

LE POLYMORPHISME ELECTROPHORETIQUE : UN MOYEN D'ETUDE DES POPULATIONS

par Paul PICHOT et Yves PICHOT⁽¹⁾

L'étude des polymorphismes biochimiques connaît depuis quelques années un développement important. L'utilisation d'une technique, aux grandes possibilités, l'électrophorèse, est sans nul doute à l'origine des progrès considérables réalisés dans cette science. La détection électrophorétique de l'hétérogénéité génétique existant au niveau de certains caractères biochimiques d'espèces animales présente, en effet, un intérêt théorique et pratique important. Elle est devenue, par exemple, la méthode de choix pour le contrôle génétique de pureté des souches ou des lignées des animaux élevés en laboratoire et des races destinées à l'élevage. Elle trouve une application encore plus importante dans la détection de maladies héréditaires graves dues à l'existence de gènes ou d'associations de gènes défavorables et il est désormais certain que l'électrophorèse peut apporter une contribution efficace à l'élimination de ces tares héréditaires dans les élevages.

L'intérêt que présente par ailleurs l'analyse électrophorétique des polymorphismes biochimiques pour l'étude des populations naturelles est essentiel. En ce domaine, en effet, l'électrophorèse s'avère être une technique intéressante et utile pour analyser l'homogénéité ou l'hétérogénéité de ces populations, les différencier géographiquement, suivre leur évolution sous l'action de facteurs divers. C'est dans ce sens que de nombreuses recherches sont poursuivies sur les populations de poissons (DE LIGNY, 1969) dont la gestion rationnelle de certains stocks s'avère être une impérieuse nécessité dès lors qu'ils sont intensément exploités. Dans cette note, nous avons voulu essayer de préciser notre démarche, en empruntant d'ailleurs beaucoup à de multiples auteurs. Appelés à travailler, au sein de l'Institut scientifique et technique des Pêches maritimes, avec d'autres chercheurs, souvent spécialisés dans des disciplines très diverses, nous avons pensé qu'il était bon de faire connaître l'orientation donnée à nos travaux d'une façon un peu détaillée.

1. La notion de population.

« Une population est formée par l'ensemble des individus d'une même espèce qui occupent un espace déterminé à un moment donné. En raison de la variabilité des conditions de milieu, les divers endroits favorables à l'installation d'une espèce sont le plus souvent séparés entre eux par des discontinuités plus ou moins importantes. Chaque lieu favorable est occupé par une population » (DAJOZ, 1974). Cette définition de la population peut intéresser diverses disciplines et varier d'un auteur à l'autre avec le centre d'intérêt des recherches poursuivies. Ainsi ce peut être un groupe d'individus vivant à l'intérieur d'une certaine aire géographique, un groupe d'individus localisés à un habitat qui peut s'étendre sur une aire ou sur des aires séparées au plan géographique.

(1) P. PICHOT et Y. PICHOT : laboratoire de Biochimie, I.S.T.P.M., 1, rue Jean-Vilar, 34200 Sète.

Cette notion de population doit être distinguée d'une unité fréquemment utilisée en halieutique, l'unité de stock ou de pêcherie. Cette dernière ne correspond pas en effet nécessairement à une entité biologique. Ainsi quand deux espèces cohabitent dans une même région ont les mêmes courbes de croissance, des taux de mortalité identique, et sont exploitées de la même façon dans une zone de pêche commune, on peut les considérer comme appartenant à la même unité de stock (POSTEL, 1972).

Au contraire, le concept de population trouve sa pleine expression dans la définition génétique que l'on peut en donner. Elle correspond à un ensemble d'individus qui se reproduisent entre eux et qui possèdent donc un fond génétique commun ou pool de gènes répartis au hasard entre les divers membres qui constituent cette population. Les différents individus ne sont en effet jamais génétiquement identiques et chacun d'entre eux détient une fraction du matériel génétique de l'espèce. L'hétérogénéité est ainsi la règle dans les populations naturelles. Sous l'action de divers facteurs, comme par exemple les conditions du milieu, certains génotypes peuvent se trouver favorisés et sélectionnés. On observe ainsi des variations dans la fréquence des gènes d'une région à l'autre et ce sont ces différences génotypiques intraspécifiques qui doivent être appréciées.

Si les méthodes d'analyse sérologique et biochimique appliquées à l'étude des populations rencontrent depuis quelques années un succès tel qu'une liste exhaustive des travaux réalisés en ce domaine ne peut être établie, c'est précisément parce qu'elles permettent d'identifier les différences génétiques individuelles et de déterminer les variations qui peuvent exister dans la fréquence des gènes d'une localité à l'autre. L'identification sérologique et biochimique des populations de poissons se ramène donc à une identification de pools de gènes existant à l'intérieur d'une espèce.

Il faut d'ailleurs noter qu'une population n'est pas, le plus souvent, complètement isolée ; des individus peuvent émigrer ou immigrer. L'échange des gènes d'une population à une autre favorise le maintien des caractères spécifiques. Inversement, la rupture des échanges de gènes entre deux populations va permettre leur évolution distincte et ceci constitue l'un des mécanismes possibles de la formation d'espèces nouvelles (MAYR, 1966).

2. Le polymorphisme biochimique.

La mise en évidence des groupes sanguins de l'espèce humaine est la forme la plus anciennement reconnue du polymorphisme. C'est en effet la découverte des groupes A, B, O chez l'homme, par LANDSTEINER en 1900 qui a apporté la notion de différences individuelles génétiquement transmises existant au niveau de certaines cellules comme les globules rouges.

Chez les poissons, l'existence de groupes sanguins a été signalée chez de nombreuses espèces (CUSHING, 1964). Pour les recherches effectuées à l'Institut des Pêches, de tels groupes ont été mis en évidence chez la sardine (LEE, 1961), le germon (KEYVANFAR, 1962), le merlu (PICHOT, 1973).

Le polymorphisme des groupes sanguins n'est pas cependant actuellement considéré comme faisant partie de ce que l'on nomme le polymorphisme biochimique. Ce terme prend, depuis quelques années, une définition de plus en plus précise, et ce qui caractérise peut-être le mieux le polymorphisme biochimique au sens strict, c'est sa mise en évidence par l'électrophorèse, d'où le nom de polymorphisme électrophorétique qu'on lui donne parfois (LUCOTTE, 1977).

L'électrophorèse a, en effet, permis d'étendre la notion de groupes à certaines protéines sériques ou tissulaires (muscle, cristallin, etc.). Certaines protéines constituant le sérum, ou d'autres tissus, présentent en effet une pluralité structurale déterminant plusieurs types pour une même protéine. Ces types sont soumis à un déterminisme génétique et permettent de classer les individus dans divers groupes après électrophorèse et détection spécifique (SMITHIES, 1955). Chez le merlu, par exemple, a été mis en évidence un système de groupes existant au niveau d'une protéine sérique, la transferrine (PICHOT, 1971), applicable à l'étude des populations de ce poisson (MANGALY et JAMIESON, 1978).

Une autre forme de polymorphisme biochimique, qui fait actuellement l'objet de nombreuses applications, est le polymorphisme enzymatique. L'électrophorèse suivie de révélation spécifique

des activités enzymatiques (HUNTER et MARKERT, 1957) permet d'obtenir des zymogrammes à partir d'extraits bruts. La plupart des protéines spécifiques sont douées de propriétés catalytiques et il est même possible que toutes les protéines cellulaires puissent être des enzymes.

Comme nous l'avons vu précédemment pour les protéines non enzymatiques, l'électrophorèse permet de séparer aisément les formes moléculaires multiples des protéines enzymatiques, en fonction de leur charge électrique, ou de leur conformation spatiale.

Sur le plan génétique, les diverses formes du polymorphisme protéique qui viennent d'être mentionnées correspondent à la coexistence dans une population de deux ou plusieurs allèles du même gène, les divers génotypes étant distingués les uns des autres par une observation qui, dans le cas qui nous concerne, sera biochimique. Les allèles ne diffèrent que par des changements d'ampleur minimum correspondant par exemple à la substitution d'un amino-acide par un autre dans une même protéine (L'HÉRITIER, 1975), et se traduisant en électrophorèse par une différence de mobilité. Notons, au passage, que la séquence des amino-acides des protéines représente le phénotype déterminé, grâce au code génétique, par la séquence des nucléotides de la molécule d'ADN représentant le génotype.

Une variabilité génétique d'un autre type, toujours présente dans les populations naturelles, doit être enfin mentionnée. Il s'agit de la variabilité génétique traduisant la présence de gènes ne se révélant que par leurs effets sur les caractères quantitatifs. Un tel type de polymorphisme a par exemple été décrit chez la sardine (PICHOT et PICHOT, 1977).

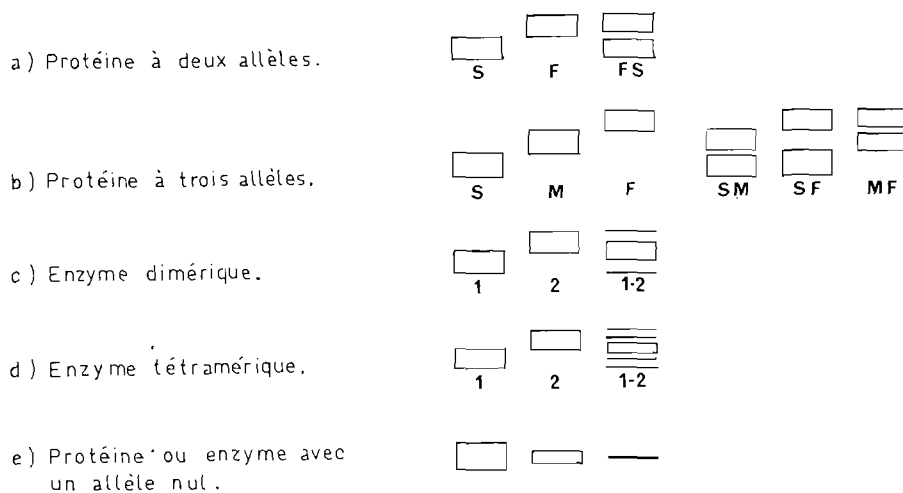


FIG. 1. — Représentation schématique de cinq situations possibles de polymorphismes biochimiques (LUCOTTE, 1977).

La figure 1 (LUCOTTE, 1977) donne une représentation schématique de diverses situations possibles chez les polymorphismes biochimiques qui viennent d'être décrits. Le cas a concerne une protéine diallélique avec deux phénotypes F (Fast ou rapide) et S (Slow ou lent) et l'état hétérozygote FS. Le cas b donne l'exemple d'une protéine à trois allèles, les cas c et d représentent respectivement un enzyme dimérique et un enzyme tetramérique, enfin le cas e décrit une variabilité quantitative.

3. L'équilibre panmictique.

La description précise du polymorphisme d'une population ne peut se réduire à noter la présence de différents types. Elle doit comporter une évaluation des fréquences rencontrées dans la population. Ces fréquences peuvent être formulées en termes de phénotypes, de génotypes et d'allèles. En l'absence de sélection, ces fréquences sont, dans une population mendélienne polymorphe, fixées par des règles statistiques découlant d'une situation qui se réalise souvent dans

la nature et qui correspond au fait que la reproduction s'effectue au hasard (reproduction panmictique). Cet état de panmixie aboutit à l'établissement de relations simples entre les fréquences phénotypiques, génotypiques et alléliques formulées sous forme d'une loi, celle de Hardy-Weinberg. Cette loi tend à démontrer que dans une population mendélienne à reproduction panmictique les fréquences alléliques restent constantes d'une génération à l'autre lorsque la population est génétiquement isolée. Souvent, dans la réalité, une population occupant une certaine aire géographique et adaptée à des conditions écologiques déterminées n'est pas complètement isolée. Elle voisine avec d'autres populations appartenant à la même espèce et peut accueillir un certain nombre d'immigrants. Cette immigration peut alors modifier les fréquences alléliques, comme peuvent le faire d'ailleurs d'autres facteurs : la sélection, les mutations par exemple.

Il faut cependant considérer que dans les cas usuels les taux d'immigration, comme ceux des mutations spontanées d'ailleurs, restent faibles et ne modifient pas grandement la composition génétique d'une population considérée au départ comme isolée.

Il faut enfin noter que l'estimation de la variabilité électrophorétique pour une population d'une espèce donnée doit être basée sur l'examen d'un nombre suffisamment important d'individus pour que les déviations dues à l'échantillonnage soient négligeables, et sur l'examen de plusieurs systèmes génétiques indépendants afin d'éviter le biais dû au fait que la variabilité n'est pas identique dans les différentes classes de protéines.

L'équilibre panmictique peut être présenté de façons diverses. Nous illustrerons par un exemple simple la façon dont fonctionne cette loi dans une population chez laquelle les unions s'effectuent au hasard et en considérant un locus occupé par deux allèles a et a'. Les individus qui constituent la population peuvent donc avoir trois génotypes (aa), (aa'), (a'a'). Soit respectivement p et q les fréquences des deux allèles et X, Y, Z les fréquences des trois génotypes.

Aucune hypothèse n'étant faite sur la structure initiale de la population, on a : $p + q = 1$ et $X + Y + Z = 1$.

L'allèle a est représentée par les gènes des individus aa dont la fréquence est X dans la population et par la moitié des gènes des individus aa' de fréquence Y. La fréquence p de l'allèle a est donc dans la population : $p = X + \frac{Y}{2}$.

Pour l'allèle a' nous avons de même : $q = Z + \frac{Y}{2}$.

Les unions s'effectuant au hasard, les fréquences des couples s'établissent ainsi (tabl. 1) :

	X (aa)	Y (aa')	Z (a'a')
X (aa)	X^2	XY	XZ
Y (aa')	XY	Y^2	YZ
Z (a'a')	XZ	YZ	Z^2

TABLEAU 1

En ne tenant pas compte du sexe des membres d'un couple, les neuf catégories de couples peuvent être classées en six types (tabl. 2).

Ainsi dans la descendance de la population, les proportions des individus de génotype (aa), (aa'), (a'a') seront, d'après le tableau 2, respectivement égales à :

$$X_1 = X^2 + 1/2 (2 XY) + 1/4 Y^2 = (X + 1/2 Y)^2 = p^2$$

$$Y_1 = 1/2 (2 XY) + 2 XZ + 1/2 Y^2 + 1/2 (2 YZ) = 2 (X + 1/2 Y) (Z + 1/2 Y) = 2 pq$$

$$Z_1 = Z^2 + 1/2 (2 YZ) + 1/4 Y^2 = (Z + 1/2 Y)^2 = q^2$$

Dans la génération 1 les fréquences des gènes seront :

$$p_1 = X_1 + 1/2 Y_1 = p^2 + pq = p(p + q) = p$$

$$q_1 = Z_1 + 1/2 Y_1 = q^2 + pq = q(p + q) = q$$

Parents		Génotypes descendance		
type	fréquence	(aa)	(aa')	(a'a')
(aa) × (aa)	X ²	1	0	0
(aa) × (aa')	2 XY	1/2	1/2	0
(aa) × (a'a')	2 XZ	0	1	0
(aa') × (aa')	Y ²	1/4	1/2	1/4
(aa') × (a'a')	2 YZ	0	1/2	1/2
(a'a') × (a'a')	Z ²	0	0	1

TABLEAU 2

La fréquence des gènes reste constante d'une génération à l'autre et la population atteint, en régime panmictique, un équilibre caractérisé par les proportions suivantes :

a) Fréquence des allèles : p pour a ; q pour a'.

b) Fréquence des génotypes : X = p² pour (aa) ; Y = 2 pq pour (aa') ; Z = q² pour (a'a').

Cette relation entre fréquences génotypiques et fréquences géniques est connue sous le nom de loi de Hardy-Weinberg.

Cette démonstration basée sur l'hypothèse d'union au hasard peut se faire de la même façon en adoptant l'hypothèse d'union au hasard des gamètes. Dans ce cas l'ovule ou le spermatozoïde peut porter l'un des deux allèles a ou a' ; dans la population les fréquences de ces allèles étant respectivement p et q, on a :

♀ \ ♂	p (a)	q (a')
p (a)	p ² (aa)	pq (aa')
q (a')	pq (aa')	q ² (a'a')

$$\text{soit } p^2 (aa) + 2 pq (aa') + q^2 (a'a') = 1.$$

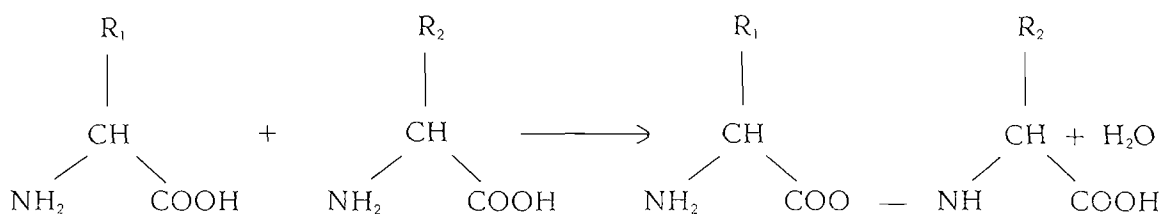
A partir des fréquences phénotypiques qui sont, dans le cas qui nous concerne, les données d'observation du polymorphisme électrophorétique, on peut en utilisant la loi de Hardy-Weinberg non seulement évaluer les fréquences génétiques, mais encore vérifier si les fréquences phénotypiques ont une base génétique, ou estimer si la population est en équilibre panmictique. Ces opérations se résument à établir une comparaison entre la répartition observée et la répartition théorique, comparaison qui s'effectue par une méthodologie statistique, un test de χ^2 .

De la même façon on pourra comparer deux populations. Pour chaque allèle analysé, en effet, un test de χ^2 permettra de comparer les fréquences observées dans chacune des deux populations et de préciser si ces fréquences sont par exemple significativement différentes. Dans ce cas l'hypothèse d'une indépendance génétique entre les deux populations étudiées pourra être avancée.

Il est cependant essentiel, comme cela a déjà été noté, que certaines conditions soient remplies pour que la conclusion donnée le soit avec une bonne certitude : examen d'un nombre suffisant d'individus, portant sur plusieurs systèmes génétiques indépendants, reproductibilité des méthodes utilisées notamment (MOLLER, 1971).

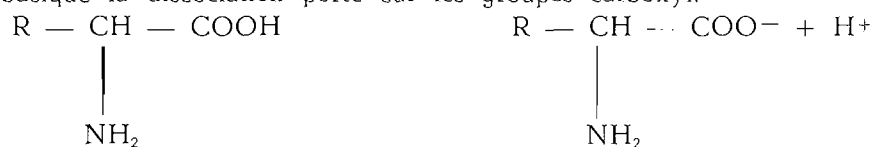
4. L'électrophorèse.

La mise en évidence du polymorphisme biochimique fait appel, comme nous l'avons déjà vu, à une technique particulière, l'électrophorèse. On peut rappeler brièvement que cette méthode de séparation utilise le caractère amphotère des protéines, molécules formées de nombreux acides aminés liés entre eux par une liaison dite peptidique.



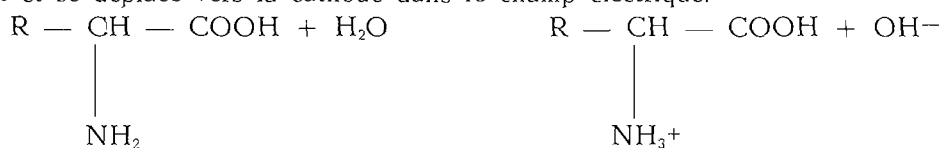
Les macromolécules ainsi formées, mises en solution, peuvent présenter une ionisation portant, selon le pH du milieu, soit sur les fonctions carboxyliques, soit sur les fonctions aminées de certains acides aminés de la chaîne peptidique (diacides aminés comme l'acide aspartique ou acides diamminés comme la lysine par exemple). Au point isoélectrique de la protéine, il se poursuit une dissociation égale des groupements acides et basiques : globalement la molécule est électriquement neutre.

En milieu basique la dissociation porte sur les groupes carboxyl.



La protéine est alors chargée négativement et, placée dans un champ électrique, se déplace vers l'anode.

En milieu acide la dissociation porte sur les groupes aminés, la protéine est alors chargée positivement et se déplace vers la cathode dans le champ électrique.



Il est ainsi aisé de séparer un mélange de plusieurs protéines, présentant des charges électriques différentes : sous l'effet du champ électrique les molécules se déplacent proportionnellement à leurs charges électriques et se séparent les unes des autres.

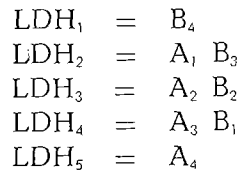
Dans le cas qui nous concerne, il a déjà été mentionné que les allèles d'un même gène diffèrent par un changement de faible ampleur qui peut par exemple être la substitution d'un amino-acide par un autre. Historiquement l'un des premiers cas connus concerne l'espèce humaine. Une anémie héréditaire, la drépanocytose, est caractérisée par une anomalie de structure de l'hémoglobine. L'hémoglobine (Hb — S) des individus atteints de cette maladie diffère de l'hémoglobine normale (Hb — A) par la substitution d'une valine (point isoélectrique 5,96) à la place d'une glutamine (point isoélectrique 3,22).

Hb — A : ... Val, His, Leu, Thr, Pro, *Glu*, Glu, Lys ...

Hb — S : ... Val, His, Leu, Thr, Pro, *Val*, Glu, Lys ...

Ces hémoglobines peuvent être séparées par électrophorèse : la migration de l'hémoglobine normale est différente de celle de l'hémoglobine pathologique (ROCHE *et al.*, 1959). Sur le plan génétique, la maladie dépend d'un gène *s*, allèle muté du gène normal *S*. Les homozygotes *ss* ont une survie précaire, au contraire des hétérozygotes *Ss* qui survivent.

Un autre exemple de variants électrophorétiques peut être fourni par un enzyme, la lactico-déshydrogénase (LDH), protéine que l'on trouve, chez l'homme dans le sérum et dans la plupart des tissus. En électrophorèse elle se sépare en cinq fractions (SCHULTZE et HEREMANS, 1966). La molécule de LDH est formée de quatre chaînes polypeptidiques. Parmi celles-ci deux sortes de sous-unités, A et B, contrôlées par deux locus, ont été mises en évidence et présentent des mobilités électrophorétiques différentes. Les cinq isoenzymes de LDH représentent les cinq tétramères qui peuvent être formés par arrangement au hasard des sous-unités A et B.



Chez certains individus, la présence d'un allèle muté B' du gène fournissant la synthèse de la sous-unité B peut exister. Le polypeptide produit sous le contrôle de cet allèle muté a une charge négative par rapport à celle de l'allèle normal. Tous les allomères, excepté LDH 5 formé de chaînes A, ont une mobilité électrophorétique plus faible. Chez les hétérozygotes, la situation est plus complexe puisque le peptide normal B et le peptide variant B' sont produits en quantité équivalente et ont des chances égales d'être incorporés dans les tétramères de LDH.

Ces deux exemples font comprendre l'intérêt considérable de l'électrophorèse, technique de séparation, qui, associée à diverses méthodes de détection (histochimiques, autoradiographiques par exemple), permet de saisir le produit de l'activité d'un système génétique élémentaire et d'envisager les développements qui ont été exposés précédemment pour ce qui concerne l'étude des populations naturelles.

5. Les principales méthodes d'électrophorèse.

Nous ne détaillerons pas ici les aspects théoriques et pratiques mis en œuvre lors d'une électrophorèse : certains ouvrages sont consacrés à ce sujet (GROULADE, 1961 ; FINE et ROPARTZ, 1968 ; MAURER, 1971 ; ALLEN *et al.*, 1977). D'une façon très générale nous dirons cependant que les principaux supports habituellement utilisés pour ce type d'étude sont au nombre de trois.

L'électrophorèse sur acétate de cellulose (fig. 2) permet de séparer les protéines en fonction de leurs mobilités électrophorétiques. Cette technique a fait l'objet d'une description détaillée dans une précédente publication (PICHOT et POLLARD, 1970).

D'une réalisation relativement aisée, son pouvoir de résolution est souvent limité. Il a été, cependant, grandement amélioré en utilisant un tampon discontinu Tris-EDTA-acide borique et véronal acide-véronal sodé (DE MATE *et al.*, 1976). L'électrophorèse en gel d'amidon (SMITHIES, 1955) est la technique qui est de loin la plus utilisée dans ce domaine, en particulier à cause de son faible prix de revient. La séparation des molécules protéiques s'effectue selon leur charge électrique mais aussi en fonction de leur taille ou de leur forme. La structure même du gel intervient comme un filtre en ralentissant la progression des molécules les plus volumineuses. Cet effet de filtration fait que des protéines ayant même charge électrique mais des poids moléculaires différents peuvent être séparées en utilisant ce support.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est très utilisée depuis quelques années. Comme pour le gel d'amidon, l'effet de filtration permet d'obtenir un degré de résolution élevé. Diverses variantes ont été proposées : électrophorèse en plaque (RAYMOND et WEINTRAUD, 1959) ou en tube (ORNSTEIN et DAVIS, 1964). Les figures 3 et 4 illustrent ces deux méthodes dont certains aspects techniques ont été développés par ailleurs (GROULADE et PICHOT, 1967 ; PICHOT, 1973 ; HUE, 1979).

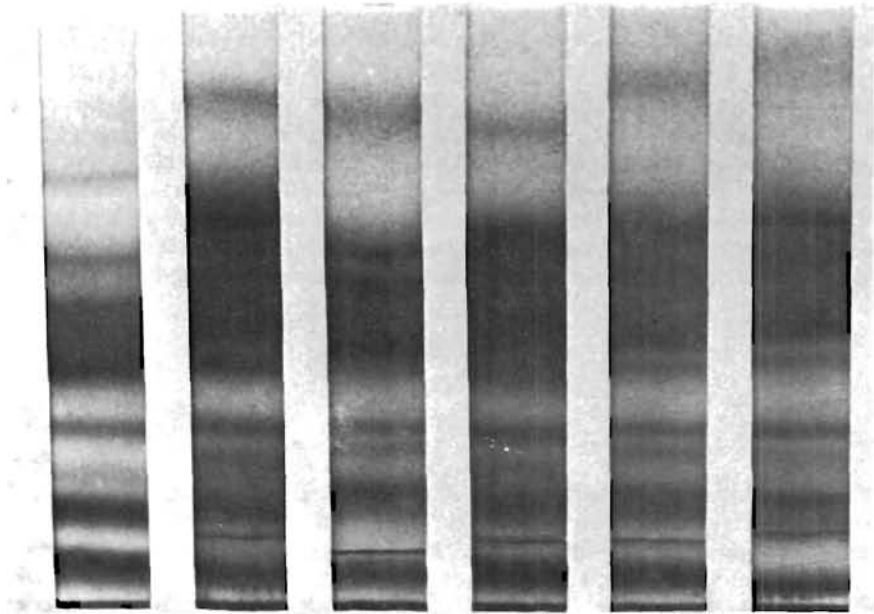


FIG. 2. — *Electrophorèse de protéines tissulaires sur bandes d'acétate de cellulose.*

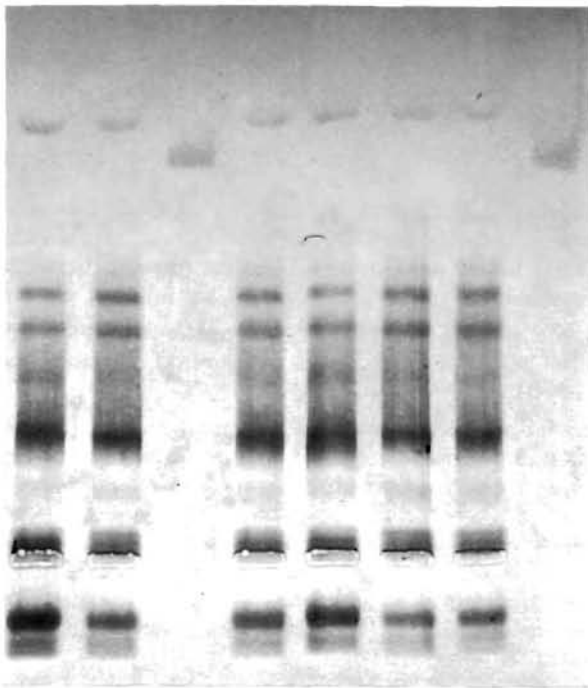


FIG. 3. — *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque.*

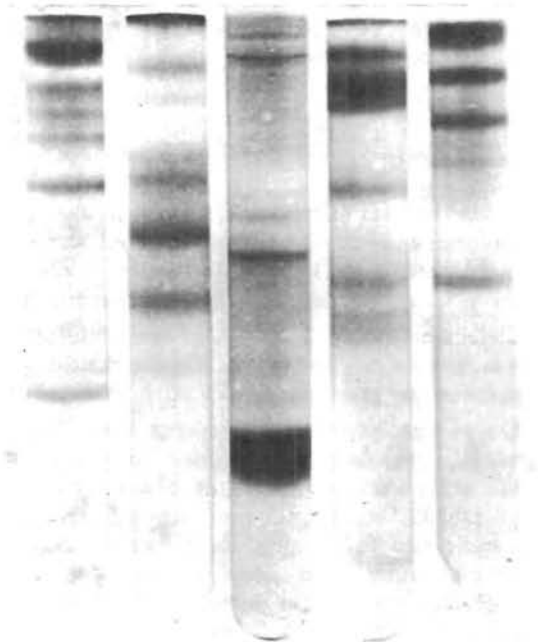


FIG. 4. — *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en tube.*

Ce gel peut être adapté à la résolution de divers problèmes par les nombreuses possibilités qu'il offre : établissement de gradient de concentration permettant de fractionner des mélanges de protéines en fonction de leur poids moléculaire, établissement d'un gradient de pH dans lequel les protéines se stabilisent à leur point isoélectrique, électrophorèse analytique, préparative, bidimensionnelle.

La mise en évidence des protéines séparées par électrophorèse fait appel, comme nous l'avons déjà vu, à des techniques histochimiques. Les protéines sériques ont été ainsi les premières à être révélées par des colorations générales ou spécifiques (GRASSMANN, HANNIG *et al.*, 1951 ; GROULADE, PICHOT *et al.*, 1967). De la même façon, des techniques de détection histochimiques ont par la suite été utilisées pour révéler les enzymes (HUNTER et MARKERT, 1957 ; SHAW et PRASAD, 1970). Les principales méthodes d'électrophorèse de zones, associées à des révélations histochimiques de plus en plus nombreuses, ont ainsi permis de décrire, ces dernières années, une grande quantité de polymorphismes biochimiques dont l'étude appliquée à de nombreux domaines peut être considérée comme l'une des plus importantes découvertes réalisées en biologie au cours des deux dernières décennies. L'application de cette méthodologie aux recherches poursuivies à l'Institut des Pêches sur les poissons, crustacés ou mollusques, paraît, sans nul doute, devoir apporter beaucoup dans divers domaines, notamment en systématique, dans la sélection des races destinées à l'élevage, dans la gestion rationnelle des stocks par l'intermédiaire de l'étude des populations, et justifier l'intérêt porté à cette science nouvelle.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN (P.C.), HILL (E.A.) et STOKES (A.M.), 1977. — Plasma Proteins. Analytical and preparative Techniques. — Oxford, London, Edinburgh, Melbourne : Blackwell, 254 p.
- CUSHING (J.E.), 1964. — The Blood Groups of Marine Animals. — *Adv. Mar. Biol.*, **2** : 85-131.
- DAJOZ (R.), 1974. — Dynamique des populations. — Paris : Masson, 295 p.
- FINE (J.-M.) et ROPARTZ (C.), 1968. — Techniques d'électrophorèse de zones. Applications à l'étude des protéines sériques. — Saint-Mandé : La Tourelle, éd., 276 p.
- GRASSMANN (W. VON), HANNIG (K.) et KNEDEL (M.), 1951. — Über die Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf filterpapier. — *Dtsch. med. Wschr.*, **76** : 333-336.
- GROULADE (J.), 1961. — Electrophorèse sur papier (appareil et techniques). — Grenoble : Allier, 64 p.
- GROULADE (J.) et PICHOT (P.), 1967. — Electrophorèse des protéines sériques en plaques de gel d'acrylamide. — *Ann. Biol. clin.*, **25** (3-4) : 371-381.
- GROULADE (J.), PICHOT (P.) et WALTZINGER (W.), 1967. — Aspects techniques de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide. — *Le Pharmacien biologiste*, **5** (48) : 125-132.
- HUE (S.B.), 1979. — Etude de l'hétérogénéité du stock de germon (*Thunnus alalunga* Bonnaterre, 1788) dans l'Atlantique nord-est. — Thèse, U.E.R. des Sciences de la nature de l'Université de Nantes, 239 p.
- HUNTER (R.L.) et MARKERT (C.L.), 1957. — Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gel. — *Science*, **125** : 1294-1295.
- KEYVANFAR (A.), 1962. — Sérologie et immunologie de deux espèces de thonidés (*Germo alalunga* Gmelin et *Thunnus thynnus* Linné) de l'Atlantique et de la Méditerranée. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **26** (4) : 407-456.
- LEE (J.Y.), 1961. — La sardine du Golfe du Lion (*Sardina pilchardus sardina* REGAN). — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **25** (4) : 417-511.
- L'HÉRITIER (Ph.), 1975. — Génétique. — Paris : Masson, 314 p.
- DE LIGNY (W.), 1969. — Serological and Biochemical studies on fish populations. — *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **7** : 411-513.
- LUCOTTE (G.), 1977. — Le polymorphisme biochimique et les facteurs de son maintien. — Paris : Masson, 63 p.
- MANGALY (G.) et JAMIESON (A.), 1978. — Genetic tags applied to the European hake *Merluccius merluccius* (L.). — *Anim. Blood Grps Biochem. Genet.*, **9** : 39-48.
- DE MATE (H.C.), BANFI (Y.P.), KORC (I.) et SOUZA (N.A.), 1976. — Cellulose acetate electrophoresis of soluble lens proteins of different species of mammals : the use of discontinuous buffer systems. — *Comp. Biochem. Physiol.*, **55 B** : 45-48.
- MAURER (H.R.), 1971. — Disc Electrophoresis. — Berlin, New York : Walter de Gruyter, 210 p.

- MAYR (E.), 1966. — Animal Species and Evolution. — Cambridge, Massachussets: Belknap Press of Harvard, University Press, 797 p.
- MOLLER (D.), 1971. — Concepts used in the biochemical and serological identification of fish stocks. — *Rapp. P.V. Réun. Cons. int. Explor. Mer.* **161**: 7-9.
- ORNSTEIN (L.), 1964. — Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, **121**: 321. DAVIS (B.J.), 1964. — Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. — *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, **121**: 404-427.
- PICHOT (P.), 1971. — Etude électrophorétique des protéines du sérum et du cristallin des merlus de la côte nord-ouest africaine. — *Rapp. P.V. Réun. Cons. int. Explor. Mer.* **16**: 80-85.
- 1973. — Etude sérologique et biochimique de trois espèces de merlus *M. merluccius* (L.), *M. senegalensis* Cadenat, *M. cadenati* Doure. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* **37** (2): 233-247.
- PICHOT (P.) et PICHOT (Y.), 1977. — Etude électrophorétique des protéines solubles du cristallin de la sardine (*Clupea pilchardus* Walb.) du golfe du Lion. — *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, **24** (5): 67-68.
- PICHOT (P.) et POLLARD (D.A.), 1970. — Etude électrophorétique des protéines du cristallin de Sparidés et Centracanthidés méditerranéens. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **34** (1): 81-88.
- POSTEL (C.), 1972. — Théorie des pêches (dynamique des populations exploitées). Université de Rennes, fasc. 3 (édition provisoire): 1-121.
- RAYMOND (S.) et WEINTRAUB (L.), 1959. — Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. — *Science*, **130**, 711.
- ROCHE (J.), BAR (D.) et BISERTE (G.), 1959. — Chromoprotéides in JAVILLIER M. *et al.*, Traité de Biochimie générale. — Paris: Masson, I (2), chap. IV: 1140-1271.
- SCHULTZE (H.E.) et HEREMANS (J.F.), 1966. — Molecular Biology of Human Proteins. I. Nature and metabolism of extra cellular proteins. — Amsterdam, London, New York: Elsevier, 904 p.
- SHAW (C.R.) et PRASAD (R.), 1970. — Starch gel electrophoresis of Enzymes. A compilation of Recipes. — *Biochemical genetics*, **4**: 297-320.
- SMITHIES (O.), 1955. — Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. — *Biochem. J.*, **61**: 629.