

Projet de Développement de la Pêche Pélagique Côtière

(IVC 6/288)

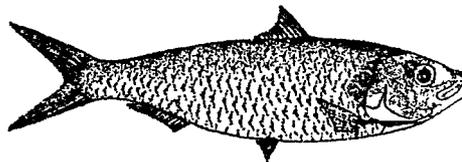
RAPPORT SCIENTIFIQUE

No. S-2/70

DONNEES DE BASE POUR LA RECHERCHE SEROLOGIQUE APPLIQUEE AUX POISSONS-

- 1- L'HEMOGLOBINE
- 2- LES PROTEINES DU PLASMA
- 3- L'ELECTROPHORESE (1ère partie)

par J.C. BARON



ABIDJAN MARS 1970

DONNEES DE BASE POUR LA
RECHERCHE SEROLOGIQUE APPLIQUEE AUX POISSONS

L ' H E M O G L O B I N E

- I Généralités
- 2 Préparation de l'hémoglobine
- 3 Etude électrophorétique de l'hémoglobine
- 4 Les enzymes respiratoires
- 5 La myoglobine
- 6 Hémoglobines animales
- 7 Influence de la présence d'hémoglobine

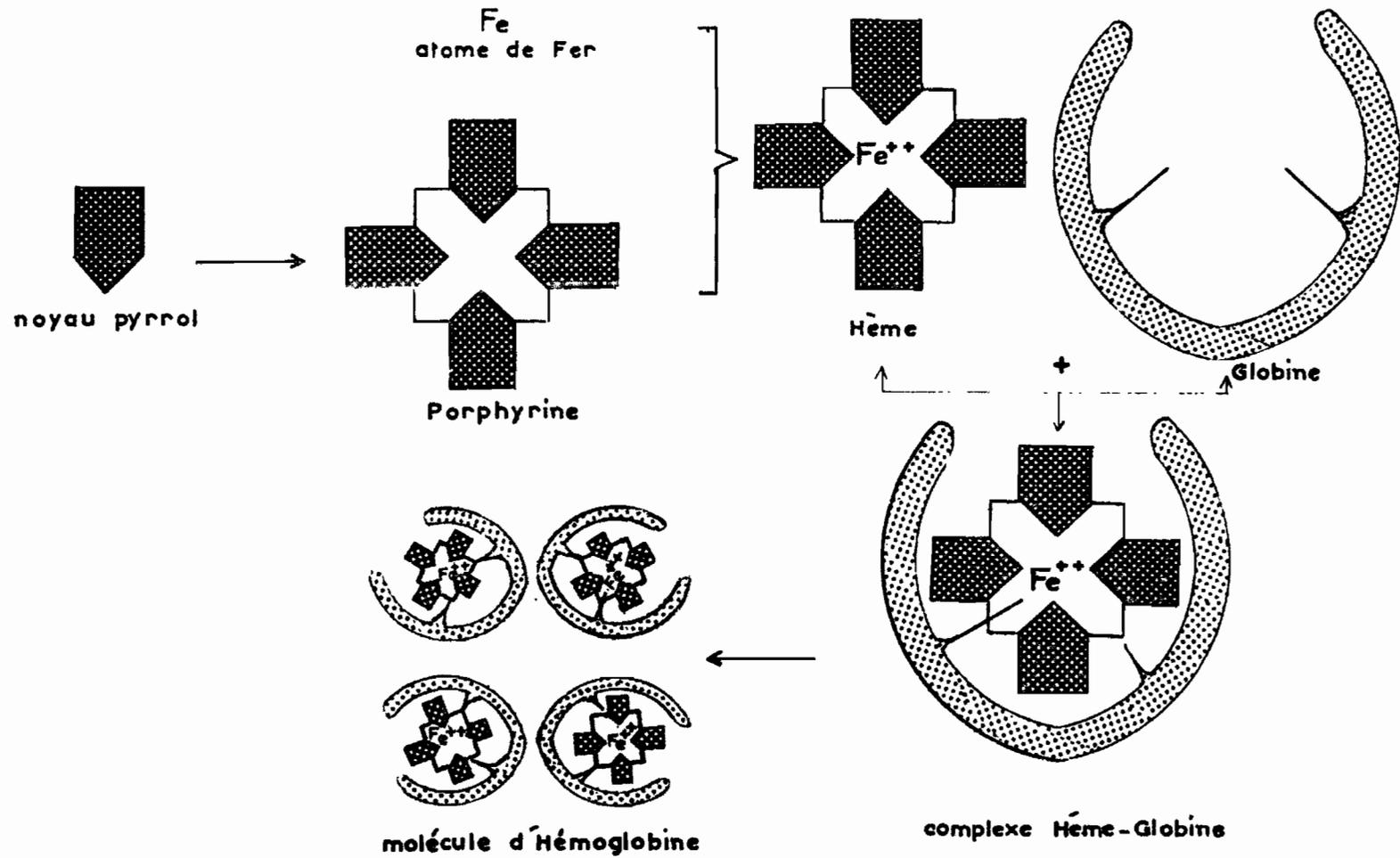


FIG. I FORMATION D'UNE MOLECULE D'HEMOGLOBINE (d'après H. LEHMANN
 et R.G. HUNTSMAN)

I. Généralités :

1.1. L'hémoglobine, pigment respiratoire

Les surfaces respiratoires des animaux terrestres et aquatiques restent séparées de l'air ou de l'oxygène dissous par de l'eau. La diffusion de l'oxygène dans l'eau est très lente et les animaux aquatiques actifs comme le maquereau mourraient d'asphyxie s'ils ne nageaient pas continuellement (l'eau les entourant n'étant pas renouvelée serait vite appauvrie en oxygène.) L'oxygène diffuse à travers les globules rouges et se fixe sur l'hémoglobine qui le transporte aux cellules ; la molécule d'hémoglobine s'élargit quand l'oxygène est relâché et se contracte quand les molécules d'oxygène y sont fixées. On connaît peu de choses sur les différents composants de l'hémoglobine. L'homme possède une hémoglobine multiple : A présente à 98% dans l'hémoglobine de l'homme adulte, A2, F particulière au nouveau né, C, S etc.. comme de nombreux animaux : Deux hémoglobines chez le cheval; hémoglobine A ou B chez le mouton. L'hémoglobine A du mouton a une meilleure affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine B et par conséquent une plus grande incidence sur les moutons d'Ecosse que sur ceux des marais de Douvres par exemple.

1.2. Nature de l'hémoglobine.

L'hémoglobine humaine est formée de globine (95 %) et d'hème, l'hème étant constitué d'1 atome de fer et d'une molécule de porphyrine (4 noyaux pyrrole) (fig.1) - Son poids moléculaire est d'environ 67.000. Notons que certaines hémoglobines primitives d'invertébrés ont un poids moléculaire variant de quelques milliers à 3.000.000, par exemple l'hémoglobine ou crythrocrurine de l'Arenicole marine (annélidé) a un poids moléculaire d'environ 2.900.000.

Les hémoglobines que l'on trouve dans la nature actuellement résultent d'une longue évolution et sont adaptées à des fonctions spécialisées chez les divers animaux.

Les 4 g de fer que possède l'homme en moyenne sont repartis de la façon suivante :

- Hémoglobine (circulation)	70 %
- Foie, rate, moëlle (stock)	20 %
- Myoglobine (muscle)	5 %
- Enzymes respiratoires (tissus)	5 %

.../...

- Quand l'hémoglobine libre apparait dans le plasma elle est liée à une α 2 globuline appelée haptoglobine pour former un complexe hémoglobine- haptoglobine trop gros pour franchir le glomérule rénal et c'est alors le foie qui l'élimine de la circulation. Si le taux d'hémoglobine libre dépasse la capacité de l'haptoglobine elle passe dans l'urine (c'est le cas dans la malaria)- L'hème elle même peut se trouver à l'état libre et former un complexe brun avec l'albumine : la méthomalbumine.

2. Préparation de l'hémoglobine :

C'est un matériel facilement obtenu par lyse des globules rouges. Ses chromoprotéines permettent de suivre la progression d'une électrophorèse dans un gel d'Agarose par exemple. L'hémoglobine peut être détectée photométriquement avec une longueur d'onde de 415 m μ ou grâce à ses propriétés péroxydasiques.

Le sang pris sur anticoagulant (citrate de Na, héparine ou solution d'Alsever) est centrifugé à 3 000 t/mn et un culot globulaire de 1 volume est prélevé. On lave trois fois les globules rouges avec de l'eau physiologique avant de les hémolyser par 5 volumes d'eau distillée. On centrifuge 10 minutes à 15000 t/mn pour séparer les stromas. Le surnageant peut être conservé au réfrigérateur. Certains auteurs activent l'hémolyse par addition de toluène ($\frac{1}{2}$ volume) ou de chloroforme (1 volume).

La solution d'hémoglobine ayant une très faible conductibilité il est bon de la mélanger avec du tampon pour gel pour éviter d'introduire une hétérogénéité dans le champ électrique.

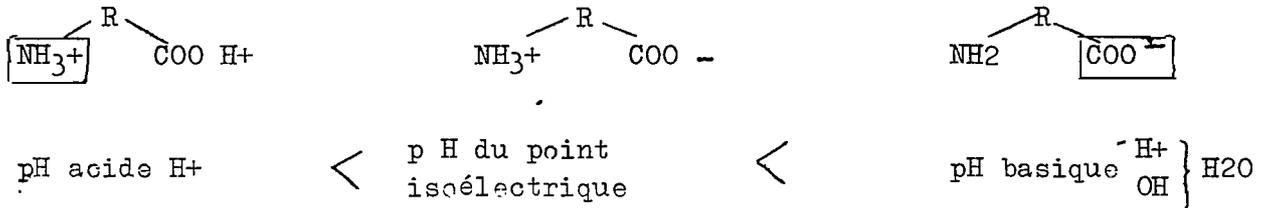
3. Etude électrophorétique de l'hémoglobine :

3.1. Introduction :

Toutes les protéines possèdent des groupements amine et carboxyle libres dont le bilan détermine la charge finale de la molécule et la valeur de son point isoélectrique.

La charge de la molécule d'hémoglobine dépend donc des résidus d'acides aminés porteurs de charges négatives COO⁻ (glutamyl ou aspartyl) ou de charges positives NH₃⁺ (arginyl ou lysyl) et principalement des résidus de surface, en contact avec le milieu extérieur.

.../...



Le point isoélectrique pour l'hémoglobine humaine est à pH = 7
et seul un pH compris entre 6,8 et 7,8 est compatible avec la vie, le
pH normal étant compris entre 7,3 et 7,5.

3.2. Mise en évidence de l'hémoglobine -

Après électrophorèse en gel d'Agarose, fixer les protéines
dans une solution d'acétate de zinc saturée à 50 % dans l'éthanol (2h)
puis laver 2h à l'eau distillée en renouvelant l'eau. Sécher sous
papier filtre à 37° et mettre 15 mn dans le bain préparé avant l'emploi
avec les trois solutions suivantes :

1.- SOLUTION DE BENZIDINE

- benzidine 1 g
- méthanol 100 ml

2.- TAMPON ACETATE pH = 4,7 = (0,1 M)

- acétate de Na 0,2 M 100 ml
- acide acétique 0,2 M 100 ml

3.- SOLUTION INHIBANT LA CERULOPLASTINE

- Na N₃ 0,1 M (sodium azide) 10 ml

PREPARATION DU BAIN :

- solution 1 : 10 ml
- méthanol : 60 ml
- solution 2 : 10 ml
- solution 3 : 10 ml
- eau oxygenée du commerce
(à 3%) 8 à 12 vol d'oxygène 10 ml

Laver à l'eau courante 5 à 10 minutes et sécher à 37°

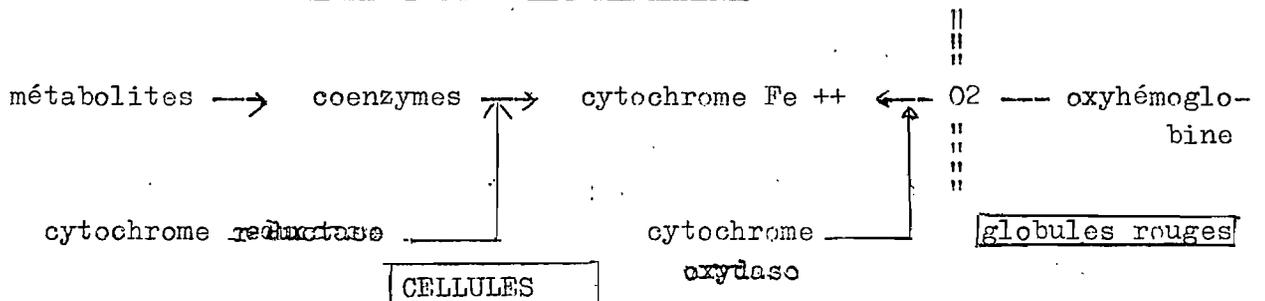
Remarque : L'étude en gel d'Agarose peut être faite par exemple avec un tampon phosphate pH = 7,3 (9,85 g de $K_2 HPO_4$ - 4,75 g $Na H_2 PO_4 \cdot 2H_2O$, 10 litres d'eau distillée). Ce tampon a été utilisé par N.P. WILKINS pour l'étude des hémoglobines de harengs et de sprats.

L'étude en gel d'amidon peut être effectuée avec du tampon borate de Na (acide borique 0,023 M ajusté à pH = 8 avec Na OH) contenant 0,1% (poids/volume) d'E.D.T.A. Le tampon pour les bacs est alors du borate de Na 0,3 M.

3.3. Le complexe haptoglobine - hémoglobine : Ce complexe peut être révélé après électrophorèse du sérum additionné d'hémoglobine par une réaction à la benzidine simple. Il suffit de faire dissoudre une pastille de benzidine bioxyde de baryum (Benzilino. Tablett Merck) dans 2,5 ml d'eau distillée et 2,5 ml d'acide acétique glacial puis de badigeonner le gel avec cette solution. Les complexes Hp/Hb apparaissent en bleu.

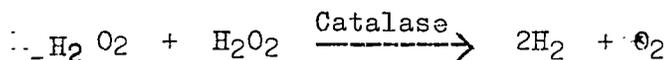
4. LES ENZYMES RESPIRATOIRES :

4.1 Le système des cytochromes :



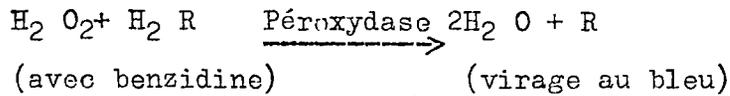
4.2 Péroxydase et catalase. De ces deux enzymes contenant de l'hème, la catalase se trouve principalement chez les animaux et la peroxydase dans les végétaux. Ces enzymes possèdent un Fer ferrique (et non ferreux comme pour l'hémoglobine).

La catalase agit sur $H_2 O_2$ directement en utilisant une molécule d' $H_2 O_2$ comme d' H_2 pour former de l'eau et libérer de l'oxygène :



La peroxydase utilise un autre corps comme donneur d'hydrogène :

.../...



L'hème a une activité péroxydasique et permet à un donneur d'hydrogène incolore tel que la benzidine, en présence d'H₂ O₂ de virer au bleu sous l'effet de l'oxydation.

5.- LA MYOGLOBINE

La myoglobine stocke de l'oxygène et l'hémoglobine le transporte. La capacité de la myoglobine et de l'hémoglobine à se combiner de façon réversible à l'~~oxygène~~ n'est pas unique : l'hémocyanine des invertébrés (qui est une protéine à fonction respiratoire contenant du cuivre et que l'on trouve dans l'hémolymphe de certains ordres de mollusques et de crustacés) et quelques complexes du cobalt en sont capables.

6.- HEMOGLOBINES ANIMALES :

6.1.- Oiseaux et reptiles l'hémoglobine migre à la vitesse des globulines humaines alors que chez les mammifères elle migre à la vitesse des β globulines.

Deux hémoglobines ont été mises en évidence chez les poulets, oies et canards et chez les autres animaux une seule protéine possède une activité péroxydasique alors que la coloration à l'Amidoschwartz révèle plusieurs bandes.

6.2.- Poissons : Des variations intraspécifiques ont été trouvées chez Gadus merlangus et Gadus morrhua (Fig2) par Sick au cours d'électrophorèse en gel d'agar (tampon phosphate pH = 7,3 μ = 0,02, 200 volts pendant 30 minutes ou 60 minutes)

L'hémoglobine de G. morrhua est sous le contrôle du locus HbI comportant 2 allèles HbI¹ et HbI².

Les deux types d'anguille, Anguilla rostrata (Amérique) et Anguilla anguilla (Europe) ont chacun deux hémoglobines de mobilités identiques alors que l'espèce Japonaise A. Japonica possède quatre hémoglobines de mobilités différentes.

Chez Pleuronectes platessa et Platichthys flesus les supposés hybrides possèdent sept bandes différant des bandes de P.p et P.f. et ~~différant~~ de leur combinaison. Les molécules des hybrides semblent avoir été formées par association de sous unités de chacun des parents.

L'étude de l'hémoglobine des sprats norvégiens par Naevdal (1966) donne des résultats assez confus et difficilement interprétables dans l'hypothèse d'expression phénotypique d'un mécanisme génétique.

Les électrophorégrammes obtenus (fig.3) donnent quatre composants formant trois types principaux a1, a2 et b correspondant aux types 1, 2 et 3 de Wilkins et quatre types secondaires c, d, e et f de composants plus faibles dont le nombre semble croître au cours de la conservation de l'hémoglobine. Pour ces mêmes raisons, les types a1 et a2 ont été groupés.

Le phénotype b représenterait des hétérozygotes possédant deux allèles contrôlant les fractions 1 et 2. Le phénotype a serait un homozygote et le phénotype e serait le second. Cette hypothèse concorderait avec la loi de Hardy-Weinberg, sauf pour les phénotypes c, d et f ce qui donnerait à penser que la fraction 2 serait instable. Il se pourrait que c, d et e soient l'expression d'un même génotype. En conclusion les sprats des eaux norvégiennes forment plusieurs populations comme l'avait suggéré Dannevig (1951) après étude du nombre de vertèbres. Chez d'autres poissons par contre aucun polymorphisme n'a pu être mis en évidence, ainsi les 18 Coryphènes étudiées à Abidjan présentent une hémoglobine constante à 3 fractions antigéniquement identiques. Il ne semble pas non plus y avoir de polymorphisme de l'hémoglobine chez les Sardinella eba d'Abidjan, comme chez les Sardina pilchardus de l'Adriatique (KRAJNOVIC).

Les hémoglobines des saumons provenant de régions aussi différentes que le Canada et l'Ecosse ont des fractions de structures identiques comprenant 8 chaînes polypeptidiques distinctes et confirmant l'absence de variation entre les différentes populations.

.../...

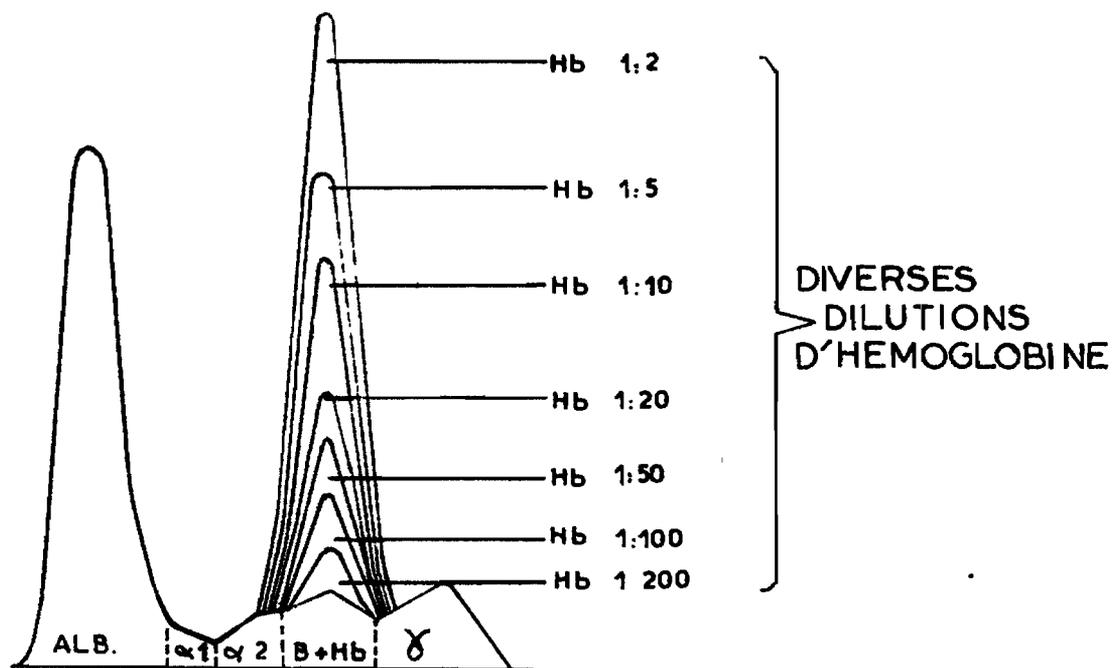


FIG. 4.—VARIATIONS DE LA COURBE PHOTOMETRIQUE DU
 SERUM HUMAIN EN FONCTION DES CONCENTRATIONS
 D'HEMOGLOBINE —

7.- INFLUENCE DE LA PRESENCE D'HEMOGLOBINE DANS LES SERUMS HUMAINS SOUMIS A L'ELECTROPHORESE.

7.1.- Conditions d'expérience : Le support est du papier de 4 cm de large, le tampon est un tampon véronal-véronal sodé de pH = 8,6 et de force ionique 0,1 sous 160 volts et 1,25 mA par bande durant 6 heures.

La solution d'hémoglobine humaine est obtenue en ajoutant 2 volumes d'eau distillée et 1 volume de toluène à 1 volume d'hématies lavées 4 fois à l'eau physiologique. Après broyage à l'agitateur de verre on centrifuge à 10.000 tours minute et on recueille la couche limpide sous le toluène. On rajoute 1 volume de toluène à la solution recueillie et l'on centrifuge pour éliminer les stromas.

La solution d'hémoglobine est ajoutée à diverses dilutions au sérum avant la migration.

7.2.- Résultats : Même à une dilution de $\frac{1}{200}$, alors que

la coloration du sérum est à peine visible, l'hémoglobine donne une tache qui se traduit sur la couche photométrique par un pic confondu avec celui des β globulines et faussant l'évaluation des fractions protéiques (fig.4). On constate que plus la concentration en hémoglobine est grande plus les perturbations retentissent sur les fractions voisines des β globulines.

En conclusion il est impossible d'évaluer les taux des globulines β et α_2 dans les sérums hémolysés.

DONNEES DE BASE POUR LA
RECHERCHE SEROLOGIQUE APPLIQUEE AUX POISSONS

LES PROTEINES DU PLASMA

- 1 Généralités
- 2 Séparation des protéines du sérum
- 3 Propriétés et fonction biologique
- 4 Immunoprotéines et isoagglutinines
- 5 Enzymes
- 6 Fibrinogène

espèces	Concentration en protéines du plasma en g/litre
Homme	60 - 80
Boeuf	76
Chien	60
Lapin	55
Vipère	50 - 60
Anguille	65 - 70
Coryphène (s)	65
Mérou (s)	62
Marlin (s)	61
Acanthocybium (s)	55

espèces	Concentration en protéines du plasma en g/litre
Alosa pseudoharengus (s)	56
Saumon adulte	56
Saumon smolt	48
Congre	50
Labre	46
Sardinella ceba (s)	46
Rascasse	35
Sélaciens	32
Homarus americanus	22 - 102
Cancer magister	11,5-137,5

TABLEAU I : Teneur en protéines du plasma ou du sérum (s) chez quelques animaux

Le sang est un liquide contenant en solution des sels minéraux et des composés organiques et en suspension des globules : les érythrocytes (gl. rouges), les leucocytes (gl. blancs) et les thrombocytes.

Le plasma sanguin est obtenu par addition d'anticoagulants au sang frais (citrate de sodium, héparine) puis par séparation des globules par centrifugation. La densité et la viscosité du plasma sont fonction de la teneur en protéines totales qui varie selon les espèces, les individus et les conditions physiologiques (voir tableau I). Ainsi chez l'Alose la teneur est de 59 g/l avant la ponte et de 53 g/l après la ponte. Chez le saumon sain la teneur en protéine varie de 43 à 86 g/l et chez le saumon malade de 28 à 77 g/l. Les protéines du plasma sont le fibrinogène qui précipite lors de la coagulation, l'albumine et les globulines ; elles possèdent des propriétés physiologiques multiples, déterminant le pH et la pression osmotique, ont un rôle de transport et de fonction hormonale, enfin protègent l'individu contre les infections. Les procédés physico-chimiques tels que l'électrophorèse et l'ultracentrifugation ont permis d'identifier les diverses fractions α , β et γ des globulines. Le tableau II montre les caractères de quelques protéines plasmatiques humaines.

2 - Séparation des protéines du sérum. Elle était autrefois obtenue par salification fractionnée avec du sulfate d'ammonium et de sodium. Actuellement, on fait appel à l'électrophorèse pour caractériser analytiquement les plasmas ou sérums individuels, le plus souvent à l'électrophorèse sur papier (TURBA, GRASSMANN et HANNIG). Un électrophérogramme normal, exécuté à un pH de 8,6, voit toutes les protéines migrer vers l'anode. L'albumine migre le plus rapidement, ensuite viennent les fractions des globulines α_1 , α_2 , β et γ . Ce ne sont pas encore des protéines homogènes,

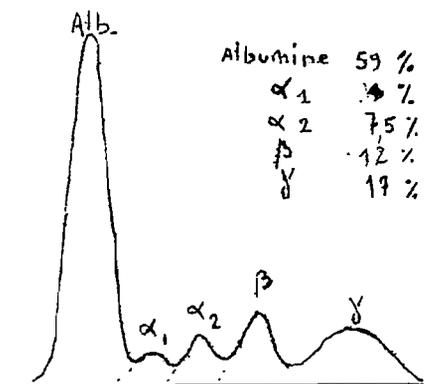


Fig.1- Courbe photométrique d'une électrophorèse de sérum humain sur papier.

pourtant les quantités relatives de ces fractions permettent cliniquement certaines conclusions. L'électrophérogramme du sérum normal et sa courbe d'évaluation correspondante sont représentés fig.1. Des sérums pathologiques montrent souvent des images qui s'en éloignent nettement ; parfois, ils révèlent des "paraprotéines" qui n'existent pas dans les sérums normaux.

On obtiendra une séparation plus poussée des protéines en utilisant l'immuno-électrophorèse. Ici, les protéines séparées par électrophorèse vont diffuser à l'encontre d'un antisérum. Au contact d'une protéine et d'un anticorps, se formera un arc de précipitation (fig.2).

En plus de la mobilité électrophorétique, la vitesse de diffusion et la spécificité sérologique sont des facteurs déterminants pour la position des arcs. On peut, de cette manière, distinguer plus de 20 composants. Pour obtenir en quantité suffisante des protéines isolées à partir du plasma sanguin; on fait appel à une méthode étudiée par E. COHN et ses collaborateurs.

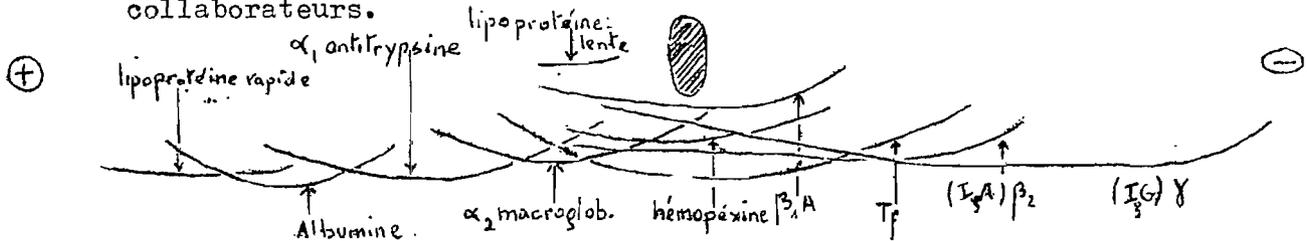


Fig.2 - Séparation immuno-électrophorétique d'un sérum humain normal et schéma de la position des lignes de précipités obtenus.

(Le cercle correspond au point de dépôt de l'électrophorèse. Les anticorps sont déposés dans une gouttière à la partie inférieure.)

Nous décrivons rapidement la méthode en nous appuyant sur le schéma suivant. Le plasma est porté au pH 7,2 et additionné d'alcool jusqu'à une concentration de 8% ; le précipité (fraction I, surtout du fibrinogène) est centrifugé, le surnageant porté au pH 6,9 et à une concentration de 25 % en alcool. Les fractions II et III précipitent, composées de β et de γ globulines ; elles contiennent toutes les immunoprotéines et les iso-agglutinines spécifiques des groupes sanguins et une partie des lipoprotéines. La solution est diluée à 18 % d'alcool et portée au pH 5,2. La fraction IV.1 précipite, formée de lipoprotéines. Le reste de la solution est porté à un pH 5,8 et à un taux d'alcool de 40 %. La fraction IV-4 contient les globulines restantes. Enfin, pour une concentration d'alcool identique, le pH passe à 4,8. Les albumines précipitent alors, représentant la plus grande fraction homogène des protéines. La suite entière de ces réactions doit être effectuée à une température de -2° à -5° pour éviter la dénaturation et par là l'insolubilité des protéines.

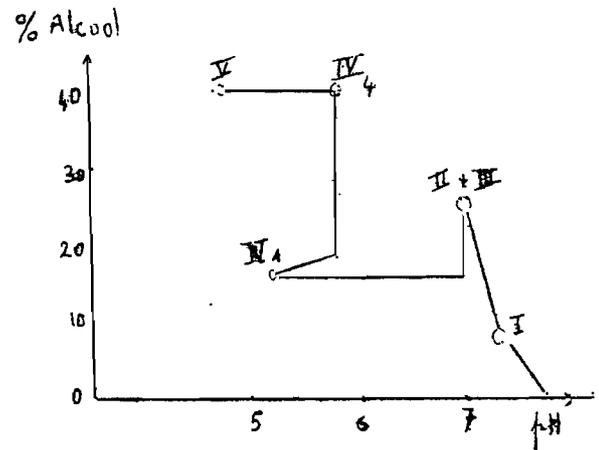


Fig.3- Schéma de fractionnement du plasma

3.- Propriétés et fonction biologique. Les propriétés les plus importantes sont rassemblées dans le tableau II

3.1- L'albumine est une molécule élliptique de 150 Å de longueur, dont le rapport des axes est de 4/1 (voir fig.4). Elle sert essentiellement à la régulation osmotique du sang et constitue en même temps une réserve protéique pour l'organisme. En outre, l'albumine a la faculté de pouvoir se lier réversiblement à toutes les substances chargées négativement. C'est pourquoi elle peut assumer le rôle de transporteur.

3.2- Les globulines comprennent des protéines très diverses dont quelques métalloprotéines renfermant du fer, du zinc et du cuivre. La céruléoplasmine cuivreuse (PM 150 000) possède l'action enzymatique d'une laccase. On ignore encore si une signification biologique est attachée à cette action. Parmi les α et les β - globulines, se trouvent les glyco- et lipoprotéines. Elles renferment du cholestérol et des phospholipides. La β_2 lipoprotéine a été spécialement bien étudiée ; c'est une particule sphérique d'un poids moléculaire étonnamment élevé : 1,3 million.

Le quart environ contient une composante protéique particulière constituée de 30 % de cholestérol (en partie libre, en grande partie estérifié) et de phospholipides. Le rôle de ces lipoprotéines dont la constitution n'est peut-être pas toujours constante, réside dans le transport de substances hydrophobes en milieu aqueux, le sang. Ce principe est diversement appliqué dans l'organisme vivant. Malgré leur faible fraction peptidique insuffisante pour recouvrir la surface sphérique, les lipoprotéines se comportent comme des protéines. Pourtant elles possèdent une faible densité et montent vers la surface lors d'une centrifugation en solution normale de chlorure ou de bromure de sodium.

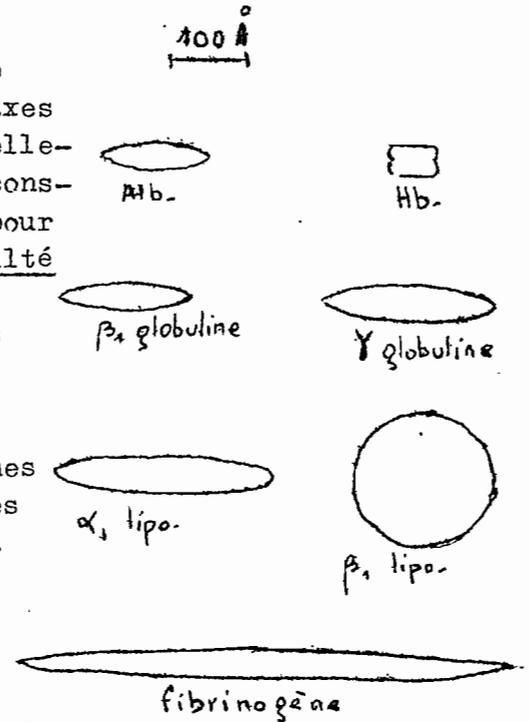


FIG.4- Dimensions comparées des molécules protéiques de sang (Oncley)

- 4.- Immunoprotéines et iso-agglutinines.- On les trouve parmi les γ globulines qui représentent une fraction sérique très hétérogène et difficile à séparer. Les anticorps individuels que l'on peut déterminer avec les antigènes correspondants ne constituent qu'une part évanescence des γ globulines. On les rencontre souvent, en quantité plus grande, après une maladie infectieuse.

Les iso-agglutinines sont des protéines qui possèdent une spécificité analogue à celle des anticorps contre des globules étrangers. Cette spécificité existe régulièrement, c'est-à-dire qu'elle n'a point été provoquée artificiellement par un antigène. Avec les substances des groupes sanguins, elles sont responsables de l'incompatibilité de nombreuses transfusions sanguines.

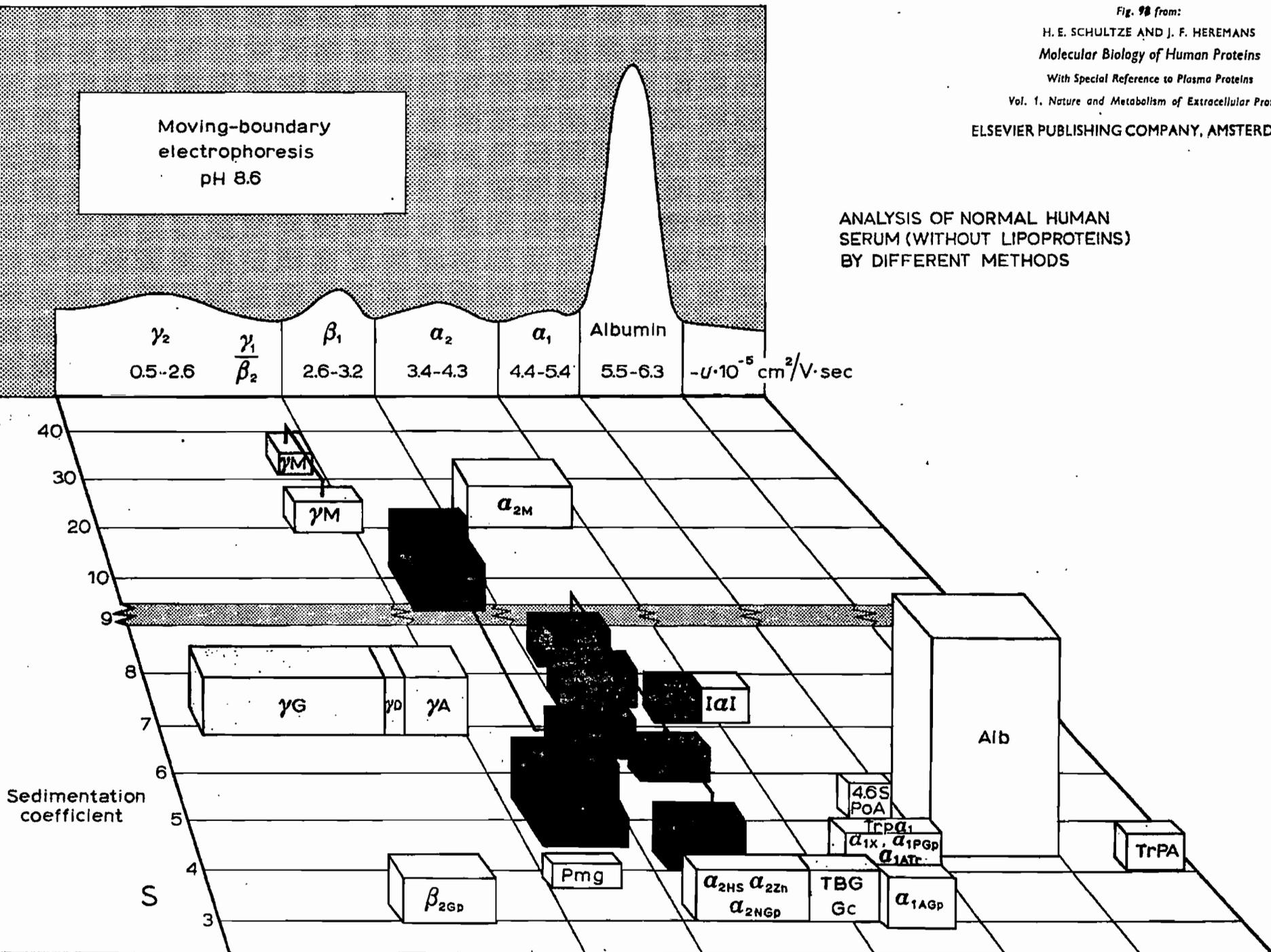
- 5.- Enzymes.- En plus de la céruléoplasmine et des enzymes de la coagulation sanguine, le plasma normal contient seulement quelques estérases. Cependant, dans des conditions pathologiques déterminées, des enzymes peuvent parvenir des tissus dans le plasma, l'acide glutamique-oxalocétate-transaminase (infarctus cardiaque) ou la lactate-déshydrogénase (dans la plupart des maladies du Foie) par exemple. La détermination d'enzymes dans le plasma a ainsi une valeur pour le diagnostique.

- 6.- Fibrinogène, fibrine et coagulation du sang.- Le phénomène de la coagulation sanguine repose sur une transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble, constituée par une trame protéique fibreuse. Tous les détails de la coagulation sanguine ne sont pas encore connus ; la discussion porte aujourd'hui sur dix facteurs différents désignés par des chiffres romains.

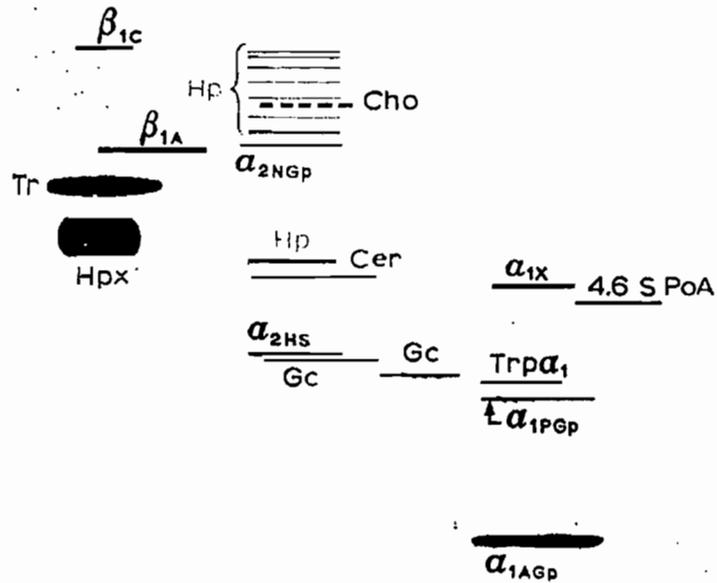
.../...

Protéines du plasma	% des protéines totales	poids moléculaire	mobilité électrophrétique en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot 10^5$ déterminée en élec. libre à pH=8,6 force ionique 0,1
Albumine	56 - 64	69.000	6,1
α_1 Glyco-protéine	-	54.000	5
Céruplasmine	0,2-0,5	150.000	4,6
α_2 Macroglobuline	1,5 - 4,5	820.000	4,2
Transferrine	3 - 6,5	90.000	3,3
β_A Globuline	1,6	160.000	2,2
β_M Globuline	1	960.000	2
Fibrinogène	5	340.000	2,1
γ Globuline	10 - 17	160.000	1,1

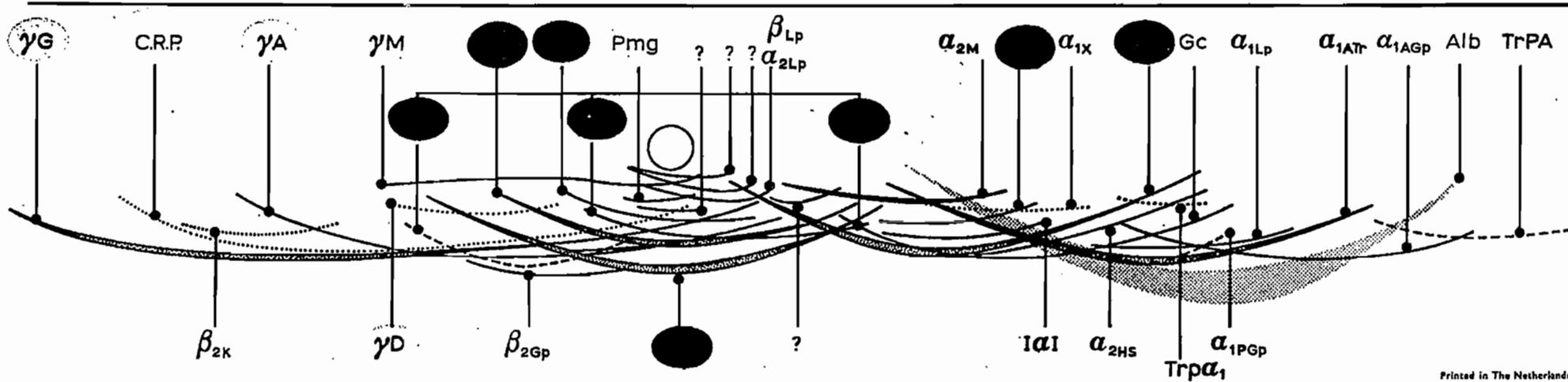
Tableau II : Propriétés des fractions plasmatiques



Starch-gel electrophoresis
(two-dimensional)



Immunoelectrophoresis
(lipoproteins included)



DONNEES DE BASE POUR LA
RECHERCHE SEROLOGIQUE APPLIQUEE AUX POISSONS .

L'ELECTROPHORESE

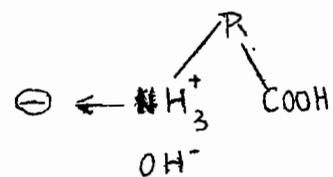
1° Partie : PRINCIPES

- 1- Introduction
- 2- L'électrophorèse libre
- 3- L'électrophorèse de zone
- 4- Mobilité électrophorétique
- 5- Caractérisation des protéines.

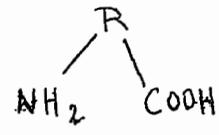
L'ELECTROPHORESE

I- PRINCIPES

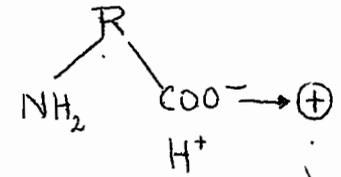
1 - Introduction : Les protéines présentent à la fois des groupements acides et des groupements basiques donnant lieu à une ionisation superficielle qui est fonction du pH. Les propriétés amphotères des protéines les font agir comme un acide en milieu basique et comme une base en milieu acide. Pour un certain pH la protéine est électriquement neutre : c'est son point isoélectrique. En milieu basique l'ionisation porte sur les groupes carboxyl et en milieu acide sur les fonctions amine.



milieu acide



point isoélectrique



milieu basique

Les tampons utilisés en électrophorèse des protéines ont pour la plupart un pH alcalin (8,2 - 8,6 - 9,2) donnant une migration anodique. Leur force ionique est donnée par la formule

$$\mu = \frac{1}{2} \sum m_i v_i^2$$

où m_i est la concentration molaire
et v_i la valence

L'électrophorèse est une technique qui permet de mettre en évidence les constituants d'un mélange de protéines par la différence de leur mobilité dans un champ électrique.

La mobilité électrophorétique μ d'une substance est la distance en cm parcourue par cette substance en une seconde sous l'influence d'un gradient de potentiel E de un volt par cm.

$$\mu = \frac{d}{t \cdot E} \quad \frac{\text{cm}}{\text{sec} \frac{\text{v}}{\text{cm}}} = \frac{\text{cm}^2}{\text{sec} \cdot \text{v}}$$

μ est de l'ordre de 1 à $6 \cdot 10^{-5}$ cm par seconde par gradient de 1 volt/cm soit 1 à $6 \cdot 10^{-5}$ cm². volt⁻¹ sec.⁻¹.

La vitesse de migration est proportionnelle à la charge et inversement proportionnelle au coefficient de friction de la particule.

On distingue deux sortes d'électrophorèse.

- 1- l'électrophorèse libre
- 2- l'électrophorèse de zone.

- 2.- L'électrophorèse libre : Mise au point par Tiselius elle utilise la méthode des déplacements de frontières. Elle permet la détermination précise de la mobilité des constituants et leur analyse quantitative. Les divers constituants du mélange se séparent uniquement à l'interface tampon-solution et se manifestent sous forme d'une série de frontières mises en évidence par un système optique approprié.
- 3.- L'Electrophorèse de zone : Les constituants du mélange se séparent suivant leur mobilité électrique en zones distinctes à l'intérieur d'un support dont le rôle est de stabiliser les zones durant l'électrophorèse vis à vis des perturbations caloriques, mécaniques et de la pesanteur. Les divers supports employés sont : le papier, la poudre de cellulose, le chlorure de polyvinyl, l'acrylamide, l'amidon, l'agarose et des mélanges comme le Séphadex-agarose-amidon ou l'agarose-acrylamide.

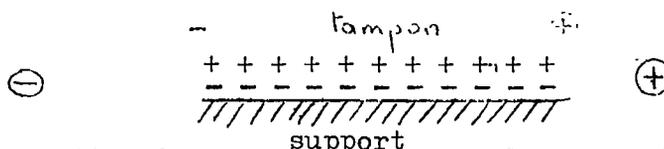
Trois facteurs jouent un rôle important :

1. - le courant d'électro-endosmose
2. - le pouvoir adsorbant du support
3. - la porosité du support.

.../...

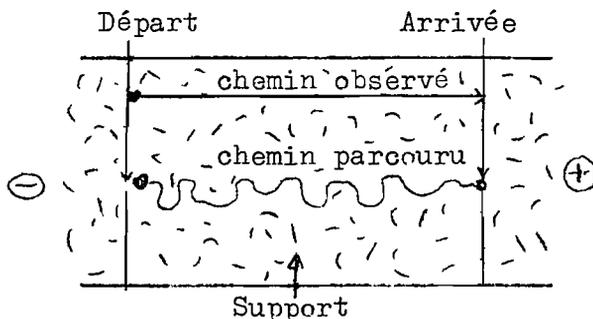
3.1.- L'électroendosmose est le déplacement de la solution d'électrolyte vers la cathode (pôle négatif) ce qui entraîne un déplacement dans le même sens de tous les constituants soumis à l'analyse donc un décalage des protéines vers le pôle négatif.

Le support, fixe, ayant une charge généralement négative par rapport au tampon, l'intensité du courant d'électro-endosmose dépend du choix du support, du pH et de la force ionique du tampon.



3.2.- L'adsorption des constituants sur le support se fait par échange ionique et joue peu pour la plupart des protéines qui ont une charge négative au pH où se fait l'électrophorèse.

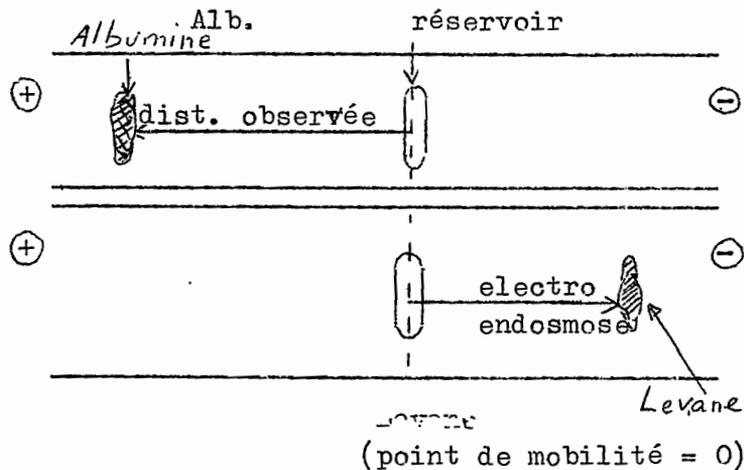
3.3.- La porosité du support est due aux capillaires formés dans ce support et le chemin parcouru dans ces capillaires est plus long que celui observé en surface d'où un facteur de correction.



4. - Mobilité électrophorétique. Le calcul de la mobilité électrophorétique d'une substance doit tenir compte du facteur de correction de porosité et de la valeur du flux électro-osmotique déterminable par l'emploi d'une substance électriquement neutre comme le dextrane ou le levane.

.../...

Ainsi la mobilité absolue de la sérum albumine en tampon véronal pH = 8,2 et de force ionique = 0,1 est de $6,1 \times 10^{-5}$ cm² volt⁻¹ sec⁻¹, calculée sur la distance observée + l'électro-endosmose.



P. Grabar a proposé d'exprimer la mobilité en valeur relative en prenant une protéine de référence telle que la sérum albumine. Dans ce cas la mobilité relative est la même quelle que soit la méthode d'électrophorèse employée et égale au rapport $\frac{U_x}{U_r}$ des distances parcourues par la substance étudiée (U_x) et la protéine de référence (U_r)

5.- Caractérisation des protéines

Les constituants séparés par l'électrophorèse sont mis en évidence par des réactions colorées avec de l'Amidoschwarz, de l'azocarnin, du rouge ponceau, de la nigrosine, du bleu de bromophénol etc...

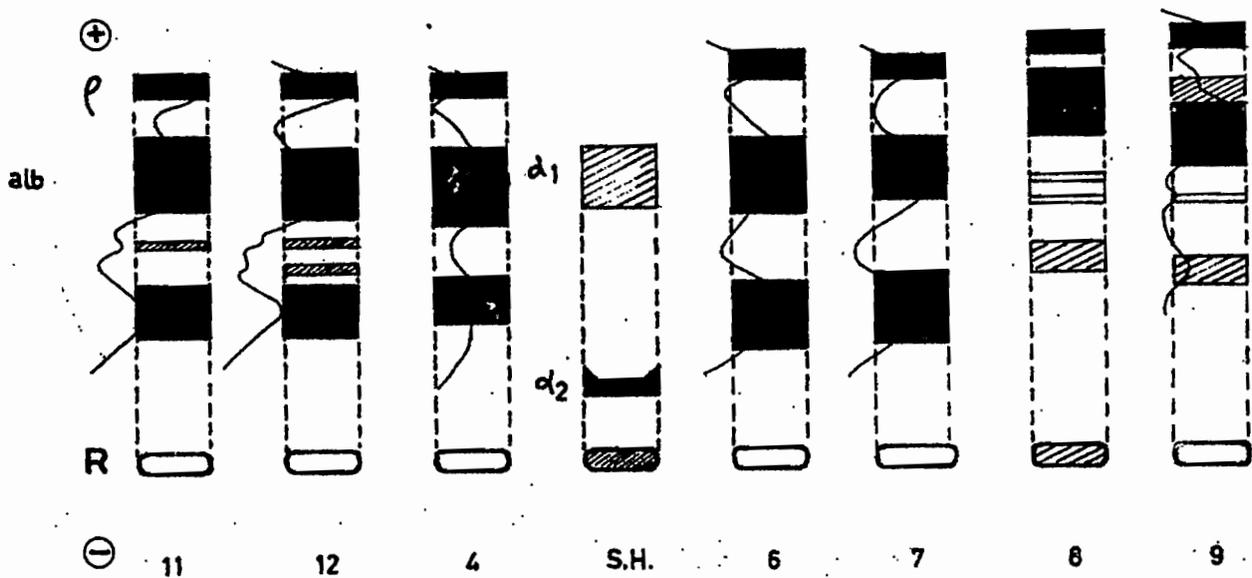
Il existe des colorants spécifiques des lipoprotéines tels que le Soudan noir acétylé (méthode de précoloration) le noir Soudan dans l'alcool éthylique (coloration bleu) et l'OIL RED O, (cf. planche I)

Les glycoprotéines sont mises en évidence par le réactif de Schiff donnant une coloration rose violacée ou du Nitrate d'Argent donnant une coloration foncée que l'on fixe au Thiosulfate de Na.

.../...

Les métalloprotéines contenant du cuiivre sont colorables à l'alizarine blue. La transferrine porteuse de Fer se révèle en rose par la bathophénantroline et en vert par le Nitroso R salt mais la meilleure méthode est le marquage en Fe 59 radioactif que l'on révèle par autoradiographie.

Enfin les électrophorogrammes, plus ou moins colorés selon la concentration en protéines et rendus translucides par divers procédés sont analysés sur un photomètre enregistrant la densité optique des diverses fractions et donnant une courbe caractéristique et le pourcentage des différents composés. La planche I nous montre un électrophorogramme de sérums de sardinella eba coloré à l'OIL RED O ainsi que les courbes photométriques correspondantes.



ÉLECTROPHORÉGRAMME ET COURBES PHOTOMÉTRIQUES DE LIPOPROTÉINES DE SÉRUMS DE SARDINELLA éba DU 17-4-68

Gel d'Agarose I.B.F. à 1,5%. Tampon de Hirschfeld pH = 8,4. 4heures à 5 v/cm