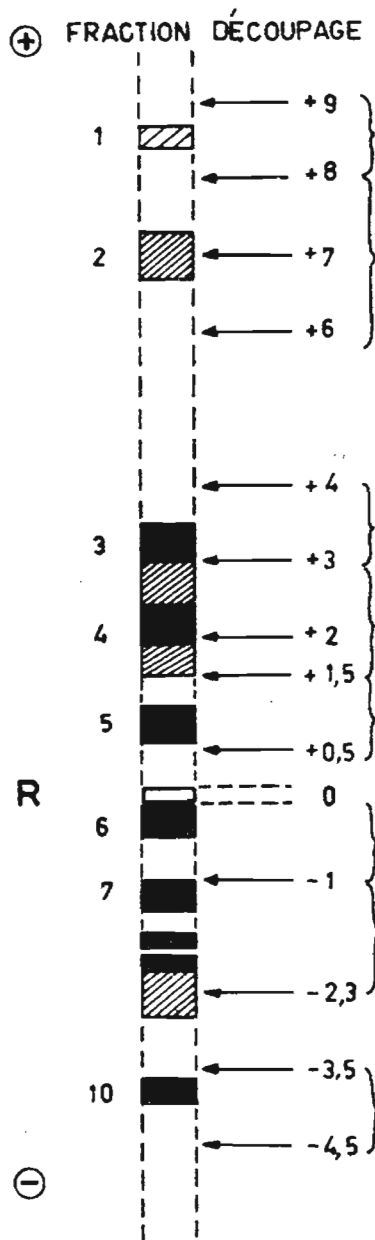
Nous retrouvons les arcs principaux a, c, d, et r à l'exception de l'arc b qui n'apparaît ni chez S.aurita ni chez S.eba.

L'arc a montre une deuxième flexure nette au niveau du réservoir indiquant la communauté antigénique de deux fractions de mobilités électrophorétiques différentes.

Les fractions de migration cathodique là encore n'ont pas été décelées. Par contre une fraction plus rapide que la fraction r a donné un faible précipité, près de la rigole contenant l'immunsérum. Il pourrait s'agir de l'arc e déjà détecté précédemment.

Notons que l'arc r est présent dans l'extrait altéré D1, D2 qui ne présente par ailleurs pas de fraction 2 à l'électrophorèse (voir 4-1-2).

Dilution I.S.	Ag. pur ↓	I.S. et Ag. dilués ↓	I.S. pur ↓	Dilution Ag.
1	○	○	○	$\frac{1}{512}$
$\frac{1}{2}$	○	○	○	$\frac{1}{256}$
$\frac{1}{4}$	○	○	○	$\frac{1}{128}$
$\frac{1}{8}$	○	○	○	$\frac{1}{64}$
$\frac{1}{16}$	○	○	○	$\frac{1}{32}$
$\frac{1}{32}$	○	○	○	$\frac{1}{16}$
$\frac{1}{64}$	○	○	○	$\frac{1}{8}$
$\frac{1}{128}$	○	○	○	$\frac{1}{4}$
$\frac{1}{256}$	○	○	○	$\frac{1}{2}$
$\frac{1}{512}$	○	○	○	1



TEST DE PRÉCIPITATION DES IMMUNCOMPLEXES ANTIGÈNES - ANTICORPS.

(Schema à l'échelle x 2).

DÉCOUPAGE APRÈS ÉLECTROPHORÈSE D'EXTRAITS DE CRISTALLINS DE *S. aurita*.

Agarose I.B.F. 1,5%. Tampon Tris_borique pH = 8,8 3h30 à 6 V/cm.

4-2-3 - Identification des fractions et des arcs de précipitation:

Les arcs de précipitation rendent compte de l'aptitude de certains antigènes à provoquer des anticorps chez le lapin, et à des pouvoirs antigéniques différents correspond la formation d'anticorps différents. Les diverses fractions protéiques séparées par électrophorèse peuvent être ou non antigéniques et lorsqu'elles le sont elles peuvent provoquer la formation d'une ou plusieurs familles d'anticorps donnant lieu à un ou plusieurs précipités. Il est donc intéressant d'identifier les diverses fractions électrophorétiques aux arcs de précipitation antigène-anticorps. Deux essais ont été effectués:

4-2-3-1 - Première identification:

Après l'électrophorèse préparative 5 bandes ont été découpées. Seules les bandes III et IV correspondant aux fractions 6 et 7-8 ont permis d'extraire suffisamment d'antigène pour donner lieu à des arcs de précipitation.

La fraction 6 contribuerait à la formation de l'arc a ou b et les fractions 7-8 correspondraient à la partie inférieure (vers la cathode) de l'arc d.

4-2-3-2 - Deuxième identification:

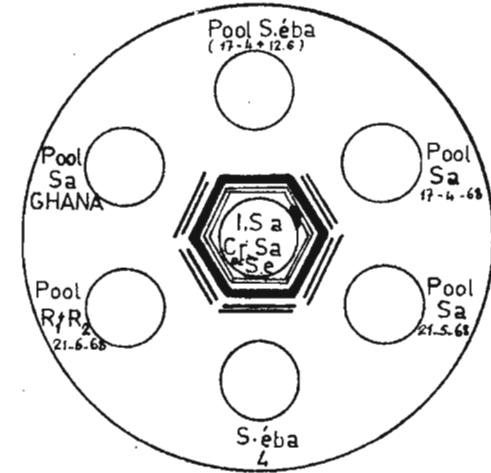
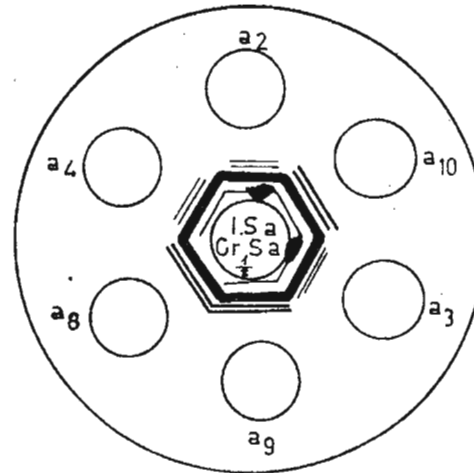
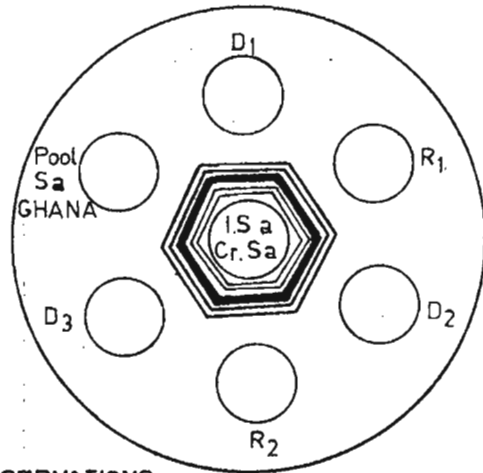
La plus grande concentration en protéines des extraits obtenus par un découpage plus serré effectué d'après la bande témoin d'une part et l'utilisation d'un 2^e immunosérum de meilleur titre d'autre part, ont permis d'obtenir des résultats plus satisfaisants (planche VI).

La fraction 10 contribuerait à la formation de l'arc f et la fraction 2 à celle des arcs e et r; l'arc d serait formé par l'ensemble des fractions 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9, l'arc c par la fraction 4 et l'arc b par la fraction 6. L'arc a n'a pu être déterminé.

4-2-3-3 - Conclusion:

Plusieurs fractions différenciées électrophorétiquement sont immunologiquement très proches les unes des autres et donnent un même précipité. Cette étude sera ultérieurement approfondie.

(SPECIAL AGAR NOBLE DIFCO A 1.5% EN EAU PHYSIOLOGIQUE)



OBSERVATIONS

I

20h 1 et 2 complets, 3 complet, 4 pour D₁ et GHANA, 5 pour D₁
 28h 4 et 5 complets
 46h 1 et 2 disparus; 3, 4 et 5 complets

II

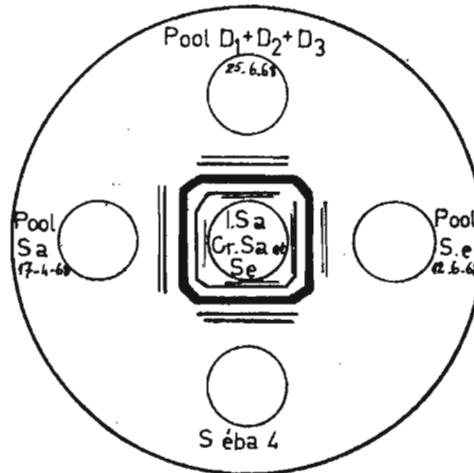
1 ou 2 complet sauf a₈; 3 complet; 4 et 5 absents
 4 et 5 pour a₈ et a₉ seulement
 1 et 2 disparus, 3, 4 et 5 complets

III

1 et 2 complets; 3 complet; 4 complet; sauf Pool éba et éba 4, 5 pour GHANA et Pool S.a. du 174
 4 et 5 complets sauf pour Pool éba
 1 et 2 disparus, 4 et 5 absents pour Pool éba.

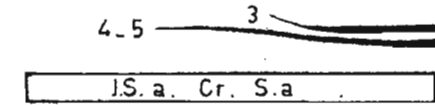
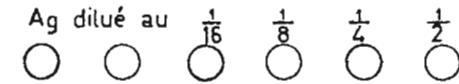


Numérotation des précipités



IV

20h. 1.2 et 3 complets. 4 et 5 pour Pool S.a.
 28h. 4 complet sauf Pool éba, 5 complet sauf Pool éba et éba 4
 48h. 1 et 2 disparus. 3, 4 et 5 complets.



V

4-3 - Analyse immunologique:

Le but de cette analyse est de préciser les communautés et les différences antigéniques existant entre les différents extraits de cristallin. En effet les antigènes identiques donnent des précipités coalescents, les antigènes indépendants des précipités qui se croisent et les antigènes à réactivité croisée forment un éperon. La planche VII traduit les résultats obtenus. Au moins 5 précipités ont été détectés par les immunsérums. Le plus important est le numéro 3 ensuite viennent les précipités 4 et 5 et enfin les précipités 1 et 2 qui se dissolvent au bout de 46 heures (très certainement par excès d'antigène). Tous ces précipités rendent compte d'une communauté antigénique très nette entre S.eba et S.aurita, "rondes" ou "demi-rondes". Cependant la vitesse d'apparition des précipités leur intensité et parfois même leur absence permet de penser qu'il faut persévérer dans cette voie en améliorant principalement les immunsérums.

Pour S.aurita des variations individuelles semblent exister dans l'intensité des réactions (Schéma II). Aucune différence n'apparaît pour les mélanges d'extraits de cristallins de S.aurita des 17 avril, 21 mai et 25 juin, il y a en outre communauté antigénique des 5 précipités observés avec ceux des S.aurita du Ghana pêchées en juin (Schémas III et IV). Aucune différence n'a été constatée entre les S.aurita "ronde" et "demi-rondes". (Schémas I et V).

L'absence des précipités 4 et 5 (Schéma III) avec le pool S.eba (17.4 + 12.6) n'a pu être vérifiée faute d'extraits du 17.4.1968.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - MANSKI, W. - HALBERT, S.P. - AUERBACH, T.P. (1964) - Immunochemical analysis of the Phylogeny of lens Proteins, in "Taxonomic Biochemistry and Serology" ed. Charles A. Leone.
- 2 - WIEME, R.J. - KAMINSKI, M. - (1955) - Etude de la composition antigénique de l'extrait aqueux du cristallin de boeuf
Bull. Soc. Chim. Biol. 37, p.247.
- 3 - RABAËY, M. (1959) - Over de eiwitsamenstelling der coglens. Thesis, University of Ghent.
- 4 - BARRETT, I. - WILLIAMS, A.A (1967) - Soluble lens proteins of some scombroid fishes. Copeia (2) pp. 468-471.
- 5 - SMITH, A.C. - (1962) - The electrophoretic characteristics of albacore, bluefin tuna, and kelp bass eye lens proteins.
Calif. Fish and Game 48, (3), pp. 199-201.
- 6 - GUTIERREZ, M. (1967) - Estudios electroforéticos previos de las proteínas del cristalino y suero del atún, *Thunnus thynnus* (L.)
Invest. Pesq. t.31, (1).
- 7 - ODENSE, P.H. - LEUNG, T.C. - ALLEN, T.M. (1966) - An electrophoretic study of tissue proteins and enzymes of four canadian cod populations.
International Council for the Exploration of the Sea.
Gadoïd comitee G.14.
- 8 - FINE, J.M. (1955) - Discussion au colloque 4 "Vè Kongress der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie" - Freiburg 20-24, Sept. 1955, pp. 822-824.
- 9 - BEDNARIK, T. (1966) - The concentration of antisera for immuno-electrophoretic analysis.
Clinica Chimica Acta 14 pp. 645-653.

DOCUMENTS DU CENTRE DE RECHERCHES OCEANOGRAPHIQUES

- 001 - MARCHAL, E.G. - Avril 1966
Fluctuations de la pêche des sardinelles en Côte d'Ivoire.
- 002 - REYSSAC, J. - Avril 1966
Le phytoplancton entre Abidjan et l'Equateur, pendant la saison chaude.
- 003 - REYSSAC, J. - Avril 1966
Quelques données sur la composition et l'évolution annuelle du phyto-
plancton au large d'Abidjan.
- 004 - MARCHAL, E.G. - Avril 1966
Teneur en matières grasses et teneur en eau chez deux olupéidés de Côte
d'Ivoire.
- 005 - MARCHAL, E.G. - Octobre 1966
Oeufs, larves et post-larves de l'anchois du Golfe de Guinée,
(Anchoviella guinéensis).
- 006 - TROADEC, J.P. - Octobre 1966
Observations sur la biologie et la dynamique des Pseudolithus senegalensis
dans la région de Pointe-Noire.
- 007 - BERRIT, G.R. - Octobre 1966
Catalogue des données disponibles sur le milieu physique - (Secteur marin
d'Abidjan).
- 008 - BAUDIN-LAURENCIN, F.G. - Octobre 1966
Sur une amélioration concernant la numérotation des carrés statistiques
Marsden.
- 009 - BERRIT, G.R. - Octobre 1966
Les eaux dessalées du Golfe de Guinée.
- 010 - REYSSAC, J. - Décembre 1966
Diatomées et dinoflagellés des eaux ivoiriennes pendant l'année 1965 -
Variations quantitatives.
- 011 - TRADUCTION, Janvier 1967
Gulland, J.A., et Cadima E. Méthodes d'analyse des populations de poissons.
Chap. I: Mathématiques. - (trad. J.P. TROADEC).

- 012 - REYSSAC, J. - Janvier 1967
Note sur les variations nyctémérales des diatomées et dinoflagellés en deux points du littoral ivoirien.
- 013 - REYSSAC, J. - Février 1967
Diatomées et dinoflagellés récoltés par le navire "OMBANGO" dans les parages de l'île Annobon.
- 014 - MARCHAL, E.G. - Mai 1967
Clé provisoire de détermination des oeufs et larves des clupéidés et engraulidés ouest-africains.
- 015 - BAUDIN-LAURENCIN, F.G. - Mai 1967
La pêche de l'albacore dans la région nord-équatoriale du golfe de Guinée (entre Monrovia et le Cap Formose).
- 016 - BERRIT, G.R. - R.GERARD & L. VERCESI - Juin 1967
Observations Océanographiques exécutées en 1966 - I-Stations Hydrologiques.
- 017 - BERRIT, G.R. - GERARD, R. & VERCESI, L. - Janvier 1968
Observations Océanographiques exécutées en 1966
II. - Stations Côtières - Observations de Surface - et de Fond.
- 018 - BERRIT, G.R. - GERARD, R. & VERCESI, L. - Juin 1967
Observations Océanographiques exécutées en 1966
III. - Bathythermogrammes.
- 019 - MARCHAL, E.G. - Décembre 1967
La pêche des sardiniers ivoiriens en 1966.
- 021 - BAUDIN-LAURENCIN, F.G. - Avril 1968
Croissance et Age de l'Albacore du golfe de Guinée - Etude Préliminaire -.
- 022 - LEMASSON, L. & REBERT, J.P. - Mai 1968
Observations de courants sur le plateau continental ivoirien mise en évidence d'un sous-courant.
- 023 - BARON, J.C. - Mai 1968
Note sur le sang de quelques poissons marins de Côte d'Ivoire.
(*Scomber japonicus*, *Coryphaena hippurus*, *Acanthocybium solandri*,
Euthynnus alleteratus, *Tetrapturus* sp.)

- 024 - BAUDIN-LAURENCIN, F. G. & MARCHAL, E. G. - Juin 1968
Contribution à l'étude biométrique de l'Albacore -Thunnus albacares)
du Golfe de Guinée.
- 025 - LE LOEUFF, P. & INTES, A. - Juillet 1968
La Faune Benthique du plateau continental de Côte d'Ivoire
Récoltes au chalut - Abondance - Répartition - Variations saisonnières
(Mars 1966 - Février 1967).
- 026 - BERRIT, G. R. - GERARD, R. - LEMASSON, L. - REBERT, J. P. & VERCESI, L. -
Août 1968 - Observations Océanographiques exécutées en 1967 -
I. Stations hydrologiques - Observations de surface et de fond -
Stations côtières.
- 027 - BERRIT, G. R. - GERARD, R. - LEMASSON, L. - REBERT, J. P. & VERCESI, L. -
Observations Océanographiques exécutées en 1967.
II. Bathythermogrammes (en préparation)