

VARIABILITE ELECTROPHORÉTIQUE DES PROTEINES NON ENZYMATIQUES : CAS DES PROTEINES SOLUBLES DU NOYAU DU CRISTALLIN DE LA SARDINE DU MAROC

M. ETTALIBI[☆], R. BIAZ[◇], H. BELVEZE[◇] ET A. BELEMLIH[☆]

☆ Institut Agronomique et Vétérinaire HASSAN II RABAT

◇ Institut des Pêches Maritimes - CASABLANCA

*" C'est lui qui a mis la mer à votre service
pour que vous en retiriez une chair fraîche et les bijoux
dont vous vous parez. Tu vois les vaisseaux fendre les va-
gues pour que vous partiez à la recherche de ses bienfaits.
Peut-être seriez-vous reconnaissants "*

SOURATE DES ABEILLES, LE CORAN

Les causes d'hétérogénéité moléculaire des protéines non enzymatiques sont nombreuses. Nous pouvons citer entre autres :

- la perturbation de la lecture de l'information génétique avec duplication et reassortiments aléatoires des bases nucléiques (ex. délétions, substitutions, addition...), l'hétérogénéité de la copule glucidique quand elle existe, la variabilité dans les substitutions sur résidus d'acides-amino ex. Acétylation, amidation, Phosphorylation, sulfatation...)... Ceci au cours de la Biosynthèse,

- et la fixation de ligands, la désamidation, le clivage et ou la perte d'acides-amino ou de résidus glucidiques, la différenciation d'allèles, la thermosensibilité... après cette biosynthèse.

Par contre, les moyens de détection de cette variabilité des protéines non enzymatiques (Protéines de structure) protéines de transport...) sont très limités. A l'heure actuelle, pour des raisons de simplicité et de coût relativement peu élevé, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide semble donner la meilleure approche.

De nombreux travaux ayant trait à la génétique des populations et à l'élucidation du mécanisme de l'évolution moléculaire et biologique ont utilisé l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

En ce qui nous concerne, le problème de l'identification des populations de sardine sur la côte marocaine ayant retenu notre attention tant sur le plan biologique que sur le plan économique nous nous sommes attelés à l'élucider au moyen de cette méthode.

1. METHODOLOGIE

Auparavant, plusieurs méthodes d'identification des populations de sardines ont été utilisées. Parmi elles, nous pouvons citer entre autres :

- les techniques biométriques (1)

- le marquage (2) pour l'étude du trajet, de l'époque et des causes de migration du poisson,

- les méthodes biostatistiques (taux de croissance et de mortalité naturelle, prise par unité d'effort). Ce dernier paramètre est proportionnel à la densité du poisson dans l'aire de pêche (3)

- et les techniques acoustiques (étude de la distribution géographique des sardines entre Tanger et Cap Juby non loin d'EL AYOUN (4)

Malheureusement, toutes ces techniques se basant la plupart des cas sur des critères morphologiques donc phénotypiques, aboutissent à des résultats difficilement comparables et voire même parfois contradictoires (5).

Partant du fait que la présence de deux ou plusieurs formes multiples (cas des enzymes) ou de formes discontinues au sein d'une même espèce est un critère d'hétérogénéité caractérisé par des différences au niveau de la structure primaire (6) (7) (8) nous avons émis l'hypothèse suivante :

le caractère amphotère des protéines leur permet d'être mobiles dans un champ électrique. Dans des conditions déterminées de pH, de force ionique, de température, de champ électrique et de temps de migration, une protéine donnée migrera toujours de la même façon. De ce fait les protéines obtenues à partir d'un matériel biologique (organe, tissu...) vont migrer à des vitesses variables selon leurs charges nettes. Or, pour une population de grande taille constituée par un ensemble d'individus d'une même espèce vivant en panmixie dans un même milieu, les fréquences géniques correspondant à celles des différents phénotypes pour un locus donné et les fréquences génotypiques ne varient pas d'une génération à l'autre. Cet équilibre survient en l'absence de migrations (changement du milieu environnant) de mutations et de sélection. En fait, les mutations intervenant à chaque génération sont éliminées par la sélection naturelle. Toutefois on peut penser qu'un certain nombre de mutations échappent à cette loi. Il en résulte un maintien de la variabilité d'où l'apparition d'hétérogénéité dans la population initiale. De plus, la sélection peut favoriser non pas la souche sauvage mais l'hétérozygote. Comme elle peut donner l'avantage au génotype rare, un certain équilibre s'établit.

Par ailleurs, le milieu environnant joue également son rôle. Variable dans l'espace et le temps, l'environnement favorise certains génotypes au détriment d'autres dans certaines conditions.

D'où en tenant compte de ces considérations, si les électrophorogrammes de protéines sont identiques on pourra dire que la population est homogène. Inversement, si les modèles électrophorétiques sont différents on dira que la population est hétérogène et qu'il y a eu interpénétration entre deux ou plusieurs populations homogènes au préalable.

Partant de l'hypothèse précédente, nous avons effectué l'identification des populations de sardines sur la côte marocaine par électrophorèse sur gel de polyacrylamide du noyau du cristallin.

Les protéines structurales du noyau du cristallin ont l'avantage d'être stables au cours de la vie du poisson (9). Les protéines étudiées concernent la presque totalité des protéines solubles dans l'eau et le chlorure de sodium. La technique employée est celle de BONNET et PICHOT (10).

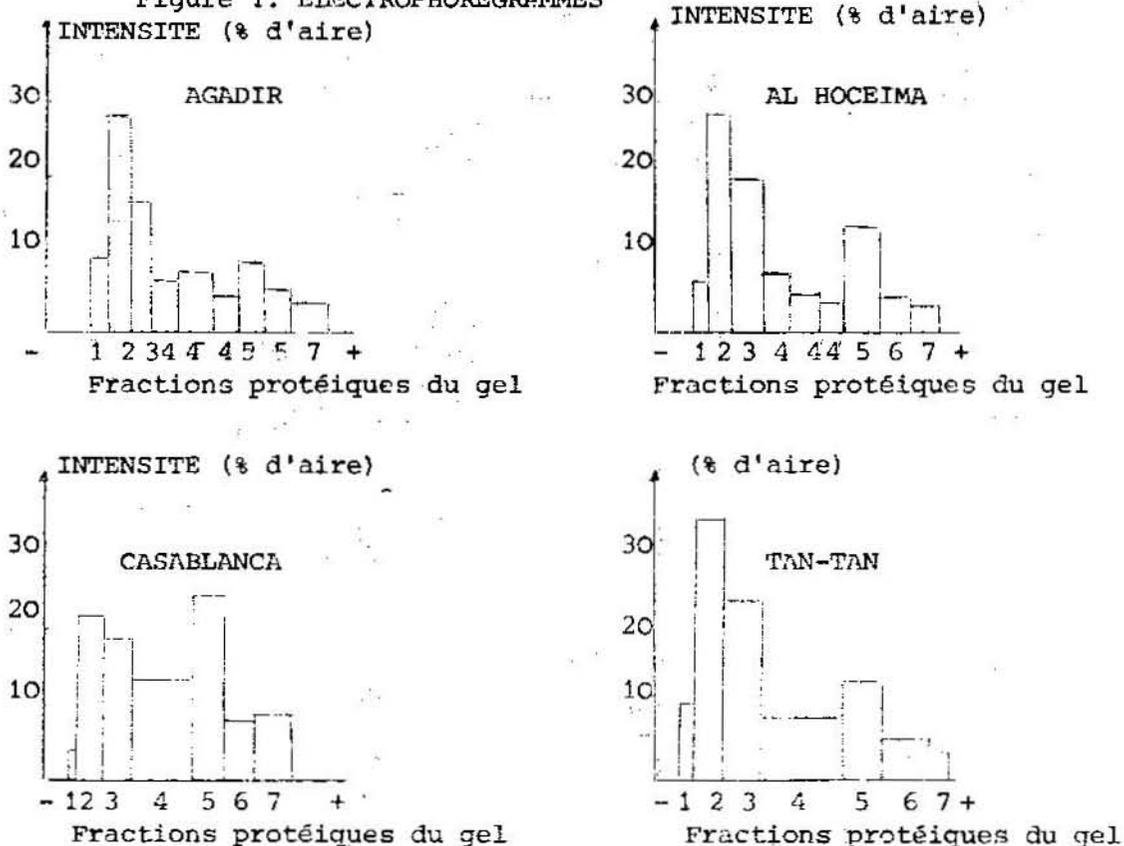
A la lumière des données biologiques émanant en partie de l'Institut des pêches maritimes de Casablanca, nous avons choisi et étudié quatre zones de pêche : Al-Hoceïma, Casablanca, Agadir et Tan-Tan avec respectivement 24, 36, 61 et 65 échantillons.

Les gels constitués uniquement par le support de séparation sont préparés suivant la technique de ETTALIBI (11). Ces gels de 8 cm de long sont constitués par 7,5% d'Acrylamide. Sur chaque gel, est déposé un échantillon de 300 microgrammes de protéines, dosées par la méthode de LOWRY et Al (12). La charge, contenant également une goutte de bleu de Bromophénol à 0,005%, est recouverte par une goutte de Glycérol pur. Après avoir homogénéisé avec soin le dépôt, on procède à la mise en place d'une solution tampon TRIS hydroxyméthyl amino-méthane 0,02 M-Glycine 0,01 M pH9,2. L'électrophorèse est démarrée à 1,5 mA par gel pendant 15 minutes puis 6 mA par gel pendant deux heures environ dans une cuve Gilson Gelphor à refroidissement par circulation d'eau froide. Les gels sont ensuite colorés au noir amido 10 B (13). L'excès de colorant est éliminé par électrophorèse transversale dans un appareil du type Pharmacia à l'aide d'un mélange Acide acétique/Méthanol /H₂O (7/5/100 V/V).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Pour les différents lots, les électrophorégrammes, que nous avons obtenu par densitométrie, sont généralement représentés par 7 bandes dont 3 disques cathodiques principaux et un disque anodique important. Comme le montre la figure 1, la présence de bandes secondaires est notée. Ainsi la bande 4 est en fait composée de 2 à 3 bandes secondaires.

Figure 1. ELECTROPHOREGRAMMES



Pour chaque électrophorégramme nous avons calculé la moyenne des pourcentages d'aires des différentes fractions ou bandes protéiques numérotées de 1 à 7 comme le montre le tableau 1 suivant :

Origine des lots à n échantillons	Fraction n°	1	2	3	4	5	6	7	d5/d2
AL-HOCEIMA n = 24		8,36	24,19	17,58	28,70	15,65	5,19	0,73	6,53 ± 1,52
		+ 1,34	+ 2,78	+ 1,52	+ 3,30	+ 0,97	+ 1,35	+ 0,83	
CASABLANCA n = 36		7,84	25,99	13,82	19,04	17,86	6,21	3,22	6,60 ± 0,32
		+ 2,10	+ 1,93	+ 6,86	+ 3,77	+ 1,44	+ 0,63	+ 1,32	
AGADIR n = 61		11,41	23,52	17,42	25,23	13,76	6,76	1,57	5,38 ± 0,32
		+ 1,38	+ 1,29	+ 0,88	+ 2,67	+ 1,34	+ 0,50	+ 0,68	
TAN-TAN n = 65		13,20	25,59	18,85	21,06	13,59	5,20	2,5	5,66 ± 0,36
		+ 1,48	+ 1,51	+ 1,38	+ 2,41	+ 0,97	+ 0,92	+ 0,52	

Tableau 1. Moyenne des pourcentages d'aires de différentes fractions protéiques pour des lots de n échantillons avec un risque de 5% et de la mobilité électrophorétique relative de la bande 5 par rapport à la bande 2 (d5/d2).

Sur ce même tableau nous indiquons également la mobilité électrophorétique relative (d5/d2) de la fraction anodique n° 5 (qui est unique) par rapport à la fraction cathodique n° 2. Cette dernière est non seulement la plus importante mais en plus, elle semble être invariable dans tous les lots.

La comparaison des échantillons en tenant compte de l'interaction bandes-régions nous amène à effectuer une analyse de la variance à deux critères de classification (14). Les tables nous donnent pour un degré de liberté maximum, les valeurs théoriques suivantes pour la variable F

$$F_{0,95} = 2,1 \text{ pour un risque } = 5 \%$$

$$F_{0,99} = 2,80 \text{ pour un risque } = 1 \%$$

$$F_{0,999} = 3,74 \text{ pour un risque } = 0,1 \%$$

Les valeurs statistiques obtenues à partir de nos données expérimentales sont présentées dans le tableau 2.

Interactions bandes-Régions deux à deux	Variable f obtenue	Interprétation
Casablanca Tan-Tan	52,50	$f > F_{0,999}$ Très hautement significative
Al-Hoceïma Casablanca	11,02	$f > F_{0,999}$ Très hautement significative
Agadir Casablanca	10,41	$f > F_{0,999}$ Très hautement significative
Agadir Tan-Tan	9,18	$f > F_{0,999}$ Très hautement significative
Al-Hoceïma Tan-Tan	9,04	$f > F_{0,999}$ Très hautement significative
Agadir Al-Hoceïma	3,07	$F_{0,999} > f > F_{0,99}$ Hautement significative

Tableau 2. Analyse de la variance à deux critères de classification.

Le tableau 2 précédent indique que les lots, provenant de zones de pêche géographiquement voire même écologiquement différentes, sont comparés deux à deux - totalement différents.

Par ailleurs, la comparaison des électrophorégrammes au niveau d'une bande protéique donnée ou du rapport des mobilités électrophorétiques de deux fractions protéiques importantes d_5/d_5 , nous met en présence d'une analyse de la variance à un critère de classification.

Le traitement des échantillons s'opère avec un degré de liberté D.D.L 3 et 182. Les tables (14) nous donnent dans ces conditions les valeurs théoriques suivantes pour la variable F :

$$F_{0,95} = 2,66 \text{ pour un risque de } 5 \%$$

$$F_{0,99} = 3,90 \text{ pour un risque de } 1 \%$$

$$F_{0,999} = 5,68 \text{ pour un risque de } 0,1 \%$$

Critère de variation	f obtenue	Interprétation
Bande protéique n° 1	9,48	$f > F_{0,999}$ très hautement significative
Bande protéique n° 2	2,05	$f < F_{0,95}$ non significative
Bande protéique n° 3	3,06	$f > F_{0,95}$ significative
Bande protéique n° 4	6,31	$f > F_{0,999}$ très hautement significative
Bande protéique n° 5	9,80	$f > F_{0,999}$ très hautement significative
Bande protéique n° 6	3,83	$f > F_{0,95}$ significative
Bande protéique n° 7	5,57	$f > F_{0,99}$ hautement significative
RAPPORT d5/d2	7,56	$f > F_{0,999}$ très hautement significative

Tableau 3. Analyse de la variance à un seul critère de classification.

Comme le montre le tableau 3, l'analyse de la variance à un seul critère de classification nous permet de dire pour les quatre lots que les bandes protéiques n° 1, 4 et 5 ainsi que le rapport d5/d2 sont hétérogènes avec une probabilité de 99,9%. Alors que la bande protéique n° 7 est hétérogène avec une probabilité de 99%, les bandes n° 3 et 6 le sont seulement avec une probabilité de 95 %. La fraction protéique n° 2 semble être homogène ce qui confirme nos observations précédentes.

D'une manière générale, pour les quatre lots, la fraction protéique n°2 est pratiquement invariable ce qui suggère, un haut degré d'homologie à ce niveau pour l'ensemble des échantillons étudiés.

3. CONCLUSION

Les différences quantitatives observées au niveau de toutes les fractions protéiques, exception faite pour la bande 2, suggèrent que les lots de sardines étudiés possèdent chacun un potentiel génétique dont l'homologie à haut degré ne se ferait sentir qu'au niveau de l'expression de la fraction protéique 2. Il est important de noter que la variation quantitative des fractions protéiques peut être considérée comme un critère génétique permettant de contrôler ou d'identifier des populations séparées (15).

L'analyse statistique que nous avons effectuée, même si la représentativité de l'échantillon d'Al-Hocefma (lot considéré comme témoin) est un peu faible, nous montre que les lots, issus de zones de pêche géographiquement et surtout écologiquement distinctes, sont différents.

Considérant uniquement les bancs de sardines vivant dans l'Atlantique du Maroc, nous pouvons dire qu'il y aurait, au moins, trois populations distinctes. A l'heure actuelle, aucune étude n'a été faite sur l'aire biologique de ces populations avec éventuellement les aires d'interpénétrations.

Certes, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide nous a permis d'observer, à travers les différences significatives notées au niveau des fractions protéiques 1, 3, 4, 5, 6 et 7 et du rapport d_5/d_2 , une variabilité due au potentiel génétique. Cette méthode, qui a l'avantage d'être simple, relativement peu coûteuse, inventoriale (les gels peuvent se conserver plusieurs années), ... est de plus en plus utilisée comme moyen de contrôle comme par exemple l'analyse des protéines du fromage (16), la détection des viandes de cheval, boeuf, veau, mouton, porc (17) et la détection du soja et du lait dans les produits de viande (18).

Toutefois, malgré tout cela, la méthode a des limites. Aussi, pour des études plus approfondies de différenciation et de classification des protéines, l'électrofocalisation sur gel de polyacrylamide semble donner d'excellents résultats pour détecter les caractères génétiques de variétés de raisin (19, 20) de pomme de terre (21) et d'autres fruits ou légumes (22).

Malheureusement le facteur limitant de cette technique à haute résolution reste le coût élevé des ampholytes qui constituent le gradient de pH. L'électrofocalisation peut être associée à des techniques d'immunochimie (23, 24, 25). Cette méthode est d'une sensibilité extrême mais elle cumule les difficultés à la fois de la sérologie et de l'électrofocalisation.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. FURNESTIN (J) (1950)
Etude comparative de quelques caractères métriques des sardines du Golfe de Gascogne et du Maroc.
Mem. Off. Pêches Marit. Ser. Sp. 14, 37 - 42
2. MUZINIC (R.) (1966)
Mortalité initiale de la sardine dans les conditions expérimentales et mortalité due au marquage
Stud. Rev. Pen. Fish. Conn. Médit., 31, 1 - 12
3. GULLAND (J.A.) (1969)
Manuel des méthodes d'évaluation des stocks d'animaux aquatiques
1ère partie : analyse des populations
Manuel FAO de Science Halieutique 4, F.R.S./M4, 106 - 108
4. JOHANNESSON (K.), L. VILLEGAS et M. LAMBOEUF (1975)
Estimation acoustique quantitative de l'importance et de la distribution des ressources sardinières de la côte atlantique au Maroc.
Trav. et Doc., Projet PNUD/FAO/pour le développement de la pêche maritime
15, 4 - 10
5. BIAZ (R.) (1976)
Essai d'identification des populations de sardines de l'atlantique marocain par électrophorèse sur le noyau du cristallin
Thèse pour le Doctorat Vétérinaire
Institut Agronomique et Vétérinaire HASSAN II. Rabat.

6. FORD (E.B.), (1965)
Genetic polymorphism, Faber and Faber ed., London
7. LAMOTTE (M) (1974)
Le Polymorphisme dans le règne animal.
mémoire de la Société Zoologique de France n° 37 PARIS
8. LUCOTTE (G.) (1977)
Le Polymorphisme biochimique et les facteurs de son maintien
Masson, Paris.
9. SMITH (A.C.) and (R.A.) GOLDSTEIN, (1967)
Variations in protein composition of the eye lens nucleics in ocean
whitefish, *Cautolatilus princeps*,
Comp. Biochem. Physiol. Pergamon Press Great Britain 23, 533 - 539
10. BONNET (M) et P. PICHOT (1970)
Etude comparative par électrophorèse de *Scomber Scombus* et *Scomber Colas*
Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 34 (1), 73-80
11. ETTALIBI (M) (1975)
Contribution à l'étude de la purification de l' α -amylase pancréatique
de mouton et à l'étude de quelques propriétés moléculaires de l'enzyme
Diplôme d'Etudes Supérieures (Doctorat de 3ème cycle de Biochimie)
Faculté des Sciences - Université Mohammed V, RABAT.
12. LOWRY (OH), N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951)
Protein measurement with the folin Phenol reagent
J. Biol. Chem., 193, 265 - 275
13. FINE (J.M.), et C. ROPATZ (1968)
Techniques d'électrophorèse de zones : Application à l'étude des
protéines sériques - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
Editions de la Tourelle 94, St. Mandé
14. DAGNELIE P. (1970)
Théories et méthodes statistiques : analyse de la variance à deux
critères de classification
Editions J. DUCULOT, GEMBLOUX 2,
15. ECKROAT (L.R.) and WRIGHT (J.E.) (1969)
Genetic analysis of soluble lens protein polymorphism in brook trout,
Salvelinus fontinalis
C.N.R.S. 271 781, 466 - 473
16. JOURNAL OFFICIEL (France) du 4/8/(1972) p 8407-8408
Méthode officielle d'analyse du fromage de chèvre
17. DESCHREIDER (A.R.) et R. MEAUX (1974)
Détection des viandes de cheval, boeuf, veau, mouton, porc.
Industries Agricoles et Alimentaires, Fev. 101-106
18. FROUIN (A), C. BARRAUD et J. JONDEAU, (1973)
Détection du soja et du lait dans les produits de viande
Annales de falsification et de l'expertise chimique, Juin-Juillet
Août, 214-222.
19. CORG (A), (1973)
Anwendung der disk-elektrophorese und der isoelektrischen Fokussie-
rung in Polyacrylamid -gelen zur charakterisierung pflanslicher Protein
und enzyme und deren beeinflussung durch genstisch und ökologische factoren
Diss. TU München.

20. DRAWERT (F) und A. CORG (1974)
Über die elektrophoretische differenzierung und Klassifizierung von Proteinen. III Disk-elektrophorese und isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid-gelen von Proteinen und enzyemen austraben verschiedener rebeorten
Z. Lebensm. Unters. - Forsch, 154, 328-338.
21. KAISER (K.P.), L.C. BRUEN and H.D. BELITZ (1974)
Protease inhibitors in potatoes. Protein, Trypsin-and chymotrypsin inhibitor patterns by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. A rapid method for identification of potato-varieties.
Z. Lebensm. Unters-Forsh, 154, 339-347.
22. DRAWERT (F) und A. CORG (1975)
Über die elektrophoresische differenzierung von Proteinen. VI. Disk elektrophorese und isoelektrische Fokussierung in polyacrylamid-gelen von proteinen und enzymer. aus Tomaten. Gurken, Zuchermals und Zwiebeln
Z. Lebensm. Unters. - Forsch, 159, 23-30
23. BOURS (J.) (1974)
Isoelectric focusing and immunochemistry of lens crystallins
Documenta opthalmologica 37, 1, 1-46
24. BOURS (J) and M. RABAEY (1975)
Isoelectric focusing and immunochemistry of Bovine lens crystallins
Exp. eye. Res. 20, 2, 180, 180-181
25. BOURS (J), (1975)
Isoelectric focusing and immunochemistry of lens crystallins
Diss Abstr. int. B 36, 1-38.