

Amélioration et Adaptation de la Méthode d'Identification
des Espèces par Electrofocalisation des Protéines
appliquée aux crevettes, mollusques et préparations de poissons hachés

Etude financée avec la participation du Secrétariat d'Etat à la Mer
Rapport de synthèse
Juin 1989

Centre de Nantes
B.P. 1049
44037 NANTES CEDEX 01
Départements VP et CSRU



Outre la valeur nutritionnelle, organoleptique ou marchande, c'est l'espèce qui conditionne la qualité des produits à base de poisson. La reconnaissance exacte des espèces est donc un facteur important du commerce de ces produits.

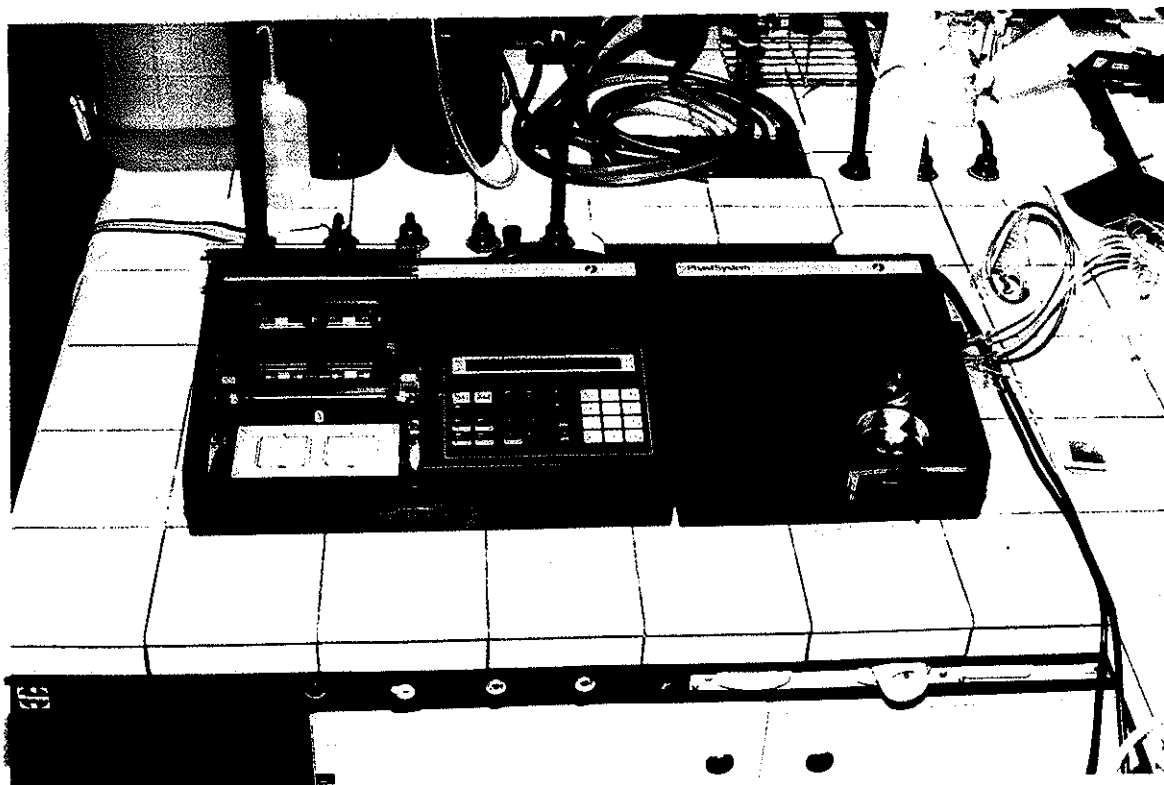
La multiplicité de leurs origines et la diversification des échanges, surtout pour la filière congelée, peuvent conduire à des pratiques commerciales plus ou moins frauduleuses. Or les critères morphologiques employés pour la détermination des poissons entiers s'avèrent insuffisants pour la majeure partie des échanges : poissons panés, ou transformés (blocs, sticks, portions congelées issues du sciage de filets).

Il convenait donc de rechercher des critères biochimiques caractéristiques des espèces ; l'insuffisance des résultats de l'analyse des lipides a orienté les travaux vers l'étude des protéines. Celles-ci, support de l'information génétique, se sont révélées douées d'une forte spécificité, particulièrement la fraction sarcoplasmique hydrosoluble, qui comprend la myoglobine et un grand nombre d'enzymes. Après séparation par électrofocalisation et coloration, elle forme une succession de bandes ou spectre électrophorétique propre à l'espèce.

Un catalogue électrophorétique (*) des poissons commercialisés en France a été édité par l'IREMER en 1985. Le principe de la diagnose est la comparaison du spectre de l'échantillon inconnu avec des spectres de référence parfaitement identifiés. La méthode d'IEF (isoélectrofocalisation) utilisée en routine est longue : 24 à 48 heures sont nécessaires à la parfaite décoloration du gel, pour permettre une analyse densitométrique des bandes protéiques et la suppression du bruit de fond correspondant à la décoloration dans la masse du gel.

Le début de cette étude a été consacré à la transposition de la méthode à un appareil le Phast System utilisant des gels de taille réduite et une chambre de coloration automatique, ce qui a permis de réduire le temps d'analyse à 1 h 30. Nous avons ensuite utilisé les avantages de ce système (rapidité, reproductibilité) pour mettre au point une méthode d'identification des crustacés et des mollusques. Puis nous nous sommes intéressés aux produits plus élaborés : à la chair hachée de poisson renfermant ou non des protéines étrangères et aux produits de la mer ayant subi un traitement technologique : cuisson, ionisation, fumage.

(*) Catalogue électrophorétique des poissons commerciaux P. DURAND, A. LANDREIN, J.C. QUERO.



↑
unité de séparation

↑
unité de contrôle

PHOTO 1 : Appareil d'électrophorèse automatisé : le Phast System

1. APPLICATION DU PHAST SYSTEM A LA DETERMINATION D'ESPECES HALIEUTIQUES

1.1. Appareillage

Le Phast System réalise des électrophorèses mono ou bi - dimensionnelles et des isoélectrofocalisations sur des gels de polyacrylamide de petite taille ; il comporte deux parties : une unité de séparation et une unité de coloration qui fonctionnent indépendamment l'une de l'autre, tout en étant dirigées par un même microprocesseur. (cf. photo 1)

1.2. Méthode optimisée

Préparation de l'extrait protéique

Pour extraire les protéines sarcoplasmiques, on broie pendant 30 secondes un poids de chair avec le même poids d'eau distillée ; l'extrait obtenu est centrifugé et filtré.

Afin d'obtenir la concentration optimale pour la séparation et la coloration au bleu de Coomassie, on ajuste la concentration en protéines à 10 mg/ml.

Le sel perturbant la focalisation (traînée, bandes déformées, contamination de bandes voisines), il est préférable d'effectuer un dessalage par dialyse ou chromatographie sur gel, pour les produits renfermant plus de 10 g % de sel.

Conditions électriques de la migration

Tous les paramètres durant la séparation sont contrôlés et régulés par le microprocesseur de l'unité de séparation.

Pour chaque étape le voltage, la tension, la puissance, la température et le temps sont programmés. Pour une reproductibilité maximum, la durée de chaque étape est exprimée en volt-heures, résultat de l'intégration par l'appareil du voltage par rapport au temps.

Les conditions électriques varient selon la gamme de pH utilisée ; celles que nous avons retenues après différents essais sont les suivantes : 410 Vh pour les gammes de pH 3-9 et 4-6,5 et 510 Vh pour la gamme de pH 5-8.

Coloration

La coloration au bleu de Coomassie est très rapide (30 mn) et sa sensibilité, jusqu'à 20 ng d'une protéine, suffit pour les analyses de routine.

Celle au nitrate d'argent est plus longue (1 h) mais révèle davantage de bandes ; elle est environ 20 fois plus sensible que la précédente. Elle peut s'utiliser dans des gammes de pH étroites (par exemple 4-6,5 ou 5-8) et apparaît particulièrement bien adaptée à la détermination d'espèces proches. Les photos 2 et 3 illustrent à titre d'exemple, les résultats obtenus pour trois espèces de thonidés.

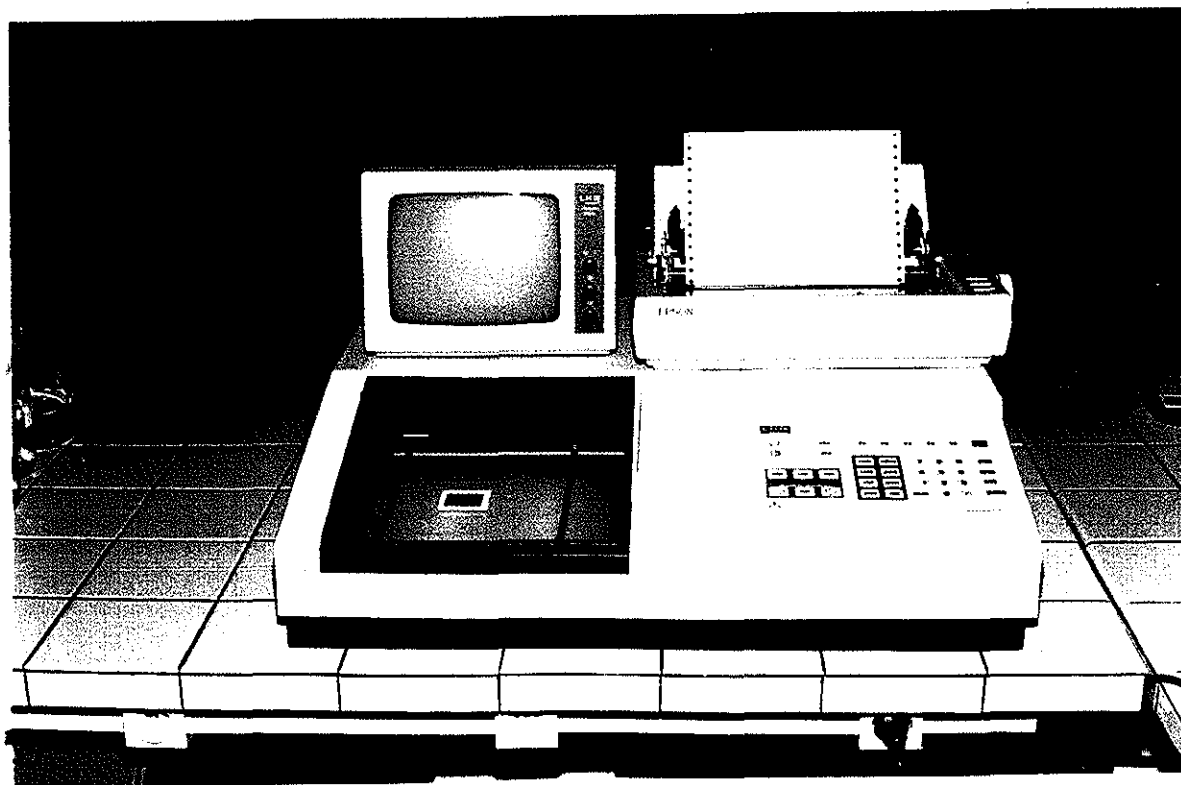


PHOTO 4 : Densitomètre à laser



Photo 2 (x 1,8)

- . gradient de pH 3-9
- . séparation 410 Vh
- . extrait à 10 mg/ml de protéines
- . coloration au bleu de Coomassie

- 2 Gernon (*Thunnus aialonga*)
- 3 Bonite à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis*)
- 4 Albacore (*Thunnus albacares*)
- 1 et 5. Marqueur de points isoélectriques de pH 5,65 à 8,3

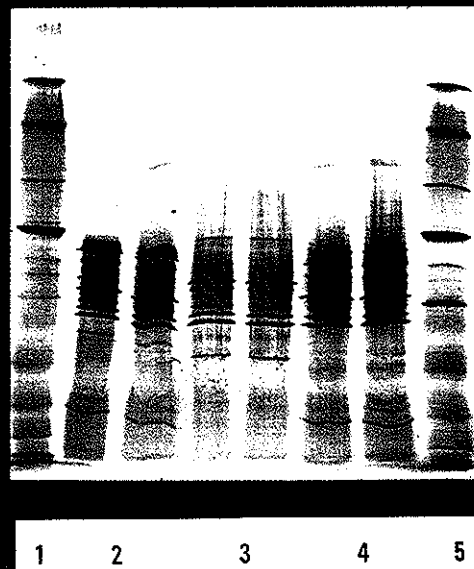


Photo 3 (x 1,8)

- . gradient de pH 3-9
- . séparation 410 Vh
- . extrait à 1 mg/ml de protéines
- . coloration au nitrate d'argent

PHOTOS 2 et 3 : Profils électrophorétiques d'espèces de Thonidés

1.3 - Lecture et interprétation

Actuellement en routine, sur les gels traditionnels (dimension 12 x 12 cm), on effectue une comparaison visuelle des bandes. Toutefois dans le cas du Phast System, pour interpréter le résultat, étant donnée la taille des gels obtenus (4,2 x 5 cm) il est préférable d'effectuer soit une lecture densitométrique, soit de fixer le gel dans un cadre de diapositive permettant de le visionner. L'obtention d'une bonne lecture densitométrique (cf. fig. 1) nécessite l'utilisation d'un matériel performant (cf. photo 4).

Le fait d'effectuer une lecture densitométrique constitue une première étape dans l'automatisation de la détermination d'espèce, nous avons réalisé une étude de faisabilité de cette automatisation. Celle-ci requiert des tâches préalables (recherche des paramètres d'intégration, analyses systématiques de séries d'échantillons, suivi de l'étude de la variabilité et mise en place de règles d'identification) puis une étude fonctionnelle et enfin la rédaction du programme adéquat. La réalisation de ce projet a été estimée à un an de travail.

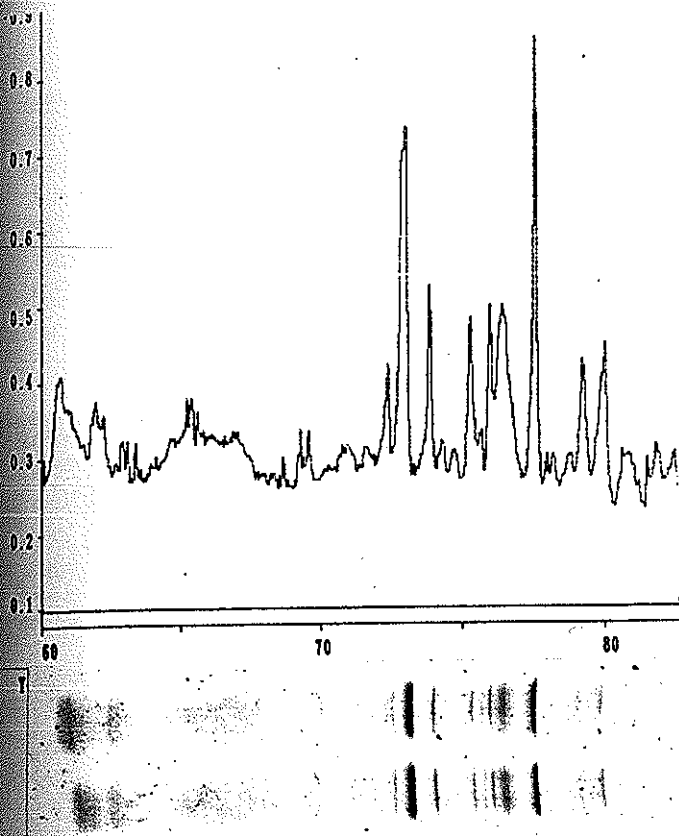


Fig. 1 : Profil et analyse densitométrique

2. IDENTIFICATION DES CRUSTACÉS ET MOLLUSQUES

L'IEF pour la détermination de produits marins autres que les poissons crus ou congelés a donné des résultats satisfaisants. Elle permet de différencier les crustacés, les mollusques mais aussi des produits ayant subi un traitement technologique altérant peu les protéines.

2.1 - Crevettes - Langoustines

Un protocole d'expérience semblable à celui utilisé pour les poissons convient pour les crustacés. Il permet de différencier les crevettes des chevrettes (crevettes d'eau douce). La photo 5 illustre à titre d'exemple les résultats obtenus à partir de 5 espèces de crevettes d'élevage, de crevettes grises et de langoustines.

- . gradient de pH 3-9
- . séparation 410 Vh
- . extrait à 10 mg/ml de protéines
- . coloration au bleu de Coomassie

- 1 : *Macrobrachium rosenbergii* (chevrette ou bouquet géant)
- 2 : *Penaeus vannamei* (crevette pattes blanches)
- 3 : *Penaeus stylirostris* (crevette bleue)
- 4 : *Penaeus japonicus* (crevette Kuruma)
- 5 : *Penaeus duorarum* (crevette rose du Nord)
- 6 : *Crangon crangon* (crevette grise)
- 7 : *Nephrops norvegicus* (langoustine)

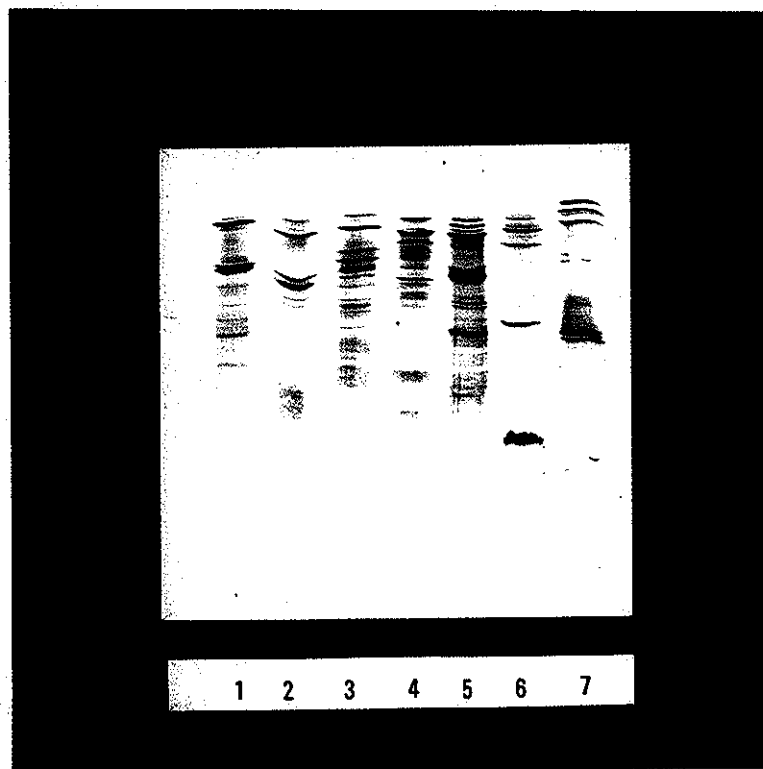
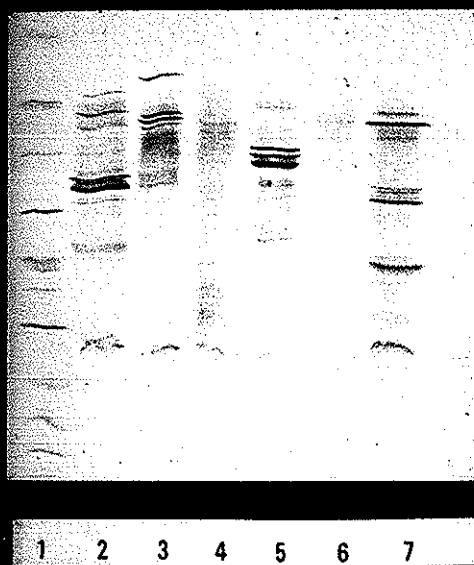


PHOTO 5 : Profils électrophorétiques de crustacés obtenus à l'aide du Phast System (x 1,8)

2.2 - Mollusques bivalves

Les bivalves de type "Saint-Jacques" sont sujets aux fraudes car ils sont commercialisés sous forme de "noix" et seules quelques espèces peuvent recevoir la dénomination "noix de Saint-Jacques". L'IEF permet de les différencier comme le montre la photo 6. Dans ce cas, il est préférable d'affectuer l'extrait protéique sur la noix seule plutôt que sur l'ensemble noix-coraïl.



. gradient de pH 3-9
. extrait à 10 mg/ml de protéines
. coloration au bleu de Coomassie

- 1 : Marqueur de pH
- 2 : *Pecten maximus* (noix seule)
- 3 : *Patinopecten yessoensis* (noix seule)
- 4 : *Patinopecten yessoensis* (noix + corail)
- 5 : *Pecten magellanicus* (noix seule)
- 6 : *Pecten magellanicus* (noix + corail)
- 7 : *Chlamys varius* (noix seule)

PHOTO 6 : Profils électrophorétiques de pectinidés (x 1,8)

3. AUTRES APPLICATIONS DE LA METHODE

3.1 - Mélange d'espèces

Des essais conduits à partir de mélange binaire de pulpe de poisson d'espèces connues ont montré que la détermination était possible pour des rapports de mélange compris entre 1/4 et 3/4. Toutefois une étude plus approfondie est nécessaire pour identifier les espèces dans une pulpe plus complexe (mélange ternaire, faible proportion d'un constituant du mélange) et en l'état actuel de la technique, la détermination d'un mélange totalement inconnu s'avère impossible, étant donnée la diversité et le nombre de bandes obtenues. La poursuite de ces travaux devra être envisagée avec en parallèle le développement d'un traitement automatisé des spectres

3.2 - Influence du stockage

Les expériences réalisées sur le poisson stocké en glace ou congelé ont montré que les électrophorogrammes obtenus sont identiques dans les limites de consommabilité du produit. L'identification de l'espèce est donc possible quel que soit le temps de stockage, dans les limites précitées, mais ne permet pas d'évaluer, ni de détecter ce temps de conservation.

3.3 - Détection de protéines étrangères

L'essor des produits transformés suggère l'emploi probable de protéines "étrangères" comme cela est connu dans les produits texturés à base de viande. Nous avons essayé d'identifier la présence de protéines classiquement utilisées ; nous avons ainsi détecté de l'albumine (bande dédoublée à pI 4,6) dans du surimi, et de la β caséine (bande à pI 5,3) dans une pulpe de poisson ; toutefois il nous a paru difficile de discerner un hydrolysate de soja dans une pulpe de poisson par cette méthode. Le résultat de ce dernier exemple peut s'expliquer par le degré élevé d'hydrolyse des protéines de soja ; dans ce cas l'hydrolysate ne renferme plus des protéines mais des peptides, difficiles à révéler par le bleu de Coomassie.

3.4 - Détermination de produits cuits

La cuisson dénaturant les protéines, les résultats d'IEF sont variables en fonction de l'intensité de celle-ci ; il devient donc très difficile de déterminer l'espèce de manière univoque dans ce cas.

Toutefois, des crevettes blanchies à l'eau bouillante pendant moins de 2 minutes sont encore identifiables, il en est de même pour un filet de poisson dont on a porté la température à coeur à 70° C pendant moins d'une minute.

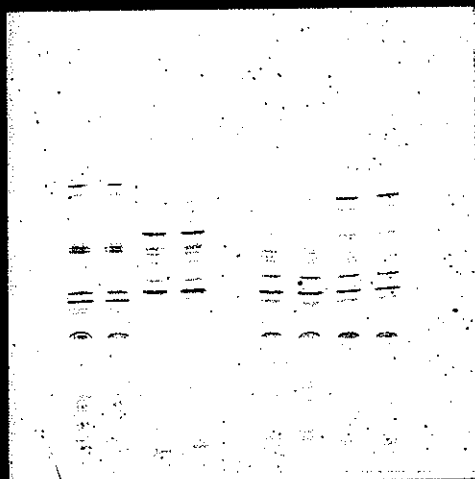
On entrevoit donc la difficulté de déterminer, à l'aide de la méthode décrite, des produits cuits, l'identification étant étroitement liée au procédé de fabrication, elle nécessite des références dans les mêmes conditions.

Pour se libérer de ces contraintes on peut envisager une restauration de la solubilité des protéines dénaturées par la cuisson, à l'aide d'un traitement chimique (bromure de cyanogène) ou physico-chimique, suivie d'une séparation fine. A cet égard l'électrophorèse en système bidimensionnel pourrait s'avérer intéressante.

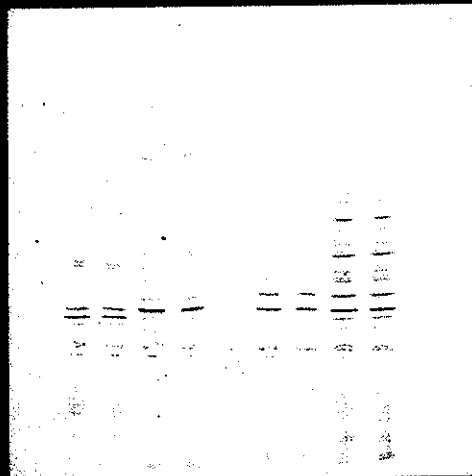
3.5 - Détermination d'un produit fumé à froid

Le fumage fait disparaître certaines bandes, toutefois il est tout à fait possible d'identifier un poisson fumé, il suffit d'avoir des produits de référence traités dans les mêmes conditions.

Si ce n'est pas le cas une identification orientée, basée sur un nombre plus restreint de bandes significatives, est envisageable (cf. photos 7 et 8).



1 2 3 4



1 2 3 4

Photo 7 : Poissons crus

Photo 8 : Poissons fumés

- 1 : Saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*)
- 2 : Saumon argenté du Pacifique (*Oncorhynchus kisutch*)
- 3 : Truite arc en ciel (*Salmo gairdneri*) diploïde
- 4 : Truite arc en ciel (*Salmo gairdneri*) triploïde

PHOTOS 7 et 8 : Profils électrophorétiques de poissons avant et après fumage

3.6 - Détection d'un produit ionisé

Des publications font état de la possibilité d'utiliser la technique d'IEF pour mettre en évidence l'ionisation d'un produit. Toutefois, les expériences réalisées ne nous ont pas permis de détecter une incidence de l'ionisation, aux doses utilisables (1 à 2 KGy), sur les profils électrophorétiques des poissons testés (sole, merlan), même en utilisant une gamme de pH étroite et/ou une coloration argentique.

3.7 - Etude de protéases musculaires

Les différentes applications des techniques électrophorétiques testées jusqu'à présent ont été basées sur une coloration aspécifique des protéines, autrement dit toutes les protéines sont mises en évidence par le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent, quelles que soient leur nature, leur propriété ou leurs rôles.

Les protéines sarcoplasmiques solubles révélées par coloration aspécifique et utilisées pour l'identification de l'espèce sont pour la plupart des enzymes. Parmi ceux-ci des protéases au sens large du terme, c'est-à-dire des enzymes participant aux mécanismes de décomposition des protéines, représentées par diverses activités : cathepsines, peptidases, transaminases, decarboxylases des acides aminés, etc.

Ces enzymes jouent un rôle dans les phénomènes d'altération de texture observés pour les produits cuits sous vide.

En effet, la fermeté d'un filet de poisson cuit sous vide diminue au cours du temps de conservation bien que l'analyse bactériologique soit stable durant cette période.

La mise en évidence directe d'activité protéolytique par électrophorèse tel que cela est pratiqué pour la révélation d'activité enzymatique spécifique dans les études génétiques (zymogrammes) a donc été envisagé.

Différents facteurs limitants, en particulier : le petit nombre d'enzymes protéolytiques couverts par les méthodes directes de détection, la perte d'activité catalytique en IEF, les problèmes de diffusion des substrats et réactants au sein du gel, etc. empêchent une utilisation simple de l'IEF pour révéler facilement ce type d'activité.

Diverses expériences ont été conduites pour apprécier la protéolyse globale sur des filets de poisson cuit sous vide. Ces expériences ont donné une confirmation et une appréciation de celle-ci. Il serait intéressant de mieux caractériser les enzymes mis en jeu dans le but d'optimiser le traitement (temps, température, pH, stockage). Cette connaissance permettrait de reconsidérer l'utilisation des techniques électrophorétiques comme méthode à la fois de suivi du traitement technologique (en l'occurrence perte d'une activité protéolytique) et d'appréciation de qualité du produit (au cours de l'entreposage).

CONCLUSION

La transposition de la méthode électrophorétique utilisée en routine a été réalisée. Ses diverses applications ont ouvert de nouvelles perspectives :

- celle de l'automatisation de la détermination, grâce à un logiciel approprié,
- celle de la transposition, et de l'extension du catalogue électrophorétique à d'autres produits marins tels que crustacés et mollusques ; cette orientation s'inscrit bien dans la perspective de nouvelles normes à envisager dans le cadre du futur libre échange européen.