

ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DU CRISTALLIN DE SPARIDES ET CENTRACANTHIDES MEDITERRANEENS

par Paul PICHOT et David A. POLLARD

Au cours des vingt dernières années, des techniques nouvelles comme l'électrophorèse ont permis d'aborder l'étude détaillée des protéines ; elles ont trouvé de nombreuses applications dans les recherches sur la systématique. La spécificité des électrophorégrammes des protéines sériques, en particulier, a été notée par un grand nombre d'auteurs. Cependant la valeur de l'électrophorèse du sérum pour des études taxonomiques est fréquemment critiquée ; en effet, l'état physiologique et les conditions d'environnement peuvent altérer les protéinogrammes, aussi bien par des variations dans la distribution quantitative des protéines normalement présentes que par la formation de nouvelles protéines.

Dans ces conditions, il nous a paru intéressant de faire appel à l'électrophorèse des protéines d'un autre tissu. Les travaux de RABAEY (1964) et de SMITH et GOLDSTEIN (1967) nous ont conduits à choisir le cristallin. Ces auteurs ont en effet noté que les électrophorégrammes obtenus à partir de ce tissu présentent de nombreuses fractions et qu'ils sont très caractéristiques de l'espèce.

Dans la première partie de ce travail nous avons voulu préciser certaines données techniques qui nous ont permis d'obtenir, d'une part une séparation nette des différentes fractions, d'autre part une bonne reproductibilité des résultats, conditions indispensables pour une telle étude. La seconde partie se présente sous l'aspect d'un examen critique de la variabilité des caractéristiques biochimiques étudiées dans un groupe systématique restreint.

Nous avons choisi les familles des Sparidés et des Centracanthidés dont les espèces ont été bien étudiées et en général bien définies du point de vue des critères morphologiques conventionnels. Cependant la présence d'un polychromatisme chez les Centracanthidés (POLLARD et PICHOT, 1970) ou de changements de forme au cours du développement chez les Sparidés (BONNET, 1969) rend parfois incertaine la position systématique de quelques formes proches.

I. - Matériel et méthodes.

1. - Origine du matériel étudié.

Tous les Sparidés et Centracanthidés étudiés dans ce travail proviennent de la côte méditerranéenne française. La plus grande partie de l'échantillonnage a été pêchée au chalut, sur des fonds de 70 à 80 m situés au sud de Sète, ou dans la région de Toulon. Quelques spécimens ont été capturés au filet maillant, sur des fonds rocheux de 10 à 15 m dans la région de Sète, ou dans l'étang de Thau.

Après que les cristallins aient été recueillis, chacun d'eux est débarrassé des tissus qui y adhèrent (ligament suspenseur, muscle rétracteur, humeur vitrée) puis rincé dans de l'eau distillée. Ils peuvent être conservés pendant plusieurs semaines à -20°C , à sec, dans des tubes à hémolyse.

2. - Extraction des protéines.

Les protéines solubles dans l'eau et en solution saline (NaCl à 9 %) (SMITH et GOLDSTEIN, 1967) sont extraites de la façon suivante. L'échantillon est décongelé 48 h avant l'électrophorèse, puis rincé à nouveau dans de l'eau distillée. Le cristallin est finement écrasé dans un tube à hémolyse, au moyen

d'une tige de verre, en ajoutant progressivement un volume d'eau distillée égal au double du poids du cristallin. Le tube bouché est alors placé dans un réfrigérateur à + 4°C pendant 24 h. Une dilution au demi est ensuite réalisée au moyen d'une solution de chlorure de sodium à 18 ‰, de façon à obtenir une solution finale titrant 9 ‰ environ ; le tout, énergiquement secoué, est replacé pendant 24 h au réfrigérateur. Après centrifugation (4 000 tours/minute) pendant 10 minutes, le surnageant recueilli est prêt pour être soumis à l'analyse électrophorétique.

Cette dernière opération doit s'effectuer dans les deux jours qui suivent, certaines fractions ayant tendance à précipiter lors d'une conservation plus longue à + 4°C. La congélation accélère ce phénomène.

3. - Détermination du poids des protéines totales.

Le poids de protéines soumis à l'électrophorèse est déterminé par une méthode colorimétrique faisant intervenir la réaction du biuret qui donne avec les protéines une coloration violette dont l'intensité est fonction de la concentration protéique. Une dilution au 1/20^e d'une partie (0,1 ml en général) de la solution contenant les protéines du cristallin est préparée à l'aide de chlorure de sodium à 9 ‰ ; 2 ml de cette dilution sont mélangés à 8 ml du réactif de Gornall.

Biuret selon Gornall. Faire dissoudre dans de l'eau distillée par ordre chronologique :

sulfate de cuivre pur cristallisé RP Prolabo (Cu SO ₄ , 5H ₂ O)	1,5 g
tartrate double de potassium et de sodium RP Prolabo	6 g
hydroxyde de sodium RP Prolabo (exempt de carbonates)	30 g
iodure de potassium RP Prolabo	1 g
eau distillée q.s.p.	1 000 ml

Ce réactif est conservé à l'obscurité dans un flacon de polyéthylène.

Une solution étalon est préparée de la même façon en partant d'une dilution au 1/20^e d'un sérum dont on connaît la protéinémie (LYO-TROL N B.D. Mérieux).

Une solution témoin est obtenue en mélangeant 2 ml de chlorure de sodium à 9 ‰ à 8 ml de réactif de Gornall. Laisser toutes les réactions se stabiliser 30 minutes à la température de la pièce. La mesure est effectuée au moyen d'un colorimètre muni d'un filtre centré sur 570 m μ dont le 100 ‰ de transmission (densité optique nulle) est fait sur la solution témoin. Lire la densité optique D_s de la solution étalon et celle D_x de la solution dont on cherche à connaître le poids de protéines totales. Ce dernier, exprimé en g/l, est donné par le rapport D_x/D_s multiplié par le poids en g/l de protéines contenues dans la solution étalon. Ce poids de protéines totales permet de déterminer la quantité d'échantillon qui sera soumise à la séparation électrophorétique.

4. - Electrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose.

La première utilisation des membranes cellulosiques en électrophorèse de zone a été faite en 1957 par KOHN. Les nombreux avantages offerts par ce support, en particulier la netteté et la régularité du fractionnement, nous ont conduits à l'adopter.

a) Appareillage. Appareil de séparation. L'électrophorèse est réalisée dans une cuve d'électrophorèse de zone à évaporation limitée (type J. GROULADE, A.P.E.L.A.B. constructeur). Un chevalet spécialement adapté à l'acétate de cellulose permet de maintenir horizontalement 9 membranes de 160 x 25 mm. Il comporte deux gouttières qui peuvent recevoir deux cales servant à fixer les bandes.

Générateur. L'alimentation est fournie par un redresseur ST 3B A.P.E.L.A.B. donnant un courant continu stabilisé. Cet appareil permet en outre le contrôle de la différence de potentiel aux bornes des bandes.

Appareil de séchage. Les membranes sont séchées sous lampe à émission infra-rouge A.P.E.L.A.B. d'une résistance de 500 watts.

b) Réactifs. Des membranes d'acétate de cellulose « Microphor » de format 160 x 25 mm, sont imprégnées des réactifs suivants :

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1°) Solution tampon pH 9,0 : | 2°) Solution colorante : |
| véronal acide Prolabo 2 g | amidochwarz 10 B Merck 5 g |
| véronal sodé Prolabo 15,40 g | méthanol dénaturé Prolabo 900 ml |
| eau distillée q.s.p. 1 000 ml | acide acétique glacial Prolabo 100 ml |
| cette solution est conservée au réfrigérateur, est diluée au 1/2 avant usage. | cette solution est filtrée pour éliminer l'excès de colorant. |
| 3°) Solution décolorante : | 4°) Solution diaphanisante : |
| méthanol dénaturé 900 ml | dioxanne pur Prolabo 40 ml |
| acide acétique glacial 100 ml | éthanol absolu 60 ml |

c) Mode opératoire. Les membranes d'acétate de cellulose (l'une d'entre elles coupée en deux dans le sens de la longueur sert de bande de bord) sont imbibées de solution tampon en les posant d'abord à plat à la surface de celle-ci puis en les immergeant 5 minutes dans la solution. Deux ponts de papier (Arches 302) de 200 x 90 mm, également imprégnés de tampon, sont mis en place sur le chevalet, de telle sorte que l'une de leurs extrémités déborde de 5 mm le bord interne de la gouttière, l'autre extrémité plongeant dans le tampon des cuves à électrodes.

Les bandes d'acétate sont alors essorées entre deux feuilles de papier filtre. Chacune d'elles est identifiée au moyen d'un crayon feutre A. W. Faber Feltstik-69 puis déposée sur les ponts en évitant la formation de bulles entre les deux surfaces en contact, chaque bande étant séparée par un espace inférieur au millimètre.

Les membranes sont tendues par enfoncement des glissières. Fermer l'enceinte et attendre 10 minutes pour stabilisation.

A l'aide d'une micropipette de 100 µl coudée à angle droit, l'échantillon est déposé suivant une trace transversale, à 5 mm environ en avant de l'extrémité du pont cathodique. Après 2 à 3 minutes, pendant lesquelles l'échantillon pénètre dans la bande, la séparation électrophorétique proprement dite peut commencer.

La quantité de protéines la plus favorable à une bonne séparation est d'environ 300 µg. La distribution suivante permet d'obtenir des résultats comparables :

- protéines totales : 70-50, 50-30, 30 g/l, volumes de solution déposés respectivement, 5, 7,5, 10 µl.
Le taux de protéines des extraits étudiés dans ce travail varie de 40 à 60 g/l.

Séparation électrophorétique. On applique une différence de potentiel de 20 volts par cm de longueur de bande. L'intensité est de 1,3 mA par bande de 25 mm de large.

Après 15 minutes de migration l'intensité est de nouveau réglée à sa valeur initiale, ceci afin d'éviter un échauffement trop important. La migration est arrêtée après 90 minutes. Les bandes sont immergées 3 minutes dans la solution colorante, puis décolorées rapidement par 4 à 5 bains successifs dans la solution décolorante. Le dernier bain doit être incolore. Les bandes sont rendues transparentes par immersion dans la solution de dioxanne (30 secondes suffisent) et déposées sur une plaque de verre propre, en l'absence de bulles d'air. Après 15 minutes de séchage sous la lampe à infra-rouge elles sont prêtes à être photométrées et stockées.

La photométrie a été réalisée avec un densitomètre intégrateur semi-automatique Jouan, muni d'un filtre centré sur une longueur d'onde de 600 mµ.

5. - Exploitation des diagrammes électrophorétiques.

a) Emplacement des fractions. La position de chaque fraction, exprimée en millimètres, est déterminée à partir de la courbe densitométrique (fig. 1). Dans tout le groupe étudié, la dernière fraction du cristallin, se séparant peu du point de dépôt, est prise comme zéro. La première fraction, de valeur faible, étant souvent mal définie, une bande est réservée dans chaque migration à un sérum humain normal dont l'albumine sert de 100 % de référence.

b) Estimation quantitative. La valeur relative de chaque fraction est obtenue à partir de la courbe densitométrique et de son intégrale (fig. 1). Afin d'obtenir des résultats comparables certaines précautions préliminaires sont nécessaires.

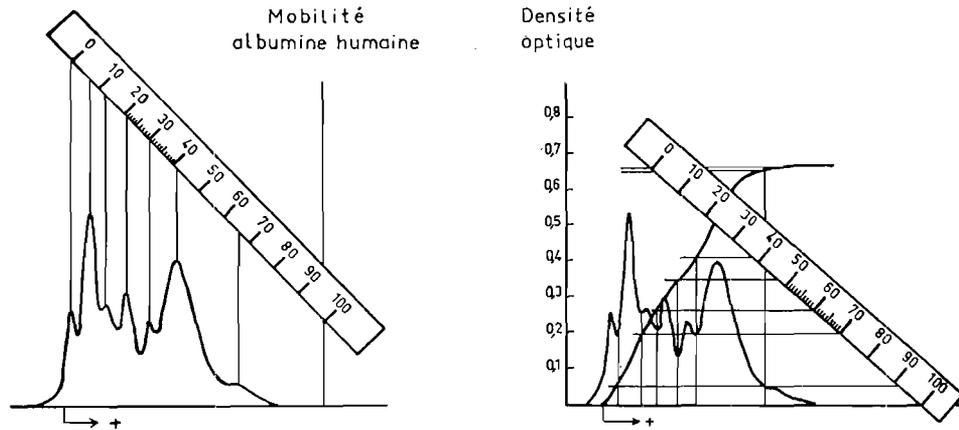


FIG. 1. — Exploitation des diagrammes électrophorétiques : détermination de la mobilité relative des fractions (schéma de gauche) ; exploitation de l'intégrale et détermination des valeurs relatives (schéma de droite).

Intégrité du cristallin. Le cristallin est formé de trois parties principales : une membrane externe entoure un ensemble constitué d'un cortex mou et d'un noyau dur. L'intégrité des trois parties doit être conservée. En effet, l'électrophorèse du noyau seul par exemple (fig. 2) montre que la répartition des fractions est différente de celle du cristallin entier. Chez le noyau ce sont principalement les fractions les plus cathodiques qui sont prépondérantes. Les fractions les plus anodiques (A, B et C) semblent plus caractéristiques du reste du cristallin (membrane + cortex).

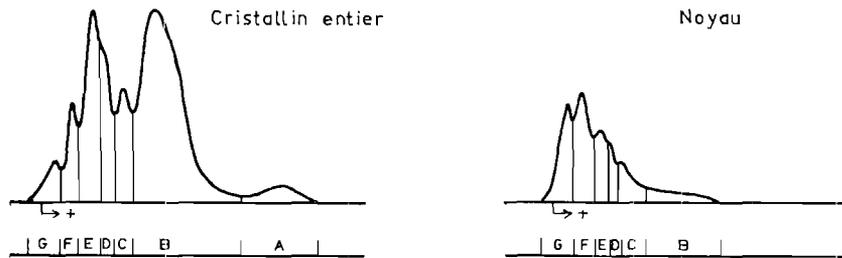


FIG. 2. — Electrophorèse de fractions obtenues à partir d'un cristallin complet de Boops boops (schéma de gauche) et du seul noyau de la même espèce (schéma de droite).

Individualisation des fractions. La détermination des valeurs relatives est obtenue à partir de la courbe densitométrique qui est divisée en zones correspondant aux différentes fractions. Cette division se fait à partir de points remarquables de la courbe, qui correspond à un changement de pente, d'où on abaisse des perpendiculaires à l'axe des abscisses. Ces points repères, de valeurs inégales, rendent la détermination de certaines fractions plus ou moins juste. Afin de préciser ce fait, la moyenne, l'écart-type, puis le coefficient de variation des valeurs relatives de chaque fraction, ont été calculés pour les espèces *Spicara maena* forme *chryselis* et *Sargus annularis* (fig. 3). Pour toutes les fractions, en général, ce coefficient varie en sens inverse de leur importance. L'imprécision de la fraction A est justifiée par le fait qu'il est difficile, voire impossible, de l'estimer à la photométrie.

Chez *Spicara chryselis*, la fraction C a un coefficient exagéré par rapport à son importance. L'imprécision de son estimation tient en grande partie à l'incertitude de sa limite avec la fraction B.

Chez *Sargus annularis*, les fractions B et B2 ont un coefficient très exagéré ; en effet ces fractions, toutes deux quantitativement importantes, ont une limite commune difficile à déterminer avec

précision. Pour cette raison nous les considérons comme appartenant à un même ensemble B.

On notera que les fractions D, E, F de *Spicara chryselis* et C, D, E, F de *Sargus annularis* ont

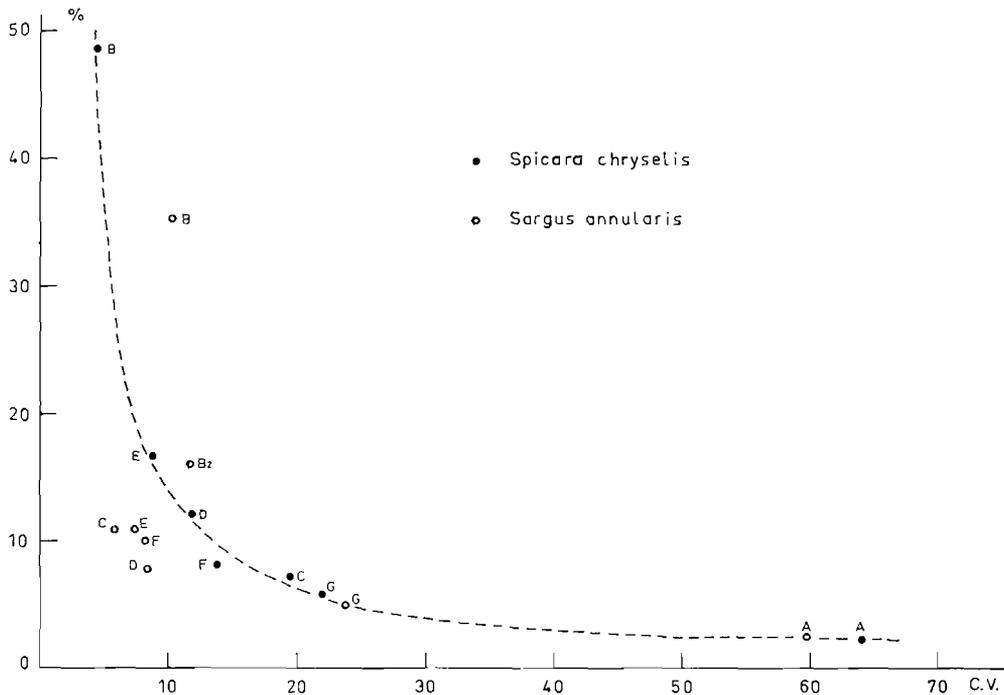


FIG. 3. — Coefficient de variations des fractions protéiques du cristallin de *Spicara chryselis* ($n = 12$) et de *Sargus annularis* ($n = 8$).

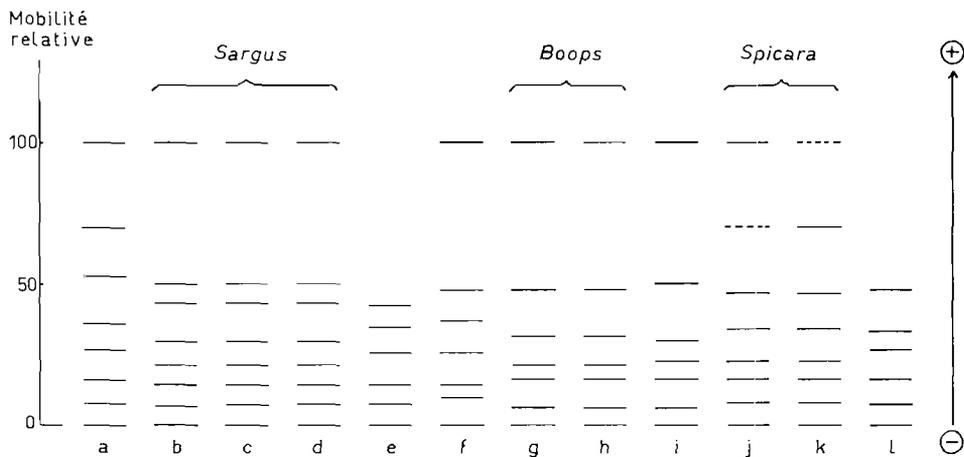


FIG. 4. — Mobilités relatives moyennes des protéines du cristallin de *P. erythrinus* (a), *S. annularis* (b), *S. sargus* (c), *S. vulgaris* (d), *P. puntazzo* (e), *S. cantharus* (f), *B. boops* (g), *B. salpa* (h), *S. auratus* (i), *S. maena* (j), *S. smaris* (k), *O. melanura* (l).

des coefficients de variation, d'une part assez faibles et d'autre part assez proches les uns des autres, ce qui permettra de comparer avec précision ces fractions entre elles.

II. - Résultats.

1) **Position et nombre des fractions.** Les mobilités relatives moyennes des fractions des espèces étudiées ont été reportées sur un même graphique (fig. 4). La première remarque que l'on peut

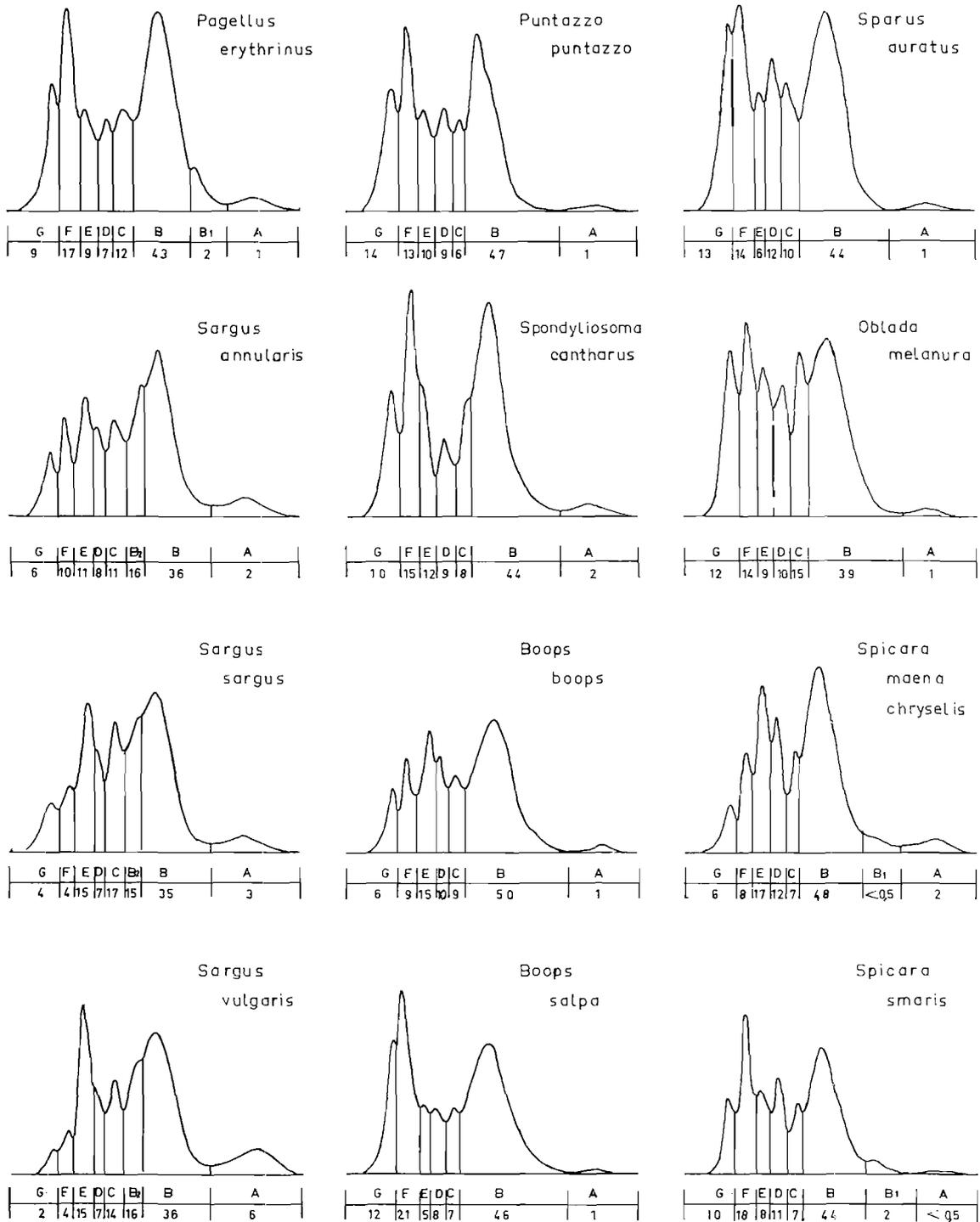


Fig. 5. — Enregistrements photométriques des protéines du cristallin obtenues par électrophorèse sur acétate, et pourcentages relatifs des différentes fractions.

faire est la présence de 8 fractions dans les genres *Pagellus*, *Sargus* et *Spicara* alors que les autres n'en montrent que 7. A l'intérieur de ces deux groupes les genres se caractérisent par des positions différentes d'une ou plusieurs fractions. Pour les espèces appartenant au même genre, les fractions qui se correspondent occupent toutes le même emplacement.

2) *Valeurs relatives.* Les valeurs relatives des fractions sont assez différentes d'un genre à l'autre (fig. 5).

Pour préciser les différences qui existent entre des espèces appartenant au même genre et plus particulièrement celles qui séparent *Boops boops* de *Boops salpa* et *Spicara chryselis* de *Spicara smaris*, la moyenne et l'écart-type des fractions ont été calculés et reportés dans le tableau 1.

Espèces	Nb	FRACTIONS								
		G (cathode)	F	E	D	C	B ₂	B	B ₁	A (anode)
<i>Spicara chryselis</i>	12	m = 5,8	7,5	16,6	13	7,2		48,6	± 0,5	2,3
		s = 1,26	1,74	1,47	1,40	1,40		2,13		1,48
<i>Spicara smaris</i>	10	m = 8,6	20,1	9,3	11,9	9,6		39,2	0,8	± 0,5
		s = 1,21	3,86	1,47	2,78	3,06		4,07	0,03	
<i>Boops boops</i>	10	m = 5	8	15	9,7	9,3		51		2
		s = 1,26	1,30	1,86	1,08	1,13		1,92		2,05
<i>Boops salpa</i>	8	m = 12	21	5	8	7		46		1
		s = 0,43	2,70	1,25	2,26	2,00		2,68		0,23
<i>Sargus annularis</i>	8	m = 6	10	11	8	11	16	33,5		2,5
		s = 1,44	0,91	0,83	1,68	0,27	1,87	3,71		1,50
<i>Sargus vulgaris</i>	3	m = 2,5	4	15,5	7	13	16	36		6

TABLE. 1. — Valeurs relatives moyennes des protéines solubles du cristallin séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose : m - moyenne ; s écart-type.

On peut constater que les espèces d'un même genre se séparent principalement par le pourcentage relatif des fractions E et F. Pour la première fraction le pourcentage est fort chez une espèce, faible chez l'autre, le phénomène inverse se produisant pour la seconde fraction. L'examen des écarts-types montre qu'à l'intérieur d'une même espèce chaque fraction est en général quantitativement bien définie. Cette constante dans le pourcentage des valeurs relatives d'un individu à l'autre s'oppose aux résultats obtenus avec les protéines sériques. En effet ces dernières laissent apparaître des changements importants dans la distribution quantitative des différentes fractions d'un individu à l'autre.

Conclusion.

Les électrophorégrammes des protéines du cristallin montrent de nombreuses fractions et cette multiplicité des protéines apparaît comme étant spécifique. Une telle spécificité s'exprime non seulement dans les modèles qualitatifs (position et nombre des bandes) mais également dans la distribution quantitative des fractions. Il est intéressant de noter que chez des espèces appartenant au même genre la mobilité des fractions est identique. Ce caractère peut constituer un critère intéressant dans des recherches de systématique.

Pour chaque espèce, l'échantillonnage a été choisi de façon diversifiée en prenant des individus se distinguant par la taille, le sexe ou l'état de maturité sexuelle. Aucune différence significative dans la distribution qualitative et quantitative de toutes les fractions n'a pu être mise en évidence en fonction de ces facteurs. La même conclusion semble pouvoir être avancée en ce qui concerne les conditions d'environnement. En effet, des électrophorégrammes identiques ont été obtenus pour *Spicara maena* et *Spicara maena* forme *chryselis* (POLLARD et PICHOT, 1970) bien que le premier type ait été toujours

capturé près de la côte sur des fonds rocheux recouverts d'herbiers et le second au large, sur des fonds vaso-sableux.

Cette conclusion sur la constance des caractères étudiés restent cependant à préciser et fera l'objet d'un travail ultérieur. Malgré cette restriction, il ressort néanmoins que l'électrophorèse des protéines du cristallin permet d'apporter des précisions complémentaires à la systématique des poissons.

Pour ce qui est de la technique, si l'électrophorèse sur acétate de cellulose permet d'obtenir des résultats qualitatifs exploitables, il est nécessaire de standardiser les modes opératoires afin d'obtenir des données quantitatives précises.

AUTEURS CITES

- BONNET (M.), 1969. — Les Sparidés des côtes nord-ouest africaines. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **33** (1) : 97-116.
- KOHN (J.), 1957. — A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. — *Clin. Chim. Acta*, **2** : 297-303.
- POLLARD (D.A.) et PICHOT (P.), 1970. — Identification des espèces du genre *Spicara* par électrophorèse des protéines du cristallin. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, à paraître.
- RABAEY (M.), 1964. — Comparative study of tissue proteins (lens and muscle) in fish. — *Prip. biol. Fluids*, **12** : 723-277.
- 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.