
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE ET D'ANATOMIE COMPARÉE
ET STATION DE ZOOLOGIE EXPÉRIMENTALE DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE.
Directeur: Professeur E. GUYÉNOT.

Fractionnement par électrophorèse sur papier des protéines sériques de trois espèces du genre *Triturus*¹

par

V. KIORTSIS et M. KIORTSIS

Avec 2 figures dans le texte.

L'électrophorèse du sérum sur milieu solide — papier, agar ou gel d'amidon — ainsi que l'immunoélectrophorèse, ont été utilisées récemment et à plusieurs reprises pour mettre en évidence des différences spécifiques ou raciales chez les animaux (CHEN 1959, DESSAUER et FOX 1956, BARGETZI 1958). La simplicité et la précision de ces méthodes, la faible quantité de sérum requis, constituent des avantages sérieux, surtout quand on s'adresse à des animaux de petite taille.

Au cours d'une étude sur les variations des fractions protéiniques dans le blastème régénérateur, en voie de différenciation, nous avons eu l'occasion de soumettre au fractionnement électrophorétique les protéines du sérum de plusieurs espèces de Batraciens Urodèles, en particulier trois appartenant au genre *Triturus*. L'information dans ce domaine étant encore fragmentaire et faisant parfois complètement défaut, il nous a paru utile de rapporter nos observations.

Matériel-méthode. Les animaux utilisés appartiennent à trois espèces européennes du genre *Triturus*. Les uns (*T. cristatus* Laur.) proviennent du nord de l'Italie ou de la Haute-Savoie (France).

¹ Travail exécuté et publié avec l'aide de la « Donation Georges et Antoine Claraz, instituta et curata Johannis Schinz professoris auspiciis ».

Les autres (*T. alpestris* Laur. et *T. helveticus* Razoumofsky) ont été capturés aux environs de Genève ou dans le Jura. Ce sont des adultes, arrivés à maturité sexuelle, vivant dans l'eau. Ils sont examinés à différentes époques de l'année.

La prise de sang est faite, soit après amputation d'une patte, soit par ponction cardiaque. On le recueille dans des tubes capillaires, on l'y laisse coaguler et on bouche les deux extrémités du tube à la paraffine. Une centrifugation de 5 min. à 4000 t/min. suffit pour séparer les globules du sérum. Immédiatement après, 0,01 ml de sérum est placé dans une rigole de plexiglas, de 3 cm de longueur et adsorbé par capillarité sur une bande de papier Whatman n° 1, préalablement imbibée de solution tampon. Le sérum déposé se trouve à une distance de 12 cm de l'anode et l'électrophorèse se fait avec un appareil Elphor (cuve Multelphor à six bandes) dans les conditions suivantes:

Solution tampon à base de Véronal sodique et d'acétate de Na, ajusté au pH 8,6, ayant une force ionique 0,1. Différence de potentiel aux bornes 120 V. Durée 14 heures. Après séchage, coloration à l'Amidoschwarz 10 B. La détermination quantitative des fractions s'effectue par photométrie directe des bandes avec un photomètre-lecteur (modèle 502 *a* de Bender et Hobein). La surface des courbes est évaluée par planimétrie et le pourcentage que représente la fraction, calculé en conséquence.

La mesure de la concentration en protéines du sérum se fait selon la technique de LOWRY et a., modifiée par OYAMA et EAGLE (1956). Une solution standard d'albumine bovine puris. CHROMA sert d'étalon. Le contenu en azote total de cette substance est déterminé, une fois pour toutes, par la méthode d'ultramicro-Kjeldahl de BOELL et SHEN ¹.

La comparaison des valeurs obtenues par spectrophotométrie, entre la solution étalon et le sérum, permet l'évaluation de la concentration en protéines de ce dernier. L'équivalent de ces protéines est exprimé directement en μg d'azote total par ml de sérum.

Résultats. Les sérums de chacune des trois espèces examinées donnent des phérogrammes caractéristiques (fig. 1). Malgré les différences de provenance, d'âge, de sexe, de saison, de conditions

¹ Nous remercions le Dr P. S. Chen, professeur à l'Université de Zurich, d'avoir bien voulu se charger de cette détermination.

nutritives, de concentration absolue en protéines du sérum, etc., la vitesse de migration, les proportions relatives des fractions, la configuration générale de la courbe d'extinction (fig. 2) sont propres à l'espèce. Nous avons examiné plus de 14 individus de chaque espèce et nous avons pu reconnaître, dans tous, le type du phérogramme correspondant.

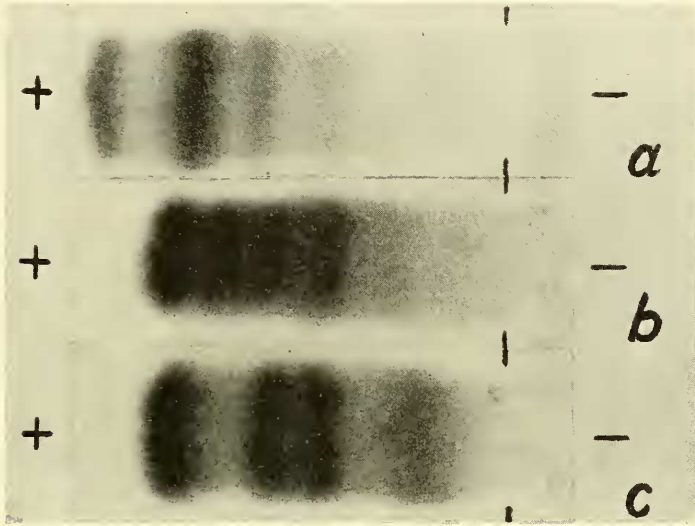


FIG. 1.

Phérogrammes des protéines du sérum dans le genre *Triturus*.
a. *T. helveticus*, b. *T. alpestris*, c. *T. cristatus*.

D'une manière générale la migration totale des protéines sériques est faible, inférieure à 8 cm. Nos résultats concordent avec les observations d'autres auteurs (FRIEDEN et al. 1957) et rentrent dans le cadre de la classification provisoire de DESSAUER et FOX qui assignent aux phérogrammes des sérums d'Urodèles une place à part, avec une migration totale de moins de 12 cm.

1. *Triturus cristatus* (fig. 1 c et fig. 2 III).

On y distingue toujours quatre fractions principales. En accord avec FRIEDEN et al., nous considérons la première de ces fractions, la plus rapide, comme représentant les albumines. Toutefois, n'ayant pas de certitude quant à leur nature chimique et ne possédant pas

ces substances isolées, nous n'avons pu établir et appliquer un facteur de correction approprié, facteur nécessaire pour l'évaluation quantitative précise des albumines après coloration à l'amidoschwarz (WUNDERLY 1956). D'ailleurs, la variabilité dans la proportion relative de ces albumines est considérable entre différents individus de *T. cristatus* (et il en va de même pour les deux autres espèces); de ce fait, et en l'état actuel de la recherche, la précision nous semble superflue.

Les trois autres fractions (globulines ?) sont simplement numérotées de 1 à 3, allant de la plus rapide à la plus lente. Leurs proportions relatives sont sujettes à des variations moins étendues que le rapport des albumines avec le reste des protéines sériques. On peut considérer les albumines comme dépendant, davantage que les autres fractions, des conditions du milieu.

L'hémoglobine, après hémolyse, s'insère entre les fractions 1 et 2; la courbe normale d'extinction se trouve de ce fait faussée. Elle comporte trois élévations au lieu de quatre, celle du milieu résultant de la fusion des fractions 1 et 2 avec l'hémoglobine. C'est l'image que donnent ANTONACI et MACAGNINO (1957) dans leur publication. Nous avons pu la reproduire dans des électrophérogrammes de sérum hémolysé. Dans nos résultats, nous n'avons pris en considération que des phérogrammes de sérums parfaitement propres et nous les avons toujours comparés avec d'autres, effectués après hémolyse partielle. Nous avons pu ainsi localiser l'hémoglobine et révéler les artefacts que sa présence introduit dans la courbe d'extinction.

La migration totale des protéines de *cristatus* atteint, en moyenne, 7,0 cm avec, pour la fraction albuminique, 6,0 cm et les fractions 1, 2 et 3, respectivement 4,4 cm, 3,4 cm et 2,2 cm (voir tableau II).

Le contenu en protéines du sérum de *cristatus* est, en moyenne, de $54,6 \pm 3,53$ μg de N total/ml, mais assez variable suivant les individus (tableau III). Là, où nous avons pu effectuer l'électrophorèse et la détermination des protéines du sérum chez le même individu, nous avons constaté une concordance parfaite — relation linéaire — entre les valeurs du dosage des protéines et la surface totale de la courbe d'extinction du phérogramme correspondant.

Pour les petites espèces — *alpestris* et, surtout, *helveticus* — où les deux opérations n'ont pu être faites simultanément sur le

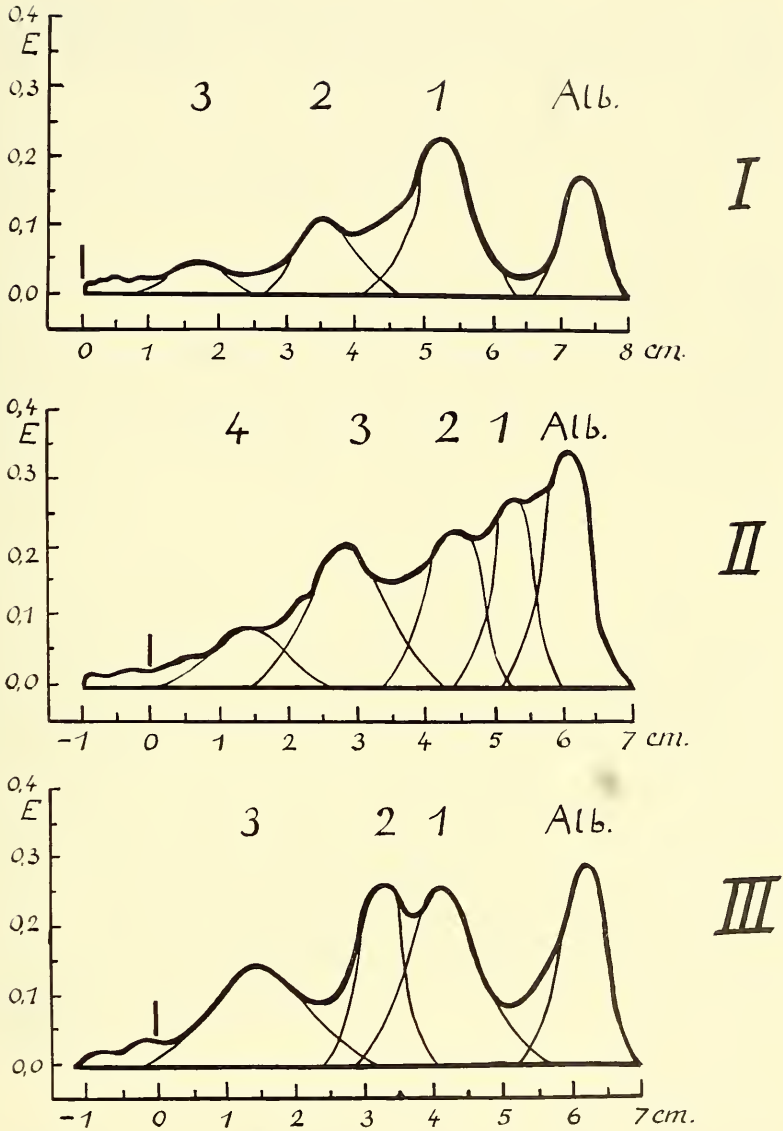


FIG. 2.

Courbes d'extinction, caractéristiques du genre *Triturus*. Abscisses = migration en cm., ordonnées = densité optique. Alb. 1, 2, 3, 4 = fractions protéiniques. I = *T. helveticus*, II = *T. alpestris*, III = *T. cristatus*. Le trait vertical indique la place initiale du sérum.

même animal, à cause de la faible quantité de sérum disponible, nous avons considéré la surface totale de la courbe d'extinction comme équivalente à la concentration en protéines du sérum examiné.

TABLEAU I.

Espèce	Nombre d'animaux	Fractions protéiniques du sérum en %					Rapport alb/glob
		Alb.	1	2	3	4	
<i>T. cristatus</i>	10	28,9 ± 1,72	33,5 ± 1,12	17,6 ± 1,04	20,0 ± 1,0	—	29/71
<i>T. alpestris</i>	4	30,0 ± 3,08	20,9 ± 0,63	19,2 ± 2,25	22,5 ± 1,23	10,9 ± 1,32	30/70
<i>T. helveticus</i>	4	24,0 ± 1,60	48,5 ± 1,87	19,0 ± 1,01	8,5 ± 0,42	—	24/76

TABLEAU II.

Migration moyenne des fractions en cm.

Espèce	Migration totale	Alb.	1	2	3	4
<i>T. cristatus</i> . . .	7,0	6,0	4,4	3,4	2,2	—
<i>T. alpestris</i> . . .	7,0	6,1	5,2	4,4	3,0	1,6
<i>T. helveticus</i> . . .	8,0	7,1	5,2	3,7	2,2	—

TABLEAU III

Quelques valeurs absolues des protéines du sérum exprimées en N total µg/ml.

N°	Prot. totales	Alb.	1	2	3	4	Surface du phérogramme mm ²
<i>T. cristatus</i>							
19	42,9	15,7	10,9	6,8	19,5	—	66
20	65,1	19,0	21,4	10,3	14,4	—	102
21	56,7	13,2	18,8	9,7	15,0	—	86
<i>T. alpestris</i>							
24	63,3	16,8	13,1	11,2	16,2	6,0	98

2. *Triturus alpestris* (fig. 1 b et fig. 2 II).

Le phérogramme est assez différent de celui de *cristatus*. Il y a, en tout, cinq fractions au lieu de quatre et, si l'on reconnaît immédiatement, par sa vitesse de migration et son importance quantitative, la fraction albuminique, on ne peut assimiler, avec certitude, aucune des autres fractions aux fractions correspondantes de *cristatus*.

La migration totale est ici de 7,0 cm comme pour *cristatus*, mais l'ensemble des fractions lentes montre un certain déplacement vers la cathode. L'hémoglobine, après hémolyse, vient se placer entre les fractions 1 et 2. Nous n'avons qu'une seule détermination des protéines totales d'*alpestris*, faite simultanément avec une électrophorèse, et nous la donnons à titre indicatif au tableau III. Les mesures planimétriques des phérogrammes montrent une concentration en protéines, un peu plus élevée que chez *cristatus*.

3. *Triturus helveticus* (fig. 1 a et fig. 2 I).

La configuration du phérogramme de cette espèce est assez particulière. On y reconnaît quatre fractions principales, comme chez *cristatus*, mais leur localisation et leurs proportions ne sont plus les mêmes. La migration totale est ici de 8,0 cm, en moyenne, et la fraction la plus rapide (albumines) a perdu beaucoup de son importance quantitative. Elle ne représente que le 24% des protéines totales, au lieu de 30% chez *cristatus* et *alpestris*. C'est la fraction 1 qui se développe, en atteignant le 48,5% des protéines totales. La concentration de ces dernières est en diminution par rapport aux espèces précédentes. Les fractions les plus lentes sont également en faible quantité. L'hémoglobine se place, quand il y a hémolyse, entre les fractions 1 et 2.

CONCLUSIONS.

Des différences marquées caractérisent les phérogrammes des trois espèces étudiées, malgré leur parenté systématique. Indépendantes du sexe, de l'âge, de la distribution géographique et de la saison, ces différences doivent être considérées comme autant de caractères spécifiques.

L'électrophorèse sur milieux solides est en droit d'entrer comme une technique auxiliaire de la taxonomie moderne, à côté des autres méthodes biochimiques utilisées.

Beaucoup moins claire est la signification physiologique de ces différences. On suppose que la complexité croissante des animaux s'associe avec une élévation du taux des protéines dans le sérum, une augmentation du quotient albumines/globulines et l'apparition et l'accroissement des fractions très lentes (FRIEDEN e. a., 1957). L'extrapolation de ces critères ontogéniques dans le domaine de la phylogénie nous conduirait à considérer, sur la base de nos résultats, *T. helveticus* comme moins évolué que *T. alpestris* et *T. cristatus*. Nous ne saurions entériner cette hypothèse, encore insuffisamment étayée par des faits. Par contre, il semble que l'augmentation proportionnelle des albumines soit liée avec la vie sur terre et en rapport avec la nécessité de conserver l'eau du corps et de maintenir le volume du plasma sanguin (FRIEDEN e. a., 1956). Tous nos animaux vivaient dans l'eau, depuis un certain temps, quand nous les avons examinés. Mais l'acquisition par le sérum du type « terrestre », qui remonte à la métamorphose, pourrait être irréversible et constituer un caractère adaptatif.

Des essais que nous avons effectué sur une forme de mœurs franchement terrestres (*Salamandra salamandra*), nous ont révélé une forte proportion d'albumines, ce qui semble confirmer la dernière hypothèse de FRIEDEN et a.

Les auteurs remercient leur maître, M. le professeur E. GUYÉNOT, directeur de l'Institut, pour sa bienveillance et son incessant soutien. Ils lui sont, en particulier, reconnaissants pour la révision du manuscrit.

Ils remercient, également, M. le professeur F. CHODAT, directeur de l'Institut de Botanique, de leur avoir permis d'utiliser le spectrophotomètre UNICAM pour les déterminations des protéines.

SUMMARY

The electrophoretic patterns of the serum proteins of three west-european species of the genus *Triturus* were studied by means of paper-strip electrophoresis. Marked differences were found in the amount and number of the protein fractions, as well as in the mean

protein content of the serum, indicating the existence of a characteristic pattern for each species.

AUTEURS CITÉS

- ANTONACI, B. L. e G. MACAGNINO. 1957. *L'indagine elettroforetica sulle sieroproteine in alcune specie animali*. Monit. zool. ital. (1-2) 65: 19-27.
- BARGETZI, J.-P. 1958. *Application de méthodes d'analyse biochimique à une étude taxonomique: les corégones du lac de Neuchâtel. I. Méthodes immunologiques*. Experientia. 14: 187-188.
- CHEN, P. S. 1959. *Trennung der Blutproteine von Drosophila- und Culex-Larven mittels Stärke-Gel-Elektrophorese*. Rev. suisse Zool. 66: 280-289.
- DESSAUER, H. C. and W. FOX. 1956. *Characteristic Electrophoretic Patterns of Plasma Proteins of Orders of Amphibia and Reptilia*. Science. 124: 225-226.
- FRIEDEN, E., A. E. HERNER, L. FISH and E. J. C. LEWIS. 1957. *Changes in Serum Proteins in Amphibian Metamorphosis*. Science. 126: 559-560.
- OYAMA, V. I. and H. EAGLE. 1956. *Mesurement of Cell Growth in Tissue Culture with a Phenol Reagent (Folin-Ciocalteu)*. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 91: 305-307.
- WUNDERLY, C. 1956. *Electrophorèse sur papier*. Vigot Frères, Paris.