

ETUDE COMPARATIVE PAR ELECTROPHORESE DE *SCOMBER SCOMBRUS* ET *SCOMBER COLIAS*

par Marc BONNET et Paul PICHOT

Les recherches antérieures sur le tissu sanguin du maquereau concernaient, d'une part les groupes sanguins, d'autre part l'immunologie des protéines sériques (BONNET, 1967). Leur but était de mettre en évidence l'existence éventuelle de races distinctes au sein de l'espèce *Scomber scombrus*.

Dans ce même but fut entreprise l'étude par électrophorèse des protéines du sérum et du cristallin. Elle visait, tout d'abord, à dégager des caractères biochimiques ayant une valeur spécifique certaine ce qui nous a amenés à établir une comparaison entre les diagrammes protéiniques de *Scomber scombrus* et de *Scomber colias*. Les résultats obtenus sont l'objet de ce rapport dans lequel figurent également des données sur le matériel et les techniques utilisés.

Les recherches ultérieures consisteront à voir si certains de ces caractères distinctifs au niveau de l'espèce présentent des variations suivant les secteurs de pêche.

I. - Matériel étudié.

Le matériel étudié comprend au total 20 sérums et 22 cristallins de *Scomber scombrus*, 10 sérums et 18 cristallins de *Scomber colias*. Pour la première espèce, 20 individus proviennent du golfe du Lion, 2 de la région de Boulogne. Pour *Scomber colias*, 10 poissons sont originaires des côtes de Mauritanie, 8 de celles de Tunisie.

Le sang et les cristallins sont prélevés immédiatement après la capture des maquereaux. Le sang, recueilli par ponction cardiaque, est centrifugé tout de suite ; le sérum obtenu est conservé à -20°C jusqu'à son analyse au laboratoire. Les cristallins sont récoltés par incision de la cornée, disposés par paire dans des tubes à hémolyse hermétiquement bouchés et stockés, comme les sérums, à une température de -20°C .

II. - Techniques d'analyse.

1) *Extraction des protéines solubles du cristallin.*

Avant leur analyse électrophorétique, il faut procéder à l'extraction des protéines du cristallin solubles dans l'eau distillée et dans une solution physiologique (SMITH et GOLDSTEIN, 1967). Les échantillons sont d'abord décongelés et lavés à l'eau distillée. Ils sont ensuite broyés dans un tube à hémolyse à l'aide d'un agitateur de verre ; un volume d'eau distillée égal au double de celui des deux cristallins est alors ajouté. Une goutte de merthiolate à 1 ‰ assure la conservation de ce mélange qui est entreposé au réfrigérateur pendant 24 heures, tube fermé. Par la suite, on dilue au demi avec une solution de chlorure de sodium à 18 ‰ et, après un nouveau passage de 24 heures au réfrigérateur, on recueille après centrifugation (5 000 tours/minute) le surnageant destiné à l'électrophorèse.

2) *Evaluation des protéines totales.*

Le poids des protéines totales permet de déterminer la quantité de sérum ou d'extrait de cristallin à étaler sur le support électrophorétique. Pour l'évaluer on utilise la méthode colorimétrique faisant intervenir la réaction du biuret (FLEURY et EBERHARD, 1951-1952).

3) *Electrophorèse sur acétate de cellulose.*

Pour l'électrophorèse des protéines et des glycoprotéines, le support choisi est l'acétate de cellulose Microphor (format 160 x 25 mm). Le tampon utilisé, véronal 0.014 M - véronal sodé 0.074 M (pH 8.6), est dilué au demi avant usage (DEMARET, 1966). L'échantillon à étaler a un volume de 300 microgrammes ; cette quantité est obtenue par dilution du sérum ou de l'extrait de cristallin en fonction du poids des protéines totales. Une différence de potentiel de 22 volts par centimètre de longueur de bande permet une bonne séparation des protéines, l'intensité étant de 0,6 milliampère par centimètre de large. La migration dure 90 minutes. Le colorant employé est l'amidoschwarz 10 B en solution méthanol-acide acétique. Le procédé de révélation des glycoprotéines est celui décrit par GROULADE (1961) ; il consiste en une coloration à l'acide periodique - réactif de Schiff.

Pour l'électrophorèse des lipoprotéines le support adopté est le film d'acétate de cellulose « Cellogel » de Chemetron. Les migrations se font dans les mêmes conditions que les précédentes, la coloration est réalisée dans une solution hydro-alcoolique de noir cérol B.

4) *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.*

Pour l'analyse des protéines sériques, sont également utilisées des plaques de gel de polyacrylamide (200 x 27 x 4 mm). Leur concentration est de 7,5 % en acrylamide, et de 0,2 % en NN' méthylène-bis-acrylamide. L'appareil de gélification, la préparation des gels, les procédés d'électrophorèse, sont ceux décrits par GROULADE et PICHOT (1967). Le tampon adopté est celui proposé par MATSON (1965) : tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane 0.16 M, glycine 0.09 M, pH 9.2. Le poids de protéines soumis à la séparation est de 700 microgrammes. La migration dure 4 h avec une différence de potentiel de 7 volts par centimètre de longueur de bande et une intensité de 0.08 milliampère par mm² de section de gel. La coloration est faite par l'amido-schwarz en solution acétique.

III. - Résultats.

1) *Protéines totales.*

L'évaluation du poids des protéines totales fait apparaître une différence assez nette entre *Scomber scombrus* et *S. colias*. En effet, les valeurs moyennes sont les suivantes :

pour <i>S. scombrus</i> :	65 g/l dans le sérum
	70 » dans le cristallin
pour <i>S. colias</i> :	34 g/l dans le sérum
	30 » dans le cristallin

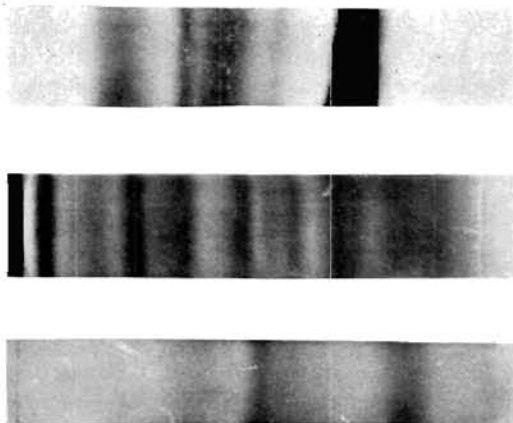


FIG. 1. — Protéinogramme sur acétate de cellulose du sérum humain (en haut), du sérum de *Scomber scombrus* (au milieu), et de *S. colias* (en bas).

2) *Electrophorèse du sérum sur acétate de cellulose.*

a) **Protéines.** Les protéinogrammes (fig. 1) et leur enregistrement photométrique (fig. 2) font apparaître des différences très nettes entre les deux espèces de maquereaux. La première remarque d'ensemble qui peut être faite est que le nombre de fractions est plus élevé chez *S. scombrus* (13 fractions) que chez *S. colias* (8 fractions). L'examen détaillé de ces documents se traduit par les points suivants.

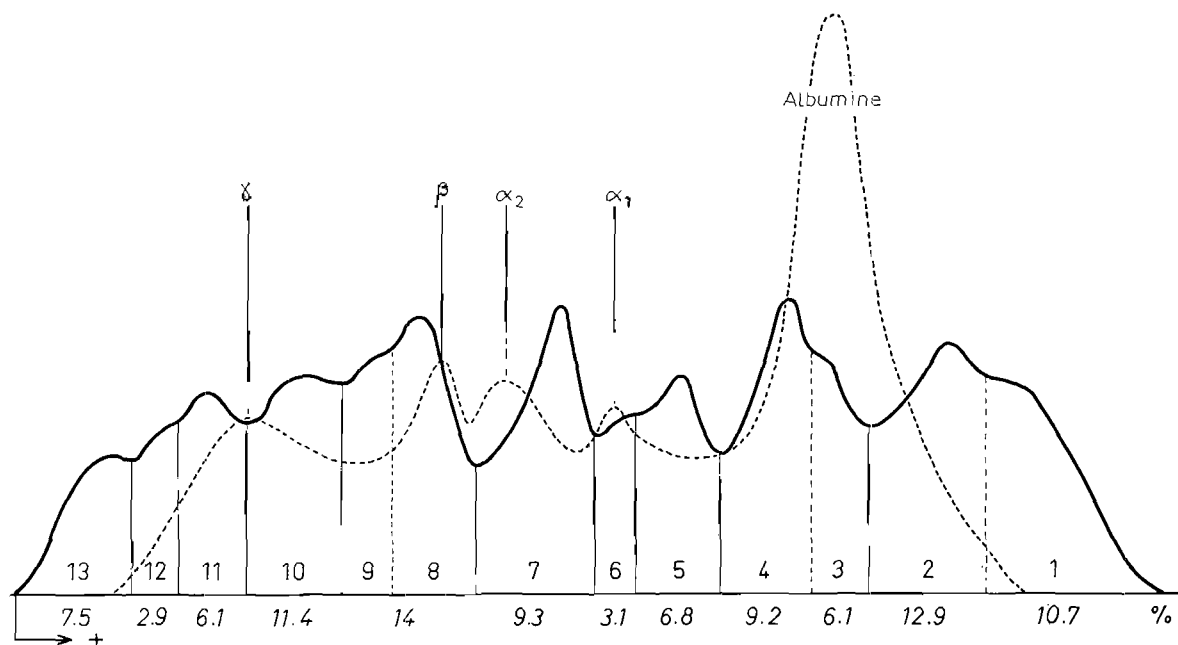
1) Dans la zone occupée par l'albumine humaine, quatre fractions (1, 2, 3 et 4) de *S. scombrus* correspondent à deux fractions (a et b) de *S. colias*. Il est à noter que la séparation entre les fractions 1 et 2 d'une part, 3 et 4 d'autre part, est difficile à obtenir avec certains sérums. De plus, la fraction b a tendance à migrer plus rapidement que les fractions 3 et 4.

2) Au niveau des alpha-globulines humaines se situe, légèrement en avant de l'alpha-2, une

fraction commune très nette : 7 pour *S. scombrus*, e pour *S. colias*. Elle est précédée par deux autres fractions communes mais moins marquées : 5 et 6. c et d.

3) Dans la zone de la beta-globuline humaine, les fractions 8 et 9 de *S. scombrus*, g et f de l'autre espèce, sont parfois difficiles à séparer.

4) A la gamma-globuline humaine correspondent quatre fractions (10, 11, 12 et 13) de *S. scombrus* et une seule (h) de *S. colias*. Les fractions 11, 12, 13 et h ont parfois une importance quantitative très faible ; elles peuvent disparaître.



Scomber scombrus

Scomber colias

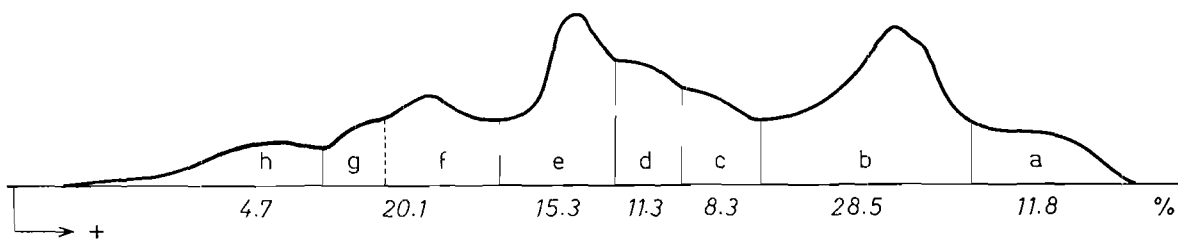


FIG. 2. Enregistrements photométriques des électrophorèses des protéines sériques sur acétate de cellulose.

Sur les protéinogrammes typiques qui viennent d'être décrits et comparés, les variations individuelles qui existent entre les sérums n'apparaissent pas. Ces variations, dont certaines ont déjà été soulignées, peuvent se résumer pour chaque espèce de la manière suivante.

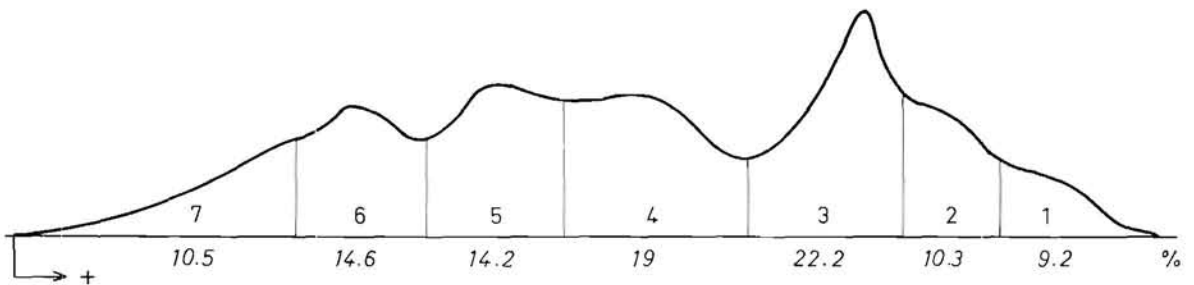
Scomber scombrus. Parmi les vingt sérums analysés :

trois présentent une fraction supplémentaire située sur le côté cathodique de la fraction 7,

un est dépourvu de fractions 11 et 12,

un autre ne présente pas les fractions 12 et 13.

Scomber colias. Sur les dix sérums soumis à l'électrophorèse :
trois ont une fraction supplémentaire sur le côté cathodique de la fraction e,
trois sont dépourvus de la fraction h.



Scomber scombrus

Scomber colias

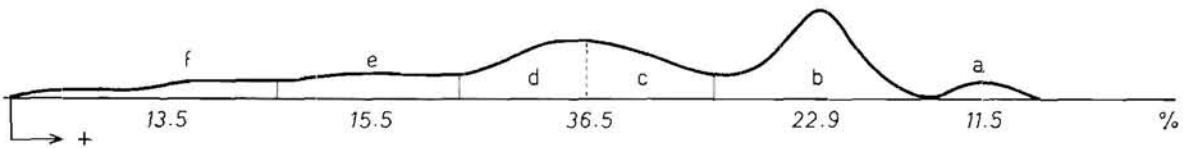


FIG. 3. — Enregistrement photométriques des électrophorèses des glycoprotéines sur acétate de cellulose.

b) Glycoprotéines. Comme les protéines, les glycoprotéines se répartissent en quatre groupes de fractions électrophorétiques qui correspondent successivement à l'albumine, aux alpha-, à la beta- et à la gamma-globuline humaines (fig. 3).

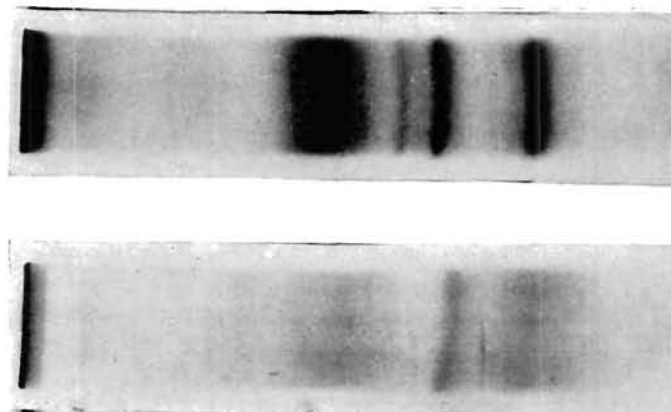


FIG. 4. — Protéinogramme sur gel de polyacrylamide du sérum de *Scomber scombrus* (en haut) et de *S. colias* (en bas).

1) Le premier groupe est composé de trois fractions chez *S. scombrus* (1, 2 et 3) et de deux chez *S. colias* (a et b). La fraction a correspond à 1 et 2, la b à 3.

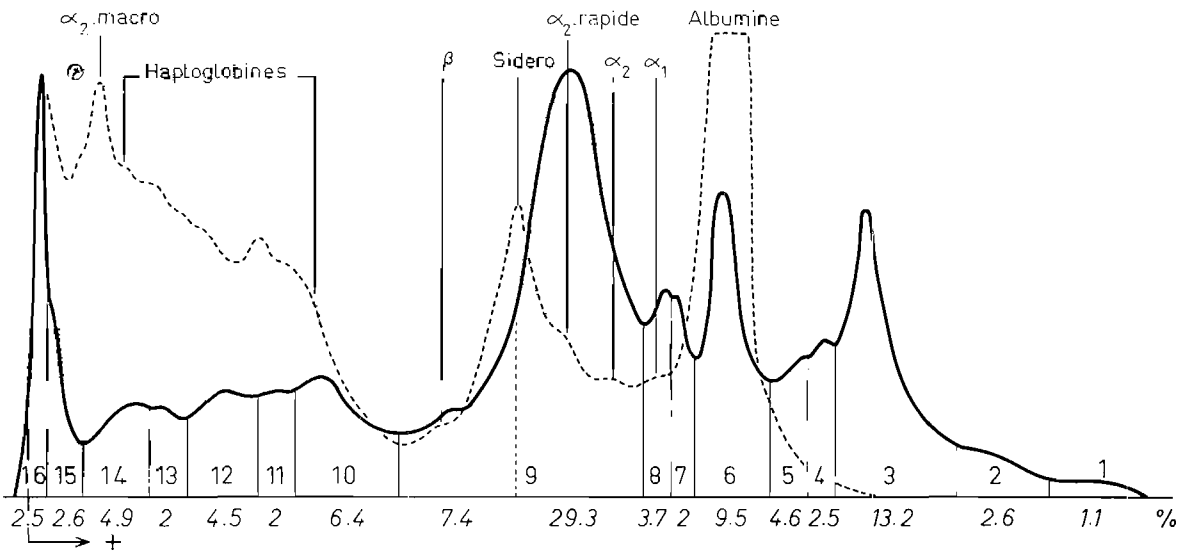
2) Le deuxième groupe, qui s'étale dans la zone des alpha-globulines humaines, est toujours hétérogène chez *S. scombrus* (fractions 4 et 5), le plus souvent homogène chez l'autre espèce, les fractions c et d étant difficilement séparables.

3) Au niveau de la beta-globuline humaine, se situent les fractions similaires 6 et e.

4) Enfin, à la beta-globuline correspondent les fractions 7 et f.

Il est à remarquer que la répartition des glycoprotéines est semblable à celle des protéines. Toutefois, la fraction 4 du protéinogramme (fig. 2) est nettement plus marquée que la partie anodique de la fraction 4 du glycoprotéinogramme, partie à laquelle elle correspond.

e) Lipoprotéines. Deux fractions ont pu être mises en évidence sur les lipoprotéinogrammes de *S. scombrus* et *S. colias*. La première migre au niveau des fractions 1 et 2 du protéinogramme, la seconde dans la zone des alpha-globulines humaines.



Scomber scombrus

Scomber colias

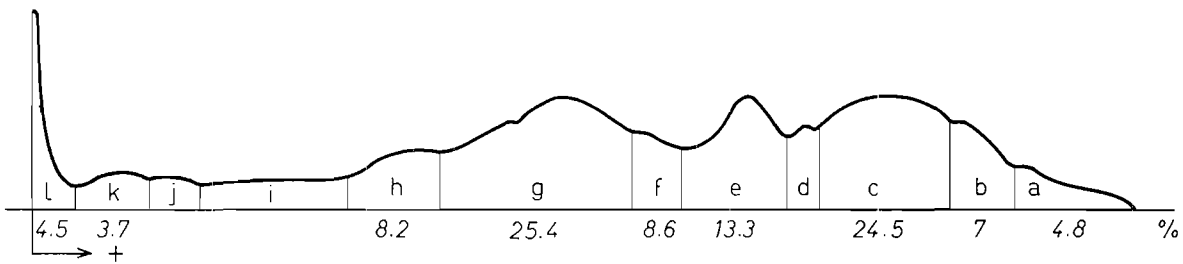


FIG. 5. -- Enregistrements photométriques des électrophorèses de protéines sériques sur gel de polyacrylamide.

3) Electrophorèse du sérum sur gel de polyacrylamide.

Les protéinogrammes obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide font aussi apparaître des différences entre les deux espèces de maquereaux (fig. 4). Les développements photométriques précisent ces différences ; ceux représentés sur la figure 5 étant les plus caractéristiques parmi

les seize réalisés pour *S. scombrus* et les dix effectués pour *S. colias*. Les résultats de l'examen comparé de ces deux enregistrements sont les suivants.

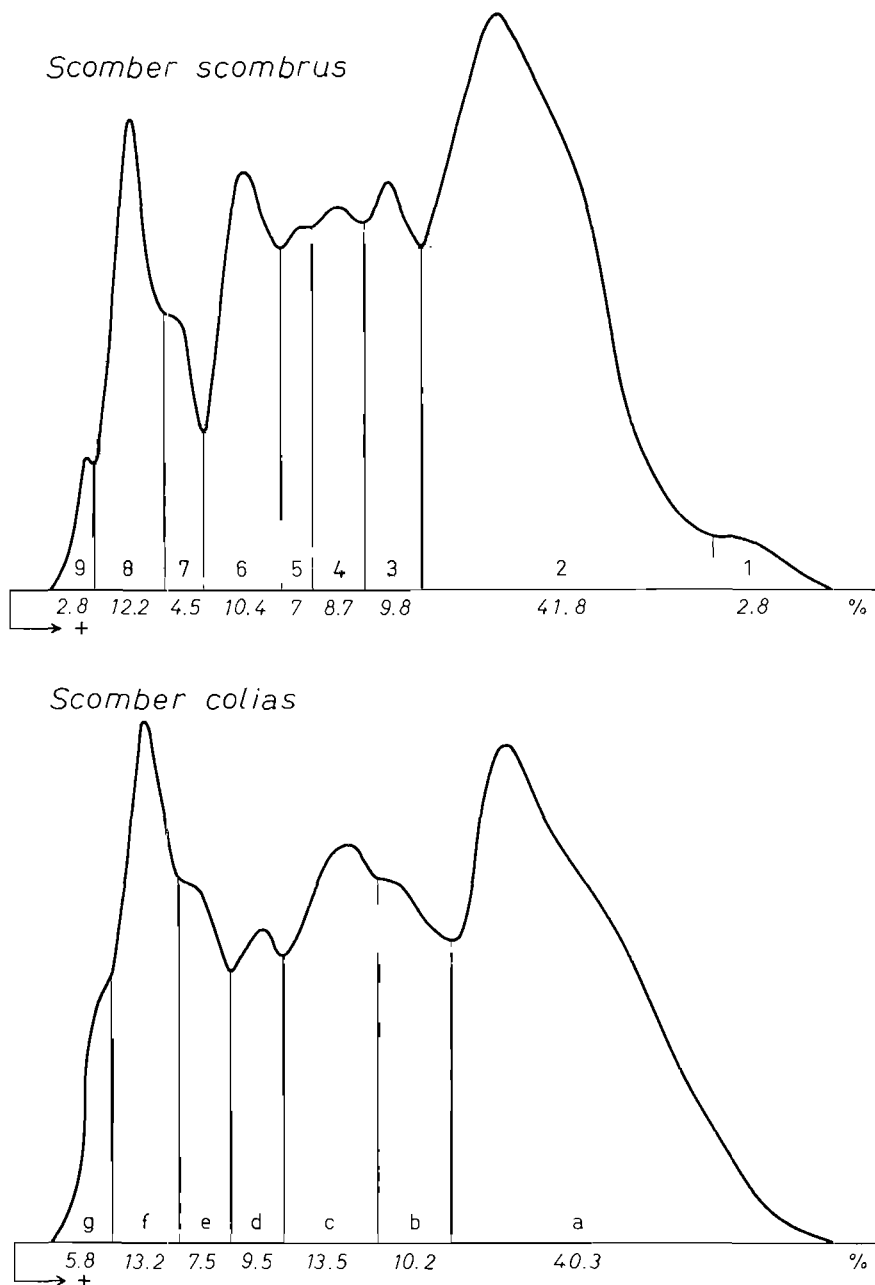


Fig. 6. — Enregistrements photométriques des électrophorèses des protéines du cristallin sur acétate de cellulose.

1) En avant de l'albumine humaine, cinq fractions (1 à 5) de *S. scombrus* correspondent à quatre fractions (a à d) de *S. colias*.

2) Au niveau de l'albumine, une fraction très nette est mise en évidence pour les deux espèces : 6 chez *S. scombrus*, e chez *S. colias*.

3) Migrant un peu en avant de la transferrine humaine, une fraction (9 et g) domine l'ensemble de l'électrophorégramme. Elle est précédée de deux fractions chez *S. scombrus* (7 et 8), d'une seule chez *S. colias* (f).

4) Dans la zone des haptoglobines humaines se situent cinq fractions chez *S. scombrus* (10 à 14). Ces fractions, très fines, évoquent par leur morphologie celle des haptoglobines humaines. Pour *S. colias*, trois fractions ont le même aspect (h, j et k), la fraction i étant très étalée et pouvant être absente dans certains cas. Le côté anodique du réservoir de dépôt est occupé par une fraction (16 et l) qui rappelle la beta-1-lipoprotéine humaine. Chez *S. scombrus* la fraction supplémentaire 15 n'est pas toujours visible.

Cette description de l'électrophorégramme correspond au type le plus couramment obtenu. Certaines variations individuelles apparaissent parfois. C'est ainsi que sur les seize sérums de *S. scombrus* analysés, deux montrent une hétérogénéité marquée au niveau de la fraction 6. Dans ce cas, une fraction supplémentaire très nette apparaît du côté anodique de cette fraction.

4) *Electrophorèse des protéines du cristallin sur acétate de cellulose.*

La répartition électrophorétique des protéines du cristallin de *S. scombrus* réalisée sur acétate de cellulose est comparable à celle obtenue par RABAËY (1964) sur gélose. Les enregistrements photométriques (fig. 6) mettent en évidence, d'une part de nombreux points communs entre les deux espèces de maquereaux, d'autre part des différences caractéristiques.

Parmi les points communs, les plus évidents sont représentés par la correspondance des fractions 2 et a, 6, 7, 8, 9 et d, e, f, g.

Les différences se traduisent par la présence constante de deux fractions supplémentaires chez *S. scombrus* ; il s'agit des fractions 1 et 5.

Conclusion.

Les résultats de ces recherches préliminaires sur les protéines du sérum et du cristallin de *Scomber scombrus* et *S. colias*, par électrophorèse, se résument en trois points.

1) La parenté entre les deux espèces se traduit par des constituants protéiniques communs dans l'un et l'autre des tissus étudiés.

2) La distinction entre les deux maquereaux est nette. Dans le sérum et dans le cristallin de *S. scombrus* le nombre de protéines est supérieur à celui trouvé pour *S. colias*, ceci quelle que soit la technique utilisée.

3) Il existe des variations individuelles dont la nature n'est pas encore précisée.

L'intérêt de cette étude comparative a été de dégager certains caractères propres à l'espèce *Scomber scombrus*. Les recherches ultérieures montreront si ces caractères sont susceptibles de varier suivant les lieux de capture ce qui permettrait de conclure à l'existence de races. Elles consisteront également à voir si les variations individuelles décelées peuvent être exploitées dans le même but.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BONNET (M.), 1967. — Observations biologiques et physiologiques sur le maquereau du golfe du Lion (*Scomber scombrus* L.). — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **31** (4) : 333-338.
- DEMARET (M.), 1966. — Microméthode d'électrophorèse d'un acétate. — *Ann. Biol. Clin.*, **24** : 369.
- FLEURY (P.) et EBERHARD (R.), 1962. — Dosage des protéines par la méthode de Biuret in : *Mises au point biologiques*, 268 p., X planches. — Paris, VIGOT Frères Edit.
- 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** : 371-381.

- MATSON (C.F.), 1965. — Polyacrylamide gel electrophoresis, a simple system using gels columns. — *Analyt. Biochem.*, **13** : 294-304.
- SMITH (A.C.) et GOLDSTEIN (R.A.), 1967. — Variation in protein composition of the eye lens nucleus in ocean whitefish *Caulolatilus princeps*. — *Comp. Biochem. Physiol.*, **23** : 533-539.
- RABAEY (M.), 1964. — Comparative study of tissue proteins (lens and muscle) in fish. — *Protides biol. Fluids*, **12** : 273-277.
-