

ELECTROFOCALISATION EN GEL D'AGAROSE, APPLICATION À LA DÉTERMINATION D'ESPÈCES DE POISSONS ET COQUILLAGES

Patrick DURAND et Annie LANDREIN

IFREMER - Centre de Nantes, B.P. 1049, 44037 Nantes Cedex, France.

Abstract

AGAROSE GEL ISOELECTRICFOCUSING : USE IN THE DETERMINATION OF FISH AND SHELLFISH SPECIES.

The electrophoretic study of sarcoplasmic fraction soluble in water or in low ionic strength solutions can be applied to species identification ; in this field isoelectricfocusing (IEF) gives excellent results. In this paper thin agarose gels have been used in IEF for the determination of marine species. The preparation of these agarose gels and the running conditions are discribed. In comparaisn with the conventional polyacrylamide IEF method agarose gels IEF give better results in the resolution of the patterns as showned for example thus obtained with smoked fillets, and above all bring a faster analytical response. The use of agarose gel in IEF is a relatively new technique, different companies market several different agarose ampholyte systems ; these products should be tested to find the most adapted.

Résumé

L'étude électrophorétique des fractions sarcoplasmiques dans l'eau et les solutions de faible force ionique peut être appliquée à l'identification d'espèces ; dans ce domaine l'isoélectrofocalisation (IEF) donne d'excellents résultats. Nous avons utilisé pour la détermination d'espèces marines des gels minces d'agarose en IEF. La fabrication de ces gels et les conditions opératoires sont décrites. Par rapport à la méthode classique d'IEF en gel de polyacrylamide, l'IEF en gel d'agarose donne une meilleure résolution des spectres comme le montrent les résultats obtenus avec des filets fumés, et surtout apporte une rapidité analytique très supérieure. Cependant, l'IEF en gel d'agarose est une technique récente, plusieurs fabricants commercialisent différents systèmes agarose-ampholites ; ces divers produits doivent être testés pour trouver les mieux adaptés.

Introduction.

La fraction protéique du muscle, extraite par l'eau ou par les solutions de faible force ionique, fait l'objet de nombreux travaux. D'une part, contenant le pool des enzymes musculaires, cette fraction est particulièrement importante pour l'étude des divers changements biochimiques ayant lieu dans le poisson après sa capture et pendant son stockage. Ainsi, certaines enzymes modulent la production de composés intervenant dans la formation de la saveur, de l'arôme, de la couleur. D'autre part, de nombreuses études électrophorétiques ont montré que cette fraction était caractéristique de l'espèce. Cette spécificité relativement indépendante de l'état physiologique, du sexe et des conditions de milieu constitue une remarquable particularité ouvrant des possibilités nouvelles dans le domaine de la taxonomie et de la génétique des espèces.

D'un point de vue moins fondamentaliste, l'étude électrophorétique des fractions sarcoplasmiques solubles dans les solutions de faible force ionique permet, par comparaison à des spectres électrophorétiques de référence, l'identification des espèces marines et des produits élaborés à partir de ces espèces. Le problème de la diagnose des espèces est complémentaire à celui de la détermination de la qualité marchande et va de pair avec le développement des échanges commerciaux de denrées alimentaires. Ceux-ci ont augmenté en volume et se sont diversifiés. Par exemple de nombreuses espèces tropicales sont vendues sur le marché européen, les poissons sont de plus en plus commercialisés sous forme de filets congelés ou fumés, de sticks reconstitués partiellement ou totalement à partir de pulpe de poisson, etc. La détermination d'espèces peut être envisagée pour ces produits par l'analyse électrophorétique des fractions protéiques solubles. Différentes techniques électrophorétiques ont été utilisées pour l'identification des espèces de poissons (1-6), de l'électrophorèse libre en veine liquide à l'électrophorèse de zone en gradient de pH, plus communément appelée isoélectrofocalisation (IEF). Nous nous sommes intéressés dans ce présent travail à une variante récente de l'IEF, à savoir l'utilisation de support d'agarose.

Isoélectrofocalisation en gel d'agarose.

L'IEF, technique électrophorétique mise au point il y a une quinzaine d'années, a suivi depuis une évolution constante. En IEF, les protéines à analyser migrent dans un gel contenant des molécules polyélectrolytiques de petite taille appelées ampholines. Ces ampholines ont une bonne capacité tampon et sont conductrices à leur point isoélectrique (pHi). Soumises à un champ électrique, elles migrent et se fixent à leur pHi respectif où leur charge nette est nulle, créant ainsi sur toute la longueur du gel un gradient de pH. La linéarité et les bornes de ce gradient de pH sont déterminées par la nature et la diversité des ampholines incorporées au sein du gel. Les protéines à analyser vont être séparées le long de ce gradient de pH de manière analogue. De par leur caractère amphotérique, elles vont migrer dans le gel et se concentrer dans la zone de pH correspondant à leur propre pHi où leur charge nette est nulle. L'IEF est une technique séparative où il y a concentration (focalisation) de la fraction étudiée, ce qui explique en partie le pouvoir de résolution élevé de cette méthode.

Classiquement, l'IEF met en œuvre des gels de polyacrylamide. Les fabricants commercialisent des supports standardisés fiables et faciles d'utilisation. Ces supports ont donné d'excellents résultats dans le domaine de l'identification des poissons. Les gels d'acrylamide présentent cependant quelques inconvénients. Tout d'abord, l'acrylamide est un composé neurotoxique, ensuite les gels de polyacrylamide ne permettent pas la séparation de macromolécules de haut poids moléculaire, enfin la décoloration de ces gels après traitement au bleu de Coomassie est longue (de 24 à 48 heures).

L'utilisation de gel d'agarose supprime ces inconvénients. Jusqu'à présent, l'agarose n'était pas utilisé en IEF, les impuretés et les groupes chargés de l'agarose engendrant par électroendosmose des gradients de pH instables. Récemment de nouveaux supports à base d'agarose de grande pureté ont été commercialisés. Ces supports, mis au point pour l'analyse des acides nucléiques ou de protéines de haut poids moléculaire, peuvent être utilisés pour la séparation de protéines de plus faible poids moléculaire. Nous les avons testés pour l'analyse de quelques produits marins.

Matériel et méthode.

Appareillage :

- a) appareil pour électrofocalisation : système Multiphor LKB 2117 ;
- b) alimentation stabilisée à puissance constante LKB 2103 ;
- c) cryostat à circulation HAAKE assurant un circuit d'eau réfrigérée (+ 8°) dans la plaque de refroidissement ;
- d) seringue type SMI Micro-Pettor B (Polylabo) pour les dépôts ;
- e) kit de coulage pour gel capillaire d'agarose (0,5 mm) LKB ;
- f) sèche-cheveux électrique pour séchage du gel.

Réactifs :

- a) agarose Z : 2206-104 LKB ;
- b) ampholine LKB pH 3,5-9,5 ; pH 4,0-6,0 ;
- c) solutions électrodes : acide acétique 0,5 M (anode), NaOH 0,5 M (cathode) ;
- d) solution de fixation : 100 g acide trichloracétique et 10 g acide sulfo-salicylique dilués à 1 000 ml dans de l'eau distillée ;
- e) solution de rinçage : éthanol 95° ;
- f) solution colorante : 0,5 g Coomassie R 250 dans 100 ml de solution décolorante. Agiter 1 heure à température ambiante ;
- g) solution décolorante : 350 ml éthanol 95° + 100 ml acide acétique complétés à 1 000 ml avec de l'eau.

Préparation de l'échantillon.

Peser un poids de chair (environ 20 g) et ajouter le même poids d'eau distillée. Broyer 30 secondes au Waring Blendor. Centrifuger 20 mn à 30 000 g et recueillir le surnageant sur laine de verre.

Mesurer la concentration protéique de l'extrait (méthode du Biuret "Merkotest") et faire la dilution nécessaire pour ramener cette concentration à 10 mg/ml.

Préparation du gel d'agarose.

La préparation du gel et l'électrofocalisation se font suivant la méthode décrite dans la notice LKB Instruction 1818-A.

Le moule est préparé en appliquant, à l'aide d'un rouleau, le Gel Bond Film (côté hydrophile au-dessus) sur une plaque de verre mouillée d'un peu d'eau. Une seconde plaque munie d'espaces est posée sur le Gel Bond en laissant un écart de 1 cm environ à chaque extrémité. Les plaques maintenues ensemble par des pinces sont placées à l'étuve à 70°C pendant 15 minutes.

Par ailleurs, 0,18 g d'agarose sont mélangés à 16,6 ml d'eau et portés à ébullition. Une fois l'agarose dissous, la température est ramenée à 75° C. Ajouter 1,4 ml de la solution d'ampholine et mélanger. Injecter la solution d'agarose dans le moule à l'aide d'une seringue, qui aura été chauffée auparavant. Donner au moule une inclinaison de 30° pour en permettre le remplissage par capillarité. Le placer horizontalement et laisser refroidir 15 minutes à température ambiante, puis au moins une heure au réfrigérateur en atmosphère humide.

Mode opératoire.

Démouler le gel qui reste collé au Gel Bond et placer celui-ci sur la plaque réfrigérée, maintenue à + 8°C et enduite d'un peu de pétrole pour assurer une meilleure conduction thermique. Placer les cartons à électrodes imprégnés des solutions correspondantes de chaque côté du gel.

Déposer avec la micro-seringue, directement sur le gel, 10 μ l des extraits.

Placer le couvercle de la cuve d'électrofocalisation et brancher l'alimentation. Les conditions électriques et le temps de focalisation diffèrent selon la gamme de pH choisie :

pH 3,5-9,5 : 30 minutes à puissance constante 12 watts, voltage et intensité maximum ;
pH 4,0-6,0 : 60 minutes à puissance constante 6,5 watts, voltage et intensité maximum.

Après ce temps de focalisation, le gel est placé 10 minutes dans la solution de fixation, puis est rincé 10 minutes dans l'éthanol. Il est séché sous un courant d'air chaud et coloré pendant 5 minutes dans la solution de bleu de Coomassie. La décoloration se fait 10 minutes environ en changeant une fois le bain décolorant.

Passer un coton trempé dans la solution décolorante sur la surface du gel pour éliminer d'éventuelles traces superficielles de colorant, puis sécher le gel.

Résultats et conclusions.

Figure 1.

Les spectres électrophorétiques présentés sont obtenus à partir des filets de poissons congelés (b-c) et fumés (a-d-e). Les dépôts sur le gel d'agarose ont été effectués avec les extraits bruts dont les concentrations en protéines déterminés par méthode du Biuret sont voisines de 20 mg/ml. La résolution des spectres peut être affinée en utilisant un gradient de pH aux bornes plus restreintes comme le montrent les résultats obtenus avec un gel d'agarose pH 4-6 (figure 2 ci-après).

Figure 2.

Pour les produits fumés, on peut noter l'assez bonne résolution des bandes et l'absence presque complète des traînées souvent observées lors de l'utilisation de gel de polyacrylamide. Cette amélioration est vraisemblablement liée à la limitation de l'effet de tamisage par le gel d'agarose qui permet une meilleure migration des molécules de plus haut poids moléculaire formées lors du fumage des produits. Les spectres électrophorétiques (a-d) de la figure 1 et (a₁-d₁) de la figure 2 sont très distincts bien que sensés provenir de la même espèce, à savoir l'espadon. Il est fortement probable qu'il s'agisse en fait de produits fumés provenant d'espèces différentes.

Figure 3.

Les résultats de l'analyse électrophorétique d'extraits de muscles adducteurs de coquillages sont présentés. A titre d'exemple, nous avons choisi deux

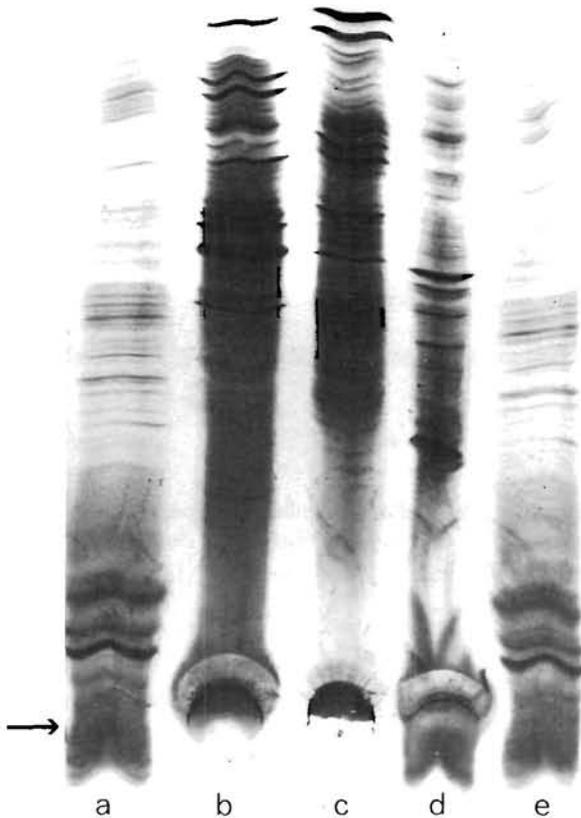


FIG 1. — Spectres électrophorétiques de poissons :

- filets de poissons fumés, commercialisés sous l'appellation « espadon » (*Xiphias gladius*) a, d, e ;
 - filets congelés de lieu noir (*Pollachius virens*) b et de cabillaud (*Gadus morhua morhua*) c ;
- gel d'agarose 0,5 mm, pH 3,5-9,5, temps de focalisation 30 minutes à puissance constante de 12 W ; les dépôts sont faits dans la zone cathodique mentionnée par une flèche.

FIG 1. — Agarose gel isoelectricfocusing patterns of fish :

- smoked fish fillets sold commercially as swordfish (*Xiphias gladius*) a, d, e ;
 - frozen fillets of saithe (*Pollachius virens*) b, and cod (*Gadus morhua morhua*) c ;
- 0,5 mm thin agarose gel, pH gradient 3.5-9.5, 30 min focalisation at a 12 W constant power ; the sample droplets are applied in the catodic zone mentioned by a arrow.

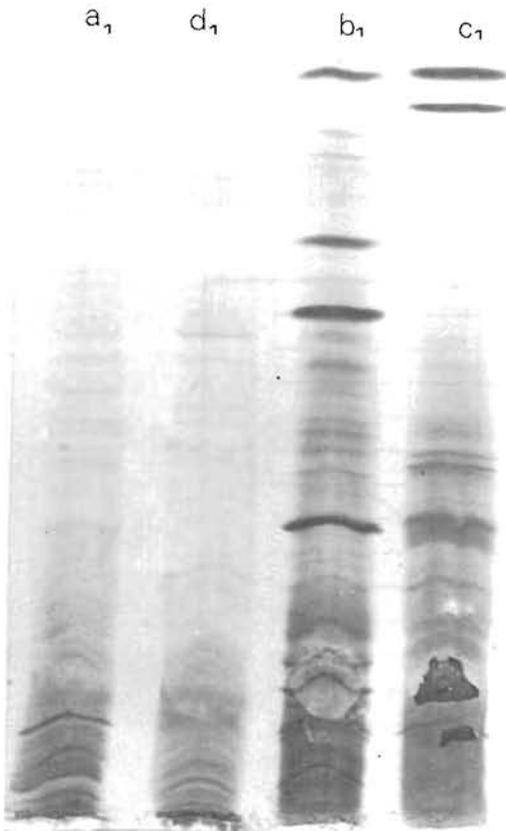


FIG. 2. — Analyse isoélectrophorétique en gamme restreinte de pH : gel d'agarose 0,5 mm, pH 4-6, temps de focalisation 60 minutes à puissance constante de 6,5 W ; mêmes extraits que ceux utilisés pour la gamme de pH étalée figure 1, mais concentration protéique ramenée à 10 mg/ml : a₁, d₁ : dilution de a et d ; b₁, c₁ : dilution de b et c.

FIG. 2. — Isoelectric focusing analysis with close pH range : agarose gel 0.5 mm thin, pH gradient 4-6, 60 min focalisation at a 6.5 W constant power, same extracts as used in results presented figure 1 with protein concentration adjusted to 10 mg/ml : a₁, d₁ : dilution of extracts a and d.

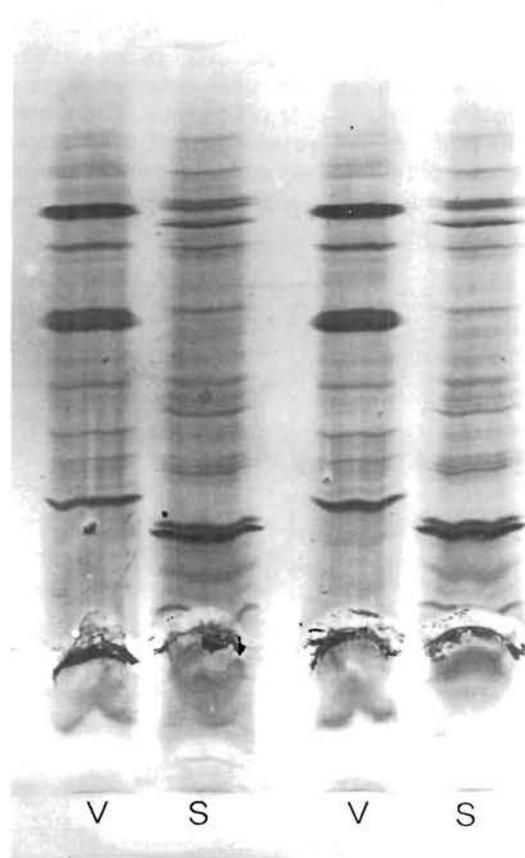


FIG. 3. — Spectres électrophorétiques de muscles adducteurs de coquillages : V : vanneau (*Chlamys opercularis*), S : coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) ; gel d'agarose 0,5 mm, pH 4-6, temps de focalisation 60 minutes à puissance constante de 6,5 W ; les extraits sont obtenus après broyage (30 secondes au Waring blender) et centrifugation (15 minutes 20 000 g à 4°C).

FIG. 3. — Sarcoplasmic protein patterns of shellfish adductor muscles : V : Queen Scallops (*Chlamys opercularis*), S : Scallops (*Pecten maximus*) ; agarose gel 0.5 mm thin, pH gradient 4-6, 60 min focalisation at a 6.5 constant power. The proteinic extracts are obtained after 30 seconds grinding in a waring blender and 15 minutes centrifugation (20 000 g, 4°C).

pectinidés communs : la coquille Saint-Jacques atlantique (*Pecten maximus* L.) et le vanneau (*Chlamys opercularis* L.). Ces deux espèces ont des profils électrophorétiques distincts, il est donc aisé de les différencier, ce qui n'est pas toujours facile quand ces coquillages sont commercialisés sous forme de noix congelées. Sous cette forme, il peut, semble-t-il, y avoir possibilité de substitution de petites coquilles Saint-Jacques par des vanneaux de grande taille.

Pour faciliter la comparaison des spectres et quantifier les variations des gradients de pH d'une plaque à l'autre, il est possible d'utiliser un marqueur interne de pH, ou de mesurer le profil de pH au moyen d'électrodes de pH à têtes plates adaptées à la mesure du pH sur une surface. Le marqueur est constitué d'un mélange de protéines de pHi connus qui migrent après isoélectrofocalisation et étalonnent le gel.

Figure 4.

Le profil de pH mesuré avec ce type d'électrode est représenté ainsi que le spectre d'un marqueur de point isoélectrique. On peut noter un léger décalage entre les valeurs de pH correspondant aux pH_i des protéines étalons et le pH mesuré à l'électrode. Ceci résulte très vraisemblablement d'une légère évolution du profil de pH au sein du gel au cours de la focalisation. Il est donc préférable, pour mesurer le gradient de pH dans le gel et comparer des spectres provenant de plaques différentes, d'utiliser un marqueur interne qui intègre ces petites variations du profil de pH au cours de la focalisation.

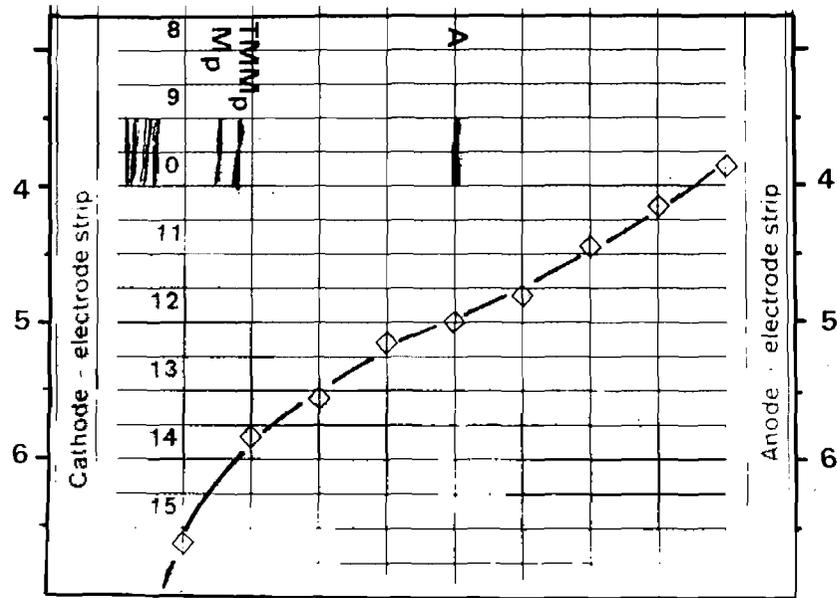


FIG. 4. — Calibration du gel d'agarose :

- valeurs de pH mesurées après 60 minutes de focalisation à puissance constante de 6,5 W avec électrodes : électrode pH Ingold (réf. 273 MZ) et électrode de référence Ag/AgCl (réf. 374 M8). L'échelle de pH est mentionnée sur l'axe des ordonnées ;
- le spectre du marqueur de points isoélectriques (Isoelectric Point Markers BDH) est porté :
 A : protéine associée à l'azurine ($pH_i = 4,8$),
 TMM_p : la metmyoglobine porcine trifluoroacétylée ($pH_i = 5,92$),
 M_p : la forme ferro de la metmyoglobine porcine ($pH_i = 6,15$).

FIG. 4. — Calibration, of the agarose gel :

- measured pH values after 60 min focalisation at a 6.5 W constant power with electrodes : Ingold pH electrodes (ref. 273 MZ) and reference electrode Ag/AgCl (ref. 374 M8). The pH scale is mentioned on the Y axis ;
- the isoelectric point marker pattern (Isoelectric point marker BDH) is showned :
 A : protein associated with Azurin (pH = 4.8),
 TMM_p : Trifluoroacetylated Myoglobin Met porcine (pH_i 5.92).
 M_p : Myoglobin ferro porcine (pH_i 6.15).

En conclusion de ces essais, il apparaît que l'agarose constitue un support d'électrophorèse intéressant et facile à mettre en œuvre. La faible épaisseur et la nature du gel permettent des temps de focalisation courts (30 minutes pour la gamme de pH 3,5-9,5) et des étapes de coloration-décoloration très rapides. Ainsi le morceau de muscle à étudier devient un résultat électrophorétique, qui peut être joint à un bulletin d'analyse ou être stocké, en moins de deux heures toutes étapes comprises. En plus de la rapidité de l'analyse, l'utilisation de gel mince d'agarose diminue très notablement le coût de l'analyse.

Pour le moment, les fabricants proposent divers types d'agarose et divers types d'ampholytes et ne commercialisent pas de gel d'agarose prêt à l'emploi. Ces différents produits doivent être testés pour trouver ceux qui s'avèrent les mieux adaptés en particulier ceux donnant la meilleure reproductibilité analytique. Compte tenu de ces variations, l'identification d'espèces par IEF en gel d'agarose est possible en l'état actuel de la technique, à condition d'analyser sur le même gel les échantillons à déterminer et les références correspondantes.

BIBLIOGRAPHIE

- CONNELL (J.J.), 1953. — Electrophoresis of fish muscle extracts. — *Biochem. J.*, **55** : 378-385.
- LANE (J.-P.), HILL (W.S.) et LEARSON (R.J.), 1966. — Identification of species in raw processed fishery products by mean of cellulose polyacetate strip electrophoresis. — *Comm. Fish. Rev.*, **28** : 10-13.
- LUNDSTROM (R.C.), 1977. — Identification of fish species by thin-layer polyacrylamide gel isoelectric focusing. — *Fish. Bull.*, **75** (3) : 571-576.
- MACKIE (I.M.), 1969. — Identification of fish species by a modified polyacrylamide disc electrophoresis technique. — *J. Ass. Publ. Anal.*, **7** : 83-87.
- 1980. — A review of some recent applications of electro phoresis and iso-electric focusing in the identification of species of fish in fish and fish products. — *In Advances in fish science and technology*, J.J. Connell edit. — London : Fishing News Books Ltd : 444-450.
- MANCUSO (V.N.), 1964. — Protein typing of some authentic fish species by disc electrophoresis. — *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, **47** : 841-844.
- MOREL (M.), 1977. — Identification des espèces de poissons par électrofocalisation en gel de polyacrylamide. — *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, n° 275 : 1-8.
- THOMPSON (R.R.), 1960. — Species identification by starch gel zone electrophoresis of protein extracts. — *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, **43** : 763-764.
- TOOM (P.M.), WARD (C.F.) et WEBER (J.R.), 1982. — Identification of fish species by isoelectric focusing. — *In Chemistry and biochemistry of marine food products*, I. Martin and E. Roy. — AVI Publishing Company, Inc. : 51-64.

Manuscrit soumis le 12 juillet 1984, accepté le 4 octobre 1984.