

STRUCTURE IMMUNOCHIMIQUE DE L'HÉMOCYANINE. ÉTUDE CHEZ DIX ESPÈCES DE CRUSTACÉS DÉCAPODES

par

J.M. Fine, M. Marneux, P. Lambin
et D. Rochu

Laboratoire d'Immunochimie (Centre National de
Transfusion sanguine, 6, rue A.-Cabanel,
75739 Paris Cedex 15).

J.C. Baron

Centre de Recherches Océanographiques de
Dakar-Thiaroye (**O.R.S.T.O.M.**).

W. Ghidalia

Laboratoire d'Océanographie biologique, Université Pierre-et-Marie-Curie,
7, quai Saint-Bernard, 75230 Paris Cedex 05, Immunologie et Sérologie des Arthropodes.

Résumé

Les sérum de dix espèces de Crustacés Décapodes, ainsi que les hémocyanines purifiées de quatre d'entre elles, ont été étudiés par des méthodes électrophorétiques et immunologiques. Chacune de ces hémocyanines a été confrontée avec l'antisérum homologue et le sérum des neuf autres espèces. Les réactions hétérologues constatées montrent qu'il existe une nette concordance entre les parentés systématiques et biochimiques de ces espèces.

Pour chaque hémocyanine analysée, les immun-sérum absorbés ont mis en évidence des déterminants spécifiques et des déterminants communs aux hémocyanines d'espèces voisines.

Introduction

Les travaux de Boyden et de Leone ont tenté d'établir une véritable systématique biochimique des Crustacés basée sur les réactions de précipitation croisées entre sérum et antisérum de différentes espèces. Cependant, l'hémocyanine n'est pas la seule protéine antigène du sérum des Crustacés et l'analyse immunoélectrophorétique a montré l'existence de nombreuses autres protéines sériques.

Dans ce travail, nous avons tenté de définir les déterminants antigéniques de l'hémocyanine par une étude comparative de cette protéine chez dix espèces de Crustacés Décapodes. Cette étude a combiné l'analyse immunoélectrophorétique, l'immunodiffusion et l'utilisation, soit d'antigènes purifiés, soit d'immun-sérum convenablement absorbés.

Matériel et méthodes

Matériel

Nous avons étudié le sérum (hémolymphé après coagulation et élimination du caillot) des dix espèces de Crustacés Décapodes indiquées ci-dessous. Chaque espèce est désignée, dans cette étude, par les initiales entre parenthèses.

- Scyllaridae : *Panulirus regius* (PR)
Scyllarides herklotsi (SH)
- Paguridae : *Petrochyrus pustulatus* (PP)
- Calappidae : *Calappa rubroguttata* (CR)
- Canceridae : *Cancer pagurus* (CP)
- Portunidae : *Carcinus maenas* (CM)
Macropipus puber (MP)
Neptunus validus (NV)
Callinectes gladiator (CG)
- Maidae : *Maia squinado* (MS)

Quatre espèces ont été capturées à Roscoff (Bretagne) : *Macropipus puber*, *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus* et *Maia squinado*. Les six autres espèces ont été pêchées à Dakar (Sénégal). L'hémolymphé est recueillie par ponction à la seringue à la base des sinus des périopodes. Après coagulation, à température du laboratoire, l'hémolymphé est centrifugée à 6 000 tr/mn pendant 20 minutes. On recueille le surnageant de couleur bleue.

Méthodes préparatives

Parmi les dix espèces étudiées, nous en avons choisi quatre dans lesquelles nous avons isolé l'hémocyanine par électrophorèse préparative en bloc de Pevikon. Il s'agit des hémocyanines de *Panulirus regius* (PRH), *Macropipus puber* (MPH), *Neptunus validus* (NVH) et *Maia squinado* (MSH).

Technique : un kilo de Pevikon (Stockholms super fosfat Fabriks A.B. Stockholm, Suède) est lavé plusieurs fois à l'eau distillée dans un biichner de 5 litres afin d'obtenir une suspension la plus fine possible de poudre de Pevikon. Après ces lavages répétés, on effectue un dernier lavage et une mise en suspension dans du tampon véronal 0,05 M pH 8,6. On coule alors dans une chambre d'électrophorèse en polyéthylène (Creyssel, 1968).

La surface du gel est rendue lisse à l'aide d'une spatule puis on creuse un réservoir de 3 mm de large sur toute la largeur du gel. On remplit ce réservoir d'un mélange de poudre de Pevikon et de 6 ml d'hémolymphé. On soumet alors la chambre d'électrophorèse à une différence de potentiel de 8 volts/cm pendant 6 heures. En fin d'électrophorèse, on applique une feuille sèche d'acétate de cellulose pendant 10 minutes afin d'obtenir une empreinte des différentes zones séparées par électrophorèse. Cette feuille est colorée au rouge Pon-

ceau S. La zone de plus forte mobilité, correspondant à l'hémocyanine, est découpée puis placée dans un filtre Büchner n° 3 et éluée dans le tampon d'électrophorèse. Le liquide élué est ensuite reconcentré à une teneur protéique de 40 mg/ml.

Méthodes analytiques

L'électrophorèse en acétate de cellulose est réalisée dans des plaques de cellogel Sebia (Milan) en tampon véronal/véronal sodé à pH 8,6. Les protéines sont colorées par le rouge Ponceau S.

*Préparation des immun-sérum*s : les immun-sérum antisérum de chaque espèce étudiée ont été obtenus par immunisation de lapins selon le protocole expérimental suivant : la solution antigénique utilisée est un mélange de 0,5 ml de sérum à 40 mg/ml de protéines et de 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund. Une première injection est faite par voie intradermique dans les coussinets plantaires du lapin. Trois semaines plus tard, on pratique une seconde injection du même mélange par voie sous-cutanée puis, un jour plus tard, une troisième injection de 0,5 ml d'antigène (sans adjuvant de Freund) par voie intraveineuse. Après un prélèvement d'essai, quatre jours après la dernière injection et si l'immun-sérum obtenu est suffisamment puissant, on recueille l'immun-sérum par saignée carotidienne à l'aide d'un cathéter en matière plastique.

Nous avons ainsi préparé les immun-sérum suivants : anti Palinurus (anti PR), anti Scyllarides (anti SH), anti Petrochyrus (anti PP), anti Calappa (anti CR), anti Cancer (anti CP), anti Carcinus (anti CM), anti Macropipus (anti MP), anti Neptunus (anti NV), anti Callinectes (anti CG), anti Maia (anti MS).

A partir de ces immun-sérum, il est possible de préparer des immun-sérum spécifiques de l'hémocyanine d'une espèce déterminée en absorbant l'immun-sérum par une préparation purifiée d'hémocyanine d'une espèce différente ayant des motifs antigéniques communs avec la précédente. L'immun-sérum antisérum total (0,5 ml) est additionné de 0,1 ml d'hémocyanine isolée hétérologue à 20 mg/ml. On laisse le précipité spécifique antigène anticorps se former pendant 60 minutes à 37 °C puis, pendant 18 heures, à 4 °C. Après centrifugation et élimination du précipité, le surnageant recueilli représente l'immun-sérum absorbé. Chaque immun-sérum total a été absorbé par les trois hémocyanines suivantes : MPH, NVH et MSH, les fractions absorbées étant désignées par le signe de l'immun-sérum suivi du signe — et du sigle de l'hémocyanine. Exemple : anti MP - MSH, anti MP - NVH.

Méthodes d'analyses immunochimiques

L'immunoélectrophorèse est réalisée en gel d'agarose (Industrie Biologique Française) à 1,5 p. 100 en tampon véronal/véronal sodé, lactate de calcium pH 8,6 (Hirschfeld 1960).

L'immundiffusion est réalisée en gel d'agarose à 1 p. 100 en tampon phosphate 0,03 M, chlorure de sodium 0,1 M, pH 7,2.

Les immun-sérum sont utilisés non dilués. Les antigènes (sérum ou hémocyanines) sont utilisés en immunoélectrophorèse à concentration de 40 mg/ml. En immunodiffusion, les antigènes sont testés à une concentration de 2 mg/ml vis-à-vis d'immun-sérum non dilués.

Immunoélectrophorèse bidimensionnelle (Laurell, 1965) : une électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer dans un premier temps (première dimension) les protéines du mélange étudié selon leurs charges électriques. Ces protéines ainsi séparées sont alors soumises à une nouvelle électrophorèse dans un gel d'agarose contenant un antisérum polyvalent (anticorps spécifiques de chaque protéine du mélange). Dans cette seconde dimension, le sens du courant fait un angle de 90° par rapport à la direction de la première séparation. Chaque antigène du mélange pénètre au cours de la seconde électrophorèse dans le gel contenant l'immun-sérum et réagit avec son anticorps homologue en donnant un précipité spécifique proportionnel à la quantité d'antigène (Planche II).

Les modalités techniques sont les suivantes :

première dimension : électrophorèse en gel d'agarose à 1,5 p. 100 dans le système tampon utilisé pour l'immunoélectrophorèse (Hirschfeld 1960) d.d.p. : 10 V/cm pendant 2 heures ;

l'électrophorèse terminée, on découpe une bandelette de 2 cm de large que l'on transfère sur une plaque de verre de 9 X 12 cm. On coule alors dans la partie libre de la plaque une solution d'agarose tamponnée contenant l'immun-sérum homologue dans le rapport suivant : 0,5 ml d'immun-sérum/11,5 ml d'agarose à 1,5 p. 100 tamponnée. Lorsque le gel est solidifié, on effectue l'électrophorèse perpendiculairement à l'axe de la première migration : d.d.p. : 3 V/cm pendant 18 heures. Les gels sont alors photographiés après lavages et colorations.

RÉSULTATS

I. - Analyse électrophorétique et immunologique des protéines du sérum dans les espèces étudiées.

L'analyse, par *électrophorèse en acétate de cellulose* (Planche I, 1) et par immunoélectrophorèse (Planche I, 2) montre la complexité de composition protéique du sérum des espèces étudiées. La localisation de l'hémocyanine par référence à son activité peroxydasique (Manwell et Backer, 1963) montre que celle-ci représente le constituant protéique quantitativement le plus important. L'hémocyanine est également le constituant du sérum présentant la plus grande mobilité électrophorétique à pH 8,6 dans toutes les espèces étudiées. Cependant, la mobilité absolue de l'hémocyanine varie selon l'espèce considérée.

L'analyse immunoélectrophorétique du sérum de chaque espèce, pratiquée par l'immun-sérum homologue (Planche I, 2), confirme ces résultats. En effet, l'arc de précipitation correspondant à l'hémocya-

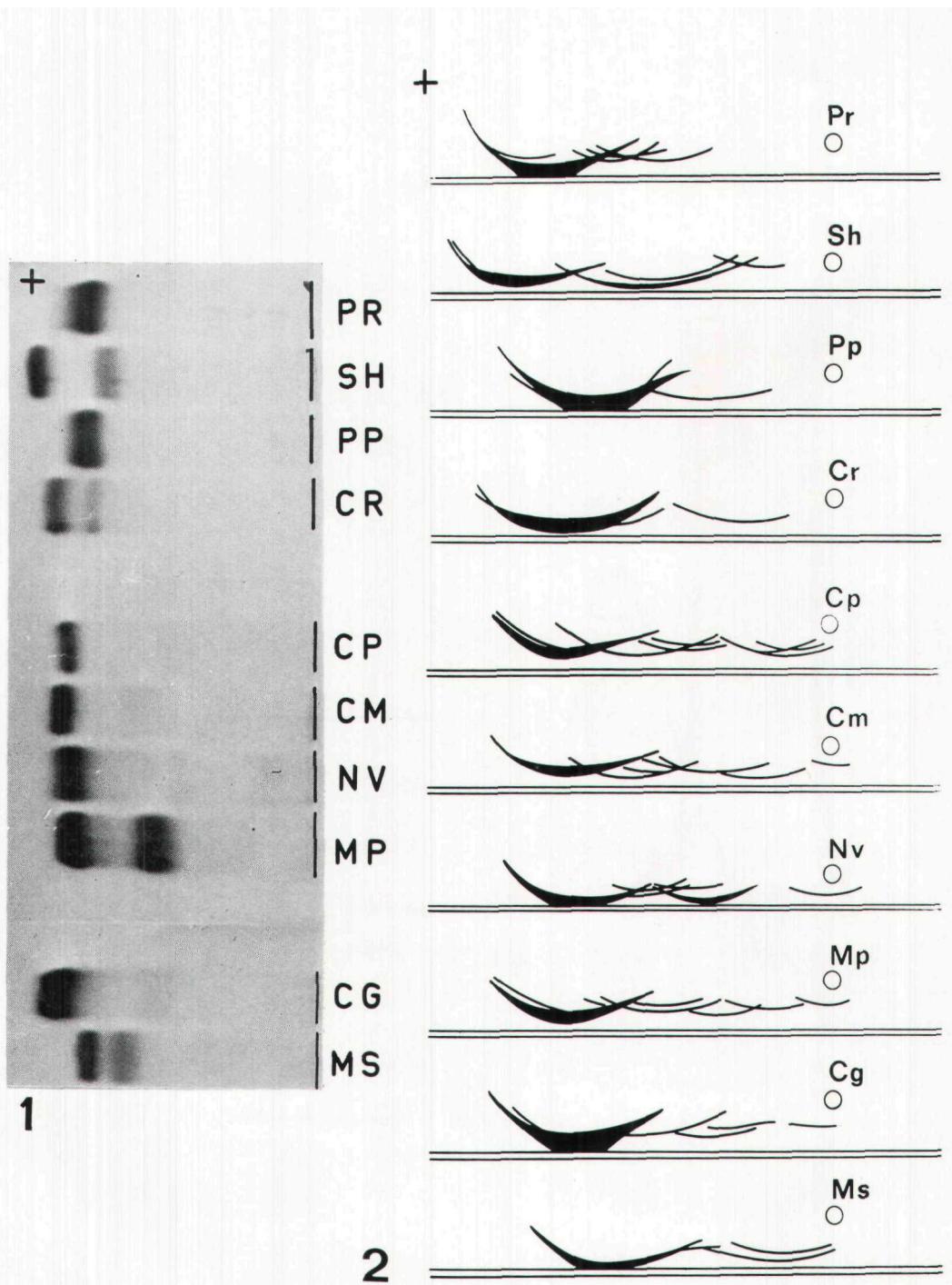


PLANCHE I
Electrophorèse en acétate de cellulose (1)
et diagrammes immunoélectrophorétiques (2)
de l'hémolymph de dix espèces étudiées.

Chaque diagramme immunoélectrophorétique est obtenu par l'immun-sérum
antihémolymph correspondant à l'espèce étudiée (immun-sérum homologue).

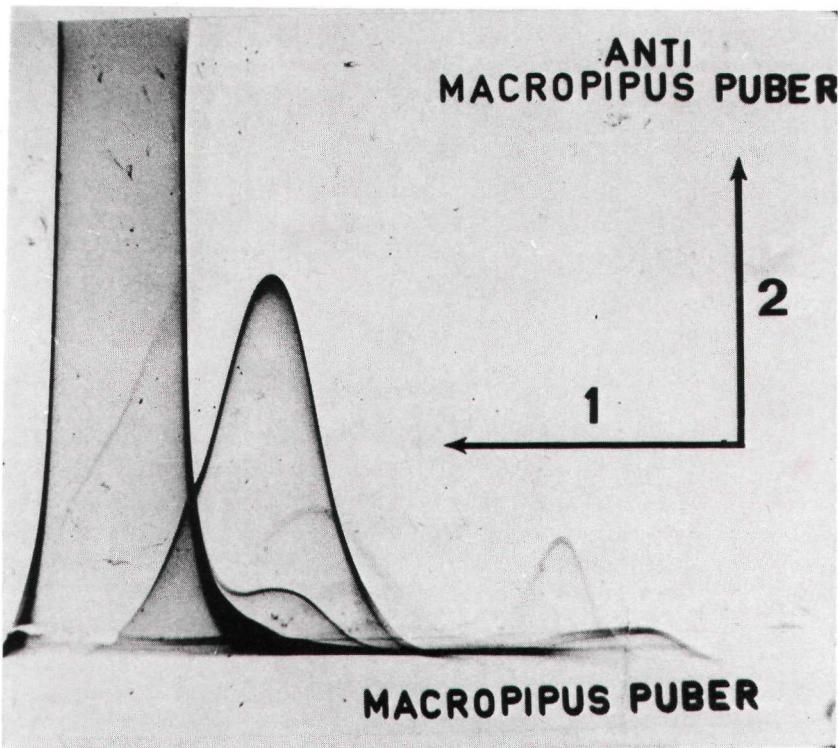


PLANCHE II

Immunoélectrophorèse bidimensionnelle en gel d'agarose
d'un sérum de *Macropipus puber*
vis-à-vis d'un immun-sérum de *Macropipus puber*.

nine est, à la fois, le plus anodique et le plus important du diagramme. En plus de l'hémocyanine, les immun-sérum révèlent d'autres constituants protéiques en nombre variable selon l'espèce considérée et, probablement, selon le stade d'intermue de l'animal.

L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle permet d'apprécier l'importance quantitative relative de ces différents constituants, en particulier, l'importance de l'hémocyanine. Quelle que soit l'espèce étudiée, le pic de l'hémocyanine évalué par cette méthode représente, en moyenne, 80 p. 100 des protéines totales. La planche II montre, à titre d'exemple, l'analyse bidimensionnelle du sérum de *Macropipus puber* vis-à-vis d'un immun-sérum anti MP. Cinq pics de réaction antigène-anticorps distincts peuvent être individualisés. Le pic le plus anodique est l'hémocyanine.

Le pic le plus important, après l'hémocyanine, correspond à un matériel protéique impliqué dans l'élaboration de la nouvelle carapace (Ghidalia, 1970).

2. - Déterminants antigéniques des hémocyanines.

Chaque immun-sérum spécifique des protéines sériques d'une espèce a été utilisé pour tester comparativement le sérum homologue et les neuf sérum hétérologues successivement par immunoélectrophorèse puis par immunodiffusion.

L'immunoélectrophorèse permet de mettre en évidence des réactions hétérologues au niveau de l'arc de précipitation le plus mobile correspondant à l'hémocyanine. Ces réactions hétérologues, témoignant d'une parenté immunochimique entre les différentes hémocyanines étudiées, lorsqu'elles existent, peuvent se manifester avec une intensité variable. Le tableau 1 montre les résultats des réactions de précipitation croisées obtenues par immunoélectrophorèse entre chaque immun-sérum et les sérum des dix espèces étudiées. Dans ce tableau, l'existence d'une communauté antigénique entre les hémocyanines d'espèces différentes est indiquée par un chiffre traduisant l'intensité de la réaction de précipitation :

- 1 et 2 : faibles précipitations ;
- 3 : forte précipitation ;
- 4 : précipitation des réactions homologues ;
- 0 : signifie une absence totale de réaction hétérologue.

La planche III, 1 a montre un exemple de réaction croisée d'intensité 3 entre l'immun-sérum anti *Callinectes gladiator* et l'hémocyanine de *Cancer pagurus*.

La planche III, 1 b montre une réaction d'intensité 2 entre le même immun-sérum et l'hémocyanine de *Petrochirus pustulatus*.

L'immunodiffusion permet de préciser la nature des parentés immunochimiques existant entre les différentes hémocyanines étudiées. Chaque immun-sérum peut permettre de comparer l'antigène qui a servi à l'immunisation (antigène homologue) aux autres antigènes (antigènes hétérologues). Dans le cas de l'existence de déterminants antigéniques communs, la réaction de précipitation montrera une

TABLEAU I

	Anti Panulirus	Anti Scyllarides	Anti Petrochyrus	Anti Calappa	Anti Cancer	Anti Carcinus	Anti Macropipus	Anti Neptunus	Anti Callinectes	Anti Maia
<i>Panulirus regius</i>	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Scyllarides kerklotzi</i>	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Petrochyrus pustulatus</i>	0	0	4	1	1	1	2	2	2	0
<i>Calappa rubroguttata</i>	0	0	2	4	3	3	3	3	3	2
<i>Cancer pagurus</i>	0	0	2	3	4	3	3	3	3	3
<i>Carcinus maenas</i>	0	0	2	3	3	4	3	3	3	2
<i>Macropipus puber</i>	0	0	2	3	3	3	4	3	3	3
<i>Neptunus validus</i>	0	0	2	3	3	3	3	4	3	2
<i>Callinectes gladiator</i>	0	0	2	3	3	3	3	3	4	2
<i>Maia squinado</i>	0	0	1	2	2	2	3	2	3	4

réaction d'identité partielle entre les antigènes considérés (Planche III, 2). L'antigène homologue donne un éperon par rapport à l'antigène hétérologue. Cet éperon traduit la présence de déterminants antigéniques spécifiques à l'antigène homologue s'ajoutant aux déterminants antigéniques communs aux deux molécules.

Lorsque l'existence de déterminants antigéniques communs est montrée par une réaction d'identité partielle, il faut savoir si l'absorp-

PLANCHE III

Exemples d'immunoélectrophorèses (1) et d'immunodiffusions (2, 3 et 4) montrant des déterminants antigéniques communs entre les hémocyanines des Crustacés.

1 a : hémolymphe de *Callinectes gladiator* (CG), hémolymphe de *Cancer pagurus* (CP), vis-à-vis de l'immun-sérum anti *Callinectes gladiator* (anti CG) ;

1 b : même expérience avec l'hémolymphe de *Petrochyrus pustulatus* (PP) ;

2 : réactions d'immunodiffusion vis-à-vis d'un immun-sérum antihémolymphe de *Carcinus maenas* (anti CM), vis-à-vis des hémolymphes de *Carcinus maenas* (CM) en haut et en bas, comparées aux hémolympthes de CR, CG, MS et PR. Les hémolympthes sont utilisées diluées au 1/10 ;

3 et 4 : réactions d'immunodiffusion montrant la parenté des hémocyanines de *Neptunus validus* (NV) et de *Callinectes gladiator* (CG) révélées, en 3, par un immun-sérum anti NV épuisé par MPH, en 4, par un immun-sérum anti CG épuisé par MPH.

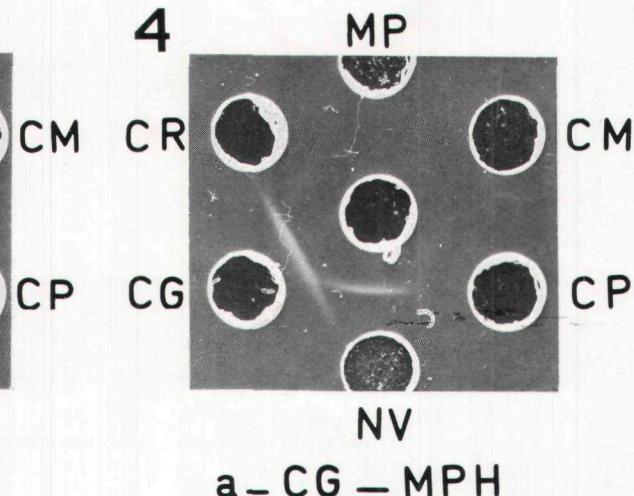
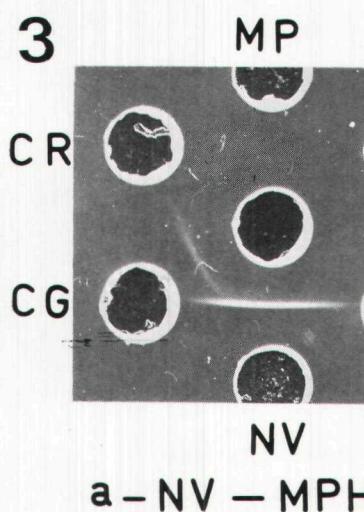
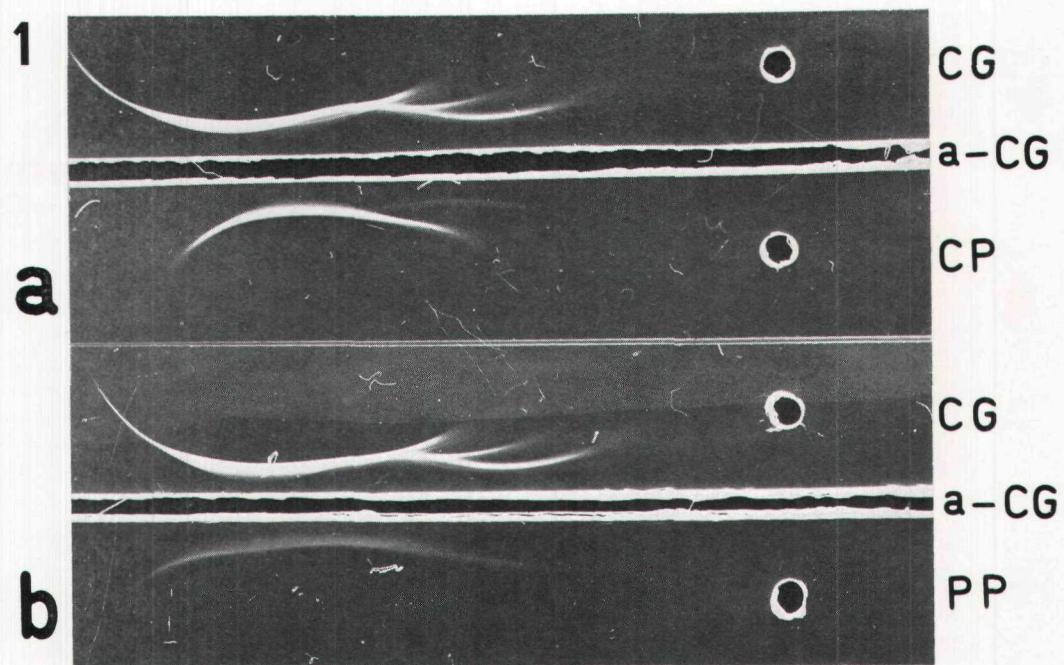


PLANCHE III

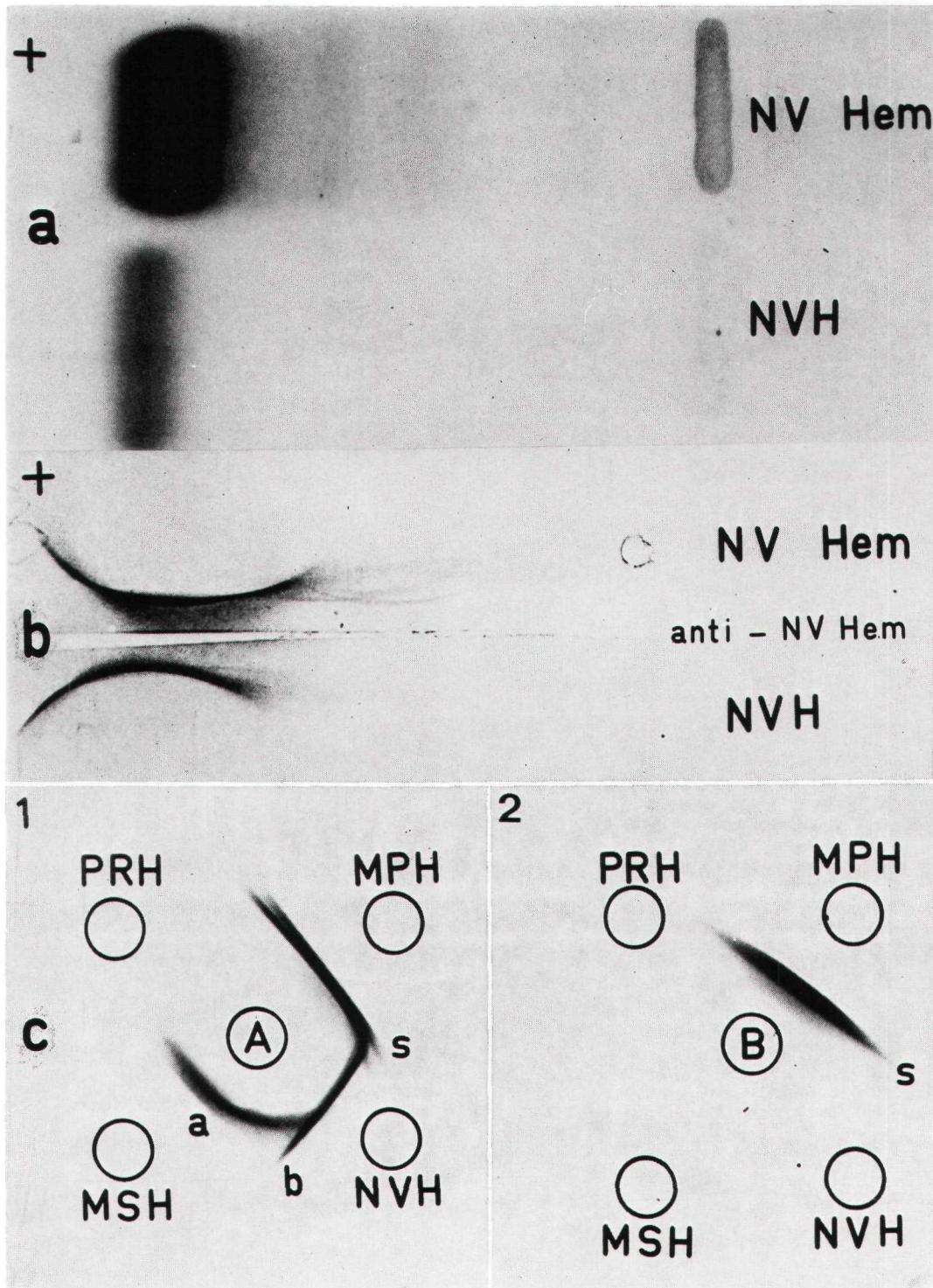


PLANCHE IV

a : électrophorèse en acétate de cellulose du sérum de *Neptunus validus* et de l'hémocyanine isolée du même animal (NVH); b : immunoélectrophorèse du sérum de NV et de NVH vis-à-vis d'un immun-sérum antisérum de NV (anti NV); c : réactions d'immunodiffusion montrant l'étude des hémocyanines isolées de quatre espèces (PRH, MPH, NVH, MSH), en 1, révélées par un anti MPH (A), en 2, révélées par un anti MPH épuisé par NVH (B).

a et b : déterminants communs ; s : déterminants spécifiques (isotypiques).

tion de l'immun-sérum homologue par l'une des hémocyanines ayant des déterminants communs fera disparaître la réactivité commune avec toutes les hémocyanines hétérologues ou, au contraire, avec certaines d'entre elles seulement. La planche III, 3 montre un exemple de déterminants antigéniques communs existant entre les hémocyanines de *Neptunus validus* et de *Callinectes gladiator*.

L'anti NV ou l'anti CG réagissent avec les hémocyanines d'autres espèces comme, par exemple : MPH, CMH, CPH et CRH. Si l'on épouse l'anti NV par MPH, on obtient une réaction spécifique vis-à-vis de NVH mais il subsiste une réaction croisée vis-à-vis de CGH, alors que les autres hémocyanines (MPH, CRH, CMH, CPH) ne réagissent plus car leurs déterminants antigéniques communs ont été absorbés par MPH. Des résultats similaires sont obtenus si l'on absorbe l'anti CG par MPH. Seule subsiste une réaction due aux motifs spécifiques de CGH et aux motifs communs entre CGH et NVH. Ainsi, l'étude d'hémocyanines d'espèces très voisines comme *Callinectes* (CG) et *Neptunus* (NV), par leurs immun-sérum homologues épuisés par l'hémocyanine d'une autre espèce (MPH par exemple), dévoile trois types de déterminants antigéniques. Les uns, communs à la plupart des espèces étudiées, les autres, communs à des espèces très proches (CG et NV), les troisièmes spécifiques de l'une ou l'autre de ces espèces.

Afin de confirmer que les communautés antigéniques observées sont bien portées par la molécule d'hémocyanine, nous avons comparé entre elles quatre hémocyanines isolées (PRH, MPH, NVH et MSH). Comme le montre la planche IV, ces hémocyanines sont obtenues à un haut degré de pureté : l'électrophorèse de zone montre un constituant homogène (4a) et l'immunoélectrophorèse révèle un constituant antigénique majeur (4b). Sur le plan immunochimique, l'anti PRH ne réagit qu'avec PRH, ce qui confirme l'absence de parenté entre les hémocyanines des Scyllarides et les hémocyanines des Brachyures étudiés. L'anti MPH, l'anti NVH et l'anti MSH montrent l'existence de déterminants antigéniques communs entre les hémocyanines de ces trois espèces et l'existence de déterminants antigéniques spécifiques propres à l'hémocyanine de chaque espèce.

La planche IV illustre l'analyse comparée de ces 4 hémocyanines :
en A : anti MPH non épuisé ;
en B : anti MPH épuisé par NVH.

La réactivité croisée montre :

1° l'absence de déterminants antigéniques communs entre MPH, NVH et MSH, d'une part et PRH, d'autre part ;

2° l'existence de motifs antigéniques communs à MSH, NVH et MPH (motif a) et à NVH et MPH (motif b).

En effet, l'absorption de l'anti MPH par MSH fait disparaître toute réactivité contre MSH (motif a) mais laisse subsister une réactivité vis-à-vis de NVH et MPH (motif b). Par contre, l'épuisement de l'anti MPH par NVH enlève toute réactivité contre MSH et NVH (motif b) ;

3° l'existence de déterminants spécifiques (s) : l'épuisement de l'anti MPH par NVH laisse uniquement subsister une réactivité contre l'antigène homologue.

Ces quelques exemples illustrent la méthodologie permettant de dénombrer les déterminants antigéniques définissant la structure immunochimique des hémocyanines. Appliquées à l'étude des dix espèces précitées, ces techniques nous ont permis de distinguer, dans les hémocyanines, deux types principaux de déterminants antigéniques :

a) *l'hémocyanine de chaque espèce étudiée* présente des déterminants caractéristiques de l'espèce (déterminant de la spécificité isotypique). Ces déterminants ne sont révélés que par les immun-sérum homologues après épuisement de ces derniers par des hémocyanines hétérologues ;

b) *des déterminants antigéniques communs aux hémocyanines de plusieurs espèces* : lorsqu'entre les hémocyanines de plusieurs espèces existe une certaine parenté structurale, celle-ci peut se traduire par la présence de déterminants antigéniques communs. Ces derniers ne peuvent être mis en évidence que par des immun-sérum hétérologues. Il est ainsi possible de montrer l'existence d'un déterminant commun entre les hémocyanines d'espèces relativement éloignées, comme les Midae et les Portunidae, voire même de deux déterminants communs lorsqu'on compare les hémocyanines d'espèces extrêmement voisines du point de vue systématique (c'est le cas, par exemple, de certains Portunidae).

En ce qui concerne les déterminants communs à plusieurs espèces, le tableau I résume l'ensemble de nos résultats. Il montre que de tels déterminants existent entre les hémocyanines des Brachyours et des Anomoures mais sont absents des hémocyanines des Macroures étudiés.

L'intensité de ces réactions reflète, au niveau de la molécule d'hémocyanine, la position systématique puisque la réaction croisée est faible entre Midae et Portunidae, entre Portunidae et *Petrochirus* par exemple, alors qu'elle est forte à l'intérieur du groupe des Portunidae ou entre Canceridae et Portunidae.

Discussion

L'hémocyanine de certains Invertébrés est utilisée depuis longtemps par les immunologistes pour étudier les réactions immunitaires, car cette protéine est douée d'un fort pouvoir immunogène. Paradoxalement, peu de travaux ont abordé sa propre structure immunologique. Pourtant, cette protéine mérite d'être étudiée quant à son évolution biochimique dans différentes espèces de Crustacés.

L'étude immunochimique d'une protéine permet, en effet, de préciser les différents déterminants antigéniques qui la caractérisent. Or, ces déterminants sont le reflet de l'évolution biochimique. Ainsi, l'existence de déterminants antigéniques communs aux hémocyanines d'espèces différentes traduit la présence de séquences peptidiques communes sur ces molécules, donc de structures voisines qui ont subsisté au cours de l'évolution biochimique de la molécule.

Dans cet ordre d'idées, cette étude a pu préciser sur le plan immunochimique au moins deux points principaux :

1° l'existence d'une *spécificité « isotypique »* des hémocyanines. Dans chaque espèce, l'hémocyanine est caractérisée par des séquences peptidiques (ou déterminants spécifiques) non retrouvées dans les autres espèces ;

2° l'existence de *spécificités « communes »* entre hémocyanines d'espèces différentes ; ces déterminants communs n'étant retrouvés que si les espèces ne sont pas trop éloignées les unes des autres et, au contraire, d'autant plus fortement que les espèces sont plus proches les unes des autres.

Des études physico-chimiques et structurales sont venues compléter les données sur la structure immunochimique des hémocyanines.

Dans un autre manuscrit, actuellement en cours de publication, nous avons montré (Lambin et al., 1975) que les hémocyanines de MP, NV, MS et PR ont des sous-unités de poids moléculaires extrêmement voisins (de l'ordre de 75 000). De plus, l'analyse des peptides de ces hémocyanines, par fingerprint, confirme l'existence des communautés antigéniques observées. Les hémocyanines de deux espèces très voisines de Portunidae (MP et NV) ont 80 p. 100 de peptides communs, alors que ce pourcentage tombe à 60 p. 100 entre les Midae et les Portunidae (MS et MP).

Summary

Sera from ten different species of Crustacea Decapod and purified hemocyanins from four of them have been analysed by electrophoretic and immunological ways. Each of these hemocyanins has been tested with the immun sera directed against it and the total serum of the nine other species. The observed heterologous reactions show that a clear concordance exists between the systematic and biochemical relationships of these different species.

For each analyzed hemocyanin, absorbed immun sera evidence specific determinants and some common determinants it shares with the hemocyanins of related species.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- CREYSSEL, R., 1968. — Appareillage simple d'électrophorèse préparative sur support in « Techniques d'électrophorèse de zones ». La Tourelle éd., Paris, pp. 225-234.
- GHIDALIA, w., 1969. — Etude électrophorétique du serum d'un Crustacé Décapode *Macropipus puber* (Linné). Application à l'immuno-chimie systématique des Crustacés. *Cah. Biol. Mar.*, 10, pp. 109-128.
- HIRSCHFELD, J., 1960. — Immuno-electrophoresis. Procedure and application to the study of group specific variations in sera. *Science Tools*, 7, p. 18.
- LAURELL, C.B., 1965. — Antigen-antibody crossed electrophoresis. *An. Biochem. Physiol.*, 8, pp. 193-208.
- MANWELL, C. and BAKER, C.M., 1963. — Starch gel electrophoresis of sera from some marine Arthropods: studies on the heterogeneity of hemocyanin and on a ceruloplasmin-like protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 8, pp. 193-208.