

IDENTIFICATION DES ESPECES DE POISSONS PAR ELECTROFOCALISATION EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

par Marc MOREL

Introduction.

— L'électrophorèse des protéines est maintenant une technique couramment utilisée pour identifier les espèces de poissons.

Elle s'applique aussi bien à des poissons frais ou congelés qu'à des produits transformés (poissons salés, fumés et, même dans certains cas, en conserve).

Le principe fondamental de cette technique repose sur le fait que des particules ionisées peuvent se déplacer sous l'action d'un champ électrique et se séparer différemment selon leur charge. _

En ce qui concerne les protéines, c'est la différence plus ou moins grande qui existe entre leur point isoélectrique pI et le pH du tampon conducteur qui permet leur séparation.

L'utilisation d'une technique nouvelle, l'électrofocalisation, va modifier quelque peu ce principe fondamental. Les protéines ne migreront plus dans un milieu conducteur de pH fixe mais dans un gradient de pH où elles se sépareront d'après leur point isoélectrique pI.

L'avantage de cette technique réside principalement dans le fait que, la capacité de résolution étant accrue, les séparations protéiques sont meilleures.

L'application de l'électrofocalisation à la séparation des protéines du muscle de poisson devrait permettre de résoudre plus facilement les problèmes d'identifications et plus particulièrement ceux que posent encore certaines espèces très voisines qui présentent des différences n'apparaissant que difficilement par les procédés habituels d'électrophorèse.

I - Technique utilisée.

Les méthodes d'extraction des protéines ayant été décrites dans un précédent bulletin de *Science et Pêche*, nous insisterons plus particulièrement sur la technique de séparation proprement dite.

1. Principe de la méthode.

L'électrofocalisation ou fractionnement isoélectrique permet la séparation des protéines sur une couche mince de polyacrylamide renfermant un gradient de pH.

Les protéines migrent dans ce gradient jusqu'à un pH qui correspond à leur point isoélectrique pI.

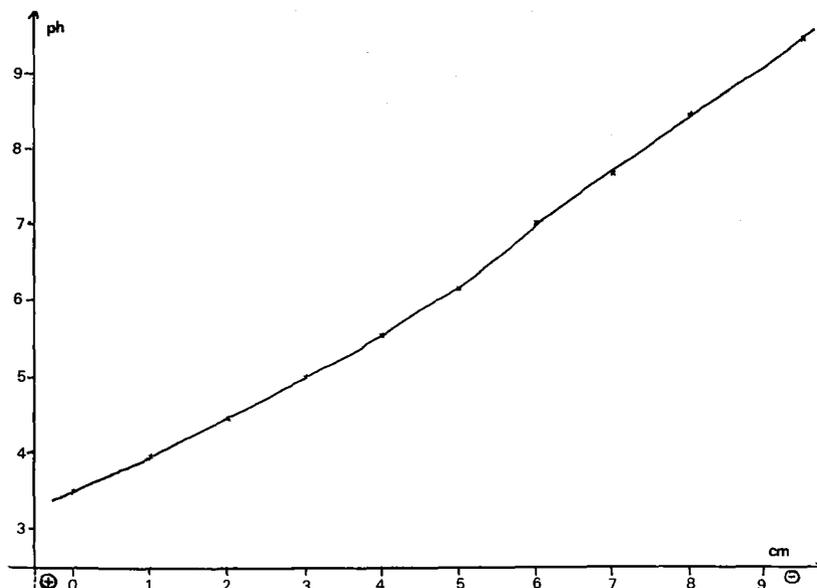


FIG. 1. — Gradient de pH de l'anode à la cathode.

2. Support employé.

La séparation se fait sur des couches minces de polyacrylamide livrées prêtes à l'emploi.

La concentration en gel est de 5 %, celle de l'agent de réticulation (N N' Méthylène bisacrylamide ou Bis), de 3 %.

Le support contient une solution « d'ampholines » (2,4 % en g/ml) porteurs d'ampholytes.

Les ampholines sont des mélanges d'acides amino-carboxyliques synthétiques de points isoélectriques différents et de bas poids moléculaires (300-600).

Soumise à une différence de potentiel, chaque molécule d'ampholine migre jusqu'à une position d'équilibre, déterminée par son point isoélectrique, créant ainsi un gradient de pH stable. On utilise ici une gamme de pH allant de 3,5 à 9,5.

Il est possible d'établir une courbe de la variation du pH entre la cathode et l'anode (fig. 1) en mesurant le pH de l'extrait obtenu par élution de petites pièces de gel (1 × 2 cm) pendant 3 heures avec 2 ml d'eau distillée (on peut également procéder avec une électrode de surface). A l'aide de cette courbe, on détermine directement le pI des différentes protéines qui ont migré dans le gradient de pH. Une différence de pI de seulement de 0,05 unité suffit pour obtenir une séparation.

3. Mode opératoire.

Équipement utilisé (fig. 2 et 3).

On utilise une cuve à séparation alimentée par un générateur à puissance constante 0-2 000 volts (1).

Cette cuve comprend une plaque de refroidissement à travers laquelle il est possible d'établir une circulation d'eau réfrigérée. La température de ce réfrigérant est maintenue constante (+7; +8° C) à l'aide d'un cryostat à circulation (1).

Le couvercle du système interne a été conçu spécialement pour maintenir une atmosphère constante au niveau du gel. Les électrodes de platine sont incorporées au couvercle et sont ainsi totalement protégées.

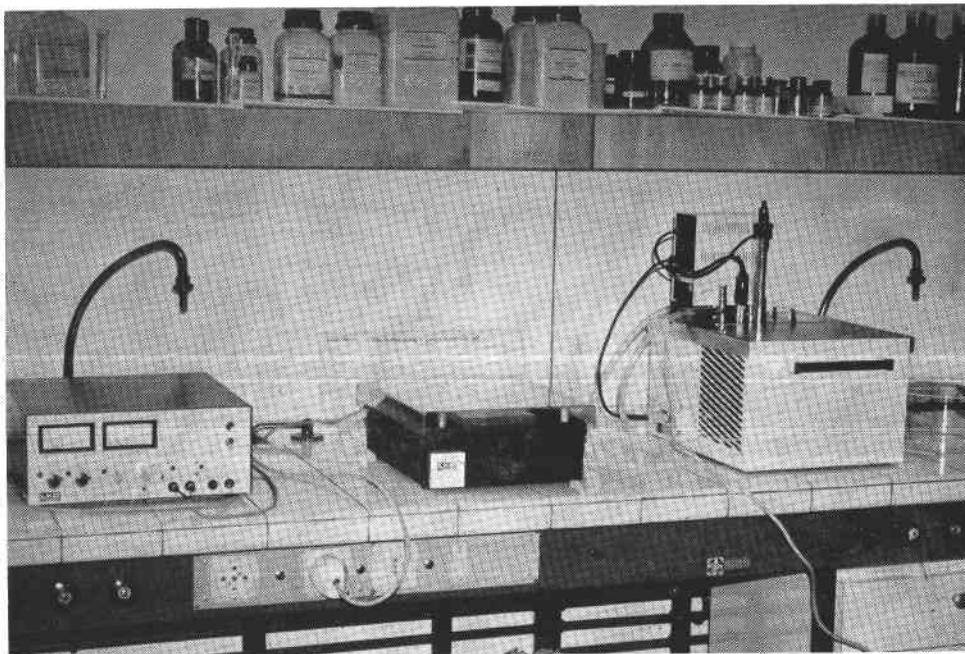


FIG. 2. — Ensemble générateur - cuve - cryostat.

Mise en place du support.

La couche mince de polyacrylamide (245 × 110 × 1 mm) est posée sur le réfrigérant préalablement enduit d'un liquide assurant le contact.

Le processus consiste ensuite à tremper des lamelles de carton dans la solution de l'électrode (acide orthophosphorique 1 M pour l'anode, soude 1 M pour la cathode) et à les placer parallèlement à chaque extrémité du gel. Les cartons assurent ainsi le contact entre les électrodes et la surface du gel.

Dépôt des échantillons (24 par plaque).

On utilise à cet effet des petites pièces de papier filtre Whatmann 3 MM 5 × 10 mm imbibées de l'échantillon à analyser et que l'on place à la surface du gel indifféremment vers l'anode ou la cathode. Il est cependant préférable de faire les dépôts sur une zone où ne migreront pas les protéines. Approximativement 12-15 µl d'échantillon sont absorbés par les pièces de papier filtre.

(1) La cuve à séparation et le générateur sont de type LKB, le cryostat à circulation HAAKE.

La concentration en protéines doit être de l'ordre de 5 à 7 mg/ml d'extrait.

Conditions de séparation.

Les électrodes mises en place, le couvercle fermé, on applique pendant 1 h 30 une puissance constante de 30 watts par plaque entière. Il est également possible de travailler avec des demi-plaques ou des tiers de plaques.

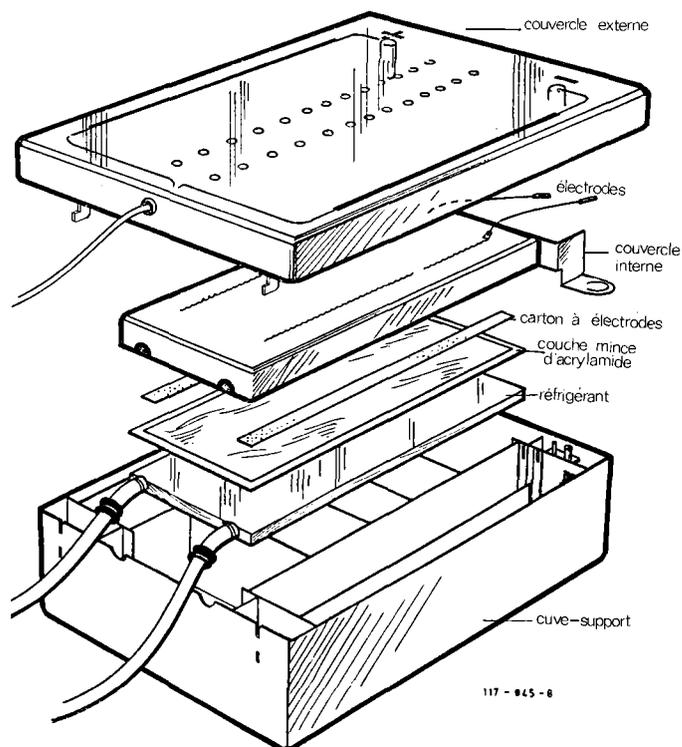


FIG. 3. — Cuve à séparation installée pour l'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide.

T (mn)	V (volts)	I (mA)	P (watts)
0	300	50	15
10	400	40	16
20	550	27	14,8
30	800	18,5	14,8
40	980	15	14,7
50	1 025	14	14,3
60	1 075	13,5	14
70	1 100	13,1	14,4
80	1 150	12,75	14,6
90	1 170	12,50	14,6

TABLEAU 1

Pour des demi-plaques (les plus couramment utilisées), on utilise une puissance constante de 15 watts, ce qui donne les variations de voltages et d'intensités suivantes, indiquées dans le tableau 1.

4. Coloration et décoloration des gels.

Quand la séparation est terminée, le gel est plongé pendant 15 mn à 60° C dans une solution acide de Bleu Brillant de Coomassie R 250 préparée extemporanément et dont la composition est la suivante :

0,25 g de Coomassie R 250	25 g d'acide trichloracétique
75 ml de Méthanol	7,5 g d'acide sulfosalicylique
155 ml d'eau distillée	

La décoloration se fait à l'aide d'une solution eau/éthanol/acide acétique (1 000 ml/375 ml/120 ml).

Inclusion sous cellophane.

Une fois décoloré (transparence totale en 48 heures), le gel est immergé dans un mélange glycérol-solution décolorante (50 ml/500 ml) pendant une heure. Le gel est alors déposé sur une plaque de verre, séché 3 à 4 h à l'étuve à 40° C et recouvert d'une feuille de cellophane. La couche mince d'acrylamide peut maintenant facilement être exploitée et lue avec un densitomètre intégrateur⁽¹⁾.

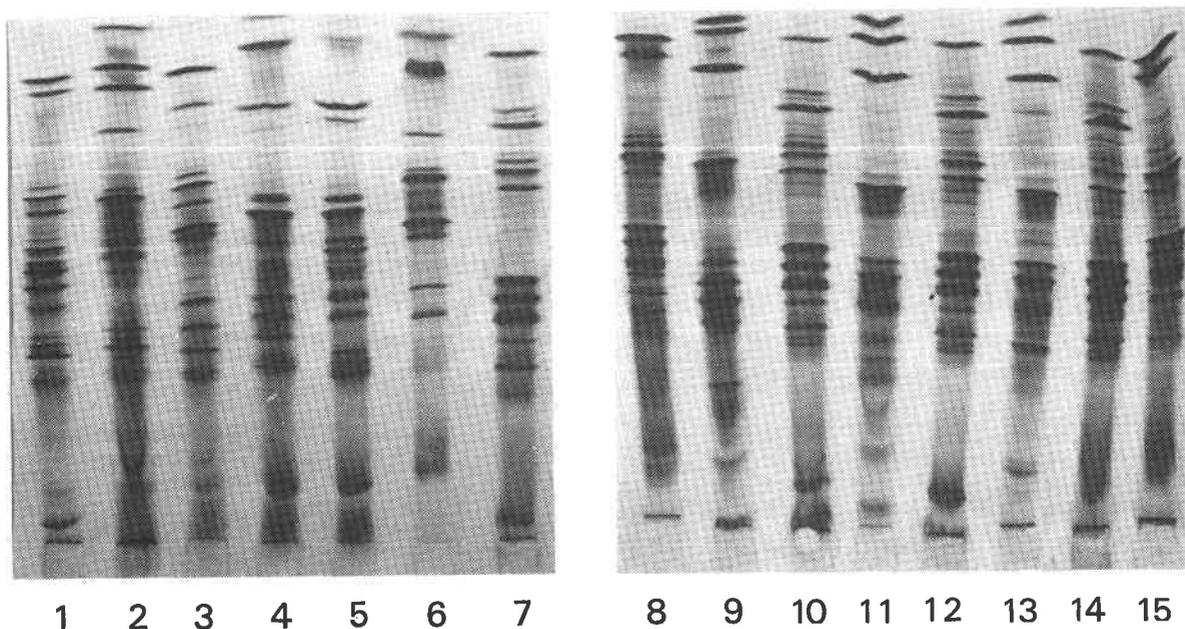


FIG. 4. — *Electrofocalisation des protéines de gadidés* (Eglefin, 1; Brosme, 2; Merlan, 3; Lingue bleue, 4; Lingue franche, 5; Tcaud, 6; Lieu noir, 7, 10, 12, 14; Cabillaud, 8, 15; Merlu de Patagonie, 9; Merlu, 11, 13).

II - Résultats obtenus.

L'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide permet une identification précise de pratiquement toutes les espèces commercialisées, transformées ou non.

Nous allons prendre trois exemples pour illustrer les possibilités qu'offre cette technique.

1. Identification des espèces de poissons sous forme de filets congelés.

L'essai a porté sur plusieurs filets de gadidés. Comme le montre la figure 4, les différences

(1) Nous avons utilisé pour nos enregistrements un densitomètre intégrateur de type VERNON.

entre les espèces d'une même famille sont assez nettes et reproductibles. Le nombre, l'intensité, la position de certaines bandes sont bien caractéristiques de l'espèce.

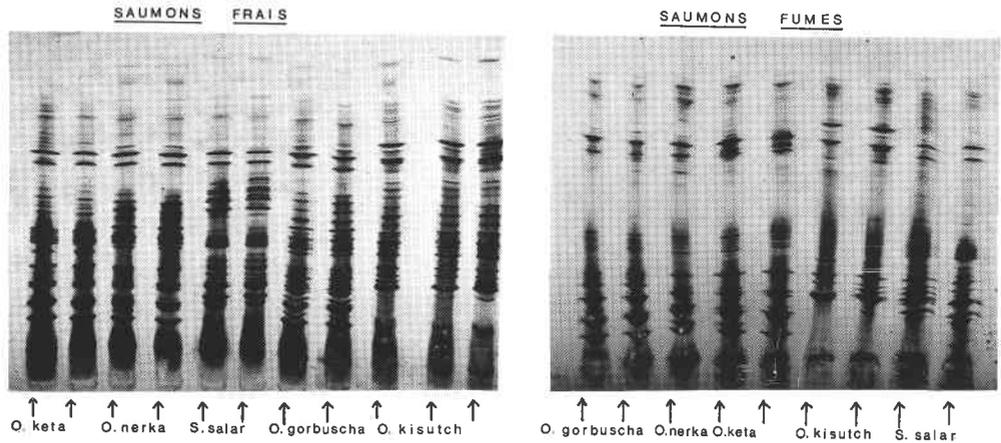


FIG. 5. — *Electrofocalisation des protéines musculaires de cinq espèces de saumon avant et après fumage.*

Cette technique, appliquée à des espèces très proches comme celles du genre *Oncorhynchus* (saumons du Pacifique), permet encore une identification précise et sûre (fig. 5).

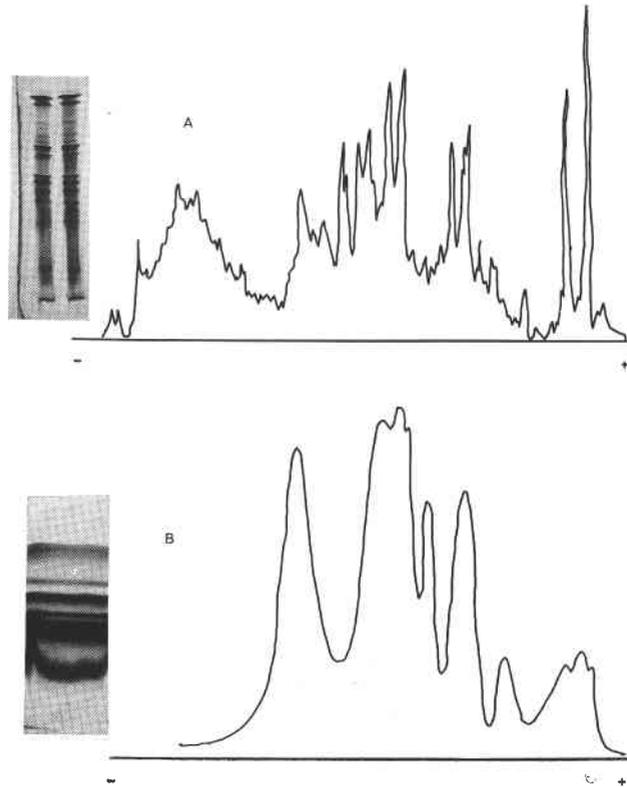


FIG. 6. — *Séparations et enregistrements densitométriques des protéines de cabillaud obtenus par électrofocalisation (A) et électrophorèse (B).*

Il est important de constater que le nombre de fractions protéiques séparées est très grand (40 à 50), beaucoup plus grand qu'en électrophorèse classique.

Pour une même espèce, il y a parfois 5 à 10 fois plus de bandes en électrofocalisation (fig. 6).

2. Identification des espèces de poissons fumés.

Cinq espèces de saumons, quatre du Pacifique (*Oncorhynchus keta*, *nerka*, *gorbuscha*, *kisutch*) et une de l'Atlantique (*Salmo salar*), ont été fumées dans les ateliers de l'Institut.

Après extraction des protéines solubles, l'électrofocalisation nous a permis de différencier ces cinq espèces de saumon fumé, pourtant très proches morphologiquement et organoleptiquement (fig. 5).

La même expérience en électrophorèse classique ne nous aurait pas permis une identification aussi précise.

3. Identification des espèces en conserve.

Des conserves de clupéidés (hareng, sprat, sardine), thonidés (germon, albacore, listao) et gadidés (merlan, églefin) ont été traitées par le bromure de cyanogène BrCN en milieu acide formique puis par l'urée 10 M selon la technique préconisée par IM. MACKIE et T. TAYLOR pour en extraire les protéines.

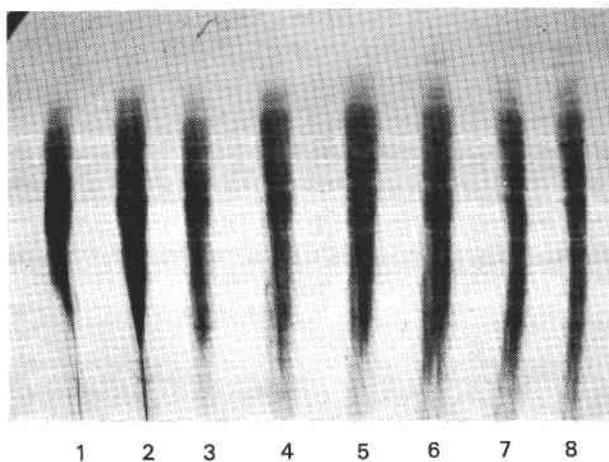


FIG. 7. — *Electrofocalisation des protéines de poissons en conserve* (Merlan, 1; Eglefin, 2; Hareng, 3; Sardine, 4; Sprat, 5; Listao, 6; Germon, 7; Albacore, 8).

On constate (fig. 7) que si les résultats obtenus par électrofocalisation sont moins précis que pour le poisson congelé ou fumé, il est néanmoins encore possible d'identifier par ce procédé les espèces en conserve.

Compte tenu de l'hydrolyse chimique pratiquée lors de l'extraction, un grand nombre de zones sont communes aux différentes espèces. L'identification se fait par la présence de bandes supplémentaires ou plus ou moins intenses selon les espèces.

III - Conclusion.

L'utilisation de l'électrofocalisation en gel de polyacrylamide permet une finesse de séparation jamais obtenue jusqu'alors en électrophorèse classique.

Elle a l'avantage de rester une technique simple, rapide, réalisant la séparation simultanée de plusieurs échantillons (jusqu'à 24 en une seule opération), ce qui permet une comparaison aisée des résultats sans problème de reproductibilité. En outre, elle permet de connaître rapidement le point isoélectrique des différentes protéines qui ont migré sur le gel.

Appliquée à l'identification des espèces de poisson, l'électrofocalisation nous a permis de distinguer facilement les principales espèces commercialisées, même celles très proches les unes des autres. Quand le poisson a subi une transformation (salage, fumage, conserve), il est encore possible d'en définir l'espèce.

Il devient désormais possible, grâce à cette technique nouvelle, d'établir une réglementation très précise des appellations qui protégerait plus efficacement le consommateur contre un risque éventuel de tromperie.

BIBLIOGRAPHIE

ANONYME, 1961 et 1962. — *Acta chem. scandinavica*, **15** : 325-341 ; **16** : 456-466.
— 1962. — *Arch. biochem. and biophys.*, suppl. 1.

KARLSSON (C.), DAVIES (H.), OHMAN (J.) et ANDERSSON (U.B.), 1973. — Analytical thin layer gel electrofocusing in polyacrylamide. Application Laboratory n° 75. — LKB Produkter AB. Stockholm, Sweden.

Instruction Manual: Multiphor 211 LKB Produkter AB.

MACKIE (I.M.) et TAYLOR (T.), 1972. — Identification of species of Heat. Sterilised canned fish by polyacrylamide-disc Electrophoresis. — *Analyst*, vol. 97, p. 609-611.

MOREL (M.), 1974. — Identification des espèces de poissons par électrophorèse des protéines du muscle. — *Science et Pêche, Bull. Inf. Inst. Pêches marit.*, n° 234.

SVENSSON (H.). — Isoelectric Fractionation Analysis and characterisation of ampholytes in Natural pH gradients.