

IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE POISSONS PAR ÉLECTROPHORÈSE DES PROTÉINES DU MUSCLE

par M. MOREL

— Durant les dernières décades, les échanges commerciaux de denrées alimentaires se sont beaucoup développés, en quantité comme en variété, et se sont multipliés dans une aire géographique dépassant largement le cadre européen. —

Cette extension des échanges soulève quelques problèmes car les appellations de produits varient d'un pays à l'autre sans que les correspondances entre elles soient bien définies. Ceci permet d'introduire sur le marché sous un nom flatteur des poissons appartenant en fait à une espèce différente. La manœuvre est particulièrement facile lorsque le produit est présenté sous forme de conserve ou de semi-conserve dans laquelle la plupart des attributs caractéristiques de l'espèce (forme du corps, emplacement des nageoires, vertèbres, écailles, etc.) ont disparu.

Il y a là un risque de tromperie pour le consommateur et de préjudice pour le producteur des espèces les plus prisées. Nous avons donc été amené à mettre au point une technique qui permette d'identifier les différentes espèces de poissons existant sur le marché français sous forme de semi-conserves, de conserves et éventuellement de produits congelés. Nos premières recherches ont porté sur les conserves.

Jusqu'alors l'identification des espèces était faite à partir de caractères organoleptiques (couleur, aspect, consistance, goût), de critères morphologiques, lorsqu'ils étaient suffisamment apparents, ou de caractères chimiques comme par exemple la teneur en huile (différenciant deux espèces voisines; l'une maigre, l'autre grasse) ou l'indice de réfraction de l'huile exsudée dans la couverture.

Cependant ces techniques, souvent incertaines, n'étaient applicables qu'à des cas particuliers. Il convenait de trouver une méthode plus générale basée, par exemple, sur l'existence de constituants musculaires (lipides ou protides) suffisamment caractéristiques de l'espèce. Du côté des lipides il est bien connu que les mêmes acides gras se retrouvent dans de nombreux tissus vivants et sont par conséquent impropres à caractériser l'espèce (ROUBAL, 1963). Par contre la fraction dite « insaponifiable », peu sensible aux températures utilisées pour l'appertisation, semble être plus caractéristique. Les constituants très divers qui la forment (stéroïdes, alcool supérieur, tocophérols, carotènes, hydrocarbures...) restent cependant encore communs à un grand nombre d'espèces. Un essai d'évaluation quantitative ne fut pas plus satisfaisant d'autant plus que, dans une même espèce, le taux d'un constituant donné varie au cours du temps.

Les recherches ont donc été orientées du côté protéique. Rappelons que les protéines comprennent trois grands groupes : les protéines fibrillaires (actine, myosine, tropomyosine) les protéines sarcoplasmiques ou « myogène » et les protéines de soutien (tissu conjonctif).

De ces 3 groupes seul le myogène est doué d'une spécificité très marquée espèce par espèce. Il est constitué en majeure partie par la myoglobine et par un grand nombre d'enzymes facilement solubles dans l'eau ou les solutions salines faiblement concentrées (la force ionique de 0,05 à 0,15). Ces protéines, soumises à l'électrophorèse, se déplacent différemment selon leurs charges électriques et donnent un spectre caractéristique pour chaque espèce. Cependant ces composés spécifiques, facilement extractibles à partir de poissons crus, sont modifiés par le traitement de conservation.

En conserve, sous l'effet de la chaleur nécessaire à la stérilisation les protéines se désorganisent puis se polymérisent par formation de liaisons « hydrogène » et hydrophobes. On aboutit alors à des complexes insolubles dans les solutions salines habituellement utilisées pour leur extraction. Il est apparu, après quelques tentatives avec divers solvants, que seule l'urée utilisée à forte concentration (10 M) pourrait rompre les liaisons formées au cours de la dénaturation thermique et extraire ainsi des fragments protéiques encore suffisamment spécifiques de l'espèce comme devaient le montrer leurs électrophorégrammes (MACKIE, 1969).

Il est donc possible d'utiliser l'électrophorèse des protéines comme technique d'identification des espèces de poissons crus et de la chair en conserve. Pour des raisons de commodité nous décrivons tout d'abord la méthode qui a été appliquée à l'identification des chairs de poissons crus.

I. - Matériel utilisé.

L'étude a porté principalement sur trois familles de poissons : les Clupéidés, les Scombridés et les Gadidés. Dans la plupart des cas l'examen a été mené de front sur le poisson cru et sa conserve réalisée le plus souvent dans les ateliers de l'Institut. Certaines espèces de Thonidés peu courantes sur nos côtes, Patudo (*Thunnus obesus*), Pélamide (*Pelamys sarda sarda*) et Thonine (*Euthynnus alletteratus*), nous ont été aimablement fournies par le laboratoire des pêches maritimes et lagunaires de Côte d'Ivoire (1).

II. - Etude électrophorétique.

1. Méthode applicable au poisson cru.

a) Extraction des protéines solubles du muscle blanc.

Nos travaux ont porté sur le muscle blanc qui constitue à lui seul l'essentiel de la musculature du poisson. Les muscles « rouges » dits de Vogt, souvent en faible proportion, se prêteraient moins bien à un travail comme celui-ci (pour certaines conserves on doit d'ailleurs ôter le muscle rouge).

20 g environ de muscle blanc sont broyés avec un volume égal de tampon phosphate disodique ($\mu = 0,05$ et $ph 7,8$). Le broyat obtenu est centrifugé 20 minutes à 3 500 tours/minutes pour séparer le surnageant destiné à l'électrophorèse (pour éviter une trop grande dénaturation des protéines toutes ces opérations se déroulent à 0 °C).

b) Electrophorèse de l'extrait protéique.

Choix du support.

Un support doit répondre aux principales caractéristiques suivantes : permettre une bonne séparation des protéines même dénaturées, être suffisamment reproductible et rester d'un emploi facile.

(1) Nous remercions vivement M. ALDRIN (J.-F.) de nous avoir fourni les conserves nécessaires à nos expériences.

Nous avons essayé plusieurs types de support parmi lesquels les gels (amidon et agar) et diverses sortes d'acétate de cellulose. Les uns étaient d'un emploi délicat (les gels), les autres ne permettaient pas toujours d'obtenir une séparation correcte des protéines (acétate de cellulose « ordinaire »). Seul l'acétate de cellulose gélatineux « Cellogel rs » répondait parfaitement à nos exigences (bonne séparation, reproductibilité, technique simple). Nous avons donc utilisé ce support pour réaliser l'électrophorèse des protéines musculaires.

Réactifs utilisés.

une solution tampon tris glycocolle de ph 8,8

tris	7 g
glycocolle	16 g
H ₂ O	1 litre

une solution colorante des protéines

Amidoschwarz 10 B	1 g
Méthanol	80 ml
Acide acétique	20 ml
H ₂ O	100 ml

une solution décolorante

Méthanol	100 ml
Acide acétique	10 ml
H ₂ O	90 ml

Mode opératoire.

Les membranes d'acétate de cellulose (5 × 25 cm) sont plongées 30 minutes dans la solution tampon tris-glycocolle puis essorées et mises en place dans la cuve à électrophorèse. On procède alors au dépôt de la solution protéique (environ 40 µl) sur une largeur de 2,5 cm et à 3 cm du pont cathodique.

La séparation électrophorétique proprement dite dure 100 minutes sous 300 volts et une intensité de 2 à 2,5 mA par bande. Quand la séparation est terminée les bandes sont immergées 5 minutes dans la solution colorante d'Amidoschwarz puis décolorées par 4 à 5 bains successifs dans la solution méthanol-acide.

Les bandes, sans être rendues transparentes, sont disposées entre deux plaques de verre propres et lues sur un photomètre enregistreur intégrateur du type « Vernon ».

Une photographie de ces électrophorèses peut également être faite. Associée à l'enregistrement photométrique elle servira de référence pour l'identification d'espèces inconnues.

2. Méthode applicable au poisson en conserve.

a) Extraction des protéines totales par l'urée 10 M.

Dans le cas de la conserve, compte tenu de la dénaturation intervenue à la stérilisation, l'extraction des protéines est faite avec de l'urée à forte concentration (10 M).

30 g de chair sont broyés avec 50 ml d'urée 10 M et abandonnée au moins une nuit, temps nécessaire à la rupture des liaisons formées pendant l'appertisation.

Le broyat est ensuite centrifugé 20 minutes à 3500 tours/minute pour séparer le surnageant destiné à l'électrophorèse.

b) Electrophorèse de l'extrait protéique.

Le support et les réactifs sont semblables à ceux employés précédemment à l'exception de la solution tampon qui est ici une solution Tris-acide borique-EDTA de pH 8,9 :

Tris	42 g
EDTA	3,7 g
acide borique	3,5 g
H ₂ O	1 l

La molarité du tampon influence directement la vitesse de migration et la qualité de séparation. En utilisant une solution tampon plus fortement concentrée la migration sera réduite, ce qui permettra d'obtenir des fractions protéiques plus nettes et par conséquent une meilleure séparation.

Mode opératoire.

Les bandes d'acétate de cellulose imbibées de tampon sont mises en place et on y dépose 40 µl d'extrait protéique à 2 cm du pont cathodique. On applique alors une différence de potentiel de 275 volts pendant 2 h 20 mn.

Du fait de la concentration importante du tampon, le support s'échauffe par effet Joule, ce qui entraîne une évaporation que la remontée capillaire du tampon n'est plus capable de compenser. Le support se sature alors en sel et risque de se couper par claquage électrique. Pour éviter cet inconvénient l'enceinte électrophorétique a été placée à 0 °C.

La coloration, la décoloration et la lecture des bandes sont faites comme précédemment.

III. - Exploitation des diagrammes électrophorétiques.

1. Electrophorèse des protéines solubles du muscle blanc (chair crue).

Les figures 1, 2 et 3 montrent les séparations électrophorétiques des protéines du myogène de trois familles de poissons importantes du point de vue commercial (1).

Chaque profil électrophorétique est caractéristique d'une seule espèce par le nombre, la position ou l'intensité des bandes. Néanmoins, on peut remarquer une similitude d'ensemble des espèces au sein d'une même famille ou de deux familles voisines.

C'est ainsi que le Chinchard (*Trachurus trachurus*) possède un spectre voisin de celui des Scombridés tant au point de vue intensité que migration des fractions protéiques.

Les électrophorégrammes révèlent parfois la présence de bandes migrant vers la cathode. C'est le cas pour les Gadidés qui possèdent généralement deux à trois bandes « négatives ». On peut présumer que ces bandes correspondent à un ensemble protéique dont le point isoélectrique (pH I) est supérieur aux pH I habituellement rencontrés.

Les résultats obtenus à partir de poissons congelés sont identiques à ceux provenant de poissons frais. On sait en effet que la dénaturation provoquée par la congélation porte uniquement sur les protéines myofibrillaires alors que le myogène reste intact. Il peut donc être extrait comme si le poisson était frais.

D'autres essais, entrepris sur du poisson lyophilisé, ont montré que les propriétés électrophorétiques des protéines sarcoplasmiques ne subissent pas de modifications dues à la déshydratation (fig. 4).

(1) Afin d'en permettre une meilleure lecture, les figures 1, 2 et 3 ont été placées en vis-à-vis (photos et diagrammes) aux pages 6 à 11 inclus.

2. Electrophorèse des fragments protéiques extraits par l'urée (conserves).

a) Essais de variation selon les conditions de préparation.

Avant tout essai ultérieur il était bon de savoir si les conditions de préparation de la chair en conserve avaient une influence sur le spectre électrophorétique des protéines.

Lors de la préparation de conserves, les deux traitements thermiques subis par le poisson sont une cuisson préalable éventuelle, puis la stérilisation qui est la plus intense.

En ce qui concerne la cuisson, elle a été effectuée de deux façons différentes : en saumure bouillante, ou en atmosphère de vapeur, selon la technique américaine. Les couvertures utilisées ont été l'eau salée (préparation au naturel), l'huile et la tomate. Pour ce qui est de la stérilisation, il paraît souhaitable de rappeler quelques principes de base.

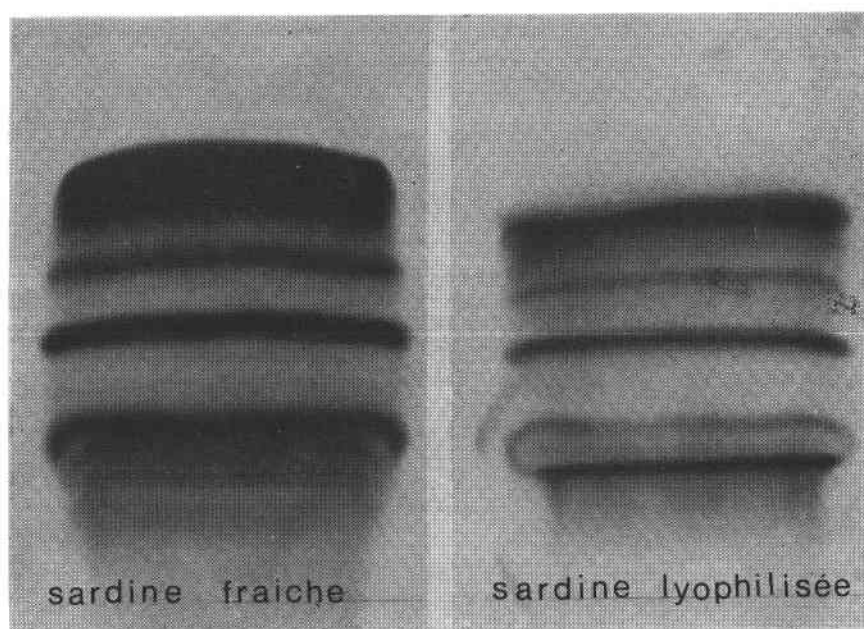


FIG. 4. — Electrophorèses des protéines musculaires de la sardine avant et après lyophilisation.

La stérilisation a pour but de tuer ou d'inhiber les microorganismes et les enzymes. Ce traitement thermique doit être suffisant pour abaisser une population éventuelle de *Clostridium botulinum* de 10^{12} à 10^0 , celle de *Clostridium sporogenes* ou *B. stearothermophilus* de 10^5 à 10^0 . Son intensité est exprimée par ce qu'on appelle la valeur stérilisatrice ; celle-ci est donnée par la formule

$$L = t. 10 \frac{T - 250}{Z}$$

où t est la durée du palier dans l'autoclave, T la température en °F et Z la pente de la courbe de mortalité de *C. botulinum*.

On voit immédiatement qu'en augmentant la température et abaissant la durée on peut aboutir à un barème de stérilisation différent mais de même valeur stérilisatrice.

On a observé dans diverses conserves (Thonidés, clupéidés) que, pour un barème de stérilisation déterminé, le mode de cuisson et la nature de la couverture n'introduisent pas de différences notables au niveau des électrophorégrammes. Il est apparu par contre que les conditions d'appertisation avaient une influence importante sur la dénaturation de protéines.

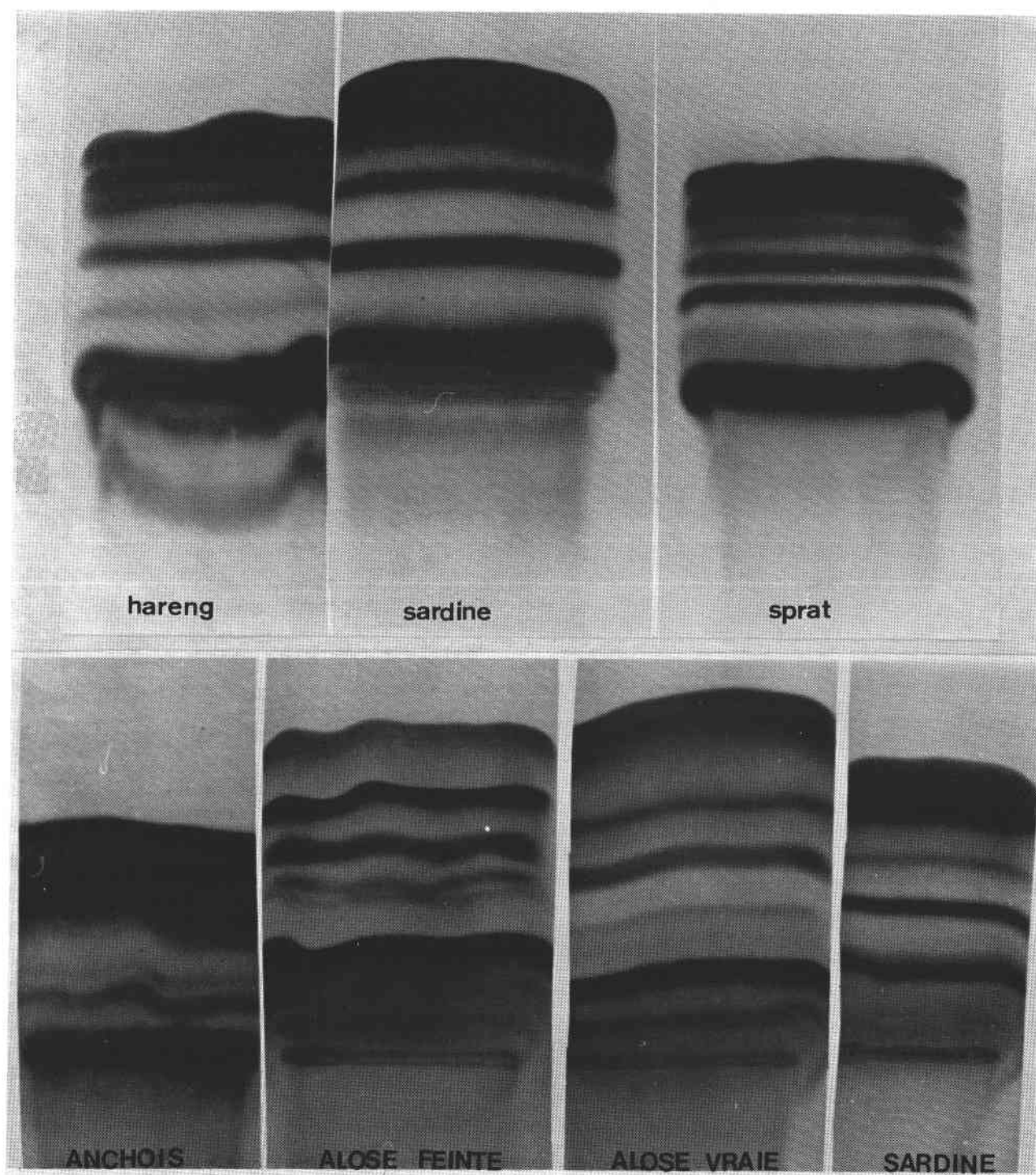


FIG. 1. — *Electrophorèses et enregistrements photométriques des protéines musculaires de quelques Clupéidés*
(diagrammes : page 7).

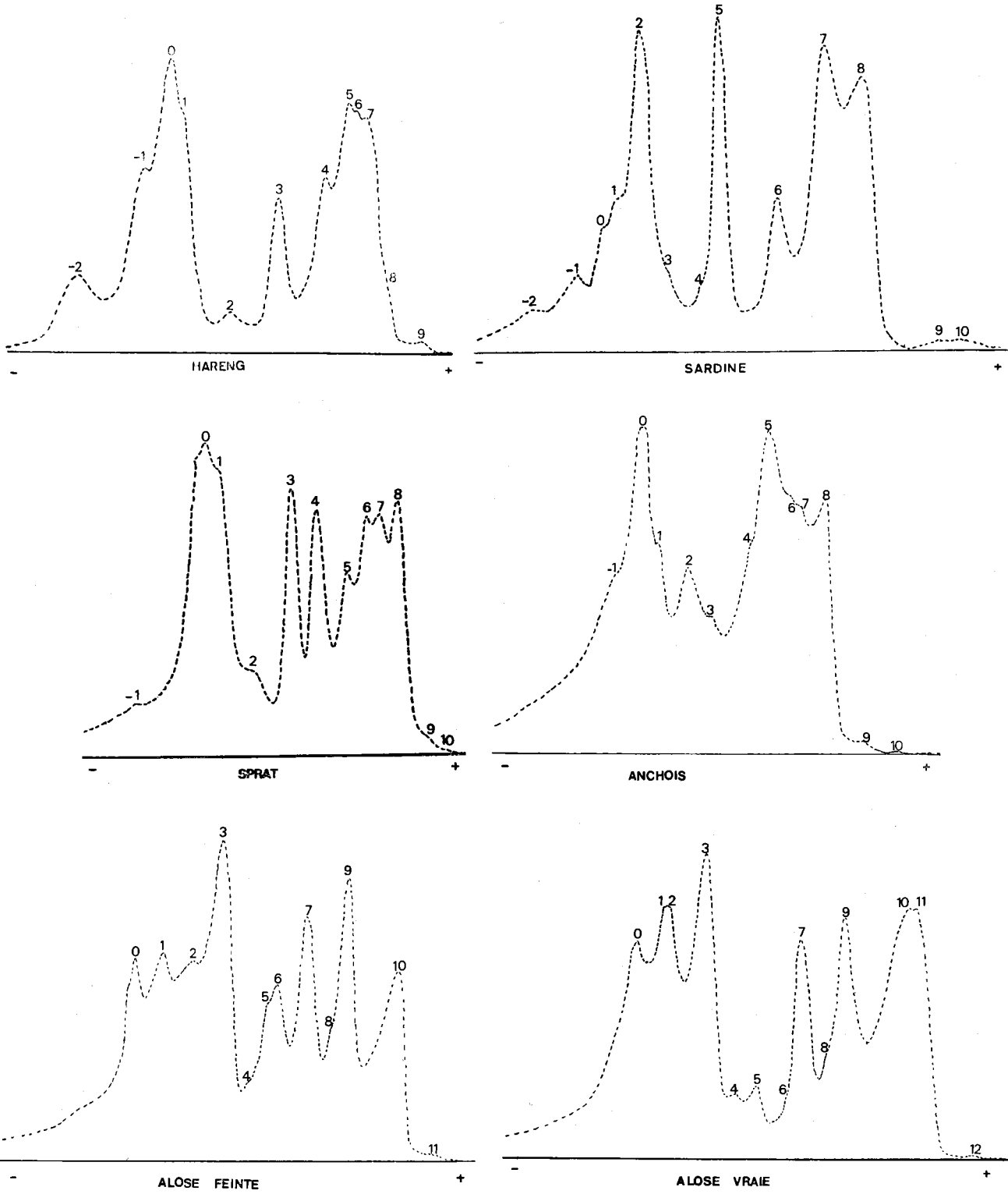


FIGURE 1. — Diagrammes (légende : p. 6).

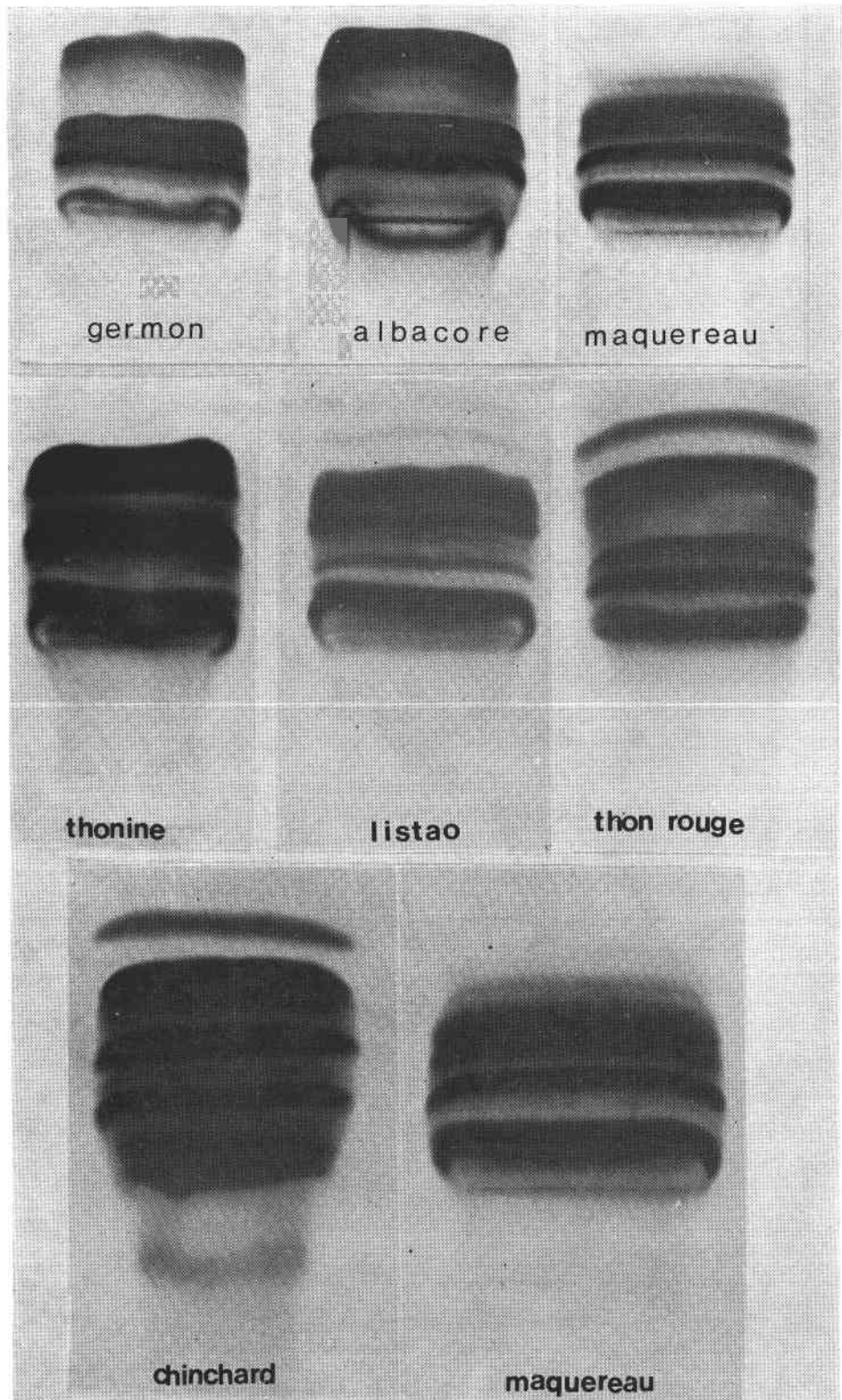


FIG. 2. — *Electrophorèses et enregistrements photométriques des protéines musculaires de quelques Scombridés (diagrammes : p. 9).*

Ainsi des conserves d'albacore au naturel ont été conditionnées en 1/4 B (212 cm³) et stérilisées en autoclave statique selon trois barèmes différents : 85 minutes à 115 °C, 27 mn à 120 °C et 4 h 30 mn à 110 °C.

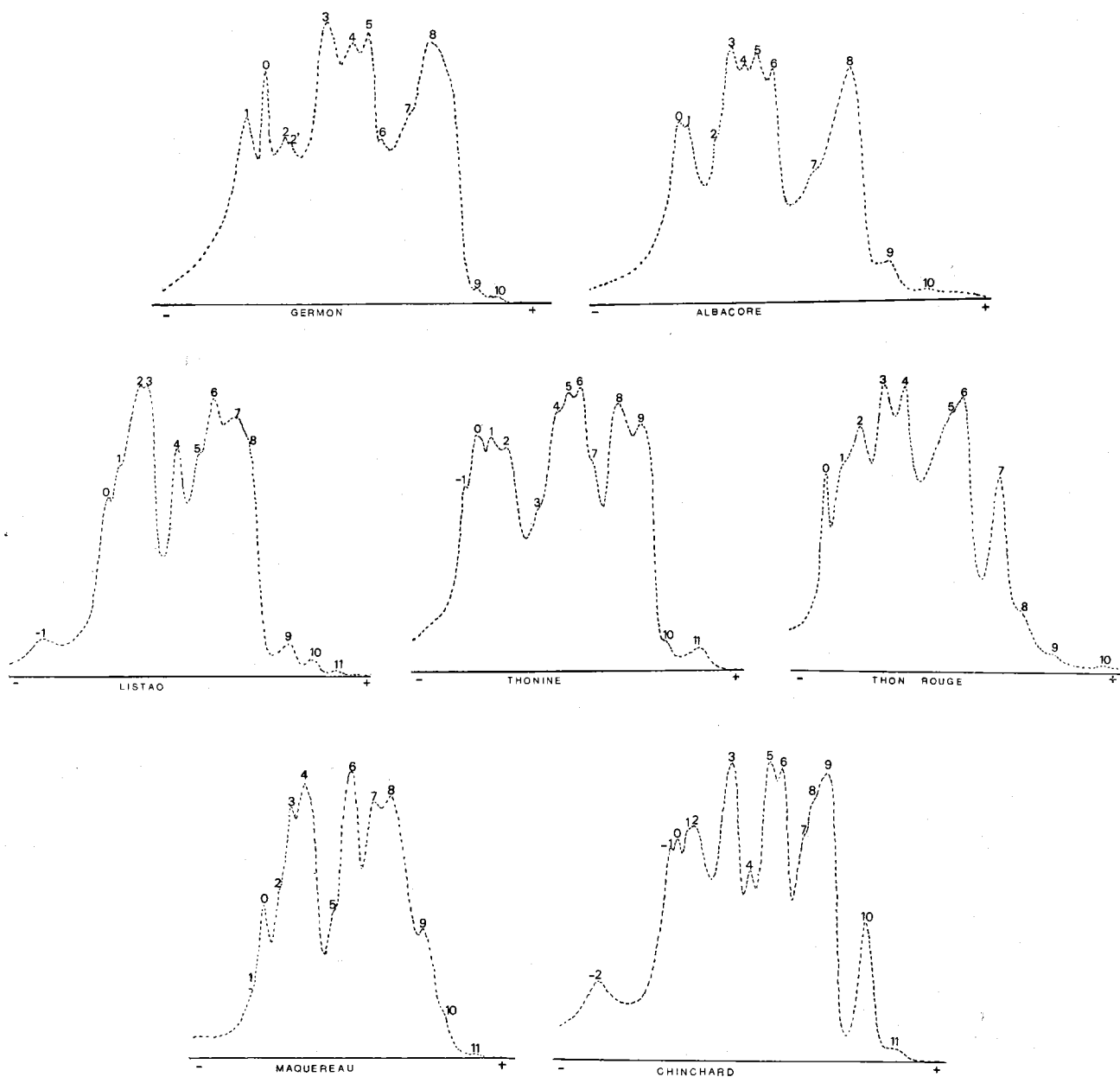


FIGURE 2. — Diagrammes (légende : p. 8).

Les spectres obtenus ont permis d'observer une dénaturation des protéines moins importantes à 120 °C. Ceci laisse à penser que l'utilisation de barèmes courts, mais à haute température, favorise l'obtention de meilleurs résultats.

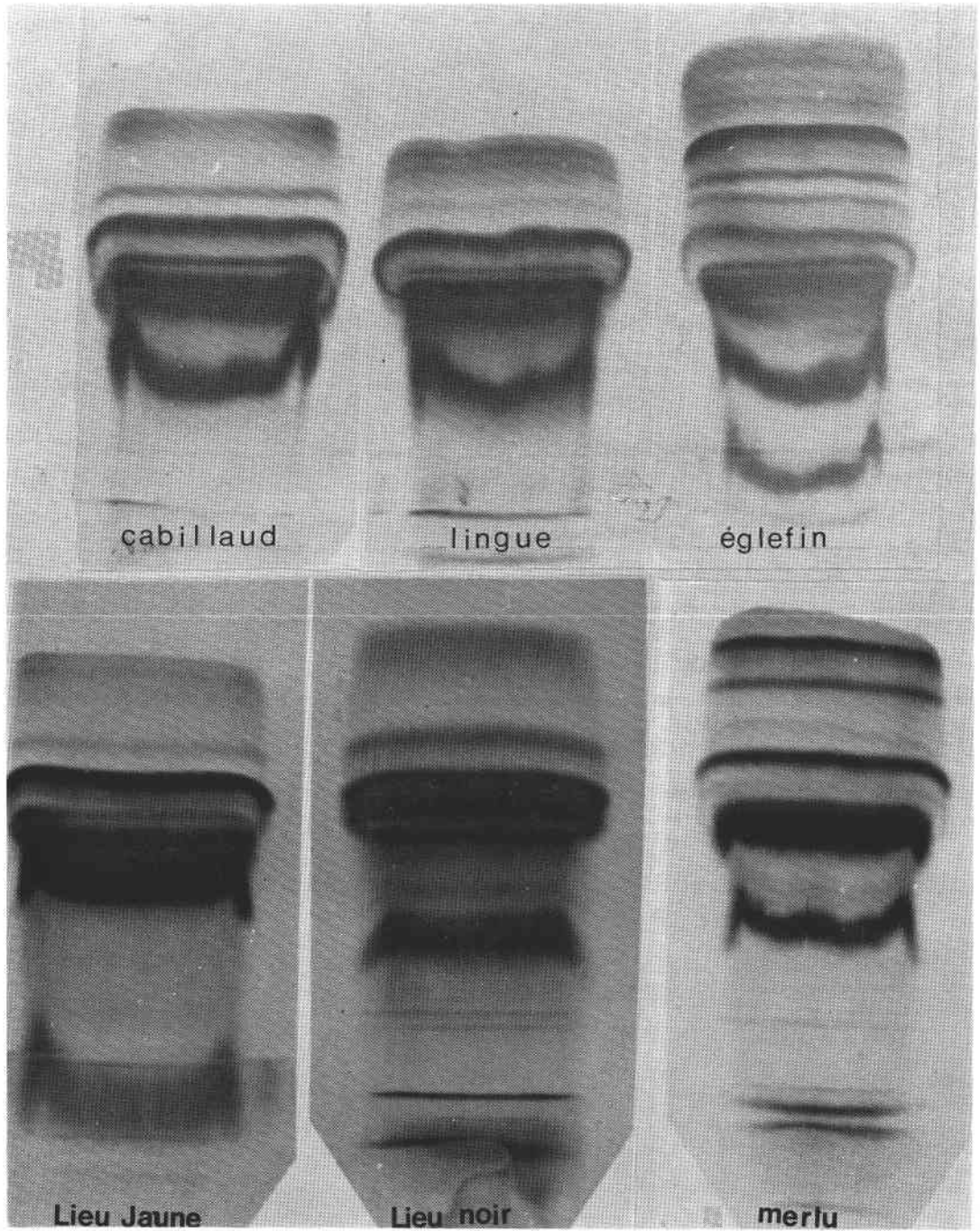


FIG. 3. — *Electrophorèses et enregistrements photométriques des protéines musculaires de quelques Gadidés* (diagrammes : p. 11).

Quelques essais effectués avec une stérilisation en régime d'agitation, pour des conserves de mollusques et de crustacés, donnent des résultats similaires (fig. 5).

Dans cette méthode l'emploi d'une température élevée (124 °C) permet de réduire le temps de stérilisation ; de plus la rotation favorise la pénétration de la chaleur dans les produits surtout s'il

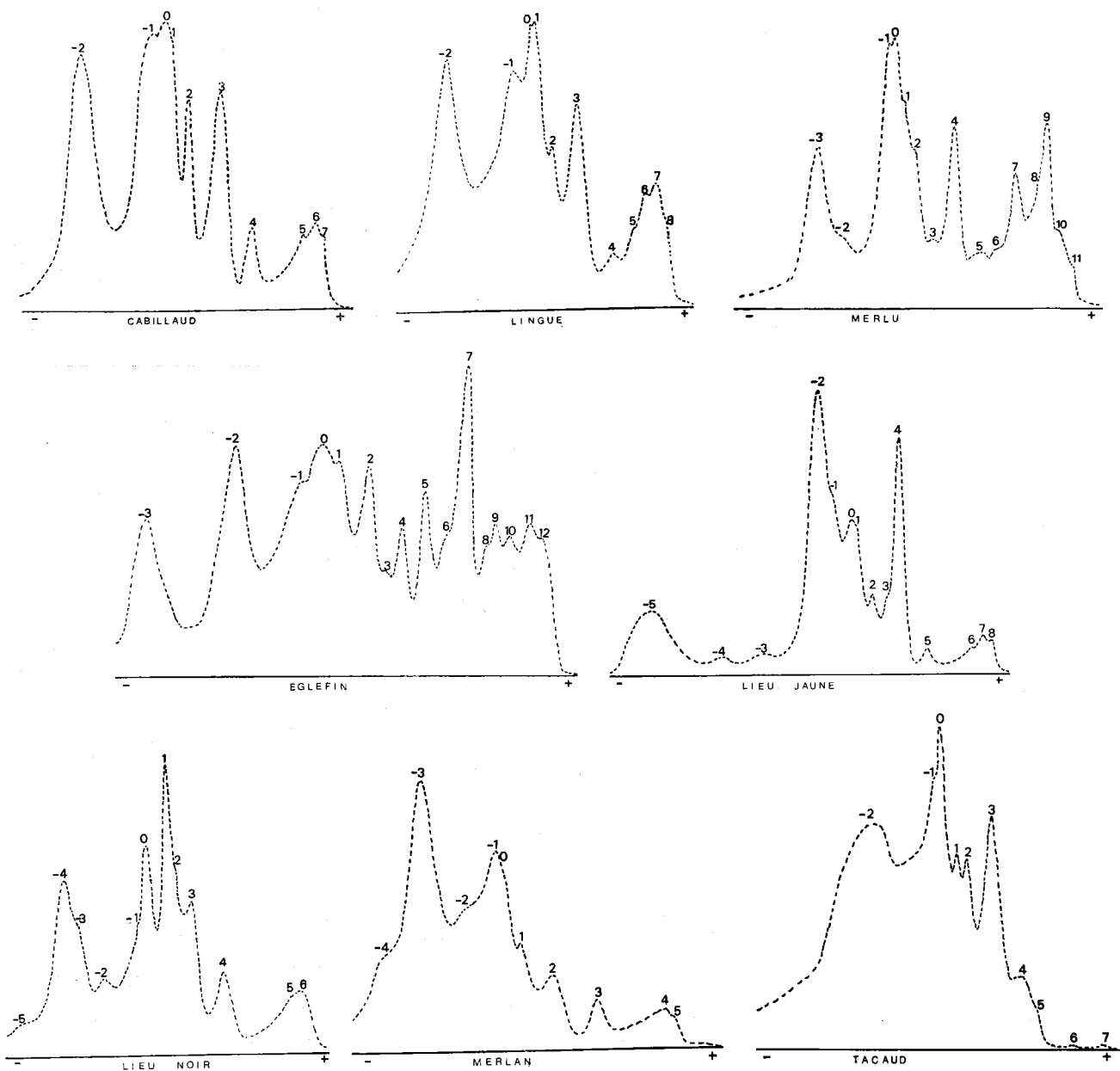


FIGURE 3. — Diagrammes (légende : p. 10).

ya une phase liquide (l'agitation augmente les échanges thermiques qui dans les procédés classiques résultent seulement de la conduction et de la convection).

b) Identification des espèces en conserve.

Les électrophorogrammes obtenus à partir de conserves sont très différents de ceux obtenus à partir de la chair crue.

L'urée, contrairement à l'eau ou les solutions faiblement concentrées en sel, n'extrait pas seulement la fraction sarcoplasmique (20 % environ des protéines totales) mais également une partie des protéines fibrillaires et de soutien. Ces protéines extraites par l'urée se présentent sous la forme de fragments plus ou moins dénaturés qui ne permettent pas une individualisation des bandes aussi

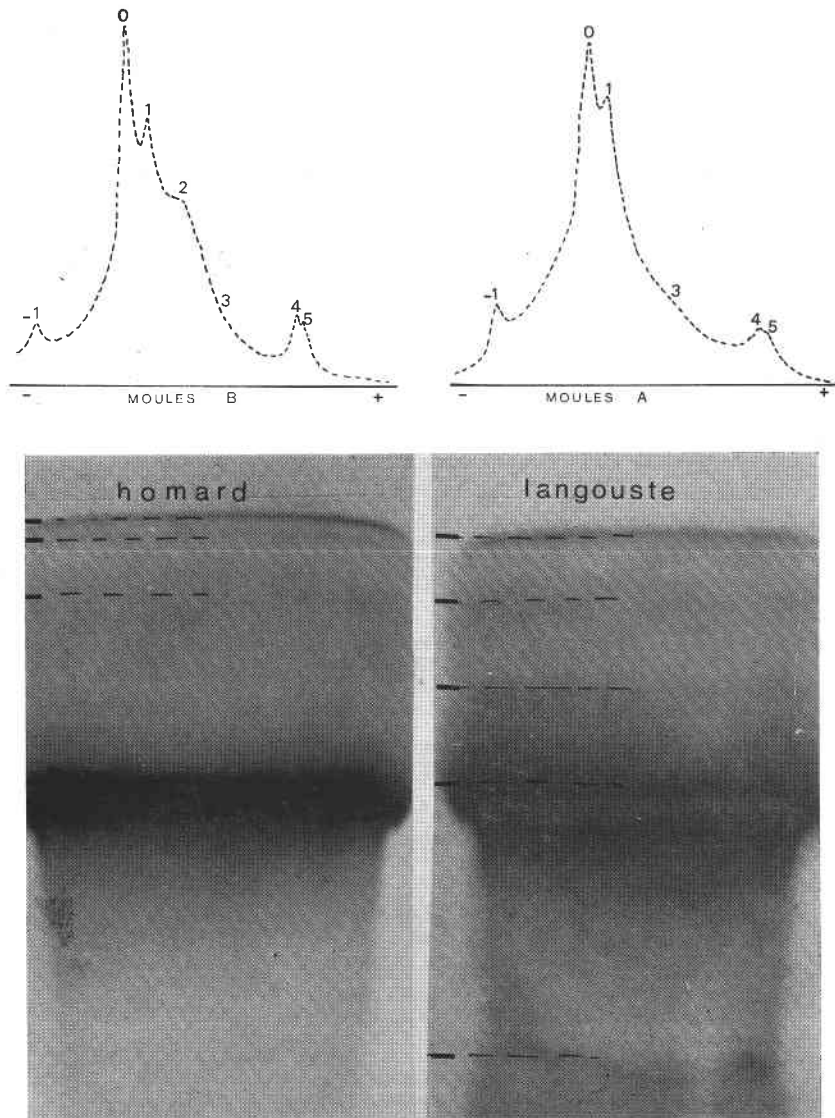


FIG. 5. — *Electrophorèses et enregistrements photométriques des conserves de Mollusques et de Crustacés stérilisées en régime d'agitation. Les moules A sont stérilisées en statique (35 mn à 115°C), les moules B en régime d'agitation (6 mn 30' à 122°C).*

nette que celles obtenues à partir de poisson frais. Il y a néanmoins, comme précédemment, une spécificité d'espèce.

Les différences caractéristiques, bien visibles au niveau des familles, sont encore assez nettes au sein d'une même famille pour permettre l'identification (fig. 6).

Les clupéidés se différencient facilement d'après le nombre, la position et l'intensité des différentes bandes. La sardine (*Clupea pilchardus*) possède un spectre bien caractéristique qui ne souffre aucune confusion avec celui du hareng, du sprat, ou de l'anchois.

La sardine en conserve peut donc être distinguée sans ambiguïté des *Sild sardine* (petit hareng), *Brisling sardine* (sprat) en conserve qui sont souvent présentés comme des substituts.

Chez les Thonidés, les différences sont moins caractéristiques. Ainsi la Thonine et le Patudo ou l'Albacore et la Bonite pélamide possèdent des spectres très voisins. D'autres espèces (le germon, le

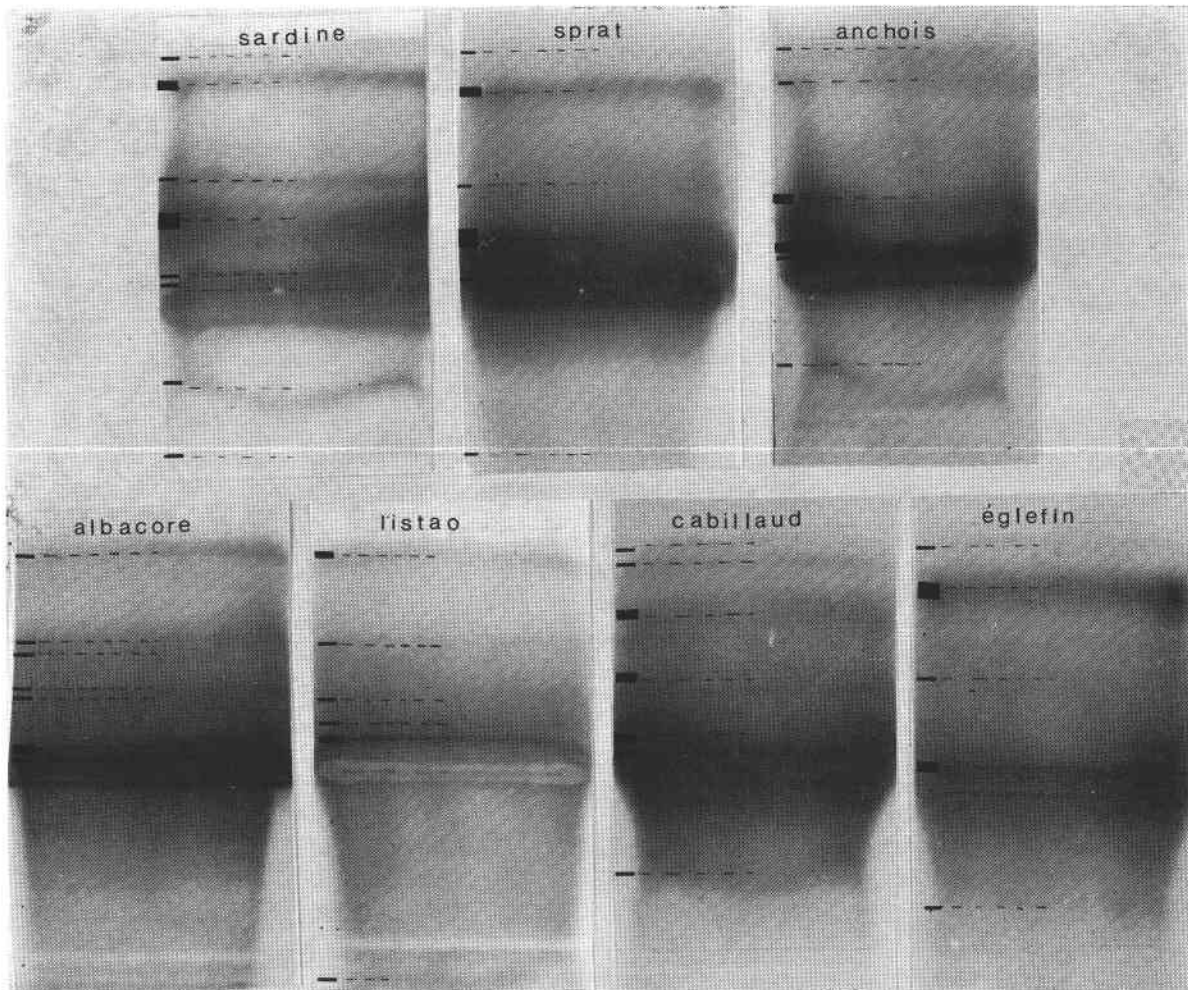


FIG 6. — *Electrophorèses en enregistrements photométriques des protéines musculaires de poissons en conserve* (diagrammes: p. 14).

listao, le thon rouge...) sont par contre plus faciles à différencier. En pratique il est néanmoins possible d'identifier sans difficultés les principaux thonidés utilisés en conserverie.

Les électrophorégrammes obtenus à partir de la chair de Gadidés en conserves sont assez semblables; seul le Cabillaud (*Gadus callarias*) semble se différencier du reste de la famille.

Pour essayer d'interpréter ces résultats, il faut faire appel aux relations existant entre protéines et texture de la chair.

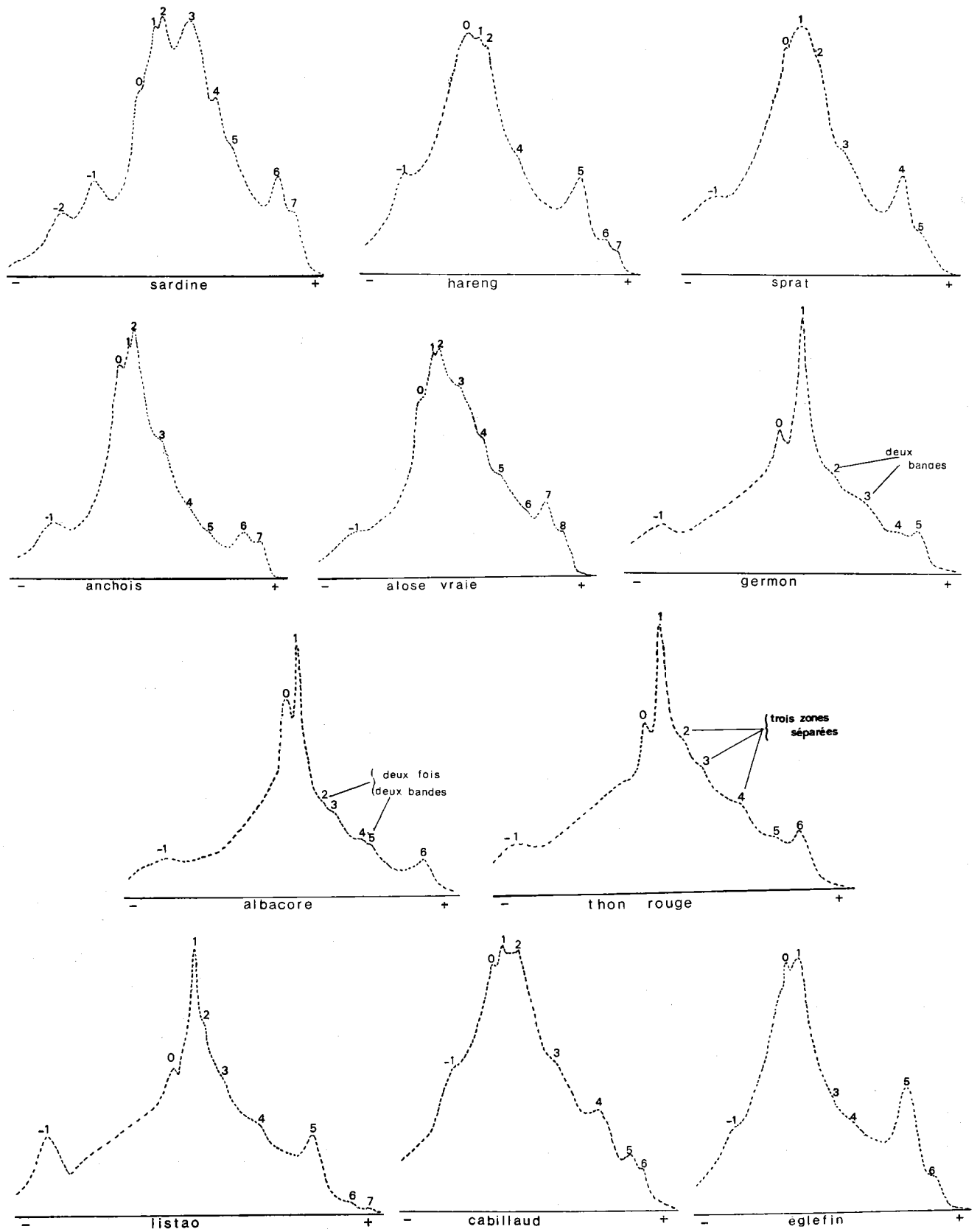


FIGURE 6. — Diagrammes (légende: p. 13).

On sait par expérience que les espèces possédant un taux protéique élevé ont une chair plus ferme et moins gélatineuse que celles possédant un taux assez faible. On connaît également le rôle important que jouent les protéines de soutien (collagène) en maintenant la cohésion des myotomes. Les tissus des Gadidés, pauvres en protéines principalement de soutien, n'auront donc pas une texture très ferme. Il se peut que sous l'action de la chaleur leurs myotomes se séparent facilement et subissent une dénaturation si importante que la fraction qui nous intéresse ne puisse plus être utilisée pour identifier les espèces.

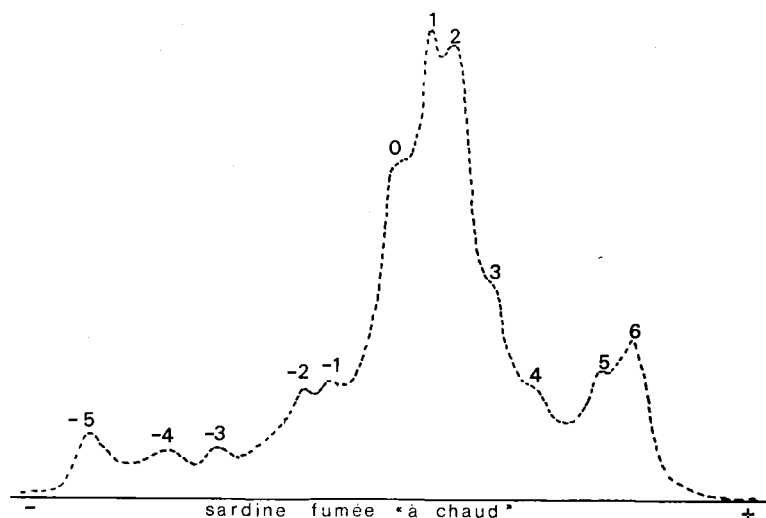


FIG. 7. — Enregistrement photométrique des protéines musculaires de la sardine fumée « à chaud » (90 °C).

La technique d'électrophorèse des protéines extraites par l'urée permet également d'identifier les espèces présentées en semi-conserves fumées « à chaud ».

Pour les poissons fumés « à froid », la dénaturation protéique est très faible et on procède comme pour la chair crue.

Les protéines étant moins dénaturées qu'en conserve (traitement thermique moins intense) on obtient à partir de poissons fumés de très bonnes séparations électrophorétiques qui sont caractéristiques de l'espèce (fig. 7).

Conclusion.

L'électrophorèse sur acétate de cellulose apparaît comme un procédé rapide et fidèle d'identification des espèces de poissons. Cette méthode ne requiert qu'un petit fragment de muscle et peut être appliquée aussi bien à des produits frais ou congelés qu'à des produits transformés en conserves ou fumés.

Les électrophorégrammes obtenus sont toujours caractéristiques d'une seule espèce. Cependant il peut être utile, en ce qui concerne la conserve, d'opérer avec un témoin et d'effectuer la séparation

des extraits à identifier, essais et témoins, lors d'une même électrophorèse. Cette façon de faire est souhaitable compte tenu des légères modifications dans la mobilité des protéines qui apparaissent parfois d'une électrophorèse à l'autre. En appliquant cette technique simple et peu coûteuse au contrôle routinier des produits transformés, les possibilités de substitution d'une espèce par une autre seront ainsi réduites de façon considérable.

I.S.T.P.M.
NANTES.

BIBLIOGRAPHIE

- BULL (H.B.), 1950. — Protein denaturation by heat. — *Outlines of Biochemistry*, p. 440-444.
- CONNELL (J.J.), 1964. — Fish muscle proteins and some effects on them of processing. — *Symposium on Foods: Proteins and their reactions*.
- CUTTING (G.L.), 1963. — The influence of drying, salting and smoking on the nutritive value of fish. — *Torry Res. mem.*
- HAMM, REINER et DEATHERAGE, 1960. — Changes in hydration, solubility and charges of muscle proteins during heating of meat. — *Food reso*, **25**, p. 587-610.
- KARLESKIND (A.), 1968. — Fractionnement des insaponifiables sur C C M-Chimie analytique. — Vol. 50, n° 5.
- LANE, PERRY (J.), HILL (Wilma S.) et LEARSON (R.J.), 1966. — Identification of species in raw processed fishery products by means of cellulose polyacetate strip electrophoresis. — *Comm. Fish. rev.*, **28**, p. 10-13.
- LEARSON (R.J.), 1969. — Zone electrophoresis an its application to fishery product inspection. — Technical conference on fish inspection and quality control, Halifax (Canada).
- Mc. LAY (R.) et PARSON (Eva), 1972. — A possible method for the identification of canned fish by separation of its carbonyl constituents. — *Analyst*, **97**, p. 376-377.
- MACKIE (I.M.), 1969. — Identification of fish species by a modified polyacrylamide Disc electrophoresis technique. — *J.A.P.A.*, **7**.
- MACKIE (I.M.) et TAYLOR (T.), 1972. — Identification of heat-sterilised canned fish by polyacrylamide, disc electrophoresis. — *Analyst*, **97**, p. 609-611.
- ROUBAL (W.T.), 1963. — Tuna fatty acids. — *J. Amer. oil chemist. soc.*, **40**.
- THOMPSON (Robert R.), 1960. — Species identification by starch gel zone electrophoresis. — *J. Assoc. off. Agric. Chemist*, **43**.
- WOLFF (J.P.), 1968. — L'insaponifiable. — *Manuel d'analyse des corps gras*, p. 163-190.
-