

Double approche liée à l'intégrité de la mitochondrie et au dosage des enzymes mitochondriales afin de différencier les filets de poisson frais des filets de poisson congelés

Tiffanie Bouchendhomme

▶ **To cite this version:**

Tiffanie Bouchendhomme. Double approche liée à l'intégrité de la mitochondrie et au dosage des enzymes mitochondriales afin de différencier les filets de poisson frais des filets de poisson congelés. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Littoral Côte d'Opale - ULCO, 2022. Français. NNT : . tel-04062810

HAL Id: tel-04062810
https://ulco.hal.science/tel-04062810

Submitted on 7 Apr 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Mention Sciences Agronomiques et Ecologiques
Spécialité Biotechnologies Agroalimentaires, Science de l'Aliment

présentée à ***l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED STS 585)***

par

Tiffanie BOUCHENDHOMME

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

Double approche liée à l'intégrité de la mitochondrie et au dosage des enzymes mitochondriales afin de différencier les filets de poisson frais des filets de poisson congelés

Soutenue le 8 décembre 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

Rapporteurs **:**
Véronique VERREZ-BAGNIS..... Cadre de Recherches, HDR, Ifremer Nantes
Abderrahmane AIT KADDOUR..... Professeur des Universités, VetAgro Sup, Clermont-Ferrand

Examinateurs et invité :
Béatrice MORIO ..... Directrice de Recherches, INRAe, Lyon
Karine SALIN..... Cadre de Recherches, Ifremer Brest
Romdhane KAROUI (Président de jury) ..... Professeur des Universités, Université d'Artois
Anne DEVIN (membre du CSI)..... Directrice de Recherches, CNRS, Bordeaux
Thierry GRARD (directeur de thèse) ..... Professeur des Universités, ULCO
Philippe LENCEL (encadrant) ..... Maître de Conférences, ULCO
Philippe PASDOIS (invité)..... Maître de Conférences, Université de Bordeaux

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à Mme Véronique VERREZ-BAGNIS et à Mr Abderrahmane AITKADDOUR pour leur travail de rapporteurs. Merci à Mme Béatrice MORIO, Mme Karine SALIN et Mr Romdhane KAROUI pour leur travail d'examinateurs.

Je tiens également à remercier Mr Philippe MARCHETTI pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi individuel et pour ses précieux conseils.

Merci à Mme Anne DEVIN pour tous les conseils prodigués au cours de cette thèse, ainsi que pour les conseils de rédaction d'articles. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi individuel et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci à Mr Philippe PASDOIS pour toutes les astuces concernant l'utilisation de l'oxygraphe et tous les conseils apportés au fil de ces années.

Je remercie la région Hauts-de-France d'avoir financé mes travaux de thèse.

Je tiens également à remercier :

Thierry GRARD, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir donnée l'opportunité unique de réaliser ce projet de thèse et d'intégrer l'unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA) au sein de l'UMRt BioEcoAgro. Merci pour tous vos conseils. Merci aussi pour l'aide avec Zotero, je ne m'en serai pas sortie seule.

Philippe LENCEL, mon encadrant. Merci pour vos précieux conseils tout au long de ces trois années. Merci de m'avoir donnée l'opportunité de participer à cette aventure qu'est la thèse. Merci pour votre patience, votre gentillesse. Vos commentaires perspicaces m'ont poussé à aiguiser ma pensée.

Irina, merci pour ton accueil chaleureux, ta bonne humeur et ta gentillesse. Merci pour les séances de sophrologie qui m'ont beaucoup aidé. Merci pour m'avoir aidé à relativiser quand je voyais tout en noir.

Méline, merci de m'avoir soutenu pendant mes baisses de moral, mais aussi de m'avoir suivie dans mes petits moments de fatigue où mes goûts musicaux devenaient un peu bizarres (baby shark). Merci pour ton aide précieuse au cours de ces trois années.

Marie-France, merci pour votre gentillesse et votre patience à toute épreuve.

Merci aux membres de l'équipe BPA de m'avoir accueilli : Denis WATIER, Pierrette ETHUIN, Maryse BONNIN-JUSSERAND (merci pour tes conseils), Cédric LE BRIS (merci de m'avoir encouragée dans la voie de la thèse pendant mon stage de Master,2), Périne DOYEN et Roxane ROQUINY.

Nathalie JOUY, merci pour la cytométrie : cela me semble moins obscur maintenant, même si je n'ose toujours pas l'approcher.

Julia et Jérôme, nous n'avons pas passé beaucoup de temps ensemble, mais je ne vous remercierais jamais assez pour vos précieux conseils à mon arrivée en thèse. Alix, merci pour ta bonne humeur communicante.

Maureen, merci pour tous les conseils que tu m'as apportés.

Laura, Amélie (merci pour les conseils sur les romans fantastiques), Viktorija, Federica, mes co-doctorantes, nous n'avons certes pas travaillé dans le même domaine, mais c'était agréable de pouvoir partager avec des personnes dans la même situation.

Les collègues du MabLab, merci pour les bons moments passés en votre compagnie lors de cette thèse. Une pensée particulière pour toi Véro. Je n'oublierais pas les petits œufs en chocolat.

Merci aux collègues de l'Anses

Anne-Sophie, ma plus fidèle amie, sur qui j'ai toujours pu compter.

Jordan, Adélaïde, Alexandre, Anaïs, Audrey, Ludo, merci d'avoir toujours été là pour moi.

Mes parents, ma sœur, mon beau-frère qui ont toujours cru en moi et m'ont poussé à toujours aller plus loin. Merci pour votre soutien inconditionnel.

Je dédie ce travail à mes filleuls William et Loúane et mes princesses Cécilia, Maëlys, Zéline.

Valorisations

Publications scientifiques

Bouchendhomme, T., Soret, M., Grard, T. et Lencel, P. (2023) Differenting between fresh and frozen-thawed fish fillets by muscle fibre permeability measurement. *Food Control* 147, p 109567. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109567

Bouchendhomme, T., Soret, M., Devin, A., Pasdois, P., Grard, T. et Lencel, P. (2022) Differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets by mitochondrial permeability measurement. *Food Control*, p 109197. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109197

Soret, M., Bouchendhomme, T., Cleach, J., Jouy, N., Crola Da Silva, C., Devin, A., Grard, T. et Lencel, P. (2022) Measurement of fish freshness: flow cytometry analysis of isolated muscle mitochondria. *Food Chemistry* 373, p 131690. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131690

Communications orales

Bouchendhomme T., Soret M., Grard T., Lencel P. Discrimination of mitochondria extracted from fresh and frozen/thawed fillets by studying the permeabilization of mitochondrial membranes . WEFTA 17-21 octobre 2022 Rotterdam

Bouchendhomme T., Soret M., Grard T., Lencel P. Discrimination des mitochondries extraites de filets frais et de filets congelés/décongelés par étude de la perméabilisation des membranes mitochondriales. Journée des doctorants de l'UMRt BioEcoAgro, 17 mai 2022

Bouchendhomme T., Soret M., Grard T., Lencel P. Discrimination des produits frais/produits congelés/décongelés par analyse de la physiologie mitochondriale. Colloque MARCO 2021 14-15 octobre 2021

Bouchendhomme T., Soret M., Grard T., Lencel P. Discrimination des mitochondries extraites de filets frais et de filets congelés/décongelés par étude de la perméabilisation des membranes mitochondriales. SFR Campus de la mer à Boulogne sur mer, 7 juin 2021

Bouchendhomme T. Différenciation des filets de poisson frais, des filets de poissons décongelés par des marqueurs mitochondriaux Finale régionale « Ma Thèse en 180 secondes », Arras, 24 mars 2021

Communication écrite

Bouchendhomme T., Soret M., Grard T., Lencel P. « Discrimination des filets frais des filets congelés/décongelés par étude de la perméabilisation des membranes mitochondriales » XIe Colloque MeetOchondrie Lège Cap-Ferret 8-11 mai 2022

Table des matières

Remerciements 3
Valorisations 5
Liste des figures 13
Liste des tableaux 14
Liste des abréviations 15
Introduction 17
Etude bibliographique 23
I. Situation de la pêche 25
1. Etat des lieux des stocks de poisson 25
2. Développement de l'aquaculture 26
3. Production pour la consommation humaine 28
4. Importations et exportations 29
5. Règlementation sur la durabilité 31
6. Suivi et traçabilité des poissons 32
7. Bilan du chapitre I 32
II. Poisson frais : définition et méthodes de conservation 33
1. Définition du poisson frais 33
2. Méthodes de conservation 33
3. Bilan du chapitre II 39
III. Le rôle important de la congélation 39
1. Les avantages de la congélation 40
2. Les effets de la congélation sur le muscle 41
3. Différents types de congélation 42
4. Méthodes de décongélation 49
5. Effet de la décongélation sur les tissus 52
6. Usage frauduleux de la congélation 52
7. Bilan du chapitre III 53
IV. Trois espèces de poisson utilisées comme modèles d'étude 53
1. D'origine benthique ou pélagique 53
2. Description biologique 56
3. Cycle de vie 58
4. Comparaison entre l'élevage et l'aquaculture 62
5. Bilan du chapitre IV 63

V. Méthodes de détermination de la fraîcheur et de différenciation frais/décongelé déjà existantes 64
1. Analyses sensorielles 64
2. Analyses physico-chimiques, microbiologiques 65
3. Méthodes spectroscopiques 71
4. Bilan du chapitre V 75
VI. Description du tissu musculaire 75
1. Description de la fibre musculaire 76
2. Cas du poisson 77
3. Evolution post-mortem 81
4. Bilan du chapitre VI 82
VII. La mitochondrie : un organite incontournable 83
1. Origine et description de la mitochondrie 83
2. Les complexes de la chaine respiratoire 84
3. Transporteurs des substrats 86
4. Approche du potentiel mitochondrial 88
5. Calcium et mitochondries 91
6. Bilan du chapitre VII 94
VIII. Perméabilisation mitochondriale 95
1. Perméabilisation physiologique 95
2. Perméabilisation chimique 99
3. Perméabilisation par la congélation 101
4. Bilan du chapitre VIII 102
Matériels et méthodes 105
I. Matériel biologique 107
1. La daurade royale *(Sparus aurata)* 107
2. Le bar commun (Dicentrarchus labrax) 107
3. La truite saumonée (*Onchorrynchus mykiss*) 107
II. Réactifs chimiques 107
III. Protocole d'extraction 108
1. Micro-extraction 108
2. Macro-extraction 110
IV. Préparation des fibres 111
V. Dosage des protéines mitochondriales 111
VI. Analyse microscopique 112
VII. Calcul du rapport du contrôle respiratoire 112

VIII. Analyse cytométrique 112
1. Suivi du potentiel membranaire 112
2. Suivi de l'accumulation de calcium 113
IX. Analyse spectrophotométrique 114
1. Analyses sur mitochondries isolées 114
2. Analyses sur fibres 114
X. Analyse oxygraphique 115
1. Analyses sur mitochondries isolées 115
2. Analyses sur fibres 116
XI. Calcul des seuils de discrimination 116
XII. Analyses statistiques 117
1. Analyses statistiques pour l'article 1 117
2. Analyses statistiques pour l'article 2 117
3. Analyses statistiques pour l'article 3 117
Résultats 119
I. Evaluation de la qualité des produits aquatiques par cytométrie de flux 121
Article 1 125
Informations complémentaires sur l'article 1 155
II. Discrimination frais/décongelé à l'aide de mitochondries isolées de tissu rouge 159
Article 2 163
Informations complémentaires sur l'article 2 185
III. Discrimination frais/décongelé sur fibres de tissu rouge 189
Article 3 191
Informations complémentaires sur l'article 3 213
Conclusion et Perspectives 215
Bibliographie 221
Résumé 245
Abstract 247

Liste des figures

Figure 1 : Evolution de la situation des stocks de poisson au niveau mondial (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020) 27
Figure 2 : Etat écologique des populations exploitées en France en 2019 (en pourcentage) (IFREMER, 2020)..... 28
Figure 3 : Schéma de la production halieutique et aquacole mondiale (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020)..... 29
Figure 4 : Valeur des importations et des exportations par catégories de produits (FRANCE AGRIMER, 2022a)..... 31
Figure 5 : Les différentes formes de revente des produits halieutiques (en pourcentage) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2022) 32
Figure 6 : énergie et composition en glace dans un filet de poisson (MAGNUSSEN et al., 2008)..... 45
Figure 7 : Schéma d'un congélateur à tunnel (DEMPSEY & BANSAL, 2010)..... 48
Figure 8 : Schéma d'un congélateur à lit fluidisé (DEMPSEY & BANSAL, 2010)..... 49
Figure 9 : schéma de la congélation par froid cryogénique 49
Figure 10 : Schéma montrant les différentes strates de la colonne d'eau (source : Ifremer) 57
Figure 11 : Daurade royale (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009a)..... 59
Figure 12 : Bar européen (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009b)..... 59
Figure 13 : Truite arc-en-ciel (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009c) 60
Figure 14 : Cycle de production en système extensif (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009a) 62
Figure 15 : Cycle de production en système intensif (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009a) 62
Figure 16 : cycle de production de la truite arc-en-ciel (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009c)..... 63
Figure 17 : Système d'évaluation de la qualité pour le saumon (IFREMER, 2009a)..... 67
Figure 18 : Schéma de la méthode permettant le dosage des ABVT (IFREMER, 2008a)..... 68
Figure 19 : Gel d'électrophorèse A : filet frais, B : filet décongelé (1,2 : parvalbumine) (ETHUIN et al., 2015)..... 72
Figure 20 : Histogramme montrant la quantité de transgéline détectée dans les filets frais et les filets décongelés (GUGLIELMETTI et al., 2018) 73
Figure 21 : Principe de la spectroscopie NIR (2016)..... 73
Figure 22 : Spectre de réflectance d'un filet frais et d'un filet décongelé de chinchard (UDDIN & OKAZAKI, 2004)..... 74
Figure 23 : Spectre de fluorescence du NADH pour les filets frais et les filets décongelés de Merlan (KAROUI et al., 2006)..... 75
Figure 24 : Spectre Raman de filets frais et décongelés de maquereau (ZHANG et al., 2020)..... 76
Figure 25 : Concentration de l'aspartate, du fumarate et de la phénylalanine (gris : filet frais ; noir : filet décongelé)..... 77
Figure 26 : Schéma de l'organisation structurelle d'une fibre musculaire (source : pour la science N°276 octobre 2000) 78
Figure 27 : Schéma de l'organisation d'un sarcomère (LISTRAT et al., 2016) 79
Figure 28 : Coupe transversale d'un filet de poisson montrant l'organisation des différents types musculaires (KIESSLING et al., 2006)..... 79
Figure 29 : Représentation d'un filet de poisson en coupe longitudinale (LISTRAT et al., 2016)..... 81
Figure 30 : Schéma représentant la mitochondrie..... 85
Figure 31 : Schéma de la chaine respiratoire mitochondriale..... 86
Figure 32 : Schéma du transporteur malate/aspartate (BORST, 2020) 88

Figure 33 : Schéma du transporteur glycérol phosphate (SHEN et al., 2006) 89
Figure 34 : Schéma du gradient de protons 91
Figure 35 : Structure chimique de la Rhodamine 123 (PUBCHEM, 2022a) 91
Figure 36 : Structure chimique du TMRM (PUBCHEM, 2022b) 92
Figure 37 : Structure chimique du CCCP (PLASEK et al., 2017) 93
Figure 38 : Mode d'action du CCCP (PLASEK et al., 2017) 93
Figure 39 : effet du calcium sur la mitochondrie (BROOKES et al., 2004) 94
Figure 40 : Transporteurs et canaux calciques majoritaires de la mitochondrie (HAYASHI et al., 2009) 95
Figure 41 : Modélisation du fonctionnement de la sonde calcéine AM 96
Figure 42 : modélisation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (RENAULT & MANON, 2011) 98
Figure 43 : Modélisation de la structure des pores de transition (KIM et al., 2003) 100
Figure 44 : Schéma du rôle des MPTP dans l'apoptose et la nécrose (LEMASTERS, 1999) 100
Figure 45 : Schéma de la perméabilisation par la saponine et la digitonine A : avant utilisation de la saponine B : après utilisation de la saponine (DUICU et al., 2012) 101
Figure 46 : Modélisation du pore formé par l'alaméthicine (DAS & BALARAM, 1984) 103
Figure 47 : Schéma montrant l'impact des cristaux de glace sur les membranes plasmiques d'après (SCUDELLARI, 2013) 104
Figure 48 : Schéma explicatif des différentes étapes de la micro-extraction 111
Figure 49 : Schéma des différentes étapes de la macro-extraction 113
Figure 50 : comparaison de la taille structure de mitochondries isolées d'un filet frais et de mitochondries isolées d'un filet décongelé 157
Figure 51 : Intégration de la calcéine par les mitochondries isolées de daurade royale (Sparus aurata) à différents temps de conservation 158
Figure 52 : Histogramme de la vitesse de consommation du NADH par les mitochondries isolées de truite arc-en-ciel 187
Figure 53 : Histogramme de la vitesse de consommation d'oxygène pour des mitochondries isolées de truite arc-en-ciel 188

Liste des tableaux

Tableau 1 : consommation française de produits aquatiques (en kg de poids vif par an et par habitant (FRANCE AGRIMER, 2021) 30
Tableau 2 : Principales espèces consommées en France (en tonnes d'achats) (FRANCE AGRIMER, 2021) 33
Tableau 3 : Effet de la congélation sur le poisson (MAZROUH, 2015) 44
Tableau 4 : Récapitulatif des différentes caractéristiques de plusieurs méthodes de congélation (DEMPSEY & BANSAL, 2010) 51
Tableau 5 : Consommation française des principales espèces pêchées de poisson par habitant (FRANCE AGRIMER, 2020) 56
Tableau 6 : Tableau comparatif de la pression en oxygène (adapté SOLDATOV, 2018a) 57
Tableau 7 : Tableau comparatif entre la daurade royale et la daurade d'élevage (GRIGORAKIS et al., 2002) 65
Tableau 8 : Valeur seuil déterminant l'état de fraîcheur des poissons (IFREMER, 2008a) 68
Tableau 9 : concentration en tissu adipeux en fonction du cycle reproductif (WEIL et al., 2013) 82

Liste des abréviations

ABVT : Azote basique volatil total

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AIF : Apoptosis inducing factor

AMP : Adénosine monophosphate

ANT : Adénine nucleotide translocator

ATP : Adénosine triphosphate

Calcéine AM : Calcéine ester acétoxyméthyle

CCCP : Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone

CsA : Cyclosporine A

CS : Citrate synthase

CTC : 5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride

CypD : Cyclophiline D

DMA : Diméthylamines

DMSO : Diméthyl-sulfoxide

ER : Endoplasmic reticulum

FAO : Food and agriculture organization (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

GC-MS : Gas chromatography-mass spectrometry (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)

HADH : β-hydroxyl-CoA-déshydrogénase

HPLC : High performance liquid chromatography (chromatographie en phase liquid à haute performance)

IMP : Inosine 5'-monophosphate

LDH : Lactate déshydrogénase

MAM : Mitochondria associated ER membrane

MTT : Thiazolyl blue tetrazolium bromide

NADH : β Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NAO : Nonyl acridine orange

NIR : Near infrared spectroscopy

ONG : Organisation non gouvernementale

OTMA : Oxyde de triméthylamines

PCP : Politique européenne commune de la pêche

pH : Potentiel hydrogène

PK : Pyruvate kinase

QIM : Quality index method (méthode de l'indice qualité)

Rh 123 : Rhodamine 123

Rpm : Rotation par minute

ROS : Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)

SALTO : Système automatisé en ligne de traçabilité pour les opérateurs

TBARS : Acide 2-thiobarbiturique

TMA : Triméthylamines

TMRM : Tétraméthylrhodamine méthyl ester

UE : Union Européenne

UQ : Ubiquinone

VDAC : Voltage dependant anion channel

VIS : Visible spectroscopy

Introduction

La consommation de produits aquatiques n'a cessé de croitre ces dernières années. La croissance annuelle est de 3,1 % depuis 1961. La consommation par habitant est passée de 9,1 kg en 1961 à 20,5 kg en 2018. Les produits aquatiques sont devenus des denrées très recherchées pour leurs qualités nutritionnelles. La consommation grandissante mais également le changement des conditions climatiques ont eu pour impact un appauvrissement des stocks de poisson. Les pêcheurs ont donc été obligés de trouver des nouveaux lieux de pêche, ce qui a conduit à un éloignement de leurs bateaux. De ce fait, différentes solutions ont été mises en place. Un aménagement de zones de protection au large du littoral et l'aquaculture se sont développés. Cependant, l'aquaculture ne permet pas d'élever toutes les espèces de poisson, ce qui rend l'utilisation de la pêche traditionnelle inévitable. La mise en place de directives permettant l'encadrement de la pêche a également permis de soulager les tensions liées à cette activité. Une des conséquences observables de l'éloignement des sites de pêche a été l'allongement du temps de transport mais aussi du temps en mer. Il a donc fallu trouver des nouvelles méthodes de conservation. La congélation a notamment été utilisée. La congélation permet au poisson de conserver ses qualités nutritionnelles. Mais elle a aussi un impact négatif sur la qualité du filet de poisson. Elle va induire l'apparition de cristaux de glace au niveau cellulaire. Ces cristaux ont pour effet une altération des membranes cellulaires et mitochondriales avec la création de pores au niveau de ces membranes. La congélation altère les fibres musculaires en dénaturant les protéines composant ces fibres. De nombreuses études ont été réalisées pour discriminer le frais du décongelé en utilisant notamment les taux d'enzymes. Cependant, les résultats diffèrent d'une espèce de poisson à l'autre, du fait qu'il s'agisse de poissons sauvages ou d'élevage, de la façon dont celui-ci a été tué et de la façon dont il a été conservé.

Dans ce travail, il a été décidé de se focaliser sur un organite important de la cellule : la mitochondrie. Les mitochondries interviennent dans de nombreux phénomènes physiologiques. Elles sont le siège du cycle de Krebs et sont les productrices d'énergie de la cellule. Elles peuvent également être responsables de nombreuses maladies. Les mitochondries ont déjà prouvé leur intérêt en tant que marqueur de fraîcheur notamment avec le suivi de la perte de potentiel membranaire par spectrofluorimétrie.

C'est dans ce contexte qu'intervient cette thèse dont le but consiste à discriminer les poissons frais des poissons ayant subi un stade de congélation/décongélation en se basant sur la perméabilité membranaire mitochondriale.

Une étude bibliographique composera la première partie de ce manuscrit. Celle-ci sera déclinée en huit chapitres. Le second chapitre aura pour but de donner une définition de ce qu'est un poisson frais et présentera les différentes méthodes de conservation. Le troisième chapitre se concentrera sur les différentes méthodes de congélation. Le quatrième chapitre permettra de présenter les espèces utilisées lors de cette thèse. Le cinquième chapitre présentera les méthodes de différenciation déjà existantes. Le sixième chapitre présentera quant à lui le tissu musculaire. Le septième chapitre aura pour but de présenter la mitochondrie. Enfin, le dernier chapitre présentera les différentes méthodes de perméabilisation mitochondriale.

Pour les besoins des deux premières études que nous avons menées, des mitochondries isolées de daurade royale (*Sparus aurata*) ont été utilisées. Celles-ci ont été obtenues à l'aide d'un protocole d'extraction mis en place précédemment. Cependant, l'utilisation de mitochondries isolées peut induire un biais expérimental. En effet, le protocole peut engendrer une rupture temporaire des membranes mitochondriales induisant la perte de composants internes. C'est pour cette raison que la dernière étude s'est focalisée sur la perméabilité mitochondriale impliquant des fibres rouges de bar (*Dicentrarchus labrax*) non perméabilisées.

Dans ce manuscrit, une étude sur le suivi de la fraîcheur du poisson sera présentée. Les mesures ont été effectuées par cytométrie en flux. Ainsi, grâce à des sondes appropriées, il a été possible de suivre l'évolution du potentiel membranaire sur une période de sept jours. Cette étude a permis de montrer une perte du potentiel au cours du temps et de déterminer trois stades de fraîcheur : l'ultra fraîcheur de J0 à J2, un stade de fraîcheur intermédiaire de J3 à J5 et à partir de J6, une fraîcheur avancée. Cette technique ne permet cependant pas de discriminer le poisson frais du poisson décongelé.

Une seconde étude utilisant la perméabilité membranaire des mitochondries a été réalisée. Les mitochondries ont été extraites du tissu rouge, ce tissu contenant une quantité importante de mitochondries. Des mitochondries issues d'un filet ne présentent pas d'altération au

niveau des membranes interne et externe. Pour vérifier cela, le NADH, qui est un substrat du complexe I de la chaine respiratoire, a été utilisé. Pour être consommé, celui-ci doit traverser la membrane interne. Un perméabilisant a aussi été utilisé. Il a permis de déterminer l'activité maximale du complexe I lors d'analyses spectrophotométriques et oxygraphiques. Le protocole d'extraction apporte cependant un biais dans les analyses, puisque d'une part uniquement les mitochondries en bon état ont été récupérées et d'autre part, ce protocole semble induire des changements morphologiques et des pertes de certains composés comme le cytochrome c.

C'est dans ce cadre qu'intervient la dernière étude. Dans ce cas, des fibres ont été directement utilisées pour éviter les biais expérimentaux éventuels dus à l'extraction des mitochondries. Selon le même principe que précédemment, un substrat a été apporté pour évaluer la perméabilité membranaire des mitochondries. Pour ces différentes expérimentations, une très faible quantité de fibres de poisson a été nécessaire.

La dernière partie de ce manuscrit constituera une conclusion générale sur les travaux effectués pendant cette thèse ainsi qu'une présentation des perspectives.

Etude bibliographique

I. Situation de la pêche

1. Etat des lieux des stocks de poisson

La consommation de poisson est devenue une alternative à la consommation de viande. En effet, cette consommation représente 17 % de l'apport en protéines pour la population mondiale. Dans les pays en voie de développement, cet apport peut atteindre 50 %. C'est le cas notamment au Bangladesh et au Ghana. Cependant, cette augmentation de la consommation a eu pour conséquence un appauvrissement des stocks. Les stocks de poisson se situant à un niveau biologiquement durable sont passés de 90 % en 1974 à 65,8% en 2017. En 1974, 10% des poissons pêchés provenaient de stocks non durables. En 2017, la pêche en stocks non durables représentait 34 % des poissons pêchés. Les poissons débarqués proviennent de stocks exploités à un niveau biologiquement durable à hauteur de 78,7 % : Figure 1 ci-dessous.

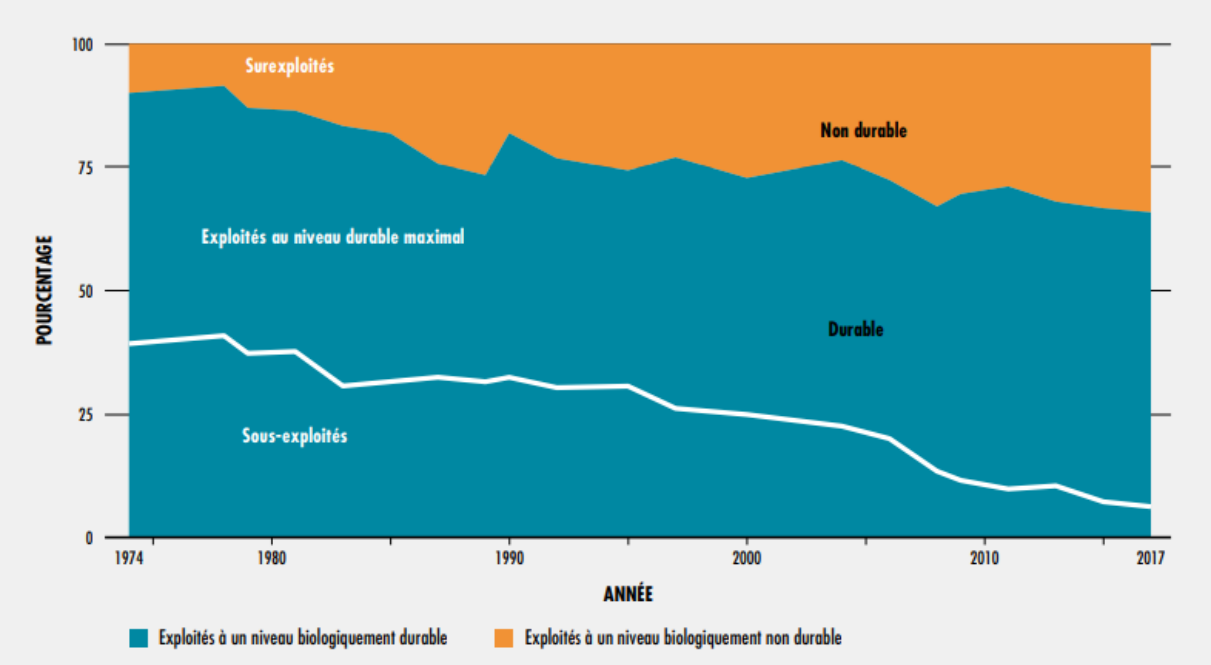


Figure 1 : Evolution de la situation des stocks de poisson au niveau mondial (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020)

Il est possible de distinguer deux types de captures, les captures en eaux continentales et les captures en eaux marines. Les eaux continentales sont les eaux de surface. Ce sont des eaux douces se situant à l'intérieur des terres alors que les eaux marines représentent les eaux côtières, les mers. La production par la pêche en eaux continentales représente 12 millions de tonnes de poisson en 2018, tandis que la pêche en eaux marines représente 84,4 millions de

tonnes de poisson (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020). L'épuisement des stocks de poisson a provoqué un éloignement des sites de pêche (DEME & THIAO, 2021). La création des zones de sauvegarde des espèces marines a induit un regroupement des espèces autour de ces zones. En conséquence, les pêcheurs se sont rapprochés en pêchant autour de ces zones. Cependant, cela a eu pour conséquence d'avoir éloigné les pécheurs des côtes. Il a donc fallu faire des aménagements sur les bateaux de pêche, ce qui a causé des frais supplémentaires pour les pêcheurs. En plus de ces frais, cela a entrainé un allongement des périodes en mer. Ces temps plus longs nécessitent des adaptations au niveau de la conservation des poissons notamment la mise en place de système de congélation pour augmenter la durée de vie des produits aquatiques (SADOVY *et al.*, 2003)

2. Développement de l'aquaculture

Les stocks sauvages de poisson sont soumis à la pression de la pêche. Ainsi, en 2019 un état des lieux a mis en évidence que 23 % des poissons pêchés provenaient d'une population en surpêche, ce qui signifie que la pression de la pêche peut conduire à une baisse de la population. 3 % des poissons proviennent de populations surpêchées et dégradées, ce qui signifie qu'il y a une baisse au niveau de la biomasse des reproducteurs, ce qui a pour impact une baisse de la population. Enfin 2 % des poissons proviennent de populations effondrées, ce qui signifie que la biomasse de reproducteurs ne permet pas de renouveler la population (IFREMER, 2020) : Figure 2 ci-dessous.

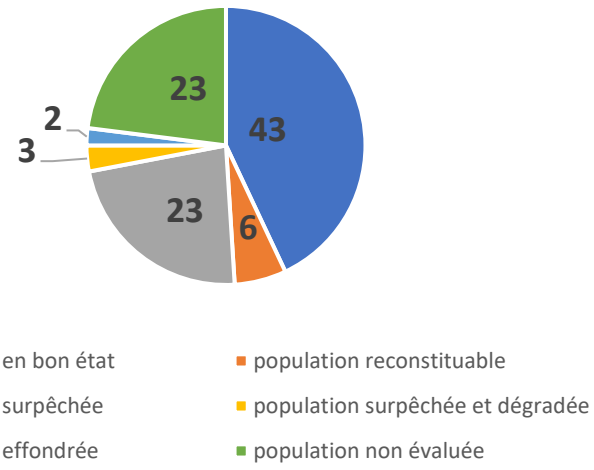


Figure 2 : Etat écologique des populations exploitées en France en 2019 (en pourcentage) (IFREMER, 2020)

Ainsi, la mise en place de l'aquaculture contribue à la préservation des stocks de poissons sauvages. L'aquaculture a également été mise en place réduire les coûts liés à la pêche. En effet, l'affaiblissement des stocks a contraint les pêcheurs à chercher d'autres points de pêche, ce qui a entrainé un éloignement des bateaux de pêche. L'éloignement pose plusieurs problèmes puisqu'il faut trouver un moyen de conserver le poisson pour le garder frais le trajet prenant parfois plusieurs jours. L'aquaculture ne concerne pas toutes les espèces de poisson, ce sont surtout des poissons d'eau douce tels que le tilapia (*Oreochromis niloticus*) ou la carpe commune (*Cyprinus carpio*)). Pour les poissons d'eau de mer, ce sont surtout des élevages de saumon (*Salmo salar*) voire de bar (*Dicentrarchus labrax*) ou de daurade royale (*Sparus aurata*).

Cette filière a permis de produire 82,1 millions de tonnes de poisson en 2018 dont 51,3 millions de tonnes en eaux continentales et 30,8 millions en eaux marines (Figure 3 ci-dessous).

L'aquaculture nécessite une réglementation pour rendre cette production responsable. (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2011).

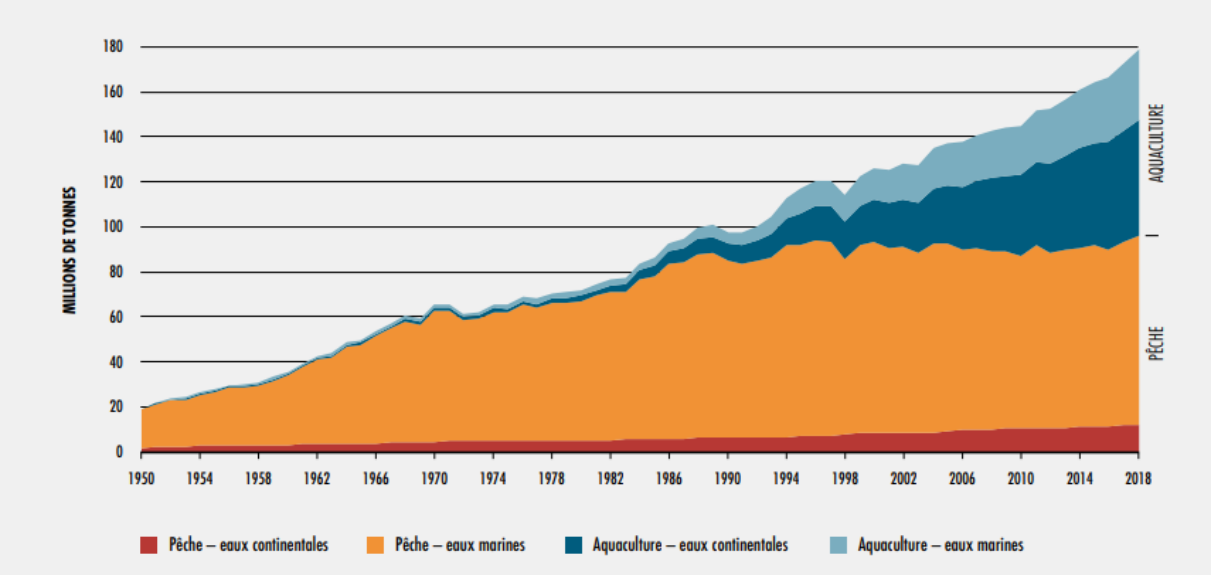


Figure 3 : Schéma de la production halieutique et aquacole mondiale (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020)

L'aquaculture est un terme générique qui englobe la pisciculture et la conchyliculture (FRANCE AGRIMER, 2022a). On peut distinguer deux types d'aquaculture : la première nécessitant une alimentation d'appoint, la seconde s'effectuant sans apport de nourriture. L'aquaculture avec alimentation d'appoint est devenue le mode d'aquaculture majoritaire. Le principal continent d'aquaculture est l'Asie en produisant 89 % du total mondial sur les vingt dernières années.

Des bassins d'aquaculture sont également présents en France. La filière a permis de produire 194 000 tonnes dont 36 000 tonnes de salmonidés en 2019.

3. Production pour la consommation humaine

En 2018, la production mondiale de poisson a atteint 179 millions de tonnes dont 156 millions étaient destinées à l'alimentation humaine. L'aquaculture a participé à cette production à hauteur de 46 %. En 2018, 52 % de la consommation mondiale de poisson provenait de l'aquaculture. En 2030, cette consommation devrait attendre 59 %. L'aquaculture constituera ainsi la source principale d'apport de poisson. La plus grande partie des produits commercialisée consiste en du poisson vivant, frais ou réfrigéré. Cela représente environ 44 % du marché. C'est sous cette forme que le poisson est le plus recherché mais également le plus cher. Cependant, le poisson frais a une durée de vie limitée. C'est pour cela qu'il peut être vendu sous d'autres formes, notamment congelée ou décongelée. La forme congelée du poisson représente d'ailleurs 35 % du marché (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020).

En 2018, il a été estimé que la consommation de produits aquatiques par habitant était de 20,5 kg en moyenne. Cette consommation était estimée à 33,3 kg par habitant en France dont 23,9 kg de poisson (Tableau 1 ci-dessous), faisant de la France le 4ème consommateur européen (FRANCEAGRIMER, 2022).

Tableau 1 : consommation française de produits aquatiques (en kg de poids vif par an et par habitant (FRANCE AGRIMER, 2021)

	Population (milliers d'hab.)	TOUS PRODUITS AQUATIQUES	POISSONS	COQUILLAGES, CRUSTACÉS ET CÉPHALOPODES
1999	60 123	28,7	19,1	9,7
2000	60 508	30,0	20,1	9,9
2001	60 941	31,0	21,1	9,8
2002	61 385	33,8	23,6	10,1
2003	61 824	34,4	24,4	10,0
2004	62 251	34,1	23,6	10,6
2005	62 731	35,7	24,4	11,3
2006	63 186	35,4	24,0	11,3
2007	63 601	35,7	24,3	11,5
2008	63 962	34,0	23,2	10,8
2009	64 305	34,0	22,6	11,4
2010	64 613	34,8	23,2	11,6
2011	64 933	35,6	24,0	11,6
2012	65 241	36,5	24,8	11,7
2013	65 562	33,3	22,9	10,4
2014	66 130	34,3	24,1	10,2
2015	66 422	34,2	23,6	10,6
2016	66 603	33,2	23,2	10,0
2017	66 774	33,7	24,0	9,7
2018	66 884	33,5	23,9	9,6

4. Importations et exportations

Les principales espèces de poisson importées sont le saumon pour 1 311 millions d'euros, le thon (*Thunnus spp.*) pour 658 millions d'euros, le cabillaud (*Gadus morhua*) pour 468 millions d'euros et le lieu noir (*Pollachius virens*) pour 287 millions d'euros. En France, les espèces principalement exportées sont le thon sous forme de conserves pour 185 millions d'euros et le saumon en particulier le saumon fumé pour 178 millions d'euros. La part congelée des importations représentent 2 155 millions d'euros contre 406 millions d'euros pour les exportations et la part fraiche des importations représentent 2 083 millions d'euros contre 608 millions d'euros pour les exportations. Le principal exportateur de poissons est la Chine suivie de la Norvège et du Vietnam. En 2020, la France a importé 2 078 milliers de tonnes de poids vifs et a exporté 586 milliers de tonnes de poids vif (FRANCE AGRIMER, 2022a) : Figure 4 ci-dessous

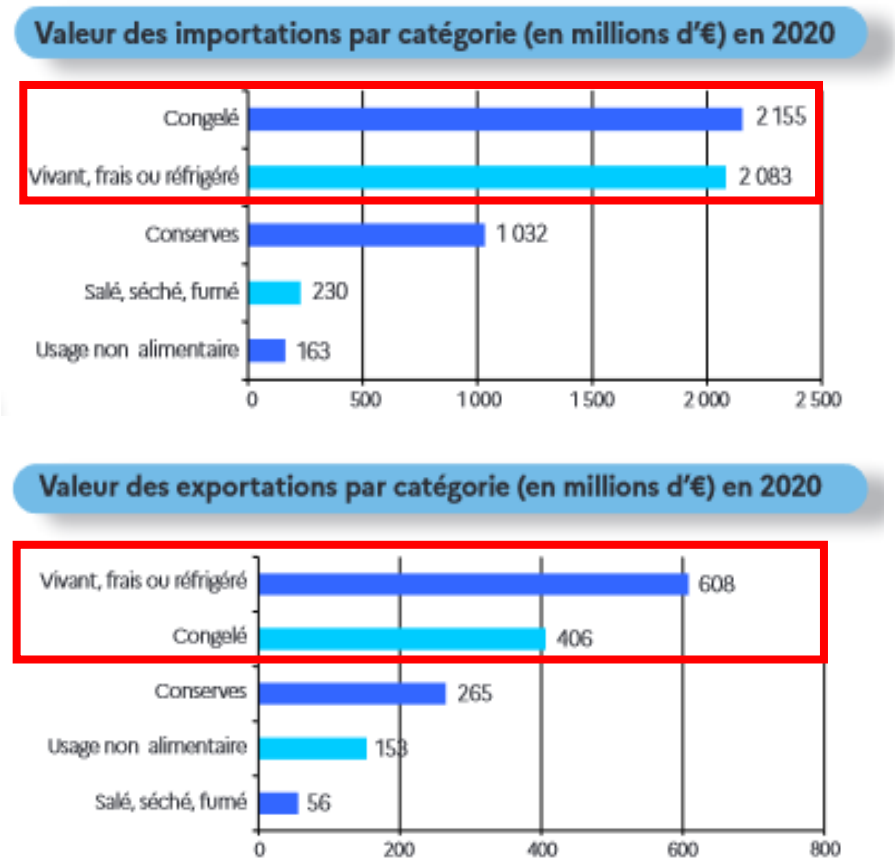


Figure 4 : Valeur des importations et des exportations par catégories de produits (FRANCE AGRIMER, 2022a)

Les produits aquatiques sont vendus sous différentes formes pour la consommation humaine (Figure 5 page 32). Les produits frais représentent la part la plus importante des produits

vendus. Ils représentent 44 % du marché. Ensuite, les produits sont vendus sous la forme congelée à hauteur de 35 %. Ces deux formes sont les plus présentes sur le marché. Deux autres formes sont également retrouvées : la mise en conserves à hauteur de 11 % et la forme salée/séchée à hauteur de 10 %. La congélation, la mise en conserves et le salage sont des méthodes de transformation du poisson. Ces procédés de transformation vont permettre de conserver plus longtemps les produits aquatiques. La congélation est la principale méthode de conservation puisqu'elle représente 63 % des produits transformés (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2022). Les principales espèces mises en conserves sont le thon (52 %), le maquereau (*Scomber scombrus*) (13 %) et la sardine (*Sardina pilchardus*) (16 %) (FRANCE AGRIMER, 2021).

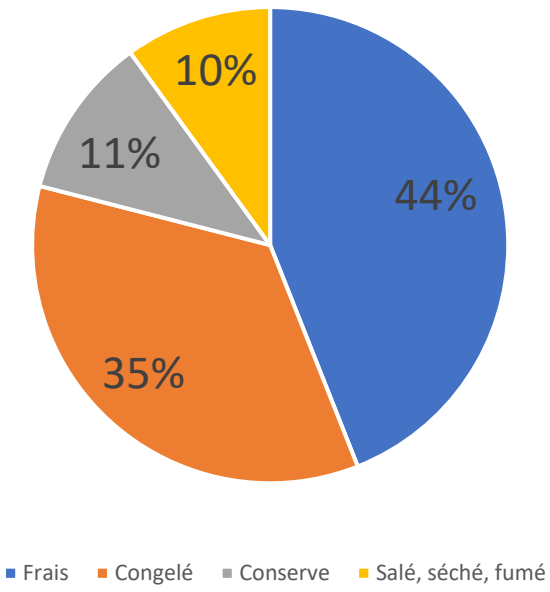


Figure 5 : Les différentes formes de revente des produits halieutiques (en pourcentage) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2022)

Les espèces les plus consommées en France sont le saumon et le cabillaud. Ces deux espèces représentent les 2/3 des poissons frais consommés. La daurade, quant à elle, est la cinquième espèce de poisson la plus consommée en France (FRANCE AGRIMER, 2021). La daurade toutes espèces confondues représentaient en 2020, 5 048 tonnes des achats sous la forme de produit frais. L'espèce étant précédée par le saumon représentant 30 962 tonnes des achats, le cabillaud avec 16472 tonnes d'achats, le lieu noir (*Pollachius virens*) avec 9 383 tonnes d'achats et la truite avec 6 053 tonnes d'achats (Tableau 2 page 33). Le saumon a connu une croissance de 24,6 % entre 2019 et 2020, la truite de 8,3 % et la daurade de 2,2 %. En revanche,

le cabillaud a connu un recul de 11,1 % et le lieu noir un recul de 6,2 % (FRANCE AGRIMER, 2021). Ce recul peut s'expliquer par un nombre de poissons moins important sur les étals mais également par la hausse du prix de ces poissons. Ainsi pour les filets de lieu noir, le prix d'achat pour les grossistes sur le marché de Rungis a connu une hausse d'environ 40 %, en août 2021 le prix au kilogramme était de 5,80 €. En juillet 2022, il a atteint 8,29 €. Le prix de revente chez les particuliers a également augmenté. Il est passé de 9,69 € en août 2021 à 12,85 € en juillet 2022, soit une augmentation d'environ 30 % du prix (FRANCEAGRIMER, 2022).

Tableau 2 : Principales espèces consommées en France (en tonnes d'achats) (FRANCE AGRIMER, 2021)

Volume (tonnes)	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**	**2020**	**%20/19**
POISSONS FRAIS	**119 735**	**119 102**	**116 611**	**115 212**	**114 424**	**118 006**	**3,1%**
Saumon	25 155	21 025	21 022	23 237	24 851	30 962	24,6%
Cabillaud	21 558	22 389	22 307	20 759	18 522	16 472	-11,1%
Lieu noir	7 236	7 448	8 534	10 228	10 007	9 383	-6,2%
Dorade	4 270	4 474	5 063	5 375	4 937	5 048	2,2%
Truite	5 397	6 048	5 845	5 331	5 587	6 053	8,3%
Baudroie (lotte)	4 302	4 937	5 683	4 465	3 720	3 563	-4,2%
Maquereau	4 909	4 453	4 287	4 098	3 871	4 195	8,4%

5. Règlementation sur la durabilité

La pêche intensive a entrainé une raréfaction de certaines espèces de poisson. Pour contrecarrer ces effets, une politique de durabilité a été mise en place. A la fin des années 80, une prise de conscience s'est effectuée au sein de la communauté internationale sur les conséquences d'une surpêche et des dommages causés à l'écosystème. De ces interrogations est né un code de conduite regroupant des principes pour une pêche responsable qui sert de référence aux pays souhaitant améliorer le cadre juridique de la pêche et de l'aquaculture. Ce code est disponible pour tous les membres de la FAO mais également aux non-membres. Son application se base sur le volontariat. Pour lutter contre la pêche illicite, un accord a été mis en place. Celui-ci prévoit d'empêcher les navires pratiquant la pêche illicite, non déclarée et non réglementée de débarquer leurs poissons dans les ports. Le suivi de l'application du code est réalisé à l'aide de questionnaires à l'attention des pays membres mais aussi à des ONG (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020). Une politique européenne commune de la pêche (PCP) a été mise en place. Cette politique permet la gestion de la pêche et des bateaux qui exploitent les produits halieutiques et a aussi permis de fixer les conditions de conservation des produits aquatiques. Un cadre juridique réglemente cette politique, il s'agit du règlement UE n°1380/2013 (MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION, 2021).

6. Suivi et traçabilité des poissons

Ainsi, les états membres de l'Union Européenne ont mis en place des directives permettant la traçabilité des produits de la pêche. Le règlement UE n°1379/2013 donne les règles applicables à l'étiquetage des produits aquatiques. Sur l'étiquette doivent être présents le nom scientifique de l'espèce, sa dénomination commerciale, s'il s'agit d'un poisson sauvage ou d'un poisson d'aquaculture, le lieu de pêche ou d'élevage et s'il a subi un stade de congélation (PARLEMENT EUROPEEN, 2013). La date de capture n'est cependant pas indiquée sur les étiquettes. Cependant, une période de capture est renseignée. Cette période est comprise entre le premier et le dernier jour de pêche. En effet, sur les bateaux de pêche, il n'est pas possible de séparer les produits par jour de pêche. En France, un outil a été mis en place pour faciliter l'application de la réglementation européenne. Il s'agit de l'outil SALTO (Système Automatisé en Ligne de Traçabilité pour les Opérateurs). Cet outil facilite la transmission des informations entre les différents acteurs de la filière.

7. Bilan du chapitre I

Toutes ces données ont mis en lumière l'importance de la pêche et de l'aquaculture pour la consommation humaine, notamment la consommation française. La consommation par an et par habitant ne fait qu'augmenter. Pour répondre à la demande, la France importe de plus en plus de poissons. La part des produits ayant été congelés progressent de plus en plus. Les produits aquatiques se présentent sous la forme de produits entiers mais également de produits filetés. Sur les produits entiers, il est possible de différencier le frais du décongelé. En revanche pour les filets, la différence est moins visible voire impossible à faire. Cela a conduit à se poser la question de la différenciation entre les produits frais et les produits décongelés. D'une part, cette différenciation est nécessaire pour s'assurer de l'authenticité du produit puisque les produits frais n'ont pas la même valeur financière que les produits décongelés. D'autre part, la congélation peut avoir un côté assainissant. Elle est, par exemple, utilisée dans l'industrie du poisson cru (sushis), pour éviter les contaminations par les parasites.

Pour comprendre comment distinguer les poissons frais des poissons décongelés, il est nécessaire de comprendre ce qu'est un poisson frais. Ainsi le prochain chapitre décrit les différentes méthodes de conservation du poisson.

II. Poisson frais : définition et méthodes de conservation

1. Définition du poisson frais

Selon la règlementation CE n°853/2004 (PARLEMENT EUROPEEN, 2004), « les produits frais de la pêche correspondent à tout produit de la pêche non transformé, entier ou préparé, y compris les produits conditionnés sous vide ou en atmosphère modifiée, qui n'a subi aucun traitement autre que la réfrigération en vue de sa conservation ». La fraîcheur du poisson peut être définie de la manière suivante : poisson ayant été fraichement péché et dont la conservation a été réalisée par refroidissement. Le poisson ne doit pas avoir été congelé. Trois états peuvent être définis pour la fraîcheur. Un état frais est obtenu après abattage, la température de l'organisme est légèrement plus basse que la température habituelle de l'animal vivant. Le second état correspond à un état pour lequel la chair est refroidie et la température au niveau du muscle n'excède pas 12°C. Cet état intervient après l'abattage. Le dernier état correspond à l'état refroidi. La chair est alors conservée entre 0°C et 4°C (LISITSYN *et al.*, 2019).

L'index qualité permet de déterminer différents niveaux de fraîcheur : très frais, frais, acceptable, limite et inacceptable. C'est un système de cotation des altérations physiques des poissons crus. Les critères d'évaluation sont visuels et olfactifs (Cf. chapitre V.1 sur la méthode QIM page 66) (GONÇALVES *et al.*, 2007).

2. Méthodes de conservation

Plusieurs méthodes de conservation physiques et chimiques existent pour permettre la conservation des filets. Ces moyens permettent de limiter la croissance bactérienne

a) Conservation par réfrigération

L'arrêté du 21 décembre 2009 fixe les températures de conservation dans les commerces et les services de restauration. Ils doivent être conservés à +2°C (MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION, 2009). Le règlement (CE) n°853/2004 fixe quant à lui la température d'entreposage et de transport, les produits de la pêche sont conservés à +3°C sur de la glace fondante (PARLEMENT EUROPEEN, 2004). La première méthode de conservation utilisée est la réfrigération. Les poissons frais représentent 44 % de la consommation des ménages français. Les principales espèces consommées sont le saumon (52 %), le cabillaud (38 %), le lieu noir (23 %), la truite (19 %) et la daurade (14 %) (FRANCE AGRIMER, 2022b). Cette technique permet

d'abaisser la température du poisson, la température de conservation est comprise entre 0°C et 4°C. Cela permet de ralentir le développement bactérien. Les microorganismes présents sur les poissons sont en phase de latence pendant leur adaptation à leur nouvel environnement. Après cette adaptation, il y aura une croissance exponentielle de la population bactérienne. Leur développement est lié à différents facteurs tels que le pH, la présence de nutriments, la température, le taux d'humidité … (DUARTE *et al.*, 2020).

Différents types de froid peuvent être utilisés pour la réfrigération commerciale : le froid statique, le froid brassé et le froid ventilé. Pour le froid statique, le froid se situe dans le bas du réfrigérateur, l'air chaud monte. Un évaporateur est présent sur le haut du réfrigérateur pour refroidir cet air chaud. Pour le froid brassé, un ventilateur est présent dans le réfrigérateur, il va répartir le froid de façon homogène. Avec le froid brassé, la circulation d'air est moins efficace que pour le froid ventilé. Pour le froid ventilé, une injection d'air froid et sec est effectuée, le refroidissement est rapide et homogène cependant cette méthode a tendance à assécher le produit.

Sur les bateaux de pêche, d'autres méthodes de refroidissement sont utilisées : la réfrigération par adsorption, le système de réfrigération à éjecteurs, la réfrigération par compression et enfin le système de réfrigération hybride. Ces méthodes permettent une réfrigération rapide mais également permettent une réduction de la consommation électrique des bateaux et une meilleure performance énergétique (WANG & WANG, 2004 ; XIANGGUO *et al.*, 2017).

Pour ce mode de conservation, plusieurs emballages peuvent être utilisés. Ces emballages ont des impacts différents sur les paramètres physiologiques du produit. Une première distinction peut être faite entre l'emballage sous vide et les emballages perméables à l'oxygène. L'utilisation d'un emballage laissant l'oxygène entrer en contact avec le produit ne permet pas une conservation longue durée de ce produit. En effet, selon (ANELICH *et al.*, 2001) ce type d'emballage ne permet pas de conserver les filets de poisson pour une durée maximale de 4 jours. Au contraire, l'utilisation de l'emballage sous-vide permet d'étendre la durée de vie à 8 jours. La mesure du nombre de colonies bactériennes montre qu'en présence d'oxygène, le produit devient impropre à la consommation humaine après seulement 6 jours de conservation contrairement à l'utilisation de l'emballage sous vide pour lequel le produit est toujours apte à la consommation à cette date. Deux autres techniques sont utilisées pour

modifier la durée de vie. Il s'agit de l'emballage sous atmosphère modifiée et de l'irradiation gamma. L'emballage sous atmosphère modifiée permet une réduction de la vitesse de la croissance bactérienne et une augmentation de la durée de vie des filets de poisson. Avec l'utilisation des radiations gamma, une réduction des colonies de bactéries mésophiles est observée et cela permet également une augmentation de la durée de vie des filets. Ces deux méthodes peuvent être associées permettant une réduction du nombre de colonies bactériennes (MONTEIRO *et al.*, 2013).

L'utilisation de la réfrigération permet une conservation non dénaturante mais ne permet pas une conservation longue durée des produits aquatiques. D'autres méthodes sont donc nécessaires pour allonger la durée de vie de ces produits.

b) Conservation par la mise en conserve

La mise en conserve (appertisation) est une méthode très utilisée. Cependant, elle ne peut pas être utilisée pour toutes les espèces de poisson notamment les poissons dits maigres puisque leur chair s'altère face aux hautes températures. Les principales espèces utilisées sont le thon (84 %), la sardine (49 %) et le maquereau (44 %) (FRANCE AGRIMER, 2022b). En effet, la différence de composition entre les poissons va induire des stabilités différentes. Ainsi, certaines espèces de poisson ne supportent pas la température utilisée pour la cuisson et la stérilisation. Cette méthode de conservation permet, selon la direction générale de l'alimentation (DGAL & DGCCRF, 2005), de « détruire les micro-organismes dans leurs formes végétatives et sporulées et leurs toxines thermosensibles assurant la stabilité à température ambiante des produits ». Le barème de stérilisation est défini par un couple temps/température. Pour les produits dont le pH est supérieur à 4,5, la valeur stérilisatrice est exprimée en équivalent temps passé à 121°C. Cette valeur est mise en relation avec le temps nécessaire pour détruite un micro-organisme de référence. Dans le cas des produits dont le pH est supérieur à 4,5 (notamment le cas des poissons), ce micro-organisme est *Clostridium botulinum*.

L'étape de la cuisson va induire une perte de nutriments puisque les protéines solubles et les vitamines présentes (notamment les vitamines B) dans l'eau vont être évacuées dans l'eau de cuisson. La température de mise en conserve est maintenue à 121°C pendant 15 minutes pour inactiver les microorganismes. Cette température de stérilisation a pour impact une

dénaturation des protéines et donc une altération au niveau des qualités nutritionnelles et gustatives (ABRAHA *et al.*, 2018).

Avant la mise en conserve, différents traitements sont appliqués aux produits aquatiques au cours desquels de nombreuses altérations des produits peuvent apparaitre. Les premières altérations apparaissent dès la capture du poisson avec l'activité enzymatique, l'altération liée au développement de la flore microbienne et l'oxydation des lipides. Ensuite, les conditions de stockage peuvent également altérer la qualité du poisson avec notamment la formation d'amines. L'utilisation de la congélation avant la mise en boîte permet de conserver le produit plus longtemps avant la mise en conserve. Cependant, la congélation va également avoir un impact sur la qualité du produit. Après ces deux étapes, le produit est ensuite cuit, ce qui entraine également des altérations au niveau du produit telle que l'augmentation de la masse graisseuse. Enfin arrive l'étape de stérilisation qui peut être décortiquée en 3 étapes. La première correspond à la fermeture hermétique de la conserve, la seconde correspond à l'étape de létalité au cours de laquelle les pathogènes dangereux et résistants à la chaleur sont éliminés. Enfin, la dernière étape correspond au traitement post stérilisation et au stockage de la conserve. Mais, il a également été constaté une formation importante d'acides gras libres (AUBOURG, 2001).

La mise en conserve est un processus complexe nécessitant de nombreuses étapes. Au cours de ces différentes étapes, de nombreuses altérations peuvent intervenir au niveau du produit avec notamment une perte au niveau des propriétés organoleptiques des produits frais.

c) Conservation par salage

Le salage est une des techniques de conservation les plus anciennes. Deux types de salage se distinguent : le salage en saumure et le salage à sec. Dans le cas du salage en saumure, le produit est plongé dans une eau saturée en sel. Pour le salage à sec, le produit est recouvert de sel. Le chlorure de sodium utilisé se diffuse de l'extérieur vers l'intérieur des muscles conduisant à la formation de liaisons entre les ions sodium, les ions chlorure et les protéines. La concentration en sel des poissons est alors d'environ 20 %. Cette méthode consiste en la pénétration de sel à l'intérieur de la chair du poisson. Cette méthode permet de réduire le nombre de colonies bactériennes présentes (HASSAN HADI AL-RUBAI *et al.*, 2020). Le nombre de bactéries est lié à l'activité de l'eau (a_w). Pour le développement des bactéries, l'activité de

l'eau doit être élevée, en général supérieure à 0,90. En dessous de cette valeur, l'environnement ne permet pas une croissance bactérienne. L'activité de l'eau est liée à la concentration en sel. Plus cette concentration augmente et plus l'activité de l'eau diminue (PITTIA & ANTONELLO, 2016).

Un changement au niveau du poisson est ainsi observé. En effet, une perte d'eau va être la conséquence du salage, induisant par la même occasion une perte de protéines (HASSAN HADI AL-RUBAI *et al.*, 2020). D'après (CALIXTO *et al.*, 2020), le salage induit des changements au niveau des paramètres physicochimiques du Cobia (*Rachycentron canadum*). Une réduction du taux d'oméga 3 et d'oméga 6 est observée sur les poissons ayant subi le salage. Cette réduction est due à l'oxydation en présence de sel. Une autre étude (QIUXING *et al.*, 2014) a permis de démontrer un changement au niveau de l'oxydation des lipides au cours du salage. Ainsi le salage combiné à une réduction de la concentration en eau permet une oxydation des lipides. Il a également été constaté que durant ce processus, la lipoxygénase est inhibée par le sel. Outre une augmentation de la quantité de sel au sein des produits, des marqueurs tels que le taux de peroxydes mais également les activités des substances réactives de l'acide thiobarbiturique et de la lipoxygénase montrent des altérations quand on les compare à des produits frais. L'activité de la lipoxygénase montre une décroissance au cours du processus de conservation ce qui peut s'expliquer par une inhibition de la lipoxygénase par le sel. Le taux de peroxydes et les TBARS montrent dans un premier temps une croissance pour ensuite décroitre. Le salage va également prévenir la croissance bactérienne. La méthode de salage est en général combinée à la méthode de séchage qui est également une méthode ancienne de conservation. Avec cette méthode, l'eau présente dans les tissus va être extraite. Ce faisant, cela induit une réduction de l'humidité du produit ainsi qu'une augmentation de la durée de vie du produit (HASSAN HADI AL-RUBAI *et al.*, 2020).

Cette méthode va ainsi induire un changement au niveau des qualités organoleptiques des produits.

d) Conservation par fumage

Le fumage fait également partie des méthodes les plus anciennes de conservation. Cette méthode se montre dénaturante pour le poisson. Deux méthodes de fumaison sont possibles : la fumaison à froid et la fumaison à chaud. La fumaison à froid se fait à des températures ne

dépassant les 33 °C contrairement à la fumaison à chaud qui, elle, s'effectue avec des températures atteignant 70 à 80 °C. La fumaison à froid nécessite des étapes supplémentaires puisqu'elle ne suffit pas à fournir une protection adéquate face aux microorganismes. Pendant le processus de fumaison, des composés formaldéhydes et des phénols vont être libérés. Ces composés permettent l'inhibition de la croissance bactérienne mais également la limitation des réactions d'oxydation (ARVANITOYANNIS & KOTSANOPOULOS, 2012). Cependant, les composés sont soumis à des règlementations puisqu'à une certaine dose, ils deviennent néfastes pour la santé. Ainsi, selon le règlement CE n°466/2001 (COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, 2001), la teneur maximale de benzo(a)pyrène ne doit pas dépasser 5 $\mu g.kg^{-1}$ de poids à l'état frais. D'après (CORDEIRO *et al.*, 2020), le fumage apporte des modifications qualitatives au niveau du produit. Il a également été constaté une augmentation de la teneur en lipides liée au processus de déshydratation dû au fumage. Ils ont démontré que les crevettes (*Litopenaeus schmitti* et *Macrobrachium amazonicum*) contenaient avant fumage 0,12 % de lipides tandis que les crevettes ayant été fumées contenaient 0,36 % de lipides. Ils ont également montré une hausse de la concentration en protéines. Avant fumage les crevettes contenaient environ 17 % de protéines alors qu'après fumage elles en contenaient environ 30 %.

La conservation par fumage induit des changements au niveau de la masse graisseuse et de la quantité de protéines. Le fumage provoque une perte de protéines et simultanément une augmentation de la masse graisseuse. Cette augmentation serait due au processus en lui-même puisque le processus induit une perte d'eau ce qui conduit à une accumulation de matière grassse (REGULSKA-ILOW *et al.*, 2013). Il a également été démontré que le fumage pouvait entrainer une perte de nutriments à cause de la température et de l'interaction entre les composants de la fumée et les protéines (SALIU, 2008).

Le processus de fumage est un bon moyen de conservation des produits aquatiques. Cependant, cette transformation du produit induit des modifications physico-chimiques qui modifient les propriétés gustatives et nutritionnelles des produits.

e) Conservation par fermentation

La fermentation est une technique répandue dans le monde entier. Elle s'effectue principalement chez les esquimaux et dans les pays asiatiques. Cette méthode se base sur l'activité des enzymes et la présence de bactéries lactiques halophiles et halotolérantes

(organismes vivants dans des milieux à hautes concentrations en sel) (NIKIFOROVA, 2020). Différentes bactéries lactiques peuvent être utilisées pour la fermentation telles que *Lactobacillus plantarum* ou *Lactococcus lactis* … La fermentation s'effectue en présence de sel. Ce sel permet d'améliorer l'activité des bactéries halophiles. L'hydrolyse des protéines se fait lors de la fermentation du poisson en présence de sel. La fermentation se fait à température ambiante pendant 12-18 mois. Cette hydrolyse est induite par des protéinases endogènes et par des protéinases produites par les bactéries halophiles. Ces composés vont servir d'indice qualité pour le produit (TANASUPAWAT & VISESSANGUAN, 2013). Au niveau du filet, plusieurs changements interviennent, notamment l'acidification et la gélification. L'acidification a pour conséquence la formation de substances antimicrobiennes. Il en découle une réduction de la contamination et donc une extension de la durée de vie du produit. La gélification, quant à elle, induit des changements au niveau de l'élasticité des muscles (ZANG *et al.*, 2020).

Tout comme le fumage, la fermentation entraine des modifications au niveau des paramètres physico-chimiques et gustatifs. Cette méthode demande beaucoup de temps pour obtenir le produit final puisque pour certains poissons, il faut jusqu'à 18 mois de fermentation.

3. Bilan du chapitre II

Le poisson frais ne permet pas une conservation sur le long terme. Il a donc fallu trouver des méthodes pour conserver le poisson telles que la mise en conserve ou encore la salaison des produits qui permettent d'allonger la durée de vie du produit. Ces différentes méthodes permettent le ralentissement de la croissance bactérienne des produits aquatiques. Cependant ces méthodes entrainent des changements organoleptiques au niveau des tissus et demandent parfois du temps avant d'obtenir le produit fini. C'est pourquoi, la congélation peut être envisagée comme méthode de conservation pour les produits aquatiques.

III. Le rôle important de la congélation

La congélation est utilisée à plusieurs fins. L'une d'elle consiste en son pouvoir assainissant. En effet, la congélation est utilisée dans le secteur alimentaire où le poisson cru peut être utilisé dans l'élaboration de certains plats (sushis). Avant d'être utilisé, le poisson doit avoir subi une congélation permettant de tuer les parasites susceptibles de présenter un risque

pour la santé des consommateurs. Cette pratique est règlementée par la norme CE n°853/2004 (PARLEMENT EUROPEEN, 2004). Elle implique un temps minimal de congélation dépendant de la température de congélation pour garantir l'innocuité des parasites (-20°C pendant au moins 24 h ou -35°C pendant au moins 15 h). Une autre raison concerne son pouvoir de conservation. En effet, l'éloignement des sites de pêche combiné à un allongement du temps en mer rendent nécessaire l'allongement du temps de conservation.

1. Les avantages de la congélation

Il est possible d'utiliser différentes températures de congélation : -18°C qui correspond à la congélation traditionnelle, -30°C à -50°C qui correspond à ce que l'on appelle la surgélation et -80°C qui correspond à la congélation ultrabasse température. Ces différences ont un impact sur la qualité du filet. Ainsi, il a été démontré qu'à des températures de congélation élevées mais correspondant à la législation (-18°C), l'oxydation des lipides et l'hydrolyse des lipides était plus importante qu'à des températures de congélation basses (-30°C, -40°C)(SONE *et al.*, 2019). Le temps de conservation varie également avec la température. Par exemple, à -18°C la durée de vie du filet est estimée à 6 mois alors qu'à -30°C, celle-ci est de 12 mois. De même, les protéines présentent une dénaturation plus rapide à -18°C qu'à des températures plus basses de congélation. Des différences sont également observées en fonction du type de produit, c'est-à-dire si celui-ci est conservé sous forme de filet ou de poisson entier. Les filets présentent une détérioration plus importante que les poissons entiers en raison de l'exposition à l'oxygène des fibres mais aussi des dommages mécaniques exercés sur les filets (lors de la préparation, du stockage, du conditionnement) (SONE *et al.*, 2019).

La congélation est utilisée avant tout pour éviter l'altération du produit. La congélation a pour but de diminuer la température du produit pour permettre le ralentissement de la croissance bactérienne mais également pour permettre le ralentissement de nombreuses réactions chimiques (EVANS, 2009). Quand les températures sont inférieures à -10°C, un ralentissement des activités enzymatiques et de la croissance des microorganismes peut être observé. La congélation est également une méthode utilisée lors du transport de la marchandise. Cela permet de desservir des endroits éloignés des sites de production mais cela permet également d'avoir accès à des zones de pêche qui seraient plus éloignées. Cela permet aussi d'éviter le gaspillage alimentaire (LISITSYN *et al.*, 2019). La congélation permet de conserver les qualités nutritives des produits alimentaires.

2. Les effets de la congélation sur le muscle

La congélation a de nombreux effets sur le tissu musculaire ainsi qu'au niveau cellulaire. La congélation induit un environnement défavorable pour la croissance bactérienne. Ainsi, un ralentissement de la croissance pourra être observé. L'altération biochimique du muscle sera également réduite par la congélation (GANDOTRA, 2012).

Dans les tissus, l'eau peut se trouver sous trois formes différentes : l'eau de liaison, l'eau immobilisée et l'eau libre. Dans un premier temps, il y a l'eau de liaison qui représente la part la plus faible. Celle-ci permet les liaisons fortes des protéines. Cette eau ne peut pas être congelée en dessous de -40°C. L'eau immobilisée représente, quant à elle, la part la plus importante dans les tissus. Elle est localisée au sein des myofibrilles. Elle se lie faiblement aux protéines. Enfin, l'eau libre est localisée entre les myofibrilles des cellules musculaires. La formation de cristaux est possible à partir de l'eau libre. La taille de ces cristaux dépend de la vitesse de congélation. Ainsi avec une congélation lente, les cristaux seront de grande taille et provoquent de nombreuses perturbations (rupture des fibres musculaires, élargissement des espaces intercellulaires, compression des myofibrilles …) (LI *et al.*, 2018). Pendant le processus de décongélation, l'eau dite immobilisée devient de l'eau libre ce qui induit une dénaturation des myofibrilles ainsi que des protéines. Ces cristaux sont responsables de la dénaturation des protéines, de la rupture de membranes cellulaires ainsi que d'une fuite de fluides intracellulaires (LI *et al.*, 2018 ; DUARTE *et al.*, 2020).

Une altération de l'intégrité des fibres musculaires est provoquée par la formation des cristaux de glace. Lors de la congélation rapide, des petits espaces se forment entre les fibres alors que lors de la congélation lente, les espaces formés sont de plus grande taille. La congélation rapide produit de petits cristaux, ce qui entrainerait des altérations moindres au niveau des fibres musculaires et permettrait également de maintenir la capacité de rétention d'eau. La structure secondaire semble aussi être impactée par le processus de congélation. Les hélices alpha et les feuillets bêta composent cette structure des protéines. À la suite de la congélation, des altérations des hélices alpha et des feuillets bêta sont observées, provoquant des instabilités au niveau de la conformation des protéines. La structure tertiaire des protéines est également affectée par la congélation. Les cristaux de grande taille induisent un changement au niveau de la polarité de l'environnement du tryptophane. Ainsi le tryptophane

est mis en contact avec un environnement polaire ce qui conduit à un dépliement des protéines (TAN *et al.*, 2021).

Tableau 3 : Effet de la congélation sur le poisson (MAZROUH, 2015)

		Poisson frais	**Poisson congelé 21 jours**
Composition biochimique	% protéines	25,48 ± 1,42	13,46 ± 1,32
	% lipides	3,53±0,18	3,05 ± 0,23
	% humidité	71,60 ± 2,56	66,20 ± 1,36
	pH	6,50 ± 0,07	6,88 ± 0,37
Composition minérale	Magnésium	1,16 ± 0,03	1,03 ± 0,08
	Calcium	9,28 ± 0,50	7,80 ± 0,39
	Phosphore	3,28 ± 0,41	2,04 ± 0,21

Une diminution de la quantité de lipides est observable après 21 jours de congélation (Tableau 3 ci-dessus). Cette perte est attribuée à la disparition des triglycérides et à l'oxydation des acides gras. Lors de la congélation, une perte de la teneur en humidité est observée. Elle s'explique par un effet de sublimation de l'eau de surface. Un autre paramètre est affecté par la congélation : il s'agit du pH. Une hausse du pH est constatée. La composition en minéraux est également impactée par la congélation. Une baisse des principaux minéraux est ainsi observée (MAZROUH, 2015).

Le muscle semble subir de nombreux dommages lors de la congélation. Plusieurs méthodes de congélation sont développées pour limiter au maximum ces altérations.

3. Différents types de congélation

a) Le super chilling

Cette méthode est également appelée « deep chilling », « sub chilling », « super réfrigération ». C'est une méthode qui se situe entre la réfrigération et la congélation. Selon le règlement UE 2022/2058, cette méthode peut être utilisée pour le transport des produits aquatiques. La règlementation stipule qu' « il existe désormais de nouvelles techniques de transport, comme la super réfrigération, consistant à abaisser la température du poisson entre le point de congélation commençante et une température de 1 à 2°C inférieure et permettant

le transport dans des caisses sans glace » (PARLEMENT EUROPEEN, 2022). Avec cette méthode, l'ensemble de l'eau n'est pas transformé en glace. Une faible proportion de l'eau estimée entre 5 et 30 % forme des cristaux (ELIASSON *et al.*, 2019). Cette méthode permet dans certains cas d'allonger entre 1,5 fois et 4 fois la durée de vie des produits. Grâce à cette technique, une réduction du nombre de colonies bactériennes est observée pendant le temps de stockage. Celle-ci permet de diminuer la dégradation biochimique ainsi que la dénaturation des protéines. Les dégradations structurelles sont également moins nombreuses que pour la congélation. Des dommages sont cependant retrouvés sur la surface des filets, de même qu'il semble y avoir un détachement plus important des myofibrilles. De même, une libération précoce d'enzymes protéolytiques est également observable. Les cristaux de glace formés sont d'une taille assez importante pour endommager les muscles (KAALE *et al.*, 2011).

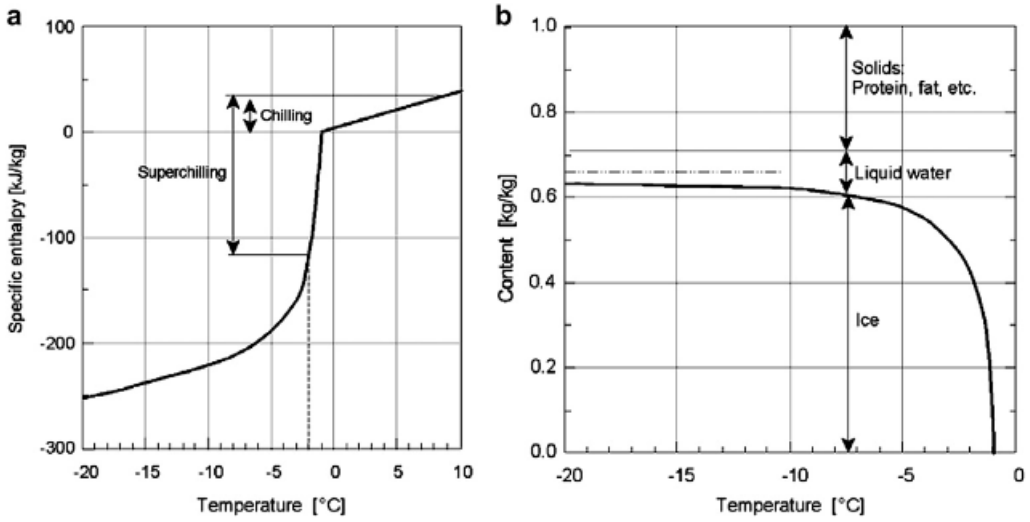


Figure 6 : énergie et composition en glace dans un filet de poisson (MAGNUSSEN et al., 2008)

Lors du super chilling, un dégagement d'énergie se déroule sous forme de transfert de chaleur. La chaleur évacuée augmente à mesure que la température descend sous le point de congélation à cause de la formation des cristaux de glace. La teneur en glace est dépendante de la température du produit (MAGNUSSEN *et al.*, 2008), Figure 6 ci-dessus.

b) La congélation/La surgélation

Ces méthodes permettent de refroidir un produit. Selon la règlementation CE n°853/2004 « Les produits de la pêche congelés doivent être maintenus à une température ne dépassant pas -18°C en tous points » (PARLEMENT EUROPEEN, 2004). La congélation se fait également à basse température, mais ces températures n'étant pas aussi basses que la surgélation, le

refroidissement est plus lent. La surgélation s'effectue à basse température avec en conséquence un refroidissement très rapide à cœur. La surgélation se déroule à des températures inférieures à -30°C. D'après une étude de (CHOI *et al.*, 2018), la congélation est définie comme rapide quand elle s'effectue en moins de 30 minutes à cœur. Ainsi, ils ont démontré que pour la viande d'agneau, à -50°C la congélation mettait 26 minutes ; à -60°C, elle mettait 16 minutes et à -80°C, elle mettait 10 minutes. Une température de -50°C ou moins permet une conservation plus longue des produits que la congélation à -18°C. Différents facteurs, influençant la qualité après décongélation de la chair, sont relativement stables à travers le temps quand le produit est congelé à -50°C. Le tissu musculaire semble également subir moins de dommages quand les températures de conservation sont inférieures à -50°C (CHOI *et al.*, 2018). La taille des cristaux de glace est dépendante de la température. Plus la température de congélation est basse et plus les cristaux sont de petite taille. Une étude de (ULLAH *et al.*, 2014) a mis en évidence une différence du nombre de pores membranaires au niveau des cellules. Le nombre de pores décroit avec l'augmentation de la température. Un faible nombre de pores est retrouvé pour les aliments congelés entre -17°C et -7°C. Plus les cristaux sont grands et plus le nombre de pores diminue. Ainsi plus les cristaux sont de grande taille, plus les dommages au niveau des membranes sont importants.

c) La cryopréservation

La cryopréservation est utilisée dans le but de préserver les tissus, les cellules et les organites mais également leurs propriétés physiologiques. Cela demande des méthodes particulières de conservation. Lors de la cryopréservation, les tissus sont conservés à très basse température. Cette ultra basse température permet la congélation quasiment instantanée des produits aquatiques. Des cryoprotectants peuvent être utilisés pour éviter les altérations par la congélation à la suite de la formation des cristaux de glace. Les cristaux formés sont de petite taille induisant ainsi la formation de pores de faible diamètre. L'utilisation de la cryopréservation (-95°C) sur les produits aquatiques a permis de conserver la microstructure du muscle. Elle a également permis de réduire la perte d'eau pendant la décongélation et la cuisson (YANG *et al.*, 2022). Des mesures de l'activité de la chaine respiratoire ont été réalisées et il a été démontré que la consommation d'oxygène était plus basse pour les mitochondries ayant été cryopréservées. Une altération du complexe I a également été observée entrainant un défaut de fonctionnement de la chaine respiratoire. La cryopréservation entraine une perte

du cytochrome c puisque celle-ci induit de nombreux dommages au niveau des membranes mitochondriales. Ces dommages se traduisent par des ruptures au niveau des membranes (STEPHENNE *et al.*, 2007 ; LARSEN *et al.*, 2012 ; BETTINAZZI *et al.*, 2019).

De nos jours, il n'y a pas encore de techniques permettant de conserver les tissus sans entrainer d'altérations au niveau des membranes mitochondriales et de la chaine respiratoire. La vitrification est une méthode de cryopréservation très rapide utilisée dans le domaine médical pour notamment conserver les embryons. Dans ce cas, la température passe de 37°C à -196°C en moins d'une seconde (TAVUKCUOGLU *et al.*, 2012). Des cryoprotecteurs pourront être utilisés pour limiter les dommages au niveau des membranes cellulaires. Cependant, cela a pour conséquence une perte du potentiel membranaire des mitochondries (LEI *et al.*, 2014).

d) Contrôle de la taille des cristaux de glace

Il est possible de contrôler la taille des cristaux par des méthodes physiques ou chimiques. La méthode physique va se baser sur les différentes températures de congélation. Plus la température de congélation est basse, plus la vitesse de descente en température est élevée et plus les cristaux formés sont de petite taille. La méthode chimique consiste à ajouter soit une protéine antigel soit une protéine de nucléation. Les protéines antigel ont d'abord été trouvées chez des poissons présents dans les eaux arctiques. Ces protéines ont pour rôle de diminuer la température de congélation et de supprimer la formation de cristaux dans les noyaux. Elles agiraient en se liant aux cristaux de glace. Les produits sont plongés dans des solutions contenant les protéines avant leur congélation, mais dans certains essais la protéine a été injectée 24 heures avant l'abattage de l'animal. Ces essais ont montré une réduction de la taille des cristaux de glace formés dans les morceaux de chair. L'utilisation de protéines de nucléation permet d'augmenter la température de congélation et ainsi de diminuer le temps de congélation. Les cristaux formés sont de grande taille. Pour utiliser ces protéines, il faut être sûr de leur innocuité. (LI & SUN, 2002).

e) Les procédés de congélation industrielle

Au niveau industriel, plusieurs types de froid peuvent être utilisés tels que le froid mécanique, le froid cryogénique et le froid mixte. On peut distinguer la congélation sur plaques et la congélation par souffle d'air. Cces deux méthodes utilisent le froid mécanique. Pour le premier type de congélation, les poissons sont placés entre deux plaques. Le froid réfrigérant est

envoyé à travers les canaux des plaques. Ce type de méthode permet une congélation uniforme du produit. Cette congélation peut se faire horizontalement ou verticalement. La congélation horizontale est préférentiellement réalisée dans les industries alors que la congélation verticale est, quant à elle utilisée à bord des vaisseaux pour la congélation de grandes quantités de poissons. Ce type de congélation permet un transfert de chaleur élevé et ainsi une congélation rapide. (SVENDSEN *et al.*, 2022). La congélation par souffle d'air permet de congeler une grande quantité de poissons en une seule fois. La température utilisée pour cette méthode est comprise entre -35°C et -52°C. Cette technique se décline de différentes façons. La première façon correspond à l'utilisation d'une chambre à faible température où l'air circule à faible vitesse. La seconde façon est basée sur l'utilisation de congélateurs à tunnel. Ce sont des pièces isolées contenant des ventilateurs permettant une circulation rapide de l'air. La Figure 7 page 48 représente un congélateur à tunnel de type « batch ». C'est un processus « on/off ». Les produits sont mis dans le congélateur. Le congélateur est mis en marche jusqu'à congélation complète du produit, puis le congélateur est éteint le temps de décharger les produits. Cette technique est utilisée pour des petites quantités de produits (DEMPSEY & BANSAL, 2010).

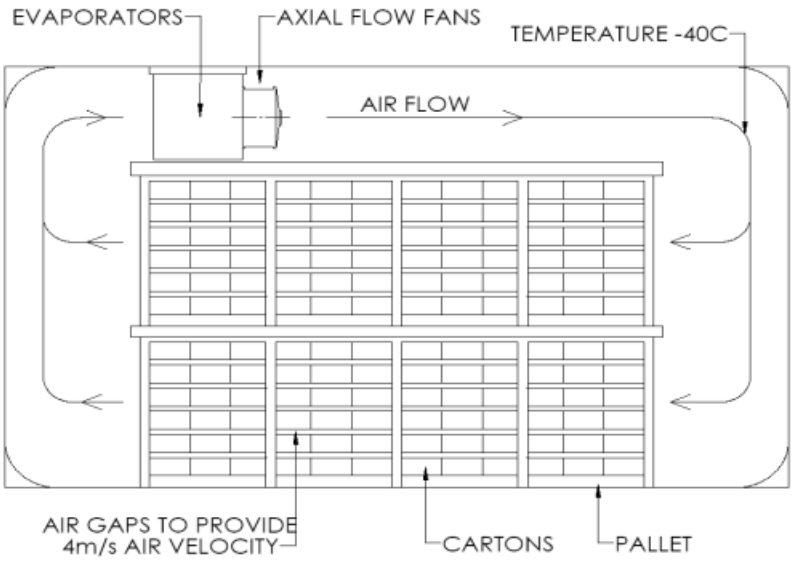


Figure 7 : Schéma d'un congélateur à tunnel (DEMPSEY & BANSAL, 2010)

La troisième façon est l'utilisation de congélateurs à lit fluidisé où des produits de petite taille sont placés sur une grille qui est traversée par l'air. L'air parvient du dessous de la grille. La Figure 8 ci-dessous présente un schéma d'un congélateur à lit fluidisé.

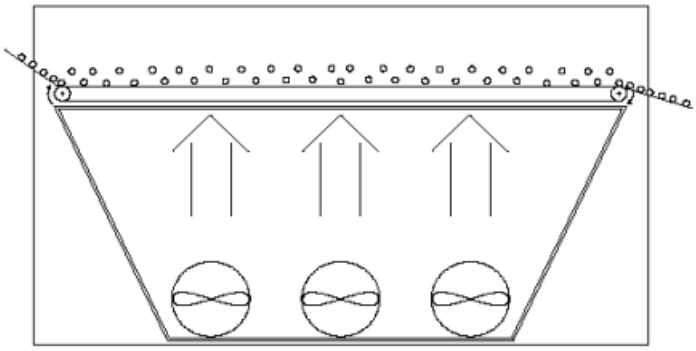


Figure 8 : Schéma d'un congélateur à lit fluidisé (DEMPSEY & BANSAL, 2010)

La dernière méthode est la congélation individuelle rapide. Les méthodes les plus utilisées par les industries sont la congélation individuelle rapide et l'utilisation de congélateur à tunnel. Les différentes techniques de congélation par souffle d'air possèdent des caractéristiques propres à chacune d'elles. Ces méthodes permettent une descente en température rapide, la congélation d'un produit prend entre 1h et 5h. elle possède une vitesse de transfert de chaleur élevée.

Il est possible d'utiliser un froid cryogénique. Ce type de froid utilise soit l'azote liquide soit le dioxyde carbone. La température de congélation de l'azote liquide est de -195,8°C et celle du dioxyde de carbone est de -78,5°C (SVENDSEN *et al.*, 2022). Cette congélation peut se faire soit par aspersion (Figure 9 ci-dessous) soit par immersion.

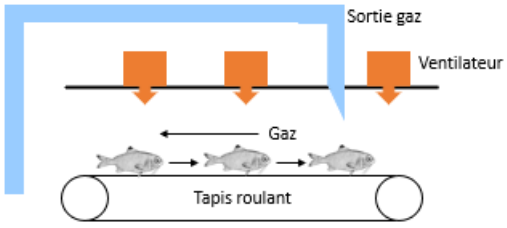


Figure 9 : schéma de la congélation par froid cryogénique

Par aspersion, les produits aquatiques sont placés sur un tapis roulant et sont aspergés de gaz, ce qui va induire la congélation quasiment instantanée des produits. Les produits sont ensuite conservés à -18°C. Par immersion, les produits sont directement plongés dans l'azote liquide. C'est une méthode rapide de congélation. Selon une étude portant sur le poisson-chat (*Ameiurus melas*), l'utilisation de la cryocongélation permet un temps de congélation d'environ 20 minutes (ESPINOZA RODEZNO *et al.*, 2013). Avec cette méthode, l'oxydation des lipides est moins rapide que lors de l'utilisation d'une méthode plus conventionnelle de

congélation telle que la congélation par l'air. Un haut coefficient de transfert de chaleur est également obtenu. Il est de l'ordre de 140 $W.m^2K^{-1}$. Par comparaison, pour la congélation par jet d'air, le coefficient est d'environ 15 $W.m^2K^{-1}$ (ESPINOZA RODEZNO *et al.*, 2013). Cependant elle reste rare en industrie à cause du coût élevé de mise en place de la technique. Des altérations sont observées au niveau des tissus avec notamment des changements enzymatiques (hausse des taux d'α-glucosidase et de β-N-acétyl-glucosaminidase), une perte d'eau lors de la décongélation mais également des altérations morphologiques (fissures macroscopiques au niveau du muscle). La congélation cryogénique est responsable d'une désorganisation des myofibrilles après seulement 30 jours de stockage alors que pour les filets conservés à une température basse (–80°C), cette altération n'est observable qu'après 90 jours de stockage (T TRUONGHUYNH, & LI, 2019).

Il est également possible d'utiliser le froid mixte. C'est une combinaison entre le froid mécanique et le froid cryogénique. Cette méthode nécessite la juxtaposition des deux types de tunnels. Le froid cryogénique peut être utilisé en premier pour permettre le croutage du produit c'est-à-dire permettre le durcissement de la surface du produit. Cette première étape permet d'obtenir une force de résistance du produit plus importante mais prévient également l'agglomération des produits entre eux. La congélation mécanique est ensuite utilisée pour obtenir une congélation à cœur du produit (AGNELLI & MASCHERONI, 2001). La combinaison des deux froids permet une réduction de la perte d'eau du produit mais aussi une réduction du temps de congélation.

Ces différentes méthodes de congélation sont synthétisées dans le Tableau 4 page 51.

Tableau 4 : Récapitulatif des différentes caractéristiques de plusieurs méthodes de congélation (DEMPSEY & BANSAL, 2010)

Freezer type	Product	Air Velocity	H.T.C.* $W/m^2°C$	Capacity	Advantages	Disadvantages
Batch tunnel	Useful for all foods but better for bulk items, particularly carcasses	1.5-6m/s Typically ≈ 4m/s	h < 50 [21]	1-80 tones	i) Low capital cost ii) Versatile, can accommodate various product geometries	i) Long freezing times ii) Relatively low H.T.C*.
Continuous tunnel	Useful for all foods but better for bulk items.	1.5-6m/s Typically ≈ 4m/s	h < 50 [21]	1000-20,000 kg/hr	i) Reduction in down time as the freezer is not stopped for loading ii) Flexible with freezing times	i) Requires additional space ii) Reduced freezing capacity due to frost on evap. coils
Spiral	Suitable for most foods, packaged or unpackaged e.g. poultry, red meat, sea.	3-8m/s	h ≈ 25-80 [22]	500-6000 kg/hr	i) Compact ii) Capable of IQF iii) Higher efficiency than tunnel	i) More expensive than tunnel freezers ii) Hygiene issues
Fluidized bed	IQF small products, 0.5 to 5 cm diameter, e.g. peas, French fries, shrimp,	≈30m/s	h ≈ 110-160 [22]	100 - 20,000 kg/hr	i) Very fast freezing times, comparable to cryogenic only cheaper ii) High efficiency	i) Only suitable for small products of fairly uniform shape and size
Impingement	IQF. Meat patties, fish fillets, Product thickness typically 0-25mm[1]	10-100m/s Typically ≈ 40m/s	h ≈ 250-350 [22]	up to 1200kg/hr	i) Reduced moisture loss ii) Very fast freezing times, similar to cryogenic	i) Only suitable for products of small thickness

4. Méthodes de décongélation

La méthode de décongélation est aussi importante que la méthode de congélation. Lors de la décongélation, les cristaux précédemment formés lors de la congélation vont de nouveau se trouver sous la forme d'eau libre. Ceci provoque une rupture ainsi qu'un rétrécissement des cellules. Il existe plusieurs modes de décongélation qui auront des effets différents sur les tissus. Les processus de décongélation conduisnte à des changements chimiques et physiques qui affectent la qualité des produits congelés. La décongélation est un phénomène plus lent que la congélation. Pour les produits de la pêche, la décongélation doit être rapide pour éviter la perte d'eau du produit, ce qui aurait pour conséquence une perte de nutriments. De plus, la température de décongélation doit être basse pour éviter l'accélération de la croissance bactérienne et l'activation des réactions enzymatiques. C'est dans cette optique que plusieurs méthodes de décongélation ont été mises au point. Ci-dessous sont présentées ces méthodes de décongélation.

a) Décongélation à ultra haute pression

Cette méthode est utilisable à des températures positives basses (+5°C). Elle permet de faire décroitre le point de fusion ainsi que la capacité thermique massique de la glace mais également d'accroitre la conductivité thermique. La différence de température entre le milieu de décongélation et le produit congelé produite par la haute pression permet d'augmenter la vitesse de décongélation (ROUILLE *et al.*, 2002). La diminution du point de fusion a pour conséquence de réduire la croissance bactérienne et ralentir les réactions enzymatiques. Cette méthode permet également d'augmenter la capacité de rétention de l'eau du produit. L'utilisation de la haute pression impacte négativement le tissu. Elle conduit à une dénaturation des protéines et à une détérioration de la texture du produit (LEBAIL *et al.*, 2002). Pour les produits de la mer, les effets sont très variables entre les espèces. Par exemple, chez l'aiguillat (*Squalus acanthias*), la perte d'eau est réduite de 20 % alors que chez les pétoncles (*Pecten irradians*), la perte d'eau est augmentée de 25 % (CAI *et al.*, 2019).

b) Décongélation par ultrasons

Les ultrasons sont transmis par vagues vers la chair congelée. Une partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur qui aide à la décongélation. A la surface du produit, la température augmente rapidement contrairement à l'intérieur de la chair. Les ultrasons peuvent induire une augmentation de la température de l'eau, ce qui peut produire des jets à haute vitesse. Ces jets génèrent un effondrement asymétrique des bulles ce qui améliore le transfert de chaleur. Cette méthode réduit les temps de décongélation et les altérations de la nourriture. Cependant, elle possède un faible taux de pénétration et nécessite beaucoup de puissance (CAI *et al.*, 2019).

c) Décongélation par champ électrostatique à haute tension

Dans le cas de cette technique, les électrons entrent en collision entre eux, ce qui crée des ions chargés. La vitesse de déplacement des ions permet la formation d'un nuage ionique et cela permet d'accélérer le transfert de chaleur. La vitesse de décongélation est augmentée à cause des turbulences provoquées par le nuage ionique. Cette méthode reste assez coûteuse à mettre en place et nécessite un grand espace pour stocker l'équipement. Elle permet la réduction du nombre de colonies bactériennes. Cependant, elle accélère l'oxydation de la nourriture et la dégradation de la saveur de la nourriture (CAI *et al.*, 2019).

d) Décongélation par l'air

Cette méthode est considérée comme la moins chère. Le transfert de chaleur se fait par convection. Deux types de convection sont définies : naturelle et forcée. La convection naturelle correspond à un simple échange de chaleur entre le milieu et le produit sans la présence d'autres interactions. La convection forcée correspond à un échange de chaleur avec l'intervention d'interactions extérieures (l'air circule sur le produit). Trois méthodes utilisent l'air pour la décongélation des produits : décongélation par l'air immobile, décongélation par l'air circulant et décongélation par impact. La décongélation par l'air immobile possède un taux d'échange très bas, rendant la décongélation très lente (jusqu'à 20 heures pour un bloc de 10 cm d'épaisseur de poisson congelé). Cette méthode a pour inconvénient un taux d'oxydation des lipides élevé dû à l'exposition prolongé du produit à l'air. La décongélation par l'air circulant est couramment utilisée en industrie. L'air est dirigé vers la surface du produit. Le fait d'imposer un mouvement à l'air induit une augmentation du taux d'échange de chaleur entre l'air et le poisson. Cela prend, pour cette méthode, environ 4 heures pour décongeler un bloc de 10 cm d'épaisseur. Le taux d'oxydation est moins élevé pour cette méthode puisque le temps de contact entre l'air et le produit est plus court (BACKI, 2018). La dernière méthode consiste en la décongélation par impact. Elle fait toujours l'objet de recherches. D'après (BOZZATO *et al.*, 2021), cette méthode permettrait de réduire de 85 % le temps de décongélation par rapport aux méthodes conventionnelles. Elle ne semble pas altérer profondément les tissus.

e) Décongélation par l'eau

La décongélation par l'eau est fréquemment utilisée dans l'industrie. Elle consiste en l'immersion des produits congelés dans des containers remplis d'eau. Une des contraintes de cette méthode est le changement régulier de l'eau de décongélation puisqu'au fur et à mesure du temps, l'eau se refroidit en effet au contact avec le produit, ce qui induirt une réduction de la capacité de décongélation. Avec la décongélation par l'eau, l'oxydation des lipides est réduite ainsi que le séchage de la surface du produit. La décongélation est assez longue. Il faut entre 3 à 5 heures pour décongeler un produit d'environ 10 cm d'épaisseur avec une température de l'eau à 15,5°C (BACKI, 2018).

f) Décongélation sous vide

Cette méthode se base sur la relation entre la température d'ébullition et la pression. Une diminution de la pression entraine une diminution de la température d'ébullition. Par cette méthode, l'eau s'évapore et forme de la condensation, ce qui donne de la chaleur. Travailler sous vide permet à la vapeur d'eau de se positionner dans les cavités contenant de l'air entre les poissons. Le temps de décongélation est semblable à la décongélation par l'air et la décongélation par l'eau. Avec cette méthode, la croissance bactérienne semble inhibée (BACKI, 2018).

5. Effet de la décongélation sur les tissus

Chacune des méthodes présentées ci-dessus provoquent des altérations au niveau du tissu en particulier du point de vue microbien et physico-chimique. D'un point de vue physico-chimique, un changement s'opère au niveau des enthalpies. Celui-ci semble s'expliquer par la rupture des liaisons hydrogène induites par les processus de décongélation. Avec l'utilisation de la décongélation par microondes, la décongélation par ultrasons et la décongélation par le vide, une décroissance de l'enthalpie a été observée ce qui a conduit à la décroissance de la thermo-stabilité des têtes de myosine et donc à une altération de la fibre musculaire. La méthode par microondes induit une cassure des liaisons hydrogène, ce qui a pour conséquence une déstabilisation de la structure et donc la perte de la structure secondaire des protéines. En revanche, la structure tertiaire des protéines myofibrillaires semble bien conservée quelle que soit la technique de décongélation utilisée (CAI *et al.*, 2018 ; CAI *et al.*, 2020).

6. Usage frauduleux de la congélation

D'après la FAO, les fraudes sont commises quand le poisson est illégalement placé sur le marché avec l'intention de duper le consommateur, habituellement pour le gain financier. Différents types de fraudes peuvent être rencontrés tels que le mauvais étiquetage, la substitution des espèces, l'utilisation d'agents liant l'eau pour augmenter la masse du produit. La mise en place du Codex Alimentarius a permis de développer des directives et principes internationaux. Ces principes permettent l'identification des pratiques frauduleuses et le développement de la standardisation du système de gestion de la sécurité sanitaire (REILLY, 2018).

Pour éviter tout usage frauduleux de la congélation, des règlementations ont été mises en place. Concernant la norme CE n°853/2004 (PARLEMENT EUROPEEN, 2004), il y est indiqué que la température de conservation des produits congelés ne doit pas être supérieure à -18°C. La règlementation UE n°1169/2011 (PARLEMENT EUROPEEN, 2011) prévoit, quant à elle, de prévenir le consommateur d'un éventuel stade de congélation/décongélation d'un produit aquatique.

7. Bilan du chapitre III

Différentes méthodes ont été développées pour permettre la conservation des produits aquatiques. La congélation permet une conservation beaucoup plus longue des produits aquatiques. Cependant, son utilisation entraine des modifications pouvant mener à une perte qualitative au niveau du produit. Une perte financière est également envisageable puisqu'un produit congelé aura une valeur inférieure à celle d'un produit frais. Ce dernier point constitue la porte ouverte à certaines fraudes, notamment la vente de produits aquatiques décongelés comme étant frais. La mise en place de techniques de différenciation entre produits frais et produits décongelés semble, de ce fait, judicieuse. Pour déterminer quel caractère est susceptible de permettre la différenciation entre les produits frais et les produits décongelés, il faut trouver un caractère commun aux différents types de poisson. Le chapitre suivant présente trois exemples de ces poissons, leur mode de vie et leur condition d'élevage.

IV. Trois espèces de poisson utilisées comme modèles d'étude

1. D'origine benthique ou pélagique

En mer, les poissons peuvent vivre à différents niveaux dans la colonne d'eau. Trois catégories de poissons sont distinguées : les poissons benthiques, les poissons démersaux et les poissons pélagiques. Un poisson benthique est un poisson vivant dans les profondeurs de la colonne d'eau. Parmi ces espèces, nous retrouvons les soles (*Solea solea*), les raies (*Raja spp.*) ou les turbots (*Scophthalmus maximus*). Un poisson pélagique est un poisson vivant dans les eaux proches de la surface dont font partie les harengs (*Clupea harengus*), les sardines, les anchois (*Engraulis encrasicolus*) ou les thons (*Thunnus spp.*). Un poisson démersal est un poisson vivant au-dessus du fond : y sont retrouvés les merlans (*Merlangius merlangus*) et les colins (*Pollachius pollachius*). La daurade fait partie des poissons démersaux, le bar commun fait partie des poissons pélagiques.

Le Tableau 5 ci-dessous montre les principales espèces de poisson pêchées consommées par les Français. Les trois niveaux de la colonne d'eau sont représentés sur le marché. Le thon, le cabillaud et lieu d'Alaska représentent les plus consommés. Le saumon qui n'apparait pas dans ce tableau, puisqu'il est principalement vendu comme poisson d'aquaculture, représente une consommation de 2,7 kg par an et par habitant (FRANCE AGRIMER, 2020).

Tableau 5 : Consommation française des principales espèces pêchées de poisson par habitant (FRANCE AGRIMER, 2020)

Colonne d'eau	Espèces de poisson	Consommation annuelle par habitant (kg)
Poisson pélagique	Thon	3,9
	Sardine	1
	Hareng	0,7
	Maquereau	0,9
	Lieu noir	0,7
Poisson démersal	Cabillaud	2,8
	Colin d'Alaska (*Terragra chalcogramma*)	2,3
	Merlu (Merluccius merluccius)	1,2
Poisson benthique	Baudroie (*Lophius piscatorius*)	0,4

Au cours de cette thèse, différentes espèces de poisson ont été étudiées. Celles-ci ne se trouvent pas au même niveau de la colonne d'eau (Figure 10 page 57). Il est ainsi intéressant de voir ce qui différencie ces différentes espèces. Elles possèdent des caractéristiques physiques différentes. Les poissons pélagiques possèdent une couleur caractéristique leur permettant de se protéger des prédateurs marins (dos bleu/vert). Ils vivent en banc. Leur corps est de forme allongée ou oblongue, ce qui leur permet de se déplacer plus rapidement. Certaines espèces de poissons démersaux possèdent des barbillons qui permettent de fouiller la vase. Leur couleur va du gris au rouge. Les poissons benthiques, quant à eux, sont généralement de forme aplatie. Ils peuvent s'enfoncer dans le fond pour fuir les prédateurs (NAUSICAA, 2022).

Des différences physiologiques sont observables entre les poissons pélagiques et démersaux. Les poissons pélagiques possèdent une quantité plus importante de protéines sarcoplasmiques que les poissons démersaux.

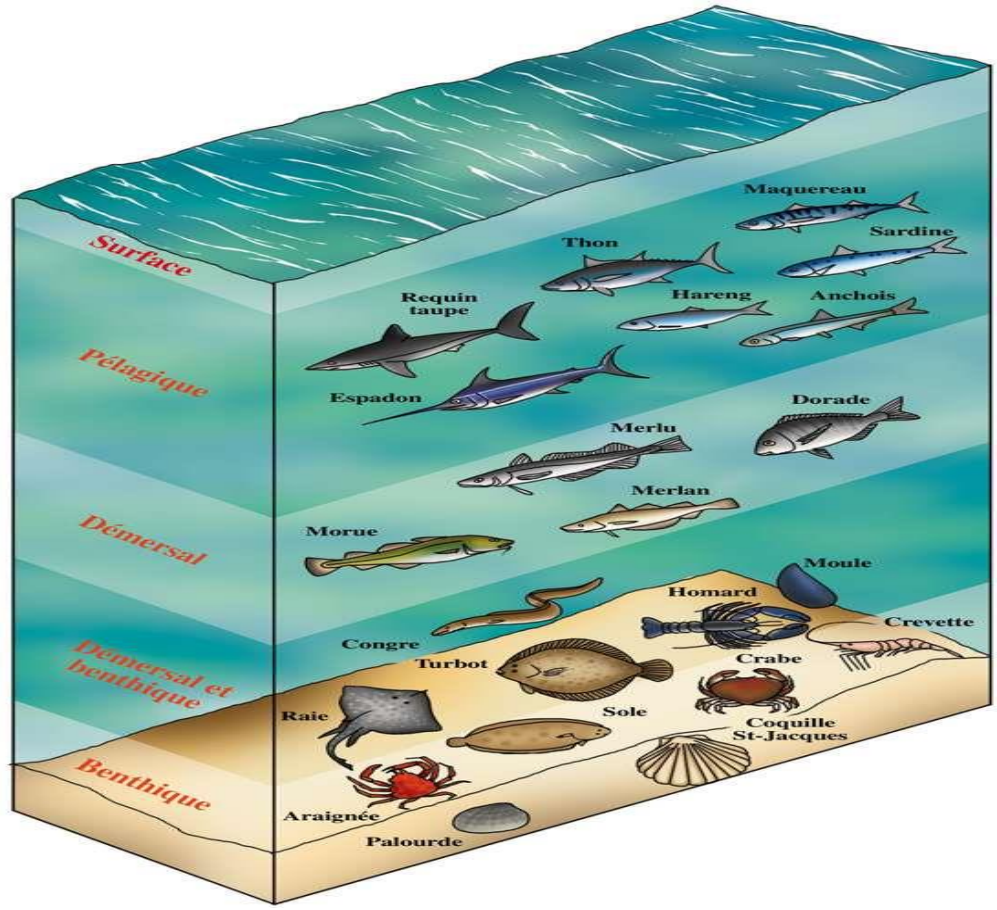


Figure 10 : Schéma montrant les différentes strates de la colonne d'eau (source : Ifremer)

Le taux d'oxyde de triméthylamine diffère également entre les deux espèces, les poissons démersaux en possédant une plus grande quantité. Le taux d'oxyde de triméthylamine est responsable de l'odeur de poisson (VENUGOPAL & SHAHIDI, 1996).

Tableau 6 : Tableau comparatif de la pression en oxygène (adapté SOLDATOV, 2018a)

Espèces animales	Pression de l'oxygène (hPa)			
	PaO_2	PvO_2	PcO_2	PmO_2
Mammifères	117,32	51,62	74,35	30,77
Poissons pélagiques	105,12	41	63.38	10,68
Poissons benthiques	68,57	20,02	36,45	5,71

Les valeurs des différentes pressions mesurées sont plus faibles pour les poissons benthiques que pour les poissons pélagiques (Tableau 6 ci-dessus). La pression artérielle de l'oxygène (PaO_2), la pression veineuse de l'oxygène (PvO_2) et la pression moyenne dans les capillaires sanguins de l'oxygène (PcO_2) montrent des valeurs proches chez le poisson pélagique et chez les mammifères alors que chez les poissons benthiques, ces pressions sont deux fois plus faibles. Le muscle squelettique chez le poisson pélagique présente une tension trois fois plus faible que chez le mammifère. Chez le poisson benthique, cette tension est 6 fois plus faible. Cette faible pression peut s'expliquer par une capacité de diffusion lente à travers la barrière hématoparenchymale (SOLDATOV, 2018).

Une différence au niveau de la composition en protéines et en eau peut être observée. Les muscles chez les poissons benthiques contiennent 40 % de protéines en moins. Il semble y avoir beaucoup de variations dans la composition protéiques des différentes espèces. Se baser sur les protéines pour différencier ne semble pas permettre de mettre en place une méthode ubiquitaire de différenciation. Il est alors possible de regarder à un autre niveau de l'activité cellulaire. D'autres différences peuvent être observées au niveau des activités enzymatiques. Trois exemples d'activités ont été particulièrement étudiées : la lactate déshydrogénase (LDH), la citrate synthase (CS) et la pyruvate kinase (PK), la LDH et la PK présentent des activités plus élevées chez les poissons pélagiques alors que la CS ne varie que très peu entre les différentes espèces. Ainsi, la CS ne permet de faire la distinction entre les poissons benthiques et les poissons pélagiques. La CS semble avoir une activité enzymatique semblable entre les espèces (SULLIVAN & SOMERO, 1980 ; SOMERO & CHILDRESS, 1990).

2. Description biologique

La daurade royale (*Sparus aurata*) (Figure 11 page 59) appartient à la famille des Sparidae. La daurade royale est reconnaissable grâce à la bande dorée au niveau de son front. Cette ligne la différencie de la daurade grise. La daurade possède un corps ovale, de couleur gris argenté. Une grosse tache noire est également repérable au niveau de la ligne latérale. La nageoire dorsale présente des épines au nombre de 11 ainsi que des rayons mous au nombre de 13. La nageoire anale présente quant à elle 3 épines ainsi que 11 rayons mous. Son habitat naturel se situe en Méditerranée, sur les côtes de l'est de l'Atlantique (de la Grande Bretagne au Sénégal). C'est une espèce dite euryhaline (supportant de grandes différences de salinité) et eurytherme (supportant de grandes différences de température). Elle est cependant sensible

aux températures froides (inférieures à 4°C) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009a). La daurade royale est l'espèce de daurade ayant la valeur marchande la plus élevée. Une comparaison entre la daurade royale et la daurade grise met en évidence des régimes alimentaires différents. La daurade royale est considérée comme opportuniste. Elle va se nourrir de ce qu'elle trouve mais préfère tout de même les gastropodes et les bivalves alors que la daurade grise a un régime alimentaire bien défini se nourrissant principalement de crustacés (PITA *et al.*, 2002).



Figure 11 : Daurade royale (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009a)

Le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) (Figure 12 page 59) appartient à la famille des Moronidae. Il possède un corps allongé. Ses écailles sont de petite taille, de couleur grisâtre avec parfois une coloration jaune au niveau du ventre. Deux nageoires dorsales sont présentes et la première possédant entre 8 et 10 épines et la seconde possédant une unique épine et 12 à 13 rayons mous. La nageoire anale possède elle 3 épines et entre 10 et 12 rayons mous. Il s'agit également d'une espèce eurytherme supportant des températures de 5°C à 28°C et euryhaline (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009b).

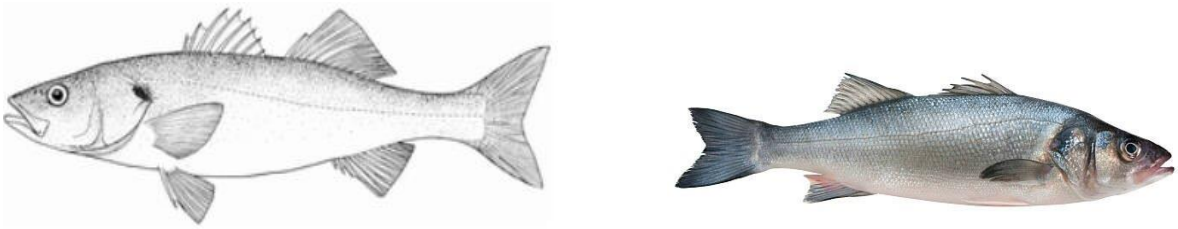


Figure 12 : Bar européen (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009b)

La truite saumonée (*Onchorynchus mykiss*) (Figure 13 ci-dessous) appartient à la famille des Salmonidae. Le corps de la truite est de forme allongée. Elle possède entre 60 et 66 vertèbres. Cette espèce possède une seule nageoire dorsale ayant entre 3 et 4 épines et 10 et 12 rayons mous. Ce poisson possède entre 3 et 4 épines anales ainsi que 8 à 12 rayons anaux. La nageoire caudale possède quant à elle 19 rayons. La truite est identifiable par sa couleur bleue à vert olive ainsi qu'à la bande rose le long de la ligne latérale. Elle supporte des températures comprises entre 0 et 27°C, cependant la ponte et la croissance se font dans une plage plus réduite de température (entre 9 et 14°C).

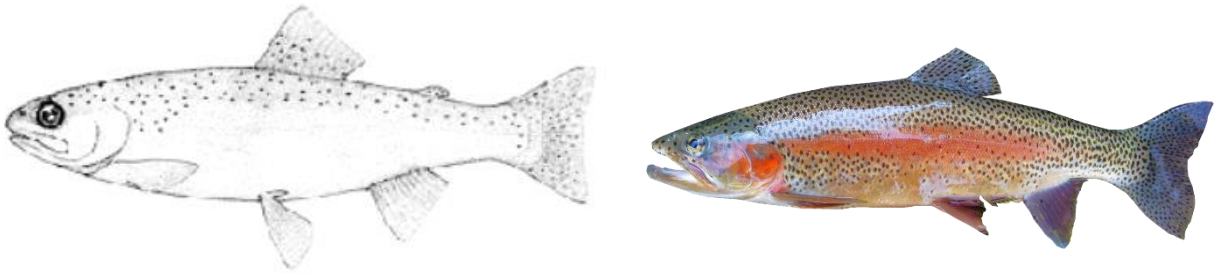


Figure 13 : Truite arc-en-ciel (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009c)

La coloration orangée de la chair de ce poisson est due à son alimentation. En milieu naturel, elle se nourrit principalement de petites crevettes contenant des pigments de caroténoïdes alors qu'en aquaculture, l'alimentation est supplémentée avec des pigments synthétiques tels que l'astaxanthine et la canthaxanthine (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009c).

3. Cycle de vie

La daurade royale est une espèce qualifiée d'hermaphrodite protandre, ce qui signifie qu'elle va d'abord se développer en tant que mâle pour ensuite devenir femelle durant sa troisième année d'existence, contrairement à la daurade grise qui est hermaphrodite protogyne c'est-à-dire qu'elle est d'abord femelle jusqu'à ses 4 ans puis devient mâle. Dans le milieu naturel, la reproduction a lieu entre octobre et décembre dans la mer Méditerranée. Les œufs ont une forme sphérique avec un diamètre inférieur à 1mm. Le stade larvaire planctonique dure environ 50 jours à une température de 18°C (SVÅSAND *et al.*, 2007).

Le bar quant à lui est gonochorique, c'est-à-dire porteur d'un seul sexe biologique. Les œufs de cette espèce sont pélagiques et de petite taille entre 1 mm et 1,4 mm.

En condition d'élevage, il est possible d'étendre la durée de reproduction mais également de modifier la période en contrôlant la température et la luminosité des bassins.

L'un des premiers stades de la vie larvaire est la consommation du sac vitellin constituant une alimentation endogène pour la larve. Ce stade a une durée d'environ 4 jours. Ensuite, le développement de la bouche et la pigmentation des yeux va s'effectuer, ce qui va permettre un changement au niveau de l'alimentation de la larve. Des rotifères lui sont alors donnés. Au bout de 10 jours la nourriture est supplémentée avec des nauplius. Elles conservent cette alimentation jusqu'à la fin de leur métamorphose, c'est-à-dire 35 jours après leur éclosion. Après 45 jours, les juvéniles sont transférés dans des bassins où le sevrage va avoir lieu.

Différents systèmes de production existent : les systèmes intensifs, les systèmes semi-intensifs et les systèmes extensifs.

Le système extensif (Figure 14 page 62) repose sur la capacité de migration des poissons. Ils seront alors capturés par des filets. Cependant il n'est pas possible avec cette méthode de prévoir la quantité de juvéniles qui sera capturée, des juvéniles provenant d'élevages vont alors rejoindre le stock obtenu par la pêche. Grâce à cette méthode, les daurades atteignent le calibre 300/450 en 20 mois. Avec cette technique, la densité de poisson est 2,5 $g.m^{-3}$. Le schéma ci-dessous représente la production dans un système extensif correspondant à de l'élevage.

Dans le cas du bar européen, les poissons sont capturés lors de leur migration vers la pleine mer à l'aide de la mise en place de barrière faite en roseaux. Dans ce système de culture, le bar n'est pas la seule espèce cultivée, il est en présence d'autres espèces. Le bar atteint sa taille commerciale au bout de 37 mois (400/500 g).

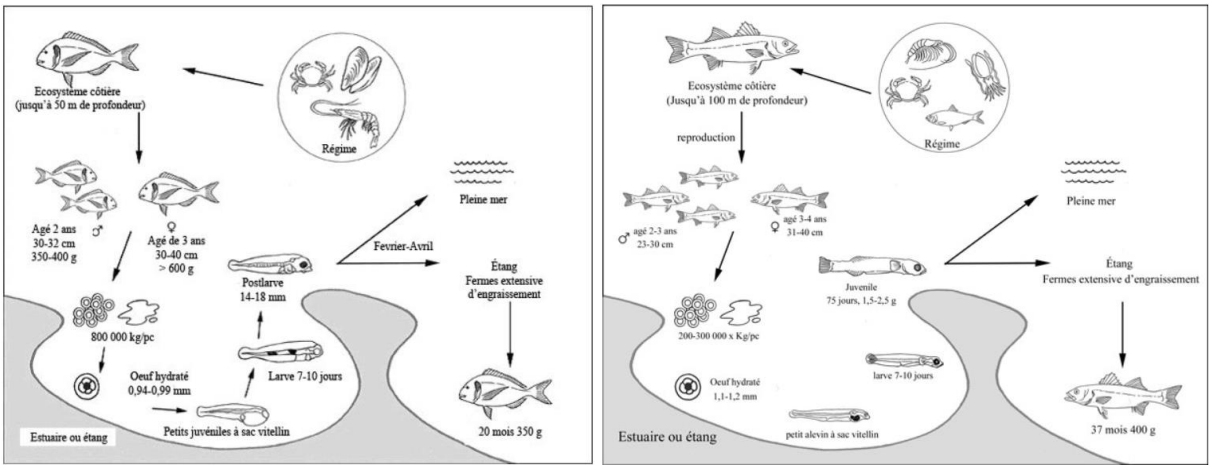


Figure 14 : Cycle de production en système extensif (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009a)

Dans les systèmes semi intensifs, un contrôle de l'environnement est effectué. Des juvéniles vont être apportés dans les lagunes pour minimiser la mortalité et permettre de réduire le temps d'élevage. Cette méthode est réalisée dans des filets placés dans les lagunes. La densité de poisson dans ce système est de 1 $kg.m^{-3}$.

Dans les systèmes intensifs (Figure 15 page 62), toutes les étapes sont contrôlées. Les densités d'élevage sont très élevées (15-45 $kg.m^{-3}$) quand l'élevage a lieu dans des bacs, il faut donc injecter de l'oxygène à concentration saturante pour permettre la survie des poissons. Les poissons peuvent sous ces conditions atteindre la taille commerciale en 1 an. Il est également possible de faire ce type d'élevage dans des cages disposées en mer, avec une densité de populations plus faibles que celle en bac (10-15 $kg.m^{-3}$). Cette méthode ne permet pas de contrôler la température de l'eau, ce qui va avoir pour conséquence une croissance plus longue mettant jusqu'à 16 mois pour atteindre la taille commerciale. Pour le bar européen, les mêmes étapes sont réalisées. Pour atteindre sa taille commerciale, il lui faut 18 mois.

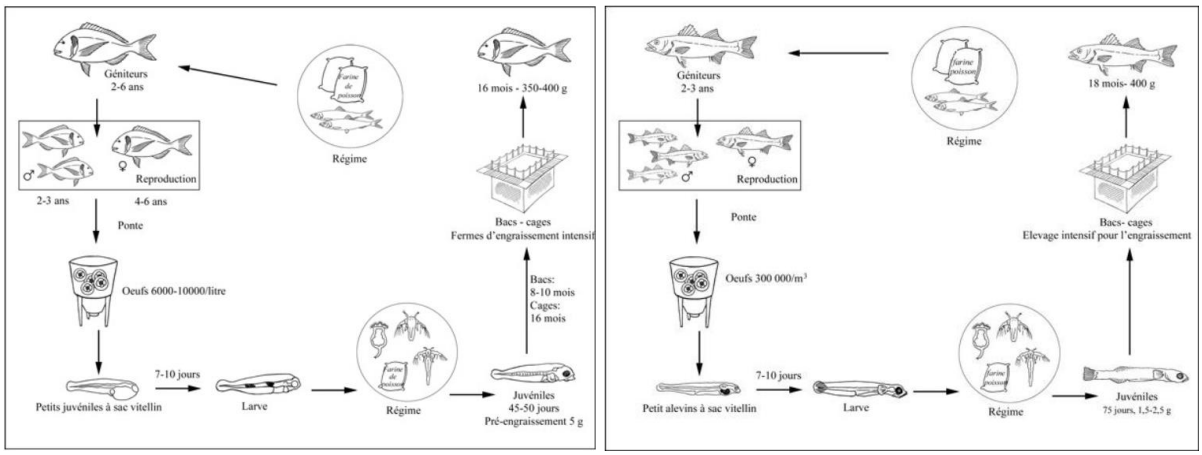


Figure 15 : Cycle de production en système intensif (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009a)

Contrairement au bar et la daurade, la truite ne se reproduit pas naturellement dans les systèmes d'élevage. Il faut une étape de ponte artificielle (Figure 16 page 63). Les œufs présentent une taille comprise en 3 et 7 mm. En règle générale, il y a une seule ponte par an (au printemps) cependant les avancées technologiques ont permis de sélectionner des espèces pouvant pondre toute l'année. Une des premières étapes est la sélection des géniteurs, les femelles sont âgées d'environ 3 ans. Il faut 1 mâle pour 3 femelles. Ensuite il y a l'étape de fécondation. Celle-ci s'effectue à sec c'est-à-dire sans eau. Les ovocytes sont récupérés en pressant les côtés au niveau des nageoires pelviennes. Une femelle peut pondre jusqu'à 2000 ovocytes par kg du poids du poisson. Ils sont conservés dans un récipient sec et gardés à sec jusqu'à la fécondation. De la même manière, la laitance des mâles est collectée. Les laitances de différents mâles sont mélangées. Puis les laitances sont mélangées avec les ovocytes. A ce stade de l'eau est introduite permettant l'augmentation de la taille des ovocytes en remplissant l'espace périvitellin et l'activation du sperme. Les œufs sont ensuite incubés jusqu'au stade œillé. L'éclosion des œufs a lieu après 4 à 14 semaines. On arrive alors au stade larvaire. La larve possède un sac vitellin pouvant durer entre 2 et 4 semaines. Une fois les larves ayant atteint environ 10 cm, elles sont placées dans un bac de grossissement. La taille commerciale des truites est atteinte au bout de 9 mois.

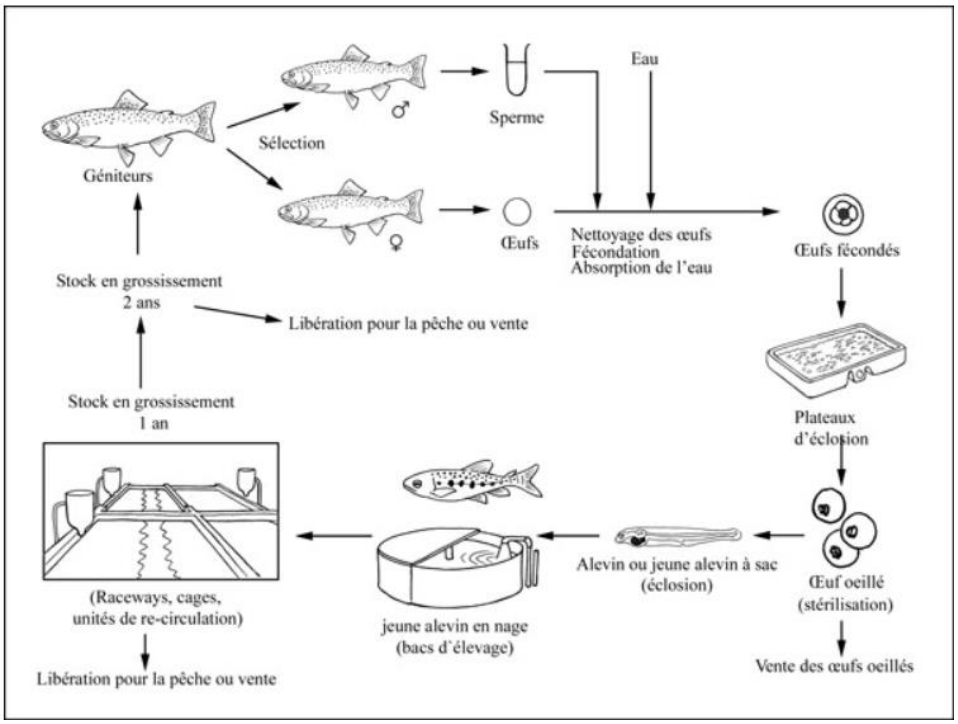


Figure 16 : cycle de production de la truite arc-en-ciel (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009c)

4. Comparaison entre l'élevage et l'aquaculture

Les conditions de vie pour les poissons d'aquaculture et les poissons sauvages sont différentes, ils n'auront pas la même activité. Les poissons d'aquaculture auront une activité plus faible que les poissons sauvages qui eux vont devoir nager plus longtemps pour trouver de la nourriture. L'activité physique plus intense aura pour conséquence un tissu rouge plus développé et des mitochondries présentes en plus grand nombre. L'accès à la nourriture n'est pas le même, les périodes de reproduction diffèrent également. Outre des différences morphologiques, il peut également être constaté des différences physiologiques. L'aquaculture a permis d'uniformiser les conditions de vie des daurades. En milieu naturel les daurades sont soumises à différents facteurs environnementaux qui peuvent influencer la composition du poisson. Une des mesures effectuées est l'index gonadosomatique. Il a été constaté que les poissons d'aquaculture avaient un index gonadosomatique qui augmentait entre novembre et janvier, ce qui correspond à la période de reproduction naturel chez la daurade. Cependant la valeur trouvée chez le poisson d'élevage est faible (0,82) ce qui indique que les poissons n'ont pas atteint une maturité complète. En revanche, chez le poisson sauvage l'index gonadosomatique atteint 5,71 indiquant ainsi que les poissons ont atteint leur maturité sexuelle. La composition en gras a également été mesurée. Plusieurs conclusions en ont été tirées. Les poissons d'élevage présentent une réduction de la graisse entre janvier et mai. Cependant, les taux de masse graisseuse sont plus élevés chez les daurades d'aquaculture (9,8 ± 1,4 %), les poissons sauvages contenant 1,2 ± 1 % de masse graisseuse. Les poissons sauvages ne semblent pas stocker de gras au niveau de la cavité péritonéale. La masse graisseuse va jouer sur la perception du consommateur quant à la qualité du poisson. (ALASALVAR *et al.*, 2002). Un autre paramètre diffère entre le sauvage et l'aquaculture, c'est la composition en acides gras. En aquaculture, les poissons contiennent des valeurs plus élevées de mono insaturés et d'acides gras n-9, alors que les sauvages présentent plus d'acides gras insaturés (34,49 % pour les sauvages contre 28,15 % pour les poissons d'aquaculture). L'acide gras monoinsaturé 22 :1n-11 est présent dans les poissons d'aquaculture mais absent chez les poissons sauvages, sa présence étant le résultat de l'alimentation des poissons d'aquaculture. Chez les poissons sauvages, de l'acide arachidonique est retrouvé en plus grande quantité (GRIGORAKIS *et al.*, 2002). Outre ces caractéristiques physiologiques, des différences physiques existent entre l'élevage et l'aquaculture. Celles-ci sont répertoriées dans le Tableau 7 ci-

dessous. Un des premiers points, permettant de distinguer les deux, est la taille du poisson. Les poissons d'aquaculture sont plus grands que les poissons sauvages. De même, la couleur est différente. Les poissons sauvages présentent des couleurs plus pâles et irisées. Les poissons sauvages présentent également une bande dorée entre les deux yeux.

Tableau 7 : Tableau comparatif entre la daurade royale et la daurade d'élevage (GRIGORAKIS et al., 2002)

	Wild gilthead sea bream	Cultured gilthead sea bream
Body shape	Lower body height, sharper snout, more spindle-shaped	Higher body height, snout more rounded and with slight prognathism
Colour	More bleached appearance, species-characteristic iridescent colours (a golden band between the eyes, and a red patch on the side of the head on the gill cover)	Much more darker dorsal and head area, iridescent colours (species characteristic) much duller, if existing at all
Skin (epidermis)	Skin thinner	Much harder skin, with thicker walls
Scales	Many scales, relatively easy to detach	Few scales, very difficult to detach
Teeth	Teeth more developed, sharper with bigger height and conical edge	Teeth very small rounded, almost of square shape
External smell	Much softer smell, of fresh sea weed	Heavier smell, sometimes almost of fish oil

La composition en lipides est également différente entre les poissons sauvages et les poissons d'élevage. La teneur en lipides va impacter le goût ainsi que l'aspect de la chair une fois cuite. Les lipides sont un des composants précurseurs des composés aromatiques. Les poissons sauvages (0,92 %) contiennent moins de lipides que les poissons d'aquaculture (4,29 %). Les daurades sauvages possèdent des différences organoleptiques avec les poissons d'élevage induisant une meilleure qualité gustative chez le poisson sauvage (GRIGORAKIS, 2007 ; ŠIMAT *et al.*, 2012).

5. Bilan du chapitre IV

Les poissons appartenant aux différents étages de la colonne d'eau possèdent des caractéristiques différentes. Plusieurs paramètres permettent de différencier les poissons benthiques, des poissons pélagiques. Une distinction peut également se faire entre les poissons d'élevage et les poissons sauvages notamment en se basant sur la composition en acides gras (SAITO *et al.*, 2007). Des différences au niveau de la composition en lipides sont également observables. La diversité des produits aquatiques consommés nécessite alors une méthode ubiquitaire de différenciation entre les poissons frais et les poissons décongelés. Il faut donc trouver un paramètre ayant peu ou pas de variabilités entre les différentes espèces.

V. Méthodes de détermination de la fraîcheur et de différenciation frais/décongelé déjà existantes

1. Analyses sensorielles

La fraîcheur du poisson a d'abord été réalisée par le biais des analyses sensorielles. Ces tests se basent sur le goût, l'odeur et l'aspect. Ce sont des méthodes qualitatives. L'une d'elles est la méthode de l'indice qualité (QIM). Les grilles de cotation sont adaptées à chaque espèce. Des évaluateurs sont dans un premier temps sélectionné. Ces évaluateurs attribuent alors des notes pour les différents caractères. Certaines caractéristiques sont notées 0 ou 1, c'est-à-dire que l'on est en absence ou en présence d'une altération. Il n'y a pas de niveau intermédiaire. Pour d'autres caractéristiques telles que l'odeur, les notes vont de 0 à 3. Ces notes permettent de suivre les différentes étapes d'altération du produit. Plus l'index qualité est élevé, plus le produit est altéré (FAO, 2023). La grille d'évaluation, (Figure 17 page 67) présente les caractères pris en compte pour déterminer le niveau de fraîcheur du saumon. Quatre caractères principaux sont pris en compte : la peau, les yeux, les branchies et l'abdomen. Chacun des caractères est ensuite décliné. Ainsi pour la peau, sa couleur, son mucus, son odeur et sa texture seront jugés. Pour les yeux, la couleur des pupilles ainsi que leurs formes seront évaluées. Pour les branchies, on regardera la couleur, le mucus et on évaluera également l'odeur émanant des branchies. Enfin, la couleur présente au niveau de l'abdomen ainsi que l'odeur provenant de celui-ci seront jugées.

Critères d'évaluation		Description	Points
Peau	Couleur	Brillante	0
		Moins brillante	1
		Jaunâtre, principalement près de l'abdomen	2
	Mucus	Clair, pas coagulé	0
		Laiteux, coagulé	1
		Jaune et coagulé	2
	Odeur	D'algues fraîches, neutre	0
		De concombre, métallique, de foin	1
		Aigre, de linge mouillé	2
		Putride	3
	Texture	Ferme, élastique (en *Rigor*)	0
		La marque du doigt disparaît rapidement	1
		Le doigt laisse une marque au-delà de 3 secondes	2
Yeux	Pupille	Transparente, noire et brillante	0
		Gris foncé	1
		Mate, grise	2
	Forme	Convexe	0
		Plate	1
		Affaissée	2
Branchies	Couleur	Rouge brun foncé	0
		Rouge pâle, rose brun	1
		Gris brun, brune, grise, verte	2
	Mucus	Transparent	0
		Laiteux, coagulé	1
		Brun, coagulé	2
	Odeur	Fraîche, d'algues	0
		Métallique, de concombre	1
		Aigre, de moisi	2
		Putride	3
Abdomen	Sang	Absence ou sang rouge	0
		Sang brun, jaunâtre	1
	Odeur	Neutre	0
		De concombre, de melon	1
		Aigre, de fermentation	2
		Putride, de chou	3
Index de Qualité			0-24

Figure 17 : Système d'évaluation de la qualité pour le saumon (IFREMER, 2009a)

La méthode sensorielle peut également être utilisée pour différencier les poissons entiers frais des poissons entiers décongelés, juste par l'observation de certains critères. Ainsi un poisson décongelé présente un œil opaque contrairement à un poisson frais, de même une décoloration des branchies peut être observée sur le poisson décongelé. Il est également possible de regarder la capacité de rétention de l'eau du poisson, le poisson décongelé ayant une capacité amoindrie.

2. Analyses physico-chimiques, microbiologiques

Différentes analyses permettent la mesure de la fraîcheur mais aussi la distinction entre les produits frais et les produits décongelés. Plusieurs paramètres peuvent être envisagés pour ces analyses.

Mesure de la fraîcheur par mesure des amines

Mesure des ABVT

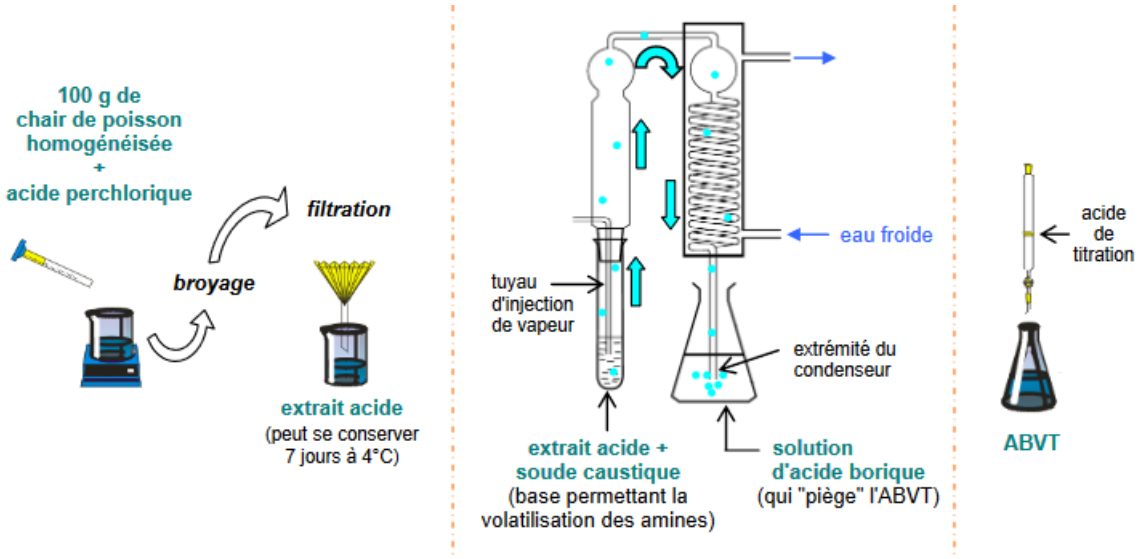


Figure 18 : Schéma de la méthode permettant le dosage des ABVT (IFREMER, 2008a)

Sous l'appellation ABVT sont retrouvés les triméthylamines ($(CH_3)_3N$), les diméthylamines ($(CH_3)_2NH$) et l'ammoniac (NH_3). Ce sont les produits de la dégradation microbiologique des protéines. Les DMA et les TMA sont les produits de dégradation de l'oxyde de triméthylamine (OTMA). Pour détecter ces composés (Figure 18 ci-dessus), une extraction est réalisée à l'aide d'une solution d'acide perchlorique. Cette étape est suivie d'une distillation de l'extrait qui est ensuite collecté dans de l'acide borique. L'extrait est ensuite titré à l'aide l'acide chlorhydrique (PACQUIT *et al.*, 2005). Des seuils ont été déterminés permettant d'évaluer l'altération de la fraîcheur. Cependant la mesure seule de l'ABVT n'est pas fiable. Il faut aussi mesurer le taux de triméthylamines (Tableau 8 ci-dessous). Les triméthylamines sont dosées par des dosages enzymatiques et colorimétriques.

Tableau 8 : Valeur seuil déterminant l'état de fraîcheur des poissons (IFREMER, 2008a)

ABVT (mg N / 100 g)	**TMA / ABVT** (%)	**Etat de fraîcheur**
< 20	< 17%	Satisfaisant
20 - 25	17 - 40 %	Acceptable
> 25	> 40 %	Non satisfaisant

L'évolution du taux d'ABVT est lié à la croissance microbienne. Ainsi, trois niveaux d'état de fraîcheur sont identifiés. Un état satisfaisant où la concentration en ABVT est faible (inférieur à 20 mg N.100 g^{-1}), un état acceptable où le produit peut encore être consommé (concentration comprise entre 20 et 25 mg N.100 g^{-1}) et un état non satisfaisant où l'état de croissance microbien est important et le taux d'ABVT est élevé (supérieur à 25 mg N.100 g^{-1}) (IFREMER, 2008a). Les résultats obtenus par la mesure de l'ABVT sont cependant à relativiser

puisque plusieurs limites se posent. L'ABVT ne peut pas être utilisé comme critère d'altération pour toutes les espèces. En effet, une significativité faible de l'ABVT est retrouvée chez les thonidés mais aussi chez le bar commun, de même que pour les poissons gras. Dans ces cas, les résultats sont difficilement interprétables. Certains modes de conservation ne permettent pas non plus l'utilisation de l'ABVT, notamment pour les poissons ayant été mis en conserve ou cuisinés. Ces procédés vont modifier les taux d'ABVT. Les teneurs en ABVT sont également dépendantes des modes de conservation mais aussi de l'espèce, du lieu de pêche. La mesure des ABVT ne permet pas de refléter l'état d'altération du poisson. Ainsi, l'utilisation de glace liquide va partiellement éliminer les composés volatils. L'utilisation de la méthode de mesure de l'ABVT n'est pas utilisable non plus pour les poissons ou filets congelés/décongelés et conservés sur glace (IFREMER, 2008b). La détermination de la fraîcheur à l'aide de l'ABVT, ne permet pas d'obtenir des résultats fiables. Une autre méthode basée elle aussi sur les amines mais cette fois-ci biogènes peut être utilisée.

Mesure des amines biogènes

Les amines biogènes sont des composés organiques. Ces molécules peuvent présenter des structures différentes telles qu'aliphatique, hétérocyclique ou aromatique. Ils sont les produits de la décarboxylation des acides aminés libres sous l'action de décarboxylases bactériennes. Les amines biogènes sont l'histamine, la tyramine, la putrescine et la cadavérine. Les amines biogènes sont quantifiés par des méthodes chromatographiques (HPLC, GC-MS …), par des méthodes spectroscopiques (VIS, NIR) ou par des méthodes colorimétriques (DUFLOS *et al.*, 1999 ; SØRENSEN *et al.*, 2018). Un indice de qualité peut être calculé par la formule suivante :

$$Indice\ chimique = \frac{\text{Putrescine} + \text{Cadaverine} + \text{Histamine}}{1 + \text{Spermidine} + \text{Spermine}}$$

Cet index est utilisé pour le thon en conserve, les filets de saumon et les sébastes. Pour les autres espèces, cet index n'est pas représentatif de la qualité du produit, c'est pour cela qu'un autre index a été mis en place :

$$\text{Indice amine} = \frac{\text{Putrescine} + \text{Cadavérine} + \text{Histamine}}{\text{Putrescine} + \text{Cadavérine} + \text{Histamine} + \text{Trypamine} + \text{Méthylamine} + \text{Spermidine} + \text{Spermine}}$$

Cependant, cet index ne semble toujours pas représentatif puisqu'il varie selon les espèces de poisson. Les stades précoces de détérioration ne sont pas détectables (PRABHAKAR *et al.*, 2020).

Mesure de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides est liée à l'altération de l'odeur et de la saveur chez le poisson. Les lipides sont susceptibles de subir une oxydation à cause de leur forte concentration en acides gras insaturés. La détection se fait par des méthodes chromatographiques (YARNPAKDEE *et al.*, 2011). Une des méthodes les plus utilisées est le dosage de l'acide thiobarbiturique (TBARS). Ce dosage permet de mesurer le malondialdéhyde présent dans l'échantillon. La réaction repose sur la liaison entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique, ce qui induit une coloration rougeâtre (FAO, 2023). Il est également possible de mesurer l'indice de peroxyde, qui correspond à la mesure de la quantité d'oxygène lié à un corps gras sous forme de peroxydes (ISO, 2017). Cependant les méthodes basées sur l'oxydation des lipides ne permettent pas de donner des réponses fiables sur l'altération des poissons. Notamment l'indice de peroxyde ne permet pas une corrélation avec le développement de la rancidité d'un produit.

Mesure des dérivés nucléotidiques

La valeur K est utilisée comme un marqueur de fraîcheur. Elle se base sur la dégradation de l'ATP (adénosine tri phosphate). L'ATP va se décomposer en ADP (adénosine di phosphate) qui lui va se décomposer en AMP (adénosine mono phosphate). C'est cet AMP qui va donner l'IMP (inosine 5'-monophosphate). Les taux d'IMP sont liés à la saveur du poisson. La décroissance du taux IMP est liée à la perte de goût chez le poisson. L'IMP est converti en inosine puis en hypoxanthine. Les taux d'ATP, d'ADP, d'AMP, d'IMP, d'inosine et d'hypoxanthine peuvent être déterminé par chromatographie liquide à haute performance (SAITO *et al.*, 2007).

$$\mathrm{K}(\%) = \frac{\mathrm{Inosine} + \mathrm{Hypoxanthine}}{\mathrm{ATP} + \mathrm{ADP} + \mathrm{AMP} + \mathrm{IMP} + \mathrm{Inosine} + \mathrm{Hypoxanthine}} x\ 100$$

Des différences au niveau des taux d'inosine 5'-monophosphate entre les espèces sauvages de daurade royale et les espèces d'aquaculture peuvent être observées. Juste après la mort, les taux entre le poisson sauvage et le poisson de l'aquaculture sont semblables : 13 µmol.g^{-1} contre 12,8 µmol.g^{-1}. La différence se situe dans la décroissance des taux. Le taux pour les poissons d'aquaculture atteint 10,8 µmol.g^{-1} au bout de 5 jours alors que le taux pour les poissons sauvages décroit beaucoup plus vite. Il atteint 7,5 µmol.g^{-1}. Cette décroissance rapide

peut être liée au stress induit par la capture du poisson ou alors lié aux différences environnementales et physiologiques entre les deux poissons (ALASALVAR *et al.*, 2002).

Mesure du pH

Le pH évolue après la mort du poisson. Une mesure peut être effectuée à l'aide de l'humeur vitrée de l'œil. Une augmentation du pH est observée en conséquence du temps de stockage (MAJOLINI *et al.*, 2009). L'utilisation du pH montre des limites puisqu'il n'est pas considéré comme un bon marqueur. En effet, des changements peuvent être induits par la température (FRANCESCHELLI *et al.*, 2021).

Mesure de la flore microbienne

Des changements au niveau de la flore bactérienne vont être retrouvés après la mort et durant le stockage du poisson. Ces changements entrainent des altérations au niveau du produit. La croissance de la flore bactérienne est liée au changement de pH du produit. Une augmentation du pH induit une augmentation de la croissance bactérienne. Différentes populations peuvent être recherchées pour prouver la fraîcheur du poisson telles que *Shewanella putrefaciens* (productrice d'H_2S) et *Photobacterium phosphoreum* (IFREMER, 2009b). Cette dernière souche est responsable de la formation de TMA et donc le taux de TMA est le reflet de la croissance bactérienne (PRABHAKAR *et al.*, 2020).

Méthodes enzymatiques

Le suivi des activités enzymatiques permet de faire la distinction entre les produits frais et les produits décongelés. Ces méthodes permettent de suivre la libération de certaines enzymes notamment mitochondriales (citrate synthase …) dans les exsudats. Une étude réalisée sur trois espèces : le carrelet (*Pleuronectes platessa*), le merlan *(Merlangus merlangus*) et le maquereau (*Scomber scombrus*), a permis de mesurer l'activité enzymatique de l'α-glucosidase (enzyme lysosomale). Les exsudats des filets de poissons décongelés présentent une activité enzymatique plus élevée que pour les filets frais. Ceci s'explique par la libération des enzymes par la congélation dans le milieu extracellulaire (DUFLOS *et al.*, 2002). Une autre enzyme a également démontré son intérêt dans la différenciation entre les filets frais et les filets décongelés : la lactate déshydrogénase. C'est une enzyme cytosolique. Comme pour l'étude précédente, la congélation induit la libération de cette enzyme dans le milieu extracellulaire, c'est-à-dire dans les exsudats. Un suivi de l'activité de la lactate

déshydrogénase montre une activité plus importante de l'enzyme dans les filets décongelés (DIOP *et al.*, 2016).

Méthode protéomique

Cette méthode permet de mesurer les altérations au niveau des protéines mais également leur possible libération dans le milieu extracellulaire par électrophorèse bidimensionnelle et par chromatographie liquide à haute résolution couplée à de la spectrométrie de masse. Une étude réalisée sur le bar commun a permis d'identifier la parvalbumine (protéine liant le calcium) comme protéine d'intérêt. La congélation a induit une altération au niveau de la membrane ce qui a conduit à la libération de la protéine dans les exsudats (Figure 19 ci-dessous) (ETHUIN *et al.*, 2015).

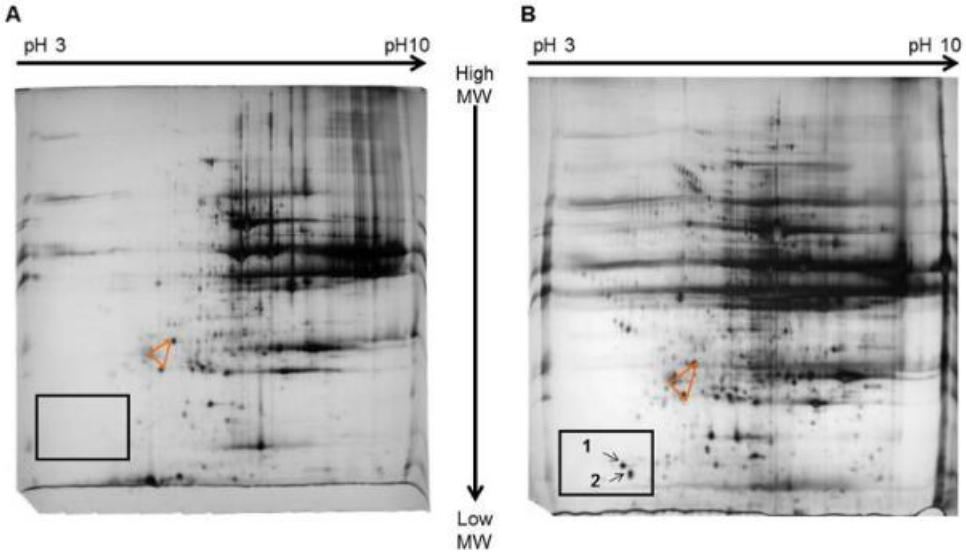


Figure 19 : Gel d'électrophorèse A : filet frais, B : filet décongelé (1,2 : parvalbumine) (ETHUIN et al., 2015)

Une autre étude réalisée sur la pieuvre blanche (*Eledone cirrhosa*) a cette fois identifié la transgeline (protéine de liaison à l'actine) comme protéine d'intérêt. La congélation a eu pour conséquence une altération au niveau de la protéine ce qui se traduit par une présence moindre de la protéine (Figure 20 ci-dessous) (GUGLIELMETTI *et al.*, 2018).

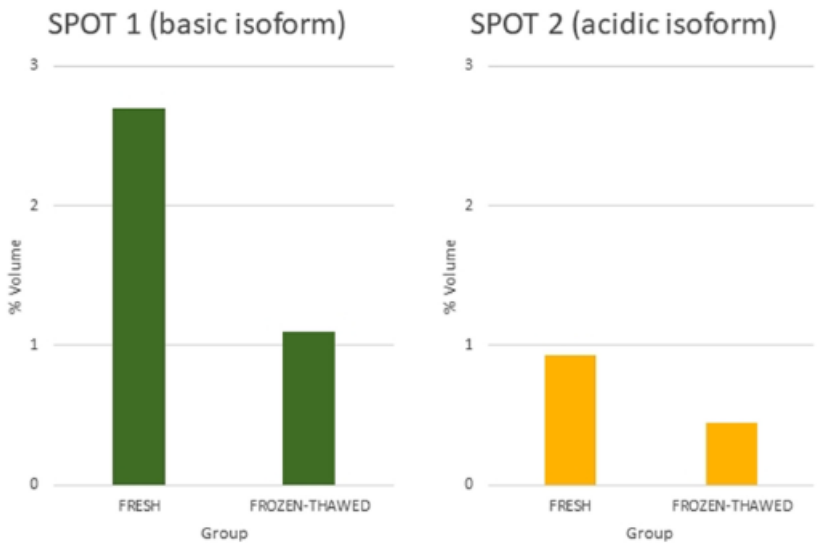


Figure 20 : Histogramme montrant la quantité de transgéline détectée dans les filets frais et les filets décongelés (GUGLIELMETTI et al.*, 2018)*

Méthode de la comète

C'est une technique d'électrophorèse permettant de mesurer les altérations (cassures au niveau de l'ADN). Un ADN non altéré sera présent sous la forme d'un spot en revanche un ADN altéré par l'action des endonucléases présentera des fragments en dehors du spot, ces fragments formant un halo derrière le spot. C'est l'association entre le spot et le halo qui donne une forme de comète (LE GRANDOIS *et al.*, 2013)

3. Méthodes spectroscopiques

Spectroscopie infrarouge

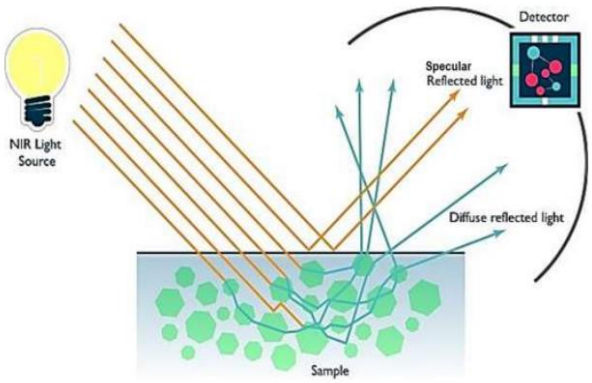


Figure 21 : Principe de la spectroscopie NIR (2016)

Cette technique (Figure 21 ci-dessus) ne nécessite pas ou peu de préparation du matériel biologique. Il s'agit d'une méthode d'imagerie in vivo. Elle permet de voir les altérations d'un

tissu en suivant la réflectance du produit. Cette méthode est basée sur les changements structuraux, sur la vibration des liaisons chimiques. Un échantillon est traversé par un faisceau lumineux. Une partie de la lumière incidente est absorbée conduisant à une intensité lumineuse plus faible à la sortie de l'échantillon. La composition chimique est alors déterminée par son comportement lors de cette phase puisque chaque élément constituant cette molécule a son propre mode de vibration. Cette méthode permet de visualiser les modes de vibrations des liaisons C-H et O-H. Ces liaisons sont liées à la relaxation de la structure lipidique et à la libération d'exsudats lors de la rupture des membranes cellulaires (NIETO-ORTEGA *et al.*, 2021). Suivant l'espèce étudiée, cette méthode permet d'identifier un poisson frais d'un poisson congelé/décongelé à environ 90%. La congélation induirait un changement au niveau de l'absorbance totale du tissu. Les altérations induites par la congélation/décongélation provoquent un changement au niveau de la diffusion de la lumière. Les spectres d'absorbance entre les produits frais et les produits décongelés présentent des différences, ces différences étant liées au changement de la composition chimique induite par la congélation (UDDIN *et al.*, 2005 ; MENDEZ *et al.*, 2019 ; ZHOU *et al.*, 2019).

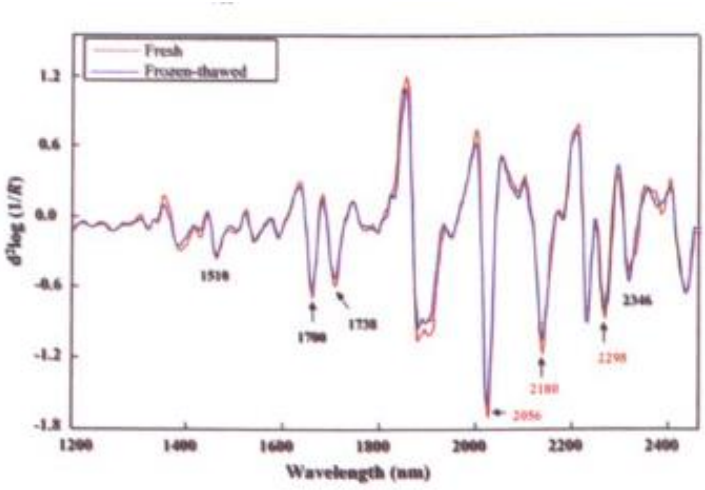


Figure 22 : Spectre de réflectance d'un filet frais et d'un filet décongelé de chinchard (UDDIN & OKAZAKI, 2004)

Dans une étude portant sur le chinchard (Trachurus trachurus), les spectres de réflectance des filets frais et des filets décongelés ont été comparés (Figure 22 ci-dessus). Des différences entre les spectres peuvent être observées à différents points d'absorbance, ce qui indique des changements dans la composition des protéines des produits décongelés. Les produits frais présentent des pics d'absorption de plus grandes amplitudes (UDDIN & OKAZAKI, 2004).

Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence permet d'analyser la fluorescence d'un échantillon. La molécule d'intérêt est excitée et va alors émettre des photons. Ce sont ces photons qui seront observés dans le spectre d'émission. Cette méthode est non seulement utilisée pour mesurer le niveaux d'oxydation des acides gras insaturés (KAROUI *et al.*, 2006 ; KAROUI & BLECKER, 2011 ; HASSOUN *et al.*, 2019) mais également pour différencier les produits frais des produits décongelés. Différents fluorophores peuvent être utilisés tels que le tryptophane, le NADH, la riboflavine … La position du pic d'émission varie en fonction des conditions de stockage du produit. Les différences dans les spectres peuvent être liées à l'oxydation des lipides conduisant à une modification de l'interaction protéine-lipide (HASSOUN, 2021, KAROUI *et al.*, 2017).

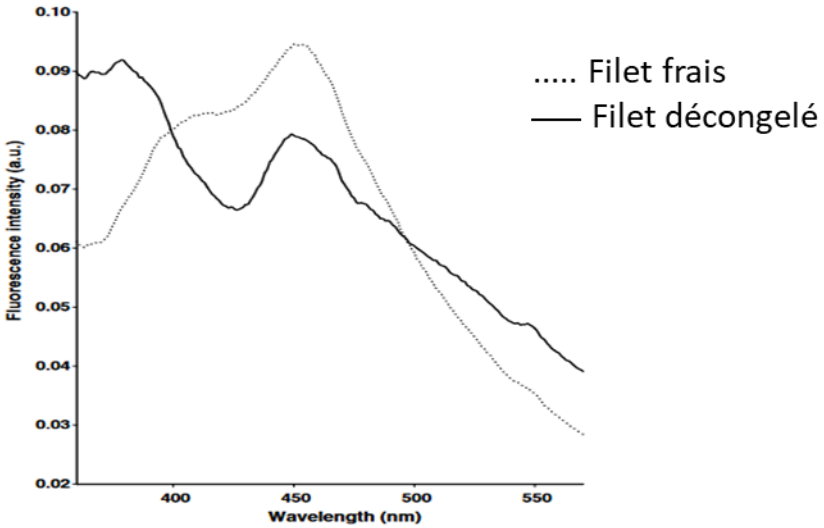


Figure 23 : Spectre de fluorescence du NADH pour les filets frais et les filets décongelés de Merlan (KAROUI et al., 2006)

Dans une étude portant sur le merlan (Figure 23 ci-dessus), le NADH a été utilisé comme fluorophore permettant la distinction entre les filets frais et les filets décongelés. L'excitation du NADH se fait à 340 nm et l'émission se fait à 460 nm. Ici, le spectre d'émission du NADH pour le filet frais présente un épaulement à 403 nm et un pic à 455 nm. En revanche pour le filet décongelé, le NADH présente un pic d'émission à 379 nm et un épaulement à 455 nm. La différence entre les deux spectres pourrait selon les auteurs s'expliquer par un changement dans l'environnement du fluorophore et à la hausse de l'activité du HADH (β-hydroxyl-CoA-déshydrogénase).

Spectroscopie Raman

Cette technique est non destructive. Elle est basée sur la mesure des vibrations fondamentales des groupes fonctionnels. La spectroscopie Raman permet de déterminer la structure des

protéines en communiquant des informations sur les structures secondaires et tertiaires des protéines. Les différents composés vont sortir à des ondes différentes. Les résidus aliphatiques hydrophobes par exemple sortiront à deux endroits différents, les groupements CH_2 et CH_3 sortiront à 1450 cm^{-1}, les groupements CH sortiront quant à eux à 2930 cm^{-1}.Elle permet également de donner la structure des lipides, en communiquant la composition en acides gras ainsi que le degré de saturation de ces acides gras (HERRERO, 2008). Une étude réalisée sur du maquereau (ZHANG *et al.*, 2020), a permis de montré que les spectres Raman présentaient des spectres d'émission avec des intensités différentes. Ces différences sont liées à la modification du mode de vibration des liaisons C-H. Les produits ayant été congelés/décongelés présentent des spectres d'émission de plus faibles intensités que les filets frais (Figure 24 ci-dessous).

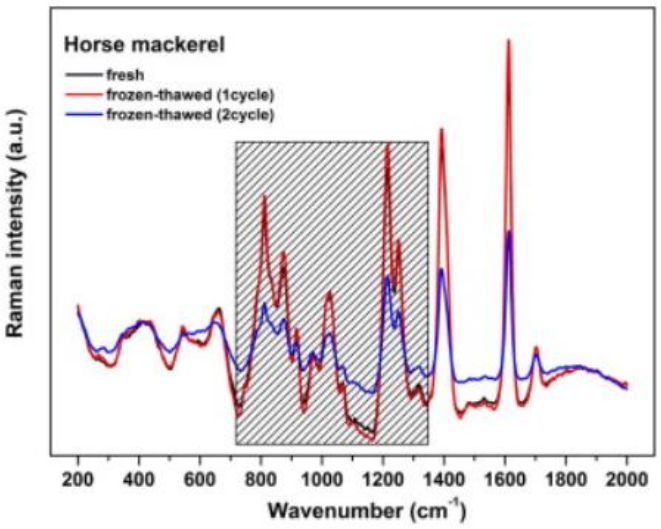


Figure 24 : Spectre Raman de filets frais et décongelés de maquereau (ZHANG et al., 2020)

Spectroscopie RMN

Cette méthode se base sur la capacité des molécules à avoir deux états d'énergie différents : un état de basse énergie et un état de haute énergie. Les radiations électromagnétiques entrainent le passage d'un niveau de basse énergie à un niveau de haute énergie. Après arrêt de la radiation, le noyau entre en relaxation et on obtient le phénomène de décroissance libre d'induction (FID). A l'aide de la transformation de Fourier, on obtient le spectre RMN.

Cette méthode permet la distinction entre le frais et le décongelé par la mesure de la concentration de différents métabolites. Des études se sont concentrées sur trois métabolites le fumarate, la phénylalanine et l'aspartate (Figure 25page 77). Il a été déterminé que seul l'aspartate présente un intérêt. Chez un poisson frais, on ne retrouve pas de trace d'aspartate. En revanche chez le poisson ayant subi un stade de congélation/décongélation, entre 3,5 et

3,8 mg d'aspartate pour 100 g de chair de poisson sont retrouvés. La formation d'aspartate serait liée à l'activité de l'aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1) qui permettrait le transfert d'un groupement amine de l'α-cétoglutarate vers le L-aspartate. (SHUMILINA *et al.*, 2020).

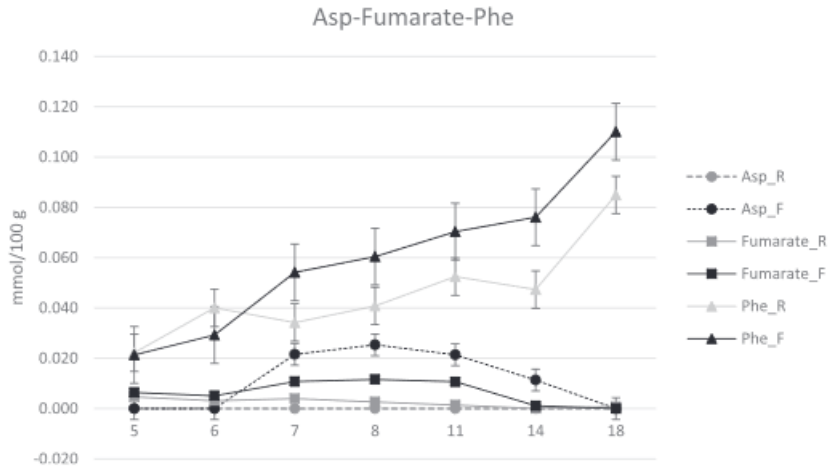


Figure 25 : Concentration de l'aspartate, du fumarate et de la phénylalanine (gris : filet frais ; noir : filet décongelé)

4. Bilan du chapitre V

De nombreuses méthodes sont utilisées pour différencier les produits frais des produits décongelés. Les méthodes sensorielles sont basées sur la sensibilité des testeurs à différents indices qualité. Les autres méthodes sont spectroscopiques et sont basées pour la plupart sur les changements d'états des électrons de la matière mais également sur les propriétés la réflectance de l'échantillon. Les méthodes présentées dans ce chapitre correspondent à des techniques de laboratoire. Certaines de ces méthodes ont l'avantage d'être rapide à mettre en place cependant elle reste des méthodes utilisées uniquement en laboratoire et difficile à utiliser en dehors du laboratoire. Elles demandent toutes un matériel spécifique que certains laboratoires ne possèdent pas. Ces méthodes sont également dépendantes de l'espèce de poisson et de ces conditions d'élevage. C'est dans ce cadre qu'intervient cette thèse. Elle vise à trouver un marqueur ubiquitaire de la différenciation des produits frais et des produits décongelés.

VI. Description du tissu musculaire

Chez le poisson, la partie consommée est le filet. Ce filet correspond au muscle du poisson. Les muscles chez le poisson sont organisés en myotomes possédant une structure tri-

dimensionnelle complexe. Les fibres musculaires suivent un angle allant jusqu'à 40° par rapport à l'axe longitudinal du poisson.

1. Description de la fibre musculaire

Il s'agit d'un muscle squelettique qui est constitué de 90 % de fibres musculaires (Figure 26 page 78) et de 10 % de tissus conjonctifs ou graisseux. Les fibres musculaires contiennent 75 % d'eau, 20 % de protéines, entre 1 et 10 % de tissu graisseux et 1 % de glycogène. Chaque fibre musculaire est entourée par de l'endomysium. La fibre musculaire est elle-même composée de faisceaux musculaires et chaque faisceau est entouré par le périmysium. Un groupement de fibres musculaires est quant à lui entouré de l'épimysium. On distingue ensuite les myofibrilles qui constituent les faisceaux. Les myofibrilles ont un diamètre d'1 µM. Les sous unités constituant les myofibrilles sont appelées les myofilaments. Dans les myofibrilles, on observe une alternance de bandes sombres (les bandes A) et de bandes claires (les bandes I). Chaque bande I est comprise entre deux lignes Z. Le sarcomère correspond au motif de répétition (Figure 27 page 79) se trouvant entre les deux lignes Z. C'est l'unité contractile de la myofibrille. Les myofilaments fins sont composés d'actine, de tropomyosine et de troponines tandis que les myofilaments épais sont composés principalement de myosine. Les myofilaments vont permettre de réguler la contraction du muscle. Les molécules de myosine du filament épais vont permettre de catalyser la dégradation de l'ATP en ADP par l'intermédiaire de leur activité ATPasique. Le sarcoplasme comprend de très nombreuses protéines solubles dont la myoglobine qui permet de transporter l'oxygène vers les mitochondries. Il contient également des granules de glycogène servant de réserve énergétique pour les cellules musculaires (LISTRAT *et al.*, 2016).

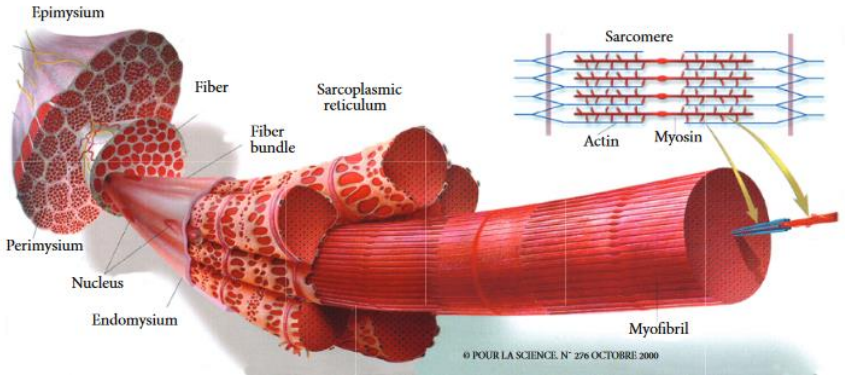


Figure 26 : Schéma de l'organisation structurelle d'une fibre musculaire (source : pour la science N°276 octobre 2000)

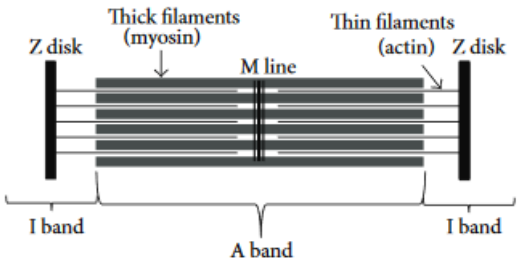


Figure 27 : Schéma de l'organisation d'un sarcomère (LISTRAT et al.*, 2016)*

2. Cas du poisson

Deux types de muscles sont présents chez le poisson : le muscle blanc et le muscle rouge. La couleur du muscle est directement proportionnelle à la teneur en myoglobine, donc à la teneur en mitochondries. Le muscle blanc est associé aux contractions rapides et le muscle rouge est associé aux contractions lentes. Chez certaines espèces, un type musculaire hybride peut exister : il s'agit du muscle rose (Figure 28 page 79). Le muscle blanc représente 80 % voire 100 % de la masse musculaire chez le poisson en fonction des espèces. Le pourcentage de muscle rouge dépend du type de poisson selon qu'il s'agisse de poissons pélagiques ou benthiques sachant que les poissons pélagiques possèdent plus de muscle rouge puisque qu'ils nagent constamment. Le muscle rouge est surtout retrouvé au niveau de la ligne latérale (ALTRINGHAM & ELLERBY, 1999).

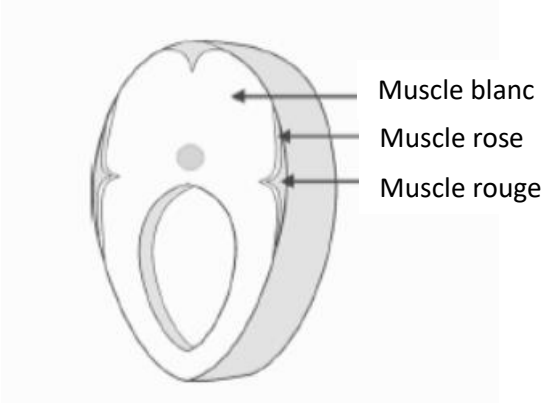


Figure 28 : Coupe transversale d'un filet de poisson montrant l'organisation des différents types musculaires (KIESSLING et al.*, 2006)*

Le muscle rouge est principalement trouvé dans la partie du corps où les muscles fonctionnent de façon aérobique. Le muscle rouge se retrouve sous la forme d'une bande continue qui s'élargie vers la queue du poisson. Le muscle rouge est surtout présent chez les poissons pratiquant la nage rapide. Chez les poissons pratiquant la nage lente, ce muscle est fortement

réduit voire absent. Les poissons pélagiques possèdent une part importante de muscle rouge (18-29 %) contrairement aux poissons prédateurs qui eux possèdent environ 5 % de muscle rouge dont l'activité locomotrice se limite à la recherche de nourriture. Le muscle rouge possède des fibres de petite taille. C'est un tissu hautement vascularisé contenant de nombreuses mitochondries, des gouttelettes lipidiques et des granules de glycogène. Les mitochondries, les lipides et le glycogène forment des agrégats au niveau du sarcolemme et dans les espaces inter-myofibrillaires. Le muscle rouge doit sa couleur à sa haute teneur en myoglobine. La teneur en ATP est moindre dans le tissu rouge que dans le tissu blanc. Il semble également que l'acide inosinique se décompose plus rapidement dans le tissu rouge, ce qui conduit à la croissance du taux d'inosine. Le muscle rouge présente une concentration en lipides plus importante que le tissu blanc (BUTTKUS, 1963).

Le muscle blanc, quant à lui, possède des fibres de plus grande taille. Il est moins vascularisé. Il possède également moins de lipides et moins de glycogène mais également moins de mitochondries.

Les myofibrilles du tissu blanc et du tissu rouge possèdent des caractéristiques différentes. Les fibres du tissu blanc vont s'allonger radialement alors que la largeur des fibres ne va pas varier. Les fibres sont alignées perpendiculairement. Les fibres rouges, quant à elles, sont organisées en colonnes polyédriques (LUTHER *et al.*, 1995). Chez les poissons benthiques, le tissu rouge est retrouvé dans de moindres proportions. La profondeur à laquelle se trouve le poisson va avoir un impact sur la quantité de fibres rouges. Ainsi, plus un poisson se trouve dans les profondeurs de la colonne d'eau et moins il y aura de tissus rouges chez ce poisson (DRAZEN *et al.*, 2013). Chez les espèces de fond qui ne se déplacent pas, il n'y aura pas de tissu rouge.

Les myomères sont séparés les uns des autres par un tissu conjonctif appelé myoseptum (Figure 29 ci-dessous). Le myoseptum va permettre de transmettre la force contractile aux myomères. Du tissu adipeux est présent principalement dans le myoseptum. Le tissu conjonctif, présent chez le poisson, contient principalement du collagène de type I et de type V. La quantité de collagène est variable selon l'espèce de poisson mais également entre les poissons d'une même espèce. La taille du myoseptum est dépendante du nombre et de la taille des adipocytes. Tous les poissons ne possèdent pas la même quantité de tissu graisseux. Chez les espèces considérées comme maigres, on observe moins de 3 % de corps gras tandis

que chez les poissons considérés comme gras, on observe plus de 10 % de tissu adipeux. La quantité de tissu graisseux varie également au sein d'une même espèce par exemple chez le saumon, la quantité de graisse varie entre 8 % et 24 %.

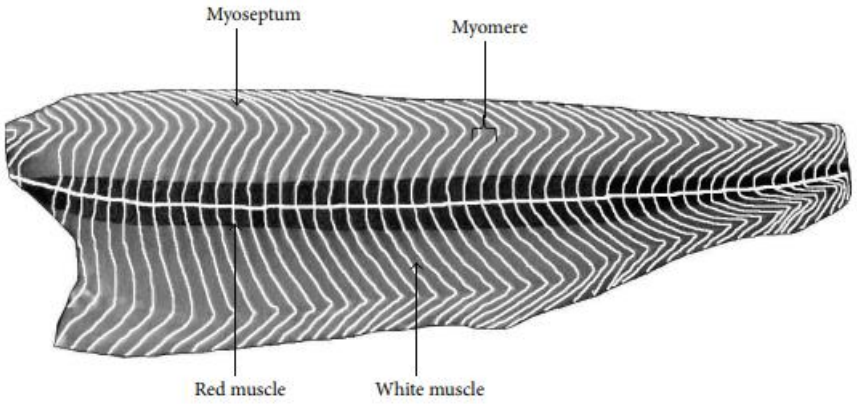


Figure 29 : Représentation d'un filet de poisson en coupe longitudinale (LISTRAT et al.*, 2016)*

Les lipides sont la source principale d'énergie chez les poissons. Ils sont stockés sous forme de d'amas graisseux. Le tissu adipeux peut se retrouver à différents endroits du corps du poisson. Trois catégories sont distinguées : le viscéral, le sous-cutané et l'intramusculaire. Chacun de ces tissus jouent un rôle différent : les tissus graisseux sous-cutanés et péri-viscéraux vont avoir un impact sur le nombre et l'épaisseur des filets pouvant être obtenus. Le tissu graisseux intramusculaire va impacter les qualités organoleptiques de la chair de poisson (WEIL *et al.*, 2013). La présence de graisse péri-viscérale va avoir un impact négatif sur le consommateur. De même, une odeur peut émaner du tissu graisseux liée à la nourriture ingérée par le poisson. Cette odeur peut être perçue négativement par le consommateur (GRIGORAKIS, 2007). La composition en adipocytes peut être influencée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à la qualité et à la quantité de la nourriture ingérée par le poisson. Ainsi, la durée du jeun du poisson va induire l'utilisation des lipides situés dans la partie viscérale du poisson. La composition en corps gras de la diète des poissons va également jouer un rôle au niveau de la croissance du poisson. Une alimentation riche en lipides va induire des dépôts de tissus adipeux. Les facteurs intrinsèques sont l'âge du poisson, le cycle reproductif (Tableau 9 ci-dessous) ainsi que les croisements entre les individus. Ainsi, plus le poisson va vieillir et plus la concentration en gras va augmenter. De ce fait, le nombre d'adipocytes va augmenter dans le tissu blanc ainsi que dans le tissu péri-viscéral (KIESSLING *et al.*, 2001 ; WEIL *et al.*, 2013).

Tableau 9 : concentration en tissu adipeux en fonction du cycle reproductif (WEIL et al., 2013)

Sexual stages	VSI (%)	% SCD AT	% SCVe AT	% BF AT
Pre-ovulation (n = 10)	4.62 ± 1.27^{a}	4.88 ± 0.81^{a}	4.31 ± 0.93^{a}	7.58 ± 1.60^{a}
Post-ovulation (n = 9)	3.22 ± 1.26^{b}	4.27 ± 0.87^{b}	4.41 ± 0.87^{a}	7.89 ± 1.34^{a}

Visceral adipose tissue is estimated by the VSI % (viscera weight/carcass weight × 100). Subcutaneous adipose tissues in the dorsal and ventral positions and adipose tissue in the belly flaps are estimated by image analysis and expressed by their area/the total cutlet area. In each column, different superscripts indicate significant differences between sexual stages ($p < 0.001$). Values are reported as the mean ± SD

VSI viscero-somatic index, *SCD AT* subcutaneous adipose tissue in the dorsal position, *SCVe AT* subcutaneous adipose tissue in the ventral position, *BF AT* belly flap adipose tissue

Le début de l'ovogenèse et de la spermatogenèse se caractérisent par une augmentation des lipides intramusculaires. Ces taux deviennent stables pendant la spermatogenèse et la vitellogenèse. Lors de l'ovulation et de la spermiation, les taux diminuent. Chez la femelle, des variations au niveau des dépôts de matière grasse ont pu être observés entre les périodes pré-ovulatoires et post-ovulatoires. Une diminution des dépôts de tissu adipeux a été observée dans les régions viscérale et sous cutanée dorsale. A l'inverse, dans la région sous cutanée ventrale et au niveau de la poche ventrale, aucune variation de dépôts de tissu adipeux n'a été observée (WEIL *et al.*, 2013). Ainsi, le sexe du poisson peut exercer une influence sur la quantité de lipides. D'après (PROKKOLA *et al.*, 2022), le sexe peut également avoir un impact sur les mitochondries. Ainsi, les mâles vont présenter une quantité d'ADN mitochondrial plus importante que les femelles. Cependant, cette différence n'a aucun impact sur la respiration mitochondriale. Celle-ci est identique entre les deux sexes. Pour les deux sexes, il a été montré que la voie du cofacteur NADH était préférée à la voie du succinate suggérant une affinité préférentielle du tissu adipeux pour le NADH (PROKKOLA *et al.*, 2022).

Une autre étude a également démontré que chez certains poissons, une acclimatation de l'organisme pouvait avoir lieu lors des changements de température (SALIN *et al.*, 2015). Ainsi, d'après (ST-PIERRE *et al.*, 1998), les mitochondries provenant du tissu rouge vont avoir un taux d'oxydation plus élevé à une température donnée pour le pyruvate quand elles sont extraites de poissons acclimatés au froid. Ainsi, pour la truite il a été démontré que la capacité oxydative des mitochondries du tissu rouge était améliorée pendant les périodes d'acclimatation au froid. En revanche, aucun changement au niveau du volume mitochondrial n'a été observé. Ces effets peuvent s'accompagner d'une augmentation de la densité lipidique au sein des fibres musculaires induisant ainsi une accélération du flux d'oxygène au niveau du muscle. Les mitochondries des fibres musculaires chez le poisson répondent au changement thermique

par une restructuration induisant une augmentation des taux d'oxydation, des activités enzymatiques et de la surface des crêtes mitochondriales. Une étude de (THORAL *et al.*, 2021), a montré que les mitochondries pouvaient s'adapter à un changement de température. Les températures élevées ont cependant pour effet une diminution de la synthèse d'ATP. Ceci indique que les mitochondries soumises à des températures élevées et où l'oxygène est moins accessible fonctionnent de la même façon que les mitochondries soumises à des températures normales. Cependant, ces auteurs ont pu tirer comme conclusion que l'adaptation aux changements climatiques résultait tout de même de la plasticité des mitochondries et de leurs capacités à produire de l'ATP.

3. Evolution post-mortem

Après la mort du poisson ou de tout être vivant, l'organisme entre en *rigor mortis*. La *rigor mortis* comprend trois stades. Le premier stade correspond à la pré-rigor. C'est un état qui intervient immédiatement après la mort du poisson. Durant cet état, les muscles peuvent encore être contractés par impulsion électrique. Les muscles présentent une structure semblable en bon état. Le sarcolemme et l'endomysium présentent des structures régulières. Quelques altérations commencent à être visibles tels qu'un détachement de myofibrilles du sarcolemme et le gonflement de certains organites. Le second stade correspond à la *rigor mortis* : les muscles se raidissent et durcissent suite à la condensation de l'actine avec la myosine pour former l'actomyosine. Il n'est plus possible de les stimuler par impulsion électrique. Le dernier stade correspond à la *post-rigor* ou maturation. Les muscles se ramollissent notamment par l'action de protéines lysosomiques qui se déversent au sein des myofibrilles en hydrolysant la liaison de l'actine à la myosine suite à la désorganisation des lysosomes entrainée par la baisse du pH intramusculaire provoquée par la dégradation de l'ATP en ADP qui libère de l'acide lactique. Chez les poissons pélagiques, la *rigor mortis* commence par la queue et s'étend le long du corps. Seulement un jour après la mort, on observe une augmentation des ruptures au niveau du sarcolemme et de l'endomysium. Les sarcomères, quant à eux présentent une structure préservée. A partir de cinq jours après la mort, de plus importantes altérations sont visibles. Les fibres musculaires se détachent de l'endomysium. De plus en plus d'organites présentent des altérations. Les myofibrilles commencent à se désorganiser. Après vingt jours, on assiste à une désorganisation complète de la fibre musculaire avec une désintégration des filaments d'actine (FOOD AND DRUG

ADMINISTRATION, 2001 ; AYALA *et al.*, 2010). D'après l'étude de (BUTTKUS, 1963), lors de l'entrée en *rigor mortis* du muscle rouge, le muscle se contracte de 52 % de sa longueur d'origine tandis que le muscle blanc ne se contracte que de 15 % de sa longueur d'origine. L'état de *rigor* est lié à la quantité d'ATP. La décroissance du taux d'ATP est liée au passage de l'état de pré-*rigor* à celui de *rigor* totale. Une autre étude (EL RAMMOUZ *et al.*, 2013) a permis de montrer que a truite arc en ciel entre en phase de *rigor mortis* entre deux et cinq heures après la mort. Avant l'entrée en *rigor*, une baisse du pH est observée (entre 20 minutes et 2 heures après la mort). En parallèle, un arrêt de la glycolyse anaérobique est observé, ce qui a pour conséquence une stabilisation du pH, un arrêt de la production d'ATP et la formation de brins rigides d'actine couplée à la myosine (actomyosine) causant alors une raideur et une incapacité d'extension des fibres musculaires. Au cours de la phase de *rigor mortis*, le filet va subir un phénomène de vieillissement dû à la dégradation par les enzymes protéolytiques endogènes.

Concernant l'aquaculture, les manipulations ante-mortem sur le poisson ainsi que l'abattage peuvent induire un stress provoquant des altérations au niveau des fibres musculaires. Une étude menée sur le cabillaud a permis de montrer l'impact de la manutention avant abattage sur la qualité du filet. Ainsi, le stress de la manutention conduit à une arrivée plus rapide de la *rigor mortis* chez le poisson, cela étant dû à une diminution plus rapide du taux d'ATP. Une altération de la texture du filet a également été observée, les poissons ayant été stressés présentant des filets à la texture plus moelleuse et dont les connexions entre les fibres sont plus lâches. Cependant, cet effet peut être éliminé en allongeant la durée de stockage des filets. Ainsi après 8 jours de stockage, les filets ne présentent plus ces caractéristiques (BJØRNEVIK & SOLBAKKEN, 2010). La méthode la plus utilisée en Europe pour tuer les poissons est l'asphyxie. Les poissons sont sortis de l'eau et placés dans des bacs contenant de la glace. Cette méthode ne permet pas une mort immédiate du poisson, les fonctions cérébrales ne s'arrêtant qu'au bout de 5 minutes (PAPAHARISIS *et al.*, 2019). Quand les poissons sont placés dans de la glace, ils vont mourir par anoxie, chez la daurade royale le processus prend entre 20 et 40 minutes, chez le bar cela prend environ 20 minutes, chez la truite cela prend entre 28 et 198 minutes (POLI *et al.*, 2005).

4. Bilan du chapitre VI

Au sein des filets de poisson, deux types de tissus sont retrouvés : le tissu rouge et le tissu blanc liés à la teneur en myoglobine de ces muscles. Ces deux tissus possèdent des

caractéristiques différentes. La qualité du tissu musculaire dépend de plusieurs facteurs que sont l'âge du poisson, le sexe, le stress de la capture, le stress de l'abattage. Une des caractéristiques sur laquelle repose cette thèse est la différence de concentration en mitochondries tissulaires, le tissu rouge étant riche en mitochondries.

VII. La mitochondrie : un organite incontournable

1. Origine et description de la mitochondrie

La mitochondrie a une origine endosymbiotique, une alpha-protéobactérie s'est associée à une cellule eucaryote primitive. La mitochondrie est un organite clé du métabolisme énergétique de la cellule. Les mitochondries ont pour rôle la production d'ATP, elles interviennent également dans la régulation de calcium. Les mitochondries sont en lien direct avec le réticulum endoplasmique (FREY & MANNELLA, 2000). Cet organite possède une double membrane qui présente une perméabilité sélective pour de nombreux substrats (Figure 30 page 85). La membrane externe est apposée contre la membrane interne ce qui délimite un espace intermembranaire qui joue un rôle clé dans la physiologie mitochondriale (ANDERSSON & KURLAND, 1999). La membrane interne contient les nombreux complexes impliqués dans la respiration.

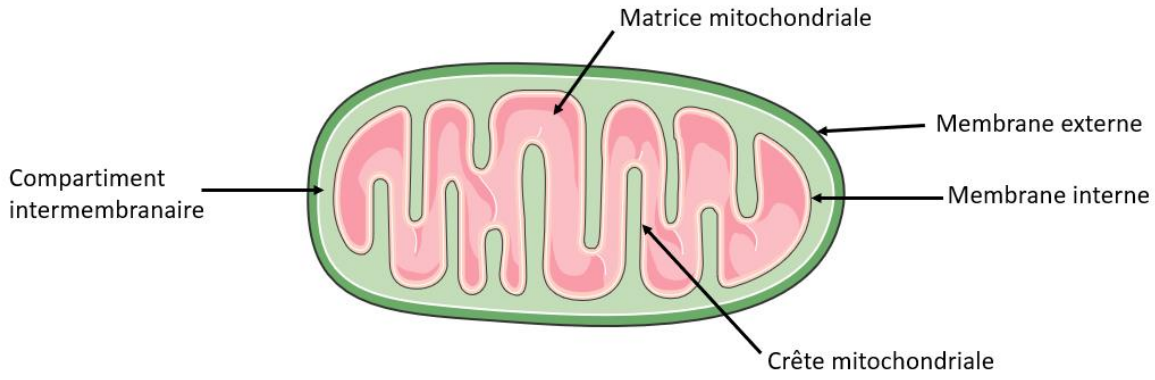


Figure 30 : Schéma représentant la mitochondrie

La biogenèse des mitochondries et le contrôle de leur dégradation vont permettre de réguler la quantité et la qualité des organites. La production de mitochondries peut être liée à des facteurs environnementaux comme la migration, le régime alimentaire mais elle peut

également être liée aux hormones ou aux facteurs de stress (MEYER *et al.*, 2017). La régulation de cette biogenèse varie également selon le type de tissu dans lequel se trouve les mitochondries. Mais de façon générale, elle est régulée par des co-régulateurs, des kinases, des enzymes et différents facteurs nucléaires. Lors de la dégradation des mitochondries, différents acteurs peuvent intervenir tels que les protéases, les lipases, les DNases. Cette dégradation peut être induite par des stimuli comme une privation en nutriment, une privation calroique mais aussi par la perte du potentiel membranaire (MEYER *et al.*, 2017).

2. Les complexes de la chaine respiratoire

La chaine respiratoire est composée de quatre complexes, du cytochrome c et d'une ATP synthase (Figure 31 ci-dessous). Chaque complexe assure le transfert d'électrons en suivant un gradient de potentiel.

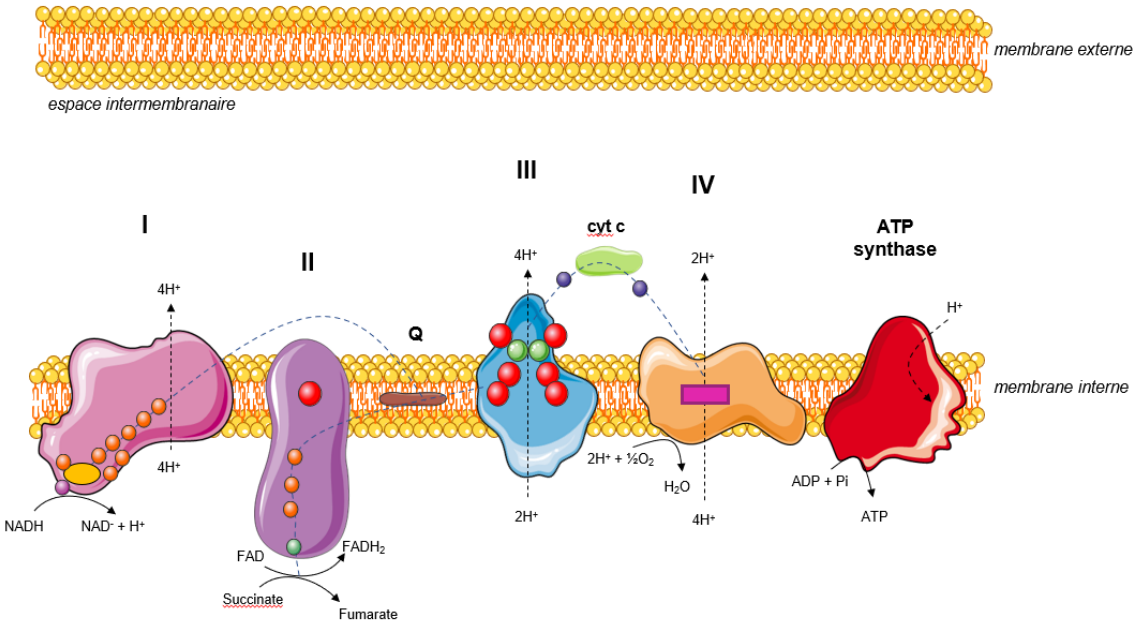


Figure 31 : Schéma de la chaine respiratoire mitochondriale

Le complexe I, également connu sous le nom NADH déshydrogénase, permet de catalyser la transformation du NADH + H^+ en NAD^+. Il permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermitochondrial.

$$NADH + H^+ + Q_{10} + 4H^+ \leftrightarrow NAD^+ + Q_{10}H_2 + 4H^+$$

Il est composé de 44 sous unités. 7 de ces sous-unités sont codées par l'ADN mitochondrial, les 37 autres sont codées par l'ADN nucléaire. Le complexe I peut être divisé en 3 modules :

- Le module N : permettant la liaison du NADH et l'oxydation
- Le module Q : permettant le transfert d'électrons à l'ubiquinone
- Le module P : correspondant à la pompe à protons

Le complexe I peut être trouvé sous une forme active mais également sous une forme non active. La transition entre les deux formes va dépendre du pH, de la présence de cations bivalents. De même, la forme active et la forme non active ont des affinités différentes pour les inhibiteurs. Le blocage du complexe I peut être assuré par un inhibiteur chimique : la roténone (VINOGRADOV & GRIVENNIKOVA, 2001 ; LENAZ *et al.*, 2016 ; GUERRERO-CASTILLO *et al.*, 2017).

Le complexe II également appelé succinate déshydrogénase. Il permet de lier le cycle de Krebs à la chaine de transport d'électrons. Il permet de catalyser l'oxydation du succinate en fumarate. Il est composé de 4 sous unités. L'activation de ce complexe dépend de la teneur en acide oxaloacétique. L'accumulation d'acide oxaloacétique induit l'inhibition de la respiration par le complexe II. Celui-ci intervient également dans le cycle de Krebs. Ce complexe également appelé complexe succinate déshydrogénase ou succinate coenzyme Q réductase constitue la seule enzyme membranaire du cycle de Krebs. La réaction produite libère moins d'énergie que celle du complexe I. Ce complexe ne permet pas le transport de protons. Ce complexe contient des protéines fer-soufre et du cytochrome b. L'ubiquinol formé dans ce complexe est transporté vers le complexe III (STEPANOVA *et al.*, 2016 ; FINK *et al.*, 2019).

$$\text{Succinate} + Q_{10} \rightarrow \text{fumarate} + Q_{10}H_2$$

Le complexe III également appelé coenzyme Q cytochrome c réductase ou encore cytochrome bc_1, est un dimère comprenant 2 complexes. Chacun de ces complexes comprend 11 sous-unités. Il va permettre l'oxydation de la molécule d'ubiquinol et la réduction du cytochrome c. Il permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire. Il permet le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c.

$$Q_{10}H_2 + 2 \text{ cytochrome } c_{oxydé} + 2H^+ \rightarrow Q_{10} + 2 \text{ cytochrome } c_{réduit} + 4H^+$$

Le complexe IV est également appelé cytochrome c oxydase. Ce complexe possède 13 sous-unités. Il permet le transfert d'électrons à l'oxygène. Il permet le transport de 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire.

$$4 \text{ cytochrome } c_{réduit} + O_2 + 8H^+ \rightarrow 4 \text{ cytochrome } c_{oxydé} + 2H_2O + 4H^+$$

Les réactions au niveau des complexes respiratoires induisent un flux de protons de la matrice à l'espace intermembranaire. Cela entraine une différence de charge entre la membrane mitochondriale interne et la matrice mitochondriale.

L'ATP synthase est le 5ème complexe de la chaine respiratoire. Elle permet de faire entrer les protons dans la matrice mitochondriale, ce qui entraine la formation d'ATP. Elle est constituée de 2 sous-unités : une sous-unité intramembranaire jouant le rôle de canal protonique et une sous-unité ancrée dans la matrice mitochondriale permettant la synthèse de l'ATP.

Le cytochrome c est ancré au niveau du feuillet externe de la membrane mitochondriale interne. Il intervient au niveau de la chaine respiratoire en permettant le transfert des électrons entre le complexe III et le complexe IV. Il intervient également dans d'autres phénomènes physiologiques notamment l'apoptose. Sa fuite va ainsi induire un flux calcique et donc activer la voie apoptotique (HAYASHI *et al.*, 2009).

3. Transporteurs des substrats

Les chaines respiratoires sont alimentées par un flux d'électrons apporté par de nombreux substrats. Des transporteurs sont nécessaires pour amener les substrats aux différents complexes. Le transporteur malate/aspartate (Figure 32 ci-dessous) et le transporteur glycérol phosphate (Figure 33 page 89) permettent l'acheminement du NADH à l'intérieur de la mitochondrie (ETO *et al.*, 1999).

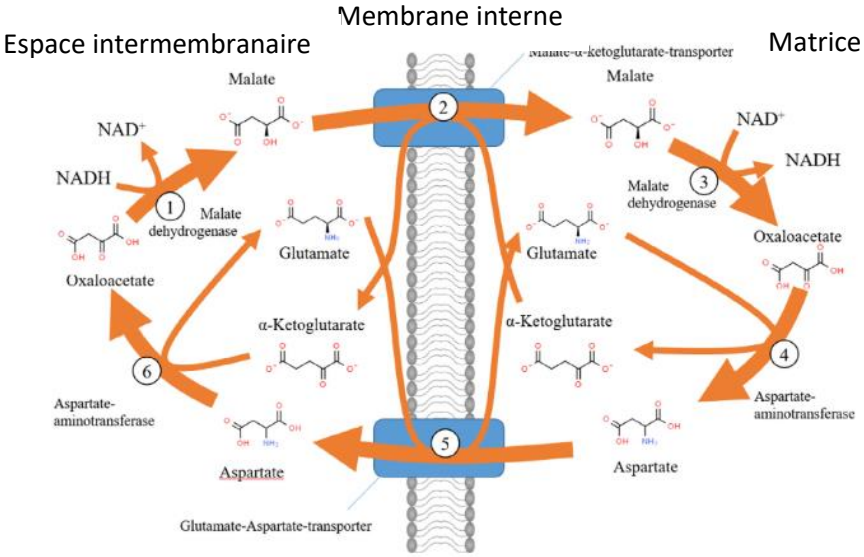


Figure 32 : Schéma du transporteur malate/aspartate (BORST, 2020)

Deux antiports sont présents au niveau de la membrane mitochondriale interne : l'antiport glutamate/aspartate et l'antiport malate α-cétoglutarate. L'antiport glutamate/aspartate permet la sortie d'aspartate de la mitochondrie. Cette sortie s'accompagne de l'entrée de glutamate et de protons dans la mitochondrie. Cette étape est irréversible. L'antiport malate α-cétoglutarate permet l'échange de malate et d'α-cétoglutarate en fonction du gradient de concentration des substrats. Les échanges sont bidirectionnels (LU *et al.*, 2008).

La sortie d'aspartate de la mitochondrie est dépendante de la force protomotrice. Ce transporteur est unidirectionnel. C'est le NADH cytosolique qui va être oxydé. Il va transférer ses électrons à un oxaloacétate à l'aide de la malate déshydrogénase présente dans le cytosol. Cela conduit à la formation d'un malate qui va alors traverser la membrane interne. Une fois dans la mitochondrie, ce malate est oxydé en oxaloacétate par l'intermédiaire d'une malate déshydrogénase. Lors de cette opération, le NAD^+ va être converti en NADH (BORST, 2020).

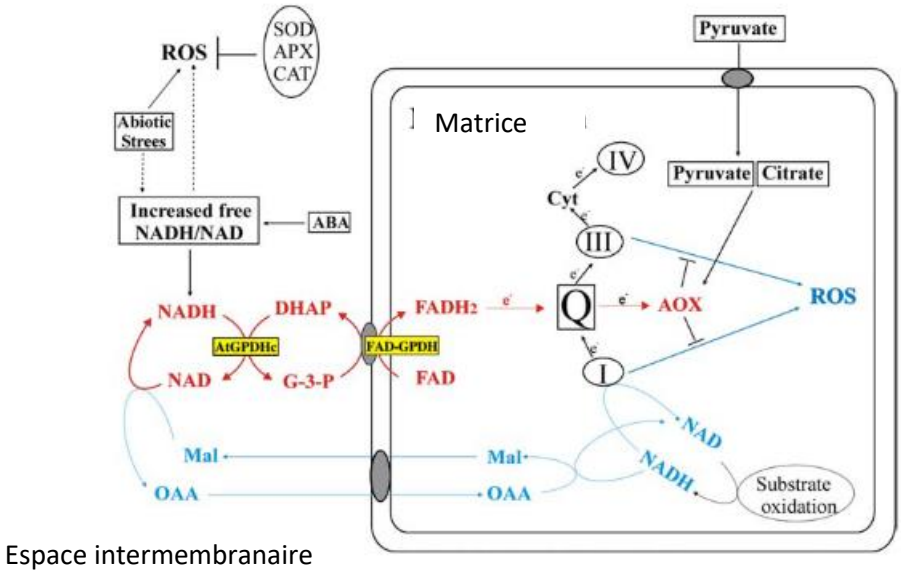


Figure 33 : Schéma du transporteur glycérol phosphate (SHEN et al., 2006)

Le transporteur glycérol phosphate (Figure 33 ci-dessus) a également pour rôle de maintenir le ratio NADH/NAD^+. Le NADH est oxydé en NAD^+ par l'intermédiaire de la glycérol phosphate déshydrogénase, en parallèle la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) est réduite en glycérol 3-phosphate. A l'intérieur de la mitochondrie, la glycérol phosphate déshydrogénase induit la formation de $FADH_2$ à partir de FAD^+. Le $FADH_2$ formé réduit une ubiquinone. Les électrons libérés participent alors à la phosphorylation oxydative (SHEN *et al.*, 2006). Ce sont deux

glycérol 3-phosphate déshydrogénases distinctes : l'une est cytosolique, l'autre mitochondriale. Les réactions réalisées au niveau de ce transporteur sont irréversibles (MILES, 2003).

Le transporteur malate/aspartate est le principal transporteur du NADH. Le transporteur glycérol phosphate interviendrait, quant à lui, lors de l'inhibition du transporteur malate/aspartate mais également quand il y a une accumulation d'alpha glycéro phosphate (PÖSÖ, 1979). Les différents transporteurs peuvent être inhibés par l'acide aminooaxyacétique. Cette molécule va inhiber l'aspartate aminotransférase qui se trouve être une enzyme limitante des transporteurs. Cet inhibiteur a pour conséquence une baisse du taux d'ATP (WANG *et al.*, 2016). Le transporteur malate/aspartate est également inhibé par les inhibiteurs des complexes de la chaine respiratoire : la roténone et l'antimycine A (ABBRESCIA *et al.*, 2012).

Ces deux transporteurs sont essentiels au transfert de NADH à la mitochondrie. Ils vont permettre le fonctionnement des complexes de la chaine respiratoire notamment le transporteur glycérol phosphate puisqu'en permettant la formation de $FADH_2$ dans la mitochondrie, celui-ci-va réduire l'ubiquinone en ubiquinol qui va alors entrer dans la voie de phosphorylation oxydative et donc permettre la production d'ATP.

4. Approche du potentiel mitochondrial

La mitochondrie est caractérisée par sa force protomotrice. Cette force est composée du gradient de pH à travers la membrane interne et du potentiel membranaire mitochondrial (BRAND & NICHOLLS, 2011). La membrane mitochondriale côté matrice est chargée négativement alors que la membrane côté espace intermembranaire est chargée positivement. Cette différence de charge permet le transport de cations au travers de la membrane mitochondriale au sein de la mitochondrie. Ce potentiel mitochondrial est stable au cours du temps. Une variation de ce potentiel indique une altération de la membrane des mitochondries, remettant alors en cause la viabilité cellulaire. Le gradient de protons est la source de la synthèse d'ATP (ZOROVA *et al.*, 2018). Le mouvement de protons active l'ATPase et induit la synthèse d'ATP. Les changements au niveau du potentiel membranaire peuvent être induits par des mouvements de protons au travers de la membrane mitochondriale interne.(BARACCA *et al.*, 2003).

Pour détecter le potentiel membranaire, il est possible d'utiliser des sondes fluorescentes telles que la Rhodamine 123 (Rh123) et le TMRM. Ces sondes font partie des fluorochromes cationiques.

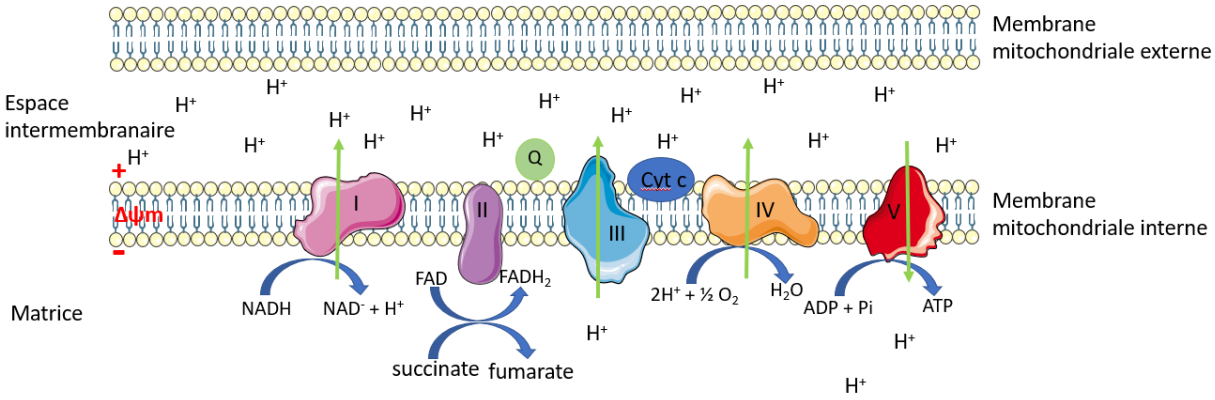


Figure 34 : Schéma du gradient de protons

a) La Rhodamine 123

La Rhodamine 123 est une sonde cationique. Elle possède des charges positives (Figure 35 page 91). La membrane mitochondriale interne est, quant à elle, chargée négativement. Cette différence de charge induit l'entrée de la sonde dans la mitochondrie. Cette sonde se trouve alors séquestrée à l'intérieur de la mitochondrie. Elle s'accumule alors à l'intérieur des mitochondries possédant un potentiel membranaire et donc correspondant aux mitochondries viables.

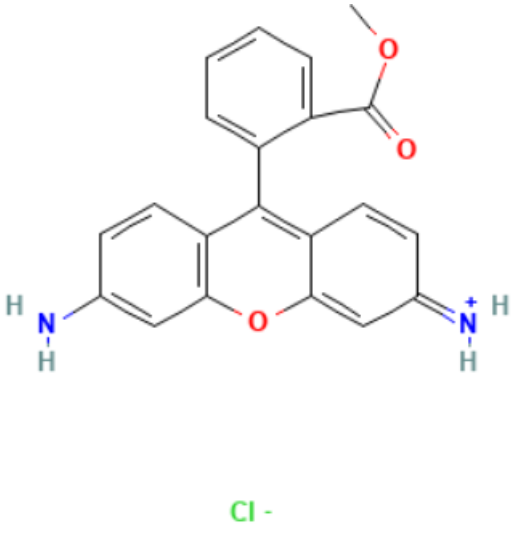


Figure 35 : Structure chimique de la Rhodamine 123 (PubChem, 2022a)

La capture de la sonde est proportionnelle à la force protomotrice de la mitochondrie. Une altération au niveau de ce potentiel provoque une rétention moindre de la sonde par la mitochondrie. La longueur d'onde d'excitation de la sonde est 488 nm tandis que la longueur d'onde d'émission est 525 nm. La dissipation du gradient de protons réduit le potentiel membranaire et donc l'entrée de la sonde dans la matrice mitochondriale (PETIT, 1992). Le niveau de fluorescence est donc directement lié au potentiel membranaire. En effet, la Rhodamine 123 peut provoquer une inhibition de la respiration stimulée par l'ADP et de la synthèse d'ATP (BARACCA *et al.*, 2003).

b) Le TMRM

Le TMRM, TétraMéthylRhodamine Méthyl ester, est un dérivé de la rhodamine 123. La molécule possède également des charges positives qui vont contribuer à son entrée dans la mitochondrie (Figure 36 page 92). La longueur d'onde d'émission de cette sonde est de 585 nm. Pour l'excitation, la longueur d'onde est identique à celle de la rhodamine 123. La présence de groupement méthyle au niveau de la molécule la rend plus apolaire.

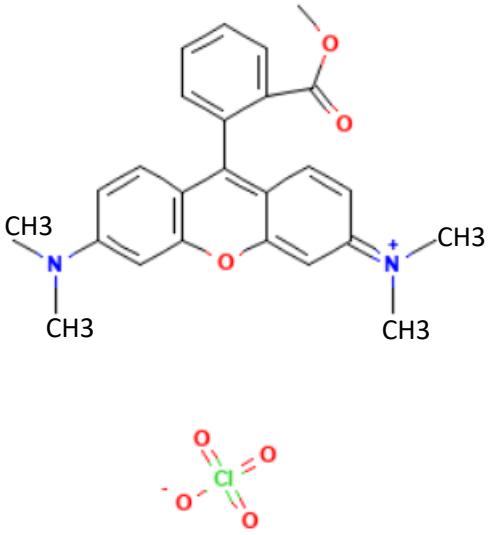


Figure 36 : Structure chimique du TMRM (PUBCHEM, 2022b)

La longueur d'onde d'émission de cette sonde est de 585 nm. Pour l'excitation, la longueur d'onde est identique à celle de la rhodamine 123. Le TMRM en excès possède le même impact que la Rhodamine 123. La liaison des sondes aux mitochondries semble température-dépendante. Il semble également que le TMRM ait la capacité à traverser plus facilement les bicouches lipidiques que la rhodamine 123 (SCADUTO JR & GROTYOHANN, 1999).

c) Le CCCP

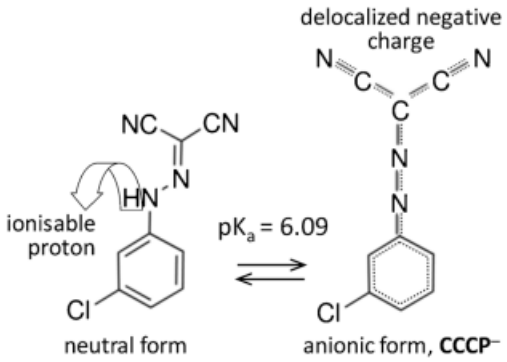


Figure 37 : Structure chimique du CCCP (PLASEK et al., 2017)

Le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) (Figure 37 ci-dessus) est couramment utilisé après l'utilisation des sondes fluorescentes. Cette molécule induit la dissipation du gradient de protons et donc la dissipation du potentiel membranaire (Figure 38 page 93).

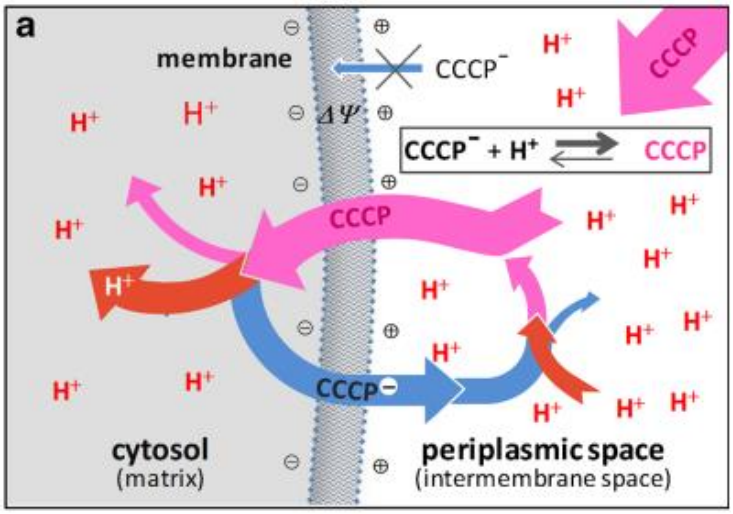


Figure 38 : Mode d'action du CCCP (PLASEK et al., 2017)

5. Calcium et mitochondries

La présence de calcium dans la mitochondrie est essentielle, il intervient dans de nombreux processus physiologiques (Figure 39 ci-dessous). Il va permettre la synthèse d'ATP en activant ou en stimulant les enzymes du cycle de Krebs et le complexe V de la chaine respiratoire. Pour entrer dans la mitochondrie, le calcium doit traverser des canaux. Ces canaux sont situés à la surface de la mitochondrie. La mitochondrie est en lien étroit avec le réticulum endoplasmique. Ce dernier contient du calcium. Les canaux vont permettre le transport du

calcium du réticulum endoplasmique à la mitochondrie afin de stimuler le métabolisme oxydatif.

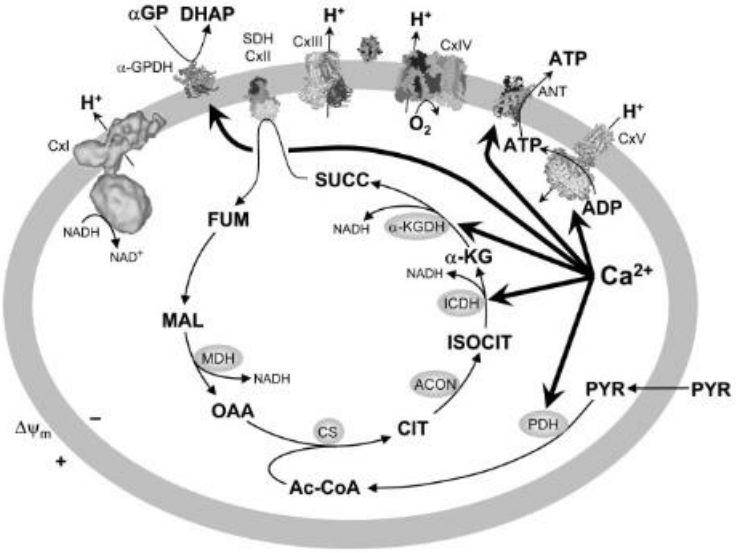


*Figure 39 : effet du calcium sur la mitochondrie (*BROOKES et al.*, 2004)*

La variation de la quantité de calcium, liée à la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) produit, a un impact sur l'ouverture des pores de transition. Le calcium joue un rôle dans la transmission des signaux trans-mitochondriaux. L'entrée du calcium dans la mitochondrie se produit par l'intermédiaire de l'uniport. Elle est dépendante du potentiel membranaire (BROOKES *et al.*, 2004). Les ions calciques ont un impact sur la physiologie mitochondriale. En effet, ils permettent de réguler les complexes de la chaine respiratoire, les protéines du cycle de Krebs mais aussi les transporteurs de métabolites. L'entrée de calcium dans les mitochondries influence également la voie de signalisation cellulaire du calcium. Le calcium peut également avoir un effet délétère. En trop grande quantité, il est responsable de la mort cellulaire (WOLF *et al.*, 2017).

Les premiers canaux présents sont les MAM (mitochondria associated ER membrane). Ils permettent de réguler le taux de calcium présent dans la mitochondrie. En effet, trois enzymes du cycle de Krebs sont calcium-dépendantes : la pyruvate déshydrogénase, l'α-cétoglutarate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase (LASORSA *et al.*, 2003 ; HAYASHI *et al.*, 2009). D'autres canaux, les VDAC (voltage dependent anion channel) interviennent dans la régulation de l'entrée calcique dans les mitochondries (Figure 40 ci-dessous). Ces canaux sont exprimés au niveau de la membrane mitochondriale externe. Ils permettent l'accumulation des ions

calciques à l'intérieur de la mitochondrie. La sortie de calcium de la mitochondrie s'effectue principalement par l'échangeur Ca^{2+}/Na^{+} (SZABADKAI & DUCHEN, 2008).

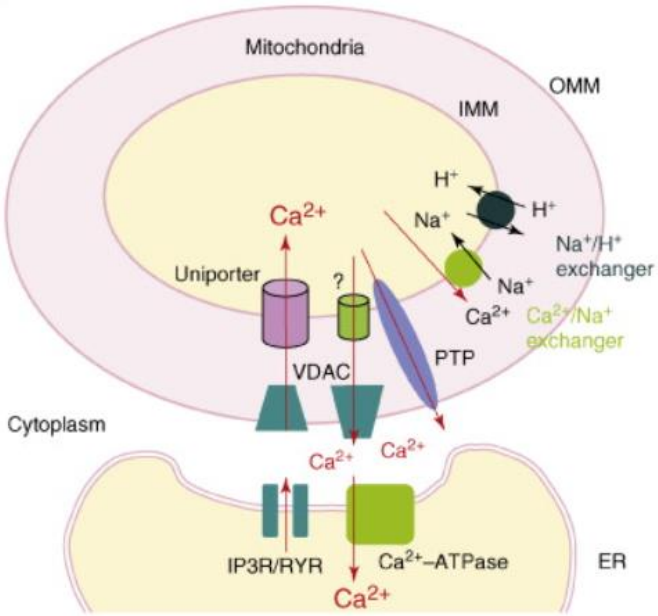


Figure 40 : Transporteurs et canaux calciques majoritaires de la mitochondrie (HAYASHI et al.*, 2009)*

a) La calcéine AM

Le suivi de l'accumulation du calcium peut être effectué à l'aide de sonde. La calcéine AM (ester AcétoxyMéthyle) est une sonde de viabilité cellulaire, qui sert également pour le suivi de l'accumulation du calcium dans la mitochondrie. Cette sonde diffuse passivement au travers de la membrane mitochondriale (Figure 41 ci-dessous). Dès l'entrée de la calcéine AM dans la mitochondrie, celle-ci est clivée par les estérases, ce qui conduit à la formation de calcéine (composé fluorescent). La calcéine se lie alors au calcium présent dans la mitochondrie (WHITE *et al.*, 2021).

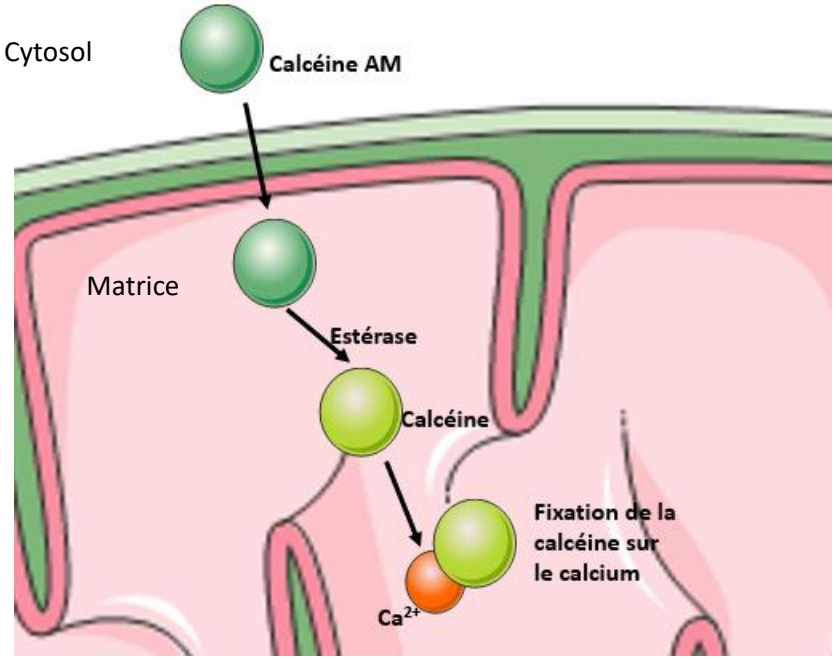


Figure 41 : Modélisation du fonctionnement de la sonde calcéine AM

b) L'ionomycine

L'ionomycine est un ionophore du calcium. Elle induit un flux de calcium au travers de la membrane mitochondriale interne mais aussi un flux de potassium induisant alors une déplétion des ions divalents au niveau de la mitochondrie (KAUFFMAN *et al.*, 1980).

6. Bilan du chapitre VII

Dans des travaux de thèse antérieurs (CLEACH, 2018), il a été mis en lumière la capacité des mitochondries à être utilisées comme marqueur de fraîcheur. L'intégrité des membranes de la mitochondriale permet un maintien du potentiel membranaire mais également une concentration stable calcium intra mitochondriale. Une altération au niveau de cette intégrité induit une perte du potentiel membranaire entrainant alors un flux libre de différents ions. Des sondes permettent d'étudier ces flux ainsi que l'intégrité membranaire des mitochondries. Chaque sonde utilisée va permettre de mesurer plusieurs paramètres indiquant ainsi les différents états des mitochondries. La mesure de l'intégrité des membranes mitochondriales a ainsi été utilisée comme marqueur de fraîcheur et de qualité des produits aquatiques.

VIII. Perméabilisation mitochondriale

L'utilisation de la perméabilité mitochondriale comme marqueur nécessite une compréhension des différents processus de perméabilisation. Les mitochondries peuvent être perméabilisées via différents moyens. Dans un premier temps, une perméabilisation physiologique peut être observée. Les mitochondries vont intégrer de nombreux signaux, ce qui permet alors aux mitochondries d'adapter leur perméabilité aux conditions physiologiques. Cette perméabilisation intervient lors de processus physiologiques tels que l'apoptose ou la nécrose. La perméabilisation peut également être induite notamment par des molécules chimiques qui perméabilisent sélectivement ou indifféremment les différentes membranes cellulaires. Enfin, une perméabilisation physique peut être induite, notamment par l'utilisation de la congélation.

1. Perméabilisation physiologique

a) Intervention des facteurs pro-apoptotiques

Les protéines Bax se trouvent sous la forme de monomères dans le cytosol mais aussi liées à la membrane mitochondriale externe quand elles entrent dans le processus d'activation. Quant au complexe Bak, celui-ci se trouve constamment lié à la membrane mitochondriale externe même quand les protéines sont inactives. Les protéines sont activées quand il y a un changement de conformation au niveau du N-terminal, celui-ci devenant accessible.

Au niveau de la mitochondrie, des facteurs pro et anti apoptotiques sont retrouvés. Ces facteurs font partie de la famille des Bcl-2. Ce sont des facteurs permettant la régulation de la voie de l'apoptose, en contrôlant la perméabilisation de la mitochondrie notamment de la membrane externe. Dans la famille des Bcl-2, des protéines possédant un seul domaine BH3 sont activées lors d'un stress ou d'un dommage. Les protéines Bad et Bax forment un oligomère et induisent ainsi la formation d'un pore au travers de la membrane mitochondriale externe (Figure 42 page 98) (BRUNELLE & LETAI, 2009).

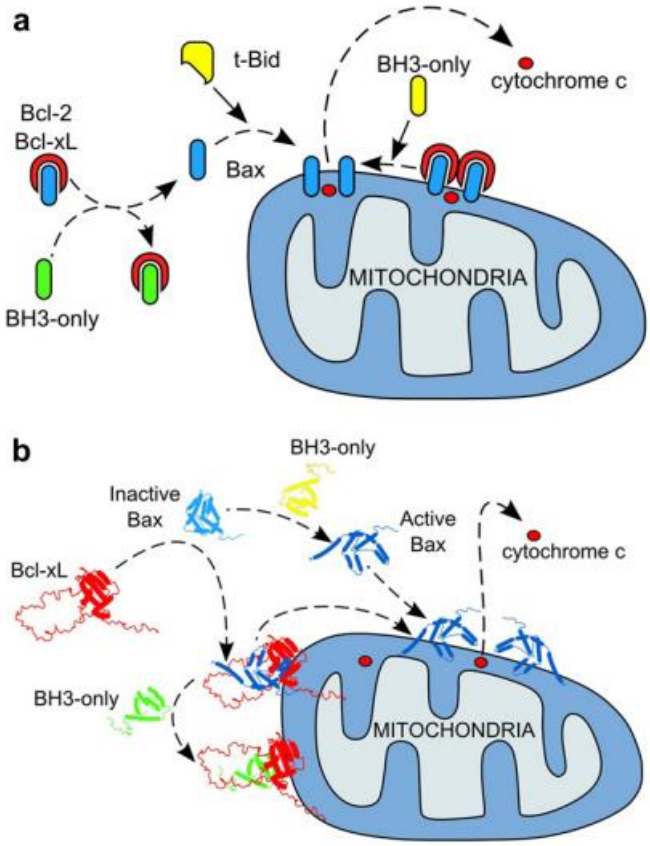


Figure 42 : modélisation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (RENAULT & MANON, 2011)

Deux modèles peuvent expliquer l'activation de Bax et Bak : le modèle indirect et le modèle direct. En ce qui concerne le modèle indirect, les protéines Bax et Bak doivent être associées à des protéines anti-apoptotiques. Pour le modèle direct, les protéines Bax et Bak sont activées par des protéines activatrices telle que Bid (BRUNELLE & LETAI, 2009).

Bid est une protéine pouvant interagir avec Bcl-2 et Bax. Elle contient un seul domaine BH3. Cette protéine peut également être responsable de la libération du cytochrome c. La protéine Bid semble plus efficace pour la libération du cytochrome c que la protéine Bax (LUO *et al.*, 1998).

Des molécules vont alors pouvoir être libérées par le pore formé par Bax et Bad. Une fuite de cytochrome c est observée. Le cytochrome c est retrouvé au niveau de l'espace intermembranaire des mitochondries. Le cytochrome c est constitué d'une chaine polypeptidique de 104 acides aminés. Il permet la navette d'électrons entre le complexe III et le complexe IV au niveau de la chaine respiratoire. Mais il interagit également avec les cardiolipines qui sont des lipides composant la membrane mitochondriale interne. La

libération du cytochrome c induit l'inactivation de la chaine de transfert des électrons et l'activation des processus apoptotiques (GARRIDO *et al.*, 2006).

b) Intervention des pores de transition

Au niveau de la membrane interne, un autre mécanisme peut se mettre en place pour induire la perméabilisation. Une ouverture des pores de transition mitochondriaux (mPTP) peut être observée (Figure 43 page 100). D'après (KIM *et al.*, 2003 ; BRENNER & MOULIN, 2012), le mPTP serait formé par l'ANT (Adénine Nucléotide translocateur) qui se situe au niveau de la membrane mitochondriale interne, le VDAC qui est présent au niveau de la membrane mitochondriale externe et de la cyclophiline D (cypD) présent dans la matrice. La cyclophiline D est un peptidyl prolyl isomérase. Elle est associée au mPTP, ce qui lui confère sa sensibilité à la cyclosporine A (Figure 43 page 100) L'ANT a pour rôle physiologique de transférer l'adénine au travers de la membrane mitochondriale interne.

Ces pores sont des canaux non spécifiques. L'ouverture de ces pores permet le passage de molécules jusqu'à 1500 Da. Elles vont alors diffuser au travers de la membrane mitochondriale interne (KIM *et al.*, 2003). L'ouverture de ces pores est responsable de la perte de la force protomotrice de la membrane. Cela aura également pour conséquence une équilibration des cofacteurs et des ions des deux côtés de la membrane mitochondriale interne. Il y aura également une rupture du gradient entre la mitochondrie et le cytosol avec alors libération du calcium, ce qui causera également le gonflement de la mitochondrie (HALESTRAP, 2009). L'ouverture de ces pores est liée à la combinaison d'une charge de calcium, d'un stress oxydatif et d'un épuisement de l'ATP. L'ouverture d'un trop grand nombre de ces pores induit la mort cellulaire (SZABADKAI & DUCHEN, 2008). Elle a également pour effet la réduction de la respiration induite par le complexe I dû à la fuite du NADH matriciel. La perte de NADH a pour conséquence de limiter le flux d'électrons entre l'ubiquinone (UQ) et le complexe III (BRISTON *et al.*, 2017).

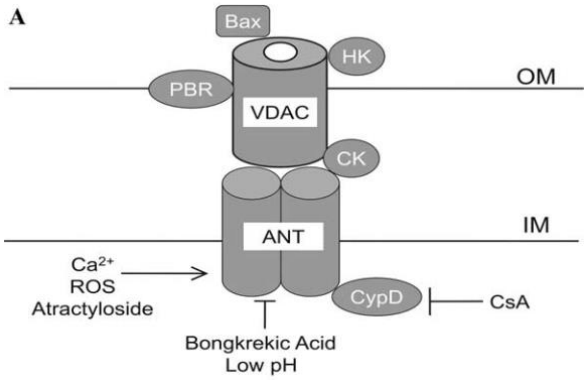


Figure 43 : Modélisation de la structure des pores de transition (KIM et al., 2003)

La probabilité d'ouverture des pores est liée aux différents substrats de la chaine respiratoire. Ainsi, l'ouverture des mPTP est augmentée quand la respiration est induite par le succinate. En comparaison, le glutamate et le malate induisent une ouverture moindre des pores. Malgré l'ouverture des pores et la perte du potentiel membranaire, le succinate permet de maintenir la respiration cellulaire (BRISTON *et al.*, 2017). L'ouverture des pores peut être régulée par des inducteurs chimiques et par la concentration en calcium matriciel. L'ouverture des pores peut être inhibée par différents facteurs notamment la cyclosporine A (CsA), les ions magnésium, un pH acide, des chélateurs de calcium ou des inhibiteurs des phospholipases (HE & LEMASTERS, 2001 ; KIM *et al.*, 2003).

Les mPTP interviennent dans deux processus de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose (Figure 44 ci-dessous). Une déplétion de l'ATP, une dérégulation des ions ou une activation des enzymes et un gonflement des cellules et des mitochondries déclenchent la nécrose. La nécrose intervient en réponse à des lésions cellulaires contrairement à l'apoptose. Lors de l'apoptose, les mPTP induisent la libération de facteurs mitochondriaux (Apoptosis-inducing factor AIF) qui activent alors la voie des caspases qui est responsable de l'apoptose (LEMASTERS, 1999).

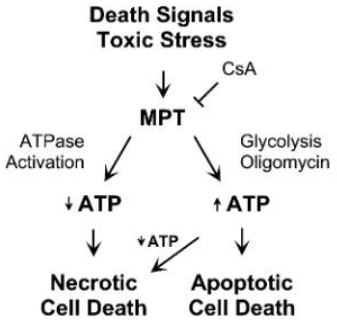


Figure 44 : Schéma du rôle des MPTP dans l'apoptose et la nécrose (LEMASTERS, 1999)

2. Perméabilisation chimique

a) Utilisation de la digitonine/de la saponine

La digitonine est isolée à partir de la digitale pourpre (*Digitalis purpurea*). La digitonine et la saponine font, toutes les deux, partie de la famille des saponines. Deux classes de saponines sont distinguables en fonction du type d'aglycone : stéroïde ou triterpène. Dans le cas de la digitonine et de la saponine, ce sont des stéroïdes glycosides et des détergents (SUDJI *et al.*, 2015).

La saponine et la digitonine forment des complexes avec le cholestérol membranaire. Les complexes formés à l'aide de la saponine ont une structure hexagonale tandis que les complexes formés avec la digitonine sont constitués de micelles sphériques et de structures tubulaires. Il semble que la digitonine soit plus efficace que la saponine. Il faut en effet des quantités plus faibles de digitonine pour obtenir des résultats identiques à la saponine. De même, les bicouches lipidiques riches en cholestérol se dégradent plus facilement en présence de digitonine (GÖGELEIN & HÜBY, 1984).

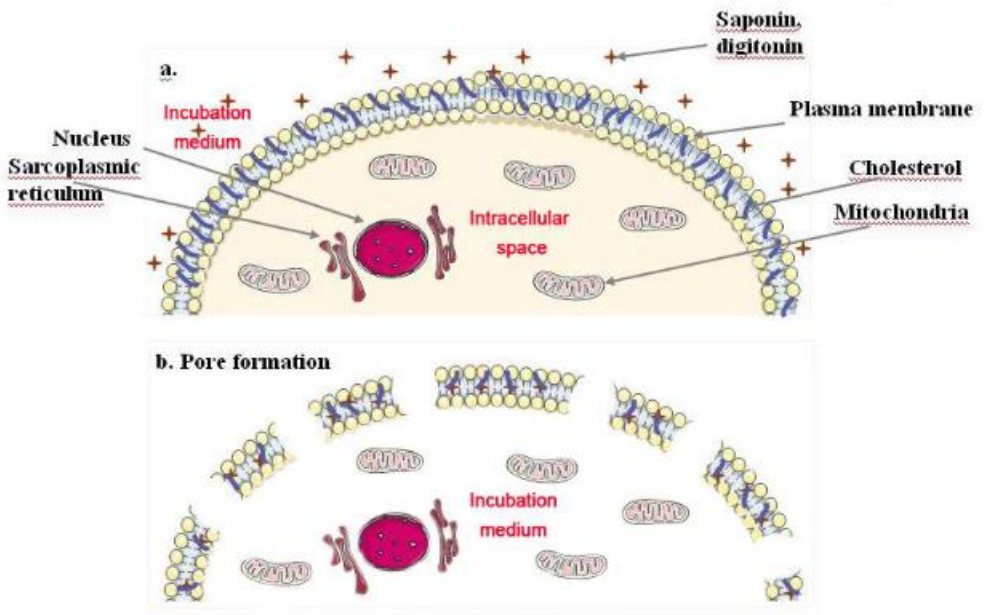


Figure 45 : Schéma de la perméabilisation par la saponine et la digitonine A : avant utilisation de la saponine B : après utilisation de la saponine (DUICU et al., 2012)

L'utilisation de la digitonine permet la perméabilisation sélective. Elle perméabilise en effet la membrane cellulaire riche en cholestérol mais n'induit pas de perméabilisation des mitochondries (VERCESI *et al.*, 1991). Ainsi, ces molécules (Figure 45 ci-dessus) rendent les

mitochondries accessibles au sein des tissus. Cependant, cela ne rend pas les complexes de la chaine respiratoire accessibles.

Le cholestérol est important pour l'activité de la digitonine. En effet la formation des complexes conduit à un changement au niveau de la perméabilité membranaire ou à la formation de pore permettant la diffusion libre de molécules avec le cytoplasme. La digitonine fonctionne selon le principe du tout ou rien, c'est-à-dire qu'en absence de cholestérol il n'y a pas de changement physiologique alors qu'en présence de cholestérol, une formation de pore est observée (SUDJI *et al.*, 2015).

b) Utilisation de l'alaméthicine

La faible quantité de cholestérol présent dans la membrane mitochondriale interne ne permet pas l'utilisation de la saponine ou de la digitonine. Par contre, l'alaméthicine est un antibiotique capable de créer des canaux au travers de la membrane mitochondriale interne. Ce peptide a d'abord été isolé depuis le champignon *Trichoderma viride* (MATHEW & BALARAM, 1983a). L'alaméthicine permet la formation de pores d'environ 10 à 20 Å (cela dépend de la composition en lipides de la membrane). Ces pores laissent passer des molécules dont la taille peut atteindre jusqu'à 3 kDa (DIVAKARUNI *et al.*, 2018). Les pores formés laissent ainsi passer des molécules de faible poids moléculaire telles que l'ATP, le NADH (SCHÖNFELD *et al.*, 2013).

L'alaméthicine dissipe le potentiel ce qui a pour conséquence d'induire le découplage des mitochondries (SCHÖNFELD *et al.*, 2013). L'utilisation de l'alaméthicine permet au NADH de traverser la membrane mitochondriale interne. L'alaméthicine permet d'avoir accès au complexe I de la chaine respiratoire sans en altérer le fonctionnement. Cependant, l'alaméthicine n'a pas que des avantages, puisqu'elle peut induire la perte de protéines de petite taille présentes dans la matrice(GRIVENNIKOVA *et al.*, 2001).

(MATHEW & BALARAM, 1983b ; DAS & BALARAM, 1984) ont proposé une modélisation du pore formé par l'alaméthicine. Il s'agit d'un canal voltage-dépendant formé au travers de la bicouche lipidique. Il y a agrégation des hélices peptidiques, formant alors un canal interstitiel (Figure 46 page 103).

D'après l'étude de (GOSTIMSKAYA *et al.*, 2003), la mitochondrie traitée par l'alaméthicine montre une intégrité structurale et une rétention du contenu protéique. L'alaméthicine permet également d'observer le fonctionnement normal des enzymes mitochondriales dans

leur environnement physiologique et en présence de toutes les interactions pouvant interférer avec leur fonctionnement. L'étude du complexe I est réalisable en utilisant cette sonde puisqu'elle n'induit pas de dommages au niveau de ce complexe. Elle permet également le maintien de l'activité ATPasique.

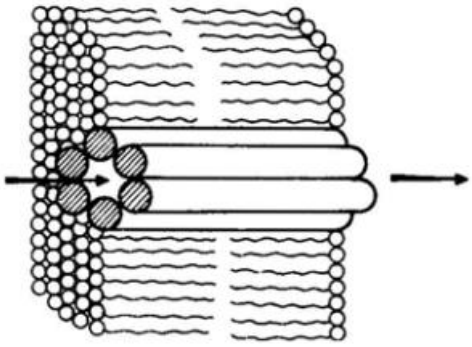


Figure 46 : Modélisation du pore formé par l'alaméthicine (DAS & BALARAM, 1984)

3. Perméabilisation par la congélation

La congélation se caractérise par la formation de cristaux glace dont la taille dépend de la descente en température du tissu. La congélation induit une rupture des membranes cellulaires entrainant alors la libération du contenu cellulaire (LI *et al.*, 2018) (Figure 47 page 104). Les cristaux de glace vont venir s'immiscer dans la membrane, créant ainsi une rupture de celles-ci. La taille des cristaux va fortement impacter les altérations cellulaires et tissulaires. Elle est liée à la vitesse de congélation et de décongélation. Les cristaux de glace sont dynamiques, leur taille et leur forme peuvent évoluer avec le temps d'entreposage et la température de congélation (FREDERIK & BUSING, 1981 ; MARTINO & ZARITZKY, 1988). La congélation induit un stress sur les cellules conduisant à la formation de cristaux et de poches de solutés hyper-osmotiques non congelées. Cette hyperosmolarité du soluté induit un retrait d'eau de la cellule et donc un rétrécissement cellulaire est observé. A la décongélation, ces cristaux retrouvent leur forme liquide, laissant alors un « trou » au niveau des membranes cellulaires.

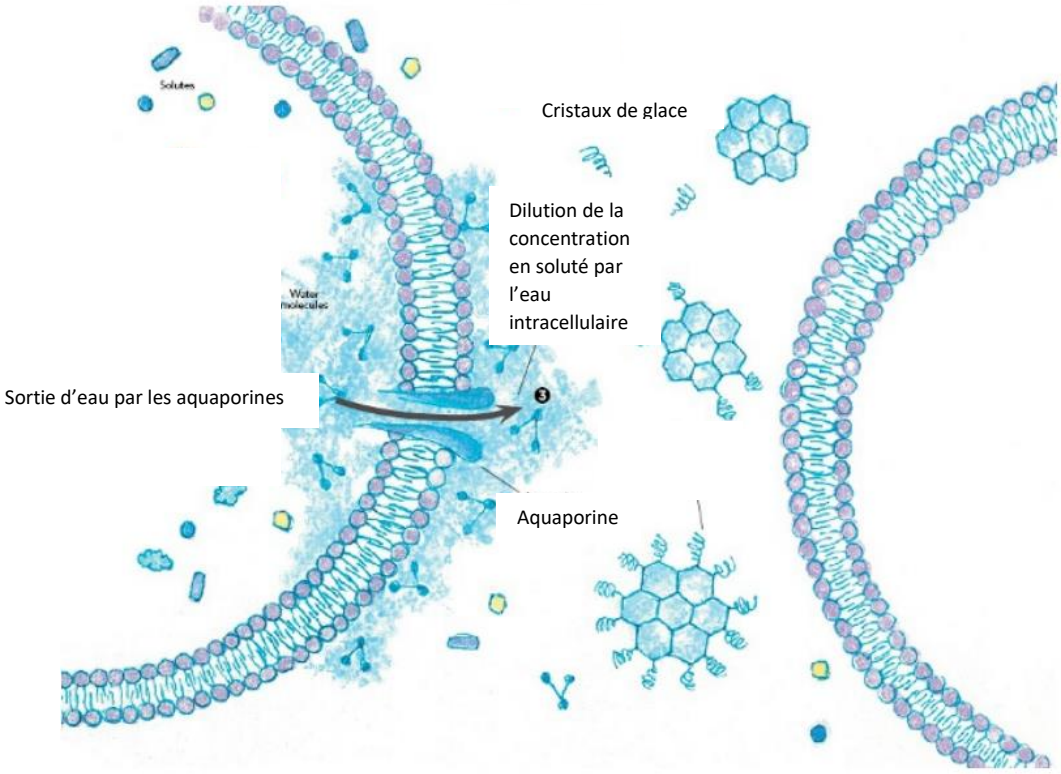


Figure 47 : Schéma montrant l'impact des cristaux de glace sur les membranes plasmiques d'après (SCUDELLARI, 2013)

La congélation induit ainsi une lyse cellulaire responsable de la libération des enzymes cytosoliques et lysosomiques, notamment la lactate déshydrogénase (LDH). Une activité plus faible de cette enzyme a été observée pour les tissus ayant subi un stade de congélation (DIOP *et al.*, 2016). La congélation induit également des changements au niveau de la structure de la membrane mitochondriale interne (TSVETKOV *et al.*, 1986). La décongélation conduit à la restauration de la concentration en eau intracellulaire et du volume cellulaire (HOLT *et al.*, 1992).

4. Bilan du chapitre VIII

Dans ce chapitre, nous avons pu prendre conscience des différents niveaux de perméabilisation auxquels nous allons être confrontés. Par des processus physiologiques, les mitochondries peuvent se perméabiliser avec l'ouverture des pores de transition. Ces pores permettent la dissipation des différents gradients de protons et de calcium et le passage de petites molécules comme le NADH. L'ouverture des pores est liée au processus de nécrose et d'apoptose.

La congélation des produits aquatiques entrainerait un éclatement des membranes internes et externes perméabilisant complètement les mitochondries.

Dans ce contexte, nous allons mesurer le niveau d'altération des membranes en faisant varier leur perméabilité. Nous allons respectivement utiliser des ionophores et des perméabilisants qui nous permettront de modifier artificiellement la perméabilité afin de mesurer le niveau d'altération des membranes lié aux processus physiologiques ou aux procédés de transformation tels que la congélation.

Matériels et méthodes

I. Matériel biologique

1. La daurade royale *(Sparus aurata)*

Le premier modèle d'étude utilisé est la daurade royale provenant de la ferme aquacole Aquanord (Gravelines, Nord). Le calibre choisi est 300/450 g Le sacrifice de ces poissons a été fait par abattage par hydrocution dans de l'eau glacée. Le stockage est ensuite réalisé dans des caisses en polystyrène isotherme, où un film protecteur a été utilisé pour éviter que le poisson ne rentre en contact avec la glace. Dès leur arrivée au laboratoire, le jour de leur abattage, les poissons sont immédiatement filetés dans la chambre froide. Une partie des filets est conservé sur glace pilée dans la chambre froide à 4°C entre 7 et 10 jours après leur arrivée, tandis que l'autre partie est aussitôt congelée à -40°C ou à -80°C. La décongélation des filets s'effectue à 4°C.

2. Le bar commun (Dicentrarchus labrax)

Des essais ont également été réalisé sur le bar (*Dicentrarchus labrax*), cette espèce provenant également de la ferme aquacole Aquanord. L'abattage et le stockage sont réalisées dans les mêmes conditions que pour la daurade royale. Le protocole mis en place au sein du laboratoire est identique à celui de la daurade royale.

3. La truite saumonée (*Onchorrynchus mykiss*)

La truite saumonée provient, quant à elle, de chez Truite service situé à Loos en Gohelle (62). Différents producteurs sont regroupés au sein de cette entreprise. Le calibre choisi est également de 300/450 g. Les truites sont abattues et refroidies. Elles sont ensuite éviscérées et placées dans des bacs de polystyrène, sous glace. Après arrivée au laboratoire, les truites sont filetées en chambre froide. Les filets sont conservés sur glace dans des caisses en polystyrène. Pour éviter le contact entre la glace et le filet, les filets sont placés sur un emballage plastique. Une partie des filets est placé au congélateur (-40°C ou -80°C), les filets sont emballés individuellement. La décongélation des filets s'effectue à 4°C.

II. Réactifs chimiques

L'acide 4-morpholinepropanesulfonique (MOPS), la sérum albumine bovine (SAB), le carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), l'acide ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tétra

acétique (EGTA), le malate, la protéinase bactérienne de type XXIV, la Rhodamine 123 (Rh123), le succinate, le Tetra Methyl Rhodamine Methyl ester (TMRM), le Tris (hydroxymethyl)aminométhane (Trizma® base), l'alaméthicine, la β-nicotinamide adénine nucléotide (NADH), la roténone, la décylubiquinone et le cytochrome c proviennent de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'acridine orange 10-nonyl bromide (NAO), le chlorure de potassium chloride (KCl) and le glutamate ont été acquis chez Fisher Labosi (Paris, France). Le chlorure de magnésium ($MgCl_2$), le phosphate de potassium dihydrogène (KH_2PO_4) et le sucrose proviennent de chez Acros Organics (Fair Lawn, NJ, USA). Rh123, TMRM and CCCP ont été préparés dans du diméthyle sulfoxide (DMSO) provenant de chez Thermo Scientific (San Diego, CA, USA). L'alaméthicine est préparée dans du méthanol provenant de chez Fisher Scientific (Loughborought, UK). Le cytochrome c est préparé dans de l'eau distillé. La décylubiquinone est préparé dans du DMSO.

Le tampon d'isolement est composé de KCl (180 mM), de sucrose (80 mM), de $MgCl_2$ (5 mM), de Tris (10 mM), de EGTA (2mM). Le pH du tampon est fixé à 7,2.

Le tampon de respiration est composé de KCl (125 mM), de MOPS (20 mM), de Tris (10 mM), d'EGTA (10 µM), de KH_2PO_4 (2,5 mM) et de SAB (2 $mg.mL^{-1}$). Le pH du tampon est fixé à 7,2.

La sonde Mitoprobe Transition Pore Assay Kit et le tampon HBSS proviennent de chez ThermoFisher Scientific. Le tampon HBSS est composé de chlorure de calcium (CaCl2) (1,26 mM), de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) (0,49 mM), de sulfate de magnésium ($MgSO_4$) (0,41 mM), de chlorure de potassium (5,33 mM), de phosphate de potassium (0,44 mM), de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) (4,17 mM), de chlorure de sodium (NaCl) (137,93 mM), de phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4) (0,34 mM) et de D-Glucose (5,55 mM).

III. Protocole d'extraction

1. Micro-extraction

Des micro-extractions ont été réalisées dans le but de récupérer un culot mitochondrial. Environ 850 mg ont été utilisés pour ces micro-extractions. Dans un premier temps, le muscle rouge est séparé du muscle blanc. Le muscle rouge est récupéré puis il est dilacéré. Ces morceaux sont ensuite mis sous agitation en présence de protéinase bactérienne pendant 3 minutes dans la chambre froide. La solution est ensuite mise dans un tube en verre puis est homogénéisée à l'aide d'un piston, une vingtaine d'allers-retours sont effectués à 300 rpm.

L'homogénat est ensuite récupéré puis il est versé dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Une première centrifugation à 7000 g de 5 minutes est effectuée. La matière grasse et le surnageant sont jetés. Le culot est resolubilisé à l'aide de 1,5 mL de tampon d'isolement. L'homogénat est ensuite versé dans le tube en verre pour subir une seconde homogénéisation, cette fois-ci à 150 rpm. La solution est récupérée puis mise dans un tube Eppendorf. Une centrifugation à 700 g pendant 5 minutes est réalisée. Le surnageant est récupéré puis placé dans un tube Eppendorf. Du tampon d'isolement est ajoutée pour remplir le tube. La centrifugation suivante est effectuée à 1500 g pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré puis recentrifugé à 1500 g pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré une dernière fois. Une dernière centrifugation est menée à 7000 g pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré. Le culot obtenu est repris à l'aide de 10 µL de tampon d'isolement. Un dosage de protéines est effectué pour les mitochondries issues du filet frais. On obtient entre 50 à 60 $mg.mL^{-1}$de protéines. Pour les mitochondries issues du filet décongelé, on obtient entre 30 à 40 $mg.mL^{-1}$ de protéines. Les étapes de centrifugation sont réalisées à 4°C. La durée d'une micro-extraction est d'environ 60 à 90 minutes. La Figure 48 ci-dessous résume les étapes d'extraction.



Figure 48 : Schéma explicatif des différentes étapes de la micro-extraction

2. Macro-extraction

Des macro-extractions ont été réalisées pour récupérer un culot mitochondrial important permettant de faire les différents essais pour les expérimentations. Dans un premier temps, le muscle rouge est séparé du muscle blanc. Le muscle rouge est récupéré puis il est découpé en petit morceaux. Ces morceaux sont ensuite mis sous agitation en présence de protéinase bactérienne pendant 6 minutes dans la chambre froide. La solution est ensuite placée dans un tube en verre puis homogénéisée à l'aide d'un piston pendant 3 minutes à 300 $t.min^{-1}$. L'homogénat est ensuite récupéré puis il est versé dans des tubes à centrifuger. Une première centrifugation à 7000 g de 10 minutes est effectuée. La matière grasse et le surnageant sont jetés. Le culot est resolubilisé à l'aide de 25 mL de tampon d'isolement. L'homogénat est ensuite versé dans le tube en verre pour subir une seconde homogénéisation cette fois-ci à 150 rpm toujours pendant 3 minutes. La solution est récupérée puis placée dans un tube à centrifuger. Une centrifugation à 700 g pendant 10 minutes est réalisée. Le surnageant est récupéré puis placé dans un tube à centrifuger, du tampon d'isolement est ajouté pour remplir le tube. La centrifugation suivante est effectuée à 1500 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré puis recentrifugé à 1500 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré une dernière fois. Une dernière centrifugation est menée à 7000 g pendant 10 minutes. Pour le filet décongelé, une seconde centrifugation à 7000 g de 10 minutes peut être nécessaire puisque le culot a tendance à se resolubiliser dans le tampon. Le surnageant est retiré. Le culot obtenu est repris à l'aide de 60 µL de tampon d'isolement. Un dosage de protéines est effectué pour les mitochondries issues du filet frais, on obtient entre 50 à 60 $mg.mL^{-1}$de protéines. Pour les mitochondries issues du filet décongelé, on obtient entre 30 à 40 $mg.mL^{-1}$ de protéines. Les étapes de centrifugation sont réalisées à 4°C. La durée d'une macro-extraction est d'environ 120 minutes. La Figure 49 page 113 résume les étapes de l'extraction.



Figure 49 : Schéma des différentes étapes de la macro-extraction

IV. Préparation des fibres

Les fibres provenaient du muscle rouge de la daurade royale. 10 mg de fibres ont été prélevées dans la partie dorsale du muscle rouge. Les fibres ont été dilacérées à l'aide de scalpels. Les fibres musculaires ont été séparées du tissu conjonctif. Les fibres ont été rincées avec le tampon de respiration. Les fibres ont été stockées dans un tampon respiratoire jusqu'à l'analyse.

V. Dosage des protéines mitochondriales

Pour doser les protéines mitochondriales, le kit BioRad protein Assay est utilisé, basé sur la méthode de Bradford (BRADFORD, 1976). C'est un dosage colorimétrique, utilisant le bleu de Coomassie. L'intensité de la coloration dépend de la concentration en protéines de l'échantillon. Une plaque de 96 puits est utilisée. Une gamme de SAB est réalisée de 0 à 0,6 $mg.mL^{-1}$. Chaque point est réalisé en duplicat. Les mitochondries extraites du filet frais sont diluées au 200^{e} tandis que les mitochondries extraites du filet décongelé sont diluées au 100^{e}. 4 µL de la gamme étalon ou de l'échantillon sont déposés dans le puits, 200 µL du réactif sont ensuite ajoutés. Avant d'être utilisé, le réactif est dilué au $5^{ème}$ à l'eau distillée. Une incubation de 15 minutes à température ambiante est réalisée. La lecture est effectuée à 595 nm.

VI. Analyse microscopique

Les culots mitochondriaux isolés ont été fixés dans du glutaraldéhyde à 2,5 % tamponné avec du cacodylate de sodium 0,1 M, postfixés dans du tétroxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon et marqués avec de l'acétate d'uranyle à 2 %. Après déshydratation par l'acétonitrile, les échantillons ont été incorporés dans de la résine de type épon (Embed-812). Des sections ultraminces (90 nm) ont été découpées à l'aide d'un ultramicrotome Leica UC7 et collectées sur des grilles de cuivre hexagonales barrées de 150 mailles. Après coloration avec de l'acétate d'uranyle à 2% préparé dans de l'éthanol à 50% et incubation avec une solution de citrate de plomb, des sections ont été observées au microscope électronique à transmission Hitachi H-600 équipé d'une source d'électrons W (fonctionnant à 75 kV). Les mitochondries ont été photographiées à l'aide de l'appareil photo numérique Hamamatsu C4742-95 fixé sur le microscope.

VII. Calcul du rapport du contrôle respiratoire

Le rapport de contrôle respiratoire (RCR) des mitochondries isolées a été obtenu comme suit. L'oxygraphie (avec un oxygraphe de modèle numérique Rank Brothers 10, Cambridge, Royaume-Uni) a été utilisée pour surveiller la consommation d'oxygène des mitochondries isolées à 25 °C. Tout d'abord, 2,1 mL de tampon respiratoire ont été ajoutés à la chambre oxygraphique complétés par un mélange de glutamate (5 mM), de malate (2 mM) et de succinate (5 mM). Ensuite, les mitochondries ont été ajoutées à une concentration finale de 0,2 mg de protéines mitochondriales par mL. Le RCR a été calculé comme le rapport entre les taux de respiration de l'état 3 à l'état 4 (n = 3) (CLEACH *et al.*, 2019). Le RCR a été évalué sans sonde (contrôle) et avec des sondes TMRM et Rh123 à une concentration de 50 nM.

VIII. Analyse cytométrique

1. Suivi du potentiel membranaire

Un cytomètre en flux (CytoFLEX Beckman Coulter Life Sciences, Paris, France) a été utilisé pour surveiller la fluorescence différentes sondes. Les sondes TMRM et rh123 ont été utilisées afin d'évaluer les changements dans le potentiel mitochondrial des mitochondries isolées extraites à différents moments de stockage du jour 0 au jour 10. Pour cette manipulation, le laser « Blue » (488 nm) a été utilisé pour exciter les fluorochromes TMRM et rh123. Le canal

fluorescent « PE » (585 nm ± 42 nm) a été utilisé pour détecter la fluorescence émise par TMRM. Le canal fluorescent « FITC » (525 nm ± 40 nm) a été utilisé pour détecter la fluorescence émise par Rh123 et la nonyl acridine orange (NAO). Pour chaque condition, l'autofluorescence des cellules sans coloration a été analysée. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Kaluza (Beckman Coulter Life Sciences). Pour évaluer le rendement mitochondrial isolé, NAO (100 nM), qui se lie à la cardiolipine dans la membrane mitochondriale interne, a été utilisé.

Pour mesurer le potentiel mitochondrial, 1 mL de tampon de respiration a été ajouté à 25 °C à un tube en polypropylène à fond rond de 5 mL conçu pour l'analyse par cytométrie en flux. Le TMRM ou la Rh123 (50 nM), sans ou avec substrats (glutamate (5 mM), malate (2 mM) et succinate (5 mM)) ont été ajoutés au tampon de respiration. Pour l'acquisition, entre 1 et 1,6 µL de mitochondries isolées ont été ajoutées afin d'enregistrer 50 000 événements en utilisant le paramètre 10 $\mu L.min^{-1}$ pour le débit de l'échantillon. En l'absence de substrats respiratoires, les mitochondries isolées oxydent les substrats endogènes indéfinis initialement présents dans les mitochondries après extraction. L'agent de découplage CCCP (concentration finale de 1 µM) a ensuite été ajouté à la préparation pour perturber le potentiel, conduisant à la sortie de TMRM ou de Rh123 de la matrice mitochondriale. Le pourcentage de mitochondries dépolarisées en présence de CCCP avec et sans substrats constituait le témoin négatif.

2. Suivi de l'accumulation de calcium

Dans cette partie, nous avons suivi l'accumulation de calcium au sein des mitochondries. Pour cela, le kit Mitoprobe Transition Pore assay a été utilisé. Dans un premier temps, les protéines mitochondriales (0,2 $mg.mL^{-1}$) sont diluées dans 300 µL de tampon HBSS supplémenté avec du calcium et du magnésium. L'autofluorescence est mesurée à l'aide d'un tube témoin. Dans ce tube il n'y a pas de sonde, ce qui permet de mesurer la fluorescence naturelle des mitochondries. Un second tube est préparé en présence de calcéine (3 µM). Le troisième tube comprend de la calcéine et du cobalt (200 µM). Le dernier tube comprend de la calcéine, du cobalt et de l'ionomycine (0,5 µM). Les tubes sont laissés à incuber à 37°C à l'obscurité pendant 15 minutes. Les tubes sont ensuite analysés au cytomètre de flux.

IX. Analyse spectrophotométrique

1. Analyses sur mitochondries isolées

La consommation de NADH a été mesurée par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV-vis, UV-1280, Shimadzu Europa GmbH, Allemagne) comme décrit précédemment par (VENARD *et al.*, 2003). Dans la cuvette spectrométrique, 1 mL de tampon respiratoire a été ajouté, puis 0,2 mg.mL^{-1} de protéines mitochondriales. Dans toutes les cuves, le cytochrome c (10 µM) et la décylubiquinone (0,1 mM) ont été inclus. Une cuve témoin a été réalisée avec addition de roténone (2,5 µM). De l'alaméthicine (2,5 µM) a été ajoutée à une autre cuve, pour observer la perméabilisation membranaire. Dans chacune des cuves, du NADH avec une concentration finale de 0,1 mM a été ajouté. L'étalonnage zéro a été effectué avant l'ajout de NADH et la lecture a été effectuée à 340 nm.

L'activité spécifique (AS) a été calculée à partir de la loi Beer-Lambert.

AS = $\frac{(\Delta A/(\varepsilon.l))/\Delta T}{[protéines]}$ µmol de NADH.min^{-1}.mg^{-1} de protéines

Coefficient d'extinction molaire du NADH ε_{NADH} = 6220 M^{-1}.cm^{-1}

ΔA = Absorbance à t = 100s – absorbance à t = 0s

l = longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu

ΔT = durée de la mesure en seconde

[protéines] = concentration en protéines dans la cuve

Une activité spécifique relative a été obtenue avec cette formule :

% AS = $\frac{AS}{ASmax} \times 100$

L'activité spécifique maximale (AS max) correspond à des filets frais à J1 en présence d'alaméthicine.

2. Analyses sur fibres

La consommation de NADH a été mesurée par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV vis, UV-1280, Shimadzu Europa Gmbh, Allemagne). La cuve spectrophotométrique contenait 1 mL de milieu respiratoire, 5 mg de fibres, du cytochrome c (10 µM) et de la décylubiquinone (0,1 mM). Un contrôle a été effectué avec de la roténone (2,5 µM). De l'alaméthicine (5 µM) a été ajoutée pour perméabiliser les fibres. Le NADH a été utilisé à une concentration finale de 0,1 mM dans tous les réservoirs excepté dans le témoin. La lecture a été effectuée à 340

nm. Les mesures ont été prises à t = 0s, t = 100s, t = 200s et t = 300s. Entre chaque mesure, les cuves ont été placés sur un agitateur vibrant à 150 rpm (Titramax 100, Heidolph instruments GmbH, Allemagne).

L'activité spécifique (AS) a été calculée à partir de la loi de Beer-Lambert:

$$AS = (\frac{(\frac{\Delta A}{\varepsilon . l})/\Delta T}{\text{quantités de fibres}})/1000 \text{ nmol de NADH.min}^{-1}\text{.mg}^{-1} \text{ de masse humide.}$$

Coefficient d'extinction molaire du NADH ε_{NADH} = 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$

ΔA = Absorbance à t = 100s – absorbance à t = 0s

l = longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu

ΔT = durée de la mesure en seconde

[protéines] = concentration en protéines dans la cuve

Le facteur 1000 permet d'exprimer l'activité spécifique en nanomoles et non plus en micromole comme précédemment.

X. Analyse oxygraphique

1. Analyses sur mitochondries isolées

La méthode oxygraphique a été utilisée pour suivre la respiration mitochondriale, elle se base sur la consommation d'oxygène. Le suivi de cette consommation a été effectué à l'aide d'un oxygraphe O-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche). L'étalonnage à 100 % a été effectué en présence de la quantité maximale d'O_2 lorsque la chambre était ouverte. De même, un étalonnage de 0 % a été effectué à l'aide de dithionite. 2,5 mL de tampon de respiration ont été ajoutés dans les chambres de l'oxygraphe. Avant l'ajout des mitochondries, le cytochrome c (10 µM) et la décylubiquinone (0,1 mM) ont été ajoutés. La concentration finale de protéines mitochondriales dans chaque chambre était de 0,2 $mg.mL^{-1}$. Du NADH (1 mM) a été ajouté, puis de l'alaméthicine (2,5 µM). L'expérience a été réalisée à +25°C.

La consommation d'O_2 a été calculée avec cette formule :

$$\text{Consommation d'O}_2 = \frac{\left(\frac{O_2}{[protéines]}\right)*60}{1000} \text{ nmol de O}_2\text{.min}^{-1}\text{.mg}^{-1} \text{ de protéines}$$

La consommation relative d'O_2 a été obtenue avec cette formule :

$$\text{\% de consommation d'O}_2 = \frac{O_2}{O_2 max} \times 100\ \%$$

O_2max est représenté par des filets frais à J1 en présence d'alaméthicine.

2. Analyses sur fibres

La consommation d'O_2 a été mesurée à l'aide d'un oxygraphe O-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche). L'étalonnage à 100 % a été réalisé lorsque la chambre était ouverte en présence d'une quantité maximale d'O_2. L'étalonnage à 0 % a été réalisé en chambre fermée et avec addition de dithionite. Avant l'ajout des fibres, du cytochrome c (10 µM) et de la décylubiquinone (0,1 mM) ont été ajoutés. Après 3 minutes, les fibres ont été ajoutées et la chambre a été fermée. Une addition de NADH (1 mM) a été faite, puis une addition d'alaméthicine (5 µM). L'expérience a été réalisée à +25°C.

La consommation d'O_2 a été calculée à l'aide de cette formule :

$$O_2 \text{ consommation} = \frac{(O_2 consommation\ avec\ substrat - O_2\ consommation\ sans\ substrat)}{quantités\ de\ fibres} x\ 60$$

La consommation d'O_2 a été exprimée en pmol de $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ de masse humide.

XI. Calcul des seuils de discrimination

Dans le cadre des études menées à l'aide de l'oxygraphe, un ratio est calculé par le rapport de la consommation d'oxygène en présence d'alaméthicine par rapport à la consommation d'oxygène sans alaméthicine peut être calculé à l'aide de cette formule :

$$ratio\ O_2 = \frac{O_2\ consommation\ avec\ alaméthicine}{O_2\ consommation\ sans\ alaméthicine}$$

Dans le cadre des études menées à l'aide de la spectrophotométrie, un ratio est calculé par le rapport de la consommation de NADH en présence d'alaméthicine par rapport à la consommation d'oxygène sans alaméthicine peut être calculé à l'aide de cette formule :

$$ratio = \frac{NADH\ consommation\ avec\ alaméthicine}{NADH\ consommation\ sans\ alaméthicine}$$

Ce ratio a permis de déterminer une valeur seuil de discrimination. En dessous d'une certaine valeur, des filets congelés/décongelés ont été décelés.

XII. Analyses statistiques

1. Analyses statistiques pour l'article 1

L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA et générée avec le logiciel SPSS 17. Les changements en pourcentage dans la polarisation mitochondriale au fil du temps ont été évalués en triplicat. Les données sont exprimées sous forme de moyennes ± déviation standard. Des tests t non appariés à deux échantillons ont été utilisés pour exprimer la signification de la différence ($p < 0,05$) entre les moyennes, et le test de Levene a été utilisé pour déterminer l'homogénéité de la variance.

2. Analyses statistiques pour l'article 2

Des analyses statistiques ont été réalisées et des graphiques ont été générés avec le programme PAST (logiciel libre pour l'analyse de données scientifiques, statistiques univariées et multivariées) version n°4.03. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type. Un test de Wilcoxon a été utilisé pour exprimer la significativité de la différence ($p < 0,05$) entre les moyennes.

3. Analyses statistiques pour l'article 3

Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés avec XLSTAT 2022.1.1. Chaque expérience a été répétée 4 fois. Les données ont été exprimées en moyenne ± écart-type. Un test t a été utilisé pour exprimer la significativité de la différence ($p <0,05$) entre les moyennes.

Résultats

I. Evaluation de la qualité des produits aquatiques par cytométrie de flux

La conservation des produits aquatiques à basse température (4°C) ou très basse température (inférieure à -20°C) va modifier profondément leur structure. Dans de précédents travaux au laboratoire il a été montré que les mitochondries pouvaient être utilisées comme des marqueurs de fraîcheur et d'altération. Des études sur des mitochondries isolées de filets de bar (*Dicentrarchus labrax*) et de daurade royale *(Sparus aurata)* conservés à 4°C ont montré une altération des fonctions mitochondriales avec le temps (CLEACH *et al.*, 2019).

La combinaison des méthodes oxygraphiques et de fluorescence a permis de mesurer l'évolution des fonctions mitochondriales avec le temps de conservation à 4°C des produits aquatiques. Le RCI (Respiratory Control Index) des mitochondries isolées de filets de daurade royale diminuait avec le temps de conservation. Il a pu être observé une perte progressive des fonctions mitochondriales. Elles se caractérisaient par une augmentation de la perméabilité membranaire. Elles se traduisaient également par une augmentation de la sensibilité au cytochrome c et par une diminution du potentiel mitochondrial. La perte du potentiel membranaire se caractérisait par une diminution de l'intégration d'une sonde cationique (Rhodamine 123). Le suivi dynamique de la fluorescence des mitochondries et leur réponse à certaines drogues (inhibiteurs ou activateurs des chaines respiratoires) devait nous montrer la pertinence du suivi du potentiel mitochondrial pour mesurer l'état de fraîcheur des filets de poisson (CLEACH *et al.*, 2020).

Des travaux ont ensuite été menés sur le niveau d'intégration des sondes cationiques (Rhodamine 123 et TMRM) sur les mitochondries isolées de filets de poisson. Le travail a consisté à regarder s'il existait une corrélation entre le niveau d'intégration des sondes fluorescentes et l'état de fraîcheur des produits aquatiques. Le niveau d'intégration des sondes est proportionnel au niveau de potentiel des mitochondries isolées. La propriété d'extinction des sondes fluorescentes a été utilisée pour mesurer l'état du potentiel des mitochondries. Les mitochondries à haut potentiel incorporent plus de sondes cationiques que les mitochondries à bas potentiel, ce qui « éteint » une partie de la fluorescence totale de l'échantillon (Quenching). Les mitochondries à haut potentiel ayant intégrées plus de sondes

cationiques sont plus sensibles à l'agent ionophore : CCCP. Le niveau d'intégration de la sonde dans les mitochondries a été normalisé par rapport à la fluorescence associée au CCCP. Les résultats obtenus par fluorimétrie ont été convaincants mais la limite de cette méthode reposait en partie sur la qualité des extractions. Les sondes cationiques peuvent interagir avec de nombreux autres organites et le CCCP reste également un ionophore capable d'interagir avec toutes les membranes cellulaires.

L'utilisation de la cytométrie de flux comme moyen d'analyse du potentiel membranaire des mitochondries isolées a permis d'arriver un niveau de résolution nettement supérieur. La cytométrie de flux sélectionne les particules à analyser selon leur taille et leur structure. Plusieurs contrôles ont été réalisés sur les isolats de mitochondries en microscopie électronique. Les extractions permettent d'atteindre un niveau élevé de purification des mitochondries. Il existe cependant une légère contamination par des débris tissulaires divers. Ces éléments sont susceptibles de réagir avec les sondes cationiques (Rhodamine 123 et TMRM) et de perturber le signal. Les mitochondries présentent une certaine hétérogénéité de taille et de forme mais la cytométrie de flux permet cependant de faire un tri sélectif des particules à analyser en fonction de la taille et de la structure. D'autre part, la cytométrie permet d'analyser les fluorescences associées aux particules à analyser. Il est possible de réaliser des multi-marquages et donc de combiner des marquages qui relèvent de la structure et des marquages qui sont associés à la fonction. Par conséquent, cette méthode d'analyse permet de mesurer le niveau de fluorescence pour l'ensemble des particules sélectionnées. Cette méthode s'est avérée très sensible pour analyser le potentiel des mitochondries isolées de filets de bar conservés à 4°C. La méthode a été étendue aux filets de daurade, de truite saumonée et s'est montrée tout aussi efficace (résultats non présentés dans ce travail).

Les méthodes de mesure de qualité des produits aquatiques par l'analyse des mitochondries en cytométrie de flux restent des méthodes expertes, applicables sur des lots de produits à contrôler et moins applicables à de petits échantillons. Dans le travail qui suit, l'analyse s'est portée sur l'extraction des mitochondries à partir de muscle rouge de filets de bar.

La conservation des produits à l'état congelé entraine de profondes altérations cellulaires des produits aquatiques. Les membranes sont les premières structures cellulaires touchées par le choc congélation-décongélation. Les mitochondries sont des organites qui devraient donc être particulièrement impactés par le choc congélation-décongélation. A la suite de cet article,

nous avons donc regardé si la taille et la structure des mitochondries étaient impactées par la congélation-décongélation et analysables en cytométrie de flux. La perméabilité des mitochondries isolées de filets congelés/décongelés est profondément altérée. Nous avons voulu exploiter cette différence de perméabilité pour différencier les produits frais, des produits congelés/décongelés. Nous nous sommes intéressés à la capacité des membranes mitochondriales à retenir le calcium. La teneur en calcium des mitochondries isolées de filets de bar frais et congelés a été mesurée grâce à la sonde calcéine et analysée en cytométrie de flux.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans la revue Food Chemistry en 2022 : (SORET *et al.*, 2022).

Article 1

Measurement of fish freshness: flow cytometry analysis of isolated muscle mitochondria

Measurement of fish freshness: flow cytometry analysis of isolated muscle mitochondria

Méline Soret[a], Tiffanie Bouchendhomme[a], Jérôme Cléach[a], Nathalie Jouy[b], Claire Crola Da Silva[c], Anne Devin[d], Thierry Grard[a*] and Philippe Lencel[a]

[a]*Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, Institut Charles Viollette, USC ANSES, INRAE, Univ. Artois, Univ. Lille, Univ. Picardie Jules Verne, Univ. Liège, Junia, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France*

[b]*Univ. Lille, Bio Imaging Center Lille, Lille, F-59000, France*

[c]*Univ. Claude Bernard Lyon 1, CarMeN laboratory, INSERM U1060, INRAe, INSA, F-69500 Bron, France*

[d]*UMR CNRS 5095 Institut de biochimie et génétique cellulaires (IBGC), F-33077 Bordeaux, France*

[*]Corresponding author: Tel: +33 3 21 99 25 08

E-mail address: thierry.grard@univ-littoral.fr (T. Grard).

Email addresses:

Méline Soret: meline.soret@univ-littoral.fr

Tiffanie Bouchendhomme: tiffanie.bouchendhomme@univ-littoral.fr

Jérôme Cléach: jerome.cleach@univ-littoral.fr

Nathalie Jouy: nathalie.jouy@inserm.fr

Claire Crola Da Silva: claire.crola-da-silva@univ-lyon1.fr

Anne Devin: anne.devin@ibgc.cnrs.fr

Philippe Lencel: philippe.lencel@univ-littoral.fr

Key words: fish freshness, flow cytometry, mitochondria, membrane potential, European seabass

Abstract

Mitochondria are real sensors of the physiological status of tissues. After the death of an animal, they maintain physiological activity for several days. This activity is highly dependent on the availability of

nutrients in the tissue. In this study, flow cytometry was used to measure the membrane potential of mitochondria isolated from European seabass (*Dicentrarchus labrax*) red muscle stored in ice for seven days in order to characterize fish freshness. Two probes, TMRM and Rhodamine 123, were used to measure mitochondrial potential. During the first few days (D0 to D3), isolated mitochondria maintained high potential, and then lost their potential (from D3 to D5), but were always re-polarizable after addition of substrates (glutamate, malate and succinate). From D7, the mitochondria were more strongly depolarized and were difficult to repolarize by the substrates. Using flow cytometry, we demonstrated that mitochondria were an excellent marker to confirm seabass freshness.

1. Introduction

The impact of food quality on human health is critical. Government agencies are responsible for ensuring food safety, paying particular attention to chemical and microbiological risks (Kher et al., 2013). The accumulation of knowledge on this subject has made it possible to change the way consumers and manufacturers look at food or food matrices. Consumers have many different ways of perceiving products, but their perè-ception is increasingly linked to health benefits (Grunert, Bredahl, & Brunsø, 2004; Kamihiro, Stergiadis, Leifert, Eyre, & Butler, 2015). In parallel, increasing interaction between consumers and industry is leading to changes in practices in the agri-food sector and more particularly in the aquatic products industry (Wu, Pu, & Sun, 2019).

The quality of aquatic products is still based exclusively on chemical and microbiological criteria. Even though the number of methods for measuring seafood quality is increasing, the methods that are used to measure fish freshness are still based on the the total volatile base nitrogen (TVB-N) level (Parlapani, Mallouchos, Haroutounian, & Boziaris, 2014) or on the determination of biogenic amines (Pinto, Nieto, Zón, Fernández, & De Araujo, 2016). These are reference methods which, although used routinely, yield variable results depending on the species.

Mitochondria seem to play an important role in changes in the quality of food products, in particular by activating proteases and by producing numerous free radicals which are involved in how products change *post mortem* (England et al., 2018; Sierra & Oliván, 2013). These oxidation reactions are

involved in the modification of the nutritional quality and indirectly impact human health (Huang & Ahn, 2019). Various studies have reported *post mortem* morphological mitochondrial changes and some have shown that mitochondrial activity was still present *post mortem* in storage conditions of +4°C in bovine, pork, poultry or fish models (Chauhan & England, 2018; Tang et al., 2005). Mitochondrial activity was also used to measure seafood alteration by monitoring the consumption or production of metabolites (Chang, Wu, Yeh, & Liao, 2020; Hassoun & Karoui, 2017).

As part of a previous study examining measurements of early markers of freshness, we showed that measuring fish freshness could be associated with measuring mitochondrial activity (Cléach et al., 2019). The structural and physiological changes in mitochondria in fish fillets stored at 4 °C seemed to show that mitochondria are a good indicator of freshness and spoilage, as well as the good physiological condition of the cells or tissues.

In another previous study, we showed that mitochondria isolated from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fillets maintained normal respiratory activity for 3 days. Uncoupling was observed on the fourth day with a gradual loss of mitochondrial membrane potential (Cléach, Soret, Grard, & Lencel, 2020).

This study completed the triptych of approaches developed in the laboratory concerning the determination of fish freshness by studying variations in *post mortem* mitochondrial potential according to the following three approaches: oxygraphy (Cléach et al., 2019); fluorescence (Cléach et al., 2020) and flow cytometry (current article).

In this study, we extended this observation to another fish species: seabass (*Dicentrarchus labrax*). The approach was based on a flow cytometric analysis of mitochondria isolated from seabass fillets stored at 4°C. Flow cytometry allowed us to target both an organelle (mitochondria) and a marker of choice (mitochondrial potential). For the first time, we demonstrate that flow cytometric analysis of mitochondrial potential is a determinant of the level of spoilage of fish fillets.

Flow cytometry is used specifically in the food field to evaluate microorganisms survival, metabolic activities, and stress, both in processing and in finished products ((Malacrinò, Zapparoli, Torriani, &

Dellaglio, 2001)). A large number of fluorescent probes are available to assess membrane permeability, enzymatic activities, bacterial potential, and various cellular constituents (Sträuber & Müller, 2010). The aim of this study was to monitor the status of seabass fillets by flow cytometry analysis of mitochondria isolated from these fillets. This method has already been widely used to assess the impact of physical or chemical treatments on different types of tissue (Cottet-Rousselle, Ronot, Leverve, & Mayol, 2011; Mattiasson, Friberg, Hansson, Elmér, & Wieloch, 2003). The mitochondrial marker that has been retained as the most pertinent for these studies is membrane potential. Over a long period of time, the mitochondrial potential collapses. To detect these different states, mitochondrial enriched fractions were studied with two mitochondrial membrane potential measurement probes: Tetra Methyl Rhodamine Methyl ester (TMRM) and Rhodamine 123 (Shapiro, 2000). The selection of mitochondria was carried out according to two criteria: their size and specific marking by Nonyl Acridine Orange (NAO) that binds specifically to cardiolipin in the inner membrane of the mitochondria (Mattiasson, 2004) in order to measure the impact of storage at 4°C over time on the mitochondrial membrane potential.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), bovine serum albumin (BSA), Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid (EGTA), malate, proteinase type XXIV, Rhodamine 123 (Rh123), succinate, Tetra Methyl Rhodamine Methyl ester (TMRM), Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Trizma® base) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Nonyl Acridine Orange (NAO), Potassium chloride (KCl) and glutamate were acquired from Fisher Labosi (Paris, France). Magnesium chloride ($MgCl_2$), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and sucrose were purchased from Acros Organics (Fair Lawn, NJ, USA). Rh123, TMRM and CCCP were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) purchased from Thermo Scientific (San Diego, CA, USA).

2.2. Fish muscle

European seabass (*D. labrax*) (300–400 g) were sourced from Aquanord sea farm (Gravelines, France), as previously described (Cléach et al., 2019). Upon arrival at the laboratory, 2 hours after death, the fish were immediately filleted. The fillets were stored on ice in a cold room (at 4°C to prevent the ice from melting too quickly) for seven days and used for experiments every other day for seven days: D0, D1, D3, D5 and D7. The ice was renewed every day. A plastic wrap was used to avoid contact between the fillets and ice or accumulating water.

2.3. Mitochondrial isolation

Mitochondria were isolated from the fillets of different fish. A piece about 0.5 cm^3 (500 mg) of red muscle harvested from the medial portion of the lateral fillet line was dissected from the fillets and cut into thin strips. The obtained strips were incubated at 4°C for 5 minutes with 2 mL isolation buffer (ISA: 180 mM KCl, 80 mM sucrose, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, 2 mM EGTA, pH 7.2 at 4°C) containing 0.2 $mg.mL^{-1}$ of bacterial proteinase type XXIV. The tissue suspension was poured into a 3 mL glass Potter homogenizer and homogenized for 3 min using a motorized Teflon pestle at 300 rpm. The homogenate was centrifuged at 7,500 *g* for 5 minutes. The resulting pellet was resuspended in 1.5 mL isolation buffer containing 2 $mg.mL^{-1}$ of fatty acids free BSA and homogenized with pestle motor mixer. The homogenate was then centrifuged at 700 *g* for 5 min. The supernatant was filled to 1.5 mL with isolation buffer and centrifuged at 1,500 *g* for 5 min. The supernatant was centrifuged again at 7,000 *g* for 5 min. The mitochondrial pellet obtained was resuspended in the isolation buffer. Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit, derived from the Bradford method, using BSA as a standard. All mitochondrial isolation steps were performed in a cold room at 4°C. To conduct oxygraphy and flow cytometry studies, the mitochondrial pellet was resuspended in respiration buffer (125 mM KCl, 20 mM MOPS, 10 mM Tris, 10 µM EGTA, 2.5 mM KH_2PO_4, 2 $mg.mL^{-1}$ fatty acids free BSA, pH 7.2). For flow cytometry measurements, the amount of mitochondria was adjusted to 50,000 events per µL.

2.4. Transmission electron microscopy

The isolated mitochondrial pellets were fixed in 2.5% glutaraldehyde buffered with 0.1M sodium cacodylate, postfixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer and stained with 2% uranyl acetate. After acetonitrile dehydration, samples were embedded in epon-like resin (Embed-812). Ultrathin sections (90 nm) were cut using a Leica UC7 ultramicrotome and collected on 150 mesh hexagonal barred copper grids. After staining with 2% uranyl acetate prepared in 50% ethanol, and incubation with a lead citrate solution, sections were observed on a Hitachi H-600 transmission electron microscope equipped with a W electron source (operated at 75kV) and a side mounted Hamamatsu C4742-95 digital camera.

2.5. Respiratory control ratio

The respiratory control ratio (RCR) of isolated mitochondria was obtained as follows. Oxygraphy (Rank Brothers digital model 10, Cambridge, United Kingdom) was used to monitor the oxygen consumption of isolated mitochondria at 25°C. Firstly 2.1 mL of respiration buffer were added to the oxygraphic chamber supplemented with a mixture of glutamate (5 mM), malate (2 mM), and succinate (5 mM). Then, mitochondria were added to a final concentration of 0.2 mg/mL. RCR was calculated as the ratio of state 3 to state 4 rates of respiration (n =3) (Cléach et al., 2019). RCR was evaluated without a probe (control) and with TMRM and Rh123 probes at a concentration of 50 nM.

2.6. Flow cytometry

A flow cytometer (CytoFLEX Beckman Coulter Life Sciences, Paris, France) was used to monitor the fluorescence of TMRM and Rh123 in order to evaluate changes in mitochondrial potential of isolated mitochondria extracted at different storage times from Day 0 to Day 7. For this manipulation, the “Blue” laser (488 nm) was used to excite the fluorochromes TMRM and Rh123. The fluorescent channel “PE” (585 nm ± 42 nm) was used to detect the TMRM emitted fluorescence. The fluorescent channel “FITC” (525 nm ± 40 nm) was used to detect the Rh123 and NAO emitted fluorescence. For each condition, autofluorescence of cells without staining was analyzed. Data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter Life Sciences). To evaluate isolated mitochondrial yield, NAO (100 nM), which binds to cardiolipin in the inner mitochondrial membrane, was used.

To measure mitochondrial potential, 1 mL of respiration buffer was added at 25 °C to a 5 mL round-bottom polypropylene tube designed for flow cytometry analysis. TMRM or Rh123 (50 nM), without or with substrates (glutamate (5 mM), malate (2 mM) and succinate (5 mM)) were added to the respiratory buffer. For the acquisition, between 1 to 1.6 µL isolated mitochondria were added in order to record 50,000 events using the 10 $\mu L.min^{-1}$ setting for sample flow rate. In the absence of respiratory substrates, the isolated mitochondria oxidize the undefined endogenous substrates initially present in the mitochondria after extraction. The decoupling agent CCCP (1 µM final concentration) was then added to the preparation to disrupt the potential, leading to the TMRM or Rh123 output from the mitochondria matrix. The percentage of depolarized mitochondria in the presence of CCCP with and without substrates was the negative control.

2.7. Statistical analysis

The statistical analysis was performed by ANOVA and generated with SPSS 17 software. Changes in percent mitochondrial polarization over time were assessed in triplicate. Data are expressed as mean ± standard deviation. Unpaired two-sample *t*-tests were used to express the significance of difference ($p < 0.05$) between means, and Levene's test was used to determine the homogeneity of variance.

3. Results

3.1. Electron microscopic analysis of isolated mitochondria

Electron microscopy had a dual purpose. It consisted, on the one hand, in checking the status of purity of the preparation and, on the other, in controlling the status of the mitochondria after extraction (Fig. 1). The vast majority of the isolated mitochondria was quite well preserved. However, differences in enrichment were observed between preparations. The enrichment level on day 4 was higher than on D0 and D7. Mitochondrial extracts showed rough reticulum debris and the presence of various vesicles. However, the size of these vesicles was much smaller (> 0.5 µm). The presence of myofibrillar debris was easily identifiable on these images (Fig. 1). The size of the mitochondria in the isolate remained fairly homogeneous and varied between 1 and 2 µm. The size of the mitochondria was fairly

homogeneous across the images (Fig. 1A to 1C and 1A' to 1C'), indicating that the mitochondria do not exhibit excessive swelling during the storage period of the fillets at 4°C. By D0, the mitochondria appeared with well-defined membranes and a well-formed network of crests. On some mitochondria, detachment of the crests revealed intermembrane spaces (to be distinguished from vacuolization) (Fig. 1A and 1A'). On D4, the density of the outer membrane seemed decreased for certain mitochondria. The network of crests sometimes appeared disorganized for some mitochondria. At this stage, densification (in black) could be observed at different locations of the mitochondrial matrix (Figure 1.B and 1B'). By D7, the mitochondria retained their shape, but the outer membranes and crests were disorganized. Initial vacuolization could be observed. Similarly, the dense granules were a little more visible at D7 (Fig. 1C and 1C').

3.2. Mitochondrial targeting

The heterogeneity of the isolates obtained led to discrimination of mitochondria compared to other cellular debris. A first selection was made according to particles size and structure (Side scatter SSC and Forward scatter FSC analysis) (Fig. 2.A). The gate selected made it possible to focus on the elements of interest in a region called R1, which represented 75.38% of 10,000 events (Fig. 2.A). Events within R1 were plotted for their fluorescence at 525 nm to determine the unstained control sample (Fig. 2B). Two different regions were identified: R2 (64.88% of R1 events) and R3 (0.07% of R1 events). In this case, the distribution of particles between regions R2 and R3 was 99.9% and 0.1%, respectively (Fig. 2B). To determine the proportion of mitochondria from the R1 region, the sample was labelled with NAO (Fig. 2.C). In this case, the R2 region represented 9.74% of the R1 events, while the R3 region represented 53.37% of the R1 events. The distribution of particles between the R2 and R3 regions, where particles were NAO-positive, was 15.43% and 84.57%, respectively (Fig. 2C).

These results confirmed that the R1 region was very largely composed of mitochondria. This region was studied when marking the mitochondria with TMRM and Rh123 to measure the potential at different storage times at 4°C. NAO and TMRM/Rh123 labeling were not carried out together, due to the proximity of their emission spectra.

3.3. Mitochondrial membrane potential

Mitochondrial activity was studied according to the storage time of the seabass fillets at 4°C. Changes in the native mitochondrial potential of isolated red muscle mitochondria from seabass fillets stored at 4°C were monitored over time, from D0 to D7. In order to ensure that the probe concentrations had no impact on mitochondrial respiration, and therefore on mitochondrial potential, the measurement of respiration was carried out in the absence of probes and in the presence of TMRM or Rh123. The presence of these probes at concentrations used for flow cytometry (50 nM) had no impact on respiration (Respiratory Control Ratio: RCR). RCR was determined from isolated mitochondria in the absence of probes and in the presence of TMRM or Rh123 fluorescent probes. The hundred percent was the relative calculation of the RCR obtained without probe (n=3, $p > 0.05$, Student's *t*-test). TMRM had a percentage of 93.5 ± 13, while Rh123 had a percentage of 104 ± 17. These two probes could thus be used to measure potential variations in the isolated mitochondria seabass.

3.3.1. Mitochondrial membrane potential without substrates

The native mitochondrial potential corresponds to the potential of the mitochondria without the addition of substrates.

3.3.1.1. Measurements of the membrane potential with TMRM and without substrates

The level of TMRM incorporation in isolated mitochondria from seabass fillets was studied at different storage times in the absence of substrates (Fig. 3A). The CCCP indicator at D0 dissipated the mitochondrial potential and showed that the mitochondria fixed the probe. This negative control verified the fluorescence level of fully depolarized mitochondria. At D0, in the presence of CCCP, mitochondria were highly depolarized. Mitochondria located in the R2 region (81.34 %) showed low potential (Fig. 3A). At D0, the level of probe incorporation was elevated: 70.48% of the mitochondria had a high potential (R3 region), compared to 9.68% at low potential (R2 region) (Fig. 3A). The 19.83% (% (R1 – (R2+R3) events) of undetected events in these two areas corresponded to elements other than the mitochondria. They most likely reflected the percentage of purity of the mitochondrial

homogenate (80.17%). The distribution of mitochondria between the R2 and R3 regions was 12.08% and 87.92%, respectively reflecting a very large majority of isolated mitochondria with a high potential. From D0 to D7, the potential of mitochondria isolated from seabass samples gradually decreased over storage time. The percentage of high potential mitochondria decreased from 57.54% at D1 to 15.12% at D7 (Fig. 3A). Conversely, the percentage of low potential mitochondria increased from 22.5% at D1 to 63.41% at D7 (Fig. 3A). At D7, the distribution of mitochondria between the R2 and R3 regions was 80.75% and 19.25%, respectively reflecting a very large majority of isolated mitochondria with low potential. Using TMRM probe in the absence of substrates, the preservation of fish fillets at 4°C was accompanied by a loss of mitochondrial potential over time.

3.3.1.2. Measurements of membrane potential with Rhodamine 123 and without substrates

The results obtained with TMRM were confirmed with the use of a second potential probe: Rh123 (Fig. 4A). CCCP was also used as a negative control. At D0, in the presence of CCCP, mitochondria were highly depolarized. Mitochondria located in the R2 region (76.92%) showed low potential (Fig. 4A). At D0, the percentage of high-potential mitochondria was high (72.63%), compared with 10.53% of low-potential mitochondria (Fig. 4A). The 16.84% (% (R1 – (R2+R3) events) of undetected events in these two areas corresponded to elements other than the mitochondria. They reflected the percentage of purity of the mitochondrial homogenate (83.16%). The distribution of mitochondria between the R2 and R3 regions was 12.67% and 87.33%, respectively reflecting a very large majority of isolated mitochondria with a high potential. From D0 to D7, the potential of mitochondria isolated from seabass samples gradually decreased over the storage time. The percentage of high-potential mitochondria decreased from 36.40% at D1 to 7.74% at D7 (Fig. 4A). Conversely, the percentage of low-potential mitochondria increased from 43.02% at D1 to 64.49% at D7 (Fig. 4A). At D7, the distribution of mitochondria between the R2 and R3 regions was 89.28% and 10.72%, respectively reflecting a very large majority of isolated mitochondria with a low potential. Using the Rh123 probe in the absence of substrates, the preservation of fish fillets at 4°C was accompanied by a loss of mitochondrial potential over time.

3.3.1.3. Summary of the analysis with fluorescent probes without substrates

These results obtained with each of the two probes showed that discrimination by the size and structure of the mitochondria made it possible to eliminate the contaminants and to measure the physiological status of the mitochondria via their potential. Without substrates, mitochondria isolated from seabass samples rapidly lost their potential over time (Fig. 5A and 5B). Using TMRM or Rh123 probes without substrates, a significant decrease in the percentage of polarized mitochondria was observed from D0 to D7. TMRM was a more sensitive probe than Rh123 for the measurement of mitochondrial potential over time, especially between D0 and D5. At D7 they reached a very low potential level, close to that of CCCP depolarized mitochondria.

3.3.2. Mitochondrial membrane potential repolarization with substrates

Post-mortem biochemical reactions are numerous and contribute to the production of many metabolites, such as pyruvate (glycolytic pathway). Different types of metabolites are able to constitute substrates for the mitochondrial respiratory chain, such as glutamate, malate and succinate. The availability of these substrates could therefore condition the physiological activity of mitochondria in *post-mortem* tissue. The purpose of adding the substrates was to study the *post-mortem* physiological activity of isolated mitochondria. In this part, we compared the potential of isolated mitochondria using two different probes (TMRM and Rh123) in the presence of substrates (Fig. 3B and 4B).

3.3.2.1. Measurements of the membrane potential with TMRM and with substrates

CCCP was used as a negative control. At D0, in the presence of CCCP, mitochondria were highly depolarized. Mitochondria located in the R2 region (93.28%) showed low potential (Fig. 3B). From D0 to D5, the addition of substrates led to a relatively large increase of the mitochondrial potential (Fig. 3B). The substrate effect was greater as the storage time increased. At D0, the distribution was as follows: 87.75% of mitochondria were at high potential, and 1.77% of mitochondria were at low potential, with a distribution of mitochondria between the R2 and R3 regions of 1.98% and 98.02% respectively, reflecting a very large majority of isolated mitochondria with a high potential (Fig. 3B). At

D5, the high/low potential distribution was 61.80%/7.19%. Similarly, at D7, the distribution was as follows: 54.83% of mitochondria were at high potential and 22.05were at low potential (Fig. 3B). At D7, the distribution of mitochondria between the R2 and R3 regions was 28.68% and 71.32%, respectively showing a greater proportion of high potential mitochondria in the presence of substrates compared to the same time in the absence of substrates (Fig. 4A and B).

3.3.2.2. Measurements of the membrane potential with Rh123 and with substrates

CCCP was used as a negative control. At D0, in the presence of CCCP, mitochondria were highly depolarized. Mitochondria located in the R2 region (90.06%) showed low potential (Fig. 4B). From D0 to D5, the addition of substrates led to a relatively large increase of the mitochondrial potential. The substrate effect was greater as the storage time increased indicating depletion of endogenous substrates throughout time post mortem. At D0, the distribution was as follows: 78.77% of mitochondria were at high potential, and 12.15 % were at low potential, with a distribution of mitochondria between the R2 and R3 regions of 13.36% and 86.64%, respectively reflecting a very large majority of isolated mitochondria with a high potential (Fig. 4B). At D5, the high/low potential distribution was 29.13%/46.91%. Similarly, at D7, the distribution was as follows: 24.49% of mitochondria were at high potential, and 46.55% were at low potential (Fig. 4B). At D7, the distribution of mitochondria between the R2 and R3 regions was 65.52% and 34.48%, respectively reflecting a large majority of isolated mitochondria with a high potential with substrates.

3.3.2.3. Summary of the analysis with fluorescent probes with substrates

With substrates, mitochondria isolated from seabass samples have gradually lost their potential over time (Fig. 5A and 5B). Using TMRM or Rh123 probes with substrates, a significant decrease in the percentage of polarized mitochondria was observed from D0 to D7. TMRM was a more sensitive probe than Rh123 for the measurement of mitochondrial potential over time, especially between D0 and D7.

3.3.3. Comparative study between staining mitochondria without or with substrates

The substrates malate, glutamate and succinate largely contributed to repolarize the mitochondria. The effect of the substrates was much lower at D5 and D7 (Fig. 3B and 4B). At these times, a significant proportion of the mitochondria were no longer repolarizable after the addition of substrates. At D7, with the TMRM probe, the addition of substrates induced a high/low distribution of 54.83%/22.05% versus 87.75%/1.77% at D0 (Fig. 3B). The trends were equivalent with Rh123 (Fig. 4B), although the relative percentages of high potential mitochondria were lower. The difference in the percentage of polarized mitochondria with substrates performed on several kinetics (n = 3) was very significant for times D3, D5 and D7 (Fig. 5A and 5B). The proportion of non-polarizable mitochondria by the substrates increased rapidly beyond D7 (results not shown), which indicated profound alteration of the mitochondria and more precisely uncoupling of the mitochondrial inner membrane. These results complemented those obtained from previous studies (Cléach et al., 2019; Cléach et al., 2020; Cléach et al., 2018) by showing that the effect of substrates can also provide important information on the physiological status of the mitochondria and thereby the tissue.

4. Discussion

Flow cytometry is a technique used to assess the characteristics of whole cell mitochondria and isolated mitochondria. The interest of working on isolated mitochondria is twofold: it allows mitochondria to be isolated from any tissue, and it provides an idea of the physiological status of the tissue (Lampl, Crum, Davis, Milligan, & Del Gaizo Moore, 2015). On the other hand, flow cytometry of isolated mitochondria can also detect morphological variations and subpopulations of mitochondria (Fuller & Arriaga, 2003). In a previous study, we demonstrated that the freshness of seabream fillets could be assessed by isolated mitochondria activity. We measured the respiration and mitochondrial potential on red muscle isolated mitochondria and correlated the freshness level with loss of mitochondrial potential (Cléach et al., 2020). The originality of this study lies in the fact that the freshness evaluation of fish fillets was measured by flow cytometry of red muscle mitochondria isolated from seabass fillets. These results confirmed the relevance of mitochondrial potential in fish freshness measurement. Mitochondrial potential is a reliable indicator of the physiological status of

the cell or tissue. It is altered when tissue is ischemic (lack of oxygen) (Lee & Wei, 2012) and deprived of nutrients (disruption of energy metabolism) (P. X. Petit, O'connor, Grunwald, & Brown, 1990). Mitochondrial potential is also affected when cell integrity is affected (Jayaraman, 2005). Consequently, the mitochondrial potential evaluation of isolated mitochondria reflects the cellular status and tissue damage. In this study, purity of the isolated mitochondria preparation for the electron microscopy analyses showed enrichment in mitochondria, which may vary slightly following extraction. Preserving the size and overall structure of the mitochondria over 7 days allowed them to be selected in the same gate (from D0 to D7). We did not observe any significant changes in the size and structure of the mitochondria over 7 days in the selected population. However, there is still a risk of losing a subpopulation of extraction-sensitive mitochondria. In this study, we probably did not recover all the mitochondria. However, the mitochondria that were isolated gave sufficient information to inform us of the physiological status of the tissue. Additionally, flow cytometry analysis made it possible to pre-select the organelle population of interest (in this case mitochondria) and to dispense with more restrictive purification protocols (Percoll) (Sims & Anderson, 2008). Flow cytometry analysis made it possible to work on small samples (10,000 to 50,000 events) and to focus on mitochondria, eliminating cellular constituents that were not of interest. In the flow cytometric analysis, elements were pre-selected according to their size and structure in order to remove the major contaminants from the mitochondrial homogenate. A second selection was done by specifically labeling the samples with NAO, a reliable marker of mitochondria. The high affinity of NAO for cardiolipins explains its high specificity for mitochondria (J. M. Petit, Maftah, Ratinaud, & Julien, 1992). This verified that 80–85% of the events were selected from the NAO-labelled gate. In the selected gate, the percentage of mitochondria was very high and these samples were therefore a representative image of the mitochondria extracted from the seabass fillets.

4.1. Measurement of mitochondrial potential

Flow cytometry of isolated mitochondria made it possible to measure mitochondrial alterations based on various markers: the measurement of membrane potential loss and the generation of reactive

oxygen species (ROS), for example. Numerous studies have shown that the extraction of mitochondria is weakly denaturing, and that the isolated mitochondrial potential measurement from muscle tissue was very close to mitochondria *in situ* (Hosseini, Shaki, Ghazi-K.M., & Pourahmad, 2013). Flow cytometry of isolated mitochondria constitutes an alternative to flow cytometry techniques using cells isolated from tissues (Juan, Cavazzoni, Saez, & O'connor, 1994; Sung et al., 2010). In toxicology, the effect of drugs on tissue can be measured by analyzing the mitochondrial potential of single mitochondria (Kaufmann et al., 2006). The aging of tissues has also been evaluated through the loss of mitochondrial potential and the increase in ROS on mitochondria isolated from this tissue (Hagen et al., 1997). The loss of mitochondrial potential could come from membrane permeabilization due to permeability transition pores associated with necrotic and apoptotic processes (Lecoeur et al., 2004) or lipid peroxidation by oxygen free radicals (Paradies et al., 1999). In this study, the potential of mitochondria isolated from red muscle of seabass fillets decreased over time. At D0, the proportion of high potential mitochondria was high. The number of high potential mitochondria decreased over time. At D7, the majority of mitochondria isolated from seabass fillets were at low potential. Beyond D7, the mitochondrial potential continued to decrease and tended towards a zero potential at D9 (supplemental data). It was particularly interesting to observe that red muscle mitochondria manage to maintain potential over this period of time. Mitochondrial potential decreased almost linearly over time, and therefore constitutes an essential marker for measuring the freshness of fish fillets.

4.2. Mitochondria repolarization

Isolated mitochondria lost their potential almost linearly with storage time at 4°C without and with substrates. Decreased potential is known to attenuate the generation of ROS (Sack, 2006), which can cause irreversible damage. However, the loss of mitochondrial potential could simply be related to the availability of the substrates for the mitochondria. The addition of succinate, glutamate and malate helped to repolarize the mitochondria. Until D5 with TMRM probe, the addition of substrates made it possible to regain the native potential (D1 without substrates). After this time, part of the mitochondria could no longer be polarized by the substrates, resulting in an irreversible loss of mitochondrial

potential. The availability of substrates in the tissue therefore appeared to be decisive for the maintenance of mitochondrial activities. Our analysis made it possible to distinguish three levels of freshness. The amount of high potential mitochondria corresponded to ultra-fresh tissue status. Subsequently, mitochondria showed decreased potential and could be repolarized. This corresponded to an intermediate status of freshness. Finally, a third status was observed: the mitochondria were depolarized and were difficult to repolarize. Moreover, the alteration of the potential was greater in white tissue (result not shown) than in red tissue. Therefore, the maintenance of mitochondrial potential could result from higher maintenance of substrates in red tissue than in white tissue. Glycogen reserve and *post-mortem* lactate production is higher in red muscle (Choe et al., 2008). The LDH level is 200 to 240 times higher in red tissue than in white tissue (Yoshida et al., 2007). Therefore, the production of substrates such as pyruvate, able to maintain the mitochondrial potential in *post mortem* conditions, would be greater in red muscle (Yu, Tian, Shao, Li, & Dai, 2019). The maintenance of mitochondrial potential could also be linked to the substrates available in the seabass tissue.

5. Conclusion

Flow cytometric analysis of mitochondria isolated from red muscle of seabass fillets and stored at 4°C showed mitochondrial potential loss over time. This analysis made it possible to distinguish three levels of freshness: the ultra-fresh level corresponding to fillets where the mitochondria retain high membrane potential; the intermediate freshness level where mitochondria have lost some of their potential but remain repolarizable after the addition of substrates; and lastly, the lower freshness level where mitochondria have lost their potential and are no longer repolarizable by substrates. Flow cytometric analysis of the potential of mitochondria isolated from seabass fillets is a highly reliable method that should be developed to confirm the freshness of fish.

Declaration of interest

None.

Acknowledgements and funding

Tiffanie Bouchendhomme would like to thank the Hauts-de-France regional council and ULCO for their financial support of her PhD studies. This work was funded by the French government, Ifremer and the Hauts-de-France region in the framework of the CPER 2014-2020 MARCO project.

References

Chang, W. C. W., Wu, H. Y., Yeh, Y., & Liao, P. C. (2020). Untargeted foodomics strategy using high-resolution mass spectrometry reveals potential indicators for fish freshness. *Analytica Chimica Acta, 1127*, 98-105.

Chauhan, S. S., & England, E. M. (2018). Postmortem glycolysis and glycogenolysis: insights from species comparisons. *Meat Science, 144*, 118-126.

Choe, J. H., Choi, Y. M., Lee, S. H., Shin, H. G., Ryu, Y. C., Hong, K. C., & Kim, B. C. (2008). The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition, and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality. *Meat Science, 80*(2), 355-362.

Cléach, J., Pasdois, P., Marchetti, P., Watier, D., Duflos, G., Goffier, E.,... Lencel, P. (2019). Mitochondrial activity as an indicator of fish freshness. *Food Chemistry, 287*, 38-45.

Cléach, J., Soret, M., Grard, T., & Lencel, P. (2020). Assessment of fish freshness based on fluorescence measurement of mitochondrial membrane potential. *Food Control, 115*, 107301.

Cléach, J., Watier, D., Le Fur, B., Brauge, T., Duflos, G., Grard, T., & Lencel, P. (2018). Use of ratiometric probes with a spectrofluorometer for bacterial viability measurement. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 28*(11), 1782-1790.

Cottet-Rousselle, C., Ronot, X., Leverve, X., & Mayol, J. F. (2011). Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry, Part A, 79A*(6), 405-425.

England, E. M., Matarneh, S. K., Mitacek, R. M., Abraham, A., Ramanathan, R., Wicks, J. C.,... Gerrard, D. E. (2018). Presence of oxygen and mitochondria in skeletal muscle early postmortem. *Meat Science, 139*, 97-106.

Fuller, K. M., & Arriaga, E. A. (2003). Advances in the analysis of single mitochondria. *Current opinion in biotechnology, 14*(1), 35-41.

Grunert, K. G., Bredahl, L., & Brunsø, K. (2004). Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector—a review. *Meat Science, 66*(2), 259-272.

Hagen, T. M., Yowe, D. L., Bartholomew, J. C., Wehr, C. M., Do, K. L., Park, J. Y., & Ames, B. N. (1997). Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential

declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94*(7), 3064-3069.

Hassoun, A., & Karoui, R. (2017). Quality evaluation of fish and other seafood by traditional and nondestructive instrumental methods: advantages and limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57*(9), 1976-1998.

Hosseini, M. J., Shaki, F., Ghazi-K.M., & Pourahmad, J. (2013). Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics, 5*(2), 152-166.

Huang, X., & Ahn, D. U. (2019). Lipid oxidation and its implications to meat quality and human health. *Food science and biotechnology, 28*(5), 1275-1285.

Jayaraman, S. (2005). Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: comparison of tetramethylrhodamineethylester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H_2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580). *Journal of Immunological Methods, 306*(1-2), 68-79.

Juan, G., Cavazzoni, M., Saez, G. T., & O'Connor, J. E. (1994). A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with Rhodamine 123 and flow cytometry. *Cytometry, 15*(4), 335-342.

Kamihiro, S., Stergiadis, S., Leifert, C., Eyre, M. D., & Butler, G. (2015). Meat quality and health implications of organic and conventional beef production. *Meat Science, 100*, 306-318.

Kaufmann, P., Török, M., Zahno, A., Waldhauser, K. M., Brecht, K., & Krähenbühl, S. (2006). Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences, 63*(19), 2415-2425.

Kher, S. V., De Jonge, J., Wentholt, M. T., Deliza, R., de Andrade, J. C., Cnossen, H. J.,... Frewer, L. J. (2013). Consumer perceptions of risks of chemical and microbiological contaminants associated with food chains: a cross-national study. *International Journal of Consumer Studies, 37*(1), 73-83.

Lampl, T., Crum, J. A., Davis, T. A., Milligan, C., & Del Gaizo Moore, V. (2015). Isolation and functional analysis of mitochondria from cultured cells and mouse tissue. *Journal of visualized experiments : JoVE*(97), 52076.

Lecoeur, H., Langonné, A., Baux, L., Rebouillat, D., Rustin, P., Prévost, M. C.,... Jacotot, E. (2004). Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. *Experimental cell research, 294*(1), 106-117.

Lee, H. C., & Wei, Y. H. (2012). Mitochondria and aging. In R. Scatena, P. Bottoni & B. Giardina (Eds.), *Advances in Mitochondrial Medicine*, (pp. 311-327). Dordrecht: Springer Netherlands.

Malacrinò, P., Zapparoli, G., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods, 45*(2), 127-134.

Mattiasson, G. (2004). Flow cytometric analysis of isolated liver mitochondria to detect changes relevant to cell death. *Cytometry, Part A, 60*(2), 145-154.

Mattiasson, G., Friberg, H., Hansson, M., Elmér, E., & Wieloch, T. (2003). Flow cytometric analysis of mitochondria from CA1 and CA3 regions of rat hippocampus reveals differences in permeability transition pore activation. *Journal of neurochemistry, 87*(2), 532-544.

Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Serena, D., & Ruggiero, F. M. (1999). Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine, 27*(1-2), 42-50.

Parlapani, F. F., Mallouchos, A., Haroutounian, S. A., & Boziaris, I. S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology, 189*, 153-163.

Petit, J. M., Maftah, A., Ratinaud, M. H., & Julien, R. (1992). 10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *European Journal of Biochemistry, 209*(1), 267-273.

Petit, P. X., O'Connor, J. E., Grunwald, D., & Brown, S. C. (1990). Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *European Journal of Biochemistry, 194*(2), 389-397.

Pinto, L., Nieto, C. H. D., Zón, A., Fernández, H., & de Araujo, M. C. U. (2016). Handling time misalignment and rank deficiency in liquid chromatography by multivariate curve resolution: quantitation of five biogenic amines in fish. *Analytica Chimica Acta, 902*, 59-69.

Sack, M. N. (2006). Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovascular Research, 72*(2), 210-219.

Shapiro, H. M. (2000). Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods, 21*(3), 271-279.

Sierra, V., & Oliván, M. (2013). Role of mitochondria on muscle cell death and meat tenderization. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery, 7*(2), 120-129.

Sims, N. R., & Anderson, M. F. (2008). Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nature protocols*, *3*(7), 1228.

Sträuber, H., & Müller, S. (2010). Viability states of bacteria—Specific mechanisms of selected probes. *Cytometry Part A*, *77A*(7), 623-634.

Sung, D. K., Chang, Y. S., Kang, S., Song, H. Y., Park, W. S., & Lee, B. H. (2010). Comparative evaluation of hypoxic–ischemic brain injury by flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential with JC-1 in neonatal rats. *Journal of Neuroscience Methods*, *193*(2), 232-238.

Tang, J., Faustman, C., Hoagland, T. A., Mancini, R. A., Seyfert, M., & Hunt, M. C. (2005). Postmortem oxygen consumption by mitochondria and its effects on myoglobin form and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(4), 1223-1230.

Wu, L., Pu, H., & Sun, D. W. (2019). Novel techniques for evaluating freshness quality attributes of fish: A review of recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, *83*, 259-273.

Yoshida, Y., Holloway, G. P., Ljubicic, V., Hatta, H., Spriet, L. L., Hood, D. A., & Bonen, A. (2007). Negligible direct lactate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria obtained from red and white rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, *582*(3), 1317-1335.

Yu, Q., Tian, X., Shao, L., Li, X., & Dai, R. (2019). Targeted metabolomics to reveal muscle-specific energy metabolism between bovine *longissimus lumborum* and *psoas major* during early postmortem periods. *Meat Science*, *156*, 166-173.

Figure

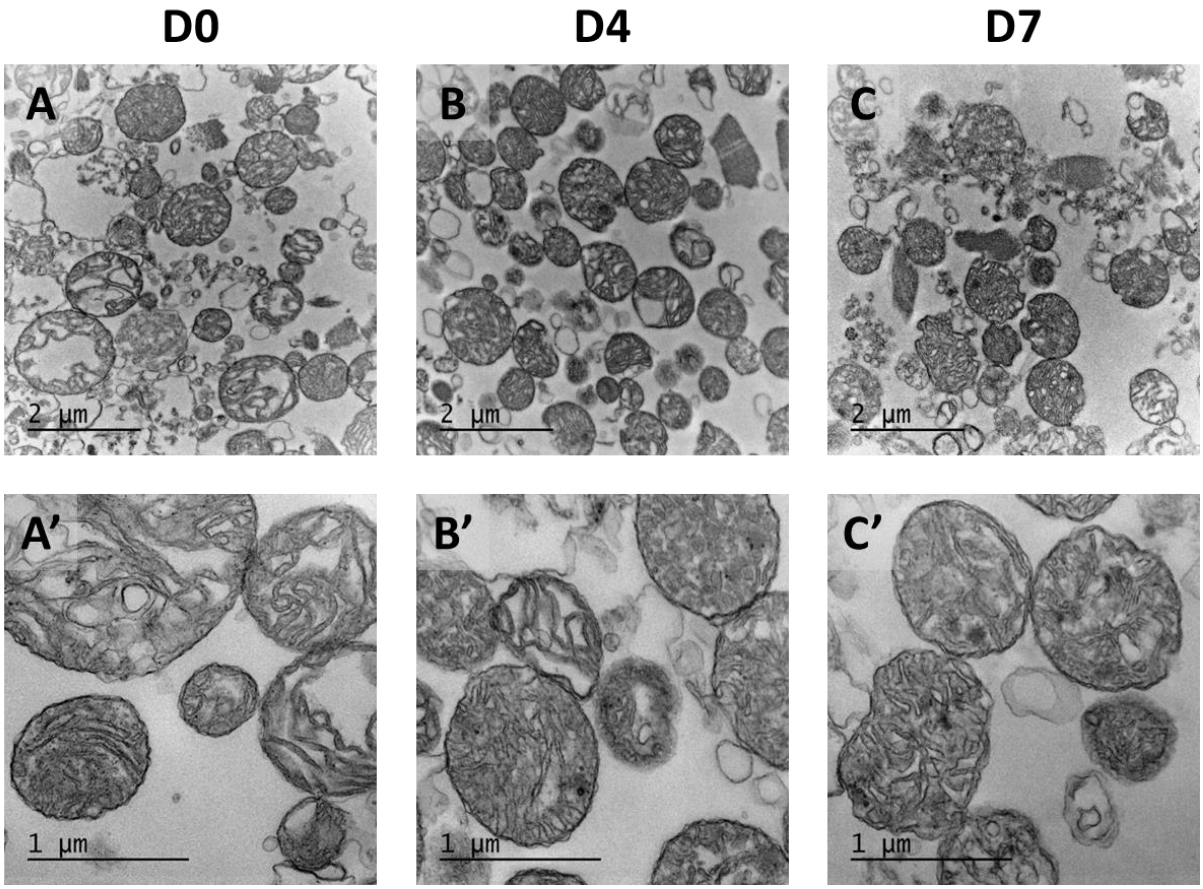
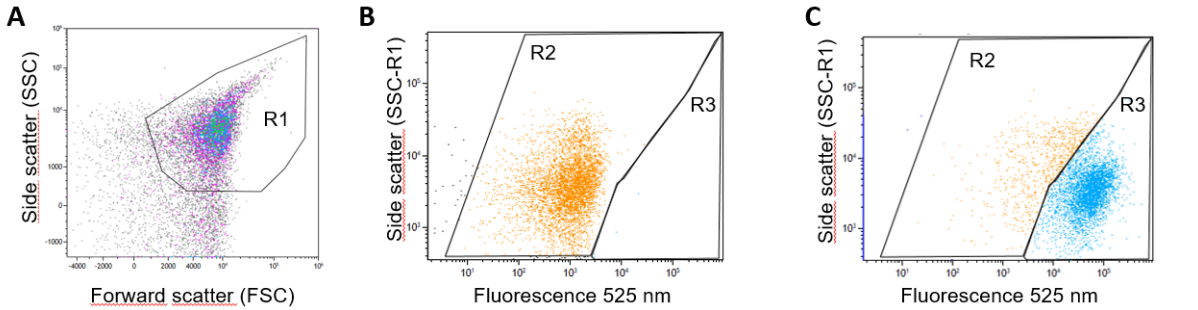


Figure 1: Electron microscopy of mitochondria isolated from seabass fillets stored at 4°C

A. Day 0; B. Day 4; C. Day 7 (Magnification X15000)

A'. Day 0; B'. Day 4; C'. Day 7 (Magnification X30000)



Gate	Events	%Total
All	10000	100.00%
R1	7538	75.38%

Gate	Events	%Gated	%(R2+R3)
R1	7563	100.00%	-
R2	4907	64.88%	99.90%
R3	5	0.07%	0.10%

Gate	Events	%Gated	%(R2+R3)
R1	7692	100.00%	-
R2	749	9.74%	15.43%
R3	4105	53.37%	84.57%

Figure 2: Isolated mitochondria selection based on size (Forward Scatter: FSC), structure (Side Scatter: SSC) and on selective labeling of mitochondria cardiolipin with 100 nM NAO (Nonyl Acridine Orange)

A. Choice of the gate among 10,000 events. Definition of the R1 region and its proportion (%) of the total

B. Fluorescence at 525 nm of the events within R1 for an unstained control sample. Definition of the R2 and R3 regions and their proportion of the R1 region

C. Fluorescence at 525 nm of the events within R1 for a NAO stained sample. Proportion of regions R2 and R3 of the R1 region

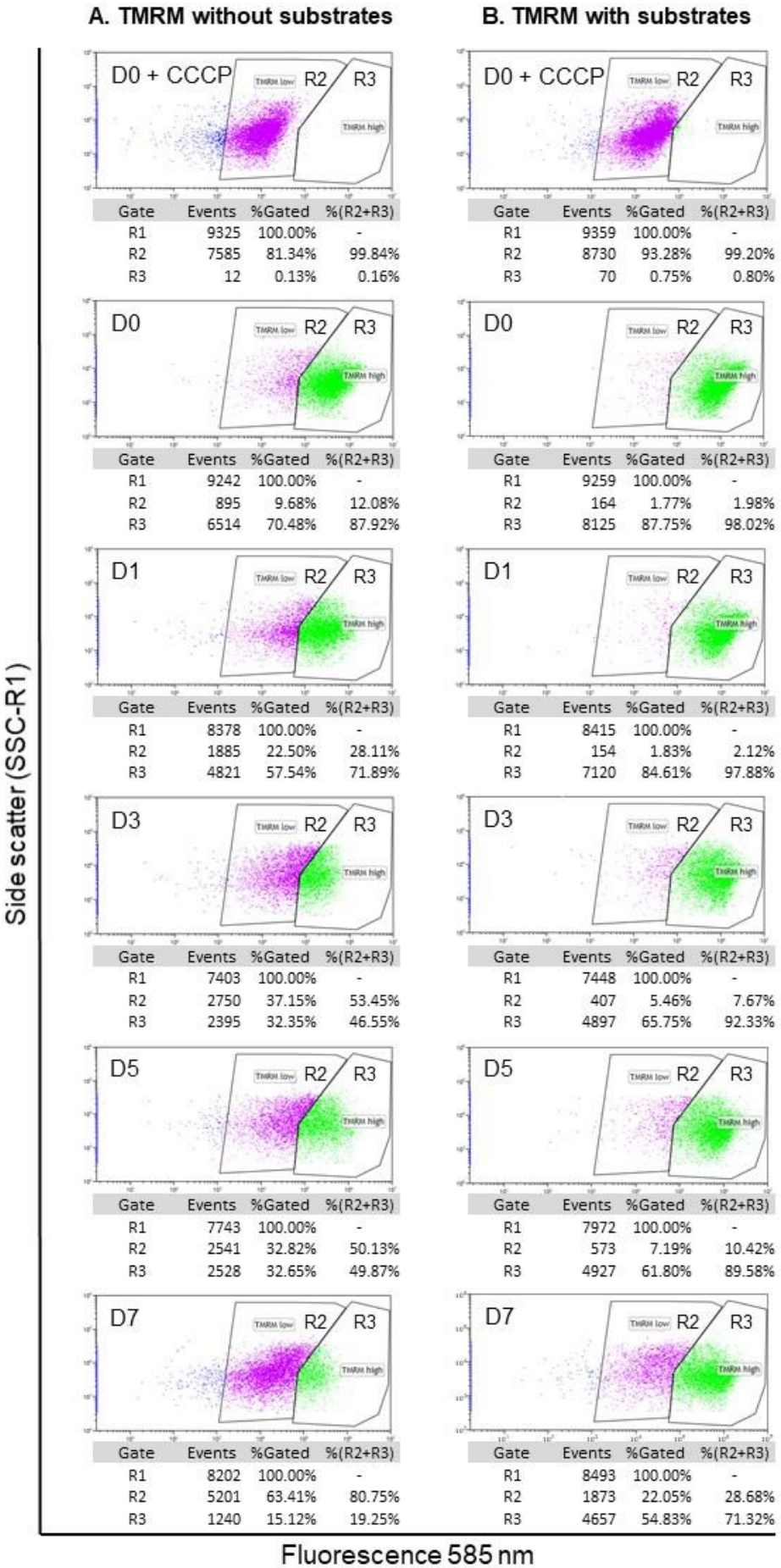

A. TMRM without substrates
B. TMRM with substrates
D0 + CCCP
R2
R3
TMRM low
TMRM high
Gate Events %Gated %(R2+R3)
R1 9325 100.00% -
R2 7585 81.34% 99.84%
R3 12 0.13% 0.16%
R1 9359 100.00% -
R2 8730 93.28% 99.20%
R3 70 0.75% 0.80%
D0
R1 9242 100.00% -
R2 895 9.68% 12.08%
R3 6514 70.48% 87.92%
R1 9259 100.00% -
R2 164 1.77% 1.98%
R3 8125 87.75% 98.02%
D1
R1 8378 100.00% -
R2 1885 22.50% 28.11%
R3 4821 57.54% 71.89%
R1 8415 100.00% -
R2 154 1.83% 2.12%
R3 7120 84.61% 97.88%
D3
R1 7403 100.00% -
R2 2750 37.15% 53.45%
R3 2395 32.35% 46.55%
R1 7448 100.00% -
R2 407 5.46% 7.67%
R3 4897 65.75% 92.33%
D5
R1 7743 100.00% -
R2 2541 32.82% 50.13%
R3 2528 32.65% 49.87%
R1 7972 100.00% -
R2 573 7.19% 10.42%
R3 4927 61.80% 89.58%
D7
R1 8202 100.00% -
R2 5201 63.41% 80.75%
R3 1240 15.12% 19.25%
R1 8493 100.00% -
R2 1873 22.05% 28.68%
R3 4657 54.83% 71.32%
Side scatter (SSC-R1)
Fluorescence 585 nm

Figure 3: Measurements of the membrane potential with TMRM in mitochondria isolated from seabass fillets for different storage times (Day 0 to Day 7)

A. The TMRM probe was used at a concentration of 10 nM and fluorescence emission was measured at 585 nm in the absence of substrates (glutamate, malate and succinate)

B. The TMRM probe was used at a concentration of 10 nM and fluorescence emission was measured at 585 nm in the presence of substrates (glutamate, malate and succinate)

The negative control was obtained by dissipation of the mitochondrial potential with CCCP (2 µM) at D0

Events were followed between the R1, R2 and R3 regions. The percentages were expressed on the total events of the R1 gate (% Gated). The distribution of events between the R2 and R3 regions was expressed as a percentage of all events related to these two regions: % (R2+R3)

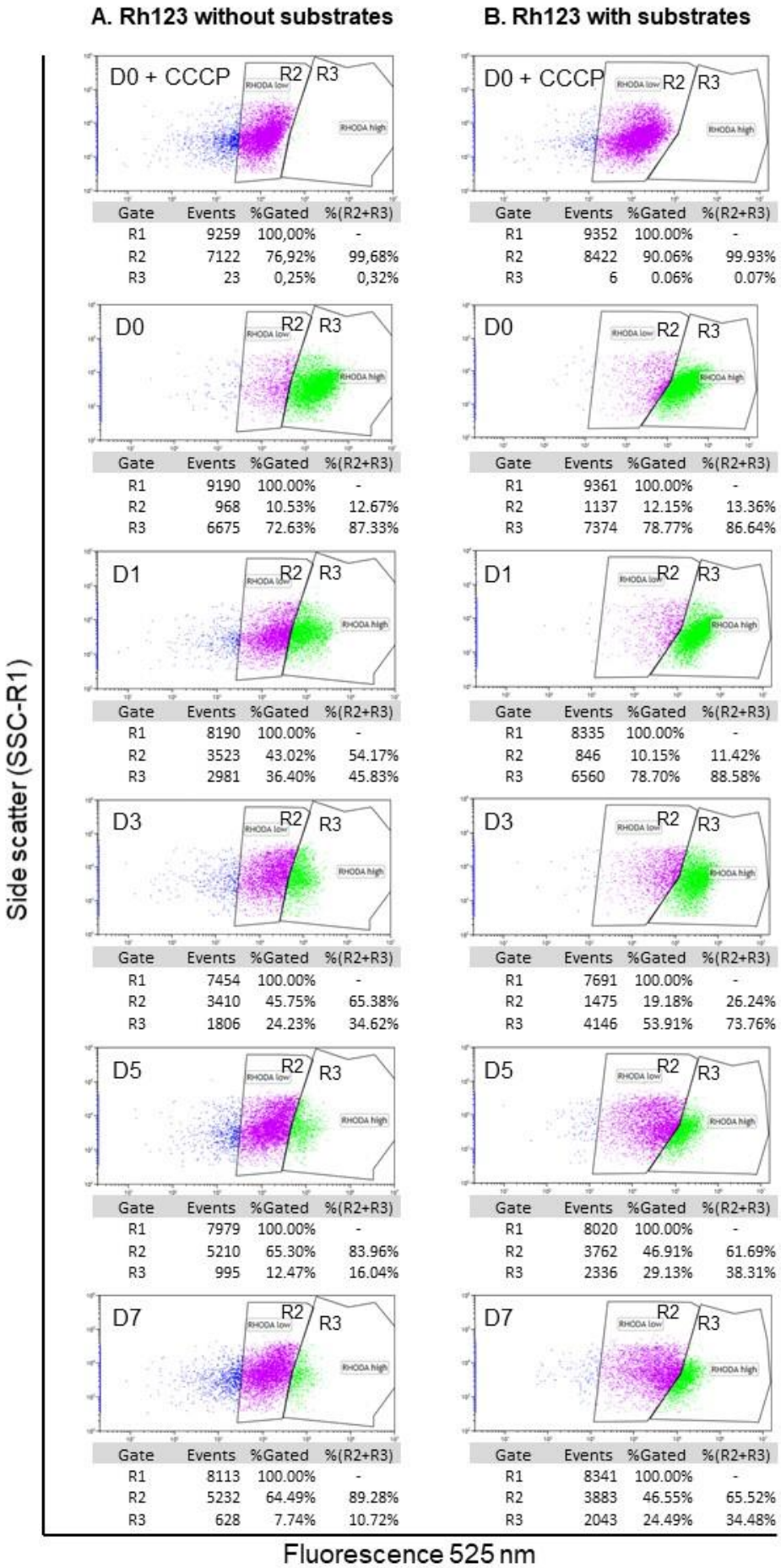

A. Rh123 without substrates
B. Rh123 with substrates
D0 + CCCP
D0
D1
D3
D5
D7
R2
R3
RHODA low
RHODA high
Gate Events %Gated %(R2+R3)
R1 9259 100,00% -
R2 7122 76,92% 99,68%
R3 23 0,25% 0,32%
R1 9352 100.00% -
R2 8422 90.06% 99.93%
R3 6 0.06% 0.07%
R1 9190 100.00% -
R2 968 10.53% 12.67%
R3 6675 72.63% 87.33%
R1 9361 100.00% -
R2 1137 12.15% 13.36%
R3 7374 78.77% 86.64%
R1 8190 100.00% -
R2 3523 43.02% 54.17%
R3 2981 36.40% 45.83%
R1 8335 100.00% -
R2 846 10.15% 11.42%
R3 6560 78.70% 88.58%
R1 7454 100.00% -
R2 3410 45.75% 65.38%
R3 1806 24.23% 34.62%
R1 7691 100.00% -
R2 1475 19.18% 26.24%
R3 4146 53.91% 73.76%
R1 7979 100.00% -
R2 5210 65.30% 83.96%
R3 995 12.47% 16.04%
R1 8020 100.00% -
R2 3762 46.91% 61.69%
R3 2336 29.13% 38.31%
R1 8113 100.00% -
R2 5232 64.49% 89.28%
R3 628 7.74% 10.72%
R1 8341 100.00% -
R2 3883 46.55% 65.52%
R3 2043 24.49% 34.48%
Side scatter (SSC-R1)
Fluorescence 525 nm

Figure 4: Measurements of membrane potential with Rhodamine 123 in mitochondria isolated from seabass fillets for different storage times (Day 0 at Day 7)

A. The Rh123 probe was used at a concentration of 10 nM and fluorescence emission was measured at 525 nm in the absence of substrates (glutamate, malate and succinate)

B. The Rh123 probe was used at a concentration of 10 nM and fluorescence emission was measured at 525 nm in the presence of substrates (glutamate, malate and succinate)

The negative control was obtained by dissipation of the mitochondrial potential with CCCP (2 µM) at D0

Events were followed between the R1, R2 and R3 regions. The percentages were expressed on the total events of the R1 gate (%Gated). The distribution of events between the R2 and R3 regions was expressed as a percentage of all events related to these two regions: % (R2+R3)

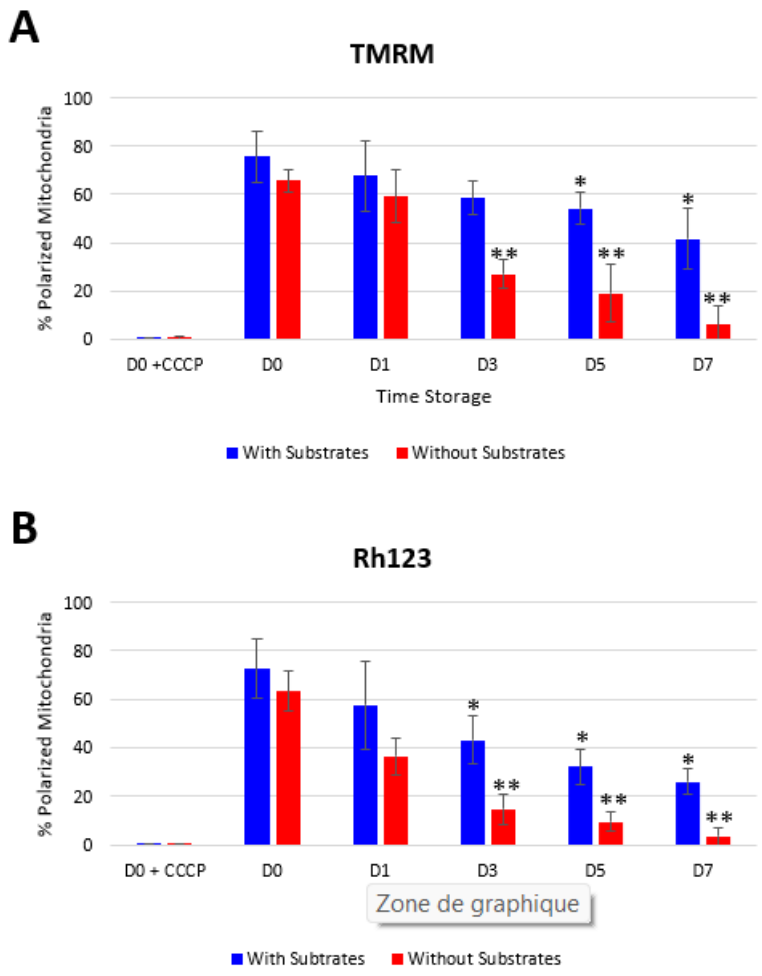


Figure 5: Percentage of polarized mitochondria evolution in seabass fillets stored at 4 ° C for different storage times (Day 0 at Day 7)

A. The polarization of the mitochondria was carried out with the TMRM probe used at the concentration of 10 nM and fluorescence emission was measured at 525 nm in the presence and in the absence of substrates (glutamate, malate and succinate)

B. The polarization of the mitochondria was carried out with the Rh123 probe used at the concentration of 10 nM and fluorescence emission was measured at 525 nm in the presence and in the absence of substrates (glutamate, malate and succinate)

The negative control was obtained by dissipation of the mitochondrial potential with CCCP (2 µM) at D0

Asterisks denote values that are significantly different at different storage times. The *t-test* and Levene's test were carried out on three different storage time measurements in triplicate~~s~~ for each timepoint using the SPSS Statistics 17 program.

* $p < 0.05$ versus D0

** $p < 0.05$ versus "with substrates"

Figure for supplemental data: Measurements of the membrane potential with TMRM in mitochondria isolated from seabass fillets for different storage times (Day 0, Day 7, Day 9)

A. The TMRM probe was used at a concentration of 10 nM and fluorescence emission was measured at 585 nm in the absence of substrates (glutamate, malate and succinate)

B. The TMRM probe was used at a concentration of 10 nM and fluorescence emission was measured at 585 nm in the presence of substrates (glutamate, malate and succinate)

The negative control was obtained by dissipation of the mitochondrial potential with CCCP (2 µM) at D0

Informations complémentaires sur l'article 1

La congélation/décongélation dans des conditions industrielles entraîne une profonde perméabilisation des mitochondries. L'un des objectifs de ma thèse était d'utiliser cette caractéristique pour pouvoir discriminer les mitochondries isolées de filets frais et les mitochondries isolées de filets congelés/décongelés en cytométrie de flux (Figure 50 ci-dessous). L'analyse de la taille et de la structure a été réalisée sur les mitochondries isolées de filets frais ou congelés/décongelés. Les mitochondries ont été analysées selon leur taille et leur structure. Le FSC (Forward Scatter) correspond à la lumière diffractée et est associée à la taille et à la surface cellulaire. Le SSC (Side Scatter) correspond à la lumière réfléchie et réfractée. Elle dépend de la granularité et de la complexité de l'élément à analyser. Nous avons remarqué que les mitochondries « sortent » exactement au même endroit de la « gate définie ». Par conséquent, les mitochondries ne semblent pas avoir été gonflées ou vacuolisées suite au choc congélation/décongélation.

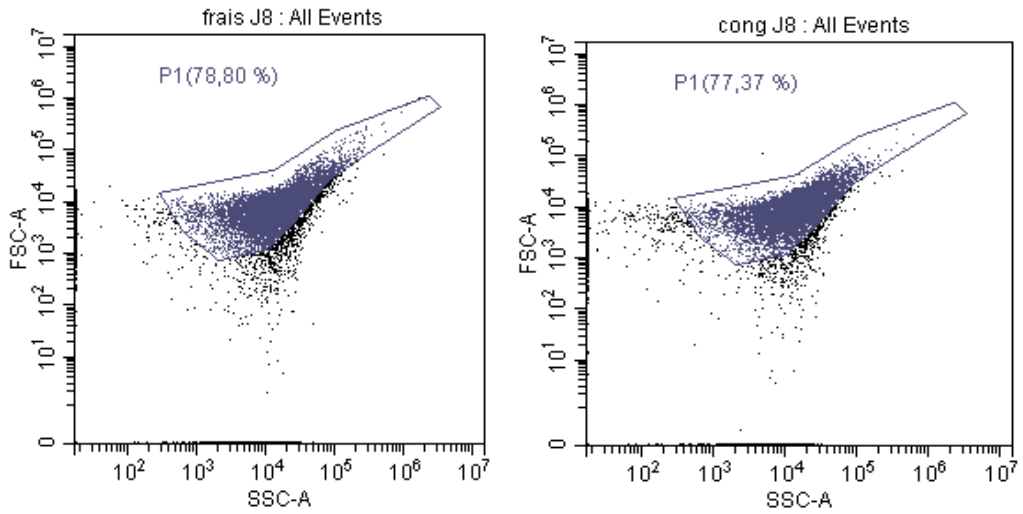


Figure 50 : comparaison de la taille structure de mitochondries isolées d'un filet frais et de mitochondries isolées d'un filet décongelé

L'extraction des mitochondries est un procédé qui sélectionne les mitochondries les moins altérées, ce qui peut apporter un biais dans l'analyse. L'analyse est un peu plus restreinte car elle se fait sur une population qui a subi le moins de dommages. Il pouvait cependant être intéressant de regarder si les mitochondries isolées présentaient des différences de perméabilité.

L'approche a donc consisté à utiliser le calcium intramitochondrial comme marqueur de perméabilisation. Les mitochondries accumulent le calcium dans la matrice mitochondriale et le flux de calcium sera lié à la perméabilisation des mitochondries. La congélation entraîne une rupture des membranes et donc une fuite de calcium qui devait être détectable en utilisant une sonde calcique (Calcéine AM). L'hypothèse était la suivante : à l'état frais les mitochondries maintiennent une concentration élevée en calcium. Cette concentration va être dépendante de l'ouverture des mPTP et de l'intégrité des membranes mitochondriales. L'analyse a porté sur la comparaison des niveaux de fluorescence des mitochondries isolées de filets frais conservés à 4°C avec les mitochondries isolées de filets congelés/décongelés (Figure 51 ci-dessous).

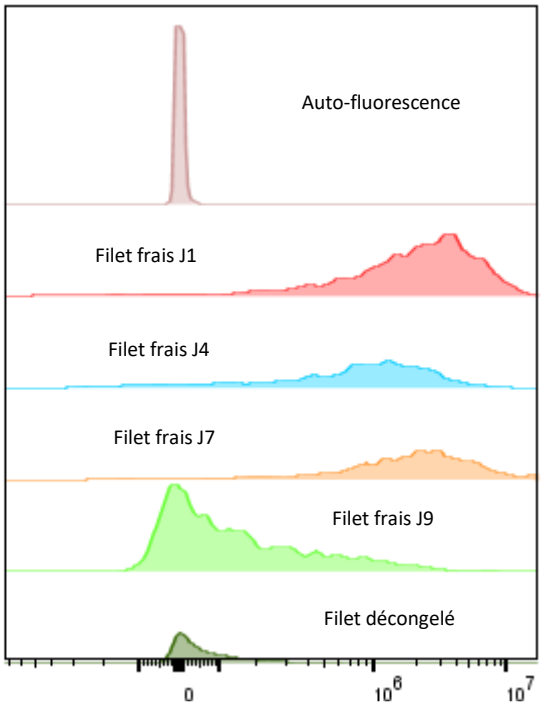


Figure 51 : Intégration de la calcéine par les mitochondries isolées de daurade royale (Sparus aurata) à différents temps de conservation

L'autofluorescence correspond à la fluorescence des mitochondries non marquées (témoin négatif). Pour les mitochondries isolées de filets frais et conservés une journée à 4°C, le niveau de fluorescence des mitochondries est élevé. La Calcéine AM marque les mitochondries, ce qui correspond à un niveau de calcium intra-mitochondrial élevé. De J4 à J7, la fluorescence des mitochondries reste élevée, ce qui correspond à une intégration importante de la calcéine AM et donc à une concentration intra-mitochondriale en calcium élevée.

A J9, la fluorescence des mitochondries est beaucoup plus faible, ce qui correspond à une intégration moins importante de la sonde. La concentration intra-mitochondriale en calcium est beaucoup moins importante. Certaines mitochondries restent cependant marquées, ce qui montre une hétérogénéité au niveau de la concentration en calcium sur les mitochondries isolées de filets conservés 9 jours à 4°C. Cette hétérogénéité pourrait être exploitée pour discriminer les filets frais des filets décongelés. En effet, les mitochondries isolées de filets congelés/décongelés présentent un niveau de fluorescence très faible (proche de l'autofluorescence) ce qui signifie une faible incorporation de calcéine AM et donc une faible concentration intracellulaire en calcium. D'autre part, ce travail a également permis de constater que les mitochondries isolées de filets frais étaient sensibles à l'ionomycine. Le reliquat de gradient de calcium pouvait être dissipé par l'utilisation d'ionomycine alors que les mitochondries isolées de filets congelés/décongelés étaient insensibles à l'ionomycine (le gradient de calcium étant déjà dissipé).

La concentration en calcium des mitochondries est très dépendante du niveau de perméabilisation des mitochondries. Comme nous avions pu le constater pour le potentiel mitochondrial, l'altération de la perméabilité des membranes mitochondriales est plus importante sur le muscle blanc que sur le muscle rouge. Par conséquent, la fuite de calcium semble très liée au potentiel mitochondrial, ce qui signifie que si cette approche semble pertinente et discriminante pour le muscle rouge, elle le sera beaucoup plus pour le muscle blanc.

La difficulté à pouvoir exploiter la différence de perméabilité des mitochondries isolées de filets frais et de filets congelés/décongelés en cytométrie de flux nous a incité à envisager d'autres méthodes de mesure. La mesure de la perméabilité des membranes mitochondriales au NADH reste au centre de nos approches. La sensibilité aux agents perméabilisant des mitochondries isolées de filets frais nous a conduit à envisager la mesure d'une perméabilité relative pour la suite de nos études.

II. Discrimination frais/décongelé à l'aide de mitochondries isolées de tissu rouge

Les procédés industriels de congélation et de décongélation sont variés. Il est important pour la filière aquatique de développer une méthode transversale et sensible qui puisse permettre de discriminer l'ensemble des produits aquatiques ayant subi un stade de congélation/décongélation. En pratique, les procédés industriels de congélation peuvent descendre jusqu'à -80°C. Nous avons donc retenu cette température pour l'appliquer au modèle étudié (filets de Daurade) et nous placer dans les meilleures conditions de congélation. La décongélation appliquée aux filets est plus lente puisqu'elle a été réalisée à 4°C. L'étude des conditions de congélation et de décongélation sur la qualité du produit n'a pas été envisagée ici. Cependant, il nous apparaissait important de pouvoir tester la méthode dans les conditions industrielles de congélation et de décongélation les moins dénaturantes possibles.

Dans de précédents travaux, l'impact de la congélation sur les membranes plasmiques avait été approché par l'étude de la libération d'une enzyme cytoplasmique : la lactate déshydrogénase (DIOP *et al.*, 2016). La libération de la LDH par autolyse sur des filets de daurade royale frais avait été comparée à la libération de l'enzyme sur des filets congelés/décongelés. Pour pallier l'hétérogénéité de composition en LDH du tissu, un ratio entre la LDH libérée et LDH totale avait été calculé. Ce travail avait permis de mettre en relation le temps de conservation, l'autolyse et la libération de LDH. La sensibilité de la LDH à la congélation, avait rendu difficile l'exploitation de l'enzyme comme marqueur de congélation.

La recherche d'une enzyme dans les exsudats de produits aquatiques reflétant le niveau d'altération des membranes plasmiques et des membranes intracytoplasmiques n'a pas été abandonnée pour autant. Les enzymes présentes dans de nombreux organites restent de bonnes candidates pour devenir des marqueurs de congélation/décongélation. Les enzymes mitochondriales le sont plus particulièrement en raison de l'important réseau membranaire qui les constitue.

La stratégie qui a été choisie dans le travail qui suit a été de mesurer l'accessibilité d'un substrat aux enzymes mitochondriales. Nous avons dans un premier temps travaillé sur des mitochondries isolées. Ce modèle permet de nous affranchir de toutes les réactions parasites que nous pourrions rencontrer avec un homogénat tissulaire. Il nous a permis de mieux comprendre les interactions dans un système isolé et donc plus simple à appréhender.

Notre premier choix de substrat s'était porté sur le cytochrome c. La sensibilité des mitochondries au cytochrome c pouvait constituer un marqueur d'altération des membranes externes des mitochondries et donc un marqueur de congélation. Nous ne présenterons pas les nombreux travaux associés au cytochrome c dans ce travail de thèse. Cependant, les résultats sur les mitochondries isolées de filets frais ont rapidement montré que les mitochondries étaient sensibles au cytochrome c pour des temps de conservation supérieurs à 4 jours. Le cytochrome c ne pouvait alors pas être un substrat de choix pour discriminer le frais du congelé/décongelé. En effet, la conservation des filets à 4°C, renforcée par les étapes d'extraction, contribuait à fragiliser la membrane externe des mitochondries.

Notre choix s'est donc porté sur le NADH en raison de ses caractéristiques. Le premier argument de choix est que le NADH ne peut pas passer au travers de la membrane interne des mitochondries. Par conséquent, la consommation du NADH par le complexe I pourrait signifier une perméabilisation de la membrane interne des mitochondries. Cette perméabilisation peut ainsi constituer une approche intéressante pour discriminer les mitochondries isolées de filets frais et de filets congelés/décongelés.

Le second argument repose sur le fait que le NADH est un substrat de nombreuses réactions enzymatiques. L'isolement des mitochondries permet d'optimiser le suivi de la consommation du NADH par le complexe I. Le suivi a ainsi été réalisé par spectrophotométrie (λ = 340nm). Il pourrait également se faire en fluorimétrie et présenterait le gros avantage de travailler sur un milieu plus hétérogène comme un homogénat tissulaire.

La perméabilisation de la membrane interne induit l'activation des enzymes de la chaîne respiratoire par le NADH. Le suivi de la perméabilisation des membranes des mitochondries isolées peut ainsi être mesuré par la consommation d'oxygène.

La congélation induit de profondes altérations membranaires. Les étapes d'extraction des mitochondries peuvent fragiliser les mitochondries déjà exposées. L'extraction pourrait

sélectionner les populations de mitochondries les moins fragiles. Dans ce contexte, il était important de vérifier si l'analyse des mitochondries isolées pouvait être représentative de l'échantillon et permettre de discriminer les produits auqatiques frais des produits congelés/décongelés.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans la revue Food Control en 2022 : (BOUCHENDHOMME *et al.*, 2022).

Article 2

Differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets by mitochondrial permeability measurement

Differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets by mitochondrial permeability measurement

Tiffanie Bouchendhomme[a], Méline Soret[a], Anne Devin[b], Philippe Pasdois[c], Thierry Grard[a]* and Philippe Lencel[a]

[a]*Univ. Littoral Côte d'Opale, UMRt 1158 BioEcoAgro, USC ANSES, INRAe, Univ. Artois, Univ. Lille, Univ. Picardie Jules Verne, Univ. Liège, Junia, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France*

[b]*UMR CNRS 5095 Institut de biochimie et génétique cellulaires (IBGC), F-33077 Bordeaux, France*

[c]*Univ. Bordeaux, INSERM U1045, IHU-LIRYC, F-33600 Pessac, France*

* corresponding author: Tel: +33 3 21 99 25 08

E-mail address: thierry.grard@univ-littoral.fr (T. Grard)

Email addresses:

Tiffanie Bouchendhomme: tiffanie.bouchendhomme@univ-littoral.fr

Méline Soret: meline.soret@univ-littoral.fr

Anne Devin: anne.devin@ibgc.cnrs.fr

Philippe Pasdois: philippe.pasdois@ihu-liryc.fr

Philippe Lencel: philippe.lencel@univ-littoral.fr

Abstract

In this study, we investigated the properties of mitochondria to discriminate fresh from frozen-thawed fish fillets. Mitochondria were isolated from gilthead seabream fillets and the impact of freezing was evaluated by measuring the permeability of mitochondrial membranes. Freezing led to permeabilization of mitochondrial inner membranes to reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). The increase in permeability related to freezing shock was compared to the physiological permeabilization of mitochondria isolated from gilthead seabream fillets stored at 4°C. Two approaches were chosen to measure the increase in permeability: a spectrophotometric method to measure the consumption of NADH by complex I, and an oxygraphic method to measure O_2 consumption by respiratory chains after exposure of mitochondria to NADH. Mitochondria isolated from frozen-thawed fillets were highly permeable to NADH and were no longer sensitive to a membrane permeabilizing agent: alamethicin. Altogether, our scientific approach allowed us to discriminate mitochondria isolated from fillets that have been exposed or not to a freezing shock (-80°C) and thus to discriminate between fresh and frozen-thawed fish fillets.

Key words: oxygraphy, spectrophotometry, mitochondria, NADH, permeabilization

1. Introduction

Fish are increasingly being caught far from the place of distribution and consumption. New chilling and freezing processes are also making it possible to better preserve fish products during transport (Erikson, Misimi, & Gallart-Jornet, 2011; Tolstorebrov, Eikevik, & Bantle, 2016). New chilling processes called "super chilling" that allow low core temperatures and that help to preserve products for longer are now being used. Freezing processes have also evolved considerably. Products can now be frozen at ultra-low temperatures (ULT -50°C), which helps to preserve their quality (Nakazawa, *et al.*, 2020).

At sale, different types of fraud may be observed, including substitution of species or sale of frozen-thawed fish as fresh fish (Chiesa, *et al.*, 2020). In these conditions, there is a need to develop techniques that allow fresh fish to be differentiated from frozen-thawed products.

The freezing process induces certain disruptions in fish, with changes in muscle structure and biochemical parameters. Freezing of seafood products is associated with rupture of the plasma and intracytoplasmic membranes (Uemura, *et al.*, 2006), which leads to enrichment of exudates in proteins and intracytoplasmic enzymes (Diop, *et al.*, 2016; Ethuin, *et al.*, 2015).

The rupture of intracellular compartments has been studied through numerous biochemical and enzymatic approaches. The nuclear magnetic resonance (NMR) technique makes it possible to distinguish fresh fish from frozen-thawed fish by measuring differences in concentrations of certain metabolites in tissues (Shumilina, Møller, & Dikiy, 2020).

Physical and spectral approaches have also been developed. They have the advantage of being fast and non-intrusive. They detect the physio-chemical changes that occur in frozen products (Velioğlu, Temiz, & Boyaci, 2015) (Fernández-S., *et al.*, 2012). Certain spectroscopic methods measure changes in compounds like NADH and are able to discriminate between fresh and frozen fish (Hassoun, 2021) (Ottavian, Fasolato, Facco, & Barolo, 2013).Membrane alteration is highly dependent on the nucleation of ice crystals and therefore on the rate of freezing. Freezing leads to localized increases in solutes, with variations in denaturing osmotic pressure (Dalvi-Isfahan, *et al.*, 2019). On the other hand, the freezing temperature affects the proportion of free water and the size of the crystals within the tissue. The size of crystals is largely responsible for the alteration of cells within the tissue. Ice crystals are formed and an alteration of osmotic pressure is also observed, inducing denaturation of proteins (Li, Zhu, & Sun, 2018; Strateva & Penchev, 2020). A faster speed of freezing reduces the formation of ice crystals and indirectly significantly increases the quality of the fish (Sone, Skåra, & Olsen, 2019).

It appears that intracellular ice formation is more deleterious to tissues. Intracellular crystals seem to form at relatively fast freezing rates (2°C/min) versus 0.3°C/min for slow freezing (Pegg, 2010). In optimized cryopreservation processes, the quality of vitrification (rapid freezing in the presence of high concentrations of a cryoprotective agent) can be assessed by measuring mitochondrial integrity (Restrepo, Varela, Duque, Gómez, & Rojas, 2019), although these methods are entirely incompatible with the food industry.

In previous studies, we have shown that mitochondria can be used as a marker of freshness. Once isolated from fresh fillets, they gradually lose their potential, which can be measured by mitotrackers such as Rhodamine 123 or tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM) in fluorimetry and flow cytometry (Cléach, Soret, Grard, & Lencel, 2020; Soret, *et al.*, 2022).

Damage to mitochondrial membranes from frozen-thawed fillets is accompanied by a loss of mitochondrial potential. This loss of potential is, however, not sufficient to justify whether the mitochondria were altered by a freezing process. Therefore, we studied the extent of NADH diffusion and consumption within the mitochondria to have an index of the degree of inner mitochondrial membrane (IMM) permeabilization (Batandier, Leverve, & Fontaine, 2004) to discriminate fresh from frozen-thawed fish.

Two approaches, one enzymatic and the other using oxygen consumption measurement, were taken to measure the degree of NADH permeability of mitochondria. The loss of mitochondrial integrity was measured by the level of IMM permeability to NADH. The first step was to measure the rate of NADH consumption by mitochondria isolated from fresh and frozen-thawed fillets. The second step was to study the level of activation of O_2 consumption by NADH in the presence of mitochondria isolated from fresh fillets or from frozen-thawed fillets.

2. Materials and methods

2.1 Biological material

Gilthead seabream (*Sparus aurata*) (300–450 g) were sourced from Aquanord-Ichtus sea farm (Gravelines, France), as previously described (Cléach, *et al.*, 2019). The fish were kept in isothermal polystyrene boxes, with ice. Upon arrival at the laboratory, two hours after death, the fish were immediately filleted. The fillets had a size of 16 cm long, 7 cm wide and an average weight of 75 g. The fillets were stored on ice in a cold room (+4°C) for eight days. The ice was renewed every day. Some fillets were frozen at day 0 at -80°C. These fillets were individually placed in freezer bags. They were stored in a freezer at -80°C (Model U725 innova, New Brunswick Scientific, New Jersey USA). Analyses were performed at day 1 and day 8 for fresh fish, and after 8 days of freezing and two hours of thawing at room temperature for frozen-

thawed fish. The fillets were then kept at 4°C. Plastic wrapping was used between fillets and ice to avoid contact.

2.2 Reagents

Bovine serum albumin (BSA), 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), ethylene glycol-bis (2 amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), sucrose, potassium chloride (KCl), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Trizma® base), bacterial proteinase type XXIV, alamethicin, β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), rotenone, decylubiquinone and cytochrome c were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate was purchased from Bio-Rad Laboratories (Munich, Germany). Magnesium chloride ($MgCl_2$) and potassium phosphate (KH_2PO_4) were purchased from Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA). Alamethicin was prepared in methanol purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Cytochrome c was prepared in distilled water. Decylubiquinone was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) purchased from Thermo Scientific (San Diego, CA, USA).

2.3 Mitochondrial isolation from fresh and frozen-thawed fish fillets

Mitochondrial isolation was based on the method developed by Cléach, *et al.* (2019), using red muscle. Red muscle was dissected from the fillet and diced with scissors to obtain a finely cut tissue. This tissue was incubated with 25 mL of isolation buffer (180 mM KCl, 80 mM sucrose, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, 2 mM EGTA, pH 7.2 at +4°C) for 8 min under stirring at +4°C supplemented with bacterial proteinase type XXIV. The tissue suspension was poured into a 30 mL glass Potter homogenizer and homogenized for 3 min using a motorized Teflon pestle at 300 rpm (Hei-TORQUE 400, Heidolph instruments, Schwabach, Germany). Initial centrifugation was performed at 7,000 *g* for 10 min (Megafuge 16R Heraeus, Thermo Scientific, San Diego, CA, USA). The resulting pellet was then washed with isolation buffer and 25 mL of this buffer was added to resuspend the pellet. The homogenate was homogenized at 150 rpm for 3 min and then centrifuged at 700 *g* for 10 min. The supernatant was recovered and centrifuged at 1,500 *g* for 10 min. This step was repeated once. The supernatant was recovered and centrifuged one last time at 7,000 *g* for 10 minutes. All steps were performed at +4°C. The mitochondrial pellet was then diluted with 60 µL of isolation buffer. To determine the final concentration of the pellet, a Bio-Rad protein assay kit was used. BSA was used as a standard. Mitochondria were kept on ice at a final concentration of 50–60 $mg.mL^{-1}$.

The same protocol was used for the frozen-thawed fillets. In this case, the final concentration of mitochondria was about 20–30 $mg.mL^{-1}$.

2.4 NADH consumption by spectrophotometry

NADH consumption was measured by spectrophotometry (UV-vis spectrophotometer, UV-1280, Shimadzu Europa GmbH, Germany) as previously described by Venard, *et al.* (2003). In the spectrometric cuvette, 1 mL of the respiratory buffer was added, then 0.2 $mg.mL^{-1}$ of mitochondria. In all cuvettes, cytochrome c (10 µM) and decylubiquinone (0.1 mM) were included. A control cuvette was carried out with addition of rotenone (2.5 µM). Alamethicin (2.5 µM) was added to another cuvette, to observe membrane permeabilization. To all cuvettes, NADH with final concentration of 0.1 mM was added. Zero calibration was performed before addition of NADH and the reading was performed at 340 nm.

Specific activity (SA) was calculated from the Beer-Lambert law.

SA = $\frac{(\Delta A/(\varepsilon.l))/\Delta T}{[proteins]}$ µmol of $NADH.min^{-1}.mg^{-1}$ of proteins

ε = 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$

Relative specific activity was obtained with this formula:

% SA = $\frac{SA}{SAmax} \times 100$ %

SA max was represented by fresh fillets at D1 in the presence of alamethicin.

2.5 O_2 consumption by oxygraphy

Consumption monitoring was done using an oxygraph O-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). 100 % calibration was performed in the presence of the maximum amount of O_2 when the chamber was open. Similarly, 0 % calibration was performed using dithionite. A respiratory buffer was added to the chamber. An amount of 2.5 mL of the respiratory buffer was added (KCl 125 mM, MOPS 20 mM, Tris 10 mM, KH_2PO_4 2.5 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, EGTA 10 µM and BSA 2 $mg.mL^{-1}$). Before addition of the mitochondria, cytochrome c (10 µM) and decylubiquinone (0.1 mM) were added. The final concentration of mitochondria in each chamber was 0.2 $mg.mL^{-1}$. NADH (1 mM) was added, then alamethicin (2.5 µM). The experiment was performed at +25°C.

The rate of O_2 consumption was calculated with this formula:

O_2 consumption = $\frac{\left(\frac{O_2}{[proteins]}\right)*60}{1000}$ nmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of proteins

Relative O_2 consumption was obtained with this formula:

% O_2 consumption = $\frac{O_2}{O_2max} \times 100$ %

O_2max was represented by fresh fillets at D1 in the presence of alamethicin.

2.6 Microscopy

Samples were prepared according to the protocol of Michalec, *et al.* (2017). In short, 3 mm^3 pieces of red muscle were cut from fillets and fixed in 2.5 % glutaraldehyde (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) buffered with 0.1 M sodium cacodylate (Sigma-Aldrich), post-fixed in 1 % osmium tetroxide (Sigma-Aldrich). The pieces were incubated in 2 % uranyl acetate (Agar Scientific, Stansted, UK). After dehydration with acetonitrile, the samples were cast in an epon-like resin (EMbed-812). Ultrathin sections (90 nm) were made with a Leica UC7 ultramicrotome and collected on 150-mesh hexagonal copper grids. The sections were stained with 2 % uranyl acetate in 50 % ethanol and lead citrate. The sections were observed under a Hitachi H-600 transmission electron microscope equipped with a W electron source (operating at 75 kV) and a Hamamatsu C4742-95 digital camera mounted on the side.

2.7 Statistical analysis

Statistical analyses were performed and graphs generated with the PAST (free software for scientific data analysis, univariate and multivariate statistics) program version n°4.03. Each experiment was performed in triplicate. Data are expressed as mean ± standard deviation. A Wilcoxon test was used to express the significance of difference ($p < 0.05$) between means.

3. Results

3.1 Morphological modification of mitochondria by freezing

The ultrastructure of gilthead seabream muscle tissue from fresh fillets (D1) and frozen (D1)-thawed (D2) fillets was observed by transmission electron microscopy (TEM). On the fresh tissue (Fig. 1A), the different bands were clearly organized. The actin and myosin filaments were well defined and aligned in parallel. The I and A bands were distinguished as well as the Z and M lines (Fig. 1A1). The numerous mitochondria appeared compact and well organized. The mitochondrial cristae were well structured and did not show any vacuolization. The inner membrane invaginations were well visible and the outer membrane was dense and marked, reflecting good integrity (Fig. 1A2).

On the frozen-thawed tissue (Fig. 1B), a deep destructing of the tissue was observed. The sarcomeres were very disorganized. The size of the sarcomeres was considerably reduced. The I and A bands were much less visible. The A-band was considerably reduced, which translated into the disappearance of the H-band and the I-band. The Z-lines remained identifiable and made it possible to appreciate the reduced size of the sarcomeres (Fig. 1B1). The mitochondria were deeply altered. Disappearance of a large proportion of the mitochondrial cristae was observed, showing vacuolization (large spaces between cristae) (Fig. 1B2). The peripheral

membrane seemed to be much less dense in some places, which suggested the presence of breaches.

3.2 Measurement of mitochondrial NADH consumption by spectrophotometry

Discrimination between intact and altered mitochondria was made by measuring the permeability of the inner mitochondrial membrane. If the IMM is unaltered, NADH is unable to cross it. Thus, activation of respiratory chain enzymes by NADH is a good indicator of membrane permeabilization. The increase in permeability of the mitochondrial membranes to NADH was measured by a spectrophotometric method (consumption of NADH by complex I).

3.2.1 Measurement of the impact of freezing on NADH consumption by mitochondria

NADH has a peak absorbance at 340 nm. The consumption of NADH by mitochondria isolated from fresh (Day 1) and frozen (Day 0)-thawed (Day 8) fillets was therefore followed at 340 nm over a period of 300 seconds (Fig. 2). NADH is the substrate of a large number of cytoplasmic and mitochondrial enzymes. Consequently, a negative control was obtained by adding rotenone. Rotenone specifically blocks complex I and thus the consumption of NADH by mitochondrial complex I. This result allowed us to verify that the consumption of NADH (outside the respiratory chain) was negligible (FR). Similarly, a positive control was obtained by adding alamethicin. This is a permeabilizing agent that makes mitochondria fully permeable to NADH. Figure 2 shows that the addition of alamethicin led to a maximum consumption rate of NADH, both on mitochondria isolated from a fresh fillet (F+ curve) and on mitochondria isolated from a frozen-thawed fillet (T+ curve). The effect of alamethicin on mitochondria from a frozen-thawed fillet was very little, because the rate of consumption of NADH by these mitochondria was already very high. This indicated that permeabilization of inner mitochondrial membrane from a frozen-thawed fillet to NADH was high. The effect of alamethicin on mitochondria from frozen-thawed fillets was weak, because the level of permeabilization of mitochondria was already very high (T+). On the other hand, the effect of alamethicin was strong on mitochondria from fresh fillets (F+). Alamethicin strongly increased the rate of consumption of NADH by mitochondria. The consumption of NADH without alamethicin was much higher on mitochondria isolated from frozen-thawed fillets (T- curve) than on mitochondria isolated from fresh fillets (F- curve). However, alamethicin had a much greater permeabilizing effect on mitochondria isolated from fresh fillets than on mitochondria isolated from frozen-thawed fillets.

3.2.2 Impact of fillet storage time on NADH consumption

Storage of fresh fillets at 4°C increased membrane permeability and decreased the enzymatic activity of complex I, which affected the consumption of NADH by the mitochondria. 100 % activity (Fig. 3) corresponded to the consumption rate of mitochondria isolated from a fresh fillet and permeabilized with alamethicin (maximum activity of complex I: FD1+). The other results were normalized to FD1+. Storage time at 4°C affected the rate of NADH consumption after permeabilization with alamethicin. Total activity seemed to decrease from 100 % at D1 (FD1+) to 47.64 % at D8 (FD8+). This marked decrease probably resulted from the inhibition or alteration of complex I. However, the alamethicin effect was still present and substantial on fresh tissue at the D1 and D8 timepoints. However, we did not observe any significant effect of alamethicin on mitochondria isolated from frozen-thawed fillets (TD8- and TD8+).

Therefore, mitochondria isolated from fresh fillets had relatively low basal NADH consumption (29.35 % of total activity: FD1-), while mitochondria isolated from frozen-thawed fillets presented much higher consumption (78.06 % of total activity: TD8+). On the other hand, freezing induced alteration of the mitochondrial membranes. The membranes became permeable and allowed consumption of NADH. On mitochondria from frozen-thawed fillets, the level of permeabilization was sufficiently high not to observe any alamethicin effect.

3.3 Measurement of mitochondrial O_2 consumption by oxygraphy

Increased inner mitochondrial membrane permeability to NADH was measured by the oxygraphic method. The supply of NADH to the respiratory chain induced consumption of O_2. O_2 concentrations were followed in real time in the oxygen chamber (Fig. 4: left axis and blue curve). These concentration measurements allowed us to calculate continuous O_2 consumption rate (right axis and red curve expressed in pmol O_2 $s^{-1}.mL^{-1}$).

3.3.1 Measurement of the impact of freezing on O_2 consumption by mitochondria

For mitochondria isolated from fresh fillets stored at 4°C for one day (Fig. 4A), simple addition of mitochondria to mitochondrial buffer did not result in O_2 consumption. The absence of substrates did not allow for the activation of respiratory chains and thus O_2 consumption. The addition of NADH resulted in O_2 consumption of 65.44 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of proteins, which reflected low permeabilization of mitochondria to NADH. The addition of alamethicin resulted in very high consumption of O_2, rising to 310.84 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of proteins. This increase by a factor of 4.7 showed that mitochondria were permeabilized by alamethicin. Mitochondrial membranes isolated from fresh fillets are permeable by alamethicin. For mitochondria isolated from frozen-thawed fillets (Fig 4B), the addition of mitochondria to mitochondrial buffer did not lead to increased O_2 consumption, but the addition of NADH led to a significant increase

in O_2 consumption, of the order of 173.32 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of proteins, i.e., about 2.6 times greater than for mitochondria isolated from fresh fillets. Further, alamethicin did not increase NADH induced oxygen consumption rate, which showed that mitochondria inner membranes were already permeabilized after freezing.

3.3.2 Impact of fillet storage time on O_2 consumption by mitochondria

Relative O_2 consumption of mitochondria isolated from fresh and frozen-thawed seabream fillets was studied (Fig. 5). The oxygraphic method confirmed the results obtained in spectrophotometry. At D1, the permeability of mitochondria to NADH was low (19.82 %: FD1-). Respiratory activity (O_2 consumption) was maximal when mitochondria were permeabilized by alamethicin (FD1+). At D8, O_2 consumption of mitochondria isolated from fresh fillets was lower in the presence of NADH (15.36 %: FD8-) than O_2 consumption of mitochondria isolated from frozen-thawed fillets (55.75 %: TD8-). Total respiratory activity (after addition of alamethicin) at D8 was much lower (32.34 %: FD8+), but we still observed an alamethicin effect. On mitochondria isolated from frozen-thawed fillets, the difference in O_2 consumption with and without alamethicin was not significant and seemed to show that freezing strongly altered mitochondrial membranes (55.75 %: TD8-; 65.26 %: TD8+). The diffusion of NADH was then maximal and resulted in high O_2 consumption. O_2 consumption on mitochondria isolated from frozen-thawed fillets (65.26 %: TD8+) was significantly lower than for fresh fillets (100 %: FD1+). Observation of the alamethicin effect on the O_2 consumption of mitochondria allowed us to discriminate fresh from frozen-thawed fillets.

4. Discussion

4.1 Mitochondrial membrane alteration by freezing

In this study, we showed that freezing led to profound cellular and tissue alterations. Muscle fibers and the outer and inner membranes of mitochondria are deeply altered by freezing at -80°C. Mitochondria are an excellent marker of differentiation for fresh-thawed fish because they are easily isolated and have an outer membrane and an inner membrane. Freezing directly affects mitochondrial membrane permeability. It is also necessary to understand the differences in permeabilization due to freezing or to physiological processes of permeabilization (Galluzzi, *et al.*, 2007). The outer membrane of mitochondria is naturally permeable to small molecules (less than 5 kDa). The permeability of the outer membrane can increase after translocation of proteins (Bax, Bid) to the outer membrane. These proteins form pores and increase the permeability of the outer membrane. The permeability of the inner membrane may also change, in particular with the formation of transition pores (Bonora, Giorgi, & Pinton, 2021). Storage

of the fillets at 4°C activates the processes of mitochondrial membrane permeabilization. The inner membrane is normally impermeable to NADH. Activation of the respiratory chains by NADH is therefore a marker of inner membrane permeabilization (Batandier, *et al.*, 2004). We also need to distinguish between this physiological permeabilization and permeabilization due to freezing.

In this study, we did not choose to use the external membrane to measure the effects of freezing. Some molecules such as cytochrome c could be a candidate indicator of outer membrane alteration (Gouveia, Bajwa, & Klegeris, 2017). Mitochondrial extraction processes respect the integrity of the mitochondria (Valenti, de Bari, De Filippis, Ricceri, & Vacca, 2014). However, storing the fillets at 4°C weakens the mitochondria that become more fragile upon extraction. Examination of the outer membrane can be a good indicator of the quality of the extraction. Cytochrome c is also a good indicator of the integrity of the outer membrane. Cytochrome c is localized in the intermembrane space and is released as soon as the integrity of the outer membrane is affected. However, to measure the impact of freezing, the permeability of the outer mitochondrial membrane was not retained because it changes too substantially with the storage time and the quality of the extraction. To compensate for cytochrome c leakage, we added a non-negligible amount of exogenous cytochrome c (10 µM). The added cytochrome c contributes to electron transfer in the respiratory chain and allowed us to assess the permeability of the inner membrane (Waterhouse, *et al.*, 2001).

In a previous study, we showed that storage at 4°C led to membrane alterations characterized by a loss of mitochondrial potential in mitochondria isolated from fresh fillets (Soret, *et al.*, 2022). Not surprisingly, the loss of mitochondrial potential was also observed in mitochondria isolated from frozen-thawed fillets (data not shown). Frozen-thawed mitochondria became permeable to H^+ protons and were unable to maintain their membrane potential.

In this study, we showed that freezing at -80°C led to a disruption of the inner membranes. This was associated with an increase in inner mitochondrial membrane permeability to NADH. The consumption of NADH by complex I was followed by spectrophotometry and also by monitoring of O_2 consumption by oxygraphy. We showed that on mitochondria isolated from frozen-thawed fillets, NADH permeability was higher than on mitochondria isolated from fresh fillets. Thus, freezing resulted in very high permeabilization of mitochondria. Storing fresh fillets at 4°C still resulted in proteolysis, shown by damage to enzymes and mitochondrial membranes (Javadov & Karmazyn, 2007). Permeability testing on mitochondria isolated from fillets stored for 8 days at 4°C confirmed that the permeability remained significantly lower than the permeability induced by freezing. This shows that freezing strongly affected the

permeability of mitochondria. Additionally, alamethicin (permeabilizing agent) had a significant effect on mitochondria isolated from fresh fillets, but no action on mitochondria isolated from frozen-thawed fillets, regardless of the storage time. This reflected significant permeabilization of mitochondria isolated from frozen-thawed fillets.

NADH is a substrate for many enzymatic reactions (Ying, 2006). Isolation of mitochondria has been found to eliminate spurious reactions. The use of rotenone made it possible to inhibit complex I and thus to measure the consumption of NADH that was not attributable to the respiratory chain. In this study, rotenone blocked all NADH consumption flux, which meant that NADH consumption was clearly associated with the respiratory chains. Freezing increased the membrane permeability of mitochondria to NADH, which discriminated fresh from frozen-thawed fillets.

4.2 Mitochondrial enzymatic alteration

Storage of fillets at 4°C maintains mitochondrial activity over several days. However, the respiratory chains quickly produce super-reactive oxygenated compounds. These highly reactive compounds contribute to the oxidation of mitochondrial lipids and proteins (Lenaz, 1998). Complex I is particularly affected by oxidation reactions (Batandier, *et al.*, 2004). In this study, we observed that at D1, the rate of NADH consumption and O_2 consumption on mitochondria isolated from fresh fillets and in the presence of alamethicin was maximal. At D8, the NADH consumption and O_2 consumption of mitochondria isolated in the presence of alamethicin was strongly reduced, which showed a loss of activity of the complex I of the respiratory chain at least.

The consumption of NADH by isolated mitochondria cannot be an indicator of freezing by itself. Importantly, we noticed that NADH consumption was higher on mitochondria isolated from frozen-thawed fillets than on mitochondria isolated from fresh fillets. This difference was not significant because the loss of complex I activity during freezing tends to decrease the difference in consumption due to increased permeability. This difference could be further decreased if the storage time at 4°C of the fillets (post-freezing) was increased.

O_2 consumption in the presence of NADH remains relevant to discriminate fresh from frozen-thawed fillets, but we observed very high loss of activity when the fillet was kept at 4°C for a long period of time. The oxidation of certain compounds of the respiratory chain must participate in this loss of activity. To compensate for some of this oxidation and storage loss, we used decylubiquinone (0.1 mM). As for cytochrome c, the exogenous contribution of

decylubiquinone compensated in part for the oxidation reactions produced during storage at 4°C or during freezing (Sharpley, Shannon, Draghi, & Hirst, 2006).

To consider the loss of activity of the complexes linked to the storage time at 4°C or freezing, we used a permeabilizer: alamethicin. Alamethicin allowed us to discriminate mitochondria isolated from fresh fillets from mitochondria isolated from frozen-thawed fillets. It still had an effect on mitochondria isolated from fillets stored for 8 days at 4°C. Alamethicin no longer acted on mitochondria isolated from frozen-thawed fillets, which had a high level of permeabilization. The use of alamethicin normalized the results and made it possible to measure the maximum activity (NADH consumption and O_2 consumption) for each condition. The activity measured in the presence of alamethicin gave an idea of the level of alteration of the respiratory chain activity related to storage at 4°C or related to freezing.

Freezing was performed at -80°C for a short storage time of 8 days. Using alamethicin, the maximum activity of NADH consumption and O_2 consumption by mitochondria decreased with freezing and with storage time at 4°C. The decrease in O_2 consumption was slightly greater than the decrease in NADH consumption (complex I activity). The accumulated alterations in the respiratory chain amplify the inhibition of O_2 consumption (Peterson, Johannsen, & Ravussin, 2012). Also, the freezing time at -80°C did not seem to affect these decreases in activity. Longer freezing times (1 month) did not show amplification of the inhibition phenomena (data not shown). Freezing at -80°C seemed to stabilize the oxidation reactions. Interestingly, these losses of activity seemed rather to be attributable to the freezing shock. Freezing disrupts membrane fluidity, which causes dysfunction of the interactions between complexes of the respiratory chain and thus of the complexes (Valenti, *et al.*, 2014).

In short, freeze-thaw shock altered mitochondrial membranes sufficiently to make them insensitive to the permeabilizing effect of alamethicin.

5. Conclusion

Isolation of mitochondria from seabream fillets was used to explore mitochondrial functions and consequently their alterations. Freezing of fish fillets is associated with substantial destruction of mitochondrial membranes, leading to permeabilization of the inner membrane to NADH. The degree of permeabilization of isolated mitochondria to NADH can be measured by the activity of complex I and O_2 consumption in the presence of NADH. Moreover, the enzymatic activities were normalized by the addition of alamethicin, which is a permeabilizing agent. Mitochondria isolated from red tissue of fillets that are insensitive to alamethicin are highly permeabilized mitochondria, and are therefore indicators of frozen-thawed fish products.

These results could be generalized to many species and therefore meet the expectations of the seafood industry concerning the differentiation of fresh fillets from frozen-thawed fillets from the point of view of compliance with regulations.

Declaration of interest

None

Acknowledgements and funding

Tiffanie Bouchendhomme would like to thank the Hauts-de-France regional council and ULCO for their financial support of her PhD studies. The authors would like to thank Anne-Sophie Lacoste for her valuable technical assistance with the electron microscopy. This work was funded by the French government, Ifremer and the Hauts-de-France region in the framework of the CPER 2014-2020 MARCO project.

References

Batandier, C., Leverve, X., & Fontaine, E. (2004). Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem., 279*(17), 17197-17204.

Bonora, M., Giorgi, C., & Pinton, P. (2021). Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1-20.

Chiesa, L. M., Pavlovic, R., Nobile, M., Di Cesare, F., Malandra, R., Pessina, D., & Panseri, S. (2020). Discrimination between fresh and frozen-thawed fish involved in food safety and fraud protection. *Foods, 9*(12), 1896.

Cléach, J., Pasdois, P., Marchetti, P., Watier, D., Duflos, G., Goffier, E., Lacoste, A. S., Slomianny, C., Grard, T., & Lencel, P. (2019). Mitochondrial activity as an indicator of fish freshness. *Food Chem., 287*, 38-45.

Cléach, J., Soret, M., Grard, T., & Lencel, P. (2020). Assessment of fish freshness based on fluorescence measurement of mitochondrial membrane potential. *Food Control, 115*, 107301.

Dalvi-Isfahan, M., Jha, P. K., Tavakoli, J., Daraei-Garmakhany, A., Xanthakis, E., & Le-Bail, A. (2019). Review on identification, underlying mechanisms and evaluation of freezing damage. *J. Food Eng., 255*, 50-60.

Diop, M., Watier, D., Masson, P.-Y., Diouf, A., Amara, R., Grard, T., & Lencel, P. (2016). Assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (*Sparus aurata*) by a cytosolic enzyme: Lactate dehydrogenase. *Food Chem., 210*, 428-434.

Erikson, U., Misimi, E., & Gallart-Jornet, L. (2011). Superchilling of rested Atlantic salmon: Different chilling strategies and effects on fish and fillet quality. *Food Chem., 127*(4), 1427-1437.

Ethuin, P., Marlard, S., Delosière, M., Carapito, C., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Dehaut, A., Lencel, V., Duflos, G., & Grard, T. (2015). Differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis. *Food Chem., 176*, 294-301.

Fernández-S., I., Fuentes, A., Aliño, M., Masot, R., Alcañiz, M., & Barat, J. M. (2012). Detection of frozen-thawed salmon (*Salmo salar*) by a rapid low-cost method. *J. Food Eng., 113*(2), 210-216.

Galluzzi, L., Zamzami, N., Rouge, T. M., Lemaire, C., Brenner, C., & Kroemer, G. (2007). Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis, 12*(5), 803-813.

Gouveia, A., Bajwa, E., & Klegeris, A. (2017). Extracellular cytochrome c as an intercellular signaling molecule regulating microglial functions. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj., 1861*(9), 2274-2281.

Hassoun, A. (2021). Exploring the potential of fluorescence spectroscopy for the discrimination between fresh and frozen-thawed muscle foods. *Photochemistry, 1*(2), 247-263.

Javadov, S., & Karmazyn, M. (2007). Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell. Physiol. Biochem., 20*(1-4), 1-22.

Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg., 1366*(1-2), 53-67.

Li, D., Zhu, Z., & Sun, D.-W. (2018). Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review. *Trends Food Sci. Technol., 75*, 46-55.

Michalec, F. G., Holzner, M., Barras, A., Lacoste, A. S., Brunet, L., Lee, J. S., Slomianny, C., Boukherroub, R., & Souissi, S. (2017). Short-term exposure to gold nanoparticle suspension impairs swimming behavior in a widespread calanoid copepod. *Environ. Pollut., 228*, 102-110.

Nakazawa, N., Wada, R., Fukushima, H., Tanaka, R., Kono, S., & Okazaki, E. (2020). Effect of long-term storage, ultra-low temperature, and freshness on the quality characteristics of frozen tuna meat. *Int. J. Refrig., 112*, 270-280.

Ottavian, M., Fasolato, L., Facco, P., & Barolo, M. (2013). Foodstuff authentication from spectral data: Toward a species-independent discrimination between fresh and frozen–thawed fish samples. *J. Food Eng., 119*(4), 765-775.

Pegg, D. E. (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology, 60*(3), S36-S44.

Peterson, C. M., Johannsen, D. L., & Ravussin, E. (2012). Skeletal muscle mitochondria and aging: A review. *Journal of aging research, 2012*.

Restrepo, G., Varela, E., Duque, J. E., Gómez, J. E., & Rojas, M. (2019). Freezing, vitrification, and freeze-drying of equine spermatozoa: Impact on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, and DNA integrity. *Journal of equine veterinary science, 72*, 8-15.

Sharpley, M. S., Shannon, R. J., Draghi, F., & Hirst, J. (2006). Interactions between phospholipids and NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondria. *Biochemistry, 45*(1), 241-248.

Shumilina, E., Møller, I. A., & Dikiy, A. (2020). Differentiation of fresh and thawed Atlantic salmon using NMR metabolomics. *Food Chem., 314*, 126227.

Sone, I., Skåra, T., & Olsen, S. H. (2019). Factors influencing post-mortem quality, safety and storage stability of mackerel species: a review. *Eur. Food Res. Technol., 245*(4), 775-791.

Soret, M., Bouchendhomme, T., Cléach, J., Jouy, N., Crola Da Silva, C., Devin, A., Grard, T., & Lencel, P. (2022). Measurement of fish freshness: Flow cytometry analysis of isolated muscle mitochondria. *Food Chem., 373*, 131690.

Strateva, M., & Penchev, G. (2020). Histological, physicochemical and microbiological changes in fresh and frozen/thawed fish. *Trakia Journal of Sciences, 18*(1), 69.

Tolstorebrov, I., Eikevik, T. M., & Bantle, M. (2016). Effect of low and ultra-low temperature applications during freezing and frozen storage on quality parameters for fish. *Int. J. Refrig., 63*, 37-47.

Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A., & Kawamura, Y. (2006). Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiol. Plant., 126*(1), 81-89.

Valenti, D., de Bari, L., De Filippis, B., Ricceri, L., & Vacca, R. A. (2014). Preservation of mitochondrial functional integrity in mitochondria isolated from small cryopreserved mouse brain areas. *Anal. Biochem., 444*, 25-31.

Velioğlu, H. M., Temiz, H. T., & Boyaci, I. H. (2015). Differentiation of fresh and frozen-thawed fish samples using Raman spectroscopy coupled with chemometric analysis. *Food Chem., 172*, 283-290.

Venard, R., Brèthes, D., Giraud, M.-F., Vaillier, J., Velours, J., & Haraux, F. (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry, 42*(24), 7626-7636.

Waterhouse, N. J., Goldstein, J. C., Von Ahsen, O., Schuler, M., Newmeyer, D. D., & Green, D. R. (2001). Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *The Journal of cell biology, 153*(2), 319-328.

Ying, W. (2006). NAD+ and NADH in cellular functions and cell death. *Front. Biosci., 11*(1), 3129-3148.

Figure

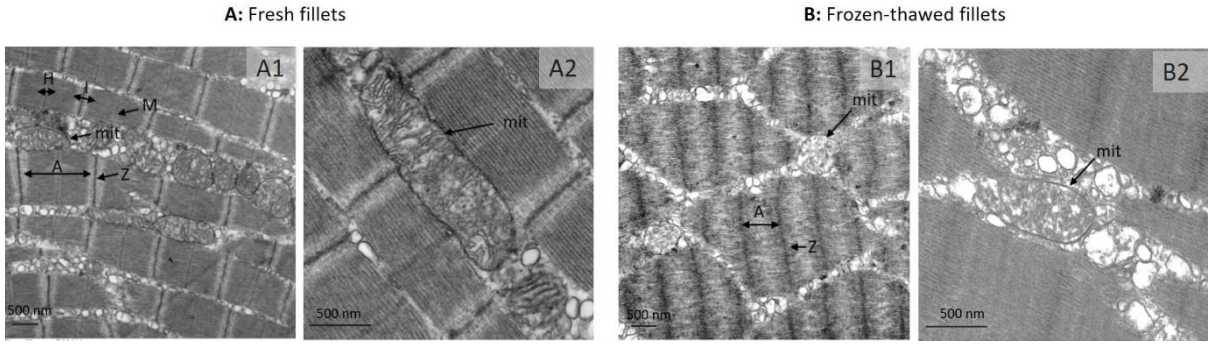


Figure 1: Electron microscopy of red muscle sections of gilthead seabream fillets stored at 4°C or frozen storage

Fig A1/A2: fresh (Day 1) muscle section

Fig B1/B2: frozen (Day 1)-thawed (Day 2) muscle section

A: A band; H: H zone; I: I band; M: M line; mit: mitochondria; Z: Z line; Scale: Bars = 500 nm

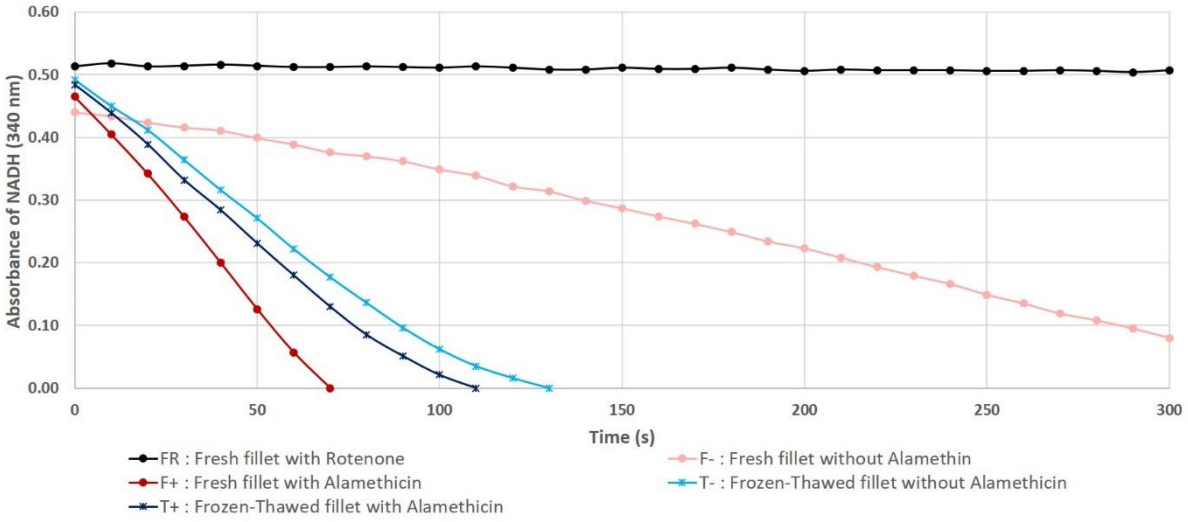


Figure 2: Measure of NADH consumption by spectrophotometry in isolated seabream mitochondria

FR: Mitochondria isolated from fresh fillet (Day 1) with rotenone

F-: Mitochondria isolated from fresh fillet (Day 1) without alamethicin

F+: Mitochondria isolated from fresh fillet (Day 1) with alamethicin

T-: Mitochondria isolated from frozen (Day 0)-thawed (Day 8) fillet kept at -80°C without alamethicin

T+: Mitochondria isolated from frozen (Day 0)-thawed (Day 8) fillet kept at -80°C with alamethicin

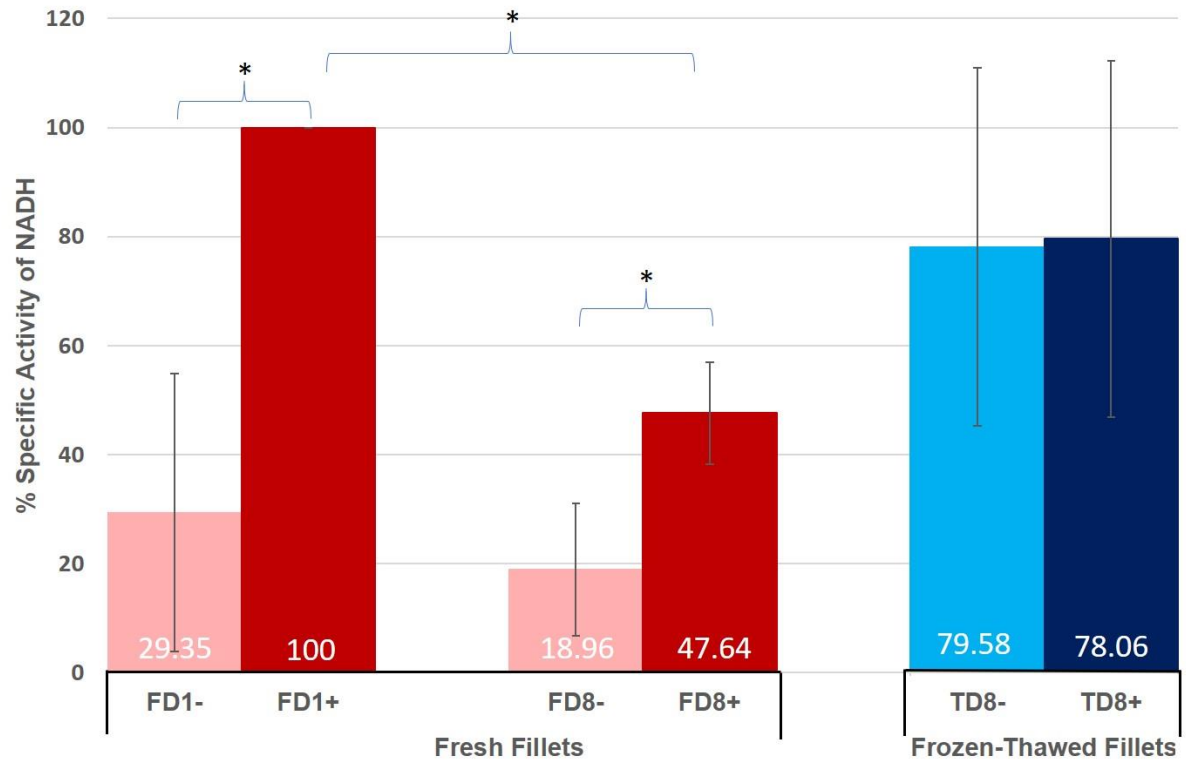


Figure 3: Relative specific activity of mitochondria isolated from fresh and frozen-thawed seabream fillet

FD1: Mitochondria isolated from fresh fillet Day 1

FD8: Mitochondria isolated from fresh fillet Day 8

TD8: Mitochondria isolated from frozen-thawed fillet kept for 8 days at -80°C

Mitochondria were incubated with alamethicin (+) or without alamethicin (-)

The relative activity was reduced to FD1+ (with alamethicin) activity

Asterisks denote values that are statistically significant

A Wilcoxon test was performed ($p < 0.05$, n = 3)

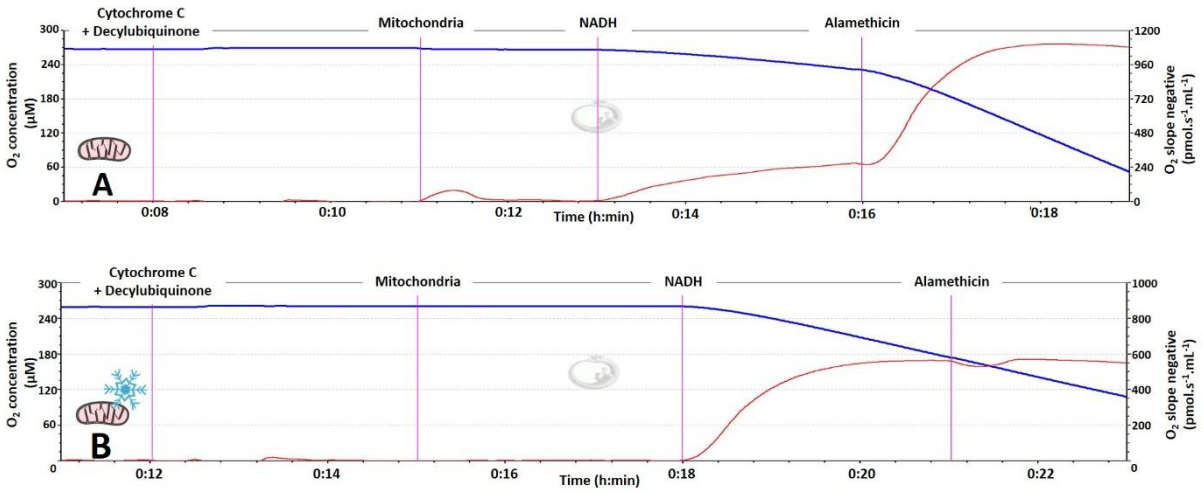


Figure 4: O_2 consumption by oxygraphic assay in mitochondria isolated from seabream
Oxygraph traces (blue curve) and first derivate (red curve) are represented at different storage conditions

A. Oxygraph of mitochondria from D1 fresh fillet

B. Oxygraph of mitochondria from D8 frozen-thawed fillet

The run was carried out in the presence of cytochrome c (10 µM) and decylubiquinone (0.1 mM). After the addition of mitochondria (0.2 $mg.mL^{-1}$), NADH (0.1 mM) and alamethicin (2.5 µM) were added to the incubation chamber

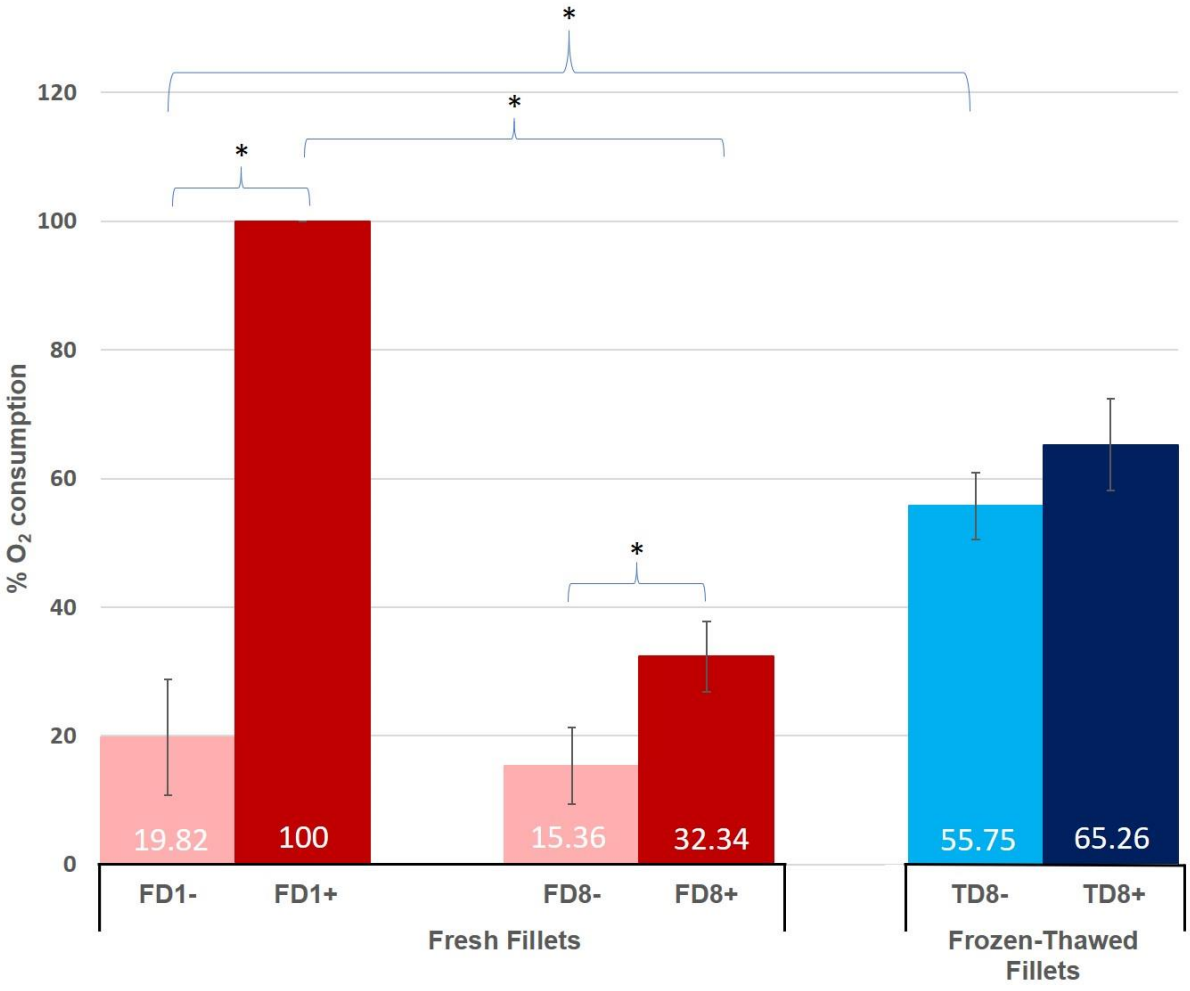


Figure 5: Relative O_2 consumption of mitochondria isolated from fresh and frozen-thawed seabream fillets

FD1: Mitochondria isolated from fresh fillets Day 1

FD8: Mitochondria isolated from Fresh fillets Day 8

TD8: Mitochondria isolated from frozen-thawed fillets kept for 8 days at -80°C

Mitochondria were incubated with alamethicin (+) or without alamethicin (-)

The relative O_2 consumption was reduced to FD1+ (with alamethicin) activity

Asterisks denote values that are statistically significant

A Wilcoxon test was performed ($p < 0.05$, n = 3)

Informations complémentaires sur l'article 2

Outre la daurade, nous avons également mené des expérimentations sur les fibres rouges de la truite arc-en-ciel. La Figure 52 ci-dessous présente de ce fait la vitesse de consommation du NADH par les mitochondries isolées de truite arc-en-ciel durant différents temps de conservation. Pour les mitochondries issues des filets frais à J1 et à J7, une hausse de la vitesse de la consommation de NADH a été observée en présence d'alaméthicine. Il est possible de constater une perte d'activité au niveau du complexe I entre J1 et J7. En revanche, pour les mitochondries issues du filet décongelé, il n'y a pas d'effet de l'alaméthicine.

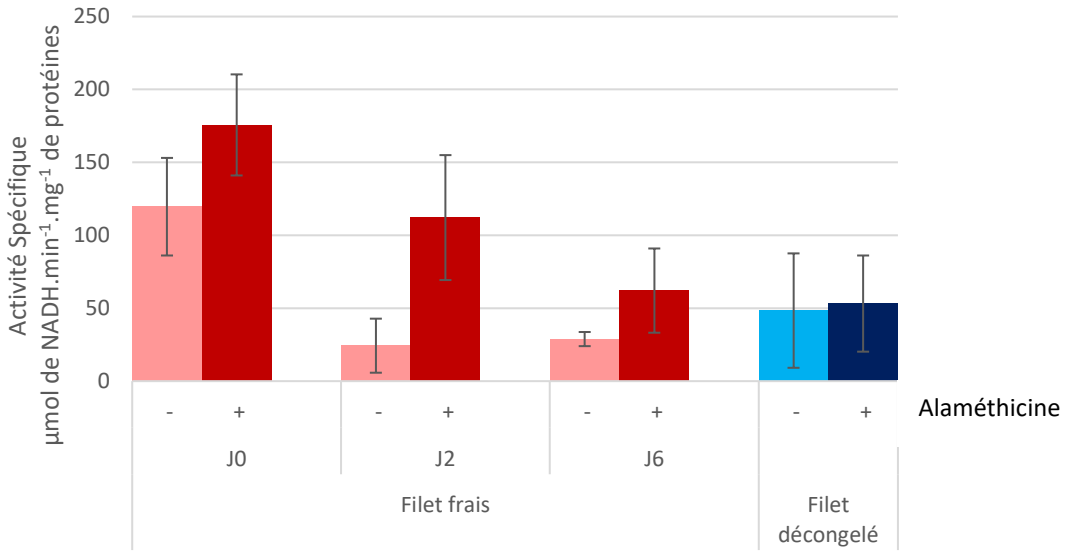


Figure 52 : Histogramme de la vitesse de consommation du NADH par les mitochondries isolées de truite arc-en-ciel

Des essais ont également été réalisés sur la truite arc en ciel (Figure 53 page 188). Le même protocole expérimental que pour la daurade a été suivi. Les premiers résultats sur la vitesse de consommation de l'oxygène par les mitochondries isolées semblent montrer le même profil que pour la daurade. A J1, les mitochondries sans alaméthicine présentent une faible consommation d'oxygène alors qu'en présence d'alaméthicine, la vitesse de consommation est beaucoup plus élevée. Pour les mitochondries extraites du filet décongelé, la vitesse de consommation est très réduite. Il peut également être constaté que l'effet alaméthicine est négligeable dans ce cas. Pour les mitochondries extraites du filet frais à J7, il est possible d'observer une perte de l'activité de la chaine respiratoire en présence ou en absence d'alaméthicine par comparaison avec le J1. Un effet alaméthicine est toujours observable à J7. Ce sont des résultats préliminaires qui semblent prometteurs. Cependant, ils nécessitent de

mettre au point la méthode mise en place pour la daurade, en ajustant la quantité des réactifs utilisés.

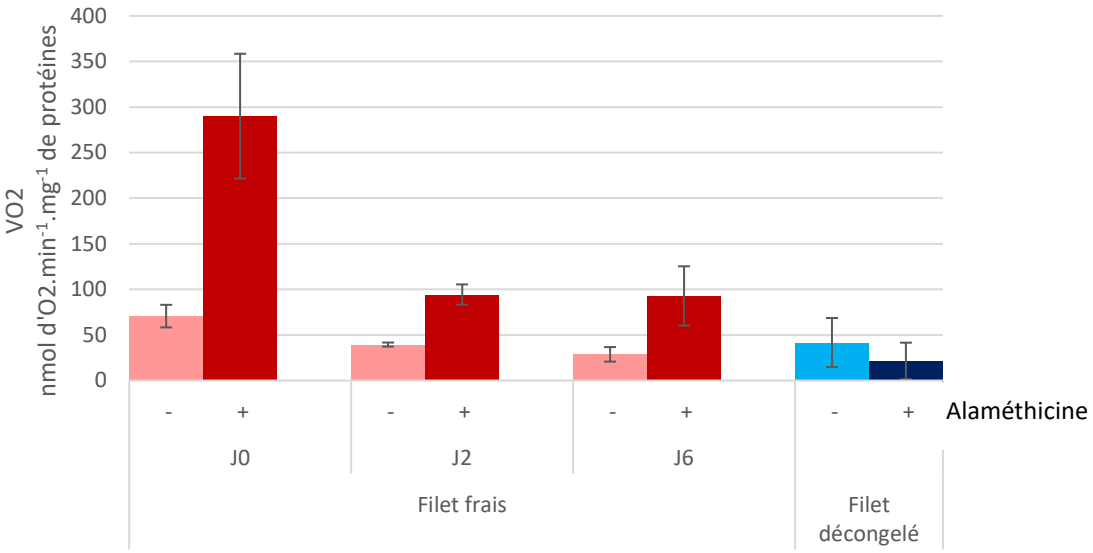


Figure 53 : Histogramme de la vitesse de consommation d'oxygène pour des mitochondries isolées de truite arc-en-ciel

Les mitochondries constituent des organites ubiquitaires quelle que soit l'espèce de poisson. De plus, leur extraction depuis les filets est standard quelle que soit l'espèce également, ce qui en fait une cible intéressante pour son utilisation comme marqueur ubiquiste de fraîcheur et d'altération des produits de la mer. Nous avons utilisé les propriétés de perméabilité sélective des mitochondries (imperméabilité de la membrane interne au NADH). La présence de nombreux complexes enzymatiques, que l'on peut activer par de nombreux substrats, font aussi de la mitochondrie un élément de choix.

L'extraction des mitochondries a permis de comprendre l'impact de la congélation sur les membranes mitochondriales. La congélation entraine une perméabilisation des membranes mitochondriales internes au NADH. Cette augmentation de perméabilité a pu être caractérisée par spectrophotométrie (mesure de la consommation du NADH par le complexe I) et par oxygraphie (mesure de l'activation des chaînes respiratoire et la consommation d'oxygène par le NADH).

L'extraction ne permet probablement pas d'extraire les mitochondries les plus altérées par le processus de congélation. Il est cependant intéressant de constater que les mitochondries isolées de filets décongelés présentent un niveau d'altération membranaire suffisant pour que

celui-ci soit discriminant. Les mitochondries isolées de filets décongelés ne sont plus sensibles au perméabilisant (alaméthicine), ce qui signifie un niveau très important de perméabilisation.

Ce résultat est essentiel car il laisse entrevoir la possibilité de travailler sur des homogénats de tissu. Cette méthode permettrait de s'affranchir des étapes d'extraction. La consommation de NADH pourrait être suivie par fluorescence.

Le NADH participe à de nombreuses réactions cytoplasmiques, ce qui pourrait parasiter la mesure de la consommation de NADH par les mitochondries. Cependant, le blocage à la roténone permettrait de voir ce qui est imputable aux mitochondries. La vitesse de consommation du NADH par l'homogénat et sa sensibilité ou non au perméabilisant apporterait de l'information sur le conditionnement du produit aquatique.

L'effet du NADH pourrait également être testé sur la consommation d'oxygène d'un homogénat en présence ou absence d'alaméthicine. La consommation d'oxygène étant aussi plus spécifique des mitochondries, ceci permettrait d'éviter les nombreuses étapes d'extraction.

Ce travail s'est cependant limité au muscle rouge. Nous avons vu dans le précédent article que les mitochondries isolées de muscle rouge gardent une certaine intégrité post-mortem avec le maintien du potentiel mitochondrial. Sur les produits filetés, il est parfois difficile d'isoler du muscle rouge. C'est pourquoi, il est aujourd'hui indispensable d'étendre les analyses sur le muscle blanc.

Les mitochondries isolées du muscle blanc réagissent différemment des mitochondries isolées de muscle rouge. Le potentiel membranaire mitochondrial se dissipe beaucoup plus rapidement. Des essais ont été réalisés pour comparer les états des mitochondries isolées du muscle blanc et du muscle rouge. Pour les premiers jours de conservation des filets à 4°C, les mitochondries isolées de muscle blanc réagissent de façon identique aux mitochondries isolées de muscle rouge. Mais pour des temps de conservation supérieurs à 4 jours, nous observons une forte réponse au NADH avec une faible réponse à l'alaméthicine pour les mitochondries isolées du muscle blanc. Ces premiers résultats semblent montrer une perméabilisation plus importante des mitochondries isolées de muscle blanc. Cette perméabilisation des mitochondries isolées ne permettrait donc pas de discriminer les filets frais des filets congelés/ décongelés.

Ces observations préliminaires montrent probablement la limite de l'utilisation de la perméabilité au NADH des mitochondries isolées de filets de poisson et plus particulièrement du muscle blanc. Sur le muscle blanc, l'augmentation de la perméabilité au NADH des mitochondries isolées de filets frais ne permettrait pas de les discriminer des mitochondries isolées de filets décongelés. Pour mesurer l'altération des membranes mitochondriales par la congélation, il sera important de s'affranchir des phénomènes de régulation physiologique de la perméabilité. La perméabilité des pores de transition au NADH en est un exemple.

III. Discrimination frais/décongelé sur fibres de tissu rouge

Dans le précédent travail, nous avons pu montrer que les mitochondries isolées de muscle rouge pouvaient être utilisées comme des marqueurs de congélation/décongélation. La congélation provoque des altérations membranaires des mitochondries les rendant perméables au NADH. Le niveau de perméabilisation est maximal sur les mitochondries isolées de filets décongelés, ce qui rend les mitochondries insensibles au perméabilisant (alaméthicine).

Pendant les étapes d'extraction, les mitochondries subissent des centrifugations successives et des étapes de remise en suspension des culots. Ces étapes peuvent être critiques pour des mitochondries déjà fragilisées. Comme nous avons pu le souligner précédemment, une part non négligeable de mitochondries altérées pourraient ne pas se retrouver dans les isolats. De plus, dans ces isolats, nous minimisons la part de mitochondries très altérées par la congélation en sélectionnant les mitochondries les plus intègres.

Un deuxième élément qui pourrait aller en faveur des détracteurs de l'utilisation des mitochondries isolées est le caractère dénaturant de l'extraction. Nous avons bien montré que les isolats permettaient de discriminer les produits frais des produits décongelés. Il est très probable que les étapes d'extraction amplifient l'altération des membranes externes et internes déjà fragilisées par le temps de conservation des filets ou le choc congélation/décongélation.

Dans de précédents travaux, nous avions pu constater une sensibilité au cytochrome c sur des mitochondries isolées de filets conservés plus de 4 jours à 4°C. Cette sensibilité au cytochrome c augmente avec le temps de conservation des filets. Pour compenser la fuite de cytochrome c, due à l'altération de la membrane externe des mitochondries, nous avons travaillé à une concentration en cytochrome c de 10 µM. La part de perméabilisation des membranes mitochondriales due aux étapes d'extraction pourra être évaluée en comparaison avec un procédé non dénaturant.

L'objectif de travailler avec des fibres isolées était donc double. D'une part, il consistait à s'affranchir des éventuelles altérations et dénaturations subies au cours des étapes

d'extraction. D'autre part, il nous semblait intéressant de réduire le temps d'analyse en éliminant les nombreuses étapes d'extraction.

L'intérêt d'utiliser les fibres dans ce contexte est que la perméabilisation est associée au choc congélation/décongélation. L'utilisation des fibres musculaires, pour sonder les fonctions mitochondriales, est très souvent associée à la perméabilisation par la saponine ou la digitonine. L'originalité du travail présenté ci-après est de mesurer l'action du NADH sur les mitochondries, en utilisant sa capacité à diffuser au travers des membranes plasmiques et mitochondriales altérées.

Nous avons conservé pour ce travail l'approche spectrophotométrique pour mesurer la consommation de NADH par le complexe I. L'approche oxygraphique a permis de mesurer l'activation de la consommation en oxygène par le NADH. Nous avons mis en corrélation le niveau de consommation de l'oxygène avec la perméabilité au NADH des membranes plasmiques et mitochondriales.

Le NADH est le substrat de nombreuses réactions enzymatiques cytosoliques. De ce fait, la demande en NADH sur les fibres pourrait être plus importante et perturber le signal observé sur les mitochondries isolées. En d'autres termes, la perméabilisation des membranes mitochondriales au NADH peut-elle encore être utilisée comme marqueur d'altération liée à la congélation/décongélation ?

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans la revue Food Control en 2023 (BOUCHENDHOMME *et al.*, 2023).

Article 3

Differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets by muscle fibres permeability measurement

Differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets by muscle fibre permeability measurement

Tiffanie Bouchendhomme[a], Méline Soret[a], Thierry Grard[a]* and Philippe Lencel[a]

[a]*Univ. Littoral Côte d'Opale, UMRt 1158 BioEcoAgro, USC ANSES, INRAe, Univ. Artois, Univ. Lille, Univ. Picardie Jules Verne, Univ. Liège, Junia, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France*

* corresponding author: Tel: +33 3 21 99 25 08

E-mail address: Thierry.grard@univ-littoral.fr (T. Grard)

Email addresses:

Tiffanie Bouchendhomme: tiffanie.bouchendhomme@univ-littoral.fr

Méline Soret: meline.soret@univ-littoral.fr

Philippe Lencel: philippe.lencel@univ-littoral.fr

Highlights

Mitochondrial properties were used to discriminate fresh and frozen-thawed fillets

Permeability of muscle fibres and mitochondrial membranes to NADH was measured

Two approaches were used to measure permeability: spectrophotometry and oxygraphy

Frozen-thawed fibres were more permeable to NADH and less sensitive to alamethicin

Abstract

There is no comprehensive method for differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets. This is an ongoing problem, particularly in relation to regulations. In this study, we showed the relevance of using the properties of mitochondria to discriminate fresh fish fillets from frozen-thawed fish fillets. The use of red muscle fibres of Gilthead sea bream allowed us to leave mitochondria in their physiological environment and to avoid possible alterations of mitochondrial membranes during isolation steps. The impact of freezing on fillets was evaluated by measuring the permeability of fibres and mitochondrial membranes to nicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen (NADH). NADH permeability of fresh fillet fibres stored at 4°C was compared to the permeability of fibres extracted from frozen-thawed fillets. Two approaches were used to measure permeability changes: a spectrophotometric method that measured consumption of NADH by complex I, and an oxygraphic approach that measured stimulation of O_2 consumption by NADH. Fibres from frozen-thawed fillets were more permeable to NADH and were less sensitive to the permeabilizer alamethicin. The

sensitivity of this method allowed us to clearly detect red muscle fibres from frozen-thawed fish versus fresh fish fillets.

Key words: oxygraphy, spectrophotometry, mitochondria, NADH, permeabilization, muscle fibres

1. Introduction

Many species of fish are caught at considerable distances from consumption sites. As a result, storage of aquatic products can include a freezing stage. These products are generally intended to supply the frozen food market (COSTELLO & OVANDO, 2019). Consumption of frozen products has tended to decrease in recent years, although it increased again in 2020 with the COVID-19 pandemic. Detecting possible supply of frozen-thawed seafood to the fresh fish market is a real problem. The development of molecular tools to detect fraud within the aquatic products industry is becoming increasingly relevant (SONE *et al.*, 2019).

Given that freezing leads to the formation of ice crystals that cause irreversible damage to plasma and intracytoplasmic membranes (Li, 2018), we built on this finding in previous studies. We measured the impact of fish fillet freezing on the permeabilization of mitochondria isolated from red muscle fibres (BOUCHENDHOMME *et al.*, 2022). Freezing of aquatic products leads to changes in mitochondrial membranes which become far more permeable. This permeability can be measured in different ways: via the release of matrix proteins or metabolites, or via permeability to certain substrates (SILEIKYTE *et al.*, 2010). Increased permeability to nicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen (NADH) is associated with mitochondrial membrane alteration related to freezing-thaw shock (KROEMER *et al.*, 2007).

Isolation of mitochondria requires a series of extraction steps. In this study, our objective was to reduce analysis time by using muscle fibres directly, without a mitochondria extraction step. This technique has been used for many years to explore mitochondrial functions for medical purposes, including the detection of myopathies, neurodegenerative diseases and cancer (KUZNETSOV *et al.*, 2022). Muscle fibres are usually mechanically dissociated and permeabilized with saponin or digitonin to make substrates and inhibitors accessible to mitochondria (KUZNETSOV *et al.*, 2008). This treatment is used to enable exploration of mitochondrial functions while preserving their state and their interactions with other organelles (PICARD *et al.*, 2010 ; PICARD *et al.*, 2011). The use of muscle fibres is particularly well adapted to the discrimination of frozen-thawed aquatic products from fresh ones. In this context, freezing shock induces permeabilization of plasma and intracytoplasmic membranes making the fibres and mitochondria more sensitive to substrates and to certain inhibitors present in the

extracellular medium (STÉPHENNE *et al.*, 2007). Due to the high concentration of mitochondria in red muscle, the amount of fibres required for the analysis is low.

Evaluation of mitochondrial function in muscle fibres has been used to measure differences in meat quality in pork and beef products (WERNER *et al.*, 2010 ; RAMOS *et al.*, 2020). Use of muscle fibres allows for the measurement of differences in post-mortem respiratory activities in various breeds. Permeabilized fibres have also been used to link post-mortem mitochondrial activities to meat quality (ENGLAND *et al.*, 2018 ; RAMOS *et al.*, 2021). In this study, we aimed to use isolated red muscle fibres to explore mitochondrial functions that might be affected by freezing processes (TOLSTOREBROV *et al.*, 2016). The chosen model allowed us to measure the sensitivity of muscle fibres to NADH with or without permeabilization (MAYEVSKY & ROGATSKY, 2007 ; MAYEVSKY & BARBIRO-MICHAELY, 2009). Our study focused on the action of freezing on plasma and mitochondrial membranes by measuring the sensitivity of mitochondria to NADH (BATANDIER *et al.*, 2004). Two techniques were used: the first was to measure consumption of NADH on fresh and frozen-thawed fibres by a spectrophotometric method. The second was to measure O_2 consumption by oxygraphy on fresh and frozen-thawed fibres, in the presence of NADH. The permeabilization level of the membranes was normalized by using a permeabilizing agent, alamethicin (MATIC *et al.*, 2005). In this way, it was possible to assess levels of membrane permeabilization by measuring the level of NADH consumption and the level of O_2 respiration. The objective was to study whether permeabilization induced by freezing remained significant compared to permeabilization induced by autolysis processes (PEGG, 2010), linked to the storage of products at low temperatures (2–4°C) (DIOP *et al.*, 2016).

2. Materials and methods

2.1 Biological material

Gilthead seabream (*Sparus aurata*) (300–450 g) were sourced from Aquanord-Ichtus sea farm (Gravelines, France), as previously described (CLÉACH *et al.*, 2019). Filets were stored in a cold room (+4°C) on ice. The core temperature of fishes was 2°C. Ice renewal was carried out every day. Some of the fillets were frozen at -40°C at D0. Analyses were performed at day 1, day 4 and day 8 for fresh fillets and for frozen-thawed fish after 9 days in the freezer. The thawing phase was carried out in a cold room at 4°C. To avoid contact between fillets and ice, plastic wrapping was used.

2.2 Reagents

Bovine serum albumin (BSA), ethylene glycol-bis (2 amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), sucrose, potassium chloride (KCl), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Trizma® base), 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), alamethicin, β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), decylubiquinone and cytochrome c were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Magnesium chloride ($MgCl_2$) and potassium phosphate (KH_2PO_4) were purchased from Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA). Alamethicin was prepared in methanol purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Cytochrome c was prepared in distilled water. Decylubiquinone was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) purchased from Thermo Scientific (San Diego, CA, USA).

2.3 Fibre preparation

Fibres originated from red muscle of Gilthead seabream. In brief, 10 mg of fibres were taken from the dorsal part of the red muscle. Fibres were dilacerated using scalpels. Muscle fibres were separated from conjunctive tissue. Fibres were then rinsed with respiratory buffer. The respiratory buffer was composed of KCl 125 mM, MOPS 20 mM, Tris 10 mM, KH_2PO_4 2.5 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, EGTA 10 µM and BSA 2 $mg.mL^{-1}$. Fibres were stored in respiratory buffer until analysis.

2.4 NADH consumption by spectrophotometry

NADH consumption was measured by spectrophotometry (UV vis spectrophotometer, UV-1280, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany). The spectrophotometric tank contained 1 mL of the respiratory medium, 5 mg of fibres, cytochrome c (10 µM) and decylubiquinone (0.1 mM). Rotenone (2.5 µM) was used as a control. Alamethicin (5 µM) was added to permeabilize the fibres. NADH was used at 0.1 mM final concentration in all tanks. The zero calibration was done without NADH and reading was performed at 340 nm. Measurements were taken at t=0s, t=100s, t=200s and t=300s. Between each measurement, tanks were placed on a vibrating stirrer at 150 rpm (Titramax 100, Heidolph instruments GmbH, Schwabach, Germany).

The specific activity (SA) was calculated from the law of Beer-Lambert:

$$SA = \left(\frac{(\frac{\Delta A}{\varepsilon.l})/\Delta T}{\text{quantities of fibres}}\right)/1000 \text{ nmol of NADH.min}^{-1}\text{.mg}^{-1} \text{ of wet mass.}$$

$\varepsilon = 6220\ M^{-1}.cm^{-1}$

2.5 O_2 consumption by oxygraphy

O_2 consumption was measured using an oxygraph O-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). The 100 % calibration was done when the chamber was open in the presence of a maximum amount of O_2. The 0 % calibration was done in the closed chamber and with addition of dithionite. Before addition of the fibres, cytochrome c (10 µM) and decylubiquinone (0.1 mM) were added. After 3 minutes, the fibres were added and the chamber was closed. NADH (1 mM) was added, then alamethicin (5 µM). The experiment was performed at +25°C.

O_2 consumption was calculated using this formula:

$$O_2 \text{ consumption} = \frac{(O_2 \ consumption \ with \ substrate - \ O_2 \ consumption \ without \ substrate)}{quantities \ of \ fibres} x \ 60$$

O_2 consumption was expressed in pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass.

2.6 Discrimination threshold

A ratio can be calculated using this formula:

$$ratio \ = \frac{consumption \ with \ alamethin}{consumption \ without \ alamethicin}$$

This ratio was used to determine a discrimination threshold value. Below a certain value, frozen-thawed fillets were found.

2.7 Statistical analysis

Statistical analyses and graphs were generated with XLSTAT 2022.1.1. Each experiment was repeated 4 times. Data were expressed as means ± standard deviation. A *t*-test was used to express the significance of difference ($p < 0.05$) between the different means.

3. Results

3.1 Measurement of NADH consumption by spectrophotometry

Rates of NADH consumption (in nmol of $NADH.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass) on isolated fresh fillet fibres kept at 4°C (F) and on isolated frozen-thawed fillet fibres (T) and in the presence or absence of the permeabilizer alamethicin (+/-) were studied (Fig. 1).

NADH consumption on fresh fibres was low. It was 779.96 nmol of $NADH.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass. The addition of alamethicin (FD+) led to a considerable permeabilization effect, which resulted in a significant increase in NADH consumption by fresh fibres. Consumption reached 2161.27 nmol of $NADH.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass. Consumption of NADH by frozen-thawed fibres without the addition of alamethicin was high and was 3152.86 nmol of $NADH.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass, whereas the addition of alamethicin did not lead to any increased consumption

of NADH. Frozen-thawed fibres had a higher NADH consumption rate and were not sensitive to the action of the permeabilizer (alamethicin), unlike fresh fibres.

3.2 Effect of fillet storage time on NADH consumption

Rates of NADH consumption (in nmol of NADH.min^{-1}.mg^{-1} of wet mass) on isolated fresh fillet fibres stored at 4°C and for different storage times (1 day, 4 days and 8 days) were studied (Fig. 2).

Storage time had no significant effects on NADH consumption by fresh fibres. NADH consumption decreased from 779.86 nmol of NADH.min^{-1}.mg^{-1} of wet mass at D1 to 476.53 nmol at D4, and to 967.68 nmol at D8. The storage time at 4°C did not seem to have any influence on the permeabilization of fibres by alamethicin. At D1, the consumption of NADH in the presence of alamethicin was 2161.27 nmol of NADH.min^{-1}.mg^{-1} of wet mass. It was 2271.98 nmol and 2276.8 nmol of NADH.min^{-1}.mg^{-1} of wet mass for the times D4 and D8, respectively. Regardless of the storage time, alamethicin had the same effect on the permeabilization of fibres and therefore on the consumption of NADH.

3.3 Effect of freezing on O_2 consumption by oxygraphy

O_2 concentrations in the oxygen chamber containing 10 mg of isolated fresh fillet fibres and the rates of O_2 consumption by these fibres were monitored over time (Fig. 3A). Addition of isolated fibres from a fresh fillet resulted in low consumption of O_2 (less than 25 pmol.s^{-1}.mL^{-1}). After addition of NADH, a slight increase in O_2 consumption was observed; the plateau indicated a value of 135 pmol.s^{-1}.mL^{-1} which demonstrated slight permeabilization of the mitochondria. After addition of the permeabilizer (alamethicin), a significant increase in O_2 consumption was observed, which was 355 pmol.s^{-1}.mL^{-1}. This increase showed that fresh fibres were sensitive to permeabilization; NADH was therefore able to significantly activate respiration (i.e., O_2 consumption).

O_2 concentrations in the oxygen chamber containing 10 mg of isolated frozen-thawed fillet fibres and the rates of O_2 consumption by these fibres were monitored over time (Fig. 3B). Addition of isolated fibres from a frozen-thawed fillet resulted in low consumption of O_2 (less than 20 pmol.s^{-1}.mL^{-1}). After addition of NADH, a significant increase in O_2 consumption was observed. The rate of NADH consumption increased without any real plateau effect. It reached about 180 pmol.s^{-1}.mL^{-1} before the addition of alamethicin which induced greater permeabilization of mitochondria. After addition of the permeabilizer (alamethicin), we did not observe a significant increase in O_2 consumption. The lack of alamethicin effect showed that fibres from frozen-thawed fillet were not very sensitive to permeabilization. The rate of O_2

consumption on fibres isolated from frozen-thawed fillet was about two times lower than for fibres isolated from fresh fillet.

3.4 Effect of fillet storage time on O_2 consumption

O_2 consumption by the fibres as a function of storage time of fish fillets and type of packaging (fresh or frozen-thawed) is shown in Fig. 4. The rate of O_2 consumption was expressed in pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass and 4 oxygraphs were generated for each condition. O_2 consumption by isolated fresh fish fibres decreased over time from 1373.79 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass at D1 to 243.72 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass at D8. This showed an alteration of the respiratory chain complexes which resulted in decreased O_2 consumption for an identical stimulation with NADH. Contrary to the spectrophotometric method, O_2 consumption by the fibres isolated from frozen-thawed fish was not higher than the fibres isolated from fresh fillets. It was 1373.79 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass for the fresh fibres at D1 versus 1234.08 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass for the frozen-thawed fibres. Measuring O_2 consumption of isolated fibres exposed to NADH therefore did not appear to be sufficient to discriminate between fresh from frozen-thawed fish.

For fibres of fresh fillet, we observed an alamethicin effect at all 3 storage times (D1, D4 and D8). Alamethicin increased NADH permeability of the isolated fresh fillet fibres, which resulted in increased O_2 consumption. O_2 consumption of the fibres in the presence of alamethicin decreased over time from 4608.75 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass at D1 to 891.06 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass at D8. This represents a decrease of 80.66 % and reflects the fact that respiratory chain efficiency decreased with storage time of the fillets at 4°C. For fibres of frozen-thawed fillet, there was no significant alamethicin effect. O_2 consumption was 1234.08 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass on fibres without alamethicin, and 1848.09 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass in the presence of alamethicin. On the 4 trials performed, this difference was not significant. Freezing led to sufficient permeabilization not to be amplified by a permeabilizer (alamethicin). We can also note lower O_2 consumption of frozen-thawed fillet fibres compared to fresh fillet fibres in the presence of alamethicin. Consumption decreased from 4608.75 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass for FD1+ to 1848.09 pmol of $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ of wet mass for T+. Freezing destabilized the activity of the respiratory chain complexes.

3.5 Ratio determination to discriminate fish quality (frozen-thawed fillets)

An alamethicin effect was present in both methods, spectrophotometric and oxygraphic. This is why we calculated in this part a ratio R = (Activity in presence of alamethicin / Activity in absence of alamethicin).

In Figure 5A, we present the ratios obtained for the spectrophotometric method as a function of the storage time of fillets at 4°C and for different packaging modes (fresh and frozen-thawed). The R ratio for fresh aquatic products was around 2.5–3. The ratio calculated for frozen-thawed aquatic products was around 1. Using the statistical data, a ratio of 1.5 emerged for this method. Fresh products could be defined as products with an R ratio > 1.5, frozen-thawed products as products with an R ratio < 1.5.

In Figure 5B, we present the ratios obtained for the oxygraphic method as a function of the storage time of fillets at 4°C and for different packaging modes (fresh and frozen-thawed). Ratios were calculated as R = (O_2 consumption rate in the presence of alamethicin expressed in pmol of O_2.min^{-1}.mg^{-1} / O_2 consumption rate in the absence of alamethicin). The ratio for fresh products was higher than 3. The calculated ratio for frozen-thawed products was around 1.5. Using the statistical data, a ratio of 2 emerged for this method. Fresh products could be defined as products with an R ratio > 2, frozen-thawed products as products with an R ratio < 2.

4. Discussion

Freezing causes profound membrane alterations that lead to permeabilization of plasma and intracytoplasmic membranes. Plasma and mitochondrial membranes are naturally impermeable to NADH (YING, 2006), but freezing physically alters the membranes making the respiratory enzyme complexes accessible to NADH. In a previous study, we showed that measuring the NADH permeabilization of isolated mitochondria makes it possible to discriminate between fresh and frozen-thawed seafood products. The use of muscle fibres allows us to avoid all the extraction steps, but brings an additional level of complexity insofar as conditions are more heterogeneous (diffusion of NADH in the fibres) and NADH can be associated with numerous sarcoplasmic enzymatic reactions (PICARD *et al.*, 2012).

4.1 Frozen-thawed fish fillet detection by the spectrophotometric approach

In this study, we showed the effect of freezing at -40°C on the rupture of plasma and mitochondrial membranes. Consumption of NADH by the fibres was measured by spectrophotometry at 340 nm. On fibres isolated from fresh fillets (from D1 to D8), NADH consumption was low. Consumption of NADH was not attributable to consumption by the mitochondria because it was insensitive to rotenone (data not shown). In the fresh state, it has been reported that plasma and mitochondrial membranes remain intact and consumption of

NADH is therefore low and not attributable to the mitochondria (SCHANTZ & HENRIKSSON, 1987). Additionally, consumption of NADH by isolated fresh fish fillet fibres did not increase with the storage time of the fillets at 4°C. This showed that the autolysis that could occur on the fibres and that could make NADH accessible to the cytosol did not increase its consumption. In a previous study, we demonstrated autolysis on a fish fillet by release of lactate dehydrogenase over several days of storage at 4°C (DIOP *et al.*, 2016). We can hypothesize that this autolysis could make the fibres more permeable to NADH but not the mitochondria. Artificial permeabilization by alamethicin leads to a significant increase in NADH consumption by the fibres and thus to permeabilization of the plasma and mitochondrial membranes (MATIC *et al.*, 2005). Here, consumption of NADH was indeed attributable to the mitochondria because it was able to be blocked by rotenone. Therefore, the basal consumption by mitochondria on isolated fresh fillet fibres remained low due to the low level of permeabilization of plasma and mitochondrial membranes. NADH consumption on fresh fillet fibres was able to be stimulated by alamethicin. This permeabilizer acted on plasma and mitochondrial membranes, making mitochondria sensitive to NADH. Contrary to what we had observed on isolated mitochondria, consumption of NADH by isolated fibres from fresh fillet and in the presence of alamethicin, was not affected by the storage time at 4°C. This was an argument in favour of using fibres to avoid possible denaturation during extraction processes, especially for mitochondria isolated from fillets that have been stored longer at 4°C (ZAMZAMI *et al.*, 2007).

The relevance of using fibre permeabilization with NADH as a freezing marker was justified by two important experimental elements. The first was that freezing shock induced a very significant increase in NADH consumption by the fibres. Freezing leads to a rupture of plasma and mitochondrial membranes, making complex I accessible to NADH (YAMADA *et al.*, 2020). Blocking of complex I by rotenone leads to a very significant decrease in NADH consumption by the fibres, suggesting that this consumption is indeed associated with mitochondria (LI *et al.*, 2003). Freezing shock thus permeabilized the plasma and mitochondrial membranes. The second experimental argument was the absence of a permeabilizing effect of alamethicin on NADH consumption by isolated frozen-thawed fillet fibres. The permeabilizing action of freezing on plasma and mitochondrial membranes was sufficiently strong that no permeabilizing effect of alamethicin on isolated frozen-thawed fillet fibres was able to be observed (CARRARO & BERNARDI, 2020). The action of freezing resulted in maximum NADH consumption by the fibres.

The spectrophotometric approach was based on the consumption of NADH by complex I of mitochondria. The storage of aquatic products at low temperatures (freezing) over relatively

long periods of time could lead to oxidation phenomena. The main site of production of superoxide compounds, involved in oxidation reactions, is complex I (MAZAT *et al.*, 2020). This production could lead to the oxidation of lipids and peripheral proteins and contribute to a loss of activity of complex I and meat quality. Therefore, measuring the rate of NADH consumption by the fibres cannot be an objective factor of alteration. This rate should be normalized to the rate of NADH consumption by the fibres after addition of alamethicin. This ratio makes it possible to take into account possible losses of activity of complex I linked to the storage time at 4°C or to the storage time in frozen state. This ratio allowed us to determine whether the fibres were sensitive or insensitive to permeabilization (alamethicin). Fresh aquatic products were defined as products with an R ratio >1.5 and frozen-thawed aquatic products were defined as products with an R ratio < 1.5.

4.2 Frozen-thawed fish fillets detection by the oxygraphic approach

The oxygraphic method can be considered more specific to mitochondria since O_2 consumption is directly proportional to NADH consumption by the respiratory chains. O_2 consumption by fibres isolated from fresh fillet and exposed to NADH tended to decrease during the time the fillet was kept at 4°C. This result was somewhat surprising but was not attributable to the change in permeability of the fibres to NADH, but rather related to a loss of activity of the respiratory chains (LAROSA & REMACLE, 2018). By permeabilizing the fibres (using alamethicin), we observed a significant decrease in O_2 consumption with the storage time of the fillets at 4°C. This result showed that the activity of enzyme complexes within the respiratory chain tended to decrease with storage time. The same result was also observed in a previous study on mitochondria isolated from fresh fillets (BOUCHENDHOMME *et al.*, 2022). These results show that measuring increased plasma and mitochondrial membrane permeability by NADH may be partially biased by a loss of respiratory chain activity.

O_2 consumption by isolated fresh fillet fibres was able to be stimulated by alamethicin. As with the spectrophotometric method, alamethicin acted on the plasma and mitochondrial membranes and allowed the diffusion of NADH into the mitochondria, activating O_2 consumption. The activity of the respiratory chains strongly decreased with the storage time, but the alamethicin effect was observed for all times (D1, D4 and D8).

For the oxygraphic method, freezing did not result in a significant increase in O_2 consumption of the fibres, whereas it induced an alteration of the plasma and mitochondrial membranes. Why did this happen? Part of the explanation came from the observation of O_2 consumption of the fibres in the presence of alamethicin. This consumption also decreased substantially and was

close to the O_2 consumption without alamethicin. Therefore, like for fresh fibres, O_2 consumption by fibres isolated from frozen-thawed fillets stimulated by the increased permeability of fibres to NADH was partly compensated for by a loss of activity of the respiratory chains. The respiratory chains seem to be sensitive to the freezing process (STÉPHENNE *et al.*, 2007). Therefore, direct O_2 consumption on NADH cannot be an indicator of freezing. On the contrary, on fibres from frozen-thawed fillets, no alamethicin effect was observed. It has been shown that freezing causes maximum permeabilization of the fibres which become insensitive to the effect of the permeabilizer (LI *et al.*, 2018 ; RASMUSSON *et al.*, 2022). As for the spectrophotometric approach, we noted that the direct effect of NADH on O_2 consumption by the fibres cannot be used as a marker of membrane alteration and therefore of freezing. It was necessary to reduce this activity to the maximum activity that was obtained in the presence of alamethicin. Ratio R was defined as the ratio between O_2 consumption without alamethicin / O_2 consumption in the presence of alamethicin. Calculating this ratio also allowed us to avoid losses of respiratory chain activity linked to storage at 4°C or to the storage time in frozen state. Determining the state of the product (fresh or frozen-thawed) is linked to the sensitivity of the fibres to the permeabilizer alamethicin. If the R ratio is > 2, the product can be defined as fresh, and if the R ratio is < 2, the product can be defined as frozen-thawed.

5. Conclusion

This study confirmed the relevance of using mitochondria as a frozen-thawed marker. The use of fish muscle fibres allowed us to avoid the isolation steps of mitochondria and this makes it possible to obtain results in a much shorter time. Freezing-thawing led to permeabilization of the plasma and mitochondrial membranes. NADH was then able to access complex I and the respiratory chains to activate O_2 consumption. Fibres isolated from fresh fillets were sensitive to permeabilization with alamethicin, resulting in increased permeability to NADH. Fibres isolated from frozen-thawed fillets were insensitive to the action of alamethicin. This approach yielded a rapid result on the preservation state of the Gilthead seabream. To generalize this test to other aquatic products, it would be useful to extend this study to the white muscle of fish fillets.

Declaration of interest

None

Acknowledgements and funding

Tiffanie Bouchendhomme would like to thank the Hauts-de-France regional council and ULCO for their financial support of her PhD studies. This work was funded by the French government, Ifremer and the Hauts-de-France region in the framework of the CPER 2021-2027 IDEAL project. The authors want to thank Philippe PASDOIS for his scientific and technical advice.

References

Batandier, C., Leverve, X., & Fontaine, E. (2004). Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(17), 17197–17204. https://doi.org/10.1074/jbc.M310329200

Bouchendhomme, T., Soret, M., Devin, A., Pasdois, P., Grard, T., & Lencel, P. (2022). Differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets by mitochondrial permeability measurement. *Food Control*, *141*, 109197. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109197

Carraro, M., & Bernardi, P. (2020). Chapter 15—Measurement of membrane permeability and the mitochondrial permeability transition. *Methods in Cell Biology*, *155*, 369–379. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.10.004

Costello, C., & Ovando, D. (2019). Status, Institutions, and Prospects for Global Capture Fisheries. *Annual Review of Environment and Resources*, *44*(1), 177–200. https://doi.org/10.1146/annurev-environ-101718-033310

Diop, M., Watier, D., Masson, P.-Y., Diouf, A., Amara, R., Grard, T., & Lencel, P. (2016). Assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (*Sparus aurata*) by a cytosolic enzyme: Lactate dehydrogenase. *Food Chemistry*, *210*, 428–434. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.136

England, E. M., Matarneh, S. K., Mitacek, R. M., Abraham, A., Ramanathan, R., Wicks, J., Shi, H., Scheffler, T. L., Oliver, E. M., Helm, E. T., & Gerrard, D. E. (2018). Presence of oxygen and mitochondria in skeletal muscle early postmortem. *Meat Science*, *139*(97–106). https://doi.org/DOI: 10.1016/j.meatsci.2017.12.008

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, *87*(1), 99–163. https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006

Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Margreiter, R., Hagenbuchner, J., & Ausserlechner, M. J. (2022). Analysis of mitochondrial function, structure, and intracellular organization in situ in cardiomyocytes and skeletal muscles. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 2252. https://doi.org/10.3390/ijms23042252

Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, *3*(6), 965–976. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61

Larosa, V., & Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Bioscience Reports*, *38*(5), BSR20171492. https://doi.org/10.1042/BSR20171492

Li, D., Zhu, Z., & Sun, D.-W. (2018). Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *75*, 46–55. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.019

Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., & Robinson, J. P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(10), 8516–8525. https://doi.org/10.1074/jbc.M210432200

Matic, S., Geisler, D. A., Møller, I. M., Widell, S., & Rasmusson, A. G. (2005). Alamethicin permeabilizes the plasma membrane and mitochondria but not the tonoplast in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow) suspension cells. *Biochemical Journal*, *389*(3), 695–704. https://doi.org/10.1042/BJ20050433

Mayevsky, A., & Barbiro-Michaely, E. (2009). Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function in vivo. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(10), 1977–1988. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.012

Mayevsky, A., & Rogatsky, G. G. (2007). Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: From animal models to human studies. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *292*(2), C615–C640. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00249.2006

Mazat, J.-P., Devin, A., & Ransac, S. (2020). Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *77*(3), 455–465. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03381-1

Pegg, D. E. (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*, *60*, S36–S44. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.003

Picard, M., Hepple, R. T., & Burelle, Y. (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: Tailoring the organelle for optimal function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *302*, C629–C641. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00368.2011

Picard, M., Ritchie, D., Wright, K. J., Romestaing, C., Thomas, M. M., Rowan, S. L., Taivassalo, T., & Hepple, R. T. (2010). Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers: Mitochondrial function in senescent skeletal muscle. *Aging Cell*, *9*(6), 1032–1046. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00628.x

Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondria: Isolation, structure and function: Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of Physiology*, *589*(18), 4413–4421. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212712

Ramos, P. M., Bell, L. C., Wohlgemuth, S. E., & Scheffler, T. L. (2021). Mitochondrial function in oxidative and glycolytic bovine skeletal muscle postmortem. *Meat and Muscle Biology*, *5*(1). https://doi.org/10.22175/mmb.11698

Ramos, P. M., Li, C., Elzo, M. A., Wohlgemuth, S. E., & Scheffler, T. L. (2020). Mitochondrial oxygen consumption in early *postmortem* permeabilized skeletal muscle fibers is influenced by cattle breed. *Journal of Animal Science*, *98*(3), skaa044. https://doi.org/10.1093/jas/skaa044

Rasmusson, A. G., Møller, I. M., & Widell, S. (2022). Assessment of respiratory enzymes in intact cells by permeabilization with alamethicin. In *Plant Mitochondria* (Van Aken, O., Rasmusson, A.G., Vol. 2363, pp. 77–84).

Schantz, P. g., & Henriksson, J. (1987). Enzyme levels of the NADH shuttle systems: Measurements in isolated muscle fibres from humans of differing physical activity. *Acta Physiologica Scandinavica*, *129*(4), 505–515. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1987.tb08090.x

Sileikyte, J., Roy, S., Porubsky, P., Neuenswander, B., Wang, J., Hedrick, M., Pinkerton, A. B., Salaniwal, S., Kung, P., Mangravita-Novo, A., Smith, L. H., Bourdette, D. N., Jackson, M. R., Aubé, J., Chung, T. D. Y., Schoenen, F. J., Forte, M. A., & Bernardi, P. (2010). Small Molecules Targeting the Mitochondrial Permeability Transition. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. National Center for Biotechnology Information (US). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK280049/

Sone, I., Skåra, T., & Olsen, S. H. (2019). Factors influencing post-mortem quality, safety and storage stability of mackerel species: A review. *European Food Research and Technology*, *245*(4), 775–791. https://doi.org/10.1007/s00217-018-3222-1

Stéphenne, X., Najimi, M., Ngoc, D. K., Smets, F., Hue, L., Guigas, B., & Sokal, E. M. (2007). Cryopreservation of Human Hepatocytes Alters the Mitochondrial Respiratory Chain Complex 1. *Cell Transplantation*, *16*(4), 409–419. https://doi.org/10.3727/000000007783464821

Tolstorebrov, I., Eikevik, T. M., & Bantle, M. (2016). Effect of low and ultra-low temperature applications during freezing and frozen storage on quality parameters for fish. *International Journal of Refrigeration*, *63*, 37–47. https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2015.11.003

Werner, C., Natter, R., Schellander, K., & Wicke, M. (2010). Mitochondrial respiratory activity in porcine longissimus muscle fibers of different pig genetics in relation to their meat quality. *Meat Science*, *85*(1), 127–133. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.12.016

Yamada, Y., Ito, M., Arai, M., Hibino, M., Tsujioka, T., & Harashima, H. (2020). Challenges in Promoting Mitochondrial Transplantation Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6365. https://doi.org/10.3390/ijms21176365

Ying, W. (2006). NAD^+ and NADH in cellular functions and cell death. *Frontiers in Bioscience*, *11*, 3129–3148.

Zamzami, N., Maisse, C., Métivier, D., & Kroemer, G. (2007). Measurement of membrane permeability and the permeability transition of mitochondria. *Methods in Cell Biology*, *80*, 327–340. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80016-6

Figure legends

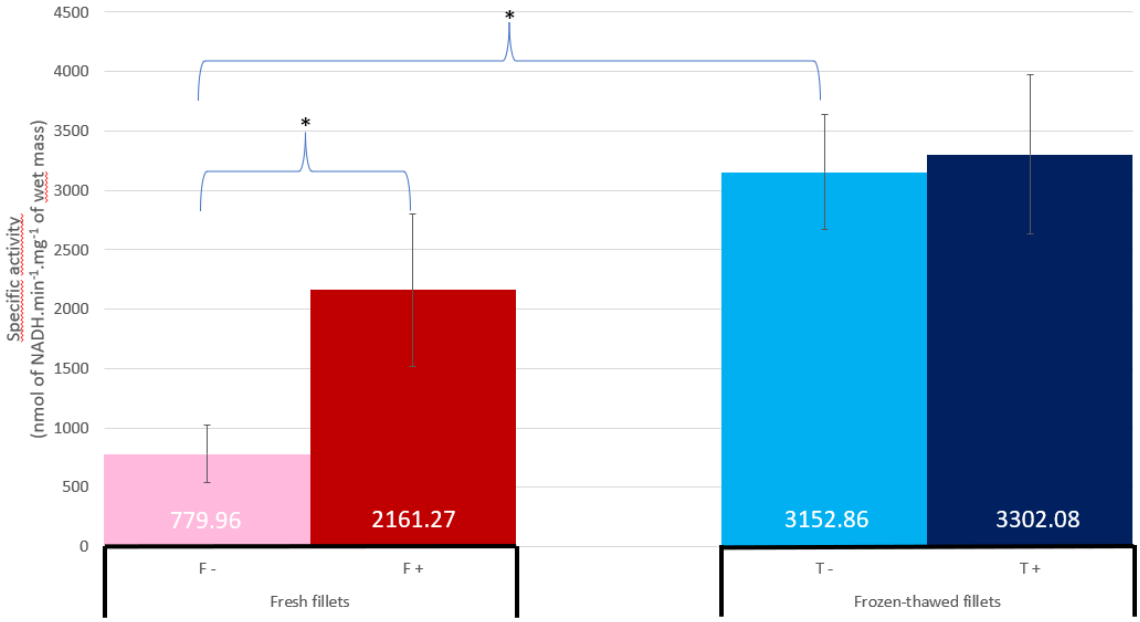


Figure 1: Relative specific activity of red muscle fibres from fresh and frozen-thawed Gilthead seabream fillet.

F-: Red muscle fibres from fresh fillet without alamethicin

F+: Red muscle fibres from fresh fillet with alamethicin

T-: Red muscle fibres from frozen-thawed fillet kept at -40°C without alamethicin

T+: Red muscle fibres from frozen-thawed fillet kept at -40°C with alamethicin

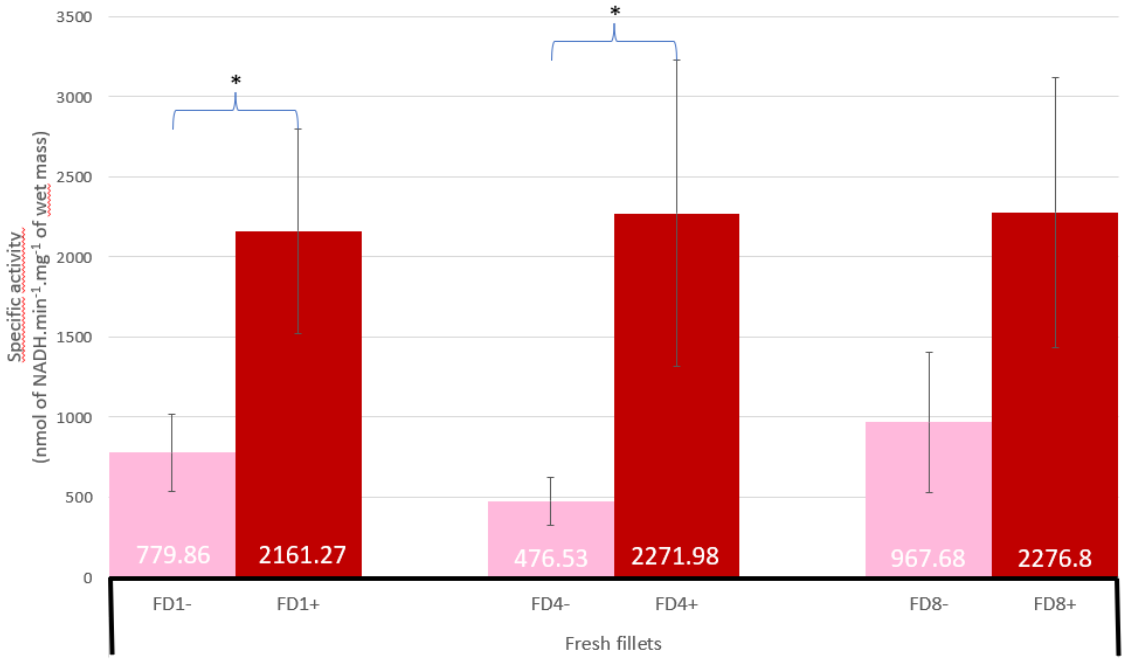


Figure 2: Measurement of NADH consumption by spectrophotometry in red muscle fibres from fresh Gilthead seabream fillet storage at 4°C.

FD1-: Red muscle fibres from fresh fillet Day 1 without alamethicin

FD1+: Red muscle fibres from fresh fillet Day 1 with alamethicin

FD4-: Red muscle fibres from fresh fillet Day 4 without alamethicin

FD4+: Red muscle fibres from fresh fillet Day 4 with alamethicin

FD8-: Red muscle fibres from fresh fillet Day 8 without alamethicin

FD8+: Red muscle fibres from fresh fillet Day 8 with alamethicin

Red muscle fibres were incubated with alamethicin (+) or without alamethicin (-)

Asterisks denote values that are statistically significant

A *t*-test was performed ($p < 0.05$, n = 4)

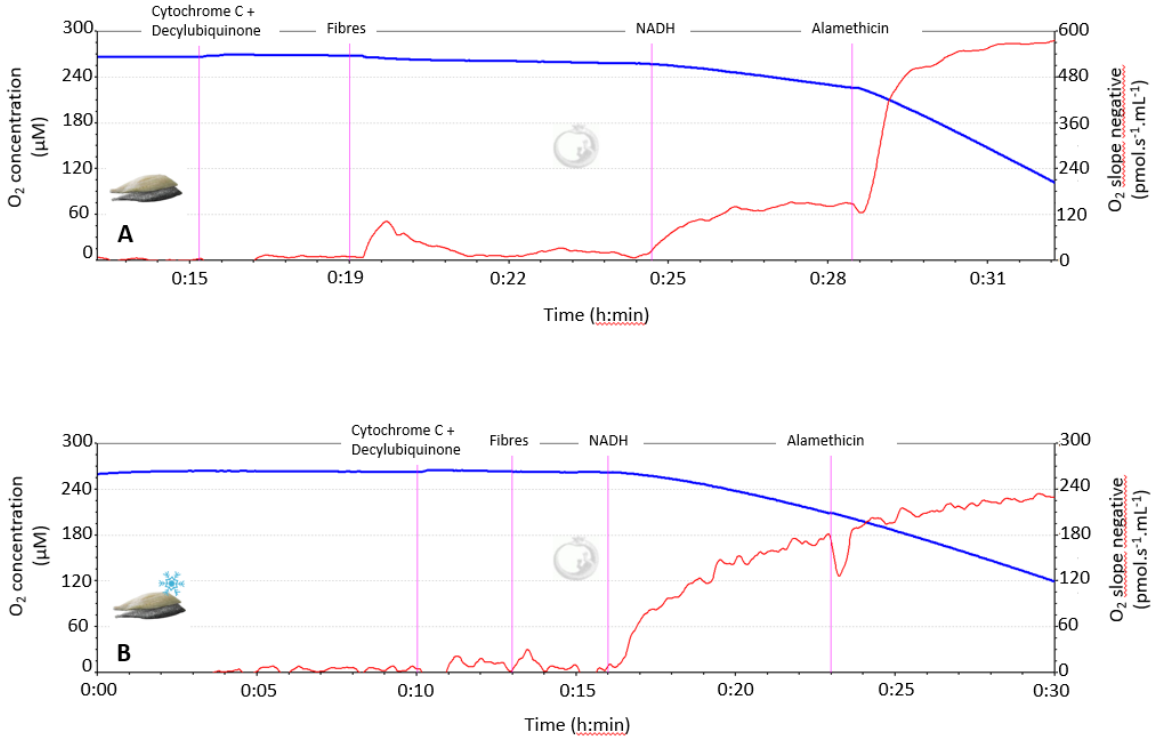


Figure 3: O_2 consumption of Gilthead seabream red muscle fibres by oxygraphy

Oxygraph traces (blue curve) and first derivate (red curve) are represented at different storage conditions.

C. Oxygraph of red muscle fibres from D1 fresh fillet

D. Oxygraph of red muscle fibres from frozen-thawed fillet

The run was carried out in the presence of cytochrome C (10 µM) and decylubiquinone (0.1 mM). After the addition of red muscle fibres (10 mg), NADH (0.1 mM) and alamethicin (2.5 µM) were added to the incubation chamber.

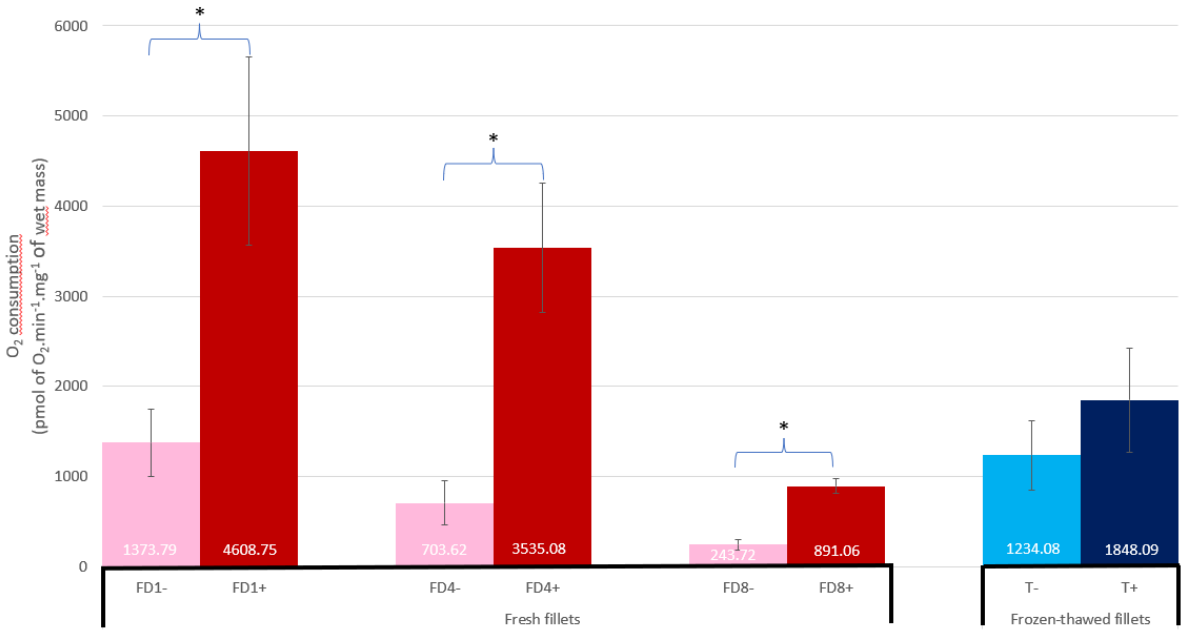


Figure 4: Relative O_2 consumption of red muscle fibres from fresh and frozen-thawed Gilthead seabream fillets.

FD1-: Red muscle fibres from fresh fillet Day 1 without alamethicin

FD1+: Red muscle fibres from fresh fillet Day 1 with alamethicin

FD4-: Red muscle fibres from fresh fillet Day 4 without alamethicin

FD4+: Red muscle fibres from fresh fillet Day 4 with alamethicin

FD8-: Red muscle fibres from fresh fillet Day 8 without alamethicin

FD8+: Red muscle fibres from fresh fillet Day 8 with alamethicin

TD8-: Red muscle fibres from frozen-thawed fillets kept for 8 days at -40°C without alamethicin

TD8+: Red muscle fibres from frozen-thawed fillets kept for 8 days at -40°C with alamethicin

Red muscle fibres were incubated with alamethicin (+) or without alamethicin (-)

Asterisks denote values that are statistically significant

A *t*-test was performed ($p < 0.05$, n = 4)

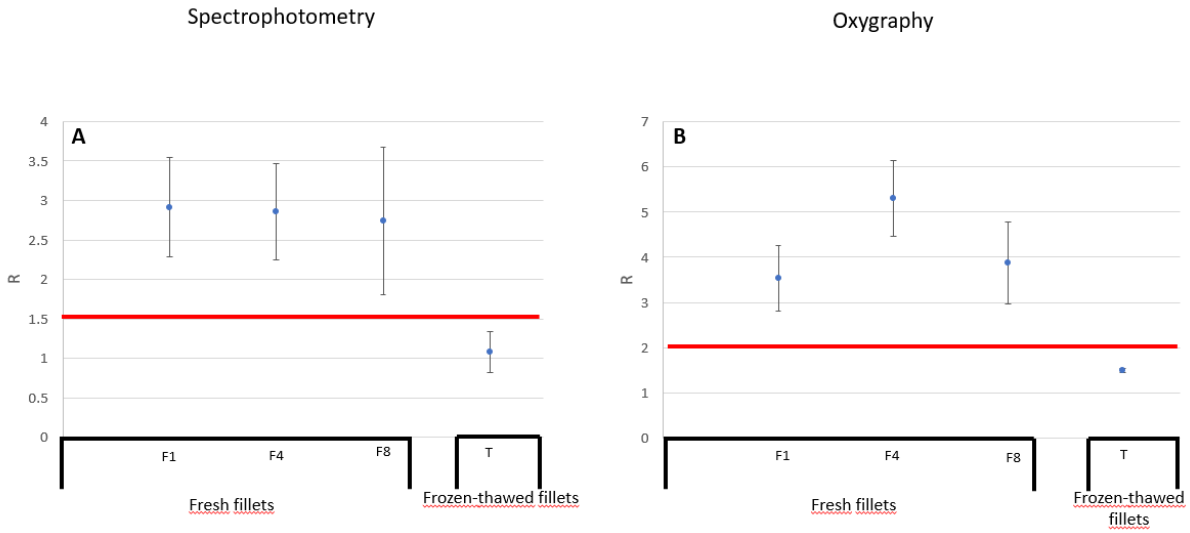


Figure 5: Relative R ratio from fresh and frozen-thawed Gilthead seabream fillets.

For both methods, the R ratio is determined by the ratio between the activity in the presence of alamethicin and the activity in the absence of alamethicin (R = (activity with alamethicin) / (activity without alamethicin)).

A. R ratio of red muscle fibres by the spectrophotometric method

B. R ratio of red muscle fibres by the oxygraphic method

The red line defines the ratio that appears to be significant to distinguish fresh from frozen-thawed fillets.

A *t*-test was performed ($p < 0.05$, n = 4)

Informations complémentaires sur l'article 3

Le travail sur les fibres isolées confirme bien les résultats obtenus sur les mitochondries isolées. La congélation des filets entraine une altération des membranes plasmiques et des membranes mitochondriales. Le NADH peut alors diffuser librement jusqu'aux mitochondries et traverser la membrane mitochondriale pour activer le complexe I et la chaine respiratoire. L'absence d'action de l'alaméthicine sur les fibres isolées de filets décongelés montre une perméabilisation maximale de ces fibres.

Pour les fibres isolées de filets frais conservés à 4°C, le NADH stimule beaucoup moins le complexe I et la chaine respiratoire en raison de sa très faible diffusion au travers des membranes plasmiques et mitochondriales. Le signal perçu par l'oxygraphie est beaucoup moins parasité que pour la spectrophotométrie en raison du lien spécifique qui lie le NADH à la consommation d'oxygène. Il est intéressant de constater que la stimulation des chaines respiratoires par le NADH a tendance à diminuer avec le temps de conservation des filets à 4°C. Ce résultat est plutôt inattendu car des travaux antérieurs sur la LDH avaient montré une autolyse avec le temps de conservation des filets à 4°C. La diminution de la stimulation des chaines respiratoires par le NADH en présence et en absence d'alaméthicine montre une altération de l'activité des chaines respiratoires. L'augmentation de la perméabilité des membranes au NADH est compensée par une perte d'activité des chaines respiratoires.

Comme pour les mitochondries isolées, la différence entre les produits frais et les produits congelés/décongelés ne peut pas se faire sur simple mesure de l'augmentation de la perméabilité des membranes au NADH. La quantité de fibres est standardisée (5 mg de fibres fraîches). Il existe un biais sur la standardisation de la méthode en lien avec les quantités exactes de fibres prélevées et sur la teneur des fibres en mitochondries. La vitesse de consommation de NADH et d'oxygène auraient pu être ramenées à la quantité de citrate synthase pour normaliser les activités à une quantité de mitochondries. Nous avons fait le choix de ramener les activités à la masse de fibres humides et de regarder l'effet « alaméthicine ». Le ratio permet ainsi de normaliser les résultats obtenus.

Comme nous pouvions nous y attendre une partie non négligeable de la consommation du NADH (méthode spectrophotométrique) est non sensible à la roténone. Ceci suggère qu'une partie du NADH ajouté sert à alimenter des réactions autres que la chaine respiratoire. Cette

réaction n'empêche pas de voir l'effet de la congélation sur l'augmentation de la perméabilité au NADH et l'effet alaméthicine. Ceci nous rappelle cependant que le NADH est capable d'intervenir dans un grand nombre de réactions chimiques et enzymatiques et que l'interprétation se complique dans un milieu plus hétérogène.

Ce travail sur les fibres de muscle rouge nous montre que la congélation/décongélation entraine une importante altération des membranes plasmiques et mitochondriales. Pour la mise en place d'une méthode rapide, nous pourrions exploiter cette augmentation de perméabilité cellulaire et tissulaire. L'utilisation du NADH pourrait être couplée sur un tissu avec un complexe colorimétrique ou fluorimétrique réductible par les chaines respiratoires. L'intensité de coloration pourrait être proportionnelle au niveau de perméabilité au NADH et pourrait renseigner sur l'état du produit aquatique (frais ou congelé).

Ces réactions sont très dépendantes de la quantité de mitochondries présentes dans les tissus. Le NADH n'est pas un substrat spécifique de la mitochondrie. Il est capable de participer à un très grand nombre de réactions, avec une variabilité inter-espèces importante. Il s'agit donc là d'autant de facteurs qu'il sera indispensable de prendre en compte pour développer un test universel, ce qui demeure notre objectif.

Conclusion et Perspectives

Au cours de cette thèse, différentes conclusions ont pu être tirées notamment sur le fonctionnement des mitochondries après la mort du poisson. Différentes techniques ont également été utilisées : la cytométrie de flux, la spectrophotométrie et l'oxygraphie. Grâce à l'ensemble de ces méthodes, il a été possible de démontrer que les mitochondries peuvent être utilisées comme des marqueurs de fraîcheur et de congélation (CLEACH *et al.*, 2019 ; SORET *et al.*, 2022 ; BOUCHENDHOMME *et al.*, 2022). La mitochondrie est un organite dont les membranes sont chargées, négativement pour la membrane interne côté matriciel et positivement dans l'espace intermembranaire. Cette différence de charge est responsable du transport des cations et des anions mais également des protéines (ZOROVA *et al.*, 2018).

L'utilisation du potentiel membranaire reste cependant un caractère assez limitant puisque celui-ci diminue avec le temps entrainant de ce fait la perméabilisation naturelle des membranes mitochondriales. Post mortem, la mitochondrie subit des dommages liés au temps. Ces dommages induisent une perméabilisation des membranes externe et interne de la mitochondrie mais aussi une altération au niveau des complexes de la chaine respiratoire. La perte d'intégrité de la membrane mitochondriale interne conduit à la perte du potentiel membranaire avec pour conséquence une équilibration des ions au travers de la membrane. Les complexes de la chaine respiratoire, notamment le complexe I, connaissent une perte d'activité au cours du temps de stockage mais aussi pendant la congélation.

La congélation participe à la perméabilisation des membranes mitochondriales. Elle est la responsable d'altérations au niveau de la membrane mitochondriale interne, notamment sa perméabilisation. Cela induit également une perte de molécules tel que le cytochrome c, molécule nécessaire au bon fonctionnement de la chaine respiratoire (MEYER *et al.*, 2017). Une fuite du NADH matriciel est également observable après altération de la membrane mitochondriale interne (BRISTON *et al.*, 2017). Le NADH est un substrat du complexe I de la chaine respiratoire. Dans des conditions physiologiques, la membrane mitochondriale interne y est imperméable (LEVERVE & FONTAINE, 2001). L'altération de la membrane interne induite par la congélation peut laisser penser que le NADH peut traverser cette membrane et alors alimenter la chaine respiratoire. L'utilisation de substances inhibitrices comme la roténone permet de montrer la spécificité de consommation du NADH par le complexe I (LI *et al.*, 2003).

Une perméabilisation chimique a également pu être utilisée pour sonder les effets de la congélation sur les mitochondries issues du filet frais. L'alaméthicine induit la formation de

pores au niveau de la membrane mitochondriale interne et permet le passage de molécules comme le NADH à l'intérieur de la mitochondrie

Trois études ont composé cette thèse. La première étude a été réalisée en utilisant la cytométrie de flux, ce qui permet de cibler les éléments à analyser (mitochondries). Nous avons pu distinguer différents niveaux de fraîcheur. Les produits aquatiques dont les mitochondries sont à haut potentiel membranaire, ont pu être assimilés à des produits « ultra frais ». Les produits aquatiques, dont le potentiel mitochondrial est plus faible mais « repolarisable » par les substrats, ont pu être assimilés à des produits frais. Enfin, les produits aquatiques, dont les mitochondries isolées ne sont plus « repolarisables », ont pu être assimilés à des produits moins frais. Cette méthode appliquée au muscle rouge semble très sensible et liée à la vitesse de dégradation des produits aquatiques et aux conditions de capture et de conservation. Cette méthode a été testée sur trois espèces de poisson mais pourrait être étendue à de plus nombreuses espèces. La congélation entraine une importante altération et perméabilisation des membranes mitochondriales. Elles contribuent à une perte de potentiel et à une fuite calcique mais qui semble aujourd'hui encore difficile d'exploiter au regard des résultats obtenus sur les produits frais conservés sur des périodes plus longues à 4°C.

C'est dans ce cadre qu'intervient la seconde étude de cette thèse. Il a été décidé de se focaliser sur le fonctionnement des complexes de la chaine respiratoire notamment par l'étude de la consommation de NADH par le complexe I et de la consommation d'O_2. Une consommation de NADH plus importante a été observée pour les mitochondries issues de tissu rouge du filet décongelé. L'ajout d'alaméthicine a permis de visualiser l'activité maximale du complexe I pour les mitochondries issues du filet ultrafrais. Un effet alaméthicine est visible uniquement sur les mitochondries issues du filet frais. Ceci explique la perméabilisation déjà importante des mitochondries issues du filet décongelé. Le suivi de la consommation d'O_2 a également montré que la chaine respiratoire conservait une certaine intégrité puisque 8 jours après la mort, une consommation d'O_2 était toujours visible même si elle perdait en intensité.

Le travail sur des mitochondries isolées nécessite des étapes d'extraction assez lourdes et longues, difficilement applicables en routine. Ces deux premières études ont été réalisées sur des mitochondries isolées de tissu rouge. Le tissu rouge est un tissu vascularisé contenant de nombreuses mitochondries et des molécules de réserve comme le glycogène (LUTHER *et al.*,

1995). Il serait nécessaire d'étendre ces études au muscle blanc qui semble beaucoup moins stable dans le temps. L'utilisation de mitochondries isolées permet d'observer directement le fonctionnement de chaque complexe de la chaine. Cependant, cela ne reflète pas totalement le fonctionnement des mitochondries dans les tissus puisque celle-ci peuvent avoir des interactions avec d'autres organites (FREY & MANNELLA, 2000).

Dans la troisième étude, nous avons utilisé les propriétés de perméabilisation des membranes plasmiques et mitochondriales par la congélation/décongélation. Le NADH peut alors diffuser librement et activer le complexe I et les chaines respiratoires. Une faible consommation de NADH par les fibres fraiches a été observée. L'utilisation de l'alaméthicine a permis une perméabilisation des membranes mitochondriales sur le tissu frais mais n'a pas eu d'effet sur le tissu décongelé. Concernant l'oxygraphie, une perte d'activité a pu être observé au cours du temps pour le tissu frais. Pour le tissu décongelé, les fibres présentent une consommation d'O_2 plus faible que pour le tissu frais. L'alaméthicine n'a toujours pas d'effet sur ces fibres montrant alors que la congélation a permis de perméabiliser les différentes membranes mitochondriales.

Si cette méthode sur les fibres de tissu rouge semble donner des résultats corrects pour différencier le frais du décongelé, il serait intéressant de développer cette méthode sur les fibres isolées du muscle blanc qui semble beaucoup plus fragile.

Les différentes méthodes utilisées permettent de différencier les filets frais des filets décongelés. Cependant, les temps de conservation utilisés lors de cette thèse restent assez courts. Il serait alors intéressant d'allonger le temps de conservation des filets frais. Ils auraient pu être prolongés au-delà de 12 jours. Toutes les expérimentations ont été réalisées sur du tissu rouge. Or, ce tissu n'est pas toujours présent puisque certaines espèces n'en possèdent tout simplement pas (DRAZEN *et al.*, 2013). C'est pour cela qu'à l'avenir, il serait intéressant de développer des méthodes utilisant le tissu blanc du poisson. Plusieurs difficultés seront rencontrées avec ce tissu. celui-ci possède en effet beaucoup moins de mitochondries que le tissu rouge et il semble s'altérer beaucoup plus rapidement également (LUTHER *et al.*, 1995). Dans ce travail, nous avons utilisé les propriétés de perméabilité au NADH des membranes plasmiques et mitochondriales. Ce travail est rendu compliqué par les réactions possibles du NADH avec d'autres organites cellulaires. D'autre part, le NADH est aussi capable de diffuser par les mPTP. Par conséquent, le NADH n'est peut-être pas le

meilleur candidat pour mesurer l'altération membranaire des mitochondries. Des enzymes matricielles, dont le poids moléculaire serait supérieur à 3 kDa, pourraient ainsi être utilisées comme marqueur de congélation. Cette technique pourrait constituer la base d'un futur test pour discriminer les produits aquatiques frais des produits congelés/décongelés.

Ceci constitue l'axe de recherches développé actuellement au laboratoire qui consiste à mener deux types d'approches en parallèle. La première est basée sur le développement de tests rapides pouvant être effectués par les industriels de la filière halieutique au sein même de leur entreprise. Ces tests ont pour but de délivrer des résultats rapides en cas de doute sur l'authenticité ou la qualité de leurs approvisionnements. Ces études rapides, dans le cas où elles n'apporteraient pas de réponses nettes et précises, seront à valider par des méthodes plus complexes. Celles-ci constituent la deuxième approche basée sur des techniques utilisées au sein du laboratoire, telle que la cytométrie de flux, afin d'apporter une réponse objectivement non discutable.

Bibliographie

ABBRESCIA D. I., LA PIANA G. & LOFRUMENTO N. E., (2012). Malate aspartate shuttle and exogenous NADH/cytochrome c electron transport pathway as two independent cytosolic reducing equivalent transfer systems *Archives of biochemistry and biophysics*, **518** : p. 157-163. DOI : 10.1016/j.abb.2011.12.021

ABRAHA B., TESSEMA H. A., MAHMUD A., TSIGHE K. N., SHUI X. & YANG F., (2018). Effect of processing methods on nutritional and physico-chemical composition of fish: a review *MOJ Food Processing & Technology*, **6** (4) : p. 376-382. DOI : 10.15406/mojfpt.2018.06.00191

AGNELLI M. E. & MASCHERONI R. H., (2001). Cryomechanical freezing. A model for the heat transfer process *Journal of Food Engineering*, **47** (4) : p. 263-270. DOI : 10.1016/S0260-8774(00)00126-6

ALASALVAR C., TAYLOR K. D. A. & SHAHIDI F., (2002). Comparative quality assessment of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (7) : p. 2039-2045. DOI : 10.1021/jf010769a

ALTRINGHAM J. D. & ELLERBY D. J., (1999). Fish swimming: patterns in muscle function *The Journal of Experimental Biology*, **202** : p. 3397-3403. DOI : 10.1242/jeb.202.23.3397

ANDERSSON S. G. & KURLAND C. G., (1999). Origins of mitochondria and hydrogenosomes *Current Opinion in Microbiology*, **2** (5) : p. 535-541. DOI : 10.1016/S1369-5274(99)00013-2

ANELICH L. E., HOFFMAN L. C. & SWANEPOEL M. J., (2001). The influence of packaging methodology on the microbiological and fatty acid profiles of refrigerated African catfish fillets *Journal of Applied Microbiology*, **91** (1) : p. 22-28. DOI : 10.1046/j.1365-2672.2001.01346.x

ARVANITOYANNIS I. S. & KOTSANOPOULOS K. V., (2012). Smoking of Fish and Seafood: History, Methods and Effects on Physical, Nutritional and Microbiological Properties *Food and Bioprocess Technology*, **5** (3) : p. 831-853. DOI : 10.1007/s11947-011-0690-8

AUBOURG S. P., (2001). Review: loss of quality during the manufacture of canned fish products *Food Science and Technology International*, **7** (3) : p. 199-215. DOI : 10.1106/4H8U-9GAD-VMG0-3GLR

AYALA M. D., ABDEL I., SANTAELLA M., MARTÍNEZ C., PERIAGO M. J., GIL F., BLANCO A. & ALBORS O. L., (2010). Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage *LWT - Food Science and Technology*, **43** (3) : p. 465-475. DOI : 10.1016/j.lwt.2009.08.023

BACKI C. J., (2018). Methods for (industrial) thawing of fish blocks: A review *Journal of Food Process Engineering*, **41** (1) : p. 11. DOI : 10.1111/jfpe.12598

BARACCA A., SGARBI G., SOLAINI G. & LENAZ G., (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F0 during ATP synthesis *Biochimica et Biophysica Acta*, **1606** (1-3) : p. 137-146. DOI : 10.1016/S0005-2728(03)00110-5

BATANDIER C., LEVERVE X. & FONTAINE E., (2004). Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I *Journal of Biological Chemistry*, **279** (17) : p. 17197-17204. DOI : 10.1074/jbc.M310329200

BETTINAZZI S., GENDRON A. D. & BRETON S., (2019). The effect of cryopreservation on mitochondrial function in freshwater mussel tissue samples (Bivalvia: Unionida) *Cryobiology*, **88** : p. 106-109. DOI : 10.1016/j.cryobiol.2019.04.006

BJØRNEVIK M. & SOLBAKKEN V., (2010). Preslaughter stress and subsequent effect on flesh quality in farmed cod *Aquaculture Research*, **41** (10) : p. e467-e474. DOI : 10.1111/j.1365-2109.2010.02498.x

BONORA M., GIORGI C. & PINTON P., (2022). Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **23** (4) : p. 266-285. DOI : 10.1038/s41580-021-00433-y

BORST P., (2020). The malate–aspartate shuttle (Borst cycle): how it started and developed into a major metabolic pathway *IUBMB Life*, **72** (11) : p. 2241-2259. DOI : 10.1002/iub.2367

BOUCHENDHOMME T., SORET M., DEVIN A., PASDOIS P., GRARD T. & LENCEL P., (2022). Differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets by mitochondrial permeability measurement *Food Control*, **141** : p. 109197. DOI : 10.1016/j.foodcont.2022.109197

BOUCHENDHOMME T., SORET M., GRARD T. & LENCEL P., (2023). Differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets by muscle fibre permeability measurement *Food Control*, **147** : p. 109567. DOI : 10.1016/j.foodcont.2022.109567

BOZZATO A., PIPPIA E., TIBERI E. & MANZOCCO L., (2021). Air impingement to reduce thawing time of chicken fingers for food service *Journal of Food Processing and Preservation*, **45** (11) : p. e15962. DOI : 10.1111/jfpp.15962

BRADFORD M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2) : p. 248-254.

BRAND M. D. & NICHOLLS D. G., (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells *Biochemical Journal*, **435** (2) : p. 297-312. DOI : 10.1042/BJ20110162

BRENNER C. & MOULIN M., (2012). Physiological roles of the permeability transition pore *Circulation Research*, **111** (9) : p. 1237-1247. DOI : 10.1161/CIRCRESAHA.112.265942

BRISTON T., ROBERTS M., LEWIS S., POWNEY B., M. STADDON J., SZABADKAI G. & DUCHEN M. R., (2017). Mitochondrial permeability transition pore: sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability *Scientific Reports*, **7** (1) : p. 10492. DOI : 10.1038/s41598-017-10673-8

BROOKES P. S., YOON Y., ROBOTHAM J. L., ANDERS M. W. & SHEU S.-S., (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **287** (4) : p. C817-C833.

BRUNELLE J. K. & LETAI A., (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family *Journal of Cell Science*, **122** (4) : p. 437-441. DOI : 10.1242/jcs.031682

BUTTKUS H., (1963). Red and white muscle of fish in relation to rigor mortis *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **20** (1) : p. 18.

CAI L., CAO M., CAO A., REGENSTEIN J., LI J. & GUAN R., (2018). Ultrasound or microwave vacuum thawing of red seabream (*Pagrus major*) fillets *Ultrasonics Sonochemistry*, **47** : p. 122-132. DOI : 10.1016/j.ultsonch.2018.05.001

CAI L., CAO M., REGENSTEIN J. & CAO A., (2019). Recent advances in food thawing technologies *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **18** (4) : p. 953-970. DOI : 10.1111/1541-4337.12458

CAI L., ZHANG W., CAO A. & CAO M., (2020). Effects of different thawing methods on the quality of largemouth bass (*Micropterus salmonides*) *LWT - Food Science and Technology*, **120** : p. 108908. DOI : 10.1016/j.lwt.2019.108908

CALIXTO F. A. A., DIAS G. E. A., GUIMARÃES J. DE L. B., MACHADO E. DA S., LATINI J. T. P. & MESQUITA E. DE F. M. DE., (2020). Analysis of the chemical properties of salted cobia (*Rachycentron canadum*) *Food Science and Technology*, **40** (suppl 2) : p. 722-727. DOI : 10.1590/fst.32319

CARRARO M. & BERNARDI P., (2020). Chapter 15 - Measurement of membrane permeability and the mitochondrial permeability transition *Methods in Cell Biology*, **155** : p. 369-379. DOI : 10.1016/bs.mcb.2019.10.004

CHANG W. C.-W., WU H.-Y., YEH Y. & LIAO P.-C., (2020). Untargeted foodomics strategy using high-resolution mass spectrometry reveals potential indicators for fish freshness *Analytica Chimica Acta*, **1127** : p. 98-105.

CHAUHAN S. S. & ENGLAND E. M., (2018). Postmortem glycolysis and glycogenolysis: Insights from species comparisons *Meat science*, **144** : p. 118-126.

CHIESA L. M., PAVLOVIC R., NOBILE M., DI CESARE F., MALANDRA R., PESSINA D. & PANSERI S., (2020). Discrimination between fresh and frozen-thawed fish involved in food safety and fraud protection *Foods*, **9** (12) : p. 1896. DOI : 10.3390/foods9121896

CHOE J. H., CHOI Y. M., LEE S. H., SHIN H. G., RYU Y. C., HONG K. C. & KIM B. C., (2008). The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition, and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality *Meat Science*, **80** (2) : p. 355-362. DOI : 10.1016/j.meatsci.2007.12.019

CHOI M.-J., ABDUZUKHUROV T., PARK D. H., KIM E. J. & HONG G.-P., (2018). Effects of deep freezing temperature for long-term storage on quality characteristics and freshness of lamb meat *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **38** (5) : p. 959-969. DOI : 10.5851/kosfa.2018.e28

CLEACH J., (2018). Recherche et études de marqueurs précoces permettant de déterminer l'état de fraicheur de filets de poissons Thèse : Université du Littoral Côte d'Opale : Boulogne sur mer.

CLEACH J., PASDOIS P., MARCHETTI P., WATIER D., DUFLOS G., GOFFIER E., LACOSTE A.-S., SLOMIANNY C., GRARD T. & LENCEL P., (2019). Mitochondrial activity as an indicator of fish freshness *Food Chemistry*, **287** : p. 38-45. DOI : 10.1016/j.foodchem.2019.02.076

CLÉACH J., SORET M., GRARD T. & LENCEL P., (2020). Assessment of fish freshness based on fluorescence measurement of mitochondrial membrane potential *Food Control*, **115** : p. 107301. DOI : 10.1016/j.foodcont.2020.107301

CLÉACH J., WATIER D., LE FUR B., BRAUGE T., DUFLOS G., GRARD T. & LENCEL P., (2018). Use of ratiometric probes with a spectrofluorometer for bacterial viability measurement *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28** (11) : p. 1782-1790. DOI : 10.4014/jmb.1804.04048

COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES., (2001). règlement (CE) n°466/2001 de la commission du 8 mars 2001

CORDEIRO C. A. M., GOMES W. C. A., SILVA A. V. DA., DIAS J. A. R., PAIXÃO P. E. G., ABE H. A., SOUSA N. DA C., SAMPAIO D. DE S., SILVA E. M. DA., FUJIMOTO R. Y. & BARROS F. A. L., (2020). Effect of different smoking

processes on the sensory and chemical attributes of two shrimps native to Brazil *Research, Society and Development*, **9** (11) : p. e85591110460-e85591110460. DOI : 10.33448/rsd-v9i11.10460

COSTELLO C. & OVANDO D., (2019). Status, institutions, and prospects for global capture fisheries *Annual Review of Environment and Resources*, **44** (1) : p. 177-200. DOI : 10.1146/annurev-environ-101718-033310

COTTET-ROUSSELLE C., RONOT X., LEVERVE X. & MAYOL J.-F., (2011). Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes *Cytometry Part A*, **79A** (6) : p. 405-425. DOI : 10.1002/cyto.a.21061

DALVI-ISFAHAN M., JHA P. K., TAVAKOLI J., DARAEI-GARMAKHANY A., XANTHAKIS E. & LE-BAIL A., (2019). Review on identification, underlying mechanisms and evaluation of freezing damage *Journal of Food Engineering*, **255** : p. 50-60. DOI : 10.1016/j.jfoodeng.2019.03.011

DAS M. K. & BALARAM P., (1984). Interactions of the channel forming peptide alamethicin with artificial and natural membranes *Journal of Biosciences*, **6** (4) : p. 337-348. DOI : 10.1007/BF02703892

DEME M. & THIAO D., (2021). Politiques de pêche et innovations adaptatives des pêcheries artisanales sénégalaises *Natures Sciences Sociétés*, **29** (2) : p. 174-184. DOI : 10.1051/nss/2021039

DEMPSEY P. & BANSAL P., (2010). *Air blast freezers and their significance to food freezing: a review* . Dans : *Proceedings of ENCIT 2010*. Uberlandia : Brazil, p. 05-10.

DGAL. & DGCCRF., (2005). Ordre de service d'action *DGAL/SDSSA*, **2015-364**

DIOP M., WATIER D., MASSON P.-Y., DIOUF A., AMARA R., GRARD T. & LENCEL P., (2016). Assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (*Sparus aurata*) by a cytosolic enzyme: Lactate dehydrogenase *Food Chemistry*, **210** : p. 428-434. DOI : 10.1016/j.foodchem.2016.04.136

DIVAKARUNI A. S., ANDREYEV A. Y., ROGERS G. W. & MURPHY A. N., (2018). In situ measurements of mitochondrial matrix enzyme activities using plasma and mitochondrial membrane permeabilization agents *Analytical Biochemistry*, **552** : p. 60-65. DOI : 10.1016/j.ab.2017.09.019

DRAZEN J. C., DUGAN B. & FRIEDMAN J. R., (2013). Red muscle proportions and enzyme activities in deep-sea demersal fishes: red muscle in deep-sea fishes *Journal of Fish Biology*, **83** (6) : p. 1592-1612. DOI : 10.1111/jfb.12268

DUARTE A. M., SILVA F., PINTO F. R., BARROSO S. & GIL M. M., (2020). Quality assessment of chilled and frozen fish—mini review *Foods*, **9** (12) : p. 1739. DOI : 10.3390/foods9121739

DUFLOS G., DERVIN C., MALLE P. & BOUQUELET S., (1999). Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*pleuronectes platessa*) and whiting (*merlangus merlangus*) *Journal of AOAC international*, **82** (6) : p. 1357-1363.

DUFLOS G., LE FUR B., MULAK V., BECEL P. & MALLE P., (2002). Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82** (12) : p. 1341-1345. DOI : 10.1002/jsfa.1195

DUICU O., GHEORGHEOSU D., MIRICA N., TRANCOTA S., CRISTINA D., FIRA-MLADINESCU O. & MUNTEAN D., (2012). High-resolution respirometry with multiple substrates titration in permeabilized myocardial fibers *Revista Medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, **116** (1) : p. 207-213.

EL RAMMOUZ R., ABBOUD J., ABBOUD M., MURR A. E., YAMMINE S. & JAMMAL B., (2013). pH, rigor mortis and physical properties of fillet in fresh water fish: the case of rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) *Journal of Applied Sciences Research*, **9** : p. 5746-5755.

ELIASSON S., ARASON S., MARGEIRSSON B., BERGSSON A. B. & PALSSON O. P., (2019). The effects of superchilling on shelf-life and quality indicators of whole Atlantic cod and fillets *LWT*, **100** : p. 426-434. DOI : 10.1016/j.lwt.2018.10.062

ENGLAND E. M., MATARNEH S. K., MITACEK R. M., ABRAHAM A., RAMANATHAN R., WICKS J., SHI H., SCHEFFLER T. L., OLIVER E. M., HELM E. T. & GERRARD D. E., (2018). Presence of oxygen and mitochondria in skeletal muscle early postmortem *Meat Science*, **139** (97-106) DOI : 10.1016/j.meatsci.2017.12.008

ERIKSON U., MISIMI E. & GALLART-JORNET L., (2011). Superchilling of rested atlantic salmon: different chilling strategies and effects on fish and fillet quality *Food Chemistry*, **127** (4) : p. 1427-1437. DOI : 10.1016/j.foodchem.2011.01.036

ESPINOZA RODEZNO L. A., SUNDARARAJAN S., SOLVAL K. M., CHOTIKO A., LI J., ZHANG J., ALFARO L., BANKSTON J. D. & SATHIVEL S., (2013). Cryogenic and air blast freezing techniques and their effect on the quality of catfish fillets *LWT - Food Science and Technology*, **54** (2) : p. 377-382. DOI : 10.1016/j.lwt.2013.07.005

ETHUIN P., MARLARD S., DELOSIERE M., CARAPITO C., DELALANDE F., VAN DORSSELAER A., DEHAUT A., LENCEL V., DUFLOS G. & GRARD T., (2015). Differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis *Food Chemistry*, **176** : p. 294-301. DOI : 10.1016/j.foodchem.2014.12.065

ETO K., TSUBAMOTO Y., TERAUCHI Y., SUGIYAMA T., KISHIMOTO T., TAKAHASHI N., YAMAUCHI N., KUBOTA N., MURAYAMA S., AIZAWA T., AKANUMA Y., AIZAWA S., KASAI H., YAZAKI Y. & KADOWAKI T., (1999). Role of NADH shuttle system in glucose induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion *Science*, **981-985** : p. 5.

EVANS J. A., (2009). *Frozen Food Science and Technology* . John Wiley & Sons, 369 p. ISBN : 978-1-4443-0233-2

FAO., Page Web : La qualité et son évolution dans le poisson frais - 8. évaluation de la qualité du poisson . https://www.fao.org/3/v7180f/v7180f09.htm Consulté le 21 février 2023

FERNÁNDEZ-SEGOVIA I., FUENTES A., ALIÑO M., MASOT R., ALCAÑIZ M. & BARAT J. M., (2012). Detection of frozen-thawed salmon (*Salmo salar*) by a rapid low-cost method *Journal of Food Engineering*, **113** (2) : p. 210-216. DOI : 10.1016/j.jfoodeng.2012.06.003

FINK B. D., YU L. & SIVITZ W. I., (2019). Modulation of complex II-energized respiration in muscle, heart, and brown adipose mitochondria by oxaloacetate and complex I electron flow *The FASEB Journal*, **33** (11) : p. 11696-11705. DOI : 10.1096/fj.201900690R

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION., Page Web : Rigor in Fish - The Effect on Quality . https://www.fao.org/3/x5914e/x5914e01.htm Consulté le 13 juillet 2022

Page Web : *Sparus aurata* . https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/fr/fr_giltheadseabr.htm Consulté le 14 mars 2022a

Page Web : *Dicentrarchus labrax* . https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/fr/fr_europeanseabass.htm Consulté le 15 avril 2022b

Page Web : *Oncorhynchus mykiss* . https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/fr/fr_rainbowtrout.htm Consulté le 19 juillet 2022c

(2011). *Développement de l'aquaculture. 4. Une approche écosystémique de l'aquaculture.* . Dans : *FAO, Directives techniques pour une pêche responsable. N°5, Suppl. 4.* FAO : Rome, p. 76.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION F., (2020). *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2020* . FAO : Rome, 247 p. ISBN : 978-92-5-132755-5

(2022). *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022* . FAO : Rome, 294 p. ISBN : 978-92-5-136461-1

FRANCE AGRIMER., (2020). *Chiffres-clés des filières pêche et aquaculture en France en 2020* . FranceAgrimer, 41 p.

Page Web : consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture en 2020 . https://www.franceagrimer.fr/filiere-peche-et-aquaculture/Actualites/2021/Consommation-des-produits-de-la-peche-et-de-l-aquaculture-Donnees-2020 Consulté le 22 août 2022

Page Web : Filière pêche et aquaculture . https://www.franceagrimer.fr/Actualite/Filieres/Peche-et-aquaculture/2021/La-filiere-peche-et-aquaculture-en-France-en-2021 Consulté le 22 août 2022a

(2022b). Consommation des produits de la pêche et de l'aqauculture en 2022

FRANCEAGRIMER., Page Web : Prix du lieu - Réseau des Nouvelles des Marchés (RNM) : pêche et aquaculture . https://rnm.franceagrimer.fr/prix?LIEU&12MOIS Consulté le 24 août 2022

FRANCESCHELLI L., BERARDINELLI A., DABBOU S., RAGNI L. & TARTAGNI M., (2021). Sensing technology for fish freshness and safety: a review *Sensors*, **21** (4) : p. 1373. DOI : 10.3390/s21041373

FREDERIK P. M. & BUSING W. M., (1981). Ice crystal damage in frozen thin sections: freezing effects and their restoration *Journal of Microscopy*, **121** (2) : p. 191-199. DOI : 10.1111/j.1365-2818.1981.tb01212.x

FREY T. G. & MANNELLA C. A., (2000). The internal structure of mitochondria *Trends in Biochemical Sciences*, **25** (7) : p. 319-324. DOI : 10.1016/S0968-0004(00)01609-1

FULLER K. M. & ARRIAGA E. A., (2003). Advances in the analysis of single mitochondria *Current Opinion in Biotechnology*, **14** (1) : p. 35-41. DOI : 10.1016/S0958-1669(02)00008-3

GALLUZZI L., ZAMZAMI N., DE LA MOTTE ROUGE T., LEMAIRE C., BRENNER C. & KROEMER G., (2007). Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis *Apoptosis*, **12** (5) : p. 803-813. DOI : 10.1007/s10495-007-0720-1

GANDOTRA R., (2012). Effect of chilling and freezing on fish muscle *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **2** (5) : p. 5-9. DOI : 10.9790/3008-0250509

GARRIDO C., GALLUZZI L., BRUNET M., PUIG P. E., DIDELOT C. & KROEMER G., (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria *Cell Death & Differentiation*, **13** (9) : p. 1423-1433. DOI : 10.1038/sj.cdd.4401950

GÖGELEIN H. & HÜBY A., (1984). Interaction of saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **773** (1) : p. 32-38. DOI : 10.1016/0005-2736(84)90547-9

GONÇALVES A. C., ANTAS S. E. & NUNES M. L., (2007). Freshness and quality criteria of iced farmed senegalese sole (*solea senegalensis*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (9) : p. 3452-3461. DOI : 10.1021/jf0632942

GOSTIMSKAYA I. S., GRIVENNIKOVA V. G., ZHAROVA T. V., BAKEEVA L. E. & VINOGRADOV A. D., (2003). In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria *Analytical Biochemistry*, **313** (1) : p. 46-52. DOI : 10.1016/S0003-2697(02)00534-1

GOUVEIA A., BAJWA E. & KLEGERIS A., (2017). Extracellular cytochrome c as an intercellular signaling molecule regulating microglial functions *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1861** (9) : p. 2274-2281. DOI : 10.1016/j.bbagen.2017.06.017

GRIGORAKIS K., (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review *Aquaculture*, **272** (1-4) : p. 55-75. DOI : 10.1016/j.aquaculture.2007.04.062

GRIGORAKIS K., ALEXIS M. N., TAYLOR K. D. A. & HOLE M., (2002). Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations *International Journal of Food Science and Technology*, **37** (5) : p. 477-484. DOI : 10.1046/j.1365-2621.2002.00604.x

GRIVENNIKOVA V. G., KAPUSTIN A. N. & VINOGRADOV A. D., (2001). Catalytic activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in intact mitochondria *Journal of Biological Chemistry*, **276** (12) : p. 9038-9044. DOI : 10.1074/jbc.M009661200

GRUNERT K. G., BREDAHL L. & BRUNSØ K., (2004). Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector-a review *Meat Science*, **66** (2) : p. 259-272. DOI : 10.1016/S0309-1740(03)00130-X

GUERRERO-CASTILLO S., BAERTLING F., KOWNATZKI D., WESSELS H. J., ARNOLD S., BRANDT U. & NIJTMANS L., (2017). The assembly pathway of mitochondrial respiratory chain complex I *Cell Metabolism*, **25** (1) : p. 128-139. DOI : 10.1016/j.cmet.2016.09.002

GUGLIELMETTI C., MANFREDI M., BRUSADORE S., SCIUTO S., ESPOSITO G., UBALDI P. G., MAGNANI L., GILI S., MARENGO E., ACUTIS P. L. & MAZZA M., (2018). Two-dimensional gel and shotgun proteomics approaches to distinguish fresh and frozen-thawed curled octopus (Eledone cirrhosa) *Journal of Proteomics*, **186** : p. 1-7. DOI : 10.1016/j.jprot.2018.07.017

HAGEN T. M., YOWE D. L., BARTHOLOMEW J. C., WEHR C. M., DO K. L., PARK J.-Y. & AMES B. N., (1997). Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: Membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94** (7) : p. 3064-3069. DOI : 10.1073/pnas.94.7.3064

HALESTRAP A. P., (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of molecular and cellular cardiology*, **46** (6) : p. 821-831. DOI : 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021

HASSAN HADI AL-RUBAI Y., HASSAN K. H. A. & ESKANDDER M. Z., (2020). Drying and salting fish using different methods and their effect on the sensory, chemical and microbial indices *Multidisciplinary Reviews*, **3** : p. e2020003-e2020003. DOI : 10.29327/multi.2020003

HASSOUN A., (2021). Exploring the potential of fluorescence spectroscopy for the discrimination between fresh and frozen-thawed muscle foods *Photochem*, **1** (2) : p. 247-263. DOI : 10.3390/photochem1020015

HASSOUN A. & KAROUI R., (2017). Quality evaluation of fish and other seafood by traditional and nondestructive instrumental methods: Advantages and limitations *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57** (9) : p. 1976-1998. DOI : 10.1080/10408398.2015.1047926

HASSOUN A., SAHAR A., LAKHAL L. & AÏT-KADDOUR A., (2019). Fluorescence spectroscopy as a rapid and non-destructive method for monitoring quality and authenticity of fish and meat products: Impact of different preservation conditions *LWT*, **103** : p. 279-292. DOI : 10.1016/j.lwt.2019.01.021

HAYASHI T., RIZZUTO R., HAJNOCZKY G. & SU T.-P., (2009). MAM : more than just a housekeeper *Trends in Cell Biology*, **19** (2) : p. 81-88. DOI : 10.1016/j.tcb.2008.12.002

HE L. & LEMASTERS J. J., (2001). Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores : a new paradigm of pore structure and function ? *FEBS Letters*, **512** (1-3) : p. 1-7. DOI : 10.1016/S0014-5793(01)03314-2

HERRERO A. M., (2008). Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review *Food Chemistry*, **107** (4) : p. 1642-1651. DOI : 10.1016/j.foodchem.2007.10.014

HOLT W. V., HEAD M. F. & NORTH R. D., (1992). Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing : observations with experimental cryomicroscopye *Biology of reproduction*, (46) : p. 1086-1094.

HOSSEINI M.-J., SHAKI F., GHAZI-KHANSARI M. & POURAHMAD J., (2013). Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach *Metallomics*, **5** (2) : p. 152-166. DOI : 10.1039/c2mt20198d

HUANG X. & AHN D. U., (2019). Lipid oxidation and its implications to meat quality and human health *Food Science and Biotechnology*, **28** (5) : p. 1275-1285. DOI : 10.1007/s10068-019-00631-7

IFREMER., Page Web : Fiche de synthèse de l'ABVT . http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/fiche_synthese_ABVT.pdf Consulté le 1 septembre 2022a

Page Web : Les limites de l'utilisation de l'ABVT . http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/fiche_ensavoirplus_limites_ABVT.pdf Consulté le 1 septembre 2022b

Page Web : La méthode QIM . http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/Fiche_ensavoirplus_QIM_saumon.pdf Consulté le 23 mai 2022a

(2009b). Principales méthodes d'évaluation de la fraîcheur des produits de la mer *Bibliomer*, : p. 6.

Page Web : Bilan 2019 de l'état écologique des poissons pêchés en France métropolitaine . https://wwz.ifremer.fr/content/download/138744/file/CP_halieutique_31012020.pdf Consulté le 24 août 2022

ISO., Page Web : ISO 3960:2017 . https://www.iso.org/fr/standard/71268.html Consulté le 21 février 2023

JAVADOV S. & KARMAZYN M., (2007). Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection *Cellular Physiology and Biochemistry*, **20** (1-4) : p. 1-22. DOI : 10.1159/000103747

JAYARAMAN S., (2005). Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: Comparison of tetramethylrhodamineethylester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580) *Journal of Immunological Methods*, **306** (1) : p. 68-79. DOI : 10.1016/j.jim.2005.07.024

JUAN G., CAVAZZONI M., SÁEZ G. T. & O'CONNOR J.-E., (1994). A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with rhodamine 123 and flow cytometry *Cytometry*, **15** (4) : p. 335-342. DOI : 10.1002/cyto.990150409

KAALE L. D., EIKEVIK T. M., RUSTAD T. & KOLSAKER K., (2011). Superchilling of food: A review *Journal of Food Engineering*, **107** (2) : p. 141-146. DOI : 10.1016/j.jfoodeng.2011.06.004

KAMIHIRO S., STERGIADIS S., LEIFERT C., EYRE M. D. & BUTLER G., (2015). Meat quality and health implications of organic and conventional beef production *Meat Science*, **100** : p. 306-318. DOI : 10.1016/j.meatsci.2014.10.015

KAROUI R. & BLECKER C., (2011). Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems—a review *Food and Bioprocess Technology*, **4** (3) : p. 364-386. DOI : 10.1007/s11947-010-0370-0

KAROUI R., HASSOUN A. & ETHUIN P., (2017). Front face fluorescence spectroscopy enables rapid differentiation of fresh and frozen-thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets *Journal of Food Engineering*, **202** : p. 89-98. DOI : 10.1016/j.jfoodeng.2017.01.018

KAROUI R., THOMAS E. & DUFOUR E., (2006). Utilisation of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and frozen–thawed fish fillets *Food Research International*, **39** (3) : p. 349-355. DOI : 10.1016/j.foodres.2005.08.007

KAUFFMAN R. F., TAYLOR R. W. & PFEIFFER D. R., (1980). Cation transport and specificity of ionomycin. Comparison with ionophore A23187 in rat liver mitochondria. *The journal of biological chemistry*, **255** (7) : p. 2735-2739. DOI : 10.1016/S0021-9258(19)85799-X

KAUFMANN P., TÖRÖK M., ZAHNO A., WALDHAUSER K. M., BRECHT K. & KRÄHENBÜHL S., (2006). Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63** (19) : p. 2415-2425. DOI : 10.1007/s00018-006-6235-z

KHER S. V., DE JONGE J., WENTHOLT M. T. A., DELIZA R., DE ANDRADE J. C., CNOSSEN H. J., LUIJCKX N. B. L. & FREWER L. J., (2013). Consumer perceptions of risks of chemical and microbiological contaminants associated with food chains: a cross-national study *International Journal of Consumer Studies*, **37** (1) : p. 73-83. DOI : 10.1111/j.1470-6431.2011.01054.x

KIESSLING A., PICKOVA J., JOHANSSON L., ÅSGÅRD T., STOREBAKKEN T. & KIESSLING K.-H., (2001). Changes in fatty acid composition in muscle and adipose tissue of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age *Food Chemistry*, **73** (3) : p. 271-284. DOI : 10.1016/S0308-8146(00)00297-1

KIESSLING A., RUOHONEN K. & BJORNEVIK M., (2006). Muscle fibre growth and quality in fish *Arch. Tierz., Dummerstorf*, **49** : p. 137-146.

KIM J.-S., HE L. & LEMASTERS J. J., (2003). Mitochondrial permeability transition : a common pathway to necrosis and apoptosis *BBRC*, **304** : p. 463-470. DOI : 10.1016/S0006-291X(03)00618-1

KROEMER G., GALLUZZI L. & BRENNER C., (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death *Physiological Reviews*, **87** (1) : p. 99-163. DOI : 10.1152/physrev.00013.2006

KUZNETSOV A. V., JAVADOV S., MARGREITER R., HAGENBUCHNER J. & AUSSERLECHNER M. J., (2022). Analysis of mitochondrial function, structure, and intracellular organization in situ in cardiomyocytes and skeletal muscles *International Journal of Molecular Sciences*, **23** (4) : p. 2252. DOI : 10.3390/ijms23042252

KUZNETSOV A. V., VEKSLER V., GELLERICH F. N., SAKS V., MARGREITER R. & KUNZ W. S., (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells *Nature Protocols*, **3** (6) : p. 965-976. DOI : 10.1038/nprot.2008.61

LAMPL T., CRUM J. A., DAVIS T. A., MILLIGAN C. & MOORE V. D. G., (2015). Isolation and functional analysis of mitochondria from cultured cells and mouse tissue *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (97) : p. e52076. DOI : 10.3791/52076

LAROSA V. & REMACLE C., (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress *Bioscience Reports*, **38** (5) : p. BSR20171492. DOI : 10.1042/BSR20171492

LARSEN S., WRIGHT-PARADIS C. & GNAIGER E., (2012). Cryopreservation of human skeletal muscle impairs mitochondrial function *Cryo Letters*, **33** (3) : p. 170-176.

LASORSA F. M., PINTON P., PALMIERI L., FIERMONTE G., RIZZUTO R. & PALMIERI F., (2003). Recombinant expression of the ca^{2+}-sensitive aspartate/glutamate carrier increases mitochondrial ATPproduction in agonist-stimulated chinese hamster ovary cells *The journal of Biological Chemistry*, DOI : 10.1074/jbc.M304988200

LE GRANDOIS J., RUAS M., KALISA P., JOLISSAINT M., MARCHIONI E., AOUDE-WERNER D., LE FUR B. & ENNAHAR S., (2013). Detection of cold chain abuse in frozen and chilled salmon using the comet assay *LWT - Food Science and Technology*, **54** (1) : p. 242-248. DOI : 10.1016/j.lwt.2013.05.025

LEBAIL A., CHEVALIER D., MUSSA D. M. & GHOUL M., (2002). High pressure freezing and thawing of foods : a review *International Journal of Refrigeration*, **25** : p. 504-513. DOI : 10.1016/S0140-7007(01)00030-5

LEE H. C. & WEI Y. H., (2012). *Mitochondria and aging* . Dans : *Advances in Mitochondrial Medicine*. Springer Netherlands : Dordrecht, p. 311-327.

LEI T., GUO N., TAN M. & LI Y., (2014). Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, **34** (1) : p. 99-102. DOI : 10.1007/s11596-014-1238-8

LEMASTERS J. J., (1999). Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis DOI : 10.1152/ajpgi.1999.276.1.G1

LENAZ G., (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1366** (1) : p. 53-67. DOI : 10.1016/S0005-2728(98)00120-0

LENAZ G., TIOLI G., FALASCA A. I. & GENOVA M. L., (2016). Complex I function in mitochondrial supercomplexes *Biochimica et Biophysica Acta*, **1857** (7) : p. 991-1000. DOI : 10.1016/j.bbabio.2016.01.013

LEVERVE X. M. & FONTAINE E., (2001). Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ *IUBMB Life*, **52** (3-5) : p. 221-229. DOI : 10.1080/15216540152846037

LI B. & SUN D.-W., (2002). Novel methods for rapid freezing and thawing of foods – a review *Journal of Food Engineering*, **54** (3) : p. 175-182. DOI : 10.1016/S0260-8774(01)00209-6

LI D., ZHU Z. & SUN D.-W., (2018). Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review *Trends in Food Science & Technology*, **75** : p. 46-55. DOI : 10.1016/j.tifs.2018.02.019

LI N., RAGHEB K., LAWLER G., STURGIS J., RAJWA B., MELENDEZ J. A. & ROBINSON J. P., (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production *Journal of Biological Chemistry*, **278** (10) : p. 8516-8525. DOI : 10.1074/jbc.M210432200

LISITSYN A. B., CHERNUKHA I. M. & LUNINA O. I., (2019). To the question about meat freezing. Review *Theory and practice of meat processing*, **4** (2) : p. 27-31. DOI : 10.21323/2414-438X-2019-4-2-27-31

LISTRAT A., LEBRET B., LOUVEAU I., ASTRUC T., BONNET M., LEFAUCHEUR L., PICARD B. & BUGEON J., (2016). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality *The Scientific World Journal*, **2016** : p. 1-14. DOI : 10.1155/2016/3182746

LU M., ZHOU L., STANLEY W. C., CABRERA M. E., SAIDEL G. M. & YU X., (2008). Role of the malate-aspartate shuttle on the metabolic response to myocardial ischemia *Journal of Theoretical biology*, **254** : p. 466-475. DOI : 10.1016/j.jtbi.2008.05.033

LUO X., BUDIHARDJO I., ZOU H., SLAUGHTER C. & WANG X., (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors *Cell*, **94** : p. 481-490. DOI : 10.1016/S0092-8674(00)81589-5

LUTHER P. K., MUNRO P. M. G. & SQUIRE J. M., (1995). Muscle ultrastructure in the releost fish *Micron*, **26** (5) : p. 431-459. DOI : 10.1016/0968-4328(95)00015-1

MAGNUSSEN O. M., HAUGLAND A., TORSTVEIT HEMMINGSEN A. K., JOHANSEN S. & NORDTVEDT T. S., (2008). Advances in superchilling of food – Process characteristics and product quality *Trends in Food Science & Technology*, **19** (8) : p. 418-424. DOI : 10.1016/j.tifs.2008.04.005

MAJOLINI D., TROCINO A., TAZZOLI M. & XICCATO G., (2009). Evolution of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) freshness during storage *Italian Journal of Animal Science*, **8** (sup3) : p. 282-284. DOI : 10.4081/ijas.2009.s3.282

MALACRINO P., ZAPPAROLI G., TORRIANI S. & DELLAGLIO F., (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry *Journal of Microbiological Methods*, **45** (2) : p. 127-134. DOI : 10.1016/S0167-7012(01)00243-3

MARTINO M. N. & ZARITZKY N. E., (1988). Ice crystal size modifications during frozen beef storage *Journal of Food Science*, **53** (6) : p. 1631-1637. DOI : 10.1111/j.1365-2621.1988.tb07802.x

MATHEW M. K. & BALARAM P., (1983a). Alamethicin and related membrane channel forming polypeptides *Molecular and Cellular Biochemistry*, **50** : p. 47-64. DOI : 10.1007/BF00225279

MATHEW M. K. & BALARAM P., (1983b). A helix dipole model for alamethicin and related transmembrane channels *FEBS Letters*, **157** (1) : p. 1-5. DOI : 10.1016/0014-5793(83)81105-3

MATIC S., GEISLER D. A., MØLLER I. M., WIDELL S. & RASMUSSON A. G., (2005). Alamethicin permeabilizes the plasma membrane and mitochondria but not the tonoplast in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow) suspension cells *Biochemical Journal*, **389** (3) : p. 695-704. DOI : 10.1042/BJ20050433

MATTIASSON G., (2004). Flow cytometric analysis of isolated liver mitochondria to detect changes relevant to cell death *Cytometry Part A*, **60A** (2) : p. 145-154. DOI : 10.1002/cyto.a.20024

MATTIASSON G., FRIBERG H., HANSSON M., ELMÉR E. & WIELOCH T., (2003). Flow cytometric analysis of mitochondria from CA1 and CA3 regions of rat hippocampus reveals differences in permeability transition pore activation *Journal of Neurochemistry*, **87** (2) : p. 532-544. DOI : 10.1046/j.1471-4159.2003.02026.x

MAYEVSKY A. & BARBIRO-MICHAELY E., (2009). Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function in vivo *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **41** (10) : p. 1977-1988. DOI : 10.1016/j.biocel.2009.03.012

MAYEVSKY A. & ROGATSKY G. G., (2007). Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **292** (2) : p. C615-C640. DOI : 10.1152/ajpcell.00249.2006

MAZAT J.-P., DEVIN A. & RANSAC S., (2020). Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain *Cellular and Molecular Life Sciences*, **77** (3) : p. 455-465. DOI : 10.1007/s00018-019-03381-1

MAZROUH M. M., (2015). Effects of freezing storage on the biochemical composition in muscles of *Saurida undosquamis* (Richardson, 1848) comparing with imported frozen *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, **3** (2) : p. 295-299.

MENDEZ J., MENDOZA L., CRUZ-TIRADO J. P., QUEVEDO R. & SICHE R., (2019). Trends in application of NIR and hyperspectral imaging for food authentication *Scientia Agropecuaria*, **10** (1) : p. 143-161. DOI : 10.17268/sci.agropecu.2019.01.16

MEYER J. N., LEUTHNER T. C. & LUZ A. L., (2017). Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity *Toxicology*, **391** : p. 42-53. DOI : 10.1016/j.tox.2017.07.019

MICHALEC F.-G., HOLZNER M., BARRAS A., LACOSTE A.-S., BRUNET L., LEE J.-S., SLOMIANNY C., BOUKHERROUB R. & SOUISSI S., (2017). Short-term exposure to gold nanoparticle suspension impairs swimming behavior in a widespread calanoid copepod *Environmental Pollution*, **228** : p. 102-110. DOI : 10.1016/j.envpol.2017.04.084

MILES B., Page Web : Inhibitor and uncouplers of ETC . http://www.dspmuranchi.ac.in/pdf/Blog/Inhibitor%20and%20uncouplers%20of%20ETC.pdf Consulté le 3 octobre 2022

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION., (2009). Arrêté du 21 décembre 2009 relatif aux règles sanitaires applicables aux activités de commerce de détail, d'entreposage et de transport de produits d'origine animale et denrées alimentaires en contenant

Page Web : Mission sur la politique commune des pêches . https://agriculture.gouv.fr/mission-sur-la-politique-commune-des-peches-0 Consulté le 31 août 2022

MONTEIRO M. L. G., MARSICO E. T., MANO S. B., TEIXEIRA C. E., CANTO A. C. V. DA C. S., DE CARVALHO VITAL H. & CONTE-JUNIOR C. A., (2013). Influence of good manufacturing practices on the shelf life of refrigerated fillets of tilapia (*Oreochromis niloticus*) packed in modified atmosphere and gamma-irradiated *Food Science & Nutrition*, **1** (4) : p. 298-306. DOI : 10.1002/fsn3.41

NAKAZAWA N., WADA R., FUKUSHIMA H., TANAKA R., KONO S. & OKAZAKI E., (2020). Effect of long-term storage, ultra-low temperature, and freshness on the quality characteristics of frozen tuna meat *International Journal of Refrigeration*, **112** : p. 270-280. DOI : 10.1016/j.ijrefrig.2019.12.012

NAUSICAA., Page Web : La colonne d'eau : qu'est-ce que c'est ? qui y vit et à quelle profondeur ? . https://www.nausicaa.fr/article/colonne-deau/ Consulté le 15 septembre 2022

NIETO-ORTEGA S., MELADO-HERREROS Á., FOTI G., OLABARRIETA I., RAMILO-FERNANDEZ G., GONZALEZ SOTELO C., TEIXEIRA B., VELASCO A. & MENDES R., (2021). Rapid Differentiation of Unfrozen and Frozen-Thawed Tuna with Non-Destructive Methods and Classification Models: Bioelectrical Impedance Analysis (BIA), Near-Infrared Spectroscopy (NIR) and Time Domain Reflectometry (TDR) *Foods*, **11** (1) : p. 55. DOI : 10.3390/foods11010055

NIKIFOROVA A. P., (2020). The use of fermentation for rational processing of fish: a review *Limnology and Freshwater Biology*, : p. 735-736. DOI : 10.31951/2658-3518-2020-A-4-735

OTTAVIAN M., FASOLATO L., FACCO P. & BAROLO M., (2013). Foodstuff authentication from spectral data: Toward a species-independent discrimination between fresh and frozen–thawed fish samples *Journal of Food Engineering*, **119** (4) : p. 765-775. DOI : 10.1016/j.jfoodeng.2013.07.005

PACQUIT A., LAU K. T., MCLAUGHLIN H., FRISBY J., QUILTY B. & DIAMOND D., (2005). Development of volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage *Talanta*, **69** (2) : p. 515-520. DOI : 10.1016/j.talanta.2005.10.046

PAPAHARISIS L., TSIRONI T., DIMITROGLOU A., TAOUKIS P. & PAVLIDIS M., (2019). Stress assessment, quality indicators and shelf life of three aquaculture important marine fish, in relation to harvest practices, water temperature and slaughter method *Aquaculture Research*, **50** (9) : p. 2608-2620. DOI : 10.1111/are.14217

PARADIES G., PETROSILLO G., PISTOLESE M., DI VENOSA N., SERENA D. & RUGGIERO F. M., (1999). Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion *Free Radical Biology and Medicine*, **27** (1) : p. 42-50. DOI : 10.1016/S0891-5849(99)00032-5

PARLAPANI F. F., MALLOUCHOS A., HAROUTOUNIAN S. A. & BOZIARIS I. S., (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions *International Journal of Food Microbiology*, **189** : p. 153-163. DOI : 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.006

PARLEMENT EUROPEEN., (2004). Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale *OJ L*, **139**

(2011). Règlement (UE) no 1169/2011

(2013). Règlement (UE) N°1379/2013 du parlement européen et du conseil du 11 décembre 2013

(2022). règlement délégué (UE) 2022/2258 de la commission du 9 septembre 2022 **OJ L**

PEGG D. E., (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs *Cryobiology*, **60** : p. S36-S44. DOI : 10.1016/j.cryobiol.2010.02.003

PETERSON C. M., JOHANNSEN D. L. & RAVUSSIN E., (2012). Skeletal muscle mitochondria and aging: a review *Journal of Aging Research*, **2012** : p. e194821. DOI : 10.1155/2012/194821

PETIT J.-M., MAFTAH A., RATINAUD M.-H. & JULIEN R., (1992). 10N-Nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria *European Journal of Biochemistry*, **209** (1) : p. 267-273. DOI : 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17285.x

PETIT P. X., (1992). Flow cytometric analysis of rhodamine 123 fluorescence during modulation of the membrane potential in plant mitochondria *Plant Physiology*, **98** (1) : p. 279-286. DOI : 10.1104/pp.98.1.279

PETIT P. X., O'CONNOR J. E., GRUNWALD D. & BROWN S. C., (1990). Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications *European Journal of Biochemistry*, **194** (2) : p. 389-397. DOI : 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15632.x

PICARD M., HEPPLE R. T. & BURELLE Y., (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **302** : p. C629-C641. DOI : 10.1152/ajpcell.00368.2011

PICARD M., RITCHIE D., WRIGHT K. J., ROMESTAING C., THOMAS M. M., ROWAN S. L., TAIVASSALO T. & HEPPLE R. T., (2010). Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers: Mitochondrial function in senescent skeletal muscle *Aging Cell*, **9** (6) : p. 1032-1046. DOI : 10.1111/j.1474-9726.2010.00628.x

PICARD M., TAIVASSALO T., GOUSPILLOU G. & HEPPLE R. T., (2011). Mitochondria: isolation, structure and function: Mitochondria: isolation, structure and function *The Journal of Physiology*, **589** (18) : p. 4413-4421. DOI : 10.1113/jphysiol.2011.212712

PINTO L., DIAZ NIETO C. H., ZON M. A., FERNANDEZ H. & DE ARAUJO M. C. U., (2016). Handling time misalignment and rank deficiency in liquid chromatography by multivariate curve resolution: Quantitation of five biogenic amines in fish *Analytica Chimica Acta*, **902** : p. 59-69. DOI : 10.1016/j.aca.2015.10.043

PITA C., GAMITO S. & ERZINI K., (2002). Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*) *Journal of Applied Ichthyology*, **18** (2) : p. 81-86. DOI : 10.1046/j.1439-0426.2002.00336.x

PITTIA P. & ANTONELLO P., (2016). *Chapter 2 - Safety by Control of Water Activity: Drying, Smoking, and Salt or Sugar Addition* . Dans : *Regulating safety of traditional and ethnic foods*. , p. 7-28.

PLÁŠEK J., BABUKA D. & HOEFER M., (2017). H^+ translocation by weak acid uncouplers is independent of H+ electrochemical gradient *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **49** (5) : p. 391-397. DOI : 10.1007/s10863-017-9724-x

POLI B. M., PARISI G., SCAPPINI F. & ZAMPACAVALLO G., (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management *Aquaculture International*, **13** (1-2) : p. 29-49. DOI : 10.1007/s10499-004-9035-1

PÖSÖ A. R., (1979). Shuttles for translocation of NADH in isolated liver cells from fed rats during oxidation of xylitol *Acta cheminca scandinavica B*, **33** : p. 93-99.

PRABHAKAR P. K., VATSA S., SRIVASTAV P. P. & PATHAK S. S., (2020). A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations *Food Research International*, **133** : p. 109157. DOI : 10.1016/j.foodres.2020.109157

PROKKOLA J. M., WAGNER A., KOSKINEN E., DEBES P. V., HOUSE A., ÅSHEIM E. R., PRIMMER C. R., PIRINEN E. & AYKANAT T., (2022). Adipose tissue mitochondrial respiration in Atlantic salmon: implications for sex-dependent life-history variation DOI : 10.1101/2022.07.25.501389

PUBCHEM., Page Web : Rhodamine 123 . https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65217 Consulté le 4 octobre 2022a

Page Web : Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate . https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11755725 Consulté le 6 octobre 2022b

QIUXING C., YANYAN W., LAIHAO L., XIANQING Y., YONGQIANG Z. & YUEQI W., (2014). Lipid oxidation during processing of traditional salting fish of yellow croakers. *Journal of Food Safety and Quality*, **5** (12) : p. 4079-4084.

RAMOS P. M., BELL L. C., WOHLGEMUTH S. E. & SCHEFFLER T. L., (2021). Mitochondrial function in oxidative and glycolytic bovine skeletal muscle postmortem *Meat and Muscle Biology*, **5** (1) DOI : 10.22175/mmb.11698

RAMOS P. M., LI C., ELZO M. A., WOHLGEMUTH S. E. & SCHEFFLER T. L., (2020). Mitochondrial oxygen consumption in early *postmortem* permeabilized skeletal muscle fibers is influenced by cattle breed *Journal of Animal Science*, **98** (3) : p. skaa044. DOI : 10.1093/jas/skaa044

RASMUSSON A. G., MØLLER I. M. & WIDELL S., (2022). *Assessment of respiratory enzymes in intact cells by permeabilization with alamethicin* . Dans : *Plant Mitochondria*. , p. 77-84.

REGULSKA-ILOW B., ILOW R., KONIKOWSKA K., KAWICKA A., ROZANSKA D. & BOCHINSKA A., (2013). Fatty acid profile of the fat selected smoked marine fish *Roczniki państwowego zakładu higieny*, **64** (4) : p. 299-307.

REILLY A., (2018). *Overview of food fraud in the fisheries sector* . Dans : *FAO Fisheires and Aquaculture VCircular N°1165*. , p. 32.

RENAULT T. T. & MANON S., (2011). Bax: Addressed to kill *Biochimie*, **93** (9) : p. 1379-1391. DOI : 10.1016/j.biochi.2011.05.013

RESTREPO G., VARELA E., DUQUE J. E., GOMEZ J. E. & ROJAS M., (2019). Freezing, vitrification, and freeze-drying of equine spermatozoa: impact on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, and DNA integrity *Journal of Equine Veterinary Science*, **72** : p. 8-15. DOI : 10.1016/j.jevs.2018.10.006

ROUILLE J., LEBAIL A., RAMASWAMY H. S. & LECLERC L., (2002). High pressure thawing of fish and shellfish *Journal of Food Engineering*, **53** : p. 83-88. DOI : 10.1016/S0260-8774(01)00143-1

SACK M. N., (2006). Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance *Cardiovascular Research*, **72** (2) : p. 210-219. DOI : 10.1016/j.cardiores.2006.07.010

SADOVY Y. J., DONALDSON T. J., GRAHAM T. R., MCGILVRAY F., MULDOON G. . J., PHILLIPS M. J., RIMMER M. A., SMITH A. & YEETING B., (2003). *While stocks last: the live reef food fish trade* . Asian Development Bank., Asian Development Bank : Manila, Philippines, 147 p. ISBN : 978-971-561-498-6

SAITO K., AHHMED A., TAKEDA H., KAWAHARA S., IRIE M. & MUGURUMA M., (2007). Effects of a humidity-stabilizing sheet on the color and K value of beef stored at cold temperatures *Meat Science*, **75** (2) : p. 265-272. DOI : 10.1016/j.meatsci.2006.07.011

SALIN K., AUER S. K., REY B., SELMAN C. & METCALFE N. B., (2015). Variation in the link between oxygen consumption and ATP production, and its relevance for animal performance *Proceedings of the royal society B*, **282** : p. 20151028. DOI : 10.1098/rspb.2015.1028

SALIU J., (2008). Effect of smoking and frozen storage on the nutrient composition of some african fish *Advances in Natural and Applied Sciences*, **2** (1) : p. 16-20.

SCADUTO JR R. C. & GROTYOHANN L. W., (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives *Biophysical Journal*, **76** : p. 469-477. DOI : 10.1016/S0006-3495(99)77214-0

SCHANTZ P. G. & HENRIKSSON J., (1987). Enzyme levels of the NADH shuttle systems: measurements in isolated muscle fibres from humans of differing physical activity *Acta Physiologica Scandinavica*, **129** (4) : p. 505-515. DOI : 10.1111/j.1748-1716.1987.tb08090.x

SCHÖNFELD P., SIEMEN D., KREUTZMANN P., FRANZ C. & WOJTCZAK L., (2013). Interaction of the antibiotic minocycline with liver mitochondria – role of membrane permeabilization in the impairment of respiration *The FEBS Journal*, **280** (24) : p. 6589-6599. DOI : 10.1111/febs.12563

SCUDELLARI M., Page Web : Freezing cells . https://www.the-scientist.com/infographics/freezing-cells-39834 Consulté le 22 août 2022

SHAPIRO H. M., (2000). Membrane potential estimation by flow cytometry *Methods*, **21** (3) : p. 271-279. DOI : 10.1006/meth.2000.1007

SHARPLEY M. S., SHANNON R. J., DRAGHI F. & HIRST J., (2006). Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondria *Biochemistry*, **45** (1) : p. 241-248. DOI : 10.1021/bi051809x

SHEN W., WEI Y., DAUK M., TAN Y., TAYLOR D. C., SELVARAJ G. & ZOU J., (2006). Involvement of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase in modulating the NADH/NAD^+ ratio provides evidence of a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in *arabidopsis The Plant Cell*, **18** (2) : p. 422-441. DOI : 10.1105/tpc.105.039750

SHUMILINA E., MØLLER I. A. & DIKIY A., (2020). Differentiation of fresh and thawed Atlantic salmon using NMR metabolomics *Food Chemistry*, **314** : p. 126227. DOI : 10.1016/j.foodchem.2020.126227

SIERRA V. & OLIVAN M., (2013). Role of mitochondria on muscle cell death and meat tenderization *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, **7** (2) : p. 120-129.

SILEIKYTE J., ROY S., PORUBSKY P., NEUENSWANDER B., WANG J., HEDRICK M., PINKERTON A. B., SALANIWAL S., KUNG P., MANGRAVITA-NOVO A., SMITH L. H., BOURDETTE D. N., JACKSON M. R., AUBÉ J., CHUNG T. D. Y., SCHOENEN F. J., FORTE M. A. & BERNARDI P., (2010). *Small molecules targeting the mitochondrial permeability transition* . Dans : *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. National Center for Biotechnology Information (US) : Bethesda (MD)

ŠIMAT V., BOGDANOVIĆ T., KRŽELJ M., SOLDO A. & MARŠIĆ-LUČIĆ J., (2012). Differences in chemical, physical and sensory properties during shelf life assessment of wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.): Shelf life parameters of wild and farmed gilthead sea bream *Journal of Applied Ichthyology*, **28** (1) : p. 95-101. DOI : 10.1111/j.1439-0426.2011.01883.x

SIMS N. R. & ANDERSON M. F., (2008). Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation *Nature Protocols*, **3** (7) : p. 1228-1239. DOI : 10.1038/nprot.2008.105

SOLDATOV A. A., (2018). The diffusion capacity of the hematoparenchymal barrier in mammalian and marine fish skeletal muscles *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **54** (1) : p. 43-49. DOI : 10.1134/S0022093018010052

SOMERO G. N. & CHILDRESS J. J., (1990). Scaling of atp-supplying enzymes, myofibrillar proteins and buffering capacity in fish muscle: relationship to locomotory habit *Journal of Experimental Biology*, **149** (319-333) : p. 16.

SONE I., SKÅRA T. & OLSEN S. H., (2019). Factors influencing post-mortem quality, safety and storage stability of mackerel species: a review *European Food Research and Technology*, **245** (4) : p. 775-791. DOI : 10.1007/s00217-018-3222-1

SØRENSEN K. M., ARU V., KHAKIMOV B., AUNSKJÆR U. & ENGELSEN S. B., (2018). Biogenic amines: a key freshness parameter of animal protein products in the coming circular economy *Current Opinion in Food Science*, **22** : p. 167-173. DOI : 10.1016/j.cofs.2018.05.014

SORET M., BOUCHENDHOMME T., CLEACH J., JOUY N., CROLA DA SILVA C., DEVIN A., GRARD T. & LENCEL P., (2022). Measurement of fish freshness: Flow cytometry analysis of isolated muscle mitochondria *Food Chemistry*, **373** : p. 131690. DOI : 10.1016/j.foodchem.2021.131690

STEPANOVA A., SHURUBOR Y., VALSECCHI F., MANFREDI G. & GALKIN A., (2016). Differential susceptibility of mitochondrial complex II to inhibition by oxaloacetate in brain and heart *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1857** (9) : p. 1561-1568. DOI : 10.1016/j.bbabio.2016.06.002

STÉPHENNE X., NAJIMI M., NGOC D. K., SMETS F., HUE L., GUIGAS B. & SOKAL E. M., (2007). Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex I *Cell Transplantation*, **16** (4) : p. 409-419. DOI : 10.3727/000000007783464821

ST-PIERRE J., CHAREST P.-M. & GUDERLEY H., (1998). Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss Journal of Experimental Biology*, **201** (21) : p. 2961-2970. DOI : 10.1242/jeb.201.21.2961

STRATEVA M. & PENCHEV G., (2020). Histological, physicochemical and microbiological changes in fresh and frozen/thawed fish *Bulgarian journal of veterinary medicine*, **23** (1) : p. 69-80. DOI : 10.15547/tjs.2020.01.012

STRÄUBER H. & MÜLLER S., (2010). Viability states of bacteria - Specific mechanisms of selected probes *Cytometry Part A*, **77A** (7) : p. 623-634. DOI : 10.1002/cyto.a.20920

SUDJI I., SUBBURAJ Y., FRENKEL N., GARCÍA-SÁEZ A. & WINK M., (2015). Membrane disintegration caused by the steroid saponin digitonin is related to the presence of cholesterol *Molecules*, **20** (11) : p. 20146-20160. DOI : 10.3390/molecules201119682

SULLIVAN K. M. & SOMERO G. N., (1980). Enzyme activities of fish skeletal muscle and brain as influenced by depth of occurrence and habits of feeding and locomotion *Marine Biology*, **60** (2-3) : p. 91-99. DOI : 10.1007/BF00389152

SUNG D. K., CHANG Y. S., KANG S., SONG H. Y., PARK W. S. & LEE B. H., (2010). Comparative evaluation of hypoxic–ischemic brain injury by flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential with JC-1 in neonatal rats *Journal of Neuroscience Methods*, **193** (2) : p. 232-238. DOI : 10.1016/j.jneumeth.2010.08.020

SVÅSAND T., CROSETTI D., GARCÍA-VÁZQUEZ E. & VERSPOOR E., (2007). *Genetic impact of aquaculture activities on native populations* . Dans : *Genimpact. Final report*. , p. 1-173.

SVENDSEN E. S., WIDELL K. N., TVEIT G. M., NORDTVEDT T. S., UGLEM S., STANDAL I. & GREIFF K., (2022). Industrial methods of freezing, thawing and subsequent chilled storage of whitefish *Journal of Food Engineering*, **315** : p. 110803. DOI : 10.1016/j.jfoodeng.2021.110803

SZABADKAI G. & DUCHEN M. R., (2008). Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling *Physiology*, **23** : p. 84-94. DOI : 10.1152/physiol.00046.2007

T TRUONGHUYNH, H. & LI TB., (2019). Quality of Aquatic Products via Cryogenic Freezing *Journal of Food Science and Nutrition Research*, **02** (04) DOI : 10.26502/jfsnr.2642-11000032

TAN M., YE J., CHU Y. & XIE J., (2021). The effects of ice crystal on water properties and protein stability of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) *International Journal of Refrigeration*, **130** : p. 242-252. DOI : 10.1016/j.ijrefrig.2021.05.040

TANASUPAWAT S. & VISESSANGUAN W., (2013). *Fish Fermentation* . Dans : Boziaris IS. *Seafood Processing*. John Wiley & Sons, Ltd : Chichester, UK, p. 177-207. DOI : 10.1002/9781118346174.ch8

TANG J., FAUSTMAN C., HOAGLAND T. A., MANCINI R. A., SEYFERT M. & HUNT M. C., (2005). Postmortem oxygen consumption by mitochondria and its effects on myoglobin form and stability *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (4) : p. 1223-1230. DOI : 10.1021/jf048646o

TAVUKCUOGLU S., AL-AZAWI T., KHAKI A. A. & AL-HASANI S., (2012). Is vitrification standard method of cryopreservation *Middle East Fertility Society Journal*, **17** (3) : p. 152-156. DOI : 10.1016/j.mefs.2012.07.007

THORAL E., ROUSSEL D., CHINOPOULOS C., TEULIER L. & SALIN K., (2021). Low oxygen levels can help to prevent the detrimental effect of acute warming on mitochondrial efficiency in fish *Biology Letters*, **17** : p. 20200759. DOI : 10.1098/rsbl.2020.0759

TOLSTOREBROV I., EIKEVIK T. M. & BANTLE M., (2016). Effect of low and ultra-low temperature applications during freezing and frozen storage on quality parameters for fish *International Journal of Refrigeration*, **63** : p. 37-47. DOI : 10.1016/j.ijrefrig.2015.11.003

TSVETKOV T., TSONEV L. & MINKOV I., (1986). A quantitative evaluation of the extent of inner membrane destruction after freezing-thawing based on functional studies *Cryobiology*, **23** (433-439) DOI : 10.1016/0011-2240(86)90028-3

UDDIN M. & OKAZAKI E., (2004). Classification of Fresh and Frozen-thawed Fish by Near-infrared Spectroscopy *Journal of Food Science*, **59** (8) : p. C665-C668. DOI : https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2004.tb18015.x

UDDIN M., OKAZAKI E., TURZA S., YUMIKO Y., TANAKA M. & FUKUDA Y., (2005). Non-destructive visible/NIR spectroscopy for differentiation of fresh and frozen-thawed fish *Journal of Food Science*, **70** (8) : p. c506-c510. DOI : 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11509.x

UEMURA M., TOMINAGA Y., NAKAGAWARA C., SHIGEMATSU S., MINAMI A. & KAWAMURA Y., (2006). Responses of the plasma membrane to low temperatures *Physiologia Plantarum*, **126** (1) : p. 81-89. DOI : 10.1111/j.1399-3054.2005.00594.x

ULLAH J., TAKHAR P. S. & SABLANI S. S., (2014). Effect of temperature fluctuations on ice-crystal growth in frozen potatoes during storage *LWT - Food Science and Technology*, **59** (2) : p. 1186-1190. DOI : 10.1016/j.lwt.2014.06.018

VALENTI D., DE BARI L., DE FILIPPIS B., RICCERI L. & VACCA R. A., (2014). Preservation of mitochondrial functional integrity in mitochondria isolated from small cryopreserved mouse brain areas *Analytical Biochemistry*, **444** : p. 25-31. DOI : 10.1016/j.ab.2013.08.030

VELIOGLU H. M., TEMIZ H. T. & BOYACI I. H., (2015). Differentiation of fresh and frozen-thawed fish samples using Raman spectroscopy coupled with chemometric analysis *Food Chemistry*, **172** : p. 283-290. DOI : 10.1016/j.foodchem.2014.09.073

VENARD R., BRÈTHES D., GIRAUD M.-F., VAILLIER J., VELOURS J. & HARAUX F., (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase *Biochemistry*, **42** (24) : p. 7626-7636. DOI : 10.1021/bi034394t

VENUGOPAL V. & SHAHIDI F., (1996). Structure and composition of fish muscle *Food Reviews International*, **12** (2) : p. 175-197. DOI : 10.1080/87559129609541074

VERCESI A. E., BERNADES C. F., HOFFMANN M. E., GADELHA F. R. & DOCAMPO R., (1991). Digitonin permeabilization does not affet mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ *Journal of Biological Chemistry*, **266** (22) : p. 14431-14434.

VINOGRADOV A. D. & GRIVENNIKOVA V. G., (2001). The mitochondrial complex I: progress in understanding of catalytic properties *IUBMB Life*, **52** (3-5) : p. 129-134. DOI : 10.1080/15216540152845920

WANG C., CHEN H., ZHANG M., ZHANG J., WEI X. & YING W., (2016). Malate-aspartate shuttle inhibitor aminooxyacetic acid leads to decreased intracellular ATP levels and altered cell cycle of C6 glioma cells by inhibiting glycolysis *Cancer letters*, **378** : p. 1-7. DOI : 10.1016/j.canlet.2016.05.001

WANG S. G. & WANG R. Z., (2004). Recent developments of refrigeration technology in fishing vessels *Renewable Energy*, **30** (4) : p. 589-600. DOI : 10.1016/j.renene.2004.03.020

WATERHOUSE N. J., GOLDSTEIN J. C., VON AHSEN O., SCHULER M., NEWMEYER D. D. & GREEN D. R., (2001). Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process *Journal of Cell Biology*, **153** (2) : p. 319-328. DOI : 10.1083/jcb.153.2.319

WEIL C., LEFÈVRE F. & BUGEON J., (2013). Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **23** (2) : p. 157-173. DOI : 10.1007/s11160-012-9288-0

WERNER C., NATTER R., SCHELLANDER K. & WICKE M., (2010). Mitochondrial respiratory activity in porcine longissimus muscle fibers of different pig genetics in relation to their meat quality *Meat Science*, **85** (1) : p. 127-133. DOI : 10.1016/j.meatsci.2009.12.016

WHITE K., CHALABY R., LOWE G., BERLIN J., GLACKIN C. & OLABISI R., (2021). Calcein binding to assess mineralization in hydrogel microspheres *Polymers*, **13** (14) : p. 2274. DOI : 10.3390/polym13142274

WOLF S. G., MUTSAFI Y., DADOSH T., ILANI T., LANSKY Z., HOROWITZ B., RUBIN S., ELBAUM M. & FASS D., (2017). 3D visualization of mitochondrial solid-phase calcium stores in whole cells *eLife*, **6** : p. e29929. DOI : 10.7554/eLife.29929

WU L., PU H. & SUN D.-W., (2019). Novel techniques for evaluating freshness quality attributes of fish: A review of recent developments *Trends in Food Science & Technology*, **83** : p. 259-273. DOI : 10.1016/j.tifs.2018.12.002

XIANGGUO X., YISHU L., SHENYIN Y. & GUANGMING C., (2017). A review of fishing vessel refrigeration systems driven by exhaust heat from engines *Applied Energy*, **203** : p. 657-676. DOI : 10.1016/j.apenergy.2017.06.019

YAMADA Y., ITO M., ARAI M., HIBINO M., TSUJIOKA T. & HARASHIMA H., (2020). Challenges in promoting mitochondrial transplantation therapy *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (17) : p. 6365. DOI : 10.3390/ijms21176365

YANG Z., LIU S., SUN Q., ZHENG O., WEI S., XIA Q., JI H., DENG C., HAO J. & XU J., (2022). Insight into muscle quality of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) frozen with liquid nitrogen at different temperatures *Food Chemistry*, **374** : p. 131737. DOI : 10.1016/j.foodchem.2021.131737

YARNPAKDEE S., BENJAKUL S., NALINANON S. & KRISTINSSON H. G., (2011). Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants DOI : 10.1016/j.foodchem.2011.11.139

YING W., (2006). NAD^+ and NADH in cellular functions and cell death *Frontiers in Bioscience*, **11** : p. 3129-3148.

YOSHIDA Y., HOLLOWAY G. P., LJUBICIC V., HATTA H., SPRIET L. L., HOOD D. A. & BONEN A., (2007). Negligible direct lactate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria obtained from red and white rat skeletal muscle *The Journal of Physiology*, **582** (3) : p. 1317-1335. DOI : 10.1113/jphysiol.2007.135095

YU Q., TIAN X., SHAO L., LI X. & DAI R., (2019). Targeted metabolomics to reveal muscle-specific energy metabolism between bovine longissimus lumborum and psoas major during early postmortem periods *Meat Science*, **156** : p. 166-173. DOI : 10.1016/j.meatsci.2019.05.029

ZAMZAMI N., MAISSE C., METIVIER D. & KROEMER G., (2007). Measurement of membrane permeability and the permeability transition of mitochondria *Methods in cell biology*, **80** : p. 327-340. DOI : 10.1016/S0091-679X(06)80016-6

ZANG J., XU Y., XIA W. & REGENSTEIN J. M., (2020). Quality, functionality, and microbiology of fermented fish: a review *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **60** (7) : p. 1228-1242. DOI : 10.1080/10408398.2019.1565491

ZHANG W., MA J. & SUN D.-W., (2020). Raman spectroscopic techniques for detecting structure and quality of frozen foods: principles and aapplications *Critical Rewiews in Food Science and Nutrition*, **61** (16) : p. 2623-2639. DOI : 10.1080/10408398.2020.1828814

ZHOU J., WU X., CHEN Z., YOU J. & XIONG S., (2019). Evaluation of freshness in freshwater fish based on near infrared reflectance spectroscopy and chemometrics *LWT*, **106** : p. 145-150. DOI : 10.1016/j.lwt.2019.01.056

ZOROVA L. D., POPKOV V. A., PLOTNIKOV E. Y., SILACHEV D. N., PEVZNER I. B., JANKAUSKAS S. S., BABENKO V. A., ZOROV S. D., BALAKIREVA A. V., JUHASZOVA M., SOLLOTT S. J. & ZOROV D. B., (2018). Mitochondrial membrane potential *Analytical Biochemistry*, **552** : p. 50-59. DOI : 10.1016/j.ab.2017.07.009

Page Web : Canadian mills opt for FITNIR analyzers . https://www.pulpandpapercanada.com/canadian-mills-opt-for-fitnir-analyzers-1100000232/ Consulté le 21 juillet 2022

Résumé

La consommation de poisson en France a augmenté de 20 % en 20 ans, passant de 19,1 kg/hab/an en 2000 à 23,9 kg/hab/an en 2020. Cette hausse se traduit par une surexploitation de zones traditionnelles de pêche qui ne sont plus suffisantes pour alimenter le marché du frais. Pour pallier ce problème d'approvisionnement, la part de l'aquaculture s'est considérablement développée ces 20 dernières années en passant de 25,7 % à 46 %. L'exploitation de nouvelles zones de pêche de plus en plus éloignées des sites de consommation est aussi une autre alternative à ces problèmes d'approvisionnement.

Si de nombreux produits aquatiques sont connus pour être commercialisés à l'état décongelé, l'alimentation du marché du frais par des produits décongelés constitue une fraude. La mise au point d'un outil fiable de détection des produits congelés/décongelés reste un enjeu majeur pour la filière des produits de la mer. Elle permettrait de détecter les fraudes, la congélation/décongélation pouvant entraîner des modifications au niveau du produit.

La thèse avait pour but d'explorer l'utilisation des mitochondries comme marqueurs de fraîcheur et de décongélation. Les mitochondries sont particulièrement présentes dans le tissu musculaire rouge. C'est pourquoi notre étude s'est concentrée sur ce tissu pour les trois espèces de poissons étudiées : le bar (*Dicentrarchus labrax*), la daurade royale (*Sparus aurata*) et la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss)*. La congélation va entraîner de profondes modifications structurales des mitochondries, avec une altération des membranes externes et internes (visible en microscopie électronique). L'altération des membranes mitochondriales va participer à la perte totale du potentiel mitochondrial des mitochondries isolées. Cette perte du potentiel a été analysée en cytométrie de flux grâce à deux sondes de potentiel : le TMRM et la Rhodamine 123. La perte de potentiel peut cependant être observée sur du filet de poisson frais à J9, ce qui limite l'utilisation de la perte du potentiel comme marqueur de décongélation.

La perméabilisation des mitochondries par le choc congélation/décongélation a été étudiée en mesurant la perméabilité au NADH de mitochondries isolées. Le niveau de perméabilisation a été normalisé en utilisant un perméabilisant : l'alaméthicine. Cette perméabilisation a été suivie par la mesure de la vitesse de consommation du NADH par les mitochondries en spectrophotométrie et l'activation de la consommation de d'oxygène en oxygraphie. La

congélation/décongélation conduit à une perméabilisation au NADH des mitochondries et à une activation des complexes enzymatiques qui se traduit par un regain de consommation d'oxygène.

Pour s'affranchir des étapes d'extraction des mitochondries, ces résultats ont été confirmés sur fibres musculaires. La congélation entraîne une rupture des membranes mitochondriales et des membranes plasmiques. Les fibres musculaires issues du muscle décongelé sont plus perméables au NADH et le consomment donc plus rapidement que les fibres fraîches. Une stimulation plus importante de la consommation d'oxygène par les fibres décongelées est aussi observée.

Le maintien d'une certaine intégrité des mitochondries dans le muscle rouge permet d'explorer les fonctions mitochondriales et de les utiliser comme marqueur de congélation/décongélation des filets de poisson. Ces travaux ont montré que les mitochondries isolées ou présentes dans les fibres de filets frais étaient sensibles à l'action d'un perméabilisant. A l'inverse, les mitochondries et fibres isolées de filets décongelés étaient insensibles à l'alaméthicine. Ceci traduit un niveau élevé d'altération des membranes mitochondriales dans ces produits. Cette technique, qui utilise le muscle rouge, semble efficace pour discriminer les produits aquatiques décongelés des produits frais. Il reste à définir si celle-ci peut s'adapter au muscle blanc des filets de poisson.

Mots-clés : mitochondrie, complexe I, perméabilisation, congélation

Abstract

Fish consumption in France has increased by 20% in 20 years, from 19.1 kg/inhabitant/year in 2000 to 23.9 kg/inhabitant/year in 2020. This increase leads to an overexploitation of traditional fishing areas that are no longer sufficient to supply the fresh market. To overcome this supply problem, the share of aquaculture has grown considerably over the last 20 years, from 25.7% to 46%. The exploitation of new fishing areas that are increasingly far from consumption sites is also another alternative to these supply shortages, which increases travel from fishing to consumer. As a consequence, fraudulent practices of selling frozen/thawed aquatic products in the fresh market often occur. The development of a reliable tool for distinguishing fresh and frozen/thawed products remains a major challenge for the seafood sector.

The thesis aimed to explore the use of mitochondria as a marker of freshness and freezing of fish.

Mitochondria are mostly present in red muscle tissue. Therefore, our study focused on this tissue for the three fish species studied: sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss).* We have found that freezing leads to profound structural changes in mitochondria, with an alteration of the outer and inner membranes (visible in electron microscopy). The alteration of mitochondrial membranes contributes to the total loss of mitochondrial potential of isolated mitochondria. This loss of potential was analyzed in flow cytometry using two potential probes: TMRM and Rhodamine 123. The loss of potential was observed on fresh fish fillet on Day 9, which limits the use of the loss of potential as a marker of freezing.

Mitochondrial permeabilization by freezing/thawing shock was first studied by measuring the NADH permeability of isolated mitochondria. The level of permeabilization was normalized by comparison to permeabilization by a known channel-forming antibiotic alamethicin. This permeabilization was followed by the spectrophotometric measurement of the rate of consumption of NADH by mitochondria and the activation of oxygen consumption by oxygraphy. Freezing/thawing was shown to lead to NADH permeabilization of mitochondria and activation of enzyme complexes which results in increased oxygen consumption.

The results obtained on isolated mitochondria were confirmed on entire muscle fibres, thus allowing to skip the mitochondrial extraction steps. Freezing leads to rupture of mitochondrial membranes and plasma membranes. Muscle fibres from frozen muscle are more permeable to NADH and therefore consume it faster than fresh fibres. A greater stimulation of oxygen consumption by thawed fibers was also observed.

Maintaining a certain integrity of mitochondria in red muscle makes it possible to explore mitochondrial functions and use them as a marker for freezing/thawing fish fillets. This work showed that mitochondria isolated or present in the fibers of fresh fillets were sensitive to the action of a permeabilizer. Conversely, mitochondria and fibres isolated from frozen fillets were insensitive to alamethicin. This reflects a high level of alteration of mitochondrial membranes in these products. This technique, which uses red muscle, appears to be effective in discriminating between frozen aquatic products and fresh products. It is necessary to define whether it can be adapted to the white muscle of fish fillets.

Key words: mitochondria, complex I, permeabilization, freezing