

Cette communication ne peut être citée qu'avec l'autorisation préalable
de l'auteur.

Conseil International pour
l'Exploration de la Mer.

C.M. 1969
Special Meeting on
"The Biochemical and Sérologi-
cal Identification of Fish
Stocks"

n°36

ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DU SERUM ET
DU CRISTALLIN DES MERLUS DE LA COTE NORD-OUEST AFRICAINE

par P. PICHOT

Institut des Pêches maritimes, Laboratoire de SETE, France.

Les études faites au cours de ces dernières années sur la systématique du genre Merluccius ont apporté d'utiles éclaircissements pour l'identification des merlus qui fréquentent habituellement les côtes nord-ouest africaines. Cependant, parallèlement au dénombrement de nouvelles espèces ou sous-espèces, l'accent a surtout été mis sur l'analyse des caractères qui permettent de ~~les~~ ^{les} séparer ~~les différentes formes~~. Parmi ceux-ci seuls les caractères numériques, et plus particulièrement le nombre des vertèbres et celui des branchiospines se sont révélés avoir une signification systématique réelle (DA FRANCA, 1952 à 1962 ; MAURIN, 1954 à 1968 ; DOUTRE, 1960). Dans ces conditions, il nous a paru intéressant de faire appel à des critères autres que ceux utilisés jusqu'alors en entreprenant une étude électrophorétique des protéines du sérum et du cristallin. Les travaux consacrés à l'électrophorèse des protéines sériques des poissons sont déjà nombreux et le caractère le plus remarquable qui s'en dégage est la très grande diversité des profils électrophorétiques et ceci même pour des espèces très voisines dans la systématique. Cette spécificité du schéma électrophorétique caractérise également l'électrophorèse des protéines du cristallin (RABAEY, 1964). *

La présente note donne les premiers résultats d'une étude entreprise sur des individus appartenant à trois espèces :

M. merluccius, M. senegalensis, M. cadenati. Le matériel et les méthodes utilisés, les résultats obtenus seront successivement examinés.

I - MATERIEL.

Les merlus analysés proviennent d'une campagne de chalutage effectuée en mars et avril 1968 par la "Thalassa", navire océanographique de l'Institut des Pêches maritimes le long des côtes occidentales d'Afrique, du cap Juby au cap Vert. Les critères retenus pour déterminer, avant l'analyse électrophorétique, les individus sur lesquels sont pratiqués les prélèvements, peuvent être résumés dans les quelques lignes qui suivent.

M. merluccius. On dénombre 6 vertèbres cervicales sur 49 à 52 vertèbres au total ; le nombre des branchiospines sur le premier arc branchial varie de 9 à 11. La membrane branchiostégale ne présente généralement pas de tache, ou s'il en existe une, cette tache est diffuse.

M. senegalensis. Il y a de 51 à 55 vertèbres dont 6 cervicales. Le nombre des branchiospines se situe entre 12 et 17. Il existe sur la membrane branchiostégale une tache noire nette, petite ou divisée.

M. cadenati. Le merlu désigné sous ce nom correspond en tout point à celui décrit par DOUTRE sous la même appellation en 1960. Peut-être s'agit-il de la même espèce que M. polli de CADENAT. Chez les individus recueillis le nombre des vertèbres cervicales ne dépasse pas 5 sur 52 à 58. Les branchiospines sont moins nombreuses que chez l'espèce précédente (9 à 12). La tache noire de la région branchiostégale est large et continue.

Donnons maintenant la répartition des individus sur lesquels ont été pratiqués les prélèvements de sérum et de cristallin.

M. merluccius, pêché entre le cap Juby et le cap Blancot, sur des fonds de 200 à 600 m, est représenté par 25 femelles (taille moyenne 58,4 cm), 11 mâles (taille moyenne 54,9 cm) et 13 individus de sexe indéterminé (taille moyenne 38,2 cm).

M. senegalensis et M. cadenati ont été capturés tous deux entre le cap Blanc et le cap Vert, entre 200 et 600 m de profondeur. Pour la première de ces deux espèces on dénombre 32 femelles (taille moyenne 54,6 cm), 10 mâles (taille moyenne 50 cm) et 6 immatures (taille moyenne 35,5 cm). Pour la seconde on relève 20 femelles (taille moyenne 46,3 cm), 10 mâles (taille moyenne 45,5 cm) et 10 indéterminés (taille moyenne 34,4 cm).

II - METHODES.

A - Electrophorèse des protéines sériques.

Le sang est prélevé par ponction cardiaque. Après coagulation et centrifugation, le sérum recueilli est conservé à -20°C pour être étudié ultérieurement au laboratoire. Afin de fixer la quantité de sérum qui sera soumise à la séparation électrophorétique, le poids de protéines totales est préalablement déterminé par colorimétrie en faisant intervenir la réaction du Biuret.

1) Electrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose.

Elle a été pratiquée selon la technique de KOHN, 1957. Le tampon utilisé est celui proposé par DEMARET, 1966 : véronal 0,015 M, véronal sodé 0,075 M, de pH 8,6, dilué au demi avant usage. Le générateur est réglé de façon à ce que la différence de potentiel soit de 20 volts par cm de longueur de bande. L'intensité est alors de 1,8 mA par bande de 3 cm de large. Un nouveau réglage de l'intensité intervient après 15 minutes de migration, cette dernière dure 1h30. Les protéines sont révélées par l'amidoschwarz en solution méthanol-acide acétique. La photométrie a été faite au moyen d'un densitomètre intégrateur semi-automatique Jouan, muni d'un filtre centré sur une longueur d'onde de 600 m μ .

2) Electrophorèse sur plaque de gel polyacrylamide.

L'appareil de gélification, la préparation des gels, la conduite de l'électrophorèse ont été dans leur ensemble décrits par GROULADE et PICHOT, 1967. Cependant quelques modifications ont été apportées à la technique précédente ; nous en donnons le détail dans les lignes qui suivent.

a) On ne prépare, pour chaque migration, que quatre bandes de gel de 200 x 27 x 4 mm.

b) La solution de monomères s'établit comme suit :

Acrylamide	28,50 g
NN' méthylène-bis-acrylamide	1,50 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml

La concentration finale en acrylamide est de 7,5 %.

c) Une solution tampon stock, Tris - (hydroxyméthyl) - aminométhane (0,66 M, glycine 0,36 M, de pH 9,2 permet de préparer :

- la solution catalysante

NNN'N'-tétraméthyl-éthylène-diamine	0,25 ml
solution tampon stock q.s.p.	100 ml

- une solution qui sert au lavage des gels, après la gélification pendant une nuit à + 4°C et qui est obtenue par une dilution au 1/4 de la solution stock avant usage

- la solution tampon des cuves réalisée par dilution au 1/4 de la solution stock.

Indiquons par ailleurs que la tension est de 6,5 volts par cm de longueur de bande, l'intensité est de 10 mA par bande de gel, la migration dure 3 heures. Les protéines sont colorées par l'amidoschwarz en solution acétique.

3) Localisation des protéines fixatrices de fer.

Ces mêmes conditions d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ont permis de mettre en évidence les transferrines. Ces protéines ont été localisées d'une part grâce au marquage du sérum par le Fer 59 selon une modalité décrite par FINE, 1968. Nous avons parallèlement utilisé une technique qui s'est avérée d'un emploi plus simple et plus rapide, celle de WANG et coll., 1968. Dans ce cas la transferrine est préalablement saturée en fer, en mettant en contact pendant une heure une goutte de citrate d'ammonium ferrique à 0,15 % et une goutte de sérum. Juste avant la mise en route de l'électrophorèse, 5 gouttes de RIVANOL, (2-éthoxy-6,9 - diamino - acridine lactate), à 0,6 % sont ajoutées pour précipiter les autres protéines sériques. Après centrifugation, l'échantillon est prêt à être appliqué. La révélation est faite avec l'amidoschwarz en solution acétique. Alors que pour le sérum humain une portion des gamma-globulines subsiste sur l'électrophorégramme (fig.2), chez les poissons étudiés seule la transferrine est mise en évidence.

B - Electrophorèse des protéines du cristallin.

Les cristallins débarrassés des tissus qui y adhèrent, puis rincés à l'eau distillée sont conservés à sec et à -20°C dans des tubes à hémolyse. Après décongélation chaque cristallin est broyé, puis les protéines solubles dans l'eau distillée et en solution saline (NaCl à 9‰) sont extraites selon des modalités décrites par SMITH, 1967. L'électrophorèse est faite sur acétate de cellulose après dosage des protéines totales par colorimétrie.

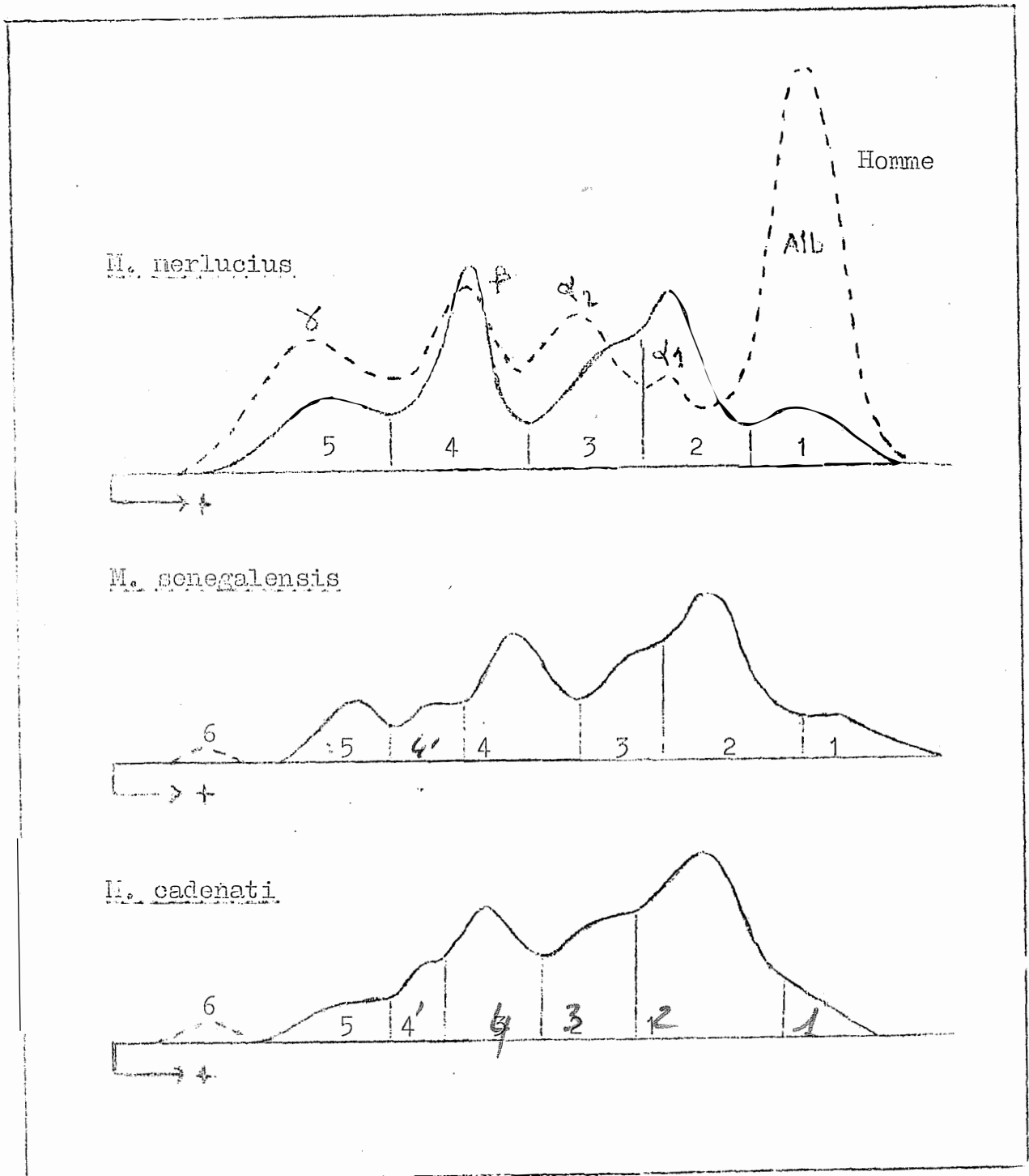


Fig. 1. - Electrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose.

On utilise un tampon véronal 0,011 M, véronal sodé 0,075 M, de pH 9,0. Cette solution est diluée au demi avant usage. La différence de potentiel aux bornes des bandes est de 20 volts par cm ; la migration dure 1h30. La révélation des protéines et la photométrie sont réalisées de la même façon que pour le sérum.

III - RESULTATS.

A - Protéines sériques.

Le poids moyen des protéines totales est de :

45,5 g/l	valeurs extrêmes	30-60	pour	<u>M. merlucius</u>
30,3 g/l	"	"	"	<u>M. senegalensis</u>
36,5 g/l	"	"	"	<u>M. cadenati.</u>

1) Electrophorégramme sur acétate de cellulose (fig.1).

Il montre dans tous les sérums des trois espèces 5 fractions principales. Cependant chez M. senegalensis et M. cadenati il est possible de mettre en évidence, dans la moitié des cas environ, deux fractions supplémentaires 4' et 6. La fraction 6 ne peut être estimée à la photométrie. Les pourcentages relatifs moyens des différentes fractions de 30 individus de chaque espèce apparaissent dans le tableau 1.

Fractions	5	4	3	2	1
Espèces		4'	4		
M. merlucius	10,7	23,5	24,7	31,6	9,5
M. senegalensis	6,2	35,3	22,2	29	7,3
		8,3	27		
M. cadenati	4,7	30,2	17,7	40,5	6,9
		3,8	26,4		

Tabl. 1. - Valeurs relatives moyennes des protéines sériques obtenues par électrophorèse sur acétate de cellulose.

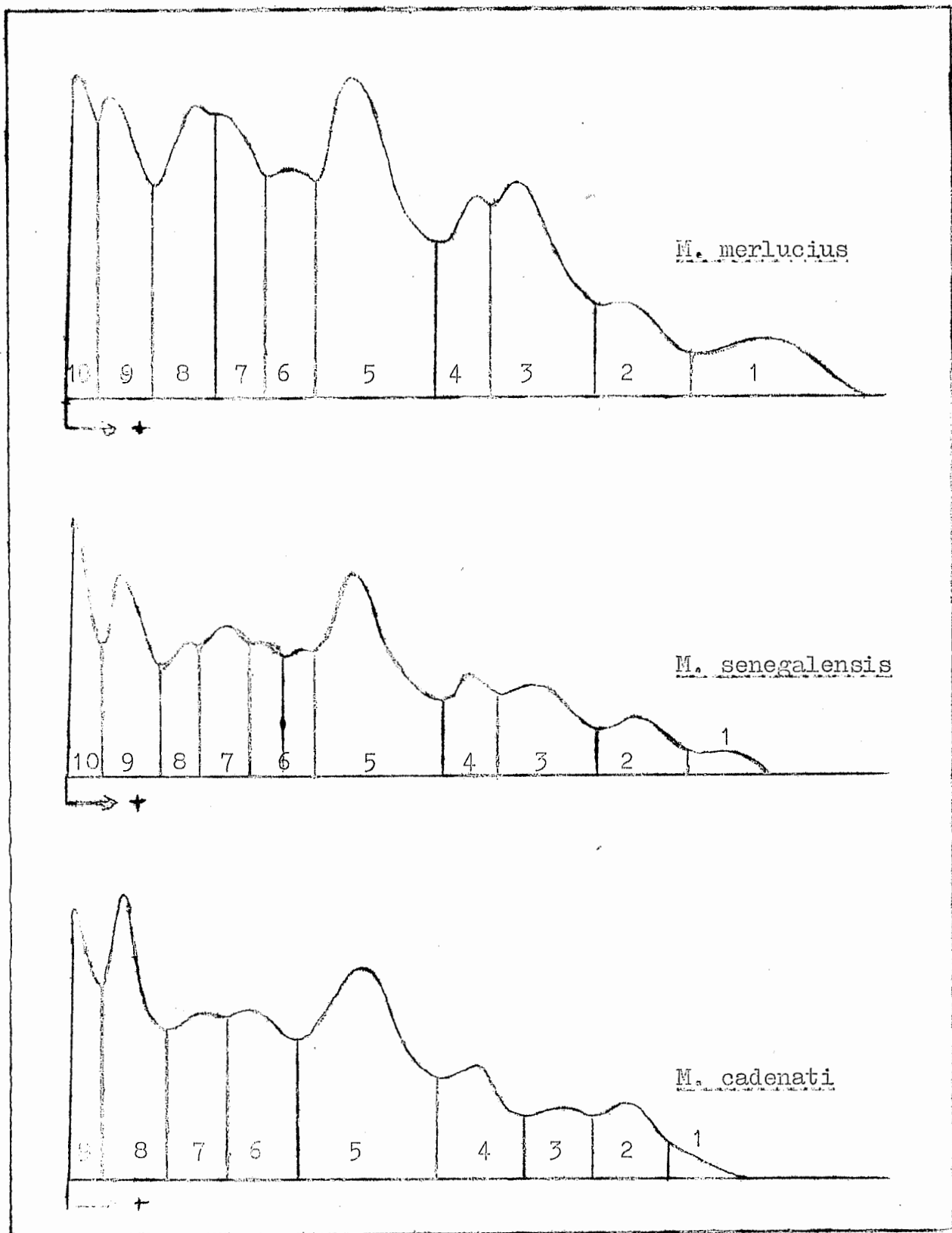


Fig. 2. - Electrophorèse des protéines sériques en gel de polyacrylamide.

Lorsque l'on compare les moyennes relatives de M. merluccius et de M. senegalensis, celles de ce dernier se différencient essentiellement par une diminution des fractions 1 et 5. Cependant, il est en fait souvent très difficile de caractériser individuellement deux sérums appartenant à chacune de ces deux espèces. En revanche M. cadenati montre une fraction 2 assez sensiblement supérieure à celle des deux espèces précédentes, mais là encore ce caractère n'est pas constant.

En conclusion l'électrophorèse sur acétate ne permet pas de différencier les trois espèces.

2) Diagramme électrophorétique sur gel de polyacrylamide (fig.2).

Il permet de mettre en évidence 10 fractions dans le sérum de M. merluccius comme dans celui de M. senegalensis. Dans les deux cas la fraction 6 peut se subdiviser parfois en deux sous-fractions. La distinction entre ces deux espèces est difficile à faire, voire impossible, certains sérums pouvant être attribués à l'un ou l'autre de ces merlus.

Au contraire, M. cadenati, bien qu'assez proche des deux précédents, dans l'allure générale du protéinogramme, s'en sépare :

- par une diminution accentuée de la fraction 1 (tabl.2) qui peut même disparaître dans certains cas,

- par l'absence de fraction dans la zone correspondant à la fraction 6 de M. merluccius et M. senegalensis,

- par le caractère particulier de la fraction 5. Elle présente tout d'abord une mobilité plus grande que la fraction correspondante des deux espèces précédentes. Sur les électrophorégrammes son aspect est également différent : alors que chez les deux autres merlus elle se présente sous l'aspect d'une ligne nettement définie, elle forme chez M. cadenati une fraction étalée. Enfin dans toutes les électrophorèses elle s'est révélée homogène. Ce dernier caractère s'oppose à la présence de deux fractions très nettes chez certains individus appartenant aux deux espèces M. merluccius et M. senegalensis.

Fractions	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Espèces										
<i>M. merluccius</i>	7	8	12	9	8,5	24	8	12,5	6	5
<i>M. senegalensis</i>	7	14	9	11	12	23	7	9	5	3
<i>M. cadenati</i>	13	14	15	11		25	9	5	7	1

Tabl. 2. -- Valeurs relatives moyennes (pour 10 individus) des protéines sériques mises en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

3) Caractérisation des transferrines.

Les essais d'identification de ces protéines montrent que leur localisation se situe au niveau de la fraction 5 pour les trois espèces. Chez *M. merluccius* et *M. senegalensis* il existe un ou deux composants transferriniques par sérum (fig.3). La mobilité électrophorétique des différents composants est identique chez ces deux espèces. Le composant le plus rapide est appelé Tf A, le plus lent Tf C, celui dont la mobilité est intermédiaire Tf B. Les phénotypes possédant seulement Tf A, Tf B, Tf C, sont appelés respectivement AA, BB, CC. Les phénotypes hétérozygotes AB et BC ont seuls été trouvés. Le nombre d'analyses étant encore insuffisant pour entreprendre avec certitude une étude génétique, seule la distribution des phénotypes rencontrés est donnée dans le tableau 3.

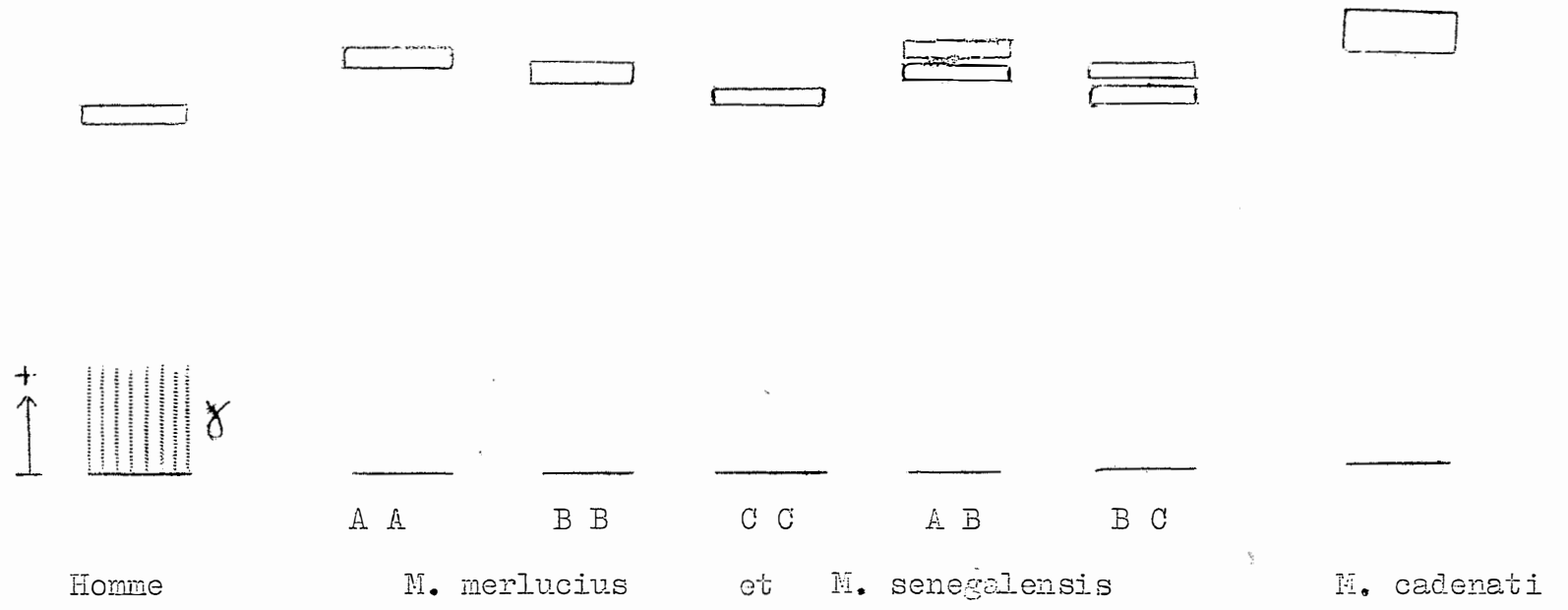


Fig. 3. - Types de transferrines étudiés par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Espèces	M. merluccius	M. senegalensis
Phénotypes		
AA	3	2
BB	10	11
CC	1	3
AB	1	•
BC	4	1

Tabl. 3. - Répartition des types de transferrines chez M. merluccius et M. senegalensis.

La mobilité toujours supérieure et l'homogénéité rencontrées chez les 20 individus de M. cadenati examinés nous ont conduit à séparer le composant observé chez cette espèce des types précédents. Nous l'appelons transferrine de type cadenati.

B - Protéines du cristallin.

Le diagramme électrophorétique des protéines du cristallin est sensiblement différent chez les trois espèces de merlus (fig.4). On distingue nettement 7 fractions chez M. merluccius, 6 chez M. senegalensis et 5 chez M. cadenati. Les deux premiers se différencient par la présence chez M. merluccius

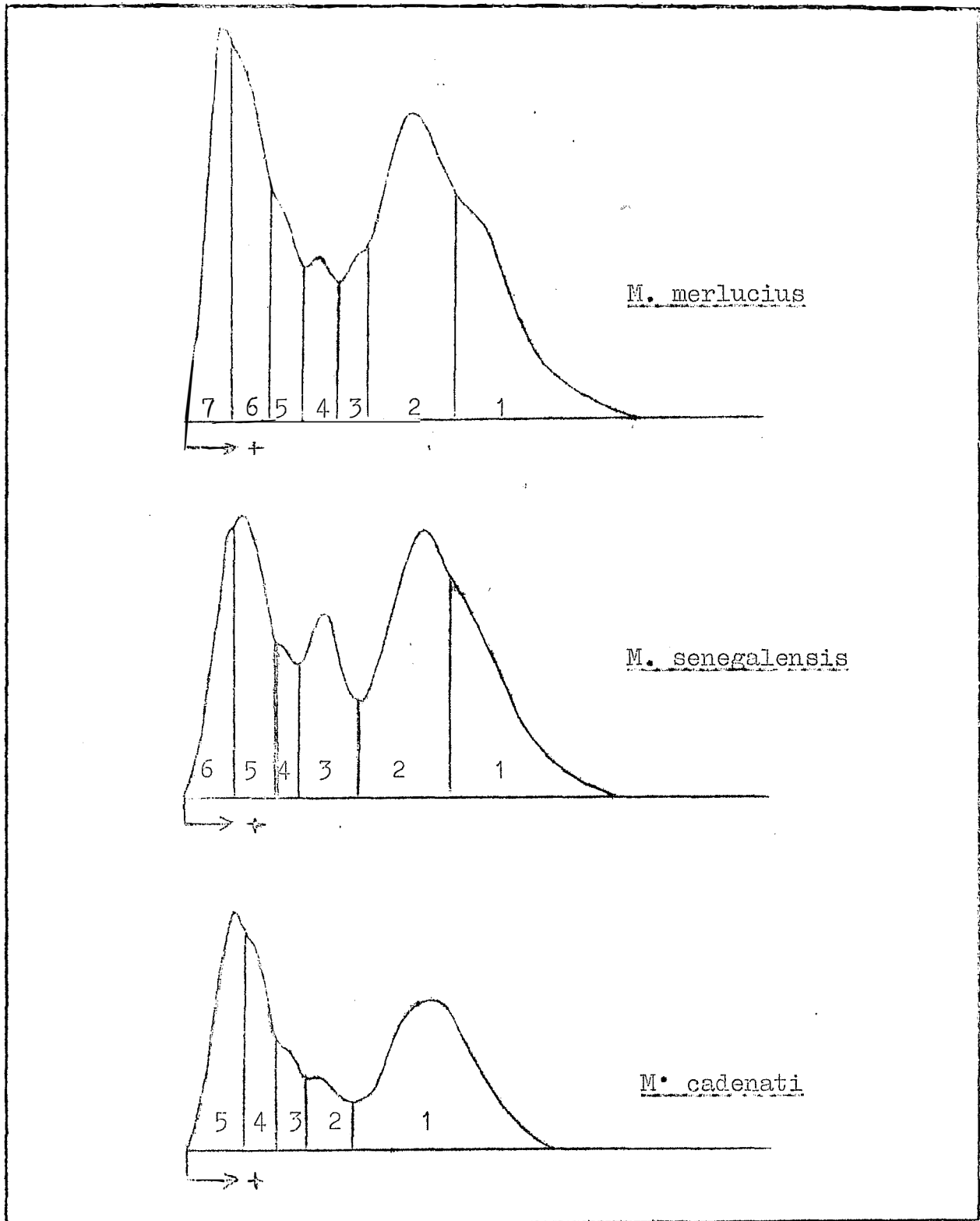


Fig. 4. - Electrophorèse des protéines du cristallin sur acétate de cellulose.

d'une fraction 3 qui n'existe pas chez *M. senegalensis*. *
M. cadenati se sépare des précédents par l'homogénéité de sa fraction la plus rapide. ~~A la suite de RABATY (1964)~~
 Nous avons toujours constaté jusqu'à présent que chez des espèces proches les différences résident essentiellement dans une variabilité des protéines qui migrent en arrière de cette fraction. Ce caractère nous donne à penser que *M. cadenati* est plus différent des deux autres merlus que ces derniers entre eux.

Fractions	7	6	5	4	3	2	1
Espèces							
<i>M. merluccius</i>	16,5	15,3	8,4	6,6	6,5	28,6	18,1
<i>M. senegalensis</i>	14,2	16,1	6,1	12,6		31,6	19,4
<i>M. cadenati</i>	20	15,5	9,1	7,4		48	

Tabl. 4. - Pourcentages relatifs moyens des protéines du cristallin séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose.

— CONCLUSION

~~Cette étude des protéines du sérum et du cristallin de merlus appartenant à trois espèces, *M. merluccius*, *M. senegalensis*, *M. cadenati*, bien que limitée par la grandeur restreinte de l'échantillonnage amène quelques remarques :~~

CONCLUSION

Cette première étude des protéines du sérum et du cristallin de merlus appartenant aux trois espèces Merluccius merluccius, M. senegalensis, M. cadonati, bien que limitée par la grandeur restreinte de l'échantillonnage, semble ouvrir des perspectives intéressantes dans l'étude de ce genre en complétant les données morphologiques généralement utilisées.

L'accent sera mis plus spécialement ici sur la description de quatre types transferriniques. L'un d'entre eux, que nous avons appelé transferrine de type cadonati ne se trouve que chez cette espèce. Il est caractérisé par une mobilité toujours supérieure à celle des types observés chez les deux autres merlus.

Les trois autres transferrines appelées par ordre de mobilité décroissante TFA, TFB, TFC se retrouvent aussi bien chez Merluccius merluccius que chez M. senegalensis.

Le profil électrophorétique des protéines du cristallin semble caractéristique de l'espèce. Il est cependant nécessaire de faire ici un examen critique de la variabilité des caractères biochimiques étudiés. C'est ainsi que ce sont seulement les variations observées sur les électrophorogrammes de cristallin appartenant à plus de 40 espèces de poissons qui nous permettent de dire que M. cadonati semble plus éloigné systématiquement des deux autres merlus que ces derniers entre eux.

Cet ensemble de caractères (transferrines et protéines du cristallin) nous donne à penser que M. cadonati est une espèce taxonomiquement bien définie.

Nous rejoignons en cela les conclusions tirées des caractères morphologiques où M. cadenati est caractérisé par exemple par la présence de cinq vertèbres cervicales alors que les deux autres espèces en possèdent chacune six.

Seule une étude, plus importante par le nombre d'analyses, de la répartition des différents phénotypes de transferrine chez Merluccius merluccius et M. senegalensis, permettrait de conclure ou non à leur autonomie.

BIBLIOGRAPHIE

- DEMARDE (M.), 1966. - Microméthode d'électrophorèse sur acétate. - Ann. Biol. clin., 1966, 24, 369.
- DOUVERE (M.P.), 1960. - Les merlus du Sénégal, mise en évidence d'une nouvelle espèce. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 24, 4, 513-536.
- PINE (J.M.), 1968. - Electrophorèse en gel d'amidon. In : PINE (J.M.) et ROPARTEZ (C.). - Techniques d'électrophorèse de zones. Applications à l'étude des protéines sériques. - Collection Techniques de Base, La Touraille, édit. Paris, 276 p.
- FRANCA (P. da), 1952. - Merluccius merluccius (L.) et Merluccius senegalensis CADENAT : seus caracteres distintivos. - Notas estudos Inst. Biol. marit. Lisboa, 3, 1-36.

- FRANCA (P. da), 1962. - Considérations sur la taxonomie des Merluccius de l'Atlantique orientale. - Mem. Junta Invest. Ultramar, 2^o ser., 36, 7-48.
- GROULADE (J.) et PICHOT (P.), 1967. - Electrophorèse des protéines sériques en plaques de gel d'acrylamide. - Ann. Biol. clin., 25, 371-381.
- KOHN (J.), 1957. - Cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. - Clin. chim. Acta, 2, 297.
- MAURIN (C.), 1954. - Etude comparative du "merlu blanc" (Merluccius merluccius L.) et du merlu "noir" (Merluccius senegalensis CADENAT). - Cons. int. Explor. mer, J. cons., 19, n^o3.
- 1968. - Les merlus des côtes nord et nord-ouest d'Afrique (Atlantique et Méditerranée). Thèse, Nancy, 1-44.
- RABAËY (M.), 1964. - Comparative study of tissue proteins (lens and muscle) in fish. Protides of the Biological Fluids, 273-377.
- SMITH (A.C.), GOLDSTEIN (R.A.), 1967. - Variation in protein composition of the eye lens nucleus in ocean whitefish Caulolatilus princeps. - Comp. Biochem. Physiol., 23, 533-539.
- WANG (A.C.), SHUSTER (J.), EPSTEIN (A.) et FUDENBERGH (H.H.), 1968. - Evolution of antigenic determinants of Transferrin and other serum proteins in primates. - Biochem. Genetics, 1, 347-358.

ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES DU SÉRUM ET DU
CRISTALLIN DES MERLUIS DE LA CÔTE NORD-OUEST AFRICAINE

par P. PICHOT

Résumé

L'électrophorèse des protéines du sérum et du cristallin de Merluccius merluccius, Merluccius senegalensis et Merluccius cadenati a été réalisée sur membrane d'acétate de cellulose et en gel de polyacrylamide. Le matériel étudié provient d'une campagne de chalutage effectuée par le navire océanographique "Thalassa" en mars et avril 1968, du cap Juby au cap Vert.

Certaines différences dans la répartition des fractions apparaissent, en particulier un polymorphisme des transferrines. Quatre types de transferrines sont décrits : l'un caractéristique de l'espèce M. cadenati ; les trois autres (A, B, C) étant présents aussi bien chez Merluccius merluccius que chez Merluccius senegalensis.

Institut des Pêches maritimes
Laboratoire de S.M.P.